

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

Vias de Sinalização Envolvidas na Regulação Hormonal do Metabolismo de
Células de Sertoli: Papel da Insulina, do IGF-1 e do FSH

Gustavo Monteiro Escott

Porto Alegre, agosto de 2016

Vias de Sinalização Envolvidas na Regulação Hormonal do Metabolismo de Células de Sertoli Humanas e de Ratos: Papel da Insulina, do IGF-1 e do FSH

Gustavo Monteiro Escott

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas: Fisiologia.

Orientadora: Eloísa da Silveira Loss

Coorientador: Pedro Fontes Oliveira

Porto Alegre, agosto de 2016

Learning is experience.
Everything else is just information.

– *Albert Einstein*

À minha família pelo apoio, carinho e amor
dispensados em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Wanderli e Clarice, meus maiores exemplos de vida; pelos valores, apoio e dedicação.

Ao meu irmão, Leonardo, pela amizade e companheirismo de todas as horas.

À Clara, minha namorada, meu amor e minha companheira de todas as horas, por todo amor, carinho, incentivo e por ter sempre acreditado.

À professora Eloísa Loss pela oportunidade, incentivo e ensinamentos que vão muito além da fisiologia.

Ao professor Luciano, pelo apoio e ensinamentos; por ter sido responsável por despertar em mim o interesse e o gosto pela fisiologia.

Ao professor Pedro Fontes Oliveira pelo acolhimento, ensinamentos e pela oportunidade da realização de um sonho.

Aos professores Marco G. Alves, Rosália Sá e Mário Sousa pelo acolhimento e ensinamentos.

À colega Luciana, pela amizade e pelo esforço dedicado para que este trabalho fosse possível.

Aos colegas Alexandre, Rajla, Fernanda, Leticia, Tadeu, Clara e Mônica pela ajuda, amizade e por partilhar o dia-a-dia comigo.

Aos colegas Tito Teles Jesus e Maria João Oliveira por fazerem do meu estágio no exterior uma experiência ainda melhor.

Ao professor Guillermo Federico Wassermann pela herança de pesquisa e saber que construiu.

Aos meus amigos de longa data pela amizade e bons momentos.

Aos órgãos de fomento à pesquisa, CNPq, CAPES e PROPESQ-UFRGS, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| LISTA DE FIGURAS | 10 |
| LISTA DE ABREVIATURAS | 12 |
| RESUMO..... | 13 |
| 1 INTRODUÇÃO | 15 |
| 1.1 Gônadas Masculinas | 15 |
| 1.2 Células de Sertoli | 16 |
| <i>1.2.1 Metabolismo das Células de Sertoli.....</i> | <i>18</i> |
| <i>1.2.2 Regulação Hormonal das Células de Sertoli</i> | <i>21</i> |
| 1.2.2.1 Hormônio Folículo Estimulante (FSH) | 22 |
| 1.2.2.2 Insulina | 25 |
| 1.2.2.3 Fator de Crescimento Semelhante à insulina do tipo 1 (IGF-1)..... | 27 |
| 1.2.2.5 Vias de Sinalização Intracelular | 29 |
| 2 JUSTIFICATIVA | 31 |
| 3 OBJETIVOS..... | 32 |
| 3.1 Objetivo Geral | 32 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 32 |
| 4 HIPÓTESES..... | 33 |
| 5 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 33 |
| 5.1 Animais Experimentais e Desenho Experimental..... | 33 |
| <i>5.1.1 Técnica Eletrofisiológica de Registro Intracelular.....</i> | <i>34</i> |
| <i>5.1.2 Captação de cálcio em testículos inteiros de ratos imaturos</i> | <i>35</i> |
| <i>5.1.3 Transporte de aminoácidos em testículos inteiros de ratos imaturos</i> | <i>36</i> |
| <i>5.1.4 Transporte de glicose em testículos inteiros de ratos imaturos</i> | <i>36</i> |

| | |
|--|-----------|
| 5.1.5 Processamento das amostras para contagem de radioatividade | 37 |
| 5.2 Células de Sertoli Humanas e Desenho Experimental | 38 |
| 5.2.1 Consumo e Produção de Metabólitos..... | 40 |
| 5.2.2 Atividade enzimática | 40 |
| 5.2.3 Western Blot..... | 41 |
| 5.3 Análise Estatística | 42 |
| 5.4 Descarte de Resíduos..... | 42 |
| 5.5 Aspectos Éticos | 43 |
| 6 RESULTADOS | 45 |
| 6.1 Testículos de Ratos Imaturos | 45 |
| 6.1.1 Efeito de diferentes concentrações de IGF-1 sobre o potencial de membrana das células de Sertoli em túbulos seminíferos inteiros de ratos imaturos. | 45 |
| 6.1.2 Efeito de diferentes concentrações de insulina sobre o potencial de membrana e transporte de glicose em testículos inteiros de ratos imaturos..... | 45 |
| 6.1.3 Envolvimento dos canais de cálcio no efeito da insulina sobre o potencial de membrana das células de Sertoli de ratos imaturos. | 46 |
| 6.1.4 Envolvimento da PI3K na estimulação da captação de cálcio pela insulina e IGF-1 em testículos inteiros de ratos imaturos. | 47 |
| 6.1.5 Envolvimento da PI3K na estimulação do transporte de aminoácidos pela insulina e IGF-1 em testículos inteiros de ratos imaturos. | 48 |
| 6.1.6 Envolvimento da PI3K na estimulação do transporte de glicose pela insulina e IGF-1 em testículos inteiros de ratos imaturos. | 48 |
| 6.2 Células de Sertoli Humanas..... | 50 |
| 6.2.1 Efeito do FSH sobre o consumo de glicose e piruvato e a produção de acetato e lactato em células de Sertoli humanas..... | 50 |
| 6.2.2 Efeito do IGF-1 sobre o consumo de glicose e piruvato e a produção de acetato e lactato em células de Sertoli humanas..... | 51 |

| | |
|--|-----------|
| <i>6.2.3 Efeito do FSH sobre a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) em células de Sertoli humanas.....</i> | <i>52</i> |
| <i>6.2.4 Efeito do IGF-1 sobre a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) em células de Sertoli humanas.....</i> | <i>53</i> |
| <i>6.2.5 Efeito do FSH sobre os níveis de proteína dos transportadores de membrana GLUT2 e MCT4 em células de Sertoli humanas.....</i> | <i>54</i> |
| <i>6.2.6 Efeito do IGF-1 sobre os níveis de proteína dos transportadores de membrana GLUT2 e MCT4 em células de Sertoli humanas.....</i> | <i>55</i> |
| <i>6.2.7 Efeito do FSH sobre os níveis de proteína das enzimas fosfofrutocinase (PFK) e LDH em células de Sertoli humanas.....</i> | <i>56</i> |
| <i>6.2.8 Efeito do IGF-1 sobre os níveis de proteína das enzimas PFK e LDH em células de Sertoli humanas.....</i> | <i>57</i> |
| 7 DISCUSSÃO..... | 58 |
| CONCLUSÕES..... | 65 |
| PERSPECTIVAS..... | 66 |
| REFERÊNCIAS..... | 66 |

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Representação esquemática da estrutura anatomo-histológica dos testículos.

Figura 1.2: Proliferação das células de Sertoli em humanos e ratos.

Figura 1.3: Representação esquemática do metabolismo da glicose em células de Sertoli.

Figura 1.4: Representação esquemática do Receptor de FSH.

Figura 1.5: Modelo hipotético da ação do FSH sobre a captação de Ca^{2+} e o transporte de aminoácidos.

Figura 1.6: Evolução dos conceitos em vias de sinalização.

Figura 5.1: Grupos experimentais dos experimentos com testículos de ratos imaturos

Figura 5.2: Grupos experimentais dos experimentos com células de Sertoli humanas

Figura 6.1: Efeito de diferentes concentrações de IGF-1 sobre o potencial de membrana das células de Sertoli em túbulos seminíferos inteiros.

Figura 6.2: Efeito de diferentes concentrações de insulina sobre o potencial de membrana e transporte de glicose em testículos inteiros de ratos de 12 dias de idade.

Figura 6.3: Efeito da insulina sobre o potencial de membrana das células de Sertoli de ratos de 12 dias de idade.

Figura 6.4: Envolvimento da PI3K na ação da insulina e do IGF-1 sobre a captação de Ca^{2+} em testículos inteiros de ratos de 12 dias de idade.

Figura 6.5: Envolvimento da PI3K na ação da insulina e do IGF-1 sobre o transporte de aminoácidos neutros em testículos inteiros de ratos de 12 dias de idade.

Figura 6.6: Envolvimento da PI3K na ação da insulina e do IGF-1 sobre o transporte de glicose em testículos inteiros de ratos de 12 dias de idade.

Figura 6.7: Efeito do FSH sobre o consumo de glicose e piruvato e a produção de acetato e lactato em células de Sertoli humanas cultivadas *in vitro*.

Figura 6.8: Efeito do IGF-1 sobre o consumo de glicose e piruvato e a produção de acetato e lactato em células de Sertoli humanas cultivadas *in vitro*.

Figura 6.9: Efeito do FSH sobre a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) em células de Sertoli humanas cultivadas *in vitro*.

Figura 6.10: Efeito do IGF-1 sobre a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) em células de Sertoli humanas cultivadas *in vitro*.

Figura 6.11: Efeito do FSH sobre os níveis de proteína dos transportadores de membrana GLUT2 e MCT4 em células de Sertoli humanas cultivadas *in vitro*.

Figura 6.12: Efeito do IGF-1 sobre os níveis de proteína dos transportadores de membrana GLUT2 e MCT4 em células de Sertoli humanas cultivadas *in vitro*.

Figura 6.13: Efeito do FSH sobre os níveis de proteína das enzimas fosfofrutocinase (PFK) e LDH em células de Sertoli humanas cultivadas *in vitro*.

Figura 6.14: Efeito do IGF-1 sobre os níveis de proteína das enzimas PFK e LDH em células de Sertoli humanas cultivadas *in vitro*.

Figura 7.1: Representação esquemática da ação hormonal sobre as células de Sertoli através da via da PI3K/PKB.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---|--|
| α : Alfa | HBSS: Hank's balanced salt solution (solução salina de Hank) |
| β : Beta | LH: Hormônio luteinizante |
| γ : Gama | M Ω : MegaOhms |
| δ : Delta | M: Molar |
| Ω : Ohm | MAPK: Proteína cinase ativada por mitógeno |
| μ M: Micromolar | mL: Mililitros |
| $^{45}\text{Ca}^{2+}$: Íon cálcio radioativo | mM: Milimolar |
| Ca^{2+} : Íon cálcio | ms: Milissegundos |
| DM: Diabetes mellitus | mV: MiliVolt |
| FSH: Hormônio folículo estimulante | nA: Nanoampére |
| GLUT: Transportador de glicose | ng/mL: Nanogramas por mililitro |
| GPCR: Receptor acoplado à proteína G | N-terminal: Terminal Amino |
| Hz: Hertz | pH: Potencial hidrogeniônico |
| i: Corrente | PI3K: Fosfatidil inositol-3-cinase |
| IGF-1: Fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1 | PKA: proteína cinase A |
| IGF-1R: Receptor de IGF-1 | PKB: proteína cinase B |
| IGF-2: Fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 2 | RTK: Receptor tirosina-cinase |
| IGFBP: Proteína ligadora de IGF | V: Volts |
| INSR: Receptor de insulina | VDCC: Canais de cálcio dependentes de voltagem |
| KCl: Cloreto de potássio | |

RESUMO

Responsáveis pela produção dos gametas masculinos e pela biossíntese de hormônios essenciais à função reprodutiva masculina, os testículos requerem uma ação hormonal orquestrada para regular seu desenvolvimento e metabolismo, a fim de desenvolver testículos adultos férteis. Três hormônios vêm sendo descritos como indispensáveis para a regulação da fisiologia testicular: FSH, insulina e IGF-1. A sinalização hormonal mediada por receptores de membrana é essencial para a regulação de diversas funções celulares. A maneira como cada interação entre ligante e receptor produz o seu próprio padrão específico de regulação da função celular é uma questão fundamental na biologia. A grande maioria das ações hormonais se dá através da ativação de vias de sinalização intracelular, as quais direcionam a fisiologia celular de acordo com as necessidades dos tecidos e órgãos. O presente trabalho tem como objetivo investigar o envolvimento da via da PI3K/PKB nas ações da insulina e do IGF-1 sobre o potencial de membrana e os transportes de cálcio, aminoácidos e glicose em células de Sertoli de ratos imaturos. Buscamos ainda, identificar os efeitos do FSH e do IGF-1 sobre o metabolismo de células de Sertoli humanas cultivadas *in vitro*, através da análise do consumo e produção de metabólitos, da atividade da lactato desidrogenase (LDH) e da expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo dessas células. Os efeitos estimulantes da insulina e do IGF-1 sobre a captação de cálcio e sobre o transporte de aminoácidos e glicose foram completamente inibidos pela ação do wortmannin, bloqueador da PI3K. O que indica que ambos os hormônios se valem dessa via de sinalização para regular o metabolismo das células de Sertoli de ratos imaturos. Em células de Sertoli humanas, o IGF-1 foi capaz de estimular a produção de lactato por essas células através do aumento da atividade da LDH, enquanto o FSH não apresentou qualquer efeito. Concluímos, que a via de sinalização PI3K/PKB é um importante meio de regulação hormonal do metabolismo das células de Sertoli de ratos imaturos utilizado por FSH, insulina e IGF-1, gerando despolarização da membrana pelo influxo de cálcio e conseqüente aumento no transporte de aminoácidos e glicose. Entretanto, em células de Sertoli humanas adultas, o IGF-1 parece ser um importante regulador do metabolismo celular, embora o FSH, a exemplo do que acontece em testículos de ratos adultos, tem pouco ou nenhum efeito sobre o metabolismo dessas células. Mais estudos

são necessários para identificar as vias de sinalização pelas quais o IGF-1 regula o metabolismo das células de Sertoli.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Gônadas Masculinas

As gônadas masculinas são órgãos pareados, ovoides e encapsulados, chamados de testículos (1). Estes órgãos possuem duas funções essenciais: promovem a produção dos gametas masculinos, os espermatozoides, e a biossíntese de uma série de hormônios esteroides e proteicos essenciais à função reprodutiva masculina (2). Os testículos são constituídos por dois compartimentos funcional e morfologicamente distintos, os quais estão envoltos por uma cápsula de tecido conjuntivo, chamada de túnica albugínea (Figura 1.1). Estes compartimentos configuram as duas unidades funcionais testiculares; uma rede de túbulos seminíferos, onde ocorre a produção e o transporte dos espermatozoides e; um tecido intersticial, composto por células de Leydig, responsáveis por produzir hormônios androgênicos, e por vasos sanguíneos e linfáticos, responsáveis pelo movimento de hormônios, nutrientes e metabólitos para dentro e fora dos testículos (3,4). Os túbulos seminíferos são compostos pelas células germinativas primitivas e células de Sertoli, e eles se apresentam fortemente enrolados e empacotados. Esta característica estrutural dos túbulos os confere uma maior extensão dentro dos testículos e, conseqüentemente, aumenta a quantidade de espermatozoides que o testículo é capaz de produzir. Além disso, estes túbulos seminíferos são ainda revestidos pelas células mioídes peritubulares, que possuem características de células musculares lisas e são responsáveis pela secreção de fatores que interferem na espermatogênese e por contrações rítmicas que estimulam o movimento dos espermatozoides ao longo dos túbulos seminíferos (5).

As células de Sertoli são células grandes e complexas e que se estendem da lâmina basal do túbulo até seu lúmen. Essas células possuem um papel central no desenvolvimento das células germinativas (6). Entre células de Sertoli adjacentes, formam-se junções, próximo à lâmina basal, denominadas junções apertadas. Essas junções formam a barreira hemato-testicular (BHT), a qual impede a passagem de agentes nocivos e complexos imunológicos oriundos do espaço intersticial (5,7). Entretanto, as células de Sertoli e as células de Leydig possuem a habilidade de receber sinais parácrinos e endócrinos e, posteriormente, retransmiti-los de forma apropriada para as células germinativas em desenvolvimento isoladas no ambiente tubular (4).

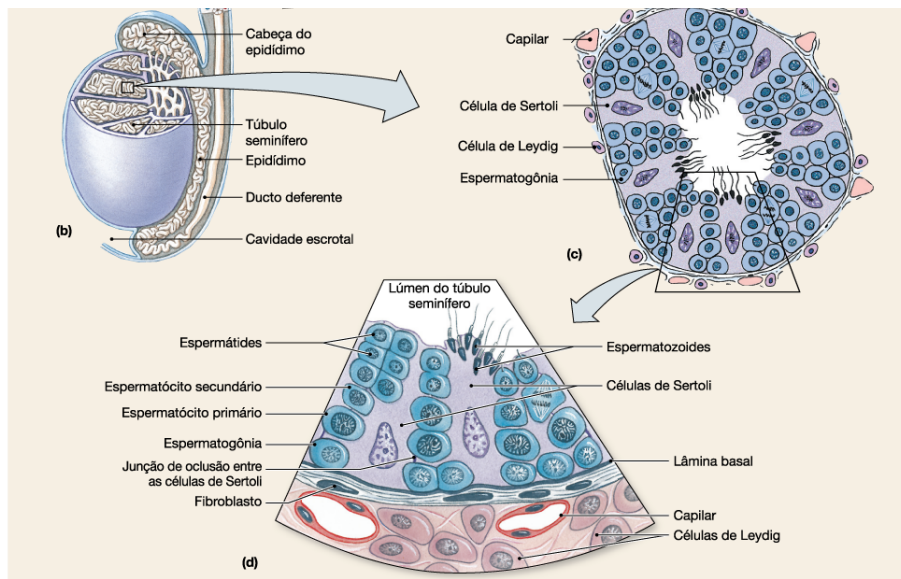


Figura 1.1: Representação esquemática da estrutura anatomo-histológica dos testículos (8).

1.2 Células de Sertoli

As células de Sertoli são células grandes e complexas que contém glicogênio e que se estendem da lâmina basal do túbulo seminífero até seu lúmen. Essas células são o principal componente estrutural dos túbulos seminíferos e são essenciais no desenvolvimento das células germinativas (6). As células de Sertoli possuem junções oclusivas entre células adjacentes, próximo à lâmina basal, denominadas junções apertadas (Figura 1.1d). Essas junções formam a BHT, a qual impede a passagem de agentes nocivos e complexos imunológicos oriundos do tecido intersticial (5,7). Dessa forma, as células de Sertoli são capazes de manter as características específicas do microambiente tubular, criando um ambiente isolado do meio extracelular externo ao túbulo seminífero. O isolamento do ambiente tubular criado pela BHT determina uma relação parácrina e de dependência das células germinativas com as células de Sertoli, nos diferentes estágios de seu desenvolvimento (9–12). Uma vez que o microambiente tubular esteja isolado por meio da barreira, o desenvolvimento das células germinativas depende da capacidade das células de Sertoli em secretar fatores de crescimento, fatores proteicos (como proteínas ligadoras de androgênios e transferrina) e metabólitos, como aminoácidos, vitaminas, acetato e, em especial, o lactato (7,13,14). Assim, a célula de Sertoli suporta o crescimento e a diferenciação das células

germinativas, garantindo a produção adequada dos gametas masculinos (15,16). Uma vez que as células germinativas em desenvolvimento se localizam isoladas no interior do túbulo seminífero, o controle hormonal da espermatogênese é mediado pelas células de Sertoli e de Leydig. Essas últimas, portanto, possuem a habilidade de receber os sinais endócrinos da corrente sanguínea e transmiti-los de forma apropriada para as células germinativas.

Ainda no período fetal, a célula de Sertoli é a primeira célula a se diferenciar a partir da gônada bipotencial. Durante esse período ela promove a formação dos túbulos seminíferos, possibilita a diferenciação de outras células testiculares (17), impede a entrada das células germinativas em meiose e garante a regressão dos ductos de Müller através de secreção do hormônio anti-mülleriano (AMH) (11). O desenvolvimento e a proliferação normais das células de Sertoli são essenciais para uma função testicular adequada na vida adulta. As células de Sertoli se proliferam durante dois períodos distintos da vida (Figura 1.2). Embora esse período de proliferação varie de espécie para espécie (11), em geral essas células se proliferam durante a vida fetal e neonatal e no período pré-puberal em todas as espécies. Em algumas espécies (como nos macacos rhesus) um período pode ter uma representação muito maior que o outro. Entretanto, na maioria das espécies período fetal e neonatal é, provavelmente, o mais importante. Em ratos, não se observa mais mitose das células de Sertoli após os 15 dias de idade e a BHT está completamente formada aos 21 dias de idade (11). Portanto, diz-se que a proliferação das células de Sertoli ocorre durante o período fetal e pré-puberal, que dura até, aproximadamente, os 15 dias de vida do animal (11,18). No entanto, os períodos neonatal e pré-puberal podem se sobrepor nesses animais, ficando difícil diferenciá-los e gerando confusão. Por outro lado, em humanos estes dois períodos estão separados por uma década sendo, portanto, de fácil observação.

