

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**EFEITO DE NUTRIENTES ENERGÉTICOS
NO METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS EM
CÉLULAS DE SERTOLI EM CULTURA**

GLÓRIA REGINA RODRIGUES DE FREITAS KAISER

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elena Aida Bernard

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Luiz Santos Perry

**Dissertação apresentada no curso de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas-Bioquímica, da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, para a obtenção do título de Mestre.**

PORTO ALEGRE

2002

Dedico este trabalho:

**Ao meu esposo Gustavo,
companheiro de todas as horas, que
neste período incentivou-me em todos
os momentos.**

**Aos meus Pais pela formação e
exemplo de vida.**

AGRADECIMENTOS

À prof^a. Elena Aida Bernard, pela compreensão, dedicação, ética profissional e sobretudo pela orientação e oportunidade de trabalhar em seu laboratório, proporcionando-me um crescimento científico e cultural.

Ao prof. Marcos L.S. Perry, pelo seu apoio, dedicação e, principalmente, pela ajuda indispensável na realização e correção deste trabalho.

À prof^a. Fátima Guma, pela sua disposição em ajudar sempre que foi preciso.

Ao prof. José Cláudio, pelas palavras de incentivo e estímulo durante a realização deste trabalho.

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

À Dona Lia, por sua colaboração na realização deste trabalho.

Aos demais professores do Departamento de Bioquímica da UFRGS, pelos ensinamentos que me proporcionaram crescimento.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica, pela presteza e dedicação.

Ao CNPq, FAPERGS e PROPESP/UFRGS, pelo apoio financeiro.

ARTIGO SUBMETIDO A PUBLICAÇÃO

Dados desta dissertação constam no artigo submetido a publicação na revista **International Journal of Andrology**, em junho de 2002.

Kaiser, G. R. R. F.; Monteiro, S. C.; Gerlain, D. P.; Souza, L. F.; Perry, M. L. S. and Bernard, E. A. - METABOLISM OF AMINO ACIDS BY CULTURED RATS SERTOLI CELLS.

ABREVIATURAS

ADP -	Adenosina difosfato
ATP -	Adenosina trifosfato
CMF-PBS -	Solução salina tamponada sem cálcio e magnésio
EDTA -	Ácido etilenodiaminotetra-acético
KRb -	Solução tampão Krebs-Ringer bicarbonato
FH4 -	Tetrahidrofolato
FSH -	Hormônio folículo estimulante
HBSS -	Solução salina de Hank
IGF -	Fator de crescimento semelhante a insulina
LDH -	Lactato desidrogenase
LH -	Hormônio luteinizante
PLP -	Piridoxal fosfato
OX -	D-aminoácidos oxidase
RNA -	Ácido ribonucleico
RBP -	Proteína ligadora de retinol ou lipídeos associados
SFB -	Soro fetal bovino
TCA -	Ácido tricloro acético

SUMÁRIO

I- INTRODUÇÃO.....	13
I.1- Testículos.....	13
I.1.1- Organização estrutural dos testículos.....	13
I.1.2- Regulação hormonal.....	14
I.1.3- Desenvolvimento da espermatogênese.....	14
I.2- Célula de Sertoli.....	15
I.2.1- Características estruturais.....	15
I.2.2- Funções das células de Sertoli.....	16
I.2.3- Metabolismo das células de Sertoli.....	17
I.3- Aminoácidos.....	24
I.3.1- Características gerais.....	24
I.3.2- Estrutura química geral.....	24
I.3.3- Classificação dos aminoácidos.....	25
I.3.4- Metabolismo dos aminoácidos.....	26
I.3.4.1- Síntese.....	26
I.3.4.1.1- Síntese dos aminoácidos não essenciais.....	27
I.3.4.1.1.2- Síntese dos aminoácidos não essenciais: alanina, glicina e glutamina	28
I.3.4.2- Degradação.....	28
I.3.4.2.2- Catabolismo dos aminoácidos alanina e glicina.....	32
I.3.4.2.3- Catabolismo da glutamina e glutamato.....	37
I.3.4.2.4- Catabolismo da valina.....	38
I.3.4.2.5- Catabolismo da leucina.....	41
II- OBJETIVOS.....	43

III- MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
III.1- Materiais.....	44
III.1.1- Listagem dos materiais utilizados na cultura.....	44
III.1.2- Listagem dos materiais utilizados nas incubações.....	46
III.1.3- Soluções e meios utilizados nas culturas das células.....	47
III.1.3.1- Solução salina tamponada de Hanks (HBSS).....	47
III.1.3.2- Solução Salina Fosfato Sem Cálcio e Magnésio (CMF-PBS)....	48
III.1.3.3- Meio de cultura.....	48
III.1.4- Enzimas utilizadas nas culturas.....	49
III.1.5- Soluções utilizadas nas incubações.....	50
III.1.5.1- Solução tampão de Krebs-Ringer bicarbonato.....	50
III.1.6- Substâncias radioativas.....	50
III.2- Métodos.....	51
III.2.1- Isolamento da célula de Sertoli.....	51
III.2.2- Cultura primária de célula de Sertoli.....	52
III.2.3- Coleta das células de Sertoli.....	54
III.2.4- Incubação das células de Sertoli com precursores radioativos.....	54
III.2.5- Processamento das amostras.....	56
III.2.5.1- Experimentos da oxidação dos precursores radioativos a CO ₂	56
III.2.5.2- Experimento que determina a síntese de lipídios a partir dos precursores radioativos.....	56
III.2.5.3- Experimento que mede a incorporação a partir dos precursores radioativos a proteínas.....	57

IV-RESULTADOS.....	59
IV.1-Capítulo I.....	59
IV.2- Capítulo II.....	82
IV.2.1- Efeito do ácido palmítico na oxidação da leucina, na sua conversão a lipídeos e sua incorporação em proteínas em presença de glicose.....	83
IV.2.2- Efeito do ácido palmítico na oxidação da glutamina, na sua conversão a lipídeos e sua incorporação em proteínas em presença da glicose.....	85
IV.2.3- Efeito do ác. palmítico na oxidação da valina, na sua conversão a lipídeos e sua incorporação em proteínas em presença de glicose.....	86
IV.2.4- Efeito do piruvato na oxidação da valina, na sua conversão a lipídeos e sua incorporação em presença ou ausência da glutamina.....	88
V- DISCUSSÃO.....	90
VI- CONCLUSÕES.....	96
VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98

LISTA DE TABELAS

I.1.3.4.1- Relação dos aminoácidos não essenciais e essenciais.....	27
I.3.4.2.1- Aminoácidos glicogênicos, glicogênicos e cetogênicos ou cetogênicos.....	30

LISTA DE FIGURAS

1.3.2.1- Estrutura química geral dos aminoácidos.....	25
I.3.4.2.1- Figura representativa do destinos dos esqueletos de carbono dos aminoácidos.....	31
I.3.4.2.2.- Figura ilustrativa do catabolismo da alanina.....	33
I.3.4.2.3.- Figura ilustrativa do catabolismo da glicina.....	36
I.3.4.2.3.1.-Figura ilustrativa da síntese e degradação da glutamina.....	37
I.3.4.2.3.2- Conversão do glutamato para α -cetoglutarato.....	38
I.3.4.2.4.- Figura ilustrativa do catabolismo da valina.....	40
I.3.4.2.5- Catabolismo da leucina.....	42
III.2.2.2- Representação esquemática da obtenção de células de Sertoli.....	53
III.2.4.1.- Representação esquemática dos experimentos realizados com os diferentes aminoácidos radioativos em presença de outros possíveis substratos energéticos.....	55
III.2.5.2- Representação esquemática das condições de incubação, avaliação da oxidação a CO ₂ , conversão a lipídeos e medida da incorporação em proteínas dos diferentes aminoácidos radioativos.....	58
IV.2.1- Efeito do ácido palmítico e glicose no metabolismo da leucina.....	84
IV.2.2- Efeito do ácido palmítico no metabolismo da glutamina em presença da glicose.....	85
IV.2.3- Efeito do ácido palmítico e glicose no metabolismo da valina.....	87
IV.2.4- Efeito do piruvato e/ou glutamina na oxidação da valina na sua conversão a lipídeos e sua incorporação em proteínas.....	89

RESUMO

Estudos previos de nosso laboratório (**Monteiro,1999**), demonstraram que os aminoácidos além de incorporarem-se às proteínas, também podem ser usados como nutrientes energéticos metabólicos. **Grootegoed e Cols.,(1986)**, mostraram o envolvimento de diferentes substratos e de diferentes caminhos na obtenção de energia em células de Sertoli. Neste trabalho, verificamos a capacidade que diferentes aminoácidos possam ter para a produção de energia em células de Sertoli de ratos de 16-18 dias de idade, investigando a oxidação a CO₂, conversão a lipídeos e incorporação a proteínas de alguns aminoácidos, na presença ou ausência de outros nutrientes energéticos, tais como ác. palmítico, glicose e/ou glutamina.

No capítulo I do presente trabalho, realizou-se um estudo utilizando os aminoácidos alanina, leucina, glicina, glutamina e valina em cultura de células de Sertoli, na presença ou ausência de nutrientes energéticos tais como: ácido palmítico, glicose e/ou glutamina. Nossos resultados mostraram que a glicina parece ser um pobre substrato energético sendo principalmente incorporada a proteínas e parcialmente convertida à lipídeos. O catabolismo da glicina não é alterado na presença de ácido palmítico, glicose e/ou glutamina. A presença de ác. palmítico não tem efeito no metabolismo dos aminoácidos estudados, no que se refere à oxidação a CO₂, conversão a lipídeos e incorporação em proteínas pelas células de Sertoli em cultura. Por outro lado, a presença de glicose parece alterar significativamente a produção de CO₂, bem como a síntese de lipídeos e proteínas a partir dos aminoácidos alanina, leucina e valina. A respeito da presença da glutamina, os resultados mostram diminuição na oxidação a

CO₂ da alanina, leucina e valina nas células de Sertoli, mesmo na presença de glicose, enquanto que a conversão destes aminoácidos a lipídeos não foi alterada. Contudo, quando glutamina e glicose foram adicionadas juntas, somente a conversão a lipídeos a partir da leucina foi aumentada. A glutamina causou uma diminuição na incorporação da alanina em proteínas sem alterar a incorporação da leucina e da valina. Por outro lado, tanto alanina quanto leucina diminuíram a oxidação da glutamina a CO₂.

No capítulo II estudou-se o efeito conjunto de dois nutrientes energéticos (glicose, glutamina, ácido palmítico e piruvato) no metabolismo dos aminoácidos leucina, glutamina e valina em cultura de células de Sertoli, no que diz respeito à produção de energia, procurando esclarecer aspectos referentes à oxidação a CO₂, conversão a lipídeos e incorporação em proteínas. Nossos resultados mostram que a adição do ácido palmítico junto à glicose não alterou o metabolismo da leucina, no que se refere à oxidação a CO₂, conversão a lipídeos e incorporação a proteínas. Por outro lado, a presença de glicose e de ác. palmítico diminuiu a oxidação do CO₂, não modificando a conversão a lipídeos e incorporação de valina a proteínas. Quanto ao metabolismo da glutamina, tanto a adição de glicose juntamente com ácido palmítico, não modificaram o metabolismo da glutamina na oxidação a CO₂, conversão a lipídeos e incorporação a proteínas. Sendo assim, entre os substratos energéticos utilizados neste trabalho, a glutamina foi o mais utilizado pelas células de Sertoli para a obtenção de energia, mesmo na presença de outros nutrientes tais como: glicose, ácido palmítico e piruvato. Por outro lado, entre os nutrientes energéticos o ácido palmítico é o menos proveitoso para a obtenção de energia pelas células de Sertoli.

I-INTRODUÇÃO

I.1-Testículos

I.1.1-Organização Estrutural do Testículo

Os testículos são glândulas que fazem parte do aparelho reprodutor masculino, cuja função é produzir espermatozóides e hormônios sexuais masculinos. Apresentam-se envolvidos por uma espessa e resistente cápsula de tecido conjuntivo, a albugínea. Localizam-se dentro das bolsas escrotais, estruturas revestidas por pele e que contem abundante camada de músculo liso. Desta maneira, os testículos permanecem fora da cavidade abdominal, com isso, sua temperatura é alguns graus abaixo da temperatura abdominal. Atribui-se às bolsas escrotais o importante papel de manter constante a temperatura dos testículos, pois em presença de temperatura fria contraem-se e em temperatura elevada relaxam-se.

Estruturalmente, os testículos dos mamíferos são compostos por dois compartimentos distintos: o tecido intersticial vascularizado e os túbulos seminíferos. Nos túbulos seminíferos são produzidos os espermatozóides.

O tecido intersticial é formado por vasos sangüíneos, canais linfáticos, macrófagos e pelas células de Leydig onde ocorre a síntese de andrógenos que estão ligados ao desenvolvimento das características sexuais primárias e secundárias e no processo espermatogênico.

Os túbulos seminíferos são constituídos por dois tipos básicos de células: as células de Sertoli, ditas células não proliferativas, uma vez que somente proliferam nos primeiros estágios do desenvolvimento dos testículos. Estas células são componentes somáticos do epitélio seminífero que circunda as células germinativas (proliferativas). As células

germinativas originam os espermatozóides através de um complexo processo de diferenciação celular: espermatogênese e espermiogênese.

I.1.2- Regulação Hormonal

Os testículos são passíveis da influência de dois hormônios hipofisários: LH e FSH. O LH atua nas células de Leydig regulando a produção de andrógenos, sendo a testosterona o principal representante desse grupo. O FSH atua sobre os túbulos seminíferos, ligando-se especificamente às células de Sertoli (*Steinberger e Steinberger, 1971*).

A iniciação e a manutenção da espermatogênese é dependente do FSH e da testosterona. A regulação do desenvolvimento das células germinativas está fortemente associada às células de Sertoli, já que os receptores para o FSH e para a testosterona são encontrados nas superfícies das células de Sertoli (*Griswold, 1993*) ou no citosol (*Sar et al., 1993*) respectivamente. Um dos efeitos do FSH e da testosterona sobre as células de Sertoli é a estimulação da produção de proteínas como a ABP (proteína carreadora de andrógenos) e a inibina. A glicoproteína inibina age no hipotálamo e na hipófise, inibindo a secreção do FSH e gerando um feedback negativo entre os testículos e a hipófise.

I-1.3- Desenvolvimento da Espermatogênese

Espermatogênese é o processo de formação de espermatozóides a partir das células germinais imaturas, a qual ocorre no epitélio seminífero. Os espermatozóides formados são transportados através do lúmen do túbulo até o epidídimo onde são armazenados até completar sua maturação fisiológica.

O desenvolvimento das células germinativas inicia com as espermatogônias indiferenciadas derivadas dos gonócitos fetais.

A espermatogênese pode ser dividida em três fases distintas:

- 1- Fase Espermatogônica
- 2- Fase Espermatocítica ou meiose
- 3- Fase de Espermátide ou espermiogênese

As células mais imaturas encontram-se perto da membrana basal. À medida que as células proliferam e diferenciam-se, movem-se em direção da luz do túbulo seminífero. Geralmente podem ser identificadas, no epitélio seminífero, quatro ou cinco camadas concêntricas, que representam gerações de células em diferentes fases do desenvolvimento. As espermatogônias derivadas de células germinativas primordiais, após divisões mitóticas e diferenciações morfológicas, geram os espermatócitos, os quais se dividem meioticamente originando as espermátides. Estas células haplóides sofrem diferenciação morfológica, conhecida como espermiogênese, à medida em que vão sendo transformadas em espermatozóides.

I.2-Célula de Sertoli

I.2.1- Características Estruturais

As células de Sertoli foram descritas em testículo humano por Enrico Sertoli em 1865.

As células de Sertoli são uma população de células somáticas as quais proliferam durante o período fetal e pré-puberal, mas não se dividem após 16 dias de idade em ratos (*Steinberger, e Steinberger, 1971; Orth, 1982*).

Entretanto durante a iniciação da espermatogênese, as células de Sertoli continuam a aumentar de tamanho, tornando-se aptas para dar suporte e nutrição para as células espermatogênicas.

A célula de Sertoli é uma célula epitelial comprida, colunar e estrelada, com ramificações que se estendem desde a lâmina basal dos túbulos seminíferos, onde são apoiadas, até o lúmen tubular. As células de Sertoli envolvem as células germinativas associadas e possuem um núcleo irregular e complexo e, no seu citoplasma, além de organelas usuais, possuem microtúbulos e microfilamentos (*Fawcett, 1993*). A projeção do citoplasma das células de Sertoli, próximas à base das células, conectam-se umas às outras formando as junções oclusivas (tight junctions) entre células de Sertoli adjacentes (**Russel e Person, 1985**). Essas junções especializadas, além de manter o epitélio germinativo coeso, permitem a comunicação célula-célula, através de contatos de baixa resistência das membranas, formando a base estrutural da barreira sangue testículo (**Fawcett, 1975**). A barreira divide o túbulo seminífero em compartimento basal e compartimento adluminal. O arranjo citoarquitetônico entre as células de Sertoli e as células germinativas é um dos exemplos da importância da interação ambiental célula-célula no testículo.

I.2.2- Funções das Células de Sertoli

As células de Sertoli possuem múltiplas funções especializadas, entre as quais a função primária de fornecer fatores de crescimento e criar um ambiente apropriado para o desenvolvimento de células germinativas.

Muitas funções acontecem simultaneamente tais como: (**Means et al. 1976**).

-Estabelecimento e manutenção da barreira sangue-testículo

-Fagocitose de células germinativas danificadas e dos corpos residuais que resultam do processo de metamorfose das espermatídes

-Secreção e manutenção de um fluido rico em potássio e bicarbonato (o qual permite maior direcionamento dos espermatozóides ao fluírem do testículo para o epidídimo)

-Produção e secreção de proteínas testiculares

-Síntese de estradiol a partir da testosterona

A célula de Sertoli no túbulo seminífero possui um caráter de célula exócrina e endócrina o que é estabelecido pelos tipos de seus produtos secretórios.

A produção e secreção de muitos produtos da célula de Sertoli podem ser regulados por fatores hormonais, incluindo FSH e testosterona, fatores nutricionais (metabólicos energéticos, metais ou vitaminas) e por interações ambientais (contato das células) (SKINNER, 1991). Esta regulação pode ocorrer especificamente na transcrição de gens, na tradução de RNA ou nas modificações pós-transcricionais.

I.2.3- Metabolismo das Células de Sertoli

Durante o desenvolvimento inicial dos testículos, as células de Sertoli são menos especializadas e podem não ser requeridas para a sobrevivência das células germinativas. A maior parte da especialização morfológica e bioquímica das células de Sertoli é originada após a cessação da divisão celular e a formação do complexo “tight junctional”. Todas essas especializações são com o propósito de manter o complexo “tight junctional” e providenciar suporte direto e/ou indireto para as células germinativas.

Fator importante no metabolismo das células de Sertoli é a ação de vários hormônios incluindo FSH e testosterona. O FSH tem função importante determinando o estado de equilíbrio de algumas enzimas do metabolismo.

As células de Sertoli maduras são mitoticamente inativas, mas metabolicamente muito ativas. Os eventos metabólicos acontecem em temperaturas abaixo da temperatura ótima para as reações catalisadas por enzimas no resto do organismo. Deve-se dar relevância à superfície da membrana plasmática que interage com o sistema vascular linfático testicular e portanto, à superfície pela qual os metabólitos entram na célula, a qual é uma pequena percentagem do total da membrana plasmática celular.

Metabólitos de grande peso molecular ou ligados a proteínas, tais como o ferro à transferrina, vitamina A à RBP- proteína ligadora de retinol ou lipídeos associados com apolipoproteínas, devem entrar na célula via aproximadamente 5% da área de superfície da membrana plasmática que é basal aos complexos “tight junctional”.

As células germinativas são metabolicamente dependentes da difusão de produtos do exterior do túbulo ou de produtos vindos diretamente das células de Sertoli.

O estudo bioquímico e metabólico das células de Sertoli teve origem com o desenvolvimento das técnicas de cultura de células. Essas técnicas permitem realizar experimentos em culturas de células de Sertoli livres de células germinativas e peritubulares, com a vantagem de uma população pura de células de Sertoli.

Sendo assim, **Robinson e Fritz (1981)**, iniciaram os estudos metabólicos da glicose em células de Sertoli. Células de Sertoli em cultura, de ratos de 20 dias de idade, foram incubadas com [U-¹⁴C]glicose e a conversão a CO₂, total de ânions, lactato, lipídeos e glicogênio foram

determinados. Somente um pequeno percentual do total, 3%, é oxidado a CO₂, e menos de 2% é convertido em lipídeos e glicogênio. A grande maioria da glicose é convertida em lactato (mais de 75%) que é secretado. Posteriormente, **Grootegoed & cols, (1986)** mostraram que 72% do piruvato originado do metabolismo da glicose são convertidos em lactato, enquanto que somente 25% são oxidados via ciclo de Krebs.

Muitos experimentos envolvendo insulina, IGF-1 e FSH foram realizados no decorrer dos anos, com o objetivo de investigar a utilização da glicose e produção de lactato pelas células de Sertoli.

Grootegoed e col.,(1981); Mita e col.,(1982); Jutte e col.,(1982,1983); Le Gac e col.,(1983); Borland e col.,(1984) reportaram que FSH, insulina e/ou IGF-1, possuem efeito estimulatório no metabolismo da glicose e produção de lactato pelas células de Sertoli “in vitro”.

Oonk e col.,(1985) estudaram e compararam os efeitos da insulina e FSH no metabolismo da glicose pelas células de Sertoli em cultura e verificaram que doses baixas de insulina exercem um rápido efeito estimulatório no metabolismo da glicose, similares aos efeitos do FSH, porém eles atuam por diferentes mecanismos.

Em geral tem sido reportado que o efeito do FSH no metabolismo da glicose é mediado pela adenil ciclase e AMPc, ativando as enzimas glicolíticas. Entretanto, a insulina estimula o transporte das hexoses em células de Sertoli em cultura.

Os estudos do metabolismo da glicose em células de Sertoli têm mostrado que a maioria da glicose metabolizada é convertida em lactato e não é oxidada via ciclo de Krebs. O meio ambiente dentro dos túbulos seminíferos contém 2% dos níveis da glicose encontrados no sangue e 50% dos níveis de lactato.

O metabolismo da glicose e a produção de lactato pelas células de Sertoli provavelmente desempenham uma função importante para manter o conteúdo de ATP pelas células espermatogênicas “in vivo”.

Esta concepção de que as células de Sertoli metabolizam glicose até lactato para ser usado pelas células germinativas é atraente e sustentada pelos experimentos comentados acima. Células germinativas preferem lactato do que glicose como substrato energético (**Jutte et al.,1981; Nakamura et al., 1981**). Entretanto, tais idéias necessitam de evidências experimentais “in vivo”.

Embora se tenha um número limitado de estudos que examinem a síntese de lipídeos em culturas primárias de células de Sertoli, sabe-se que as células de Sertoli podem utilizar ácidos graxos como fonte de energia. Estes estudos iniciaram com as observações de **Nieni & Kormano,(1965);Kerr & Kretser,(1975)** que, através de técnicas histológicas, constataram gotas de lipídeos nestas células e a quantidade destas gotas variam com o estágio do ciclo espermatogênico.

Gotas de lipídeos também foram observadas em culturas de células de Sertoli e provavelmente contenham triacilgliceróis que através de lipólise geram glicerol e ácidos graxos livres.

Em 1972, Lin e Fritz atribuíram às espermatogônias a oxidação do palmitato a CO_2 e acetoacetato. Entretanto, não se pode excluir deste resultado, a oxidação pelas células de Sertoli, as quais estavam presente juntamente com outros tipos celulares dos testículos.

Fisher e col.,(1983) estudaram o metabolismo dos lipídeos nas células de Sertoli em cultura de ratos imaturos e observaram que as células de Sertoli em cultura acumulavam ácidos graxos. Os ácidos graxos sintetizados foram esterificados largamente como fosfolipídeos ou triglicerídeos.

Resultados similares ao de **Fisher e col.,(1983)** foram mostrados por **Aveldaño e col.,(1993)** onde túbulos seminíferos de ratos de 6 semanas de idade, incubados por 1 h com [^{14}C]acetato, apresentaram a radioatividade principalmente como triglicerídeos e fosfolipídeos.

Guma e col.,(1997) estudaram os efeitos do FSH e insulina na lipogênese das células de Sertoli em cultura de ratos imaturos. Foi relatado que o FSH e insulina têm efeito regulatório no metabolismo dos lipídeos nas células de Sertoli. Após 8 horas de pré-incubação com insulina, a atividade da enzima ATP-citrato liase aumentara, enquanto que o FSH não causou efeito nesta enzima. A atividade da glicerol fosfato desidrogenase não foi afetada por nenhum dos dois hormônios testados. Quanto à incubação das células de Sertoli com [$1,2\text{-}^{14}\text{C}$]acetato, o ^{14}C estava presente predominantemente em triglicerídeos e fosfolipídeos, e em menor quantidade, em outros lipídeos. O pré-tratamento das células de Sertoli com insulina e FSH aumentou a incorporação do acetato em lipídeos. Desta forma, o controle hormonal no metabolismo das células de Sertoli é importante, não somente para a manutenção da energia para a própria célula, como também para o controle do processo espermatogênico.

Jutte e col.,(1985), constataram que células de Sertoli podem oxidar palmitato até CO_2 e corpos cetônicos. Para tanto, foram incubadas as culturas de células de Sertoli de ratos de 19 dias de idade com ácido palmítico [1-C^{14}]. Após 5 horas de incubação a 34°C , as células foram coletadas e os produtos da oxidação do palmitato foram determinados. Sob essas condições, 66% do palmitato oxidado foi a CO_2 . Dos 34% do produto oxidado remanescente, 1/3 encontrou-se nas células e 2/3 no meio de cultura como corpos cetônicos, 3-hidroxiacetato ou acetoacetato. Somente, uma pequena quantidade de palmitato radioativo estava como triacilglicerol ou lipídeos esterificados. Entretanto, com a adição de glicose houve um aumento substancial na esterificação do palmitato, porém, com

uma influência mínima na quantidade de CO₂ ou corpos cetônicos formados.

O fato da presença da glicose exógena não ter influenciado a oxidação do palmitato para CO₂ ou corpos cetônicos pelas células de Sertoli é um indicativo de que os lipídeos sejam substratos energéticos mais importantes para essas células do que a glicose.

A função da carnitina no metabolismo das células de Sertoli foi investigada por **Palmero e col.,(2000)**, onde foi avaliada a influência da carnitina no metabolismo dos lipídeos e carboidratos. Os resultados mostraram que no metabolismo dos carboidratos, isto é, produção de lactato e piruvato, atividade da lactato desidrogenase (LDH) e transporte das hexoses, foram todos significativamente aumentados, imediatamente com a suplementação da carnitina “in vitro”. Já no metabolismo dos lipídeos, a concentração intracelular de ácidos graxos não esterificados foi significativamente reduzida. Por outro lado, a concentração intracelular dos corpos cetônicos não foi alterada. Portanto, parece que a carnitina direciona o metabolismo intermediário das células de Sertoli em um via intimamente interrelacionada, estimulando ambos, quebra dos ácidos graxos e glicólise.

As células de Sertoli também podem utilizar glutamina ou leucina como fontes de energia. As células de Sertoli são capazes de converter quantidades substanciais de glutamina a CO₂, que pode ser estimulada pelo dibutiril AMP cíclico. A situação “in vivo” não é bem clara. Culturas de células de Sertoli podem obter 2 a 5 nmoles de ATP/min.mg de proteína a partir da glutamina, (**Grootegoed e col.,1986**).

No epitélio seminífero de ratos, uma transferase específica que converte aminoácidos alifáticos de cadeia simples em seus correspondentes α -ceto ácidos está presente nas células de Sertoli. Tal afirmação foi obtida através dos estudos de **Grootegoed e col.,(1985)**, onde foi observado que as células de Sertoli convertem leucina via transaminação a 4-metil-2-

oxovalerato, enquanto que os espermatócitos e espermátides reduzem o 4-metil-2-oxovalerato em 2-hidroxi-4-metil-valerato. Com isso, há a formação de uma única via intercelular do catabolismo da leucina.

A habilidade das células de Sertoli em cultura em utilizar aminoácidos como fonte de energia, tem sido investigada. **Monteiro,(1999)** pesquisou o metabolismo de quatro aminoácidos: alanina, glicina, leucina e valina em culturas de células de Sertoli, medindo a sua utilização como precursores na síntese protéica e lipídica e na oxidação a CO₂. Para tanto, foram utilizadas culturas de células de Sertoli de ratos de 16 a 18 dias de idade, incubando as células com [U-¹⁴C]glicina ou L[U-¹⁴C]leucina ou L[U-¹⁴C]alanina ou L[U-¹⁴C]valina.

Dos resultados obtidos foi concluído que células de Sertoli em cultura utilizam os aminoácidos ramificados, leucina e valina, em maior percentagem para oxidação a CO₂. A alanina é preferencialmente utilizada para a conversão em lipídeos. A glicina é pouco utilizada pelas células de Sertoli para obtenção de energia e é um bom precursor de serina que é incorporada como tal a fosfolipídeos. Quanto à síntese protéica, os quatros aminoácidos foram utilizados em quantidades semelhantes.

I.3- Aminoácidos

I.3.1- Características Gerais:

Aminoácidos são unidades monoméricas de construção das proteínas, conseqüentemente, são os produtos primários da degradação das mesmas. Todas as proteínas são formadas a partir da ligação em seqüência de apenas 20 diferentes aminoácidos, embora mais de 300 tipos diferentes de aminoácidos estejam descritos. Uma das características dos aminoácidos é que eles possuem caráter anfótero.

I.3.2- Estrutura Química Geral

Os 20 aminoácidos comumente encontrados nas proteínas possuem uma estrutura geral. Eles possuem em comum um carbono alfa central ao qual estão covalentemente ligados um grupamento carboxílico, um grupamento amino e um hidrogênio. Além disso, também ligado ao carbono alfa, encontra-se um radical R chamado de cadeia lateral, específica para cada um dos aminoácidos.

Os aminoácidos isolados de proteínas por hidrólise alcalina suave, com exceção da glicina, são opticamente ativos; isto é, eles são capazes de desviar o plano da luz plano-polarizada.

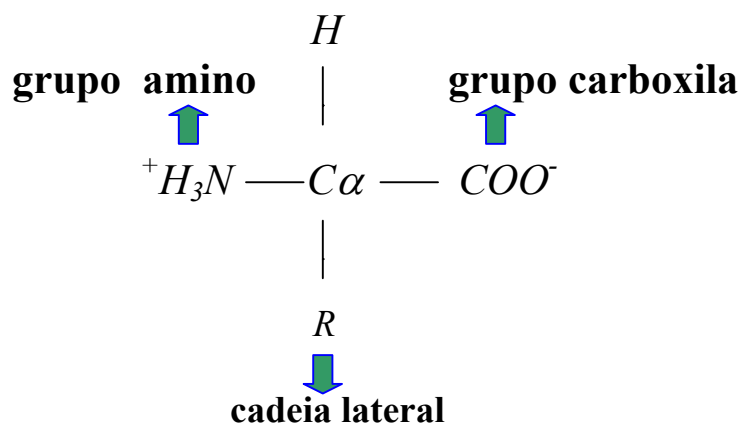


Figura 1.3.2.1- Estrutura química geral dos aminoácidos

I.3.3- Classificação dos Aminoácidos

É a polaridade do radical “R” que permite a classificação dos aminoácidos em 3 classes:

Aminoácidos com radical “R” apolar: são aqueles que possuem radical “R” geralmente formado exclusivamente por carbono e hidrogênio-grupamento alquila.. São hidrofóbicos e em número de 8.

Alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina (forma anel imina), fenilalanina, triptofano e metionina (“R” contém enxofre).

Aminoácidos com radical “R” polar não-carregados: São aminoácidos com radicais “R” contendo hidroxilas, sulfidrilas e grupamentos amida. São hidrofílico e em número de 7.

Glicina, serina (“R” com função alcoólica), treonina (“R” com função alcoólica, cisteína (posui um radical sulfidrilas), tirosina (“R” com grupamento fenol), asparagina (“R” com função amida), glutamina (“R” com função amida).

Aminoácidos com radical “R” polar carregado: Existem duas subclasses:

“R” carregados positivamente, são aminoácidos diamino e monocarboxílico, em número de 3.

Lisina, arginina e histidina.

“R” carregado negativamente, são aminoácidos monoamino e dicarboxílico, em número de 2.

Ácido aspártico e o ácido glutâmico.

I.3.4 - Metabolismo dos Aminoácidos

I.3.4.1- Síntese

Existem 20 aminoácidos principais compreendendo mais de três quartos do peso sólido do organismo humano, sendo as substâncias mais abundantes depois da água. Devido à estrutura única de cada um, suas vias metabólicas são distintas. Os aminoácidos são divididos em essenciais e não essenciais. Os essenciais são aqueles que o organismo não consegue produzir e são derivados dos alimentos, enquanto que os não essenciais são aqueles que o organismo pode produzir e são obtidos através de transformações metabólicas dos essenciais e da glicose e mais uma origem de nitrogênio.

Não Essenciais	Essenciais
<i>Alanina</i>	<i>Isoleucina</i>
<i>Ácido aspártico</i>	<i>Leucina</i>
<i>Ácido glutâmico</i>	<i>Lisina</i>
<i>Arginina</i>	<i>Fenilalanina</i>
<i>Asparagina</i>	<i>Metionina</i>
<i>Cisteína</i>	<i>Treonina</i>
<i>Tirosina</i>	<i>Triptofano</i>
<i>Glicina</i>	<i>Valina</i>
<i>Glutamina</i>	<i>Histidina</i>
<i>Prolina</i>	
<i>Serina</i>	

Tabela I.3.4.1- Relação dos aminoácidos não essenciais e essenciais. Destaque em vermelho para os aminoácidos estudados neste trabalho.

I.3.4.1.1- Síntese dos Aminoácidos Não Essenciais

Os esqueletos de carbono dos 11 aminoácidos não essenciais derivados da glicose são produzidos a partir de intermediários da glicólise e do ciclo de Krebs. Quatro aminoácidos (serina, glicina, cisteína e alanina) são produzidos a partir da glicólise via componentes da via glicolítica. Intermediários do ciclo de Krebs, que são produzidos a partir da glicose providenciam carbono para a síntese dos seis aminoácidos remanescentes. O α -cetoglutarato é o precursor para a síntese de glutamato, glutamina, prolina e arginina. O oxaloacetato para a síntese de aspartato e asparagina.

I-3.4.1.1.2- Síntese dos Aminoácidos Não Essenciais: Alanina, Glicina e Glutamina

Piruvato e α -cetoglutarato são os α -cetoácidos correspondente dos aminoácidos **alanina e glutamato**. A **alanina** é sintetizada a partir do piruvato através de uma reação de transaminação reversível catalisada pela alanina transaminase (ALT). **Glutamina** é sintetizada a partir do glutamato por uma amidação dependente de ATP. Na reação da glutamina sintetase, glutamato é primeiramente ativado pela reação com ATP para formar o intermediário gama-glutamilfosfato; em seguida, o NH_3 desloca o grupo fosfato para produzir glutamina.

A **glicina** é metabolizada por várias rotas. É produzida a partir da serina por degradação reversível que envolve tetraidrofolato. Também pode ser produzida por degradação da treonina. Pode ser oxidada pela D-aminoácido oxidase cujo produto, o glioxalato, é convertido novamente em glicina por transaminação.

I.3.4.2- Degradação

Os aminoácidos que excedem as necessidades de síntese de proteína a partir de outras biomoléculas não podem ser armazenadas, ao contrário dos ácidos graxos e glicose, nem excretados. Eles são usados como alimento energético no metabolismo. A amina é removida e o esqueleto carbonado resultante é transformado em um intermediário das principais vias metabólicas. A maior parte das aminas dos aminoácidos em excesso é convertida a uréia, enquanto seus esqueletos carbonados são transformados

em acetil-CoA, acetoacetilCoA, ou em um dos intermediários do ciclo de Krebs. Portanto, podem ser formados ácidos graxos, corpos cetônicos e glicose a partir de aminoácidos.

Muitas coenzimas desempenham papéis importantes na degradação de aminoácidos. O piridoxal fosfato, por exemplo, forma intermediários em base de Schiff que permite aos grupamentos amino serem movidos entre os aminoácidos e os cetoácidos. A vitamina B₁₂ (cobalamina), um co-fator semelhante à porfirina que contém cobalto, serve como uma fonte de radicais livres no rearranjo de um esqueleto carbonado.

Os aminoácidos podem ser classificados em glicogênicos, cetogênicos, e glicogênicos e cetogênicos de acordo com o destino dos seus carbonos.

Por definição, os aminoácidos **glicogênicos** são aqueles em que seus carbonos são convertidos a compostos que produzem glicose, piruvato e intermediários do ciclo de Krebs (α -cetoglutarato, succinil-CoA, fumarato e oxaloacetato). Os **cetogênicos** são aqueles aminoácidos em que seus esqueletos de carbonos são convertidos a corpos cetônicos ou seus precursores (acetoacetato). Já os **glicogênicos e cetogênicos** são os que convertem alguns de seus carbonos a glicose e outros carbonos são convertidos a acetil-CoA e acetoacetato.