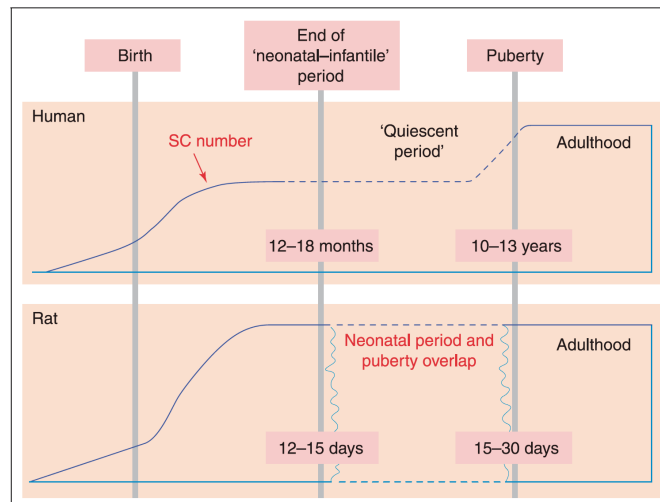


Figura 1.2: Proliferação das células de Sertoli em humanos e ratos (adaptado de Sharpe et al., 11).

Por conta da BHT, as células germinativas em desenvolvimento, especialmente espermatócitos primários e espermatídes, são metabolicamente dependentes das células de Sertoli. A ação hormonal do FSH e da testosterona é o que promove a formação das junções ocludentes entre células de Sertoli adjacentes, dando origem à BHT. À medida que os espermatócitos amadurecem e migram em direção ao lúmen do túbulo, novas junções se desenvolvem enquanto que as antigas se desfazem (7). Por conta da barreira, as células de Sertoli devem suprir as células germinativas com fatores de crescimento, proteínas ligadoras (como proteínas ligadoras de androgênios e transferrina) e substâncias utilizadas como fontes energéticas. Como espermatócitos e espermatídes são incapazes de utilizar glicose como fonte de energia, as células de Sertoli garantem sua principal fonte de energia: o lactato. Assim, a célula de Sertoli controla e promove o crescimento e a diferenciação das células germinativas além de manter a integridade do microambiente tubular (15,19).

1.2.1 Metabolismo das Células de Sertoli

O isolamento e a manutenção das características do microambiente tubular são possíveis pela presença da BHT e devem ser mantidas dentro de limites estreitos, uma vez que disto depende a sobrevivência das células germinativas (9,12). No entanto, o isolamento das células germinativas neste espaço gera uma relação de dependência metabólica destas células com as células de Sertoli (também chamada de cooperação

metabólica). Por este motivo, o metabolismo das células de Sertoli é vital para a manutenção da espermatogênese (20). A capacidade de transportar glicose através da membrana plasmática é uma característica comum a quase todas as células, desde a bactéria mais simples até o neurônio altamente especializado de mamíferos (21). O transporte de glicose através da membrana celular das células de Sertoli é um importante evento para a produção de lactato. O lactato, por sua vez, é o substrato energético preferencial para espermatócitos e espermátides e sua produção se configura como uma das mais importantes funções das células de Sertoli.

As células de Sertoli podem produzir lactato através de diversos substratos, mas utilizam preferencialmente a glicose (Figura 3). Essa produção parece ocorrer mesmo em condições adversas e o transporte de glicose é a primeira de várias etapas necessárias para que haja uma produção adequada de lactato (22). O transporte passivo de glicose é mediado pelos transportadores de glicose (GLUTs), que podem ser modulados por hormônios. Até então já foram identificados 14 genes que codificam diferentes isoformas de GLUTs, sendo os transportadores denominados de GLUT1 a GLUT14. Essas isoformas apresentam sequências similares, mas diferem em sua regulação e em sua distribuição pelos tecidos (22).

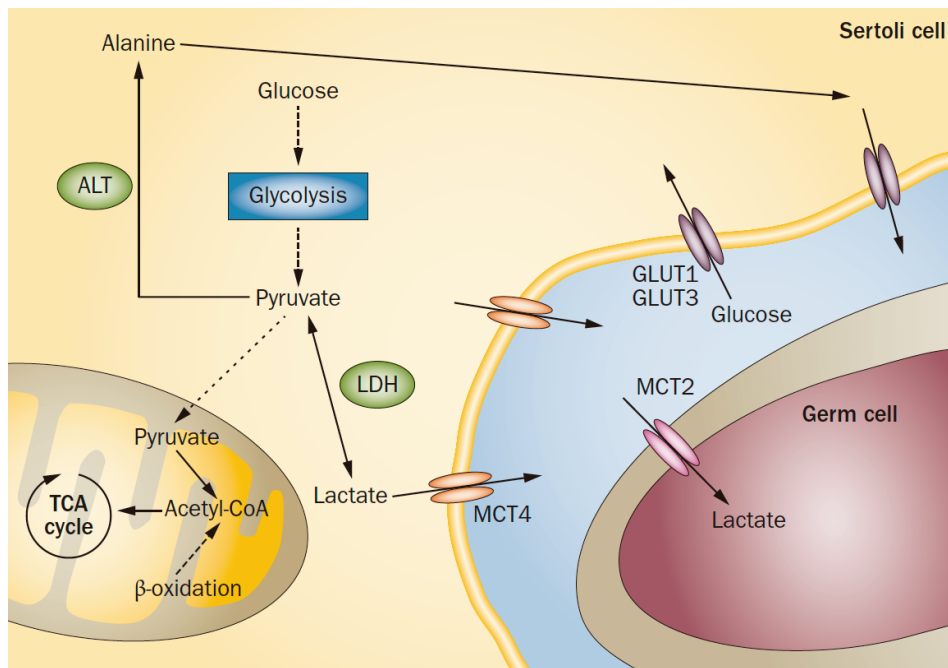


Figura 1.3: Representação esquemática do metabolismo da glicose em células de Sertoli (adaptado de Rato et al., 23).

O GLUT1 parece ter a mais ampla distribuição das isoformas. A expressão dessa isoforma, em geral, é induzida por estímulos de crescimento. Uma consequência do aumento da necessidade de energia e biossíntese requeridas para o processo de divisão celular. Foi demonstrada que sua expressão é alterada por diversos estímulos diferentes, entre eles provenientes da ação do IGF-1 e da insulina. O GLUT3 é bastante expresso em células parenquimais de cérebros adultos (21) e também células testiculares (24). Aparentemente, este transportador também é regulado por hormônios. O GLUT4, apesar de ser o mais sensível à ação da insulina, está presente apenas em músculos e tecido adiposo que, por esse motivo, são chamados de tecidos sensíveis à insulina (21).

Em células de Sertoli, foi descrita a expressão de três isoformas de transportadores de glicose, GLUT1, GLUT3 e GLUT8 (16,22,24,25). Sendo que o GLUT8 não foi localizado na membrana plasmática dessas células, o que exclui a possibilidade desses transportadores participarem do transporte de glicose do meio extracelular para o intracelular. Por outro lado, GLUT1 e GLUT3 já foram descritos na membrana plasmática de células de Sertoli e, possivelmente, esses transportadores estão envolvidos com a incorporação de glicose por essas células (22). Em células de Sertoli humanas foi também demonstrada a expressão de GLUT2, embora sua importância para o metabolismo dessas células ainda não esteja esclarecida (26).

Vários autores (27,28) já descreveram o efeito estimulante de diferentes hormônios sobre o transporte de glicose. Foi demonstrado por Oonk e colaboradores (27) que o IGF-1 e a insulina estimulam o transporte de glicose e a produção de lactato em cultura de células de Sertoli. Também demonstraram que o FSH estimula a produção de lactato, mas não tem nenhuma ação sobre o transporte de hexoses. Os autores postularam que este efeito do FSH deve envolver a estimulação da atividade de enzimas glicolíticas sem alterar a atividade de GLUTs. Entretanto, Riera e colaboradores (29) posteriormente demonstraram que o FSH é sim capaz de estimular o transporte de glicose em células de Sertoli de ratos de 20 dias de idade. Também em ratos imaturos, Mullaney et al. (30) demonstraram que à medida que a célula de Sertoli amadurece, o acúmulo de lactato nesta célula aumenta, alcançando concentrações 5 vezes maiores aos 35 dias de idade em comparação com células de Sertoli de ratos entre 10 e 20 dias de idade. Esse aumento na produção de lactato corresponde a um estado de

diferenciação muito mais elevado das células de Sertoli e sua importância na manutenção do desenvolvimento de células germinativas (30). Em todas as idades testadas o FSH e uma combinação de FSH, insulina, retinol e testosterona (FIRT) aumentaram a produção de lactato. Sendo que, novamente, a produção máxima encontrada foi nas células de ratos de 10 a 20 dias de idade. De maneira semelhante, Wassermann e colaboradores (31), demonstraram que o FSH estimula o transporte de aminoácidos em testículos de ratos imaturos somente durante o período imaturo/proliferativo, não desencadeando qualquer efeito após 20 dias de idade (10). Aparentemente, a redução ou perda da capacidade da célula de Sertoli em responder aos estímulos hormonais ao final do período púbere se deve ao fato da célula ter atingido um estado ideal de diferenciação e um aumento basal de funções específicas.

Adicionalmente, tem sido sugerido que a produção de lactato por células de Sertoli pode ser derivada não apenas do metabolismo de carboidratos, mas também a partir de aminoácidos ou do metabolismo do glicogênio, embora estes processos não estejam completamente compreendidos (23). Pouco se sabe sobre o controle hormonal do metabolismo das células de Sertoli, mas o comprometimento da função testicular descrito em doenças metabólicas como a diabetes mellitus sugerem um importante papel desses hormônios nesse processo. Por isso, a regulação destes processos metabólicos parece ser fundamental e pode ter uma influência direta sobre a fertilidade masculina. Assim, faz-se necessário o aprofundamento do conhecimento sobre o papel desempenhado por hormônios, como insulina, IGF-1 e FSH, no controle do metabolismo das células de Sertoli e no desenvolvimento das células germinativas.

1.2.2 Regulação Hormonal das Células de Sertoli

Os complexos processos de proliferação e diferenciação da célula de Sertoli, bom como a regulação de seu metabolismo, requerem uma ação orquestrada de diferentes hormônios para que haja a formação de um testículo plenamente funcional na vida adulta. Entre os principais reguladores da proliferação, desenvolvimento e metabolismo dessas células incluem-se: FSH, testosterona, insulina, fatores de crescimento semelhante à insulina, hormônios da tireoide e citocinas (Revisado em 31). Estudos em ratos sugerem que a ação hormonal sobre estas células é mais intensa, e talvez mais

importante, durante o período imaturo/proliferativo (30,33). Sabe-se que diferentes hormônios, como a insulina, FSH e fatores de crescimento, além de possuírem importante papel na diferenciação gonadal, sendo indispensáveis para a fase proliferativa das células de Sertoli imaturas, regulam o metabolismo dessas células, estimulando a produção e secreção do lactato e outros metabólitos da glicose (16,27,34).

Cada célula de Sertoli é capaz de suportar um número limitado de células germinativas em desenvolvimento e determinam, portanto, não só o tamanho dos testículos, mas a extensão diária da produção espermatogênica (11). O controle hormonal hipofisário sobre a proliferação dessas células é indispensável para que este processo ocorra adequadamente. A adeno-hipófise, por estímulo hipotalâmico, produz as gonadotrofinas, FSH e LH. Esses hormônios são mais conhecidos por atuarem diretamente no processo da espermatogênese e na produção de esteroides, respectivamente (35–37). Entretanto, o FSH é especialmente importante por ser um dos principais reguladores da taxa de proliferação das células de Sertoli durante a fase imatura/proliferativa dessas células. Recentemente, um estudo em ratos demonstrou que a insulina e o IGF-1 são tão importantes quanto o FSH em regular a proliferação das células de Sertoli (38). Em associação com estes hormônios, os hormônios da tireoide são essenciais na regulação da proliferação das células de Sertoli. Embora não estimulem a proliferação celular diretamente, estes hormônios regulam a duração do período em que a célula de Sertoli será capaz de se proliferar (39). Determinando, assim, o número de células de Sertoli que estarão presentes na vida adulta. Isto porque a maturação destas células envolve a perda de capacidade proliferativa, a formação de junções apertadas entre células de Sertoli e a expressão de funções que não estão presentes nas células de Sertoli imaturas. Na puberdade, quando esses eventos já ocorreram, o papel das células de Sertoli muda e essas células passam a ter como função fundamental o suporte físico e nutricional das células germinativas (9,11).

1.2.2.1 Hormônio Folículo Estimulante (FSH)

O Hormônio Folículo Estimulante (FSH) desempenha um papel primário no controle hormonal da espermatogênese e das funções da célula de Sertoli. O FSH

determina o número das células de Sertoli que estarão presentes em machos adultos através de sua ação sobre o controle da proliferação destas células durante a fase proliferativa (11). Em ratos, quando a proliferação das células de Sertoli deixa de ocorrer, o FSH passa a ter um importante papel na diferenciação destas células, o que é fundamental para o desenvolvimento qualitativo e quantitativo de uma espermatogênese normal no adulto, controlando, portanto, a produção de gametas na vida adulta (9,36).

O FSH é um membro da família dos hormônios glicoproteicos, a qual inclui também o LH, a gonadotrofina coriônica (hCG) e o TSH. Estes hormônios glicoproteicos são heterodímeros ricos em pontes dissulfetos com associações não covalentes entre as subunidades α e β . Os diferentes tipos de hormônios desta família têm a subunidade ou cadeia α comum, diferindo-se na estrutura da subunidade β (40). Juntamente com o LH essa gonadotrofina é produzida e secretada pelos gonadotrofos da glândula hipófise (8,41). Os receptores de FSH pertencem à família dos receptores acoplados a proteína G (GPCR; Figura 1.4), caracterizado por sete α -hélices transmembrana, os quais alternam *loops* intra e extracelulares orientados perpendicularmente à membrana e que contém entre 20-28 aminoácidos. Os *loops* se encerram em um domínio amino-terminal extracelular e um segmento carboxi-terminal intracelular (COOH) (41).

O domínio amino-terminal extracelular possui o sítio de ligação para o FSH. Enquanto a porção intracelular do receptor de FSH está associada às subunidades da proteína G. Quando o ligante se associa ao seu receptor, no terminal extracelular, segue-se a ativação do mesmo através de modificações conformacionais, as quais levam à ligação das alças intracelulares e do terminal COOH com a proteína G heterotrimérica, ativando-a. Apesar da diversidade entre os GPCR, este primeiro estágio parece ser uniforme entre as diversas classes do receptor. A ativação do receptor catalisa a troca de GDP por GTP na subunidade $G\alpha$, quando ocorre a dissociação da proteína G do receptor. Esta troca diminui a afinidade das subunidades $G\alpha$ -GTP e $G\beta\gamma$, que separadas, amplificam a resposta intracelular, cada qual ativando ou inibindo várias moléculas efetoras como enzimas, canais iônicos, entre outros (41). É característica destes receptores, sofrerem dessensibilização após uma contínua exposição ao FSH, sendo este efeito rápido e dependente de dose e tempo. Este fenômeno é conhecido como *downregulation* (42).

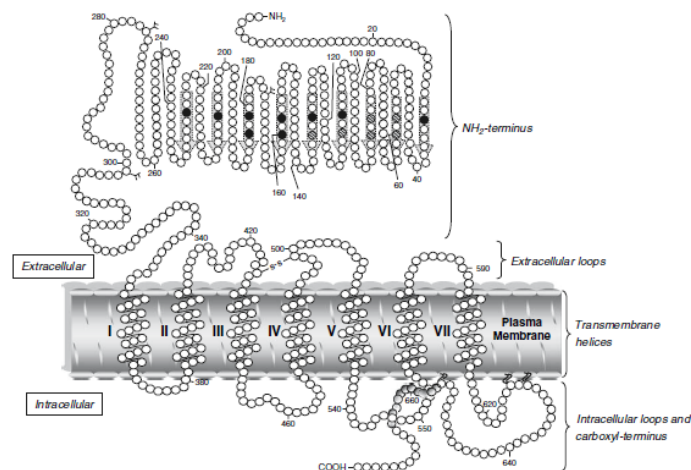


Figura 1.4: Representação esquemática do Receptor de FSH (adaptado de Ulloa-Aguirre et al. ,41).

Após a ligação com seu receptor, o FSH estimula várias vias de sinalização intracelulares através da dissociação da subunidade α das subunidades $\beta\gamma$, sendo que cada subunidade pode deflagrar vias independentes (figura 1.4). Muitos dos efeitos desencadeados pela ação do FSH sobre as células de Sertoli são rápidos, exemplificados pela estimulação da captação de Ca^{2+} através de canais de cálcio dependentes de voltagem (VDCC) em células de Sertoli de ratos imaturos (43,44). A ação eletrofisiológica do FSH na célula de Sertoli de ratos imaturos tem por característica ser bifásica, apresentando uma rápida hiperpolarização (menos de 5 segundos) dependente do aumento de AMPc seguida de uma despolarização prolongada (mais de 6 minutos) de forma independente de AMPc (43). O influxo de cálcio gerado pela despolarização da membrana está diretamente ligado à estimulação do FSH sobre o transporte de aminoácidos nas células de Sertoli de ratos imaturos (45). Essas ações intensificadas do FSH sobre as células de Sertoli imaturas, possivelmente estejam relacionadas com a proliferação dessas células nessa fase do desenvolvimento (11,44). Além disso, o fato de que o FSH regula a produção de lactato em células de Sertoli imaturas sugere que esta seja uma ação ligada à diferenciação dessas células, uma vez que espermátides e espermatócitos não estão presentes nos túbulos seminíferos nesta fase do desenvolvimento (16,46).

Todas estas diferentes ações demonstram uma plasticidade no processo de transdução de sinal do FSH através da sua interação como seu receptor GPCR. Assim, além da estimulação já bem estabelecida sobre a ativação da adenilato ciclase, via G α s, ocorrem outras sinalizações independentes em diferentes fases de desenvolvimento

desta célula. A diversidade da sinalização deflagrada pelo FSH depende do número de receptores presentes na superfície da membrana, da concentração do hormônio no plasma e das isoformas de FSH secretadas (47).

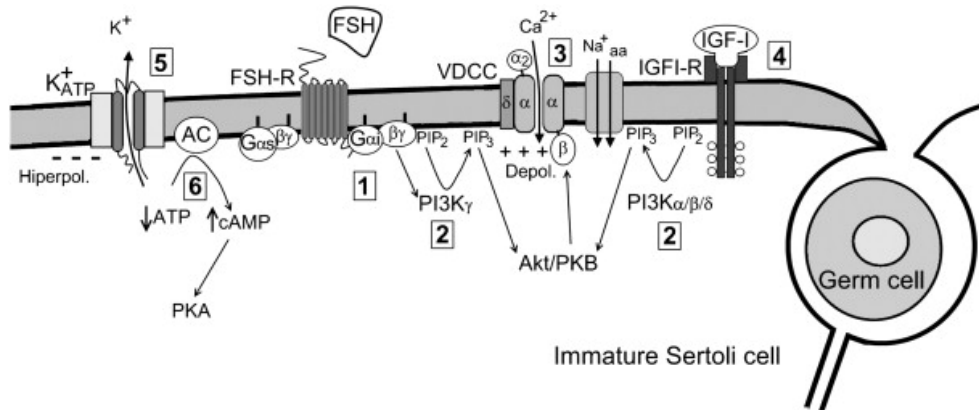


Figura 1.5: Modelo hipotético da ação do FSH sobre a captação de Ca^{2+} e o transporte de aminoácidos (44).

1.2.2.2 Insulina

A insulina é um hormônio anabólico produzido pelas células β pancreáticas e que tem fundamental importância na regulação de diversos processos biológicos. Entre esses processos podemos citar a manutenção da homeostase da glicemia, o metabolismo lipídico e glicídico, a expressão gênica, síntese proteica, além do crescimento, da divisão e da sobrevivência celulares (48). Amplamente reconhecida por seu importante papel no controle da glicemia, a insulina mantém a homeostase da glicose atuando em diferentes alvos, como fígado, músculos e tecido adiposo. Dessa forma, este hormônio regula, por exemplo, a captação periférica da glicose sanguínea e a sua produção hepática através da β -oxidação (8). Além de seus efeitos amplamente difundidos sobre a regulação do metabolismo energético, sabe-se que a insulina também exerce um papel fundamental na formação dos testículos, sendo seu receptor indispensável para o surgimento das gônadas e, portanto, para a diferenciação sexual e a fertilidade masculina (24,49). A insulina também possui importante papel no controle do metabolismo das células de Sertoli. Este hormônio estimula o transporte de glicose e a produção e secreção de lactato, contribuindo assim para a espermatogênese (27,50,51).