GLICOGÊNICOS	GLICOGÊNICOS E CETOGÊNICOS	CETOGÊNICOS
Alanina Asparagina Aspartato Cisteína Glutamato Glutamina Glicina Prolina Serina	Tirosina	
Arginina Histidina Metionina Treonina Valina	Isoleucina Fenilalanina Triptofano	Leucina Lisina

Tabela I.3.4.2.1- Aminoácidos glicogênicos, glicogênicos e cetogênicos ou cetogênicos. Destaque em vermelho para os aminoácidos essenciais. Adaptada de CHAMPE et cols, 1987.

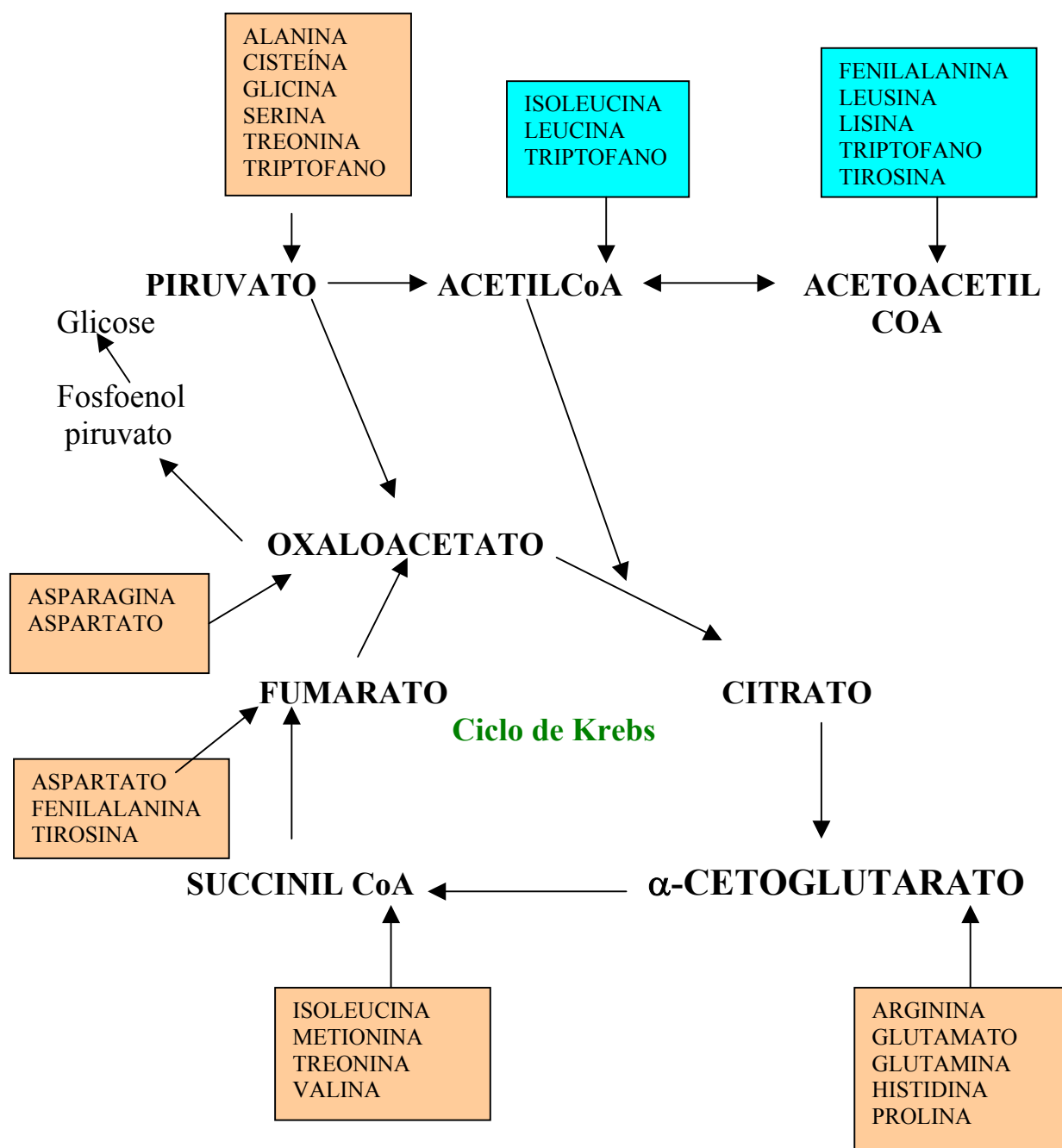


Figura I.3.4.2.1- Figura representativa do destinos dos esqueletos de carbono dos aminoácidos. Aminoácidos glicogênicos em laranja e os cetogênicos em azul. Alguns são tanto cetogênicos como glicogênicos. Adaptado do Stryer, 4^o edição, 1996.

I.3.4.2.2- Catabolismo Dos Aminoácidos Alanina e Glicina

Alanina é o principal aminoácido gliconeogênico, pois é produzido em muitos tecidos para o transporte de N para o fígado.

Alanina forma piruvato por uma reação de transaminação catalisada pela alanina transferase sendo que o piruvato pode ser convertido de volta para alanina pela mesma reação. Uma vez formado o piruvato, este poderá, através da piruvato desidrogenase ser convertido a acetil-CoA. Com isso, a alanina pode ser utilizada na via lipogênica. O piruvato pode entrar no ciclo de Krebs para a produção de CO₂ e H₂O, metabolizado neste caso como um componente energético (Figura I.3.4.2.1.1)

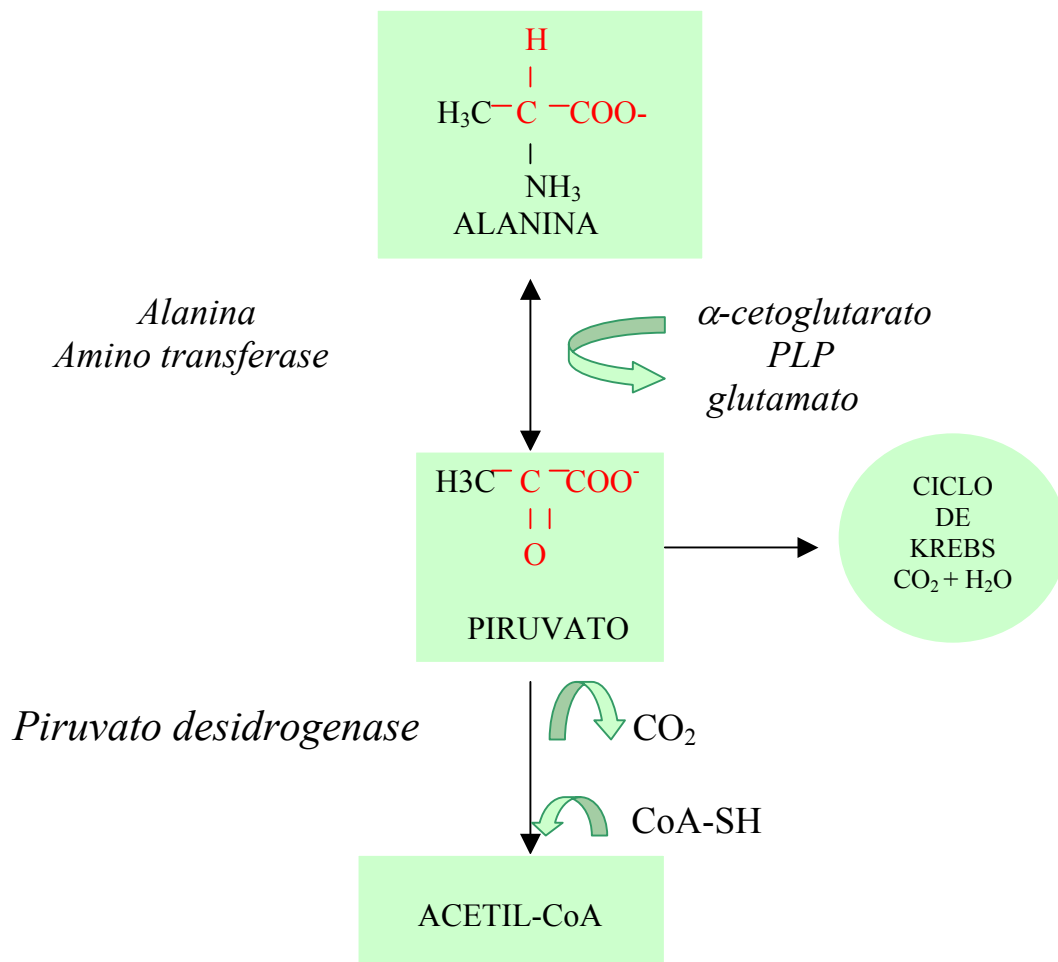


Figura I.3.4.2.2-Figura ilustrativa do catabolismo da alanina. PLP= piridoxal fosfato

Glicina é convertida em piruvato sendo primeiramente transformada em serina pela ação da enzima **serina hidroximetiltransferase**, tendo como cofator o piridoxalfosfato (PLP). Esta enzima usa N^5, N^{10} – **metileno-tetraidrofolato** (N^5, N^{10} –**metilenoTHF**) como um doador de carbono. O grupo metileno do cofator THF é obtido a partir de uma segunda glicina, catalisada pelo sistema de clivagem da glicina (fig.I.3.4.2.2) A enzima **serina hidroximetiltransferase** é um complexo multiprotéico que lembra a piruvato desidrogenase. A clivagem da glicina é a principal via de degradação deste aminoácido nos tecidos de mamíferos. Uma deficiência inerente do sistema de clivagem da glicina causa a doença hiperglicinemia não cetótica, que é caracterizada pelo retardo mental e acúmulo de grande quantidade de glicina nos fluidos corporais. A **glicina** também pode ser oxidada pela D-aminoácido oxidase cujo produto, o glioxalato, é convertido novamente a glicina por transaminação e/ou, é oxidada a oxalato ou a CO_2 e H_2O .

Pesquisas revelam que a maior taxa de utilização da **glicina** em hipocampo de ratos durante o período de crescimento cerebral, foi a través da oxidação a CO_2 , exedendo duas vezes a oxidação da alanina e dez vezes a oxidação da leucina em ratos de 7, 14, e 21 dias (GOVINATZKI e cols.,1996).

No fígado, a síntese de lipídeos a partir da **glicina** inicia-se com o transporte do citrato mitocondrial ao citosol onde é clivado pela citrato liase a oxaloacetato e acetil –CoA. O oxaloacetato é reduzido a malato pela ação da malato desidrogenase. Já o malato é descarboxilado formando piruvato (com redução do $NADP^+$ à $NADPH^+ + H^+$). O piruvato é então transportado à mitocôndria onde é carboxilado pela ação da piruvato carboxilase, com o CO_2 originado da clivagem da glicina, formando oxaloacetato. Nesta etapa deve haver um rearranjo de carbonos. Pela ação da citrato liase o

oxaloacetato reage com o acetil-CoA intramitocondrial formando citrato. O citrato, através do transportador de tricarboxilatos, atravessa a membrana mitocondrial interna e externa, que é permeável, e vai ao citossol onde é clivado a oxaloacetato e acetil-CoA. Esta acetil-CoA vai ser usada para a síntese lipídica.

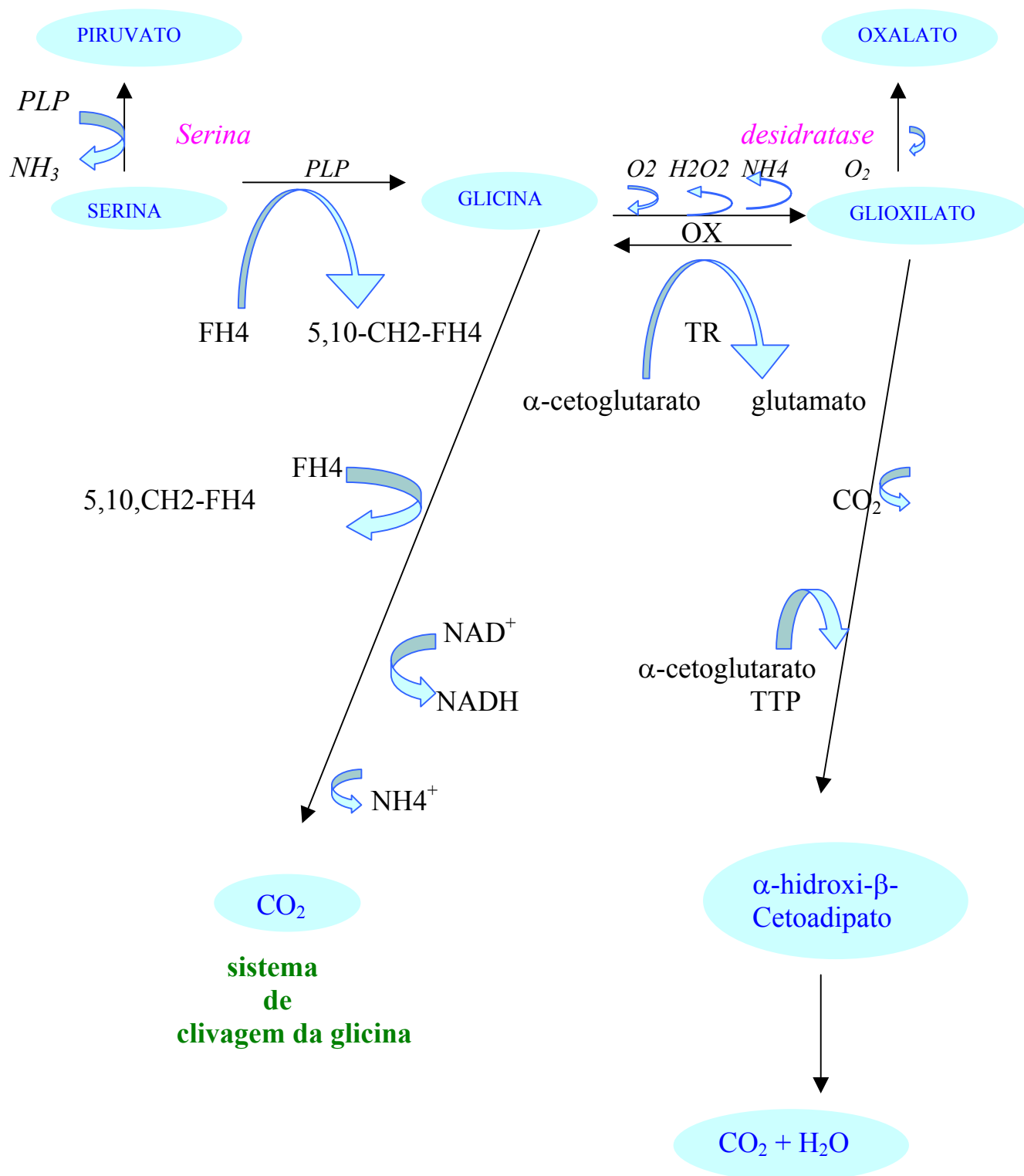


Figura I.3.4.2.3- Figura ilustrativa do catabolismo da glicina: TR=transaminases, OX= D-aminoácidos oxidase, FH₄= tetraidrofolato, PLP= piridoxal fosfato.

I.3.4.2.3- Catabolismo da Glutamina e Glutamato

Glutamina e glutamato são degradados até α -cetoglutarato.

Os esqueletos carbonados destes aminoácidos entram no ciclo de Krebs como α -cetoglutarato. Primeiramente eles são transformados em glutamato, que sofre então desaminação oxidativa pela glutamato desidrogenase, para dar α -cetoglutarato.

A **glutamina** é reconvertida a glutamato pela glutaminase (figura I.3.4.2.3.1), particularmente importante no rim. **GROOTEGOED et al., (1986)**, analisando o metabolismo da glutamina em células de Sertoli, verificaram que L-[U- 14 C]glutamina foi convertida a 14 CO $_2$ a uma taxa considerável durante incubação em células de Sertoli. Essa taxa foi estimulada pelo dbcAMP.

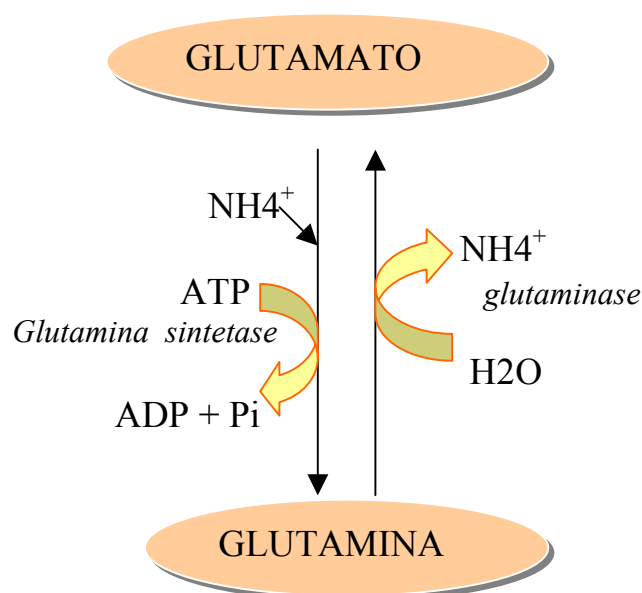


Figura I.3.4.2.3.1- Figura ilustrativa da síntese e degradação da glutamina.

O glutamato quando degradado é convertido novamente a α -ceto glutarato, tanto por transaminação, como pela glutamato desidrogenase(figura I.3.4.2.3.2). No fígado, o α -ceto glutarato forma malato que produz glicose por gliconeogênese. Portanto, o glutamato é derivado da glicose e reconvertido a glicose. Uma outra função do glutamato é prover o glutamyl da glutationa (γ -glutamyl-cisteinil-glicina), a qual está envolvida no transporte de aminoácidos dentro das células dos rins e intestinos.

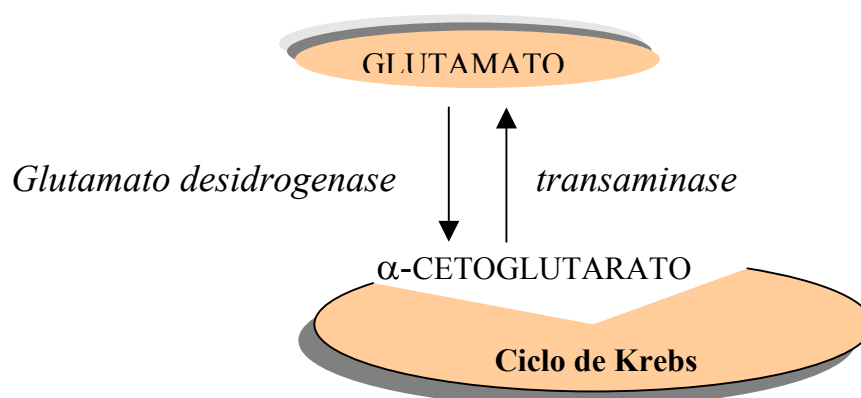


Figura I.3.4.2.3.2- Conversão do glutamato em α -cetoglutarato.

I.3.4.2.4-Catabolismo da Valina

As três primeiras reações do catabolismo da valina são semelhantes às dos outros dois aminoácidos de cadeia ramificada(leucina e isoleucina). Ocorre uma reação de transaminação gerando através de uma α -

aminoácidos aminotransferase um α -ceto ácido correspondente, no caso da valina, o α -ceto isovalérico. Este sofre uma descarboxilação oxidativa gerando isobutiril CoA, o qual é desidrogenado resultando, no metacrilil CoA; este é hidratado, gerando β -hidroxiisobutiril-CoA que é desacilado a β -hidroxiisobutirato. β -hidroxiisobutirato é oxidado a metilmalonato semialdeído cujos destinos possíveis incluem transaminação e conversão a succinil CoA. A transaminação forma α -aminoisobutirato, um aminoácido encontrado na urina. O segundo maior destino envolve uma acilação oxidativa a metilmalonil CoA e uma isomerização a succinil CoA. Este rearranjo intramolecular é catalizado por uma metilmalonil CoA mutase, uma das duas enzimas de mamíferos conhecidas que contém um derivado da vitamina B₁₂ como sua coenzima (figura I.3.4.2.4).

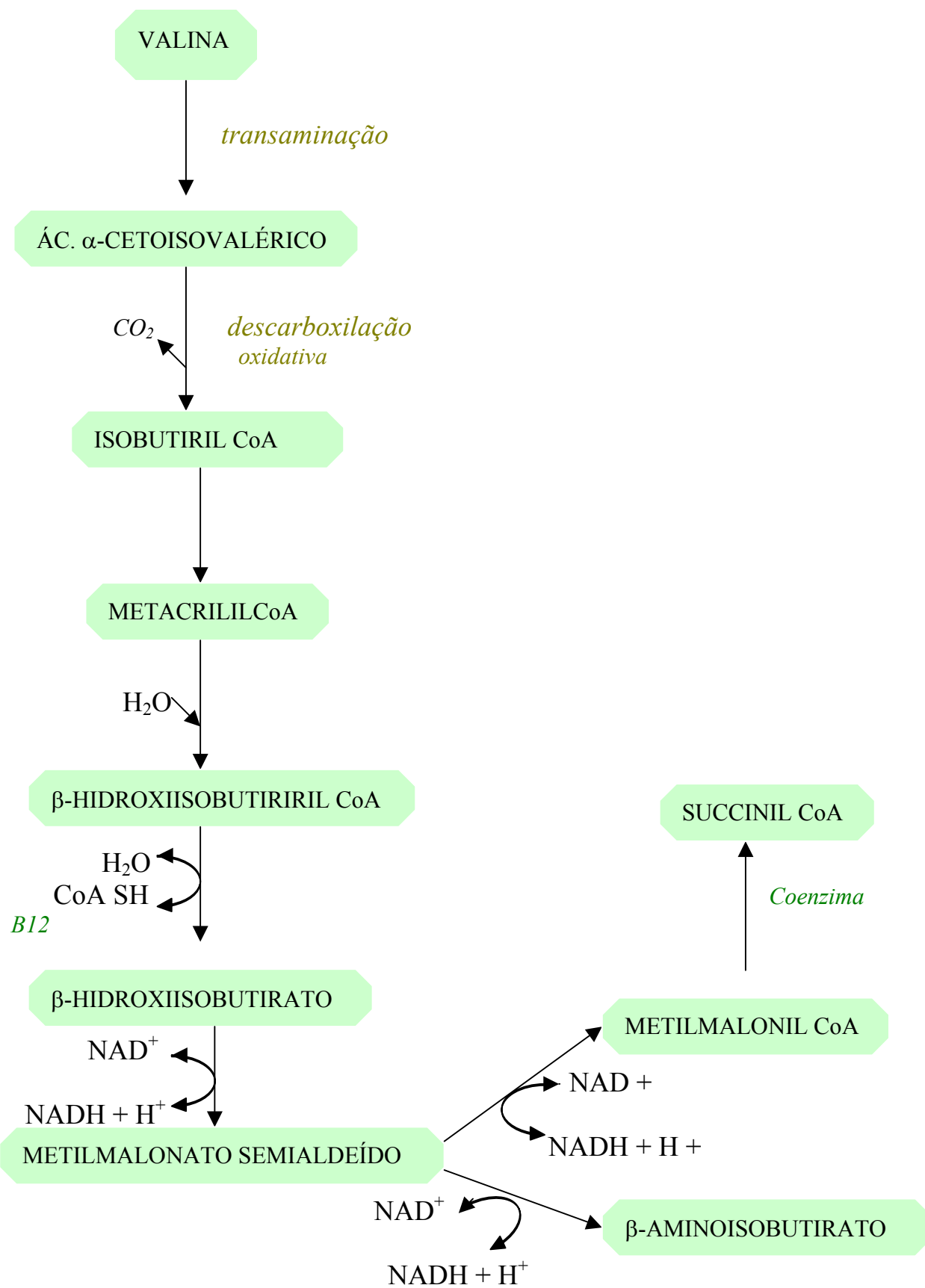


Figura- I.3.4.2.4- Figura ilustrativa do catabolismo da valina

I.3.4.2.5- Catabolismo da Leucina

Leucina inicia sua degradação da mesma maneira que isoleucina e valina, primeiramente a leucina é transaminada formando α -cetoisocaproato de cadeia ramificada. A seguir o Isovaleril-CoA formado é desidrogenado formando β -metilcrotonil CoA, reação catalisada pela isovaleril CoA desidrogenase. O β -metilglutaconil CoA é então formado por carboxilação do β -metilcrotonil CoA pela β -metilcrotonil CoA carboxilase, com gasto de um ATP. A seguir acontece a hidratação do β -metilglutaconil CoA originando 3-hidróxi-3-metil-glutaril CoA que é clivado a acetil-CoA e acetoacetato (figura. I.3.4.2.5).

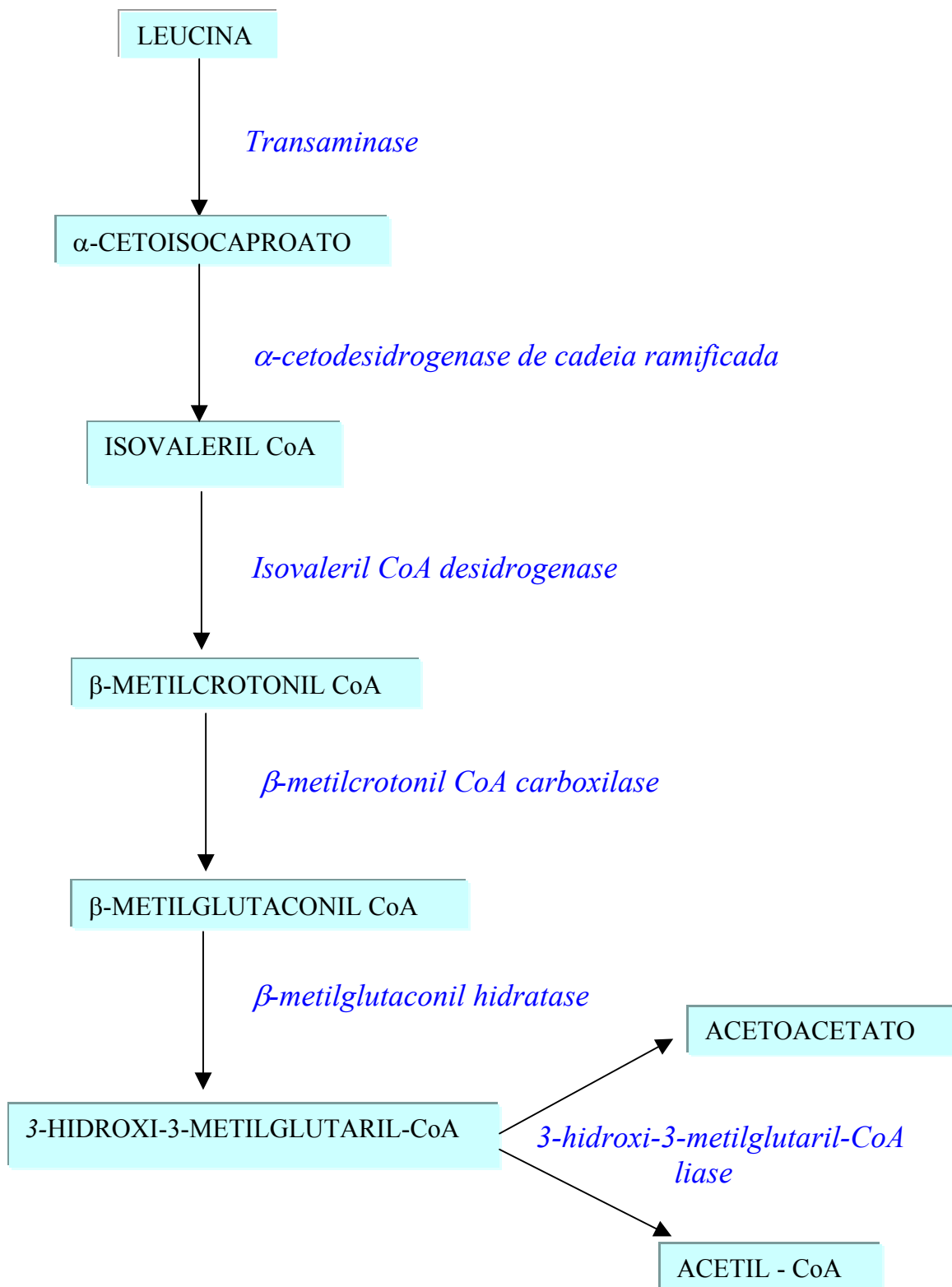


Figura I.3.4.2.5- Catabolismo da leucina.

II- Objetivos

Uma vez que os aminoácidos, além de incorporarem-se às proteínas, também podem ser usados como nutrientes energéticos (Monteiro,1999) e que há o envolvimento de diferentes substratos e diferentes caminhos na obtenção de energia em células de Sertoli (**Grootegoed e Cols,1986**), decidimos verificar a capacidade que os diferentes aminoácidos em cultura de células de Sertoli possam ter para a produção de energia, investigando a oxidação a CO₂, conversão a lipídeos e incorporação a proteínas destes aminoácidos, na presença ou ausência de outros nutrientes energéticos tais como: ácido palmítico, glicose e/ou glutamina . Para tanto, utilizamos um aminoácido cetogênico, a leucina e os aminoácidos glicogênicos alanina, glicina, glutamina e valina.

III- MATERIAIS E MÉTODOS

III.1- MATERIAIS

III-1.1-Listagem dos materiais utilizados na cultura:

Tripsina 1:250 (Difco)

Inibidor de tripsina tipo I-S (Soybean) (Sigma)

Colagenase tipo I (sigma)

Hialuronidase tipo I-S (Sigma)

DNase tipo I (Sigma)

Soro Fetal Bovino SFB (Cultilab)

Fungizone (laborclin)

Garamicina (Schering-Plough)

Sais para solução salina tamponada de Hank- HBSS (Sigma)

EDTA tritriplex III (Merck)

Meio de cultura Ham's F12:DMEN (Irvine Scientific)

Sais para CMF-PBS : solução salina fosfato tamponada sem Ca^{++} e Mg^{++}

Garrafas de Cultura com 75 cm²

O material utilizado nas culturas de células de Sertoli (pipetas, provetas, vidrarias em geral, material cirúrgico, filtros,...) foi lavado cuidadosamente com Extran alcalino (Merck), enxaguado várias vezes com água da torneira e imerso seis vezes em água deionizada e duas vezes em água bidestilada. Após, o material era envolvido em papel alumínio e esterelizado por autoclavagem a 120° C e 1 atm por 20 minutos e, posteriormente, mantidos em estufa seca a 140° C por 5 horas.

Todas as soluções salinas, enzimas e meios de cultura utilizados nas culturas foram esterelizados por filtração através de filtros com membrana de 0,2mm. A esterilidade de todas as soluções, enzimas e meios foi testada

por semeadura em caldo de carne para cultura bacteriana por pelo menos 48 horas antes de serem utilizadas.

Os meios de cultura, as soluções salinas e enzimáticas foram preparadas com água obtida em um Milli-Q Plus (Milipore), imediatamente antes de seu preparo.

III-1.2- Listagem do material utilizado nas incubações

Glicina (Sigma)

L-Alanina (Sigma)

L-Leucina (Merck)

L-Valina (Merck)

L-Glutamina (Difco)

D-Glicose (Merck)

Ácido Palmítico (Sigma)

Albumina livre de ác. graxos (Sigma)

Ácido Pirúvico (Sigma)

Sais para solução tampão Krebs Ringer-bicarbonato (pH = 7,4)

L-(U-¹⁴C) Leucina .Atividade específica: 11.7GBq/mmol,315mCi/mmol
(Amersham)

(U-¹⁴C)Glicina.Atividade
específica:2.11GBq/mmol,57.0mCi/mmol(Amersham)

L-(U-¹⁴C)Alanina.Atividade específica: 5.81 GBq/mmol,157mCi/mmol
(Amersham)

L-(U-¹⁴C) Valina. Atividade específica: 9.8 GBq/mmol, 266mCi/mmol
(Amersham)

L-(U-¹⁴C) Glutamina. Atividade específica: 10,2 GBq/mmol,
277mCi/mmol(Amersham)

Ácido tricloro Acético (Merck)

Hidróxido de Hiamina

Líquido de cintilação Optiphase "Hifase 3"

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

III-1.3- Soluções e Meios Utilizados nas Culturas das Células

III-1.3.1- Solução Salina Tamponada de Hanks (HBSS)

Utilizada no preparo da colagenase, inibidor de tripsina, DNase, hialuronidase e para lavagem das células durante as culturas.

NaCl	136,86mM
KCl	5,36mM
Na ₂ HPO ₄	0,27mM
KH ₂ PO ₄	1,10mM
Glicose	6,10mM
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,29mM
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,65mM
Vermelho fenol	7,05 x 10mM

PH = 7,4

III-1.3.2-Solução Salina Fosfato Sem Cálcio e Magnésio (CMF-PBS)

Utilizada no preparo da solução de tripsina e na lavagem das culturas antes das incubações.

NaCl	136,90 mM
KCl	5,36 mM
Na ₂ HPO ₄	0,26 mM
KH ₂ PO ₄	1,10 mM
Na ₂ SO ₄	0,70 mM
Glicose	6,10mM

PH = 7,4

III- 1.3.3 - Meio de Cultura

Foi utilizado para a cultura de células o meio Ham's F12:DMEM mistura 1:1 (Irvine Scientific), glicose, com L-glutamina sem ácido linoléico acrescido de fungizona (1,25ml/l), gamicina (50mg/l) e bicarbonato de sódio 1,2 g/l, acertando o pH em 7,6. Após o meio é filtrado através de filtros com membranas de 0,22mm (milipore) e aliquotados em garrafas de 100ml.

III-1.4 - Enzimas utilizadas nas Cultura

• **Tripsina** 1/250 (Difco)- A tripsina era pesada e dissolvida em solução salina tamponada sem cálcio e magnésio, de modo a obter-se uma concentração final de 2,5 mg/ml (24 U/mg). Esta solução era filtrada, aliquotada em volume de 20 ml e armazenada a 20 ° C negativos até o momento do uso.

• **Inibidor de Tripsina** - O inibidor era preparada em HBSS, numa concentração de 0,15 mg/ml (24 U/ml), filtrada, aliquotada em volume de 10 ml e armazenada a menos 20 ° C até o momento do uso.

• **Colagenase tipo I**. A colagenase era pesada e dissolvida em HBSS até atingir a concentração de 1,0 mg/ml (174 U/mg), filtrada, aliquotada em volume de 20 ml e estocada a 20 ° C negativos até o momento de uso.

• **DNase** - A Dnase era pesada e dissolvida em HBSS até atingir a concentração de 1 mg/ml, filtrada e armazenada a menos 20° C até o momento de uso.

• **Hialuronidase** - A hialuronidase era pesada e dissolvida em HBSS até atingir a concentração de 10 mg/ml (330 U/mg), filtrada e armazenada a menos 20 ° C até o momento de uso.

III-1.5- Soluções Utilizadas nas Incubações

III-1.5.1 - Solução Tampão Krebs-Ringer bicarbonato

Foi utilizada para ressuspender as células para posterior incubação. Era preparada imediatamente antes da realização dos experimentos, pH 7,4

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

A solução era gaseificada com carbogênio (95% de oxigênio e 5% de dióxido de carbono) até que o pH atingisse o valor 7,4.

III-1.6- Substâncias Radioativas

Foram utilizados aminoácidos com ¹⁴C na concentração final indicada em cada caso e adicionados no meio imediatamente antes do início da incubação para a medida da oxidação a CO₂, conversão a lipídeos e incorporação em proteínas.

III-2. MÉTODOS:

III- 2.1- Isolamento da Células de Sertoli

As células de Sertoli foram isoladas de testículos de ratos Wistar com idade entre 16 e 18 dias, de acordo com o método descrito por **TUNG &FRITZ,(1984)**.

Os animais foram mortos com éter, lavados com sabão líquido e banhados em álcool iodado. Os testículos foram retirados em condições estéreis (capela de fluxo laminar), dissecados da túnica albugínea e fragmentados com bisturi.

O tratamento enzimático dos fragmentos testiculares com tripsina, inibidor de tripsina, DNase, hialuronidase e colagenase eram acompanhados de agitação,centrifugação e repouso em estufa a 34° C e, durante as trocas de soluções entre um procedimento e outro eram aspirados com pipetas Pasteur para ressuspender e dispersar os agregados celulares. Ao final desse tratamento enzimático, a preparação de células resultante foi lavada três vezes com HBSS, usando-se uma pipeta Pasteur para ajudar a liberação das células. Após, as células foram suspensas em um volume conhecido de meio de cultura (figura III-2.2.2). Uma aliquota de suspensão celular foi retirada e acrescentado azul de tripan para a contagem em hemocítômetro, processo pelo qual pode-se estimar a quantidade e a viabilidade celular.