Para desencadear seus efeitos a insulina atua através da ligação com seu receptor de membrana (INSR). O INSR pertence a uma família de receptores de fatores de crescimento que têm atividade tirosina cinase intrínseca, na qual se incluem o INSR e o receptor de fatores de crescimento semelhante a insulina do tipo 1 (IGF-1R). Após a ligação da insulina com seu receptor, o mesmo sofre autofosforilação em múltiplos resíduos de tirosina. Isto resulta na ativação da cinase do receptor e consequente fosforilação em tirosina de uma família de substratos do receptor de insulina (IRS). As vias de sinalização decorrentes da ligação da insulina com seu receptor são complexas e demonstram a diversidade de efeitos que esse hormônio pode gerar nas mais diferentes células do organismo (48,52). Entre esses efeitos estão incluídas a regulação da diferenciação, crescimento, sobrevivência e metabolismo celulares (24,52).

Atualmente, dez substratos do receptor de insulina já foram identificados. Quatro desses pertencem à família dos substratos do receptor de insulina, as proteínas IRS. Outros substratos incluem Shc, Gab-1, p60dok, Cbl, JAK2 e APS. Experimentos com camundongos knockout para IRS-1 e IRS-2 recentemente elucidaram suas funções fisiológicas. O animal que não expressa IRS-1 apresenta resistência à insulina e retardo no crescimento, porém sem hiperglicemia. Já aquele camundongo que não apresenta o IRS-2 possui hiperglicemia acentuada com diversas anormalidades na ação da insulina nos tecidos periféricos e a falência da atividade secretória das células β acompanhada de redução significativa da massa de células β pancreáticas. Os fenótipos de camundongos que não expressam IRS-3 e IRS-4 não se apresentam alterados (24,53).

Pitetti e colaboradores (38) demonstraram que a falta dos receptores da família do receptor de insulina (INSR ou IGF-R) em testículos de ratos prejudica substancialmente a proliferação das células de Sertoli. Quando ambos, INSR e IGF-1R, estão ausentes a redução no tamanho dos testículos chega a 75%. A falta desses receptores nas células germinativas não causou efeitos graves sobre a espermatogênese, apenas um pequeno atraso temporal no início da primeira onda espermatogênica. Resultado que reforça a importância da ação destes hormônios sobre a fisiologia das células de Sertoli. Os autores ainda demonstraram que mesmo a ação do FSH, essencial para o desenvolvimento e proliferação da Sertoli, é dependente da presença dos receptores de insulina e IGF-1.

Além disso, Kokk e colaboradores (24) demonstraram a presença de IRS-1 e IRS-2 em testículos de ratos, inclusive nas células de Sertoli. Mais recentemente, Griffeth e colaboradores (54) demonstraram que a presença do IRS-2 é indispensável para o desenvolvimento testicular. Os autores especulam que a ação do IGF-1 sobre a proliferação da célula de Sertoli é, possivelmente, mediada pelo IRS-2. É provável também que a insulina se valha dessa proteína para estimular a proliferação das células de Sertoli. Tanto IRS-1 como IRS-2 parecem estar envolvidos também no processo de transporte de glicose pela célula. Outros hormônios, citocinas e fatores de crescimento que utilizam os IRS, também poderiam valer-se da presença dessas proteínas para estimular o transporte de glicose e a proliferação celular (24).

Em estudos anteriores de nosso laboratório demonstramos que a insulina é também capaz de induzir o transporte de aminoácidos neutros em testículos de ratos imaturos. Os mecanismos pelos quais a insulina atua sobre o transporte de aminoácidos ainda não está totalmente esclarecido. Entretanto, nosso grupo demonstrou também que a ação da insulina gera uma despolarização do potencial de membrana das células de Sertoli dependente do influxo de cálcio (55). Essa ação da insulina é semelhante àquela demonstrada para o FSH (56) e, embora ainda tenha que ser investigada, pode estar relacionada ao mecanismo pelo qual a insulina estimula o transporte de aminoácidos.

1.2.2.3 Fator de Crescimento Semelhante à insulina do tipo 1 (IGF-1)

O IGF-1 ou somatomedina é um peptídeo mitogênico que atua como um regulador positivo na proliferação e diferenciação celular. Primariamente produzido pelo fígado, sob controle do hormônio do crescimento (GH), o IGF-1 é secretado na circulação e transportado por proteínas ligadoras de IGF (IGFBPs), sendo transportados até seus tecidos-alvos. Além desta atuação endócrina, o IGF-1 também pode atuar em diversos tecidos de forma autócrina ou parácrina, podendo agir como regulador de crescimento (15). Nestes casos o IGF-1 pode ser produzido e secretado localmente. Esta ação localizada do IGF-1, bem como o estímulo para sua produção e de suas proteínas ligadoras, originou um conceito chamado de sistema IGF (57,58). Em ambos os casos o IGF-1 atua através da sinalização mediada por seu receptor de membrana (IGF-1R). O

IGF-1R é um receptor do tipo tirosina-cinase, o qual pertence à família do receptor de insulina (RTK classe II) (Figura 3), classe em que estão classificados também o receptor de insulina (INSR) e o IRR (*insulin-related receptor*) (59–62).

As células de Sertoli têm um sistema autócrino completo de IGF-1 com a presença de IGF-1 (secretado pela própria célula por estimulação do FSH), de receptor de IGF-1 (IGF-1R) e ainda com a produção de proteínas ligadoras de IGF, principalmente IGFBP3, que inibe os efeitos de IGF-1 exógeno ao sistema tubular (58,63–65). Dessa forma, a célula de Sertoli possui os componentes necessários para a síntese e a transdução de sinal do IGF-1, bem como para a modulação desse sistema, que pode ser regulado pelo FSH (58,65).

Diversos estudos sugerem que o IGF-1 regula importantes funções testiculares como a proliferação e sobrevivência das células germinativas, a produção de testosterona pelas células de Leydig, e estimulam a atividade das células de Sertoli (15). Em células de Sertoli, o IGF-1 atua regulando seu crescimento, diferenciação, proliferação e suas diversas funções de acordo com o estágio do desenvolvimento da célula. Um estudo realizado por Pitetti e colaboradores (38), demonstrou que a presença dos receptores de IGF-1 nas células de Sertoli é indispensável para a proliferação dessas células e, conseqüentemente, para a formação de um testículo capaz de produzir espermatozoides. Em ratos que não expressam os receptores de IGF-1 o tamanho do testículo é reduzido em aproximadamente 50% em decorrência da diminuição do número de células de Sertoli e os animais eram inférteis (38). Este mesmo estudo sugere ainda, que não só a ação do IGF-1 sobre seu receptor é imprescindível, mas que ele também está envolvido com a capacidade do FSH em estimular a proliferação das células de Sertoli. O IGF-1 é também capaz de estimular o transporte de glicose e a produção e secreção de lactato em células de Sertoli, possivelmente contribuindo para o controle do desenvolvimento e diferenciação dessa célula (33,55,66). Embora essas ações que podem ser executadas tanto por IGF-1 como pelo FSH parecem ser totalmente independentes mesmo que utilizando-se das mesmas vias de sinalização (66).

Foi demonstrado por Jacobus e colaboradores (43), utilizando testículos inteiros de ratos imaturos, que o IGF-1 estimula um despolarização do potencial de membrana das células de Sertoli. Esta ação é dependente do influxo de cálcio através de canais de

cálcio dependentes de voltagem do tipo L. Além disso, nosso grupo de pesquisa demonstrou também que o IGF-1 estimula a captação de cálcio – um importante íon envolvido com a sinalização intracelular e em diversos processos celulares. No mesmo estudo foi também descrita a ação estimulante do IGF-1 sobre o do transporte de aminoácidos, atuando provavelmente na fase de proliferação dessas células durante seu desenvolvimento. Aparentemente as ações do IGF-1 estão intensificadas durante a fase de proliferação da célula de Sertoli (em ratos até os 15 dias de vida), inclusive com sua produção pelas próprias células de Sertoli sendo estimulada pelo FSH, e à medida que o desenvolvimento progride a insulina atua com maior intensidade sobre os receptores tirosina-cinase dessas células (33).

1.2.2.5 Vias de Sinalização Intracelular

A sinalização hormonal mediada por receptores de membrana é essencial para a regulação de diversas funções celulares. A maneira como cada interação entre ligante e receptor produz o seu próprio padrão específico de regulação da função celular é uma questão fundamental na biologia. A identificação de receptores específicos e sistemas de segundo mensageiro, como AMPc, levou à visão clássica de sinalização como uma cascata linear (figura 1.6a). Ao longo do tempo, essa visão clássica da cascata linear evoluiu de modo a refletir a divergência observada em vários passos em uma via de sinalização e a interferência entre as vias de sinalização (figura 1.6b, c). Atualmente, entretanto, é evidente que mesmo este modelo pode não ser suficiente para explicar a complexidade de sinalização celular e o controle integrado das funções celulares (figura 1.6d) (67).

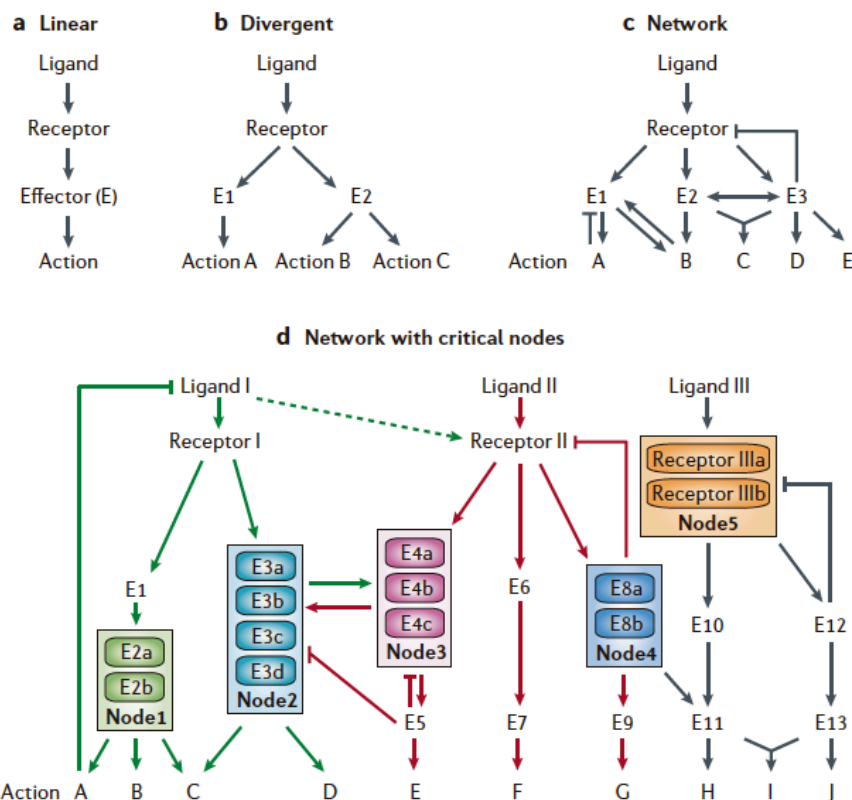


Figura 1.6: Evolução dos conceitos em vias de sinalização (adaptado de Taniguchi et al., 60)

Diversas vias de sinalização já foram descritas como mediadoras da ação hormonal sobre as células de Sertoli. Entre as vias de sinalização mais importantes ativadas pelo FSH e por insulina/IGF-1 em células de Sertoli estão a via PI3K/PKB e a via das MAPK (MEK/ERK) (46,50,66). A via das MAPK (MEK/ERK) retransmite, amplifica e integra os sinais provenientes de uma grande variedade de estímulos e induz uma resposta fisiológica adequada, incluindo a proliferação celular, a diferenciação, o desenvolvimento, respostas inflamatórias e apoptose em células de mamíferos (68). Usualmente, essa via é mais associada à proliferação e sobrevivência celulares, mas sabe-se que ela pode também estar envolvida na regulação do metabolismo celular (22). Por outro lado, a sinalização pela via PI3K/PKB contribui para diversos processos, incluindo a progressão do ciclo celular, crescimento celular, sobrevivência e migração, e transporte vesicular intracelular (69). Entretanto, essa via está intimamente relacionada com processos metabólicos celulares, como a estimulação da translocação das vesículas de GLUT4 em adipócitos (70) e o transporte de glicose (50).

Classicamente, tem-se descrito que a associação do FSH com seu receptor ativa a subunidade G α s elevando a concentração intracelular de AMPc (monofosfato cíclico

de adenosina) que, por sua vez, ativa a PKA (71). Entretanto esse receptor também tem a capacidade de ativar outras vias de sinalização independentes. Já foi demonstrada a presença da subunidade G α i em células de Sertoli de ratos isoladas, em cultura, bem como em túbulos seminíferos inteiros (72,73). Além disso, foi descrito que o FSH ativa a via MEK/ERK através do receptor acoplado às proteínas G α s e G α i, ocorrendo a ativação da via ERK em células de Sertoli em cultura de ratos com 5-11 dias de idade, mas não em células provenientes de ratos com 19 dias de idade (74). Nos ratos com 12 dias de idade, período no qual se inicia a formação da barreira hemato-testicular, os mesmos autores sugerem que este mecanismo possa ocorrer pela ativação cruzada entre a via do AMPc/PKA e da ERK. Curiosamente, em ratos de 19 dias de idade, quando já não há mais proliferação das células de Sertoli, o FSH deixa de estimular a via da ERK, passando a inibi-la (66,74).

Por outro lado, foi demonstrado que o FSH aumenta os níveis de PKB fosforilada de através da ativação da PI3K em células de Sertoli de ratos de 20 dias de idade de forma independente do IGF-1 (46). Ao ativar essa via de sinalização, o FSH induz a secreção de transferrina e lactato e o transporte de glicose pelas células de Sertoli de ratos (46,66). Assim, esses dados demonstram que uma diversidade de fatores é importante para determinar a especificidade da resposta biológica à ação hormonal e não apenas as vias de sinalização ativadas. Dentre esses fatores, podemos incluir as isoformas das moléculas sinalizadoras ativadas, a compartimentalização dessas moléculas e a natureza da ligação entre hormônios e receptores (60,75,76).

2 JUSTIFICATIVA

A sinalização hormonal mediada por receptores de membrana é essencial para a regulação de diversas funções celulares. A maneira como cada interação entre ligante e receptor produz o seu próprio padrão específico de regulação da função celular é uma questão fundamental na biologia. A grande maioria das ações hormonais se dá através da ativação de vias de sinalização intracelular, as quais direcionam a fisiologia celular de acordo com as necessidades dos tecidos e órgãos. O entendimento dos mecanismos de ação hormonal pode levar ao desenvolvimento de novos medicamentos e abordagens terapêuticas em pacientes acometidos por endocrinopatias onde haja a deficiência ou

falta da sinalização hormonal, como é o caso da diabetes mellitus. Dessa forma, o presente trabalho se justifica em aprofundar a compreensão acerca dos efeitos do FSH, da insulina e do IGF-1 sobre as células de Sertoli humanas e de ratos e as vias de sinalização ativadas por esses hormônios.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar o envolvimento da via da PI3K/PKB nas ações da insulina e do IGF-1 sobre as células de Sertoli de ratos imaturos e os efeitos do FSH e do IGF-1 sobre o metabolismo de células de Sertoli humanas cultivadas *in vitro*

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o envolvimento da via PI3K/PKB na resposta despolarizante estimulada por insulina e IGF-1 em células de Sertoli de ratos imaturos.

- Avaliar o envolvimento da via PI3K/PKB na captação de cálcio estimulada por insulina e IGF-1 em células de Sertoli de ratos imaturos.

- Avaliar o envolvimento da via PI3K/PKB no transporte de aminoácidos neutros estimulado por insulina e IGF-1 em células de Sertoli de ratos imaturos.

- Avaliar o envolvimento da via PI3K/PKB no transporte de glicose estimulado por insulina e IGF-1 em células de Sertoli de ratos imaturos.

- Investigar a ação do IGF-1 e do FSH sobre o consumo de glicose e piruvato e a produção de lactato e alanina em células de Sertoli humanas.

- Investigar o envolvimento da isoforma γ da PI3K e da p38 MAPK na ação do IGF-1 e do FSH sobre o consumo de glicose e piruvato e a produção de lactato e alanina em células de Sertoli humanas.

- Investigar a ação do IGF-1 e do FSH sobre a atividade da enzima LDH em células de Sertoli humanas.

- Investigar envolvimento da isoforma γ da PI3K e da p38 MAPK na a ação do IGF-1 e do FSH sobre a atividade da enzima LDH em células de Sertoli humanas.

- Investigar a ação do IGF-1 e do FSH sobre a expressão dos transportadores de glicose GLUT2 e de lactato (MCT) e das enzimas LDH A e PFK em células de Sertoli humanas.

- Investigar o envolvimento da isoforma γ da PI3K e da p38 MAPK na ação do IGF-1 e do FSH sobre a expressão dos transportadores de glicose GLUT2 e de lactato (MCT) e das enzimas LDH A e PFK em células de Sertoli humanas.

4 HIPÓTESES

H_0 – A via da PI3K/PKB não está envolvida na regulação hormonal do metabolismo das células de Sertoli exercida pelo FSH, pela insulina e/ou pelo IGF-1.

H_1 – A via da PI3K/PKB está envolvida na regulação hormonal do metabolismo das células de Sertoli exercida pelo FSH, pela insulina e/ou pelo IGF-1.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais Experimentais e Desenho Experimental

Foram utilizados 72 filhotes (10-20 ratas) machos de 12-15 dias, da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) do ICBS/UFRGS. Os filhotes foram transportados com a mãe do CREAL para o ICBS onde ficaram alojados no biotério setorial das ciências morfológicas. As ratas com os filhotes foram acondicionadas em caixas criadouro com maravalha. As mães receberam ração (Nuvilab, Nuvital CR1, Colombo, PR, Brasil) e água *ad libitum*. Os biotérios setoriais seguem as condições padrão com controle de temperatura em aproximadamente 22°C e ciclo claro/escuro de 12 horas. Os animais permaneceram no biotério em aclimação por no mínimo 72 horas antes da realização dos experimentos, conforme recomendações do *Guidance on the transport of laboratory animals*.

No dia do experimento, os ratos foram retirados da mãe (a qual permaneceu no biotério), acondicionados em caixa com maravalha, e transportados para o laboratório

onde foram imediatamente eutanasiados por deslocamento cervical. Ao final do protocolo dos experimentos e utilização de todos os filhotes a mãe foi eutanasiada. A eutanásia das mães foi efetuada por intoxicação exógena com isoflurano em câmara de eutanásia. Conforme recomendação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2013) o anestésico inalatório (isoflurano) foi embebido em algodão que foi colocado em um recipiente fechado juntamente com o animal. Houve uma separação física entre o animal e o algodão, para evitar o contato direto do animal com o líquido no algodão, fazendo com que o animal fosse exposto apenas ao vapor. A morte dos animais foi confirmada através da avaliação dos seguintes sinais: mucosas pálidas, ausência de movimentos respiratórios (apneia), ausência de batimentos cardíacos (assistolia) confirmada por palpação e ausculta cardíaca por meio de estetoscópio e perda do reflexo corneal, conforme orientação do CONCEA (2013).

Após a eutanásia por deslocamento cervical, os testículos foram removidos por incisão abdominal, limpos, pesados e descapsulados. Posteriormente, foram divididos aleatoriamente entre os 8 grupos experimentais (exceto para os experimentos eletrofisiológicos; Figura 5.1).

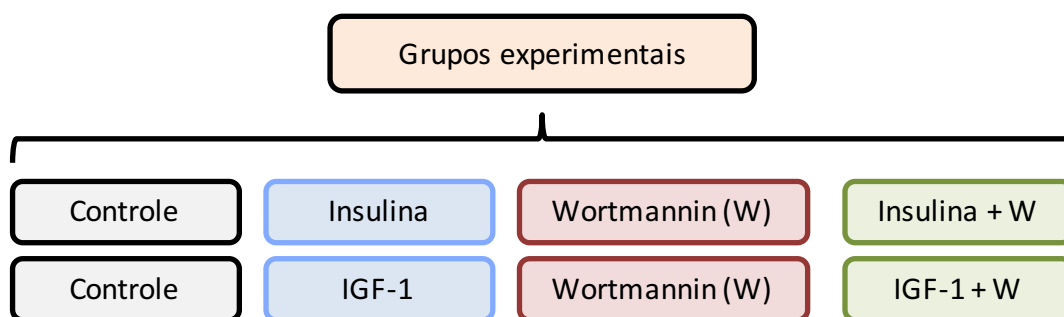


Figura 5.1: Grupos experimentais dos experimentos com testículos de ratos imaturos

5.1.1 Técnica Eletrofisiológica de Registro Intracelular

Após a eutanásia dos animais, os testículos foram imediatamente removidos e colocados em solução salina de Hank (HBSS), pH 7,4 mantida no gelo. Em seguida, os testículos foram descapsulados e cuidadosamente estirados para expor de 5 a 10 túbulos seminíferos que foram fixados no fundo de uma câmara de perfusão com auxílio de uma grade produzida com fio ortodôntico. A preparação foi então levada ao

microscópio invertido e conectada ao sistema de perfusão com HBSS. O HBSS foi mantido em banho a 36 °C para perfundir os túbulos com fluxo de 1 mL/min.