Uma vez que as culturas de células de Sertoli utilizadas neste trabalho eram primárias, cada experimento foi realizado com culturas de células provenientes de uma ou mais ninhadas de ratos Wistar entre 16-18 dias de idade. Esta característica pode explicar a variabilidade encontrada nos resultados obtidos porém, não interfere na reprodutividade das diferenças experimentais detectadas.

III-2.2- Cultura Primária de Células de Sertoli

As células eram semeadas em substrato plástico. Usou-se densidade de 3×10^5 células por garrafa com superfície de 75 cm^2 e cultivadas por 24 horas em meio F12:DMEN com 1% de soro fetal bovino(SFB). Após, as culturas foram lavadas com HBSS e cultivadas por mais 48 horas em meio F12:DMEN sem SFB (sendo que a cada 24 horas as células eram lavadas com HBSS e o meio trocado) e mantidas a 34° C em atmosfera úmida e CO_2 controlado (5% de CO_2 e 95% de ar).

As culturas das células eram observadas diariamente em microscópio invertido binocular Nikon com contraste de fase .

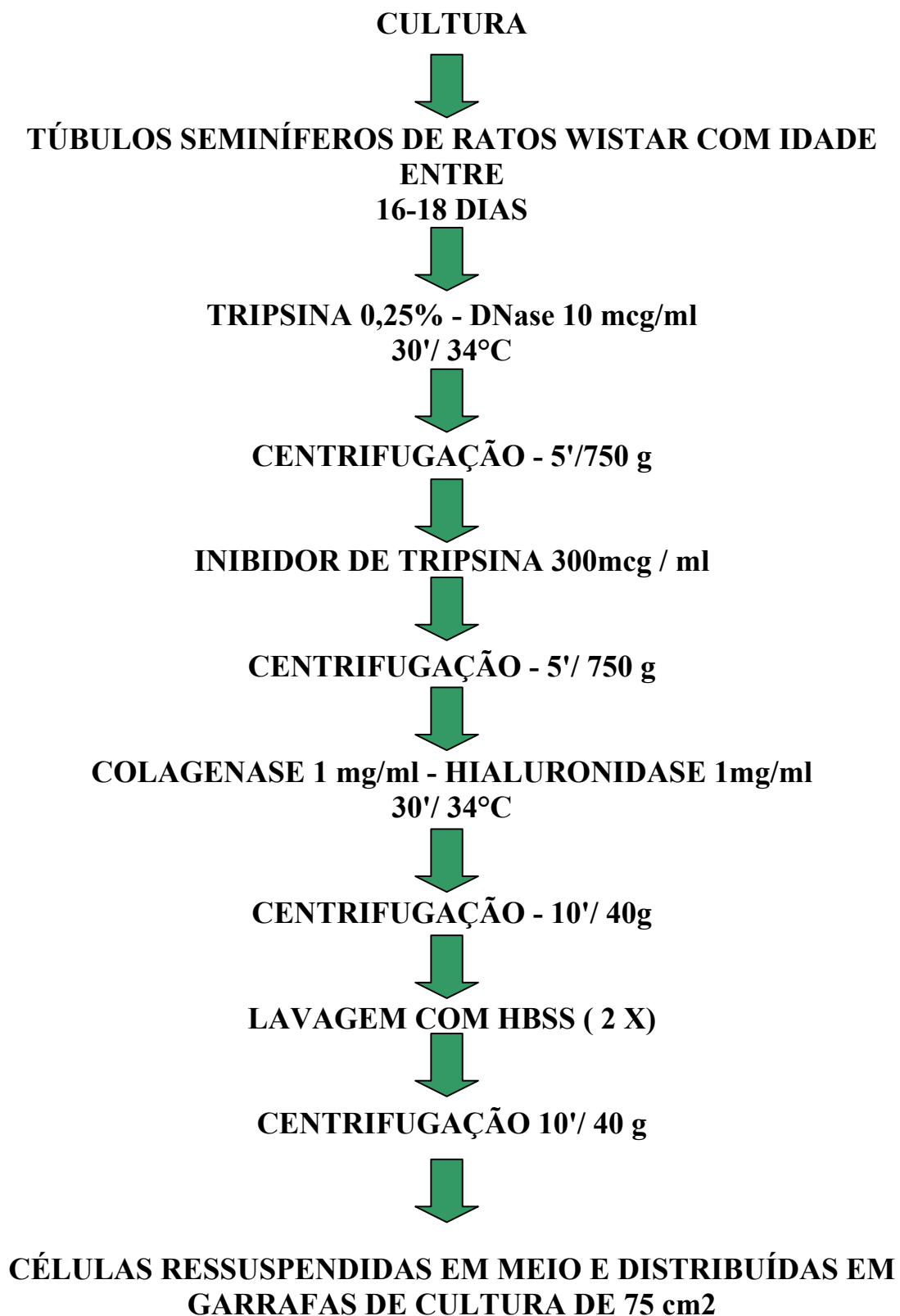


FIGURA III-2.2.2- Representação esquemática da obtenção de células de Sertoli.

III- 2.3- Coleta das Células de Sertoli em Cultura

Ao término da cultura as células eram coletadas por tratamento das culturas com tripsina 0,1% / EDTA 0,05 % em CMF-PBS durante 1'30". A reação era interrompida pela adição de meio F12:DMEN 5% SFB.

As células após serem tripsinizadas, como indicado, foram coletadas em tubos plásticos cônicos, centrifugadas por 10 min / 750 g, ressuspendidas em solução tampão KRb (pH = 7,4). As células era então contadas em microscópio óptico (Olimpus) utilizando-se um hemocítmetro e corante triplan blue para comprovação da integridade celular. Uma alíquota da suspensão celular era utilizada para determinação de proteínas usando soro albumina bovina como padrão de acordo com (**LOWRY et al.,1951**).

III- 2.4- Incubação das Células de Sertoli com Precusores Radioativos

As células de Sertoli (aproximadamente 2,0 mg proteínas), foram incubadas em frascos com concentrações conhecidas de aminoácidos radioativos na presença ou não de substratos, vide figura III-2.4.1. O conteúdo dos frascos foi gaseificado com carbogênio (95 % de O₂ e 5 % de dióxido de carbono) por 1 min; após os frascos eram fechados com tampas de borracha contendo wells de vidro com pedaços de papel filtro dobrado em forma de "V", e selados com parafilme. A temperatura de incubação foi de 34° C, em agitador metabólico Dubnoff (60 ciclos/min), por 60 min., de acordo com o método de (**DUNLOP e cols,1974**) (figura III-2.5.2).

FIGURA III-2.4.1- Representação esquemática dos experimentos realizados com os diferentes aminoácidos radioativos em presença de outros possíveis substratos energéticos.

(U-¹⁴C)glicina (0,25mCi/0,2mM)	<ul style="list-style-type: none"> + 5mM D-glicose + 2mM L-glutamina + 0,5 mM ác.palmítico
(U-¹⁴C)alanina (0,25mCi/0,2mM)	<ul style="list-style-type: none"> + 5mM D-glicose + 2mM L-glutamina + 0,5mM ác. palmítico
(U-¹⁴C)leucina (0,25mCi/0,2m)	<ul style="list-style-type: none"> + 5 mM D-glicose + 2mM L-glutamina + 0,5mM ác. palmítico
(U-¹⁴C)valina (0,25mCi/0,2mM)	<ul style="list-style-type: none"> + 5mM D-glicose + 2mM L-glutamina + 0,5mM ác. palmítico + 0,2mM ác. pirúvico
(U-¹⁴C)glutamina(0,25mCi/2,0mM)	<ul style="list-style-type: none"> + 1mM alanina + 1mM glicina + 1mM leucina + 1mM valina + 5mM D-glicose + 0,5mM ác.palmítico

III-2.5 - Processamento das Amostras

III-2.5.1 - Experimento da Oxidação dos Precursores Radioativos a CO₂

Após a incubação de 60 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 0,2ml de ácido tricloroacético (TCA) 50%, por meio de uma seringa de insulina, atravessando a tampa de borracha e injetado diretamente na suspensão celular. Então, 0,2 ml de hidróxido de hiamina 1M, foi injetado centralmente nos poços de vidro contendo papel filtro. Vedados com parafilme, os frascos retornam ao banho com agitação por mais 30 min. a 34° C para captação do CO₂. Ao final deste tempo, os frascos foram retirados do banho. O conteúdo dos poços de vidro(hidróxido de hiamina + papel filtro) foi tranferido para viais com auxílio de uma pinça e de uma pipeta automática. Cerca de 5,0 ml de líquido de cintilação Optiphase "Hisafe 3" foram adicionados para contagem da radioatividade medida em contador de cintilação líquida WALLAC 1409 (figura III-2.5.2).

III- 2.5.2- Experimento que determina a síntese de lipídios a partir dos precursores radioativos.

O conteúdo de cada frasco foi cuidadosamente homogeneizado e transferido para tubos de centrífuga, centrifugados (2000 rpm/10 min.) sendo que o sobrenadante desprezado e o precipitado (pellet) lavado com 1,0 ml de TCA a 10 %. Este processo foi repetido três vezes.

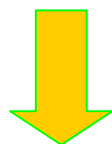
Para a extração dos lipídios, o precipitado foi ressuspendido com 1,0 ml de clorofórmio:metanol (2:1), deixando 10 min. à temperatura ambiente para completa extração lipídica, centrifugados a 2000 rpm/10 min. Tal

procedimento foi repetido por mais duas vezes. O sobrenadante de cada tubo foi transferido para viais através de pipeta Pasteur. Após total evaporação do solvente foram adicionados aos viais 5,0 ml de líquido de cintilação Optiphase "Hisafe3" e a radioatividade expressando a conversão de lipídios foi medida em contador de cintilação WALLAC 1409(figura III-2.5.2).

III- 2.5..3 - Experimento que mede a incorporação a partir dos precursores radioativos a proteínas.

O sedimento protéico deslipidado foi ressuspendido em 0,2 ml de ácido fórmico concentrado, recebendo 5,0 ml de líquido de cintilação Optiphase "Hisafe 3" e o volume total foi tranferido para viais com auxílio de uma pipeta Pasteur, e a radioatividade medida em contador de cintilação líquida WALLAC 1409 (figura III-2.5.2).

Células ressuspendidas através do tratamento com tripsina, lavadas e uma alíquota foi usada para dosagem de proteínas.



Suspensão celular (2,0 mg de proteínas) em KRb foi incubada como indicado na figura anterior (1 hora à 34 °C com atmosfera de 95% O₂ + 5% CO₂)



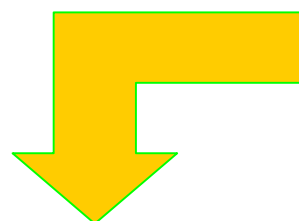
Reações terminadas com TCA 50%



Medição da Radioatividade em CO₂(captada em hidróxido de hiamina)



Suspensão celular foi lavada e os lipídeos foram extraído com clorofórmio:metanol(2:1)



Medição da Radioatividade em lipídios



Medição da Radioatividade no sedimento

Figura III- 2.5.2- Representação esquemática das condições de incubação, avaliação da oxidação a CO₂, conversão a lipídeos e medida da incorporação em proteínas dos diferentes aminoácidos radioativos.

IV- RESULTADOS

IV-1. CAPÍTULO I:

Artigo “Metabolism of amino acids by cultured rats Sertoli cells” submetido a publicação no International Journal of Andrology em 26.06.2002.

METABOLISM OF AMINO ACIDS BY CULTURED RAT SERTOLI CELLS.

Kaiser,G.R.R.F.; Monteiro, S.C.; Gelain,D.P.; Souza,L.F.; Perry,M.L.S. and Bernard, E.A. Departamento de Bioquímica. Instituto de Ciências Básicas da Saúde-UFRGS/Porto Alegre, RS-Brazil.

Short title: Metabolism of amino acid by Sertoli cells

Key words: sertoli cells, alanine, leucine, glycine, glutamine and valine

ABSTRACT

We have investigated the metabolism of some [^{14}C]-labelled amino acids by cultured Sertoli cells of 16-18-day-old rats. We showed that alanine, leucine, valine and glutamine are almost totally oxidized to CO_2 ; however, glycine demonstrated to be a poor energetic substrate, being mainly incorporated into proteins and, to a lesser extent, converted to lipids. Supported by the knowledge that these cells can utilize various energetic substrates in vitro, we therefore investigated if the simultaneous addition of other nutrients, such as glucose and glutamine, might affect the metabolism of these amino acids. We showed that the catabolism of glycine did not change in the presence of palmitic acid, glucose and/or glutamine. The presence of palmitic acid had no effect on the metabolism of the amino acids studied, neither for the oxidation to CO_2 or conversion to lipids or incorporation into proteins. Nevertheless, the presence of glucose seems to significantly change the production of CO_2 , as well as the synthesis of lipids and proteins of the amino acids alanine, leucine and valine. Regarding glutamine, the results showed that it decreased the oxidation to CO_2 of alanine, leucine and valine even in the presence of glucose. On the other hand, both alanine and leucine decreased the oxidation to CO_2 of glutamine.

INTRODUCTION

Energy metabolism of Sertoli cells is the subject of numerous studies. Some researchers have shown that glucose may not be energetically important for Sertoli cells. **Robinson & Fritz, (1981)** studied the glucose utilization by cultures of Sertoli cells and determined that only 3% were oxidized to CO₂ and less than 2% is transformed into lipids or incorporated into glycogen, however 75% of the glucose results in accumulation of lactate in the cultured medium, which are the preferred energy substrates for spermatocytes and spermatids, **Jutte et al., (1983)**. Likewise **Grootegoed et al., (1984)**, confirm the fact that energy production from glucose is limited; only a small amount of pyruvate produced from glucose is oxidized via citric acid cycle, instead pyruvate is converted to lactate and both are released by the cell. They showed that glutamine and leucine, on the other hand, can be oxidized to CO₂ at a significant rate. Regarding the energy metabolism of "in vivo" cells, the authors concluded that different substrates may be used by these cells, through different metabolic pathways. **Grootegoed et al.,(1985)**, reported that the Sertoli cells convert leucine, via transamination, into 4-methyl-2-oxovalerate and the spermatocytes and spermatids reduce the exogenous 4-methyl-2-oxovalerate to 2-hydroxy-4-methylvalerate, which is then released by the spermatogenic cells. **Jutte et al.,(1985)**, showed that the Sertoli cells can oxidize palmitate to CO₂ and ketone bodies; and infer that fatty acids are one of the major energetic substrates utilized by these cells.

Since, aminoacids show an important role in the energetic metabolism of the Sertoli cells (**Grootegoed et al.,1985; Grootegoed et al.,1986**) and there is not

studies in this matter, in the present work we decided to investigate the utilization of some amino acids by Sertoli cells, in culture, as energy source. At the same time, we studied their conversion to lipids and incorporation into proteins. Supported by the knowledge that these cells can utilize various energetic substrates in vitro, we therefore investigated if the simultaneous addition of other nutrients might affect the metabolism of these amino acids, in order to study the importance of the different pathway.

MATERIALS AND METHODS

Materials Hyamine hydroxide was purchased from J.T. Baker Chemical Company, Phillisburg, NJ, USA, and L-[U-¹⁴C]leucine (315mCi/mmol), L-[U-¹⁴C]alanine (157mCi/mmol), [U-¹⁴C]glycine (57mCi/mmol), L-[U-¹⁴C]valine (266mCi/mmol) and L-[U-¹⁴C]glutamine (277mCi/mmol) were from Amersahm International (Berkinghamshire, UK), Opti Phase Tri safe 3 were from Wallac HisafeR Cocktail. All other chemicals were reagent grade.

Cell culture: Sertoli cells were prepared from Wistar rats aged 16-18 days as previously described (**Guma & Bernard, 1994**), according to the modification of **Tung et al,(1984)**. Sertoli cells were plated (3×10^5 cells/ cm²) in DMEN:F12 supplemented with 1% fetal calf serum. Cells were cultured in a humidified 5% CO₂ atmosphere. After 24 h and 48 h the cellular monolayer was washed and fresh medium was added. On the 3rd day after plating, the medium was discarded and the attached Sertoli cells were harvested by centrifugation after treatment with 0.125% trypsin/EDTA 0.05%. The harvested cells were washed with DMEN:F12 supplemented with 5% fetal calf serum and the concentration of protein was determined by method of (**Lowry et al, 1951**). Cell viability, as judged by Trypan blue exclusions, was regularly higher than 90%.

Substrate oxidation and incorporation into lipids and proteins:

Sertoli cells (corresponding to 2.0 mg protein per vessel) were incubated in 1 ml de KRb with the specified concentrations of [^{14}C] labelled substrates, in the absence or presence of other substrates which might be used by Sertoli cells as energy-yielding substrates, as described in the legends of figures. Incubation was carried out in flasks after the content was gassed with a 95%O₂:5%CO₂ mixture for 1 minute and then sealed with rubber caps. The suspension of Sertoli cells was incubated at 34° C during 1 hour in a Dubnoff metabolic shaker (60 cycles/min) according to Dunlop et al.,(1974). Incubation was stopped by adding 0.25 ml 50% TCA through the rubber cap. Then 0.25 ml of 1M hyamine hydroxide was injected into the central wells. The flasks were shaken for further 30 minutes at 34° C to trap CO₂. After that, the content of the central well was transferred to vials and assayed for CO₂ radioactivity in a liquid-scintillation counter. The flasks' content was homogenized and transferred to tubes. After centrifugation, the precipitate was washed three times with 10% TCA, and lipids were extracted with chloroform-methanol (2:1). The chloroform-methanol phase was evaporated in vials and radioactivity was measured. The lipid-free protein pellet was dissolved in concentrated formic acid and radioactivity was measured.

All the results were expressed considering the initial specific activity of the incubation medium. Assays were linear with respect to time of incubation.

Statistical analysis: Differences between groups were evaluated with ANOVA, followed by the Duncan multiple-range test, as appropriate. A probability level of $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Table I shows the basal amino acid metabolism: CO₂ production from [U-¹⁴C] glycine is the least, on the other hand, incorporation into protein of leucine and glutamine is lower than that of the other aminoacids. Alanine and valine appear to be largely converted to lipids.

Figures 1 up to 5 show the effects of the addition of nutrients on these aminoacids metabolism.

Neither glucose nor palmitic acid or glutamine had any effect on the metabolism of glycine (fig.1), moreover, palmitic acid did not affect metabolism of the other 4 amino acids tested (fig. 2-5).

Glucose as well as glutamine (or both together) decreased CO₂ production and protein synthesis from [U-¹⁴C] alanine. Besides, glucose increased the lipids synthesis (fig. 2).