As células de Sertoli foram empaladas com auxílio de um microeletrodo de vidro, sob controle visual. O potencial de membrana das células de Sertoli foi registrado com microeletrodos preenchidos com KCl 3 M produzidos com uma resistência de 15 a 25 MΩ. O microeletrodo estava conectado a um amplificador intracelular (Intra 767, WPI Inc UK) e o sinal foi monitorado por um osciloscópio (Tektronix, 2 Channel Digital Oscilloscope TDS 210). Os traçados observados no osciloscópio foram adquiridos e armazenados em computador através do programa de interface (Wavestar Lite Version 1.0.10). Pulsos quadrados de corrente (0,5 nA, 0,5 Hz e 200 ms) foram aplicados através do eletrodo de registro por um estimulador de pulso de corrente (S48K Astromed, Grass Instruments) para avaliar a resistência da membrana. A insulina foi aplicada topicamente ao banho após a estabilização do potencial de repouso da célula por pelo menos 2 minutos. Os registros da variação do potencial de membrana e da resistência da membrana foram registrados com os diferentes tratamentos. Cada tratamento foi repetido por no mínimo de 5 vezes com diferentes células de diferentes animais.

5.1.2 Captação de cálcio em testículos inteiros de ratos imaturos

A captação de cálcio foi realizada utilizando o isótopo radioativo $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Nestes experimentos, foi utilizado o wortmannin para investigar a participação da via da PI3K na captação de cálcio estimulada por insulina e IGF-1. Os testículos de ratos de 15 dias foram extraídos depois dos animais serem sacrificados por deslocamento cervical. Os testículos foram imediatamente removidos por incisão abdominal, limpos, pesados e descapsulados. Os tecidos foram então separados em tubos controle e experimental, alternadamente esquerda e direita, contendo 1 ml de solução tampão de Hank. Em seguida, foram pré-incubados por 30 minutos em um incubador metabólico Dubnoff em temperatura de 34°C. O período de incubação foi de 2 minutos a partir da aplicação de Hank com $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (73 nCi) com ou sem insulina (580 ng/mL) ou IGF-1 (100 ng/mL). Quando utilizado wortmannin (inibidor da PI3K), este foi adicionado desde o início do período de pré-incubação. Para finalizar a incubação foi adicionado a cada tubo 1 mL de solução salina contendo cloreto de lantânio (LaCl_3) (10 mM) a 0°C, interrompendo o

fluxo de cálcio na preparação (77). Ao final dos experimentos, o sobrenadante foi preservado e congelado, os testículos foram removidos para tubos contendo 1 mL de água destilada e congelados.

5.1.3 Transporte de aminoácidos em testículos inteiros de ratos imaturos

Para avaliar o transporte de aminoácidos neutros foi utilizado como marcador um análogo não metabolizável da alanina, o ácido α -metilaminoisobutírico [$1\text{-}^{14}\text{C}$] (^{14}C]MeAIB). Foi utilizado o wortmannin para investigar a participação da PI3K na estimulação hormonal do transporte de aminoácidos. Os animais foram mortos por deslocamento cervical e os testículos imediatamente removidos por incisão abdominal, limpos, pesados e descapsulados. As gônadas foram colocadas em tubos controle e experimental, alternadamente esquerda e direita, contendo 1 ml de solução tampão de Hank. A seguir, foram pré-incubadas, por 30 minutos, em um incubador metabólico Dubnoff, em temperatura de 34°C. O período de incubação foi de 45 minutos na presença de 0,15 μCi de [^{14}C]MeAIB, com ou sem insulina ou IGF-1. Quando utilizado o bloqueador da PI3K (wortmannin), este foi aplicado antes e durante a incubação. Ao final dos experimentos de transporte de aminoácidos, o meio de incubação foi preservado e congelado, os testículos foram removidos de seu meio de incubação, lavados e, posteriormente, armazenados em tubos contendo também 1 ml de água destilada e congelados.

5.1.4 Transporte de glicose em testículos inteiros de ratos imaturos

O transporte de glicose foi estudado utilizando um análogo não metabolizável da glicose, a 2-deoxi-D-glicose, 2- ^{14}C] (^{14}C]2-DG) (0,050 mCi). Da mesma forma, foi utilizado o wortmannin, bloqueador da via de sinalização da PI3K, para investigar sua participação no transporte de glicose estimulado pelos hormônios. Testículos de ratos de 15 dias foram extraídos depois dos animais serem sacrificados por deslocamento cervical. Os testículos foram imediatamente removidos por incisão abdominal, limpos, pesados e descapsulados. Os tecidos foram então separados em tubos controle e experimental, alternadamente esquerda e direita, contendo 1 ml de solução tampão de

Hank. Em seguida, foram pré-incubados por 30 minutos em um incubador metabólico Dubnoff em temperatura de 34°C. O período de incubação foi de 120 minutos na presença de 0,15 µCi de [¹⁴C]2-DG, com ou sem IGF-1 ou insulina. Quando foi utilizado o bloqueador wortmannin, este foi aplicado 10 minutos antes e durante a incubação. Ao final dos experimentos de transporte de glicose, o meio de incubação foi preservado e congelado, os testículos foram removidos de seu meio de incubação, lavados e, posteriormente, armazenados em tubos contendo também 1 ml de água destilada e congelados.

5.1.5 Processamento das amostras para contagem de radioatividade

Ao final da incubação (referente aos procedimentos 5.1.2 ao 5.1.4), os testículos foram retirados do tampão, secos em papel filtro umedecido em HBSS para remover o excesso de radioativo aderido à superfície externa da amostra, e acondicionados em tubos de vidro com tampa rosca, contendo 1 mL de água destilada. Esses tubos foram congelados a -20°C, durante 24 horas e posteriormente fervidos por 10 minutos para romper a membrana extracelular e obter o equilíbrio entre o líquido intracelular e a água adicionada. Desse meio, foram retiradas alíquotas de 100 µL e colocados em 3 mL de líquido de cintilação. Essas amostras representam o meio intracelular. Do meio de incubação que permaneceu nos tubos de incubação, foram retiradas também alíquotas de 100 µL e colocadas em 3 mL de líquido de cintilação. Essas amostras representam o meio extracelular.

A radioatividade das amostras foi determinada em contas por minuto (cpm) em espectrômetro de cintilação LKB Rack Beta modelo 1215. Os resultados foram expressos pela relação entre radioatividade do tecido (meio interno) e a radioatividade do meio de incubação (meio externo): relação tecido/meio (T/M).

$T/M = [(cpm \text{ interno} \times 1000) / \text{peso do testículo}] / cpm \text{ externo}$ para [¹⁴C]MeAIB e [¹⁴C]2-DG e pmoles de ⁴⁵Ca²⁺ por miligrama de tecido para o cálcio radioativo.

5.2 Células de Sertoli Humanas e Desenho Experimental

O estudo clínico dos pacientes foi realizado no Centro de Genética Reprodutiva Alberto Barros (Porto, Portugal) de acordo com as normas dos comitês de ética locais, nacionais e europeu. As biópsias testiculares foram obtidas de pacientes que procuraram tratamento de fertilidade, após informados por consentimento escrito. Somente foram usadas as células deixadas em placas de cultura após o tratamento de fertilidade. As células de Sertoli humanas foram isoladas a partir de biópsias testiculares de pacientes com anejaculação (psicológica, vasculares, neurológicas) e com a espermatogênese conservada.

Os estudos foram realizados de acordo com a Declaração de Helsinki para pesquisas médicas envolvendo seres humanos. Células testiculares humanas foram isoladas de cinco biópsias testiculares, após seleção, cada biópsia foi cultivada em meio para preparação de sêmen (SPM – Hepes buffer) (Medicult, Mollehaven, Denmark) e mantidas a 32°C com 5% de CO₂ no ar até ser usada conforme previamente descrito em Oliveira et al., (78).

As biópsias testiculares foram lavadas duas vezes em HBSSf (Hanks Balanced Salt Solution, sem Ca²⁺ ou Mg²⁺; Sigma) por centrifugação a 500 g à temperatura ambiente, tal como descrito por Oliveira e colaboradores (79). As células de Sertoli foram obtidas por um método anteriormente descrito (78). Resumidamente, o sedimento resultante foi suspenso em meio de cultura para células de Sertoli (SC; DMEM:Ham's F-12 1:1, contendo 15mM de HEPES, 50 U/ml de penicilina e 50 mg/ml de sulfato de estreptomicina, 0,5 mg/ml de fungizona, 50 ug/ml de gentamicina e 10% de FBS inativado pelo calor) e forçada através de uma agulha 20G, a fim de desagregar aglomerados de células grandes. A concentração de células na suspensão celular obtida a partir do processo descrito acima foi ajustada a 5000 células/mL com meio de cultura SC, semeadas em frascos de cultura Cell+ (Sarsted, Nümbrecht, Alemanha), e incubou-se posteriormente a 30-32°C, 5% CO₂ no ar até serem usadas.

As culturas com contaminantes celulares inferiores a 5% depois de 96h, analisadas por microscopia de contraste de fase, foram usadas. A pureza da cultura de células de Sertoli foi revelada por detecção de imunoperoxidase do hormônio anti-

mülleriano e marcadores específicos de vimentina (80). A fim de excluir a possibilidade de “desdiferenciação” das células de Sertoli em cultura foi avaliada a expressão de RNAm de citoqueratina-18 (CK-18), um filamento intermediário que tem sido demonstrado estar apenas presentes nas células de Sertoli imaturas (81). Nenhuma expressão de CK-18 foi observada antes ou após o tratamento.

As células de Sertoli foram deixadas a crescer até atingirem 90-95% de confluência e, em seguida, lavou-se cuidadosamente e substituiu-se o meio por meio isento de soro suplementado com insulina-transferrina-selenito de sódio (ITS; 10 mg/ml, 5 mg/ml, 5 ug/ml, respectivamente) (DMEM:F12 1:1, pH 7,4). Os frascos foram divididos em 12 grupos (Figura 5.2). A fim de avaliar os efeitos do FSH e do IGF-1 no consumo e produção de metabólitos, sobre a expressão de GLUT1, GLUT3, LDHA e MCT4, o meio SC [grupo Controle] foi suplementado com FSH (4 mU/ml) [Grupo FSH], ou com IGF-1 (100 ng/ml) [Grupo IGF-1]. Para avaliar o envolvimento das vias de sinalização PI3K e MAPK nos efeitos do FSH e do IGF-1, foram adicionados AS-604850 (1 μ M) [Grupo AS] ou SB203580 (10 μ M) [Grupo SB] aos meios (Figura 5.2). Os tratamentos foram realizados durante 24h. Após o tratamento, 250 μ l de meio de cultura foram recolhidos para uma análise de ¹H-RMN. No final, as células foram descoladas do frasco usando uma solução de tripsina-EDTA e recolhidas para extração de proteínas totais. O número total de células por frasco foi determinado com uma câmara de Neubauer e um teste de viabilidade foi realizada sobre as células dos diferentes grupos experimentais utilizando o teste de exclusão com Trypan Blue. Viabilidade média de 85-90%, sempre com valores mais elevados do que 85%.

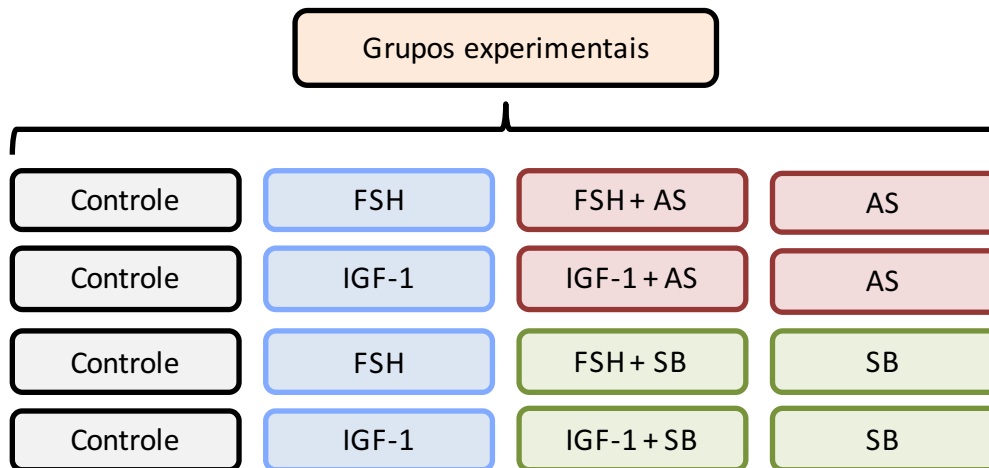


Figura 5.2: Grupos experimentais dos experimentos com células de Sertoli humanas. AS: AS-604850, bloqueador da PI3K γ ; SB: SB203580, bloqueador da via das MAPK.

5.2.1 Consumo e Produção de Metabólitos

Foi realizada espectroscopia por $^1\text{H-NMR}$ (ressonância nuclear magnética) para determinar a variação de metabólitos no meio extracelular de células de Sertoli humanas cultivadas. Os espectros de $^1\text{H-NMR}$ dos meios extracelulares foram adquiridos a 14,1 T, 25°C, utilizando um espectrômetro Bruker Avance 600 MHz equipado com uma sonda QXI 5 mm com um gradiente z (Bruker Biospin, Karlsruhe, Alemanha), utilizando métodos convencionais (82). Foi utilizado o fumarato de sódio como referência interna (singleto, 6,50 ppm) para quantificar os metabólitos em solução (multiplete, ppm): lactato (duplete, 1,33); piruvato (singleto, 2,36); acetato (singleto, 1,9); glicose H1- α (duplete, 5,22). As áreas relativas de ressonâncias de $^1\text{H-NMR}$ foram quantificadas usando a rotina de ajuste de curva fornecida com o programa de análise espectral NUTSpro NMR (Acorn NMR Inc., Fremont, CA).

5.2.2 Atividade enzimática

A atividade da lactato desidrogenase (LDH; EC 1.1.1.27) foi determinada usando um kit comercial (Promega, Madison, USA) com pequenas alterações das instruções do fabricante em cada amostra, conforme descrito em Rato et al. [20]. Resumidamente, o centrifugado celular foi homogeneizado em solução de lise (1x) suplementado com 1% coquetel inibidor de protease, imediatamente antes do uso. Esses lisados foram utilizados como amostras para determinar a atividade total intracelular de LDH. O

método é baseado na liberação de LDH das células lisadas que converte NAD⁺ em NADH e a consequente produção de formazepan na presença de diaforase no meio. A concentração de formazepan na amostra confere uma cor rosada ao meio e é proporcional a quantidade de LDH na amostra. A atividade enzimática foi expressa como unidades por miligrama de proteína.

5.2.3 Western Blot

Amostras de proteínas totais das células de Sertoli em cultura foram extraídas usando Reagente de Extração de Mamíferos (suplementado com 1% de coquetel inibidor de protease e 100 mM de ortovanadato de sódio) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração proteica foi determinada por kit de análise proteica Pierce™ BCA de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C. Após a homogeneização com tampão buffer (1.5% Tris, 20% glicerol, 4.1% SDS, 2% β-mercaptoetanol, 0.02% bromofenol blue, pH 6.8), as proteínas das amostras foram desnaturadas por 10 minutos a 55°C e sonicadas por 15 minutos a 4°C. Em seguida, as amostras foram fracionadas por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12% e eletroforese por 90 minutos em um Mini Trans-Blot® cell (Bio-Rad, Hemel Hempstead, UK). As proteínas foram então transferidas dos géis para membranas de PVDF (polyvinylidene difluoride membranes) previamente ativadas e então bloqueadas por 90 min em solução de leite em pó desnatado 5% a temperatura ambiente. As membranas foram incubadas overnight a 4°C com os anticorpos primários de interesse (Tabela 1) e a imunorreatividade foi detectada separadamente usando os anticorpos secundários (Tabela 1). As membranas foram reagidas com ECF e lidas com auxílio do Bio-Rad GelDoc XR (Bio-Rad, Hemel Hempstead, UK). Foi utilizado o software Quantity One (Bio-Rad, Hemel Hempstead, UK) para obter a densidade das bandas seguindo os procedimentos-padrão. A densidade das bandas foi dividida pela respectiva densidade da banda de β-actina e então normalizada com o valor do grupo controle.

Tabela 1: Anticorpos utilizados para células de Sertoli humanas em cultura

| Anticorpos Primários | Referência | Diluição |
|----------------------|------------|----------|
|----------------------|------------|----------|

| | | |
|-------------------------------|-------------------|-----------------|
| @GLUT2 | SC-9117 | 1:5000 |
| @MCT4 | SC-50329 | 1:1000 |
| @PFK | SC-67028 | 1:400 |
| @LDH A | EP1566y | 1:10000 |
| Anticorpos Secundários | Referência | Diluição |
| Anti-goat | A4187 | 1:5000 |
| Anti-mouse | A3562 | 1:5000 |
| Anti-rabbit | A3687 | 1:5000 |
| Normalizador | Referência | Diluição |
| β -Actina | MAS-15739 | 1:5000 |

5.3 Análise Estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Para a análise estatística utilizamos teste-t de *Student* para comparação entre dois grupos, para os dados da eletrofisiologia, ANOVA de medidas repetidas seguido do pós-teste de Bonferroni e ANOVA de uma ou duas vias para os demais dados. Foi utilizado o programa Graphpad Prism, versão 7.0, para Mac® (Grafada Software, San Diego, Califórnia, USA). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

5.4 Descarte de Resíduos

O descarte dos resíduos não tóxicos foi realizado em esgoto comum. Os resíduos químicos derivados dos experimentos foram acondicionados em frascos e encaminhados ao Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos da UFRGS para o procedimento correto de descarte. Os resíduos radioativos foram descartados ou acondicionados e encaminhados para devido descarte conforme as instruções do Serviço de Proteção Radiológica da UFRGS. As carcaças dos animais e os demais resíduos biológicos foram congelados e entregues ao CREAL do Instituto de Ciências Básicas da UFRGS.

5.5 Aspectos Éticos

De acordo com o Guia de Severidade de Procedimentos Científicos da UFRGS os procedimentos descritos neste trabalho são classificados como “sem recuperação”. Essa classificação reflete o grau de dor, sofrimento, incômodo ou prejuízo a ser experienciado pelo animal durante a execução dos procedimentos.

Todos os procedimentos serão realizados segundo a RESOLUÇÃO NORMATIVA No - 12, DE 20 DE SETEMBRO DE 2013 e a RESOLUÇÃO NORMATIVA No - 13, DE 20 DE SETEMBRO DE 2013 do CONCEA de acordo com o estabelecido na Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que estabelece os procedimentos para o uso científico de animais, além dos princípios internacionais para a prática envolvendo animais constantes do Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (8th edition) do National Research Council. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRGS, sob o número 23428, e nenhum experimento foi iniciado sem a aprovação prévia da CEUA/UFRGS.

De acordo com o COBEA (Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório) a eutanásia constitui-se na forma humanitária de matar o animal, sem dor e com mínimo desconforto. O método de eutanásia deve assegurar a perda da consciência de forma rápida, irreversível e desprovida de experiência emocional ou física desagradável, ou seja, o animal não deve apresentar dor, estresse, apreensão ou ansiedade (BRASIL, 2013). Os métodos físicos, como o decaptação, são aceitos com restrição em roedores com peso corporal inferior a 150 gramas. Entretanto, o COBEA (2013) salienta que em alguns casos como em filhotes, por exemplo, os métodos físicos causam menos estresse ao animal e são mais rápidos do que outros métodos. A técnica de decaptação consiste em uma manobra rápida, devido ao rompimento da medula espinhal, que em segundos leva o animal à perda total de sensibilidade, inconsciência e morte (RHODEN, 2006).

A administração de anestésicos acarreta ao animal alterações na secreção de vários hormônios como testosterona, LH, FSH e insulina entre outros (FREE; JAFFE; CHENG, 1980; GOULD, 2008; SAHA et al., 2005). Uma vez que a utilização dos anestésicos implica na manipulação do animal, entendemos que o estresse da manipulação/procedimento anestésico se iguala, ou aproxima-se em muito, ao estresse

sofrido pelo filhote eutanasiado através da técnica de decapitação. Além disso, as alterações na secreção hormonal podem interferir nos resultados do trabalho que visa justamente avaliar a ação hormonal. Salientamos que a eutanásia dos filhotes foi realizada por alunos capacitados e com experiência prévia no procedimento.