Fig. 3 shows that glucose increased the valine oxidation to CO₂, instead glutamine with or without glucose diminishes this CO₂ production. Glucose also increased lipids and protein synthesis.

With respect to the [U-¹⁴C]leucine metabolism, glucose as well as glutamine decreased CO₂ production, however, glucose but not glutamine increased the leucine metabolism to lipids (fig.4).

Since it was shown that glutamine decreases CO₂ production from alanine, valine and leucine, it seems important to verify the effect of these amino acids on the metabolism of [U-¹⁴C]glutamine. Fig.5-A shows that alanine and leucine lower the glutamine oxidation to CO₂, but do not produce any variation on lipid and protein synthesis. Glucose, palmitic acid and glycine did not affect glutamine metabolism (fig. 5-B).

DISCUSSION

In the present work, we verified the production of energy from glycolytic (alanine, glycine and valine) and ketogenic (leucine) amino acids by Sertoli cells, in the presence or absence of palmitic acid, glucose and/or glutamine.

In Sertoli cells, alanine, leucine and valine are mainly oxidized to CO₂, being less incorporated in proteins and converted to lipids. Nevertheless, glycine is a poor energetic substrate and it is mainly incorporated in proteins and partially converted to lipids. Previous works from our group showed that glycine is utilized by Sertoli cells for the formation of phospholipids, probably phosphatidylserine.

We also studied the velocity of metabolization of the amino acids, increasing their concentration, and found that this velocity augmented until 1.0mM each amino acids (data not shown), suggesting that the results do not depend on the saturation of the amino acid transporters.

In vertebrates, the cleavage system of glycine has been demonstrated to be the principal pathway by which glycine and serine are catabolized (**Yoshida et al., 1972**). In the central nervous system (CNS), glycine is tightly associated to intermediary metabolism, and it can be easily obtained from serine through the withdrawal of one carbon atom by serine hydroxymethyl transferase (**Daly et al., 1976**) and this route is also the main pathway of glycine oxidation in different regions of rats CNS, where this amino acid can be converted to serine and incorporated into phospholipids (**Fagundes et al., 2001**). We believe that the cleavage system of glycine in Sertoli cells has the same function as that in the CNS, once we observed in previous experiments with Sertoli cells that glycine [¹⁻¹⁴C] is converted to serine and incorporated into phospholipids (data not shown). In this work, we found that glycine is poorly oxidized to CO₂ and it is likely that the

enzymatic activities of oxidative pathway of glycine are not important on Sertoli cells.

Alanine, leucine and valine are preferentially oxidized to CO₂ in Sertoli cells. We investigated if the presence of glucose would modify the catabolism of these amino acids. Sertoli cells did not utilize glucose as a main energetic substrate, **Robinson & Fritz, (1981)** showed that only a small fraction of the pyruvate produced from glucose is utilized by Sertoli cells via Krebs cycle. Instead, the pyruvate is converted to lactate and both are secreted by these cells (**Grootegoed et al.,1985; Jutte et al.,1983**). However, this substrate interfered in the metabolism of alanine, leucine and valine. Glucose increased all the metabolism of valine: oxidation to CO₂, incorporation into proteins and conversion to lipids, while alanine and leucine have increased the synthesis of lipids and decreased its oxidation to CO₂. Incorporation of alanine into proteins also decreased in the presence of glucose.

Robinson & Fritz(1981) showed that glucose is converted to acetyl-CoA in a smaller quantity, however, it is possible that this can interfere in alanine and leucine oxidation to CO₂. This can also interfere in valine oxidation, with acetyl-CoA reacting with oxaloacetate, which arises from valine and forming citrate, which could stimulate the Krebs' Cycle. The stimulation of the conversion of valine to lipids by glucose can be the result of an increase in the pentose cycle, that, it is shown to be an important destination for glucose in Sertoli cells, **Robinson & Fritz, (1981)**. The oxidation of valine and leucine is dependent of the α -ketodehydrogenase, that is regulated by covalent modification. However, glucose has different effects in the valine and leucine oxidation to CO₂, so it is possible that different α -ketodehydrogenases are present in Sertoli cells, as described in bovine liver (**Connely et al.,1968**).

It is known that in CNS of 14-day-old rats, glucose 5-10mM stimulates the incorporation of leucine and glycine into proteins (**Oliveira et al.2002**). In the Sertoli cells, we can not explain what exactly caused the decrease in the incorporation of L-[U-¹⁴C]alanine and the increase in the incorporation of L-[U-¹⁴C]valine into proteins.

The palmitic acid is described to be oxidized by Sertoli cells, (**Jutte et al., 1985**), acting as an important energetic substrate, however, the addition of palmitic acid did not modified in the metabolism of any amino acid studied, these results agreed with the studies Palmero (**Palmero et al.,2000**), that showed that L-carnitine addition to cultured Sertoli cells diminished the no-esterified fatty acids, however did not increased ketone bodies production, indicating not saturation of Kreb's Cycle.

Glutamine is described to be the main energetic substrate for proliferating cells (**Zielke et al.,1978**). In many tissues, it is mainly oxidized to CO₂, but it also enters the gluconeogenic pathway in liver, kidney. It is known that cultured Sertoli cells can utilize glutamine as an energetic substrate (**Grootegoed et al.,1986**). In our work, we found that this amino acid inhibited the oxidation of leucine, valine and alanine. However, they did not interfere in the conversion of these amino acids to lipids. Glutamine also decreased the protein incorporation of alanine. The decreased oxidation of alanine, valine and leucine can be related to the oxidation of glutamine, which can compete in the transamination reactions diminishing the ketoacids formation from alanine, valine and leucine.

To understand the role of glutamine in the metabolism of alanine, valine and leucine, we studied the action of these amino acids on glutamine metabolism. Besides, we also studied the effect of glucose and palmitic acid in this metabolism.

Glucose, palmitic acid and valine did not modify the metabolism of glutamine. However, alanine and leucine decreased its oxidation, what can be related to the transamination reaction previously cited. The distinct effect of valine and leucine on this oxidation can be related to a different velocity of the action of aminotransferases in these amino acids, leading to an accumulation of the ketoacid from leucine and not from valine.

The biochemical pathway by which some energetic substrates, utilized in this work, modified the metabolism of alanine, leucine, valine and glutamine is not quite clear and are probably mediated by complex interactions that may be better evaluated. However, we can conclude, based on our data, that these amino acids (with glycine exception), despite their known role as precursors for protein synthesis, can be important energetic substrates.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by CNPq, FAPERGS and PROPESP/ UFRGS.

We also thank Lia Regina Brazina for technical assistance.

REFERENCES

Bowden J A & Connelly JL 1968 Branched chain alpha-keto acid metabolism. II. Evidence for the common identity of alpha-ketoisocaproic acid and alpha-keto-beta-methyl-valeric acid dehydrogenases. *The Journal of Biological Chemistry* **12** 3526-3531.

Connelly JL, Danner DJ & Bowden JA 1968 Branched chain alpha-keto acid metabolism. I. Isolation, purification, and partial characterization of bovine liver alpha-ketoisocaproic and alpha-keto-beta-methyl-valeric acid dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry* **243** 1198-1203.

Daly EC, Nadi NS & Aprison M H 1976 Regional distribution and properties of glycine cleavage system within the central nervous system of the rat: evidence for endogenous inhibitor during in vitro assay. *Journal of Neurochemistry* **36** 179-185.

Dunlop DS, Van Elden W & Lajtha A 1974 Measurements of rates of protein synthesis in rat brain slices. *Journal of Neurochemistry* **22** 821-839.

Fagundes IS, Rotta LN, Schweigert ID, Valle SC, Oliveira KR, Krüger AH, Souza KB, Souza DO & Perry MLS 2001 Glycine, serine and leucine metabolism in different regions of rat central nervous system. *Neurochemical Research* **26** 245-249.

Grootegoed J A, Jansen R & Van Der Molen HJ 1984 The role of glucose, pyruvate and lactate in ATP production by rats spermatocytes and spermatids. *Biochem. Biophys. Acta* **767** 248-256.

Grootegoed JA, Jansen R. & Van Der Molen H J 1985 Intercellular pathway of leucine catabolism in rat spermatogenic epithelium. *Biochem. Journal* **226** 889-892.

Grootegoed JA, Oonk RB, Jansen R & Van Der Molen HJ 1986 Metabolism of radiolabelled energy-yielding substrates by rat Sertoli cells. *Journal of Reproduction and Fertility* **77** 109-118.

Guma FCR & Bernard EA 1994 Effect of Retinol on glycoprotein synthesis by Sertoli cells in culture: dolichyl phosphomannose synthase activation. *International Journal of Andrology* **17** 50-55.

Jutte N H, Jansen R, Grootegoed J A, Rommers F F & Van Der Molen H G 1983 FSH stimulation of the production of pyruvate and lactate by rat Sertoli cells may be involved in hormonal regulation of spermatogenesis. *Journal of Reproduction and Fertility* **68** 219-226.

Jutten NH, Eikvar L, Levy FO & Hansson V 1985 Metabolism of palmitate in cultured rat Sertoli cells. *Journal of Reproduction Fertility* **73** 497-503.

Lowry O H, Rosebrough A L, Farr A L & Randall R J 1951 Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* **193** 265-275.

Oliveira KR, Rotta LN, Valle SC, Pilger DA, Nogueira CW, Feoli AM, Bernard EA, Souza DO & Perry MLS 2002 Ontogenic study of the effects of energetic nutrients on amino acids metabolism of rat cerebral cortex. *Neurochemical Research*, in press.

Palmero S, Bottazzi C, Costa M, Leone M, Fugassa E, 2000 Metabolic effects of L-carnitine on prepubertal rat Sertoli cells. *Hormone and Metabolic Research* **32** 87-90.

Robinson R & Fritz I B 1981 Metabolism of glucose by Sertoli cells in culture. *Biological Reproduction* **24** 1032-1041.

Tung P S & Fritz I B 1984 Extracellular matrix rat Sertoli cell histotype expression in vitro. *Biology of Reproduction* **30** 213-227.

Yoshida T & Kikuchi G 1972 Comparative study on major pathways of glycine and serine catabolism in vertebrate livers. *Biochem. Journal* **72** 1503-1516.

Zielke HR, Ozand PT, Tildon JT, Seudalian DA & Cornblath M 1978 Reciprocal regulation of glucose and glutamine utilization by cultured human diploid fibroblasts. *Journal Cell Physiol.* **95** 41-48.

Correspondence should be send to:

Elena Aida Bernard

Departamento de Bioquímica. Instituto de Ciências Básicas da Saúde-
UFRGS/Porto Alegre, RS-Brazil.

Rua: Ramiro Barcelos 2600-anexo

Porto Alegre R.S- Brasil

CEP: 90035-003

FAX: 55-51-3316-5535

E-mail: elenbern@vortex.ufrgs.br

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1- Effect of the addition of palmitic acid, glucose and/or glutamine on the metabolism of glycine. The Sertoli cells were incubated for 1 h in KRb with [U-¹⁴C]glycine(0.25 μ Ci/0.2mM) in the presence or absence of palmitic acid(0.5mM), D-glucose(5mM) and/or glutamine(2.0mM). The oxidation to CO₂ and the conversion to lipids and the incorporation into protein were measured. Data are expressed as means \pm SEM (four different cell preparations).

Figure 2- Effect of the addition of palmitic acid, glucose and/or glutamine on the metabolism of alanine. The Sertoli cells were incubated for 1 h in KRb with L[U-¹⁴C]alanine(0.25 μ Ci/0.2mM) in the presence or absence of palmitic acid(0.5mM), D-glucose(5mm) and/or glutamine(2.0mM). The oxidation to CO₂, the conversion to lipids and the incorporation into protein were measured. Values are expressed as means \pm SEM(four different cell preparations). Different letters indicate statistically significant differences.

a different from **c** $p < 0.05$

a different from **b** $p < 0.01$

a' different from **b'** $p < 0.01$

a'' different from **b''** $p < 0.01$

Figure 3- Effect of the addition of palmitic acid, glucose and/or glutamine on the metabolism valine. The Sertoli cells were incubated for 1 h in KRb with L[U-¹⁴C]valine(0.25 μ Ci/0.2mM) in the presence or absence of palmitic acid(0.5mM),

D-glucose(5mM) and/or glutamine(2.0mM).The oxidation to CO₂, the conversion to lipids and the incorporation into protein were measured. Values are expressed as means \pm SEM(four different cell preparations). Different letters indicate statistically significant differences.

a different from **c** $p < 0.05$

a different from **b** $p < 0.01$

a' different from **b'** $p < 0.05$

a'' different from **b''** $p < 0.05$

Figure 4- Effect of the addition of palmitic acid, glucose and/or glutamine on the metabolism of leucine. The Sertoli cells were incubated for 1 h in KRb with L[U-¹⁴C]leucine(0.25 μ Ci/0.2mM) in the presence or absence of palmitic acid(0.5mM), glucose(5mM) and/or glutamine (2.0mM). The oxidation to CO₂, the conversion to lipids and the incorporation into proteins were measured. Values are expressed as means \pm SEM (four different cell preparations). Different letters indicate statistically significant differences.

a different from **c** $p < 0.05$

a different from **b** $p < 0.01$

a' different from **b'** $p < 0.01$

Figure 5 A and B- Effect of the addition of glycine, alanine, leucine, valine, glucose and palmitic acid on the metabolism of glutamine. The Sertoli cells were incubated for 1 h in KRb with L[U-¹⁴C]glutamine(0.25 μ Ci/2.0mM). A) in the presence or absence of glycine(1.0mM), alanine(1.0mM), leucine(1.0mM) and valine(1.0mM) . B) in the presence or absence of palmitic acid(0.5mM) and glucose(5mM). The oxidation to CO₂, the conversion to lipids and the incorporation into protein were measured. Values are expressed as means \pm SEM

(four different cell preparations). Different letters indicate statistically significant differences (**a** different from **b** $p < 0.05$).

	GLYCINE	ALANINE	VALINE	LEUCINE	GLUTAMINE
CO ₂ (pmol/mg pt x h)	134	3776	3523	3804	3949
LIPIDS (pmol/mg pt x h)	200	582	612	298	341
PROTEINS (pmol/mg pt x h)	1314	2923	3698	1159	809

Table 1- ¹⁴C aminoacids metabolism in Sertoli cells. The Sertoli cells were incubated for 1 h. in KRb with ¹⁴C aminoacids (0,25 μ Ci/0,2mM). The results presented as means \pm SEM of pmoles of aminoacids oxidized to CO₂, converted to lipids or incorporated to proteins per mg⁻¹ protein h⁻¹. n = 4.

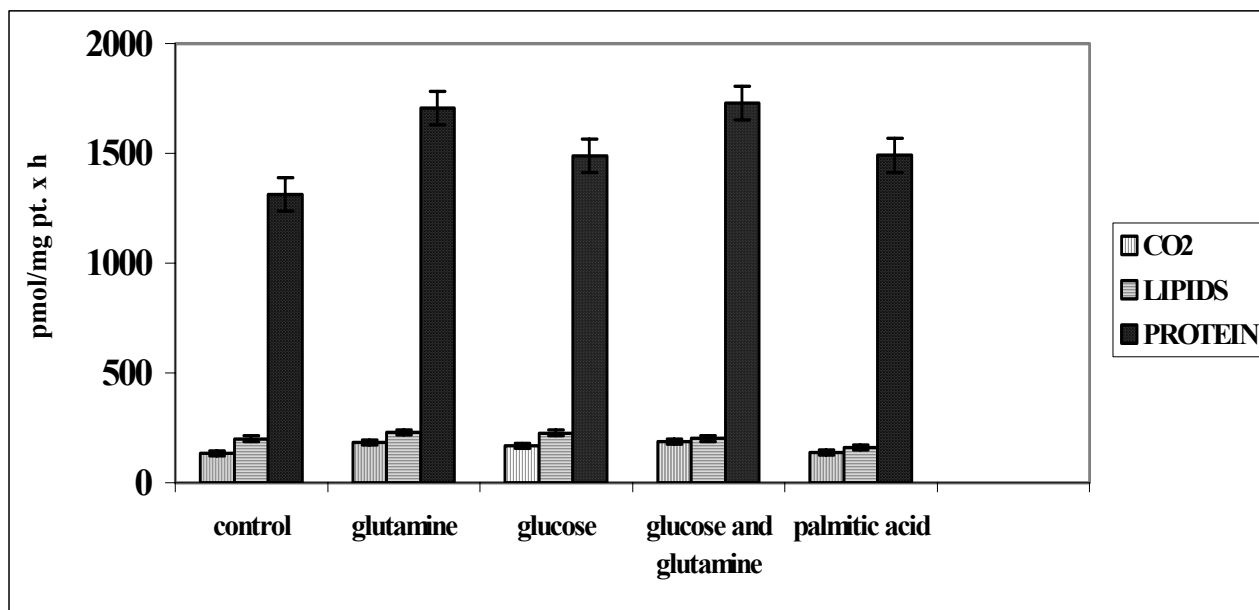


FIGURE 1- Kaiser, G R R F.

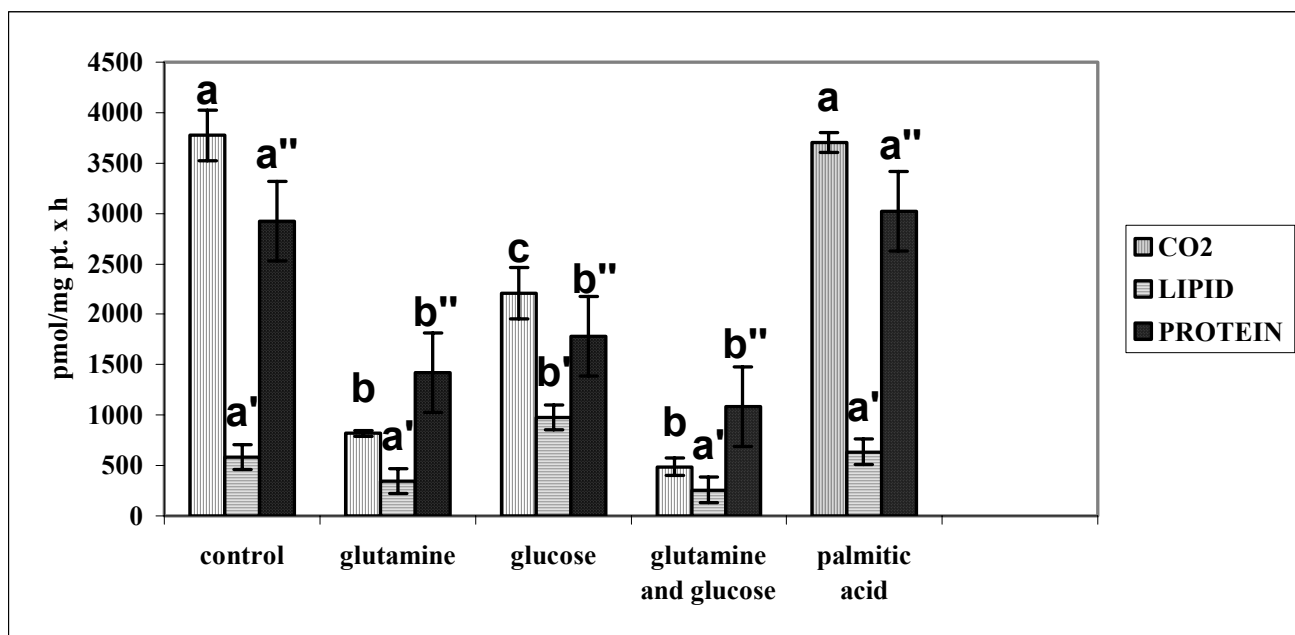


FIGURE 2- Kaiser, G R R F.