6 RESULTADOS

6.1 Testículos de Ratos Imaturos

6.1.1 Efeito de diferentes concentrações de IGF-1 sobre o potencial de membrana das células de Sertoli em túbulos seminíferos inteiros de ratos imaturos.

Para determinar a menor dose efetiva do IGF-1 capaz de estimular uma alteração no potencial de membrana das células de Sertoli, diferentes concentrações do hormônio foram administradas. Conforme figura 6.1, a concentração de 100 ng/mL foi a mais efetiva em desencadear uma despolarização do potencial de membrana das células de Sertoli.

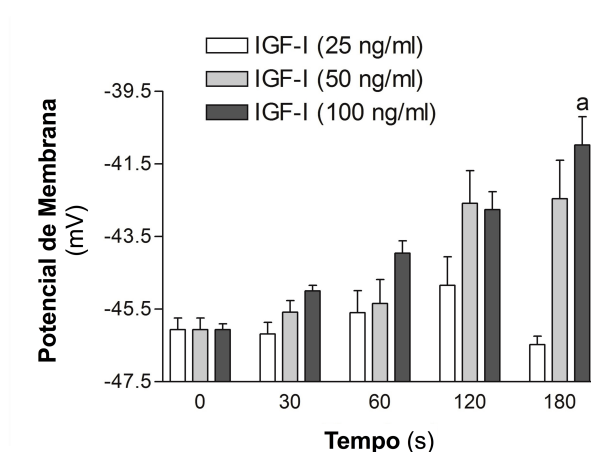


Figura 6.1: Efeito de diferentes concentrações de IGF-1 sobre o potencial de membrana das células de Sertoli em túbulos seminíferos inteiros. Efeito do IGF-1 a 25, 50 e 100 ng/mL sobre o potencial de membrana das células de Sertoli em túbulos seminíferos inteiros de ratos de 12 dias de idade. ANOVA para medidas repetidas, ^ap<0.05 em comparação com o repouso (n = 5).

6.1.2 Efeito de diferentes concentrações de insulina sobre o potencial de membrana e transporte de glicose em testículos inteiros de ratos imaturos.

A fim de determinar a menor dose efetiva da insulina capaz de estimular o transporte de glicose e uma alteração no potencial de membrana das células de Sertoli, diferentes concentrações do hormônio foram administradas. Conforme figura 6.2A, a concentração de 580 ng/mL foi a mais efetiva em desencadear uma despolarização do potencial de membrana das células de Sertoli. Da mesma forma, somente na

concentração de 580 ng/mL a insulina foi capaz de estimular o transporte de glicose nos testículos (Figura 6.2B).

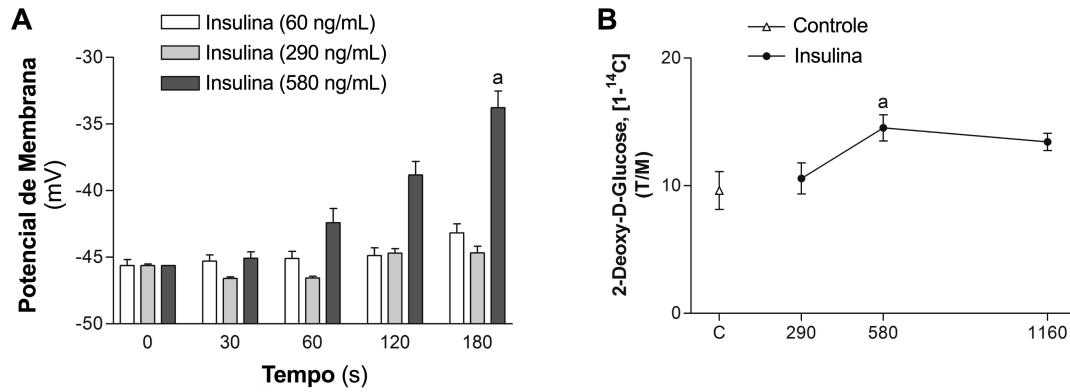


Figura 6.2: Efeito de diferentes concentrações de insulina sobre o potencial de membrana e transporte de glicose em testículos inteiros de ratos de 12 dias de idade. **(A)** Efeito da insulina a 60, 290 e 580 ng/mL sobre o potencial de membrana das células de Sertoli em túbulos seminíferos inteiros a partir de ratos de 12 dias de idade. ANOVA para medidas repetidas, ^ap<0.05 em comparação com o repouso (n = 5); **(B)** Efeito da insulina a 60, 290 e 580 ng/mL sobre o transporte de [¹⁴C]2-DG em testículos inteiros de ratos de 12 dias de idade. ANOVA de uma via ^ap<0.05 em comparação com o controle (n = 5).

6.1.3 Envolvimento dos canais de cálcio no efeito da insulina sobre o potencial de membrana das células de Sertoli de ratos imaturos.

Foi utilizado o verapamil, um bloqueador dos canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L, para investigar o envolvimento desses canais na resposta despolarizante do potencial de membrana das células de Sertoli em resposta à insulina (Figura 6.3). O verapamil aboliu completamente a ação da insulina sobre o potencial de membrana das células de Sertoli.

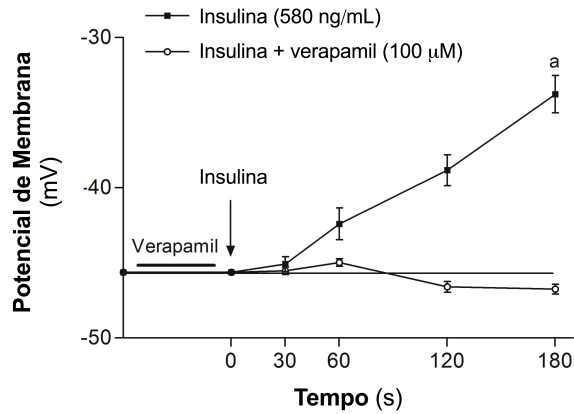


Figura 6.3: Efeito da insulina sobre o potencial de membrana das células de Sertoli de ratos de 12 dias de idade. Efeito despolarizante da insulina (580 ng/mL) no potencial de membrana das células de Sertoli. Efeito do verapamil (100 µM) sobre a ação da insulina no potencial de membrana da célula de Sertoli. ANOVA para medidas repetidas, ^ap<0.05 em comparação com o repouso (n = 6).

6.1.4 Envolvimento da PI3K na estimulação da captação de cálcio pela insulina e IGF-1 em testículos inteiros de ratos imaturos.

O wortmannin, fármaco que inibe a ação da PI3K, foi utilizado para investigar o envolvimento dessa enzima no efeito da insulina e do IGF-1 sobre a captação de cálcio em testículos de ratos imaturos (Figura 6.4). Tanto a insulina (Figura 6.4A) quanto o IGF-1 (Figura 6.4B) estimularam a captação de cálcio por testículos inteiros de ratos imaturos de forma dependente da PI3K.

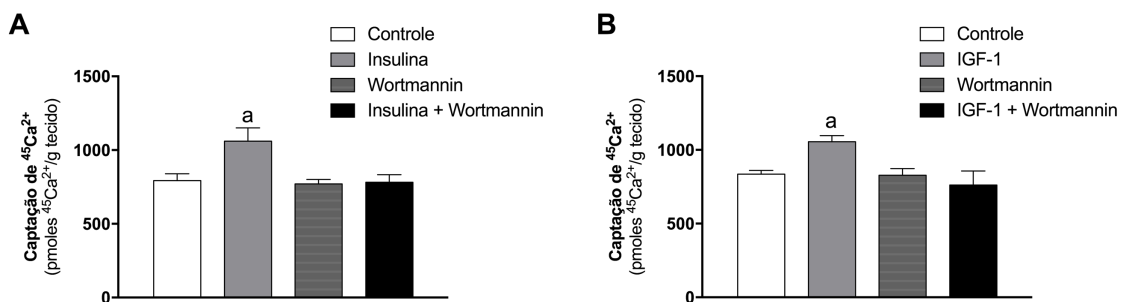


Figura 6.4: Envolvimento da PI3K na ação da insulina e do IGF-1 sobre a captação de Ca²⁺ em testículos inteiros de ratos de 12 dias de idade. **(A)** Efeito da insulina (580 nM) sobre a captação de ⁴⁵Ca²⁺ em testículos inteiros de ratos de 12 dias de idade. ANOVA de uma via p<0.05 em comparação com os demais grupos (n = 10); **(B)** Efeito do IGF-1 (100 ng/ml) sobre o transporte de ⁴⁵Ca²⁺ em testículos inteiros de ratos de 12 dias de idade. ANOVA de uma via ^ap<0.05 em comparação com os demais grupos (n = 10).

6.1.5 Envolvimento da PI3K na estimulação do transporte de aminoácidos pela insulina e IGF-1 em testículos inteiros de ratos imaturos.

Insulina (figura 6.5A) e IGF-1 (figura 6.5B) estimularam o transporte de aminoácidos em testículos inteiros de ratos imaturos, e a incubação com wortmannin demonstrou que a estimulação por ambos os hormônios é dependente da PI3K.

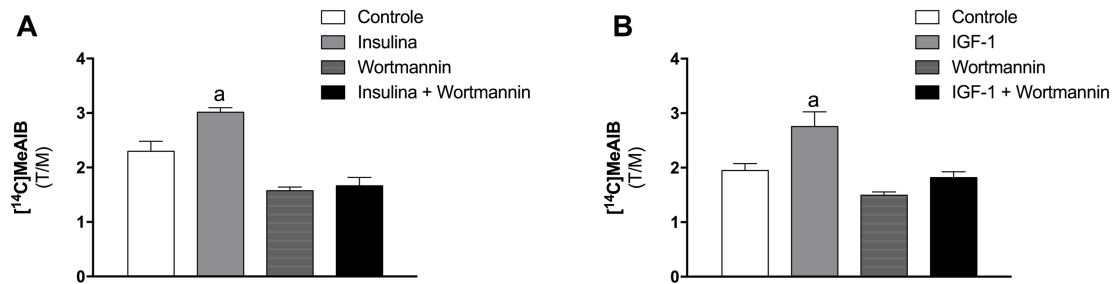


Figura 6.5: Envolvimento da PI3K na ação da insulina e do IGF-1 sobre o transporte de aminoácidos neutros em testículos inteiros de ratos de 12 dias de idade. **(A)** Efeito da insulina (100nM) sobre o transporte de [¹⁴C]MeAIB em testículos inteiros de ratos de 12 dias de idade. ANOVA de uma via, ^ap<0.05 em comparação com os demais grupos (n = 5); **(B)** Efeito do IGF-1 (100 ng/ml) sobre o transporte de [¹⁴C]MeAIB em testículos inteiros de ratos de 12 dias de idade. ANOVA de uma via p<0.05 em comparação com o controle (n = 5), ^ap<0.05 em comparação com os demais grupos (n = 5).

6.1.6 Envolvimento da PI3K na estimulação do transporte de glicose pela insulina e IGF-1 em testículos inteiros de ratos imaturos.

Ambos, insulina (figura 6.6A) e IGF-1, estimularam o transporte de glicose. A incubação dos testículos com o wortmannin demonstrou que o transporte de glicose estimulado por esses hormônios é dependente da atividade da PI3K.

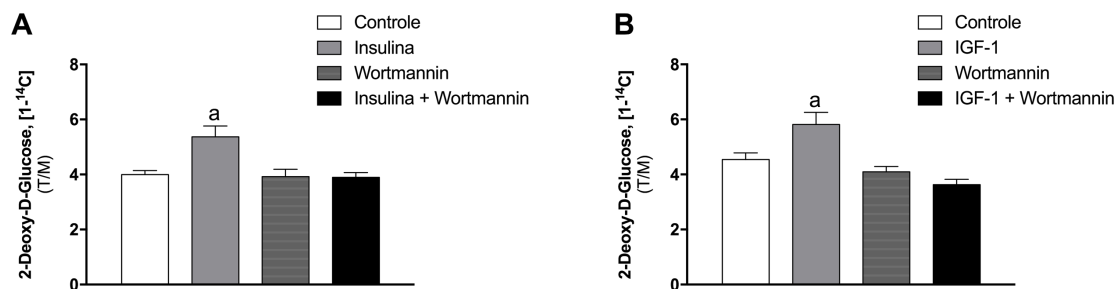


Figura 6.6: Envolvimento da PI3K na ação da insulina e do IGF-1 sobre o transporte de glicose em testículos inteiros de ratos de 12 dias de idade. **(A)** Efeito da insulina (580 ng/mL) sobre o transporte de [¹⁴C]2-DG em testículos inteiros de ratos de 12 dias de idade. ANOVA de uma via ^ap<0,05 em comparação com os demais grupos (n = 5); **(B)** Efeito do

IGF-1 (100 ng/ml) sobre o transporte de [¹⁴C]2-DG transporte em testículos inteiros de ratos de 12 dias de idade.
ANOVA de uma via; ^ap<0.05 em comparação com os demais grupos (n = 9).

6.2 Células de Sertoli Humanas

6.2.1 Efeito do FSH sobre o consumo de glicose e piruvato e a produção de acetato e lactato em células de Sertoli humanas

O efeito do tratamento das células de Sertoli humanas cultivadas *in vitro* com FSH sobre o consumo de glicose e piruvato e sobre a produção de lactato foi investigado através de ^1H -RMN. O tratamento das células com FSH durante 24 horas não alterou o consumo de glicose e de piruvato nem a produção de acetato e de lactato (Figura 6.7).

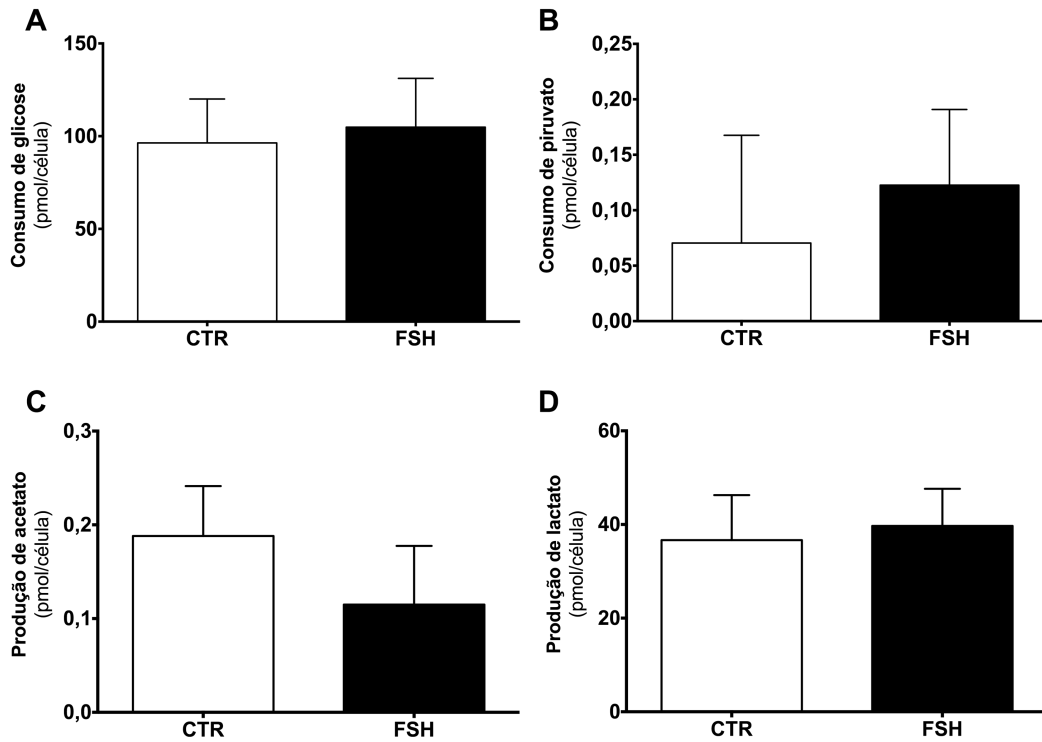


Figura 6.7: Efeito do FSH sobre o consumo de glicose e piruvato e a produção de acetato e lactato em células de Sertoli humanas cultivadas *in vitro*. **(A)** consumo de glicose; **(B)** consumo de piruvato; **(C)** produção de acetato; **(D)** produção de lactato. Teste-t de Student.

6.2.2 Efeito do IGF-1 sobre o consumo de glicose e piruvato e a produção de acetato e lactato em células de Sertoli humanas

O efeito do tratamento das células de Sertoli humanas cultivadas *in vitro* com IGF-1 sobre o consumo de glicose e piruvato e sobre a produção de lactato foi também investigado através de ^1H -RMN. O tratamento das células com IGF-1 durante 24 horas não alterou o consumo de glicose e de piruvato nem a produção de acetato. Entretanto, o tratamento com IGF-1 foi efetivo em aumentar a produção de lactato por essas células (Figura 6.8).

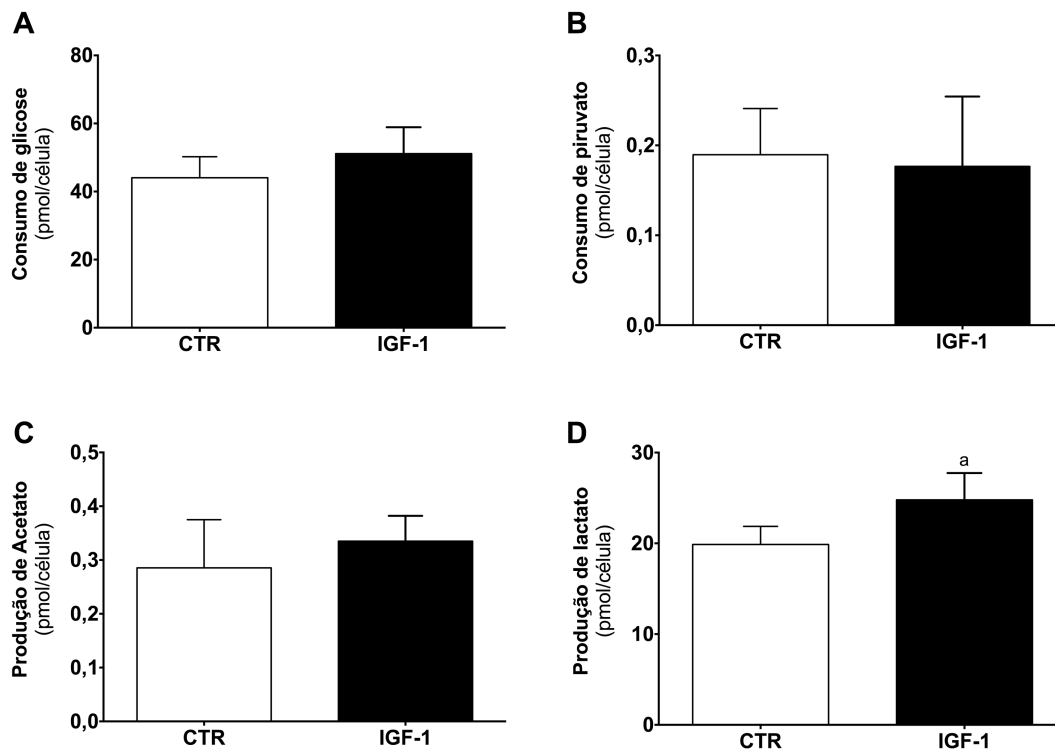


Figura 6.8: Efeito do IGF-1 sobre o consumo de glicose e piruvato e a produção de acetato e lactato em células de Sertoli humanas cultivadas *in vitro*. (A) consumo de glicose; (B) consumo de piruvato; (C) produção de acetato; (D) produção de lactato. Teste-t de Student, ^a $p < 0.05$ em comparação com grupo controle.

6.2.3 Efeito do FSH sobre a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) em células de Sertoli humanas

O efeito do tratamento das células com FSH por 24h sobre a atividade da LDH foi avaliado através de técnica colorimétrica. O tratamento com FSH e com os bloqueadores da PI3K e da MAPK não alteraram a atividade da enzima nas células de Sertoli humanas cultivadas in vitro (Figura 6.9).

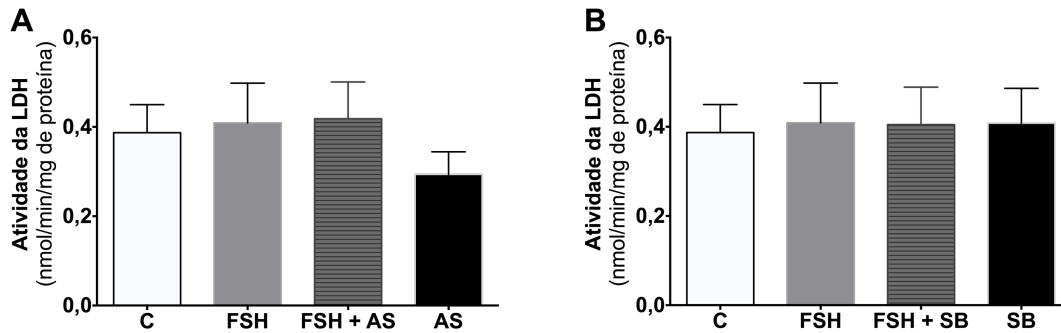


Figura 6.9: Efeito do FSH sobre a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) em células de Sertoli humanas cultivadas in vitro. **(A)** Efeito do bloqueador da PI3K γ (AS-604850) sobre a ação do FSH na atividade da enzima LDH; **(B)** Efeito do bloqueador da MAPK (SB203580) sobre a ação do FSH na atividade da enzima LDH. ANOVA de uma via.

6.2.4 Efeito do IGF-1 sobre a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) em células de Sertoli humanas

O tratamento das células de Sertoli humanas com IGF-1 por 24 horas aumentou a atividade da LDH (figura 6.10). O tratamento com os inibidores da PI3K γ (figura 6.10A) e da MAPK (figura 6.10B) não inibiu a estimulação da LDH causada pelo IGF-1. Concomitantemente, ambos bloqueadores também aumentaram a atividade basal da enzima nas células de Sertoli humanas cultivadas *in vitro*. Entretanto, não observado efeito aditivo do IGF-1 com os inibidores.

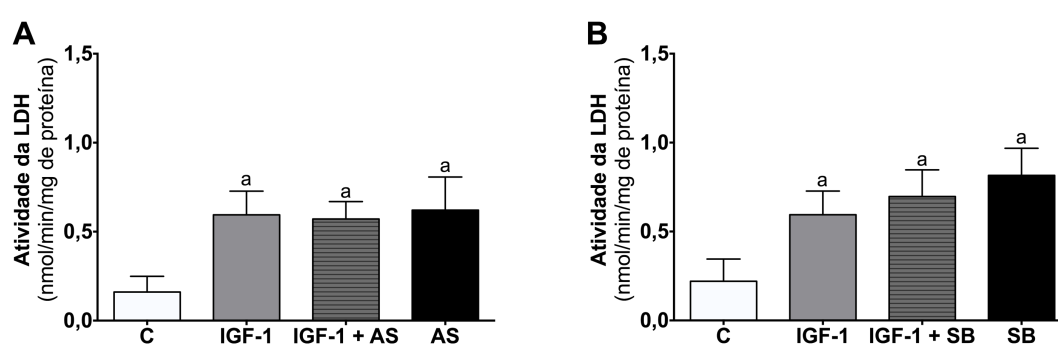


Figura 6.10: Efeito do IGF-1 sobre a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) em células de Sertoli humanas cultivadas *in vitro*. **(A)** Efeito do bloqueador da PI3K γ (AS-604850) sobre a ação do IGF-1 na atividade da enzima LDH; **(B)** Efeito do bloqueador da MAPK (SB203580) sobre a ação do IGF-1 na atividade da enzima LDH. ANOVA de uma via; ^ap<0,05 em comparação com o grupo controle.

6.2.5 Efeito do FSH sobre os níveis de proteína dos transportadores de membrana GLUT2 e MCT4 em células de Sertoli humanas

O efeito do tratamento das células de Sertoli humanas com FSH sobre a expressão das proteínas dos transportadores GLUT2, de glicose, e MCT4, de lactato, foi avaliado por western blot. O tratamento com FSH e o tratamento com os inibidores da PI3K e da MAPK não alteram a expressão das proteínas (figura 6.11).

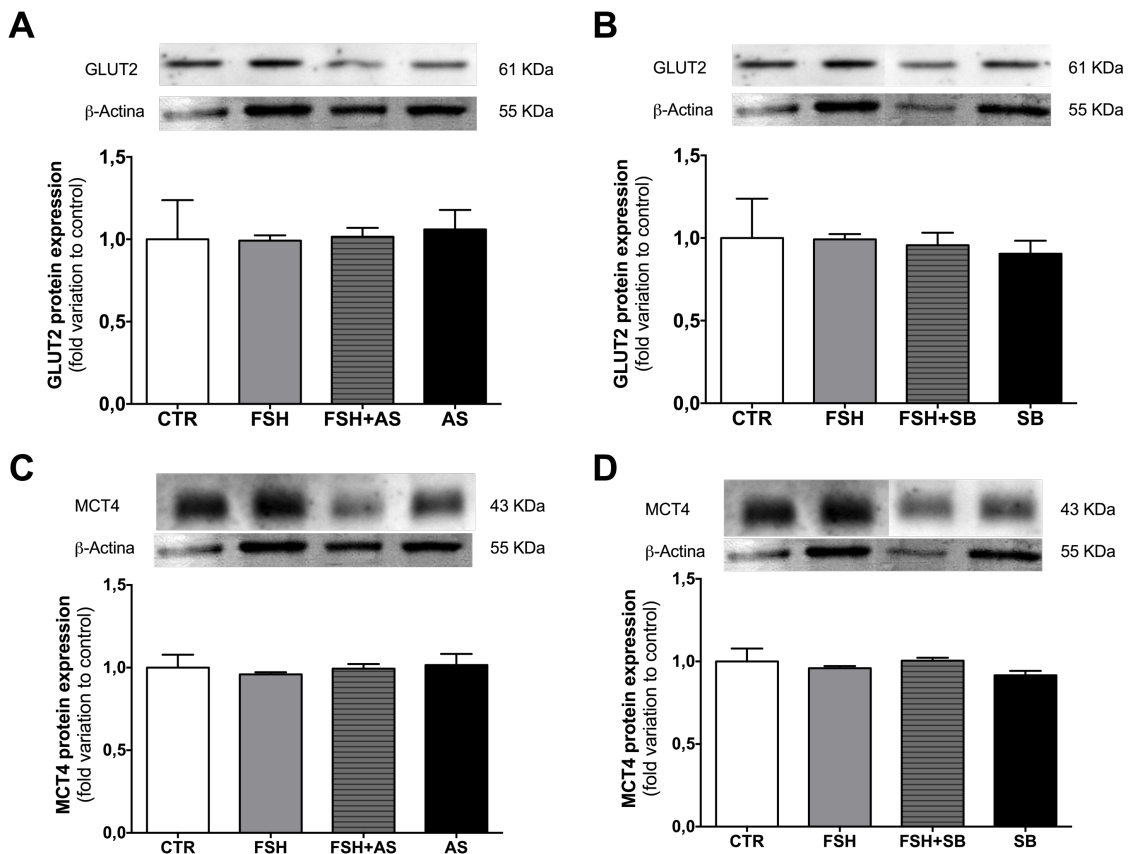


Figura 6.11: Efeito do FSH sobre os níveis de proteína dos transportadores de membrana GLUT2 e MCT4 em células de Sertoli humanas cultivadas *in vitro*. Efeito do bloqueador da PI3K γ (AS-604850) sobre a ação do FSH nos níveis de proteína dos transportadores de membrana **(A)** GLUT2 e **(C)** MCT4; Efeito do bloqueador da MAPK (SB203580) sobre a ação do FSH nos níveis de proteína dos transportadores de membrana **(B)** GLUT2 e **(D)** MCT4. ANOVA de uma via.

6.2.6 Efeito do IGF-1 sobre os níveis de proteína dos transportadores de membrana GLUT2 e MCT4 em células de Sertoli humanas

O efeito do tratamento das células de Sertoli humanas com IGF-1 sobre a expressão das proteínas dos transportadores GLUT2, de glicose, e MCT4, de lactato, foi avaliado por western blot. O tratamento com IGF-1 e o tratamento com os inibidores da PI3K e da MAPK não alteram a expressão das proteínas (figura 6.12).

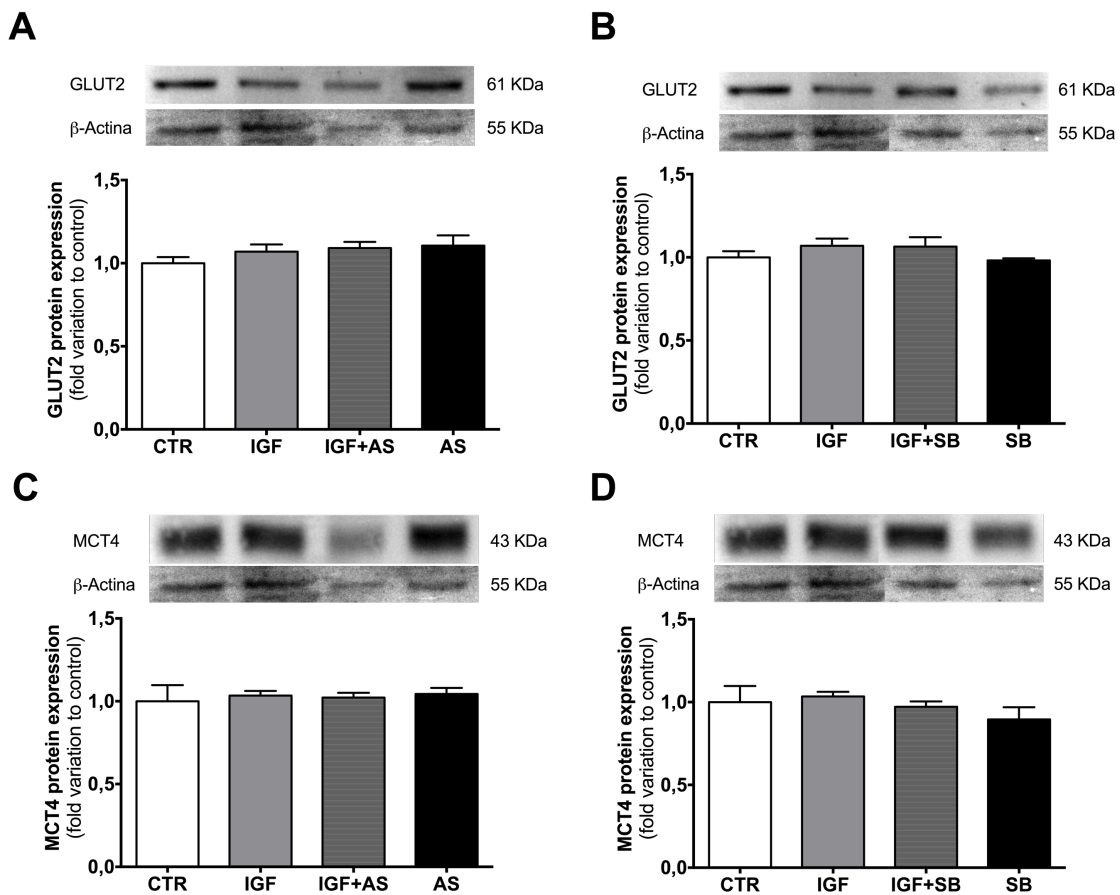


Figura 6.12: Efeito do IGF-1 sobre os níveis de proteína dos transportadores de membrana GLUT2 e MCT4 em células de Sertoli humanas cultivadas in vitro. Efeito do bloqueador da PI3K γ (AS-604850) sobre a ação do IGF-1 nos níveis de proteína dos transportadores de membrana (A) GLUT2 e (C) MCT4; Efeito do bloqueador da MAPK (SB203580) sobre a ação do IGF-1 nos níveis de proteína dos transportadores de membrana (B) GLUT2 e (D) MCT4. ANOVA de uma via.

6.2.7 Efeito do FSH sobre os níveis de proteína das enzimas fosfofrutocinase (PFK) e LDH em células de Sertoli humanas

O efeito do tratamento das células de Sertoli humanas com FSH sobre a expressão das proteínas das enzimas LDH e PFK foi avaliado por western blot. O tratamento com FSH e o tratamento com os inibidores da PI3K e da MAPK não alteram a expressão das proteínas (figura 6.13).

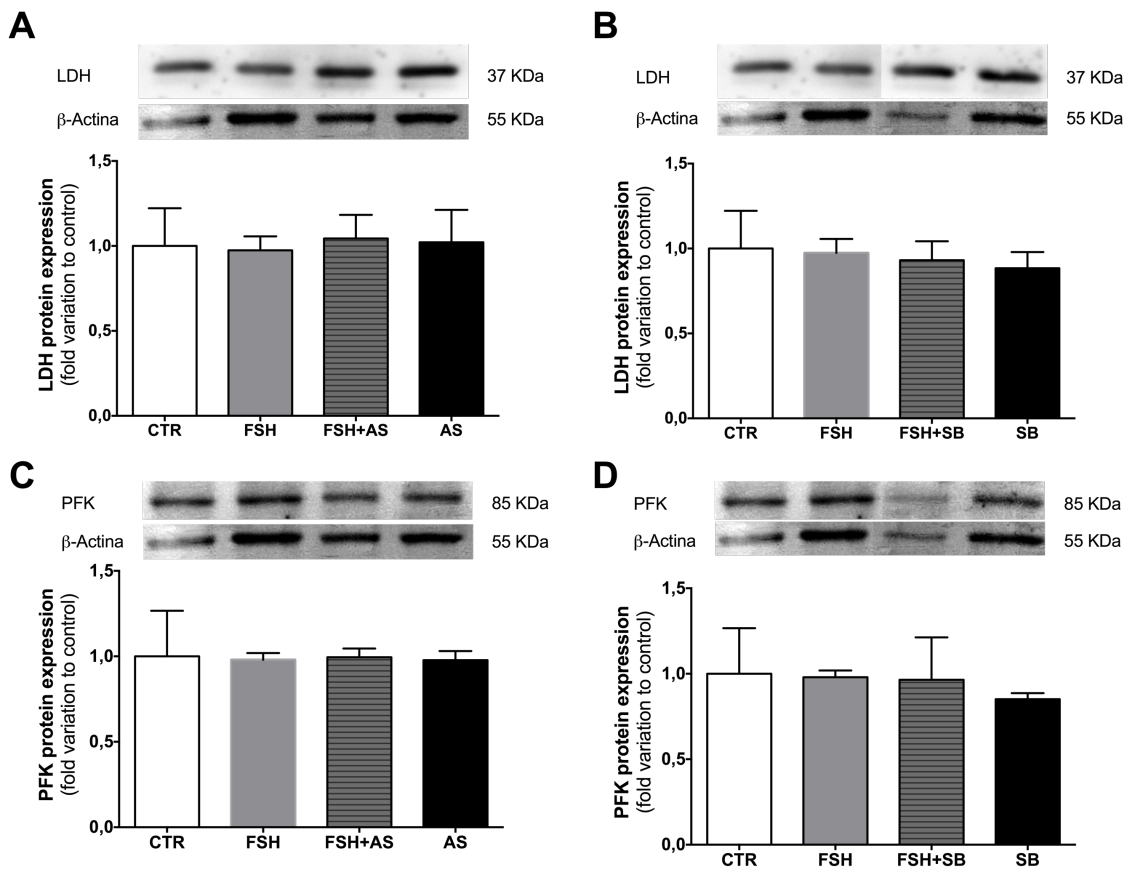


Figura 6.13: Efeito do FSH sobre os níveis de proteína das enzimas fosfofrutocinase (PFK) e LDH em células de Sertoli humanas cultivadas *in vitro*. Efeito do bloqueador da PI3K γ (AS-604850) sobre a ação do FSH nos níveis de proteína das enzimas **(A)** LDH e **(C)** PFK; Efeito do bloqueador da MAPK (SB203580) sobre a ação do FSH nos níveis de proteína das enzimas **(B)** LDH e **(D)** PFK. ANOVA de uma via.

6.2.8 Efeito do IGF-1 sobre os níveis de proteína das enzimas PFK e LDH em células de Sertoli humanas

O efeito do tratamento das células de Sertoli humanas com FSH sobre a expressão das proteínas das enzimas LDH e PFK foi avaliado por western blot. O tratamento com FSH e o tratamento com os inibidores da PI3K e da MAPK não alteram a expressão das proteínas (Figura 6.14).

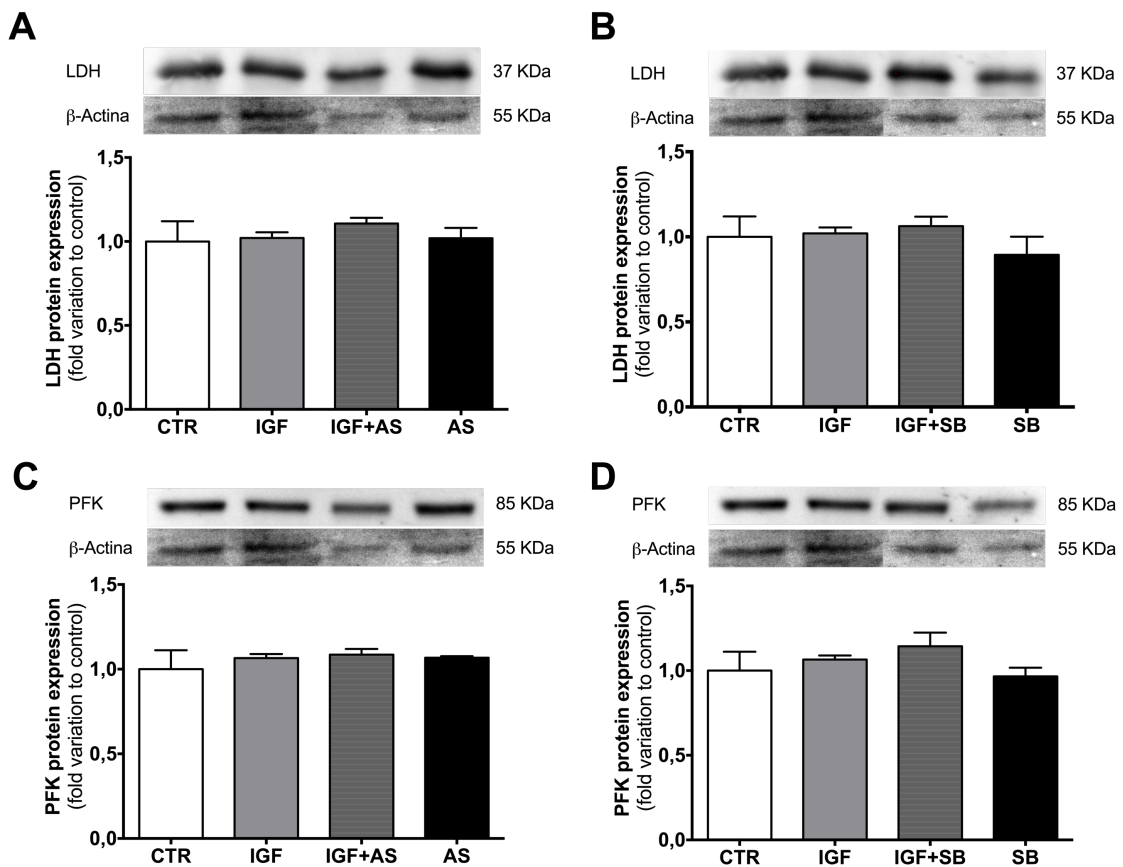


Figura 6.14: Efeito do IGF-1 sobre os níveis de proteína das enzimas PFK e LDH em células de Sertoli humanas cultivadas *in vitro*. Efeito do bloqueador da PI3K γ (AS-604850) sobre a ação do IGF-1 nos níveis de proteína das enzimas **(A)** LDH e **(C)** PFK; Efeito do bloqueador da MAPK (SB203580) sobre a ação do FSH nos níveis de proteína das enzimas **(B)** LDH e **(D)** PFK. ANOVA de uma via.

7 DISCUSSÃO

Os complexos mecanismos pelos quais as células respondem a estímulos hormonais são frequentemente dependentes de diversas vias de transdução de sinal que levam à ativação de respostas biológicas específicas. A função fisiológica dos hormônios reguladores do desenvolvimento e metabolismo das células de Sertoli será melhor compreendida quando as vias de sinalização que medeiam a regulação da mitose e do metabolismo celulares forem esclarecidas. Neste sentido, o registro eletrofisiológico das células de Sertoli em túbulos seminíferos inteiros de ratos tem permitido diversas observações relevantes, introduzindo novos conceitos sobre o mecanismo de ação de diferentes hormônios, especialmente FSH e testosterona (10,55,84).

Mais recentemente, a importância de fatores de crescimento como IGF-1 e a insulina sobre o desenvolvimento testicular, funções das células de Sertoli e a saúde reprodutiva masculina como um todo tem sido amplamente estudada. Amplamente conhecidas como “nurse cells”, ou seja, células que sustentam o desenvolvimento das células germinativas, as células de Sertoli possuem características metabólicas únicas que permitem a ela desempenhar essa função (Revisado por Rato et al., 23). Entretanto, as células de Sertoli imaturas e adultas diferem bastante tanto morfológica como metabolicamente (5,30). Enquanto que as células adultas não se proliferam e tem como principal função a produção do lactato e o controle da espermatogênese, as células imaturas estão em processo de proliferação e diferenciação e não necessitam sustentar o desenvolvimento da linhagem espermatogênica (11). Independente da fase em que a célula de Sertoli se encontra, a regulação hormonal da proliferação e/ou de seu metabolismo é indispensável para o desenvolvimento dessas células ou para a manutenção da linhagem espermatogênica (Revisado por Alves et al., 19; Escott et al., 32).