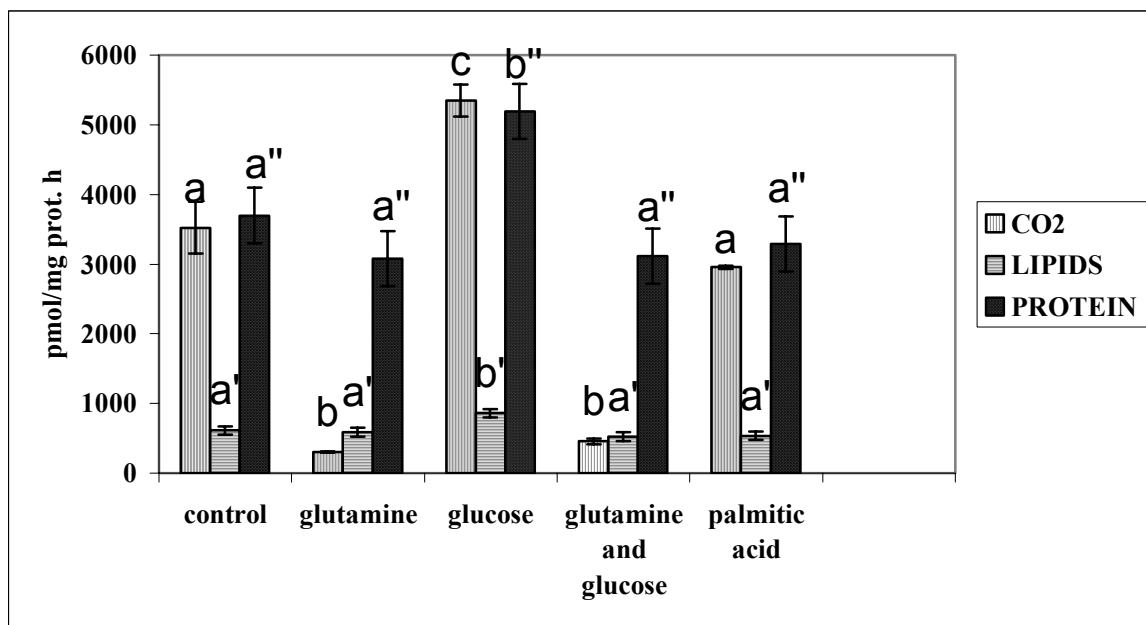


FIGURE 3 – Kaiser, G R R F.

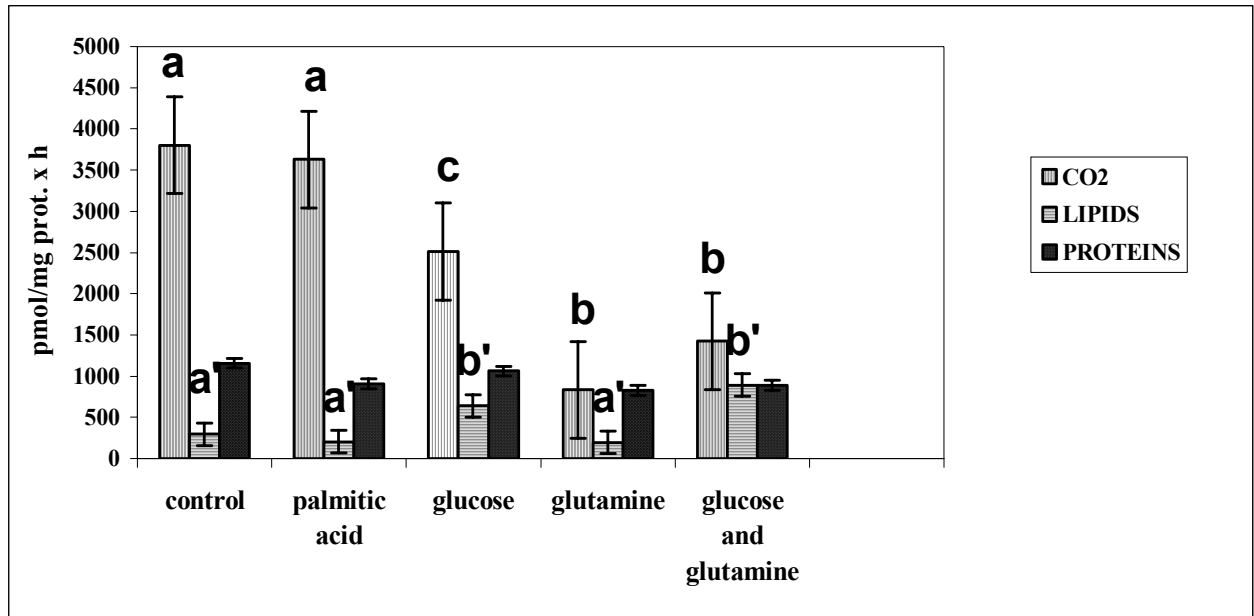
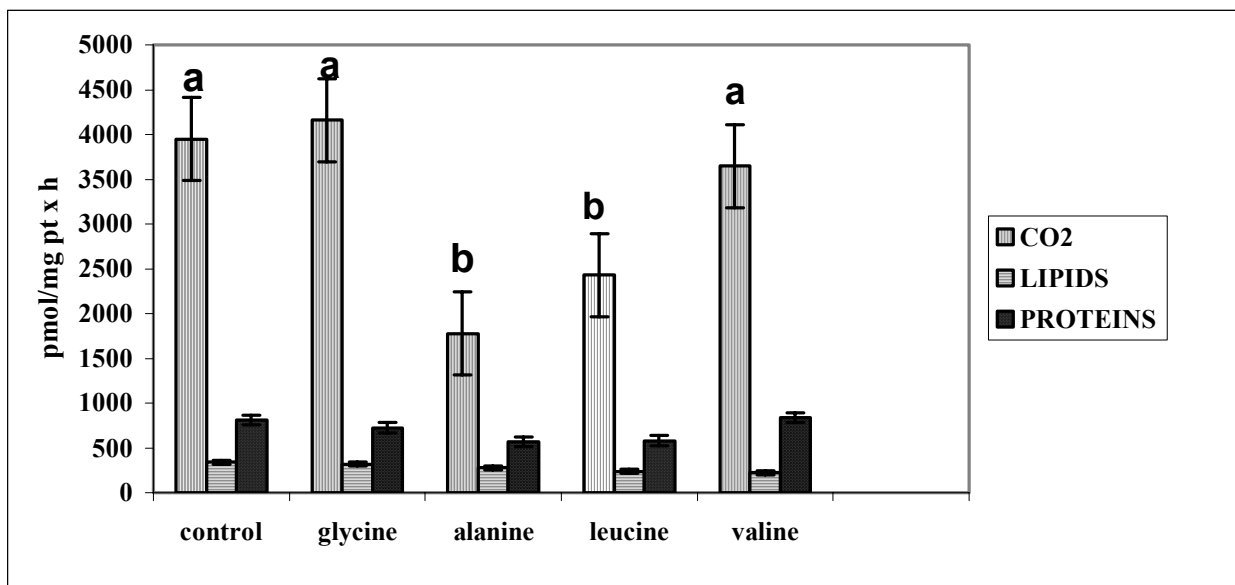


FIGURE 4 – Kaiser, G R R F

A)



B)

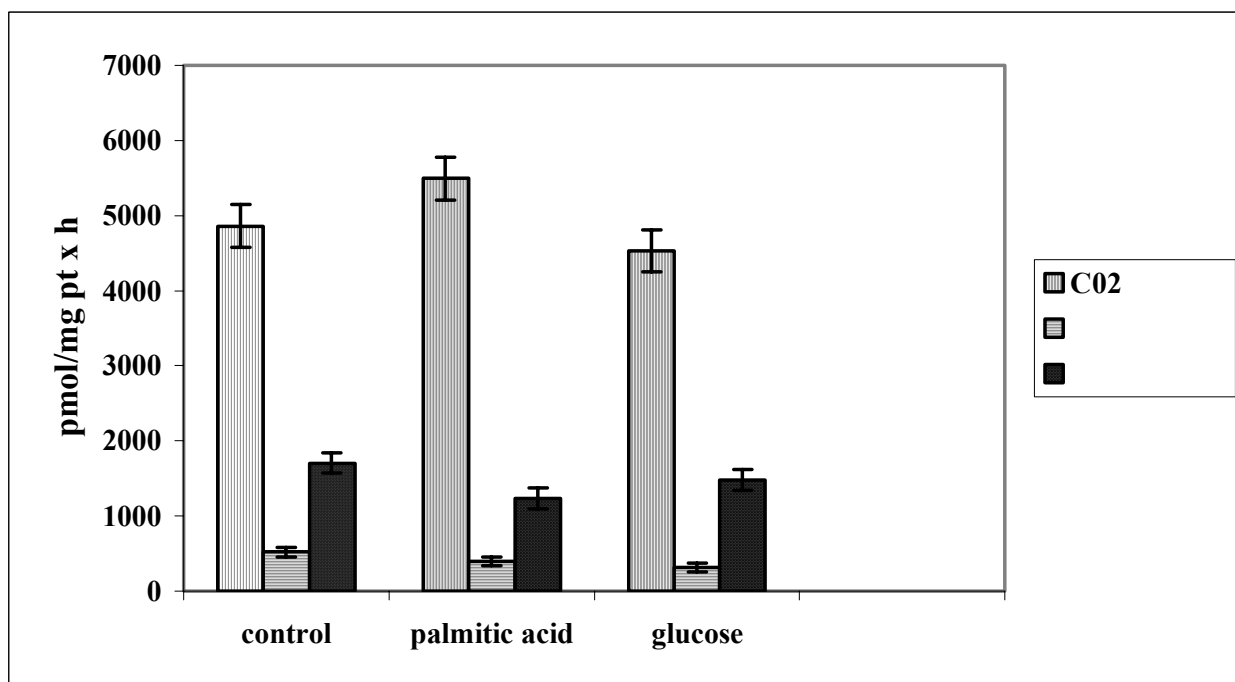


FIGURE 5 A AND 5 B – Kaiser, G R R F

IV-2. CAPÍTULO II

Resultados não incluídos no artigo.

Em decorrência das alterações que alguns nutrientes energéticos ocasionaram no metabolismo dos aminoácidos nas células de Sertoli em cultura, resolvemos investigar se estes nutrientes produziam variações nas rotas metabólicas deste aminoácidos no que se refere à oxidação a CO_2 , conversão a lipídeos e incorporação em proteínas.

Para tanto, iniciamos os nossos estudos com o efeito conjunto de ácido palmítico e glicose.

IV.2.1- Efeito do ácido palmítico na oxidação da leucina, na sua conversão a lipídeos e sua incorporação em proteínas em presença de glicose.

O objetivo deste experimento foi verificar se o ácido palmítico e a glicose quando incubados juntos modificariam o metabolismo da leucina e investigar a inter-relação entre esses nutrientes. Os resultados mostraram que a adição do ácido palmítico não induziu nenhum efeito na oxidação a CO_2 , conversão a lipídeos e incorporação em proteínas na L[U- ^{14}C]leucina. Entretanto, a presença de glicose, diminuiu a oxidação a CO_2 , aumentou a conversão a lipídeos e não teve efeito na incorporação em proteínas. A adição de ácido palmítico não modificou os resultados obtidos só com glicose.

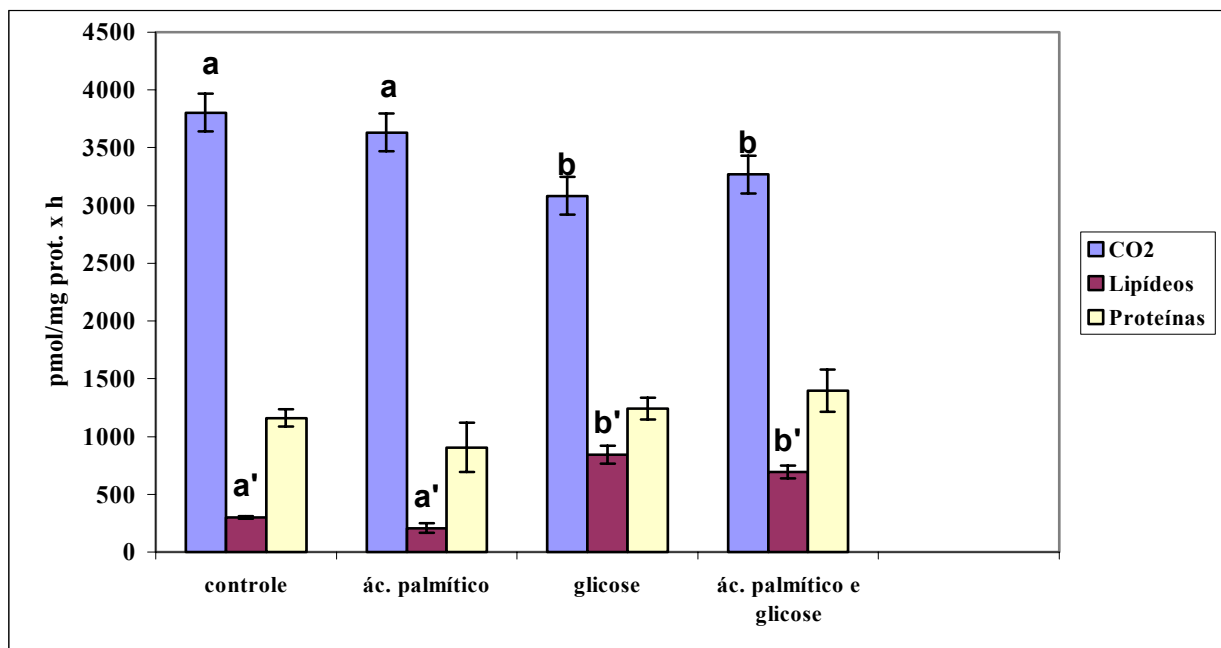


Fig. IV.2.1- Efeito do ácido palmítico e glicose no metabolismo da leucina. As células de Sertoli foram incubadas por 1 hora em KRb com L[U-¹⁴C]leucina(0,25μCi/0,2mM) e/ou D-glicose(5mM), na presença ou ausência de ácido palmítico(0,5mM). pmol.h⁻¹.mg proteína⁻¹ representa a quantidade de L[U-¹⁴C]leucina oxidada a CO₂, convertida em lipídeos e incorporada a proteínas. Os dados estão representados em média ± SEM; n = 4 em dois experimentos diferentes. Diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significantes. Os resultados foram analisados através do método ANOVA seguido do teste de Duncan.

a diferente de **b** p< 0,05

a' diferente de **b'** p< 0,01

IV-2.2 - Efeito do ácido palmítico na oxidação da glutamina, na sua conversão a lipídeos e sua incorporação em proteínas em presença da glicose.

Com relação a L-[U-¹⁴C]glutamina, quando incubada com glicose, a presença do ácido palmítico não induziu variações na oxidação a CO₂, conversão a lipídeos e incorporação em proteínas (fig. IV-2.2.). Como tinha sido observado no capítulo anterior na incubação com ác. palmítico na ausência de glicose.

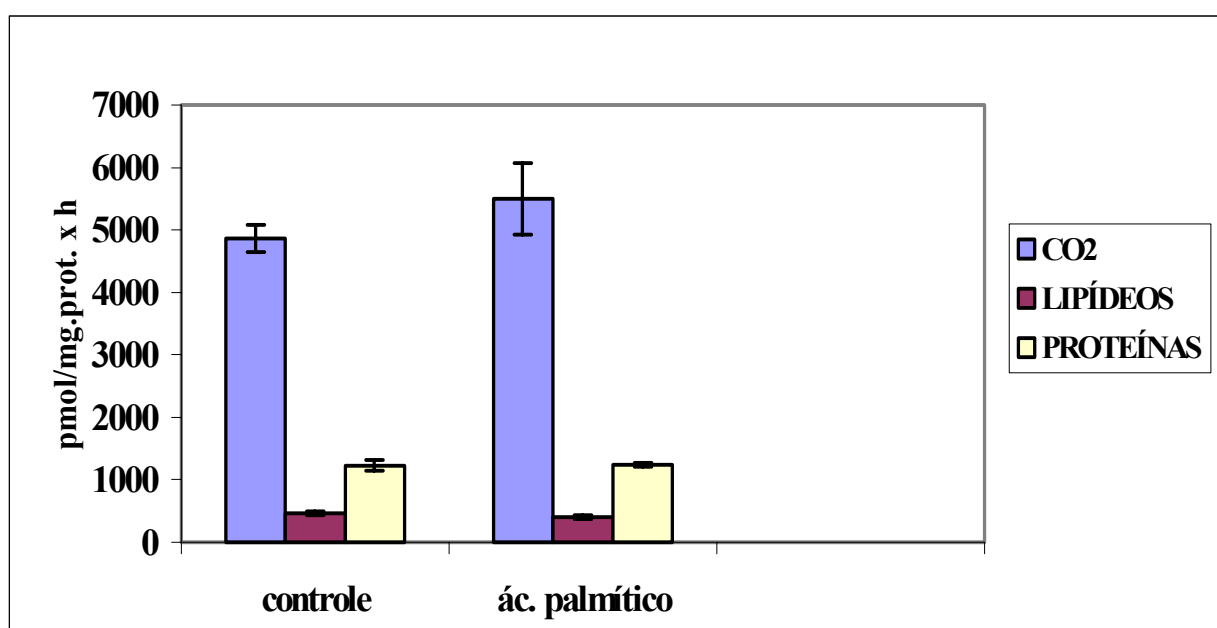


Fig. IV-2.2- Efeito do ácido palmítico no metabolismo da glutamina em presença da glicose- As células de Sertoli foram incubadas por 1 hora em KRB com L[U-¹⁴C]glutamina(0,25μCi/2,0mM) e D-glicose(5mM), em presença ou ausência de ác. palmítico(0,5mM). pmol.h⁻¹.mg proteína⁻¹ representa a quantidade de L[U-¹⁴C]glutamina oxidada a CO₂, convertida em lipídeos e incorporada a proteínas. Os dados estão representados em média ± SEM; n = 4 em dois experimentos diferentes. As médias foram analisadas pelo método ANOVA.