A fim de identificar a menor concentração efetiva de insulina e IGF-1 capaz de desencadear uma resposta eletrofisiológica pelas células de Sertoli, foram realizados experimentos com diferentes concentrações dos hormônios. O IGF-1 foi capaz de desencadear uma resposta despolarizante sobre a membrana das células de Sertoli aos 180 segundos de incubação na concentração de 100 ng/mL (Figura 6.1). Por outro lado,

a insulina somente foi capaz de estimular uma despolarização do potencial de membrana e o transporte de glicose na concentração de 590 ng/mL (Figura 6.2). Embora seja uma concentração elevada, essa foi a única concentração de insulina capaz de gerar respostas nas células de Sertoli de ratos nas nossas condições experimentais. Conforme discutido em estudos anteriores de nosso laboratório (55), isso pode ser devido ao fato de que os receptores de insulina se apresentam em concentrações muito menores que aquelas dos receptores de IGF-1 em testículos de ratos imaturos (33). Dessa forma, a maioria das ações da insulina observadas nessa fase do desenvolvimento das células de Sertoli são mediados pelos receptores de IGF-1 ou, possivelmente, por receptores híbridos (55). É importante salientar que, embora essas ações não ocorram através dos receptores de insulina, a capacidade das células de Sertoli de produzir insulina (35,85) pode vir a aumentar as concentrações testiculares deste hormônio e, portanto, os efeitos gerados por essa dose específica podem ter relevância fisiológica. Além disso, Pitetti e colaboradores (38) demonstraram em ratos que a ausência da expressão dos receptores de insulina em células de Sertoli leva ao desenvolvimento de animais inférteis, comprovando a importância da insulina para a fisiologia testicular.

Observamos no presente estudo que a insulina estimula a captação de cálcio por testículos de ratos de 12 dias de idade após 2 minutos de incubação (Fig. 6.4A). A exemplo do estudo anterior de Jacobus et al. (43), o mesmo efeito foi observado com a estimulação com IGF-1, o qual estimulou a captação de cálcio após 2 minutos de incubação (Figura 6.4B). A fim de identificar a possível participação da via da PI3K/PKB no efeito da insulina e IGF-1 sobre a captação do cálcio, utilizamos o wortmannin, potente fármaco inibidor da PI3K. Verificou-se que a inibição da PI3K bloqueou completamente os efeitos da insulina e do IGF-1 sobre a absorção de cálcio (Figura 6.4A e 6.4B, respectivamente). Os efeitos do FSH sobre a captação de cálcio por testículos de ratos imaturos foi investigado por Jacobus e colaboradores (43). Da mesma forma, foi demonstrado que o FSH utiliza a via da PI3K para estimular a captação de cálcio (43). Embora a via de sinalização ativada pelo FSH seja a mesma que a ativada pela insulina e IGF-1, a ativação de receptores GPCR usualmente está associada a estimulação da isoforma γ da PI3K, diferente daquelas ativadas por insulina/IGF-1 através de receptores do tipo tirosina cinase (α e δ) (69). Além disso, a capacidade do FSH em aumentar os níveis de PKB fosforilada em células de Sertoli de ratos imaturos é independente da ação

do IGF-1 (66). Experimentos usando EGTA (um quilate de cálcio) e verapamil (bloqueador dos canais de cálcio dependentes de voltagem) revelaram que a principal fonte de cálcio na estimulação da célula de Sertoli pelo FSH é o compartimento extracelular através do seu influxo por canais tipo VDCC; entretanto, os canais de cálcio independente de voltagem e fontes intracelulares também parecem estar envolvidos (86,87). O cálcio é um importante mensageiro intracelular de sinalização, o qual está envolvido em vários processos celulares, incluindo a proliferação celular. O mecanismo exato pelo qual a via PI3K/PKB modula a atividade dos canais de cálcio dependentes de voltagem (VDCC) permanece incerta. Um estudo desenvolvido por Catalucci e colaboradores (88) forneceu provas de que a fosforilação de uma subunidade reguladora ($Ca_v\beta 2$) do VDCC pela PKB pode modular a integridade e a função do canal. Provavelmente afetando propriedades da subunidade formadora de poros ($Ca_v\alpha 1$), por exemplo, alterando a conformação da proteína ou protegendo a subunidade contra a degradação proteica.

Durante o processo de proliferação celular, o aporte de aminoácidos é indispensável para a biossíntese de nucleotídeos, essenciais para o crescimento celular e o metabolismo (89,90). A atividade do Sistema A de transporte de aminoácidos fornece uma fonte de nitrogênio dos aminoácidos neutros e proteínas necessária para o crescimento celular e o metabolismo (89,90). Nossos resultados demonstram que a insulina e o IGF-1 estimulam o transporte de aminoácidos através do sistema A de transporte de aminoácidos neutros em testículos de ratos de 12 dias de idade após 45 minutos de incubação (Figura 6.5). Os efeitos de ambos os hormônios sobre o transporte de aminoácidos foram bloqueados quando os testículos foram incubados na presença de wortmannin, o que demonstra o envolvimento da via da PI3K na ação desses hormônios (Figura 6.5). De maneira semelhante, foi previamente demonstrado pelo nosso laboratório que o FSH também estimula o transporte de aminoácidos em testículos de ratos imaturos dentro de 45 minutos de incubação através da via da PI3K/PKB (43). Entretanto, essa parece ser uma ação do FSH estrita ao período proliferativos dessas células, uma vez que não se observam alterações no transporte de aminoácidos em testículos de animais adultos (91). O exato mecanismo pelos quais esses hormônios estimulam o transporte de aminoácidos neutros em células de Sertoli permanece desconhecido. No entanto, sabe-se que o FSH age de forma a aumentar a

atividade (V_{max}) do Sistema A do transporte de aminoácidos, o qual é dependente do influxo de Na^+ e de energia (91,92). Mecanismos semelhantes poderiam ser utilizados por insulina e IGF-1. O Sistema A medeia a simporte de aminoácidos neutros com cadeias laterais pequenas (alanina, serina e glutamina) com sódio (93). O análogo não metabolizável da alanina, MeAIB (ácido α -metilaminoisobutírico), é também um substrato para este sistema (90). Assim, o aumento da atividade do Sistema A estimulada pelo FSH e por insulina/IGF-1 fornece uma fonte aminoácidos neutros para metabolismo das células de Sertoli (89,90). A alanina pode ser convertida em piruvato e utilizada como um substrato energético pelas células de Sertoli ou ser secretada para as células germinativas em desenvolvimento (23). A glutamina é o principal aminoácido do corpo e tem um papel importante na proliferação de vários tipos celulares (94,95).

Como descrito anteriormente, a produção e secreção de lactato configura uma das principais funções das células de Sertoli. São necessárias várias etapas para garantir a produção adequada de lactato, e o transporte de glicose através da membrana celular é um evento limitante para esse processo. A ativação da via PI3K/PKB é uma importante via de regulação do transporte de glicose estimulada pela insulina em diversos de tecidos (35). Demonstramos no presente trabalho que, em testículos de ratos de 12 dias de idade, tanto a insulina como o IGF-1 estimulam o transporte de glicose após 60 minutos de incubação (Figura 6.6). O efeito estimulante da insulina e do IGF-1 sobre o transporte de glicose foi bloqueado quando os testículos foram incubados na presença de wortmannin (Figura 6.6A e 6.6B, respectivamente), indicando que os efeitos desses hormônios estão associados com a via da PI3K. Em um estudo anterior, Riera e colaboradores (29) demonstraram que o aumento da atividade da LDH e do transporte de glicose fazem parte dos mecanismos utilizados pelo FSH para aumentar a produção de lactato pelas células de Sertoli. Além disso, Meroni e colaboradores (46) demonstraram posteriormente que a estimulação do transporte de glicose em células de Sertoli de ratos em cultura pelo FSH se deve à ativação da via da PI3K, mas não da via AMPc/PKA (46,66). A relevância fisiológica da regulação hormonal da proliferação e metabolismo das células de Sertoli durante seu desenvolvimento é evidente (30,38). Segundo Mullaney et al. (30), a regulação hormonal do metabolismo da glicose é mais intensa durante o período imaturo, uma vez que há um aumento de até 5 vezes na produção basal de lactato ao longo do desenvolvimento. Esses dados reforçam a

importância da regulação hormonal do metabolismo das células de Sertoli durante seu período proliferativo.

As células de Sertoli passam por profundas mudanças estruturais e funcionais ao longo de seu desenvolvimento (5) e a maioria dos estudos que abordam a ação hormonal sobre o metabolismo das células de Sertoli em geral utilizam células provenientes de ratos de no máximo 20 dias de idade (29,30). Por isso, há ainda diversas lacunas a serem preenchidas sobre a ação desses hormônios sobre as células de Sertoli adultas. Soma-se a isso a escassez de estudos em células de Sertoli provenientes de seres humanos devido a dificuldade de se obter a amostra. Assim, partiu-se a investigar os efeitos do FSH e do IGF-1 sobre células de Sertoli humanas cultivadas *in vitro*, a fim de analisar os efeitos desses hormônios sobre o metabolismo e a expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo dessas células. As células de Sertoli utilizadas no presente estudo foram provenientes de pacientes adultos em idade fértil com dificuldades em obter uma gestação com êxito e que procuraram os serviços do Centro de Genética Reprodutiva Alberto Barros (Porto, Portugal). As biópsias testiculares foram obtidas de pacientes que procuraram tratamento de fertilidade, após o consentimento informado por escrito. Apenas as células deixadas em placas de cultura após o tratamento de fertilidade foram usadas. As células de Sertoli humanas foram isoladas a partir de biópsias testiculares de pacientes com anejaculação (psicológica, vasculares, neurológicas) e com a espermatogênese conservada.

As células de Sertoli humanas isoladas foram cultivadas em meio específico com ou sem a presença de FSH ou IGF-1. A fim de identificar o envolvimento das vias de sinalização da PI3K/PKB e das MAPK nos efeitos de ambos os hormônios as células também foram cultivadas na presença de bloqueadores específicos, AS-604850 e SB203580 (inibidores da PI3K γ e MAPK, respectivamente). Especificamente, buscou-se investigar no presente estudo os efeitos dos FSH e do IGF-1 sobre o consumo e a produção de metabólitos importantes para o metabolismo das células de Sertoli e para a cooperação metabólica entre essas células e as células germinativas em desenvolvimento. A incubação das células de Sertoli por 24 horas na presença de FSH não alterou o consumo de glicose e piruvato e nem a produção de lactato e acetato por essas células (Figura 7.1). Entretanto, a incubação das células com IGF-1 pelo mesmo período, embora não tenha alterado o consumo de glicose e piruvato nem a produção

de acetato, aumentou a produção de lactato. A produção do lactato é uma importante função das células de Sertoli diferenciadas. Entretanto, já se tem demonstrado em células de Sertoli de ratos que a capacidade de alguns hormônios, como o FSH e a insulina, de aumentarem a produção de lactato está reduzida em animais adultos, possivelmente devido ao aumento da produção basal de lactato (30).

Com a finalidade de explicar de que maneira o IGF-1 altera a produção de lactato, investigamos seus efeitos sobre a atividade da LDH, enzima glicolítica responsável pela última etapa da glicólise anaeróbia, a conversão do piruvato em lactato. Como poderia se esperar, o FSH não alterou a atividade da LDH após 24 horas de incubação (Figura 6.9). Da mesma forma, não foram observadas alterações na atividade da LDH quando as células foram incubadas na presença dos inibidores das vias da PI3K (AS-604850; Figura 6.9A) e da MAPK (SB203580; Figura 6.9B). Por outro lado, a incubação das células de Sertoli com IGF-1 induziu um aumento da atividade enzimática da LDH, o que representa um possível mecanismo pelo qual o IGF-1 aumenta a produção de lactato pelas células de Sertoli humanas (Figura 6.10). A inibição das vias PI3K/PKB (Figura 6.10A) e p38 MAPK (Figura 6.10B) não foi capaz de bloquear a ação do IGF-1. No entanto, não é possível afirmar que o estímulo do IGF-1 sobre a atividade da LDH e, conseqüentemente, sobre a produção de lactato seja independente da ativação da via PI3K/PKB. Isto porque o inibidor utilizado (AS-604850) bloqueia seletivamente a isoforma γ da PI3K, a qual tem sua atividade preferencialmente regulada por receptores do tipo GPCR, como do FSH, além de possuir pouca ou nenhuma atividade sobre as isoformas α e δ , ativadas por receptores tirosina cinase. Considerando-se o fato de que o bloqueador SB203580 não exerceu qualquer efeito inibitório sobre a ação do IGF-1 e que, portanto, a via p38 MAPK também não está envolvida na sua estimulação da atividade da LDH, é possível que o IGF-1 se utilize da PI3K α,δ /PKB ou outra via de sinalização para este fim.

A seguir, avaliamos os efeitos do FSH e do IGF-1 sobre a expressão de importantes proteínas envolvidas no metabolismo das células de Sertoli e na cooperação metabólica testicular. Sabe-se que em células de Sertoli de ratos, FSH e IGF-1 estimulam o transporte de glicose através da membrana plasmática (27,29,55), um importante e limitante passo para a produção de lactato. Dessa forma, avaliamos os efeitos do FSH e do IGF-1 sobre a expressão da isoforma 2 dos transportadores de glicose. O GLUT2 é expresso apenas em células de Sertoli humanas, não sendo

encontrado em roedores (24,26,85) e, portanto, sua função e importância para o metabolismo dessas células permanece desconhecido. As figuras 6.11A e 6.11B mostram que o FSH não apresenta qualquer atividade sobre a expressão dessa proteína após 24 horas de incubação. Da mesma forma, o IGF-1 também não altera a expressão do GLUT2 em células de Sertoli humanas após 24 horas de incubação (Figura 6.12A e 6.12B). Se esses hormônios alteram atividade do GLUT2 ou o transporte de glicose permanece uma questão a ser investigada futuramente.

Após ser produzido, o lactato formado pelas células de Sertoli é então secretado para o lúmen e para o espaço intersticial dos túbulos seminíferos onde será captado pelas células germinativas em desenvolvimento. Para isso, as células de Sertoli expressam transportadores de monocarboxilatos tipo 4 (MCT4). Diversos hormônios parecem regular a expressão do MCT4 em células de Sertoli humanas, incluindo estradiol, di-hidrotestosterona (DHT) e insulina (13,51). Nas nossas condições experimentais, FSH e IGF-1, bem como os inibidores das vias de sinalização celular, não alteraram a expressão do MCT4 em células de Sertoli humanas após a incubação por 24h (Figura 6.11 e 6.12, respectivamente). A maioria dos estudos mostram que hormônios como a insulina e a DHT alteram a expressão de MCT4 em células de Sertoli após 48 horas de incubação (13,51). Não é possível se descartar, portanto, a possibilidade de que incubações prolongadas com FSH ou IGF-1 possam alterar a expressão de MCT4 nessas células.

A estimulação da produção de lactato pode também se dar pelo aumento da expressão das enzimas glicolíticas que medeiam este processo. A LDH e a PFK são enzimas limitantes da glicólise e catalisam a formação do lactato a partir do piruvato e da frutose-1,6-bifosfato a partir da frutose, respectivamente. O aumento na expressão dessas enzimas pode favorecer o fluxo glicolítico em direção à formação do lactato. Em ratos, o FSH é capaz de estimular a expressão de RNA mensageiro da LDH (29). Entretanto, no presente estudo, os hormônios FSH e IGF-1 e os inibidores das vias de sinalização não foram capazes alterar a expressão proteica da PFK e da LDH após 24 horas de incubação (6.13 e 6.14, respectivamente). Nossos resultados, portanto, demonstram que o IGF-1 estimula a produção de lactato por células de Sertoli humanas em cultivo pelo aumento da atividade da LDH, mas não pelo aumento na expressão desta enzima. Além disso, nosso trabalho corrobora trabalhos anteriores que mostram

que as ações hormonais, em especial do FSH, sobre células de Sertoli são mais evidentes nas células imaturas, a fim de controlar a proliferação celular.

O estudo com células de Sertoli humanas é de fundamental importância para que o conhecimento construído a partir de modelos animais seja aplicável com segurança. Por isso, é necessário que se ampliem os estudos com células humanas, apesar da dificuldade na obtenção dessa amostra. Entretanto, nossos estudos demonstram uma grande semelhança entre a regulação hormonal das células de Sertoli observada em modelos de roedores com o que observamos em células humanas, em especial quanto a diminuição dos efeitos metabólicos do FSH sobre essas células após a puberdade.

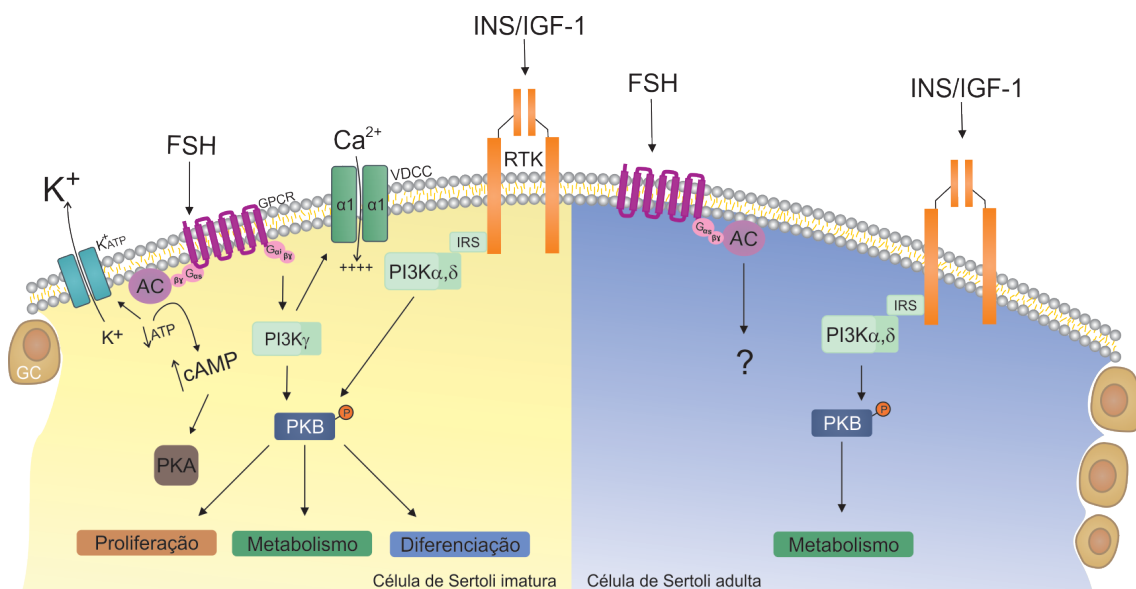


Figura 7.1: Representação esquemática da ação hormonal sobre as células de Sertoli através da via da PI3K/PKB. Durante o período imaturo, FSH, insulina e IGF-1 estimulam a proliferação, o metabolismo e a diferenciação das células de Sertoli através da ativação da via da PI3K/PKB. Nas células adultas, em especial em células de Sertoli humanas, diversas lacunas a serem preenchidas permanecem a respeito da ação hormonal e as vias de sinalização ativadas por esses hormônios nessa fase do desenvolvimento.

CONCLUSÕES

Pode-se concluir, a partir dos resultados obtidos neste trabalho, que todos os hormônios estudados utilizam a via da PI3K como meio de regular o metabolismo das células de Sertoli de ratos imaturos, gerando despolarização da membrana pelo influxo de cálcio e conseqüente aumento no transporte de aminoácidos e glicose. Em células humanas adultas, o IGF-1 pode ser um importante regulador do metabolismo celular,

embora o FSH, a exemplo do que acontece em ratos, tem pouco ou nenhum efeito sobre o metabolismo dessas células.

PERSPECTIVAS

Esperamos publicar em breve os resultados referentes aos estudos com células humanas e, apesar dos impedimentos burocráticos e financeiros impostos aos pesquisadores brasileiros, esperamos iniciar estudos com células humanas também no Brasil. Como seguimento deste trabalho, esperamos trabalhar com ratos diabéticos e células humanas provenientes de pacientes diabéticos, uma vez que a deficiência de insulina vem sendo descrita como um importante fator relacionado a infertilidade.

REFERÊNCIAS

1. Santen RJ, Bardin CW. Episodic luteinizing hormone secretion in man. Pulse analysis, clinical interpretation, physiologic mechanisms. *J Clin Invest.* 1973/10/01. 1973;52(10):2617–28.
2. Fawcett DW, Leak L V, Heidger Jr. PM. Electron microscopic observations on the structural components of the blood-testis barrier. *J Reprod Fertil Suppl.* 1970/01/01. 1970;10:105–22.
3. Skinner MK. Cell-cell interactions in the testis. *Endocr Rev.* 1991/02/01. 1991;12(1):45–77.
4. Sluka P, O'Donnell L, Bartles JR, Stanton PG. FSH regulates the formation of adherens junctions and ectoplasmic specialisations between rat Sertoli cells in vitro and in vivo. *J Endocrinol.* 2006 May;189(2):381–95.
5. Hess RA, França LR. Structure of the Sertoli Cell. *Sertoli Cell Biology.* Elsevier; 2005. p. 19–40.
6. Rey R. The prepubertal testis: a quiescent or a silently active organ? *Histol Histopathol.* 1999 Jul;14(3):991–1000.
7. Mruk DD, Cheng CY. Tight junctions in the testis: new perspectives. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2010 May 27;365(1546):1621–35.

8. Silverthorn DU. *Fisiologia Humana - Uma Abordagem Integrada*. 5^a. Porto Alegre: Artmed; 2010.
9. Griswold MD. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 1998/11/14. 1998;9(4):411–6.
10. Loss ES, Jacobus AP, Wassermann GF. Diverse FSH and testosterone signaling pathways in the Sertoli cell. *Horm Metab Res*. 2007/11/10. 2007;39(11):806–12.
11. Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C, Fisher JS. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*. 2003/05/30. 2003;125(6):769–84.
12. Jegou B. The Sertoli-germ cell communication network in mammals. *Int Rev Cytol*. 1993/01/01. 1993;147:25–96.
13. Rato L, Alves MG, Socorro S, Carvalho RA, Cavaco JE, Oliveira PF. Metabolic modulation induced by oestradiol and DHT in immature rat Sertoli cells cultured in vitro. *Biosci Rep*. 2011/06/16. 2012;32(1):61–9.
14. Alves MG, Martins AD, Cavaco JE, Socorro S, Oliveira PF. Diabetes, insulin-mediated glucose metabolism and Sertoli/blood-testis barrier function. *Tissue barriers*. 2013 May 1;1(2):e23992.
15. Froment P, Vigier M, Negre D, Fontaine I, Beghelli J, Cosset FL, et al. Inactivation of the IGF-I receptor gene in primary Sertoli cells highlights the autocrine effects of IGF-I. *J Endocrinol*. 2007/09/01. 2007;194(3):557–68.
16. Galardo MN, Riera MF, Pellizzari EH, Chemes HE, Venara MC, Cigorruga SB, et al. Regulation of expression of Sertoli cell glucose transporters 1 and 3 by FSH, IL1 beta, and bFGF at two different time-points in pubertal development. *Cell Tissue Res*. 2008/09/20. 2008;334(2):295–304.
17. Hazra R, Jimenez M, Desai R, Handelsman DJ, Allan CM. Sertoli cell androgen receptor expression regulates temporal fetal and adult Leydig cell differentiation, function, and population size. *Endocrinology*. 2013 Sep;154(9):3410–22.
18. Steinberger A, Steinberger E. Replication pattern of Sertoli cells in maturing rat testis in vivo and in organ culture. *Biol Reprod*. 1971/02/01. 1971;4(1):84–7.
19. Alves MG, Rato L, Carvalho RA, Moreira PI, Socorro S, Oliveira PF. Hormonal control of Sertoli cell metabolism regulates spermatogenesis. *Cell Mol Life Sci*. 2012 Jul 20;

20. Jutte NH, Jansen R, Grootegoed JA, Rommerts FF, Clausen OP, van der Molen HJ. Regulation of survival of rat pachytene spermatocytes by lactate supply from Sertoli cells. *J Reprod Fertil.* 1982 Jul;65(2):431–8.
21. Mueckler M. Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem.* 1994/02/01. 1994;219(3):713–25.
22. Riera MF, Galardo MN, Pellizzari EH, Meroni SB, Cigorruga SB. Molecular mechanisms involved in Sertoli cell adaptation to glucose deprivation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009/07/30. 2009;297(4):E907-14.
23. Rato L, Alves MG, Socorro S, Duarte AI, Cavaco JE, Oliveira PF. Metabolic regulation is important for spermatogenesis. *Nat Rev Urol.* 2012 Jun;9(6):330–8.
24. Kokk K, Verajankorva E, Wu XK, Tapfer H, Poldoja E, Simovart HE, et al. Expression of insulin signaling transmitters and glucose transporters at the protein level in the rat testis. *Ann N Y Acad Sci.* 2007/04/04. 2007;1095:262–73.
25. Carosa E, Radico C, Giansante N, Rossi S, D’Adamo F, Di Stasi SM, et al. Ontogenetic profile and thyroid hormone regulation of type-1 and type-8 glucose transporters in rat Sertoli cells. *Int J Androl.* 2005/04/07. 2005;28(2):99–106.
26. Martins AD, Moreira AC, Sá R, Monteiro MP, Sousa M, Carvalho RA, et al. Leptin modulates human Sertoli cells acetate production and glycolytic profile: a novel mechanism of obesity-induced male infertility? *Biochim Biophys Acta.* 2015 Sep;1852(9):1824–32.
27. Oonk RB, Jansen R, Grootegoed JA. Differential effects of follicle-stimulating hormone, insulin, and insulin-like growth factor I on hexose uptake and lactate production by rat Sertoli cells. *J Cell Physiol.* 1989/04/01. 1989;139(1):210–8.
28. Machado VL, Wassermann GF, Marques M. In vitro effect of insulin on the uptake of glucose and alpha-aminoisobutyric acid in the thyroid gland of the turtle (*Chrysemys dorsalis*). *Gen Comp Endocrinol.* 1991/04/01. 1991;82(1):8–13.
29. Riera MF, Meroni SB, Gómez GE, Schteingart HF, Pellizzari EH, Cigorruga SB, et al. Regulation of lactate production by FSH, IL1beta, and TNFalpha in rat Sertoli cells. *Gen Comp Endocrinol.* 2001/05/16. 2001 Apr;122(1):88–97.
30. Mullaney BP, Rosselli M, Skinner MK. Developmental regulation of Sertoli cell lactate production by hormones and the testicular paracrine factor, PModS. *Mol Cell Endocrinol.* 1994/08/01. 1994;104(1):67–73.

31. Perez-Sanches VH, Wassermann GF. Amino acid transport in rat Sertoli cell enriched testes: studies on the mechanism of action of follicle stimulating hormone. *Braz J Med Biol Res.* 1981/04/01. 1981;14(1):11–7.
32. Escott G, da Rosa L, Loss E. Mechanisms of Hormonal Regulation of Sertoli Cell Development and Proliferation: A Key Process for Spermatogenesis. *Curr Mol Pharmacol.* 2015 Feb 25;7(2):96–108.
33. Oonk RB, Grootegoed JA. Insulin-like growth factor I (IGF-I) receptors on Sertoli cells from immature rats and age-dependent testicular binding of IGF-I and insulin. *Mol Cell Endocrinol.* 1988/01/01. 1988;55(1):33–43.
34. Alves MG, Socorro S, Silva J, Barros A, Sousa M, Cavaco JE, et al. In vitro cultured human Sertoli cells secrete high amounts of acetate that is stimulated by 17 β -estradiol and suppressed by insulin deprivation. *Biochim Biophys Acta.* 2012 Aug;1823(8):1389–94.
35. Schoeller EL, Albanna G, Frolova AI, Moley KH. Insulin rescues impaired spermatogenesis via the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in Akita diabetic mice and restores male fertility. *Diabetes.* 2012 Jul;61(7):1869–78.
36. Huhaniemi I, Toppari J. FSH Regulation at the Molecular and Cellular Levels. *Sertoli Cell Biology.* Elsevier; 2005. p. 155–69.
37. Vannelli BG, Barni T, Orlando C, Natali A, Serio M, Balboni GC. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor in human testis: an immunohistochemical study. *Fertil Steril.* 1988/04/01. 1988;49(4):666–9.
38. Pitetti J-L, Calvel P, Zimmermann C, Conne B, Papaioannou MD, Aubry F, et al. An essential role for insulin and IGF1 receptors in regulating sertoli cell proliferation, testis size, and FSH action in mice. *Mol Endocrinol.* 2013 May;27(5):814–27.
39. JANNINI EA, ULISSE S, D'ARMIENTO M. Thyroid Hormone and Male Gonadal Function*. <http://dx.doi.org/101210/edrv-16-4-443>. Endocrine Society; 2008;
40. Fan QR, Hendrickson WA. Structural biology of glycoprotein hormones and their receptors. *Endocrine.* 2005 Apr;26(3):179–88.
41. Ulloa-Aguirre A, Zariñán T, Pasapera AM, Casas-González P, Dias JA. Multiple facets of follicle-stimulating hormone receptor function. *Endocrine.* 2007 Dec;32(3):251–63.
42. Amsterdam A, Hanoch T, Dantes A, Tajima K, Strauss JF, Seger R. Mechanisms of

- gonadotropin desensitization. *Mol Cell Endocrinol*. 2002 Feb 22;187(1-2):69-74.
43. Jacobus AP, Loss ES, Wassermann GF. Pertussis toxin nullifies the depolarization of the membrane potential and the stimulation of the rapid phase of Ca entry through L-type calcium channels that are produced by follicle stimulating hormone in 10- to 12-day-old rat Sertoli cells. *Front Physiol*. 2010/01/01. *Frontiers*; 2010 Jan;1:138.
 44. Loss ES, Jacobus AP, Wassermann GF. Rapid signaling responses in Sertoli cell membranes induced by follicle stimulating hormone and testosterone: calcium inflow and electrophysiological changes. *Life Sci*. 2011/06/28. 2011 Oct 10;89(15-16):577-83.
 45. Wassermann GF, Bloch LM, Grillo ML, Silva FR, Loss ES, McConnell LL. Biochemical factors involved in the FSH action on amino acid transport in immature rat testes. *Horm Metab Res*. 1992/06/01. 1992;24(6):276-9.
 46. Meroni S. Regulation of rat Sertoli cell function by FSH: possible role of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Endocrinol*. 2002 Aug 1;174(2):195-204.
 47. Arey BJ, Stevis PE, Deecher DC, Shen ES, Frail DE, Negro-Vilar A, et al. Induction of promiscuous G protein coupling of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor: a novel mechanism for transducing pleiotropic actions of FSH isoforms. *Mol Endocrinol*. 1997 May;11(5):517-26.
 48. Jensen M, De Meyts P. Molecular mechanisms of differential intracellular signaling from the insulin receptor. *Vitam Horm*. 2009 Jan;80:51-75.
 49. Nef S, Verma-Kurvari S, Merenmies J, Vassalli JD, Efstratiadis A, Accili D, et al. Testis determination requires insulin receptor family function in mice. *Nature*. 2003/11/25. 2003;426(6964):291-5.
 50. Escott GM, Jacobus AP, Loss ES. PI3K-dependent actions of insulin and IGF-I on seminiferous tubules from immature rats. *Pflugers Arch*. 2013 Oct;465(10):1497-505.
 51. Oliveira PF, Alves MG, Rato L, Laurentino S, Silva J, Sa R, et al. Effect of insulin deprivation on metabolism and metabolism-associated gene transcript levels of in vitro cultured human Sertoli cells. *Biochim Biophys Acta*. 2011/12/08. 2012;1820(2):84-9.

52. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001 Dec 13;414(6865):799–806.
53. Belfiore A, Frasca F, Pandini G, Sciacca L, Vigneri R. Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocr Rev*. 2009 Oct;30(6):586–623.
54. Griffeth RJ, Carretero J, Burks DJ. Insulin receptor substrate 2 is required for testicular development. Lobaccaro J-MA, editor. *PLoS One*. Public Library of Science; 2013 Jan;8(5):e62103.
55. Escott GM, de Castro AL, Jacobus AP, Loss ES. Insulin and IGF-I actions on IGF-I receptor in seminiferous tubules from immature rats. *Biochim Biophys Acta*. 2014 May;1838(5):1332–7.
56. Wassermann GF, Monti Bloch L, Grillo ML, Silva FR, Loss ES, McConnell LL. Electrophysiological changes of Sertoli cells produced by the acute administration of amino acid and FSH. *Horm Metab Res*. 1992/07/01. 1992;24(7):326–8.
57. Ritzen EM. Chemical messengers between Sertoli cells and neighbouring cells. *J Steroid Biochem*. 1983/07/01. 1983;19(1B):499–504.
58. Khan SA, Ndjountche L, Pratchard L, Spicer LJ, Davis JS. Follicle-stimulating hormone amplifies insulin-like growth factor I-mediated activation of AKT/protein kinase B signaling in immature rat Sertoli cells. *Endocrinology*. 2002/05/22. 2002;143(6):2259–67.
59. Andersen AS, Kjeldsen T, Wiberg FC, Vissing H, Schaffer L, Rasmussen JS, et al. Identification of determinants that confer ligand specificity on the insulin receptor. *J Biol Chem*. 1992/07/05. 1992;267(19):13681–6.
60. Entingh-Pearsall A, Kahn CR. Differential roles of the insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptors in response to insulin and IGF-I. *J Biol Chem*. 2004/07/13. 2004;279(36):38016–24.
61. Fantl WJ, Johnson DE, Williams LT. Signalling by receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem*. 1993 Jan;62:453–81.
62. Gauguin L, Klapproth B, Sajid W, Andersen AS, McNeil KA, Forbes BE, et al. Structural basis for the lower affinity of the insulin-like growth factors for the insulin receptor. *J Biol Chem*. 2008 Feb 1;283(5):2604–13.
63. Chatelain P, Naville D, Avallet O, Penhoat A, Jaillard C, Sanchez P, et al. Paracrine

- and autocrine regulation of insulin-like growth factor I. *Acta Paediatr Scand Suppl.* 1991/01/01. 1991;372:92–5; discussion 96.
64. Rappaport MS, Smith EP. Insulin-like growth factor (IGF) binding protein 3 in the rat testis: follicle-stimulating hormone dependence of mRNA expression and inhibition of IGF-I action on cultured Sertoli cells. *Biol Reprod.* 1995 Feb;52(2):419–25.
 65. Nakayama Y, Yamamoto T, Abé SI. IGF-I, IGF-II and insulin promote differentiation of spermatogonia to primary spermatocytes in organ culture of newt testes. *Int J Dev Biol.* 1999 Jul;43(4):343–7.
 66. Meroni SB, Riera MF, Pellizzari EH, Galardo MN, Cigorraga SB. FSH activates phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signaling pathway in 20-day-old Sertoli cells independently of IGF-I. *J Endocrinol.* 2004 Feb;180(2):257–65.
 67. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 Feb;7(2):85–96.
 68. Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res.* 2002 Mar;12(1):9–18.
 69. Vanhaesebroeck B, Guillermet-Guibert J, Graupera M, Bilanges B. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010 May 9;11(5):329–41.
 70. Cong L-N, Chen H, Li Y, Zhou L, McGibbon MA, Taylor SI, et al. Physiological Role of Akt in Insulin-Stimulated Translocation of GLUT4 in Transfected Rat Adipose Cells. *Mol Endocrinol.* Endocrine Society; 2011 Apr 21;
 71. Hansson V, Skalhegg B, Tasken K. Cyclic-AMP-dependent protein kinase (PKA) in testicular cells. Cell specific expression, differential regulation and targeting of subunits of PKA. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2000 May;73(1–2):81–92.
 72. Monaco L, Conti M. Inhibition by phorbol esters and other tumor promoters of the response of the Sertoli cell to FSH: evidence for dual site of action. *Mol Cell Endocrinol.* 1987 Feb;49(2–3):227–36.
 73. Huhtaniemi I, Nikula H, Parvinen M. Pertussis toxin enhances follicle-stimulating hormone-stimulated cAMP production in rat seminiferous tubules in a stage-dependent manner. *Mol Cell Endocrinol.* 1989 Mar;62(1):89–94.
 74. Crépieux P, Marion S, Martinat N, Fafeur V, Vern YL, Kerboeuf D, et al. The ERK-

- dependent signalling is stage-specifically modulated by FSH, during primary Sertoli cell maturation. *Oncogene*. 2001/08/11. 2001 Aug 2;20(34):4696–709.
75. Gao X, Lowry PR, Zhou X, Depry C, Wei Z, Wong GW, et al. PI3K/Akt signaling requires spatial compartmentalization in plasma membrane microdomains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Aug 30;108(35):14509–14.
 76. Versteyhe S, Klapproth B, Borup R, Palsgaard J, Jensen M, Gray SG, et al. IGF-I, IGF-II, and Insulin Stimulate Different Gene Expression Responses through Binding to the IGF-I Receptor. *Front Endocrinol (Lausanne)*. *Frontiers*; 2013 Jan 9;4:98.
 77. Batra S, Sjogren C. Effect of estrogen treatment on calcium uptake by the rat uterine smooth muscle. *Life Sci*. 1983/01/24. 1983;32(4):315–9.
 78. Oliveira PF, Sousa M, Barros A, Moura T, Rebelo da Costa A. Intracellular pH regulation in human Sertoli cells: role of membrane transporters. *Reproduction*. 2009 Mar;137(2):353–9.
 79. Oliveira PF, Alves MG, Rato L, Silva J, Sá R, Barros A, et al. Influence of 5 α -dihydrotestosterone and 17 β -estradiol on human Sertoli cells metabolism. *Int J Androl*. 2011 Dec;34(6 Pt 2):e612-20.
 80. Steger RW, Rabe MB. The effect of diabetes mellitus on endocrine and reproductive function. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1997 Jan;214(1):1–11.
 81. Zhang X-S, Zhang Z-H, Jin X, Wei P, Hu X-Q, Chen M, et al. Dedifferentiation of adult monkey Sertoli cells through activation of extracellularly regulated kinase 1/2 induced by heat treatment. *Endocrinology*. 2006 Mar;147(3):1237–45.
 82. Alves MG, Neuhaus-Oliveira A, Moreira PI, Socorro S, Oliveira PF. Exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid alters glucose metabolism in immature rat Sertoli cells. *Reprod Toxicol*. 2013 Jul;38:81–8.
 83. Rato L, Alves MG, Dias TR, Lopes G, Cavaco JE, Socorro S, et al. High-energy diets may induce a pre-diabetic state altering testicular glycolytic metabolic profile and male reproductive parameters. *Andrology*. 2013 May;1(3):495–504.
 84. de Castro AL, Cavalari FC, Diello M V, Fracasso BM, Loss ES. Epitestosterone and testosterone have similar nonclassical actions on membrane of Sertoli cells in whole seminiferous tubules. *Horm Metab Res*. © Georg Thieme Verlag KG; 2013 Jan 6;45(1):15–21.
 85. Gómez O, Ballester B, Romero A, Arnal E, Almansa I, Miranda M, et al. Expression

- and regulation of insulin and the glucose transporter GLUT8 in the testes of diabetic rats. *Horm Metab Res.* 2009 May;41(5):343–9.
86. Gorczynska E, Spaliviero J, Handelsman DJ. The relationship between 3',5'-cyclic adenosine monophosphate and calcium in mediating follicle-stimulating hormone signal transduction in Sertoli cells. *Endocrinology.* 1994 Jan;134(1):293–300.
 87. GRASSO P, REICHERT LE. Follicle-Stimulating Hormone Receptor-Mediated Uptake of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ by Proteoliposomes and Cultured Rat Sertoli Cells: Evidence for Involvement of Voltage- Activated and Voltage-Independent Calcium Channels*. *Endocrinology.* 1989 Dec;125(6):3029–36.
 88. Catalucci D, Zhang D-H, DeSantiago J, Aimond F, Barbara G, Chemin J, et al. Akt regulates L-type Ca^{2+} channel activity by modulating Cav α 1 protein stability. *J Cell Biol.* 2009 Mar 23;184(6):923–33.
 89. Ward PS, Thompson CB. Signaling in Control of Cell Growth and Metabolism. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012 Jul 1;4(7):a006783–a006783.
 90. McGivan JD, Pastor-Anglada M. Regulatory and molecular aspects of mammalian amino acid transport. *Biochem J.* 1994/04/15. 1994;299 (Pt 2):321–34.
 91. da Cruz Curte A, Wassermann GF. Identification of amino acid transport systems stimulated by FSH in rat testes. *J Endocrinol.* 1985/09/01. 1985;106(3):291–4.
 92. Silva FRMB, Wassermann GF. Kinetics of FSH stimulation of methylaminoisobutyric acid uptake in Sertoli cells in culture from testes of 15 day-old rats. *Med Sci Res.* 1999;27:627–30.
 93. Christensen HN, Oxender DL, Liang M, Vatz KA. The use of N-methylation to direct route of mediated transport of amino acids. *J Biol Chem.* 1965 Sep;240(9):3609–16.
 94. Csibi A, Fendt S-M, Li C, Poulogiannis G, Choo AY, Chapski DJ, et al. The mTORC1 pathway stimulates glutamine metabolism and cell proliferation by repressing SIRT4. *Cell.* 2013 May 9;153(4):840–54.
 95. Ronald Zielke H, Ozand PT, Tyson Tildon J, Sevdalian DA, Cornblath M. Reciprocal regulation of glucose and glutamine utilization by cultured human diploid fibroblasts. *J Cell Physiol.* Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 1978 Apr;95(1):41–8.