IV.2.3- Efeito do ác. palmítico na oxidação da valina, na sua conversão a lipídeos e sua incorporação em proteínas em presença de glicose.

O objetivo deste experimento foi verificar se a adição de ácido palmítico com a glicose durante a incubação com as células de Sertoli, ocasionaria algum efeito no metabolismo da L[U-¹⁴C]valina quanto a oxidação a CO₂, conversão a lipídeos e incorporação em proteínas. Uma vez que, já sabíamos que a glicose aumenta estas rotas no metabolismo da L[U-¹⁴C]valina e o ácido palmítico não produz nenhum efeito nestas rotas. No entanto, quando adicionados juntos, ácido palmítico e glicose, os resultados mostraram uma ligeira diminuição na oxidação a CO₂, não ocasionando mudanças na conversão a lipídeos e incorporação em proteínas da L-valina, quando comparado somente com a presença de glicose (figuraIV.2.3).

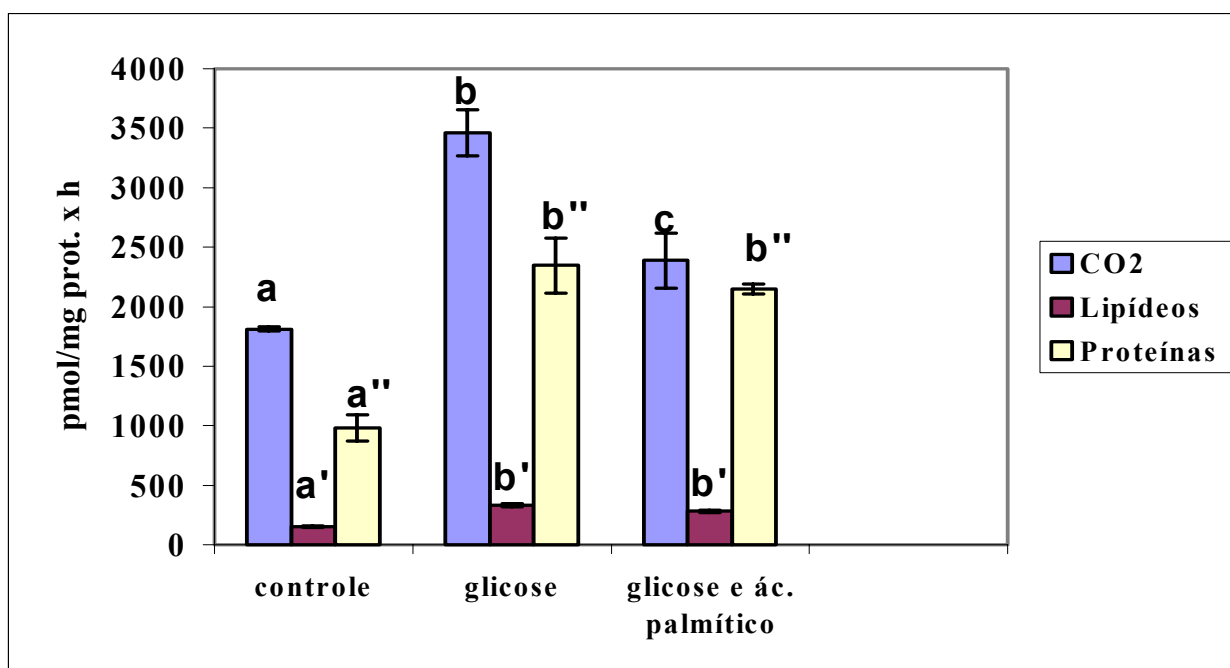


Figura IV.2.3- Efeito do ácido palmítico e glicose no metabolismo da valina. As células de Sertoli foram incubadas por 1 hora em KRb com L[U-¹⁴C]valina(0,25μCi/0,2mM) e/ou D-glicose(5mM), na presença ou ausência de ácido palmítico(0,5mM). pmol.h⁻¹.mg proteína⁻¹ representa a quantidade de L[U-¹⁴C]valina oxidada a CO₂, convertida em lipídeos e incorporada a proteínas. Os dados estão representados em média ± SEM; n = 4 em dois experimentos diferentes. Diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significantes. Os resultados foram analisados através do método ANOVA seguido do teste de Duncan.

a diferente de c p< 0,05

a diferente de b p< 0,01

a'diferente de b'p< 0,05

a''diferente de b''p< 0,01

IV.2.4- Efeito do piruvato na oxidação da valina, na sua conversão a lipídeos e sua incorporação em presença ou ausência da glutamina.

Através dos experimentos do capítulo I, sabíamos que a glutamina diminuía acentuadamente a oxidação da L[U-¹⁴C]valina. Decidimos verificar se o piruvato em presença ou ausência de glutamina causaria algum efeito no metabolismo da valina em se tratando de oxidação a CO₂, conversão a lipídeos e incorporação em proteínas. Os resultados mostraram que, o piruvato diminui em menor proporção a oxidação a CO₂ da valina e não houve efeito na conversão a lipídeos e incorporação em proteínas. Entretanto, quando adicionados juntos, piruvato e glutamina ao meio de incubação, a diminuição da oxidação a CO₂ foi igual a produzida só com a glutamina (figura IV.2.4).

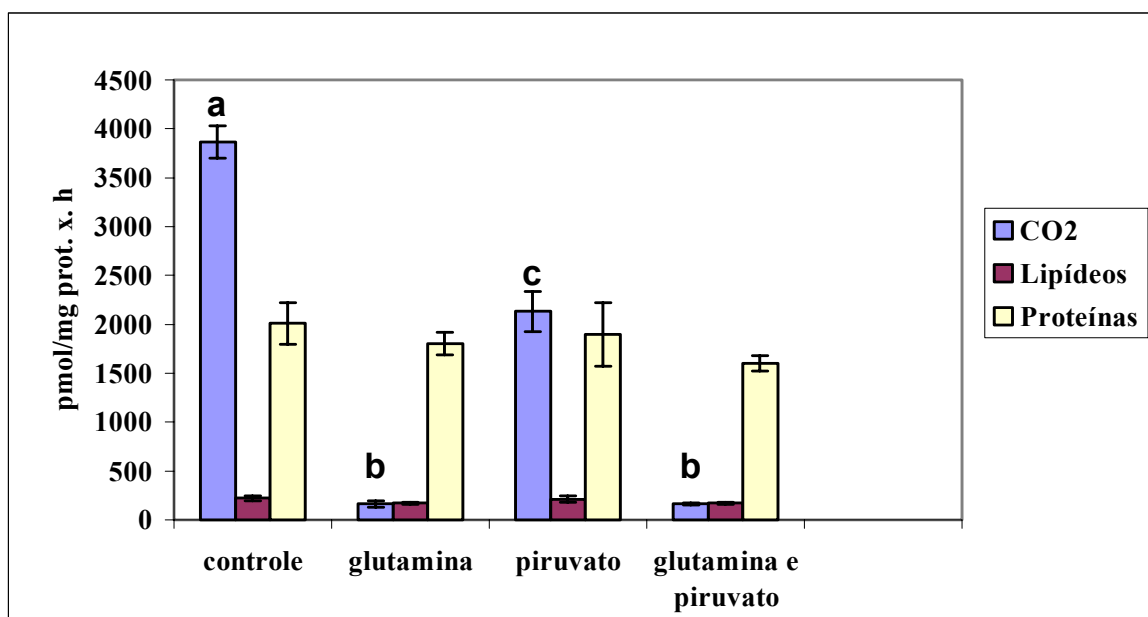


Figura IV.2.4- Efeito do piruvato e/ou glutamina na oxidação da valina, na sua conversão a lipídeos e sua incorporação em proteínas. . As células de Sertoli foram incubadas por 1 hora em KRb com L[U-¹⁴C]valina(0,25 μ Ci/0,2mM) e/ou L-glutamina(2,0mM), na presença ou ausência de piruvato(0,2mM). pmol.h⁻¹.mg proteína⁻¹ representa a quantidade de L[U-¹⁴C]valina oxidada a CO₂, convertida em lipídeos e incorporada a proteínas. Os dados estão representados em média \pm SEM; n = 4 em dois experimentos diferentes. Diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significantes. Os resultados foram analisados através do método ANOVA seguido do teste de Duncan.

a diferente de **c** p< 0,05

a diferente de **b** p< 0,01

V- DISCUSSÃO

No capítulo I do presente trabalho, realizou-se um estudo verificando a capacidade que os aminoácidos alanina, leucina, glicina, glutamina e valina em cultura de células de Sertoli possam ter para a produção de energia (oxidação a CO_2), conversão a lipídeos e incorporação em proteínas na presença ou ausência de outros nutrientes energéticos tais como: ácido palmítico, glicose e/ou glutamina.

No capítulo II, o estudo realizado foi com o objetivo de verificar uma possível interação entre os nutrientes energéticos: glicose, glutamina, ácido palmítico e piruvato, no metabolismo dos aminoácidos leucina, glutamina e valina em cultura de células de Sertoli visando a produção de energia, procurando o esclarecimento das rotas associadas à oxidação a CO_2 , conversão a lipídeos e incorporação em proteínas.

Nas células de Sertoli, alanina, leucina e valina são principalmente oxidados a CO_2 , em menor grau incorporados a proteínas e convertidas a lipídeos. Por outro lado, glicina é um pobre substrato energético sendo principalmente incorporada a proteínas e parcialmente convertida a lipídeos.

Como observado no capítulo I, presença de glicose, ácido palmítico e/ou glutamina não modificaram a oxidação de glicina a CO_2 , a sua conversão a lipídeos e sua incorporação a proteínas. Em relação à oxidação da glicina, provavelmente as atividades enzimáticas desta via sejam baixas nas células de Sertoli, uma vez que a glicina é pouco oxidada a CO_2 . Com isso, podemos concluir que as células de Sertoli nas condições experimentais do presente trabalho, pouco utilizam glicina para a obtenção de energia.

Uma vez que os outros aminoácidos ensaiados (alanina, leucina, valina e glutamina) eram preferencialmente oxidados a CO₂ pelas células de Sertoli em cultura, como visto no capítulo I, e que a glicose causava uma modificação significativa no metabolismo da alanina, leucina e valina tanto na oxidação a CO₂ como na conversão a lipídeos e incorporação a proteínas, decidimos investigar a inter-relação da glicose com o ácido palmítico no metabolismo destes aminoácidos.

A glicose não é considerada um nutriente energético principal para as células de Sertoli. **Robinson e Fritz,(1981)** mostraram que somente uma pequena quantidade de piruvato endógeno, produzido a partir da glicose, é oxidado via ciclo de Krebs. Piruvato é convertido a lactato e ambos, piruvato e lactato, são liberados da células de Sertoli, **(Grootegoed, Oonk, Jansen e Van de Molen, 1985; Jutte et al., 1983).**

Por outro lado, **Jutte et al.(1985)**, mostraram que as células de Sertoli em cultura podem oxidar palmitato a CO₂ e corpos cetônicos. Os autores observaram que a presença de glicose não alterou essa oxidação e provocou um aumento significativo na esterificação do palmitato, provavelmente devido ao aumento dos níveis de glicerol-3-fosfato. Com isso, os autores concluíram que os ácidos graxos constituem um importante substrato energético para essas células.

Entretanto, como discutido no capítulo I, em nossos experimentos a adição de ácido palmítico não modificou a oxidação a CO₂, conversão a lipídeos e incorporação a proteínas dos aminoácidos estudados. Alanina, leucina e valina, mesmo na presença de ácidos graxos não modificaram seus metabolismos, sugerindo que possam ser relevantes como nutrientes energéticos.

Nossos resultados mostraram que a adição simultânea do ácido palmítico e da glicose no metabolismo da L-[U-¹⁴C]leucina, não alterou a oxidação a CO₂, conversão a lipídeos e incorporação a proteínas. Por outro

lado, quando em presença da glicose, a adição do ácido palmítico diminuiu a oxidação do CO₂, não modificando a conversão a lipídeos e incorporação a proteínas a partir da L-[U-¹⁴C]valina. Já no metabolismo da L-[U-¹⁴C]glutamina, tanto a adição de glicose, quanto a adição de glicose e ácido palmítico, não modificaram o metabolismo da glutamina na oxidação a CO₂, conversão a lipídeos e incorporação a proteínas.

O processo de degradação dos aminoácidos leucina e valina, envolve reações de transaminações reversíveis seguidas pela oxidação. O processo oxidativo é catalisado pelo complexo α -cetodesidrogenase para cadeia ramificada que é regulado por modificação covalente. Leucina é um aminoácido cetogênico, cujo produto final do catabolismo é a formação de acetil-CoA e acetoacetato. Já a valina é um aminoácido gliconeogênico e o produto final do seu catabolismo é a formação de succinil-CoA (intermediário do ciclo de Krebs).

Em tecido adiposo de ratos, a leucina é oxidada mais rapidamente do que a valina (**Frick, G.P., Tai, L.R., Blinder, L. and Goodman, H. M.; 1981**). A leucina parece influenciar a atividade kinase que catalisa a fosforilação e inativação da α -cetodesidrogenase para cadeia ramificada. A kinase é inibida pelo produto da transaminação da leucina (α -cetoisocaproato), mais efetivamente do que o produto da transaminação da valina (α -cetoisovalerato), (**Parker, P.J., and Randle, P.J.(1978), Frick, G.P., Blinder, L. and Goodman, H.M., 1988**).

Sabe-se que a enzima aminotransferase dos aminoácidos de cadeia ramificada, que catalisa a conversão dos aminoácidos de cadeia ramificada (valina, leucina, isoleucina) em seus correspondentes α -cetoácidos, possui uma atividade alta nas células de Sertoli, o que não ocorre nas células germinativas (**Grootegoed, Jutte, Jansen e Van der Molen, 1983**).

Como discutido no capítulo I, é possível que a glicose tenha estimulado a oxidação da valina, por dois mecanismos: 1) a acetil-CoA

originada da glicólise reage com o oxaloacetato proveniente do catabolismo da valina formando citrato, com isso o ciclo de Krebs é ativado facilitando a liberação do CO₂ procedente da valina; 2) um intermediário da via glicolítica poderá ativar a α -cetodesidrogenase para cadeia ramificada não covalentemente. Entretanto, quando adicionados juntos ácido palmítico e glicose ao meio de incubação, houve uma diminuição na oxidação da valina, se comparada somente com a presença da glicose ao meio de incubação. É possível que as acetil-CoA oriundas do ácido palmítico também sejam utilizadas no ciclo de Krebs (como as da glicose) para serem oxidadas a CO₂, com isso diminuindo a oxidação da valina, quando a glicose estava presente.

Os mecanismos utilizados no metabolismo da valina, quando adicionados os nutrientes energéticos tais como: glicose e/ou ácido palmítico, não ocorreram com a L-[U-¹⁴C]leucina, uma vez que a oxidação a CO₂ da leucina diminuiu e sua conversão a lipídeos aumentou em presença da glicose. Entretanto, quando adicionamos ácido palmítico junto a glicose, não houve mudanças nas rotas metabólicas estudadas. Como discutido no capítulo I, sugere-se que as α -cetodesidrogenases para cadeia ramificada possam ser diferentes para valina e leucina, uma vez que, **Connelly, Danner and Bowden (1968) e Bowden e Connelly (1968)**, diferenciaram duas α -cetodesidrogenases para cadeia ramificada em fígado bovino, sendo um complexo enzimático responsável pela oxidação do α -cetoisocaproato e α -ceto β metilvalerato e a atividade da desidrogenase do α -cetoisovalerato é claramente separada deste complexo.

Uma vez que, o metabolismo da L-[U-¹⁴C]valina é modificado na presença de glicose e/ou glutamina, glicose e ácido palmítico, no que se refere a oxidação a CO₂, conversão a lipídeos e incorporação a proteínas,

resolvemos pesquisar se o piruvato também modificaria o metabolismo deste aminoácido.

Como mencionado no texto acima e descrito na literatura, piruvato não é utilizado pelas células de Sertoli, sendo convertido a lactato, lactato e piruvato, são liberados da células de Sertoli, para provavelmente serem utilizados pelas células germinativas. Entretanto, em nossos experimentos, a L-[U-¹⁴C]valina quando incubada com piruvato, teve sua oxidação a CO₂ diminuída, sem alterar sua conversão a lipídeos e sua incorporação a proteínas. É possível que o percurso da via do catabolismo da valina, a qual envolve complexos enzimáticos, regulações enzimáticas, seja um pouco mais longo e de menor velocidade para chegar a succinil-CoA do que a conversão do piruvato para acetil-CoA através do complexo piruvato desidrogenase. Com isso, julga-se que, mesmo uma pequena quantidade do piruvato sendo convertido a acetil-CoA, os carbonos desta são utilizados para a oxidação a CO₂ no ciclo de Krebs, com isso interferindo na oxidação da valina.

Glutamina é o principal substrato energético para as células em proliferação e transformadas (**Zielke, Ozand, Tildon, Sevdalian & Cornblath, 1978**).

O passo inicial da degradação da glutamina, envolve sua conversão a glutamato por ação da glutaminase. O glutamato pode ser então transaminado ou, em menor grau, pode ser desaminado pela glutamato desidrogenase. Ambas as reações resultam na formação de α -cetoglutarato, um intermediário do ciclo de Krebs.

As células de Sertoli em cultura são capazes de converter quantidades substanciais de glutamina a CO₂. A situação *in vivo* ainda não é clara; entretanto, em cultura, as células de Sertoli poderiam obter 2 a 5 nmoles de ATP/min/mg de proteínas a partir da glutamina (**Grootegoed et al.,1986**).

Como discutido no capítulo I, glutamina inibiu a oxidação a CO_2 da L-[U- ^{14}C]alanina, l-[U- ^{14}C]leucina e L-[U- ^{14}C]valina nas células de Sertoli, mesmo na presença da glicose, sem alterar a conversão a lipídeos deste aminoácidos. Todavia, quando juntas, glicose e glutamina, somente a conversão a lipídeos da L-[U- ^{14}C]leucina foi aumentada. Quanto à incorporação a proteínas, a glutamina diminuiu a da L-[U- ^{14}C]alanina, sem haver alterações na da L-[U- ^{14}C]leucina e L-[U- ^{14}C]valina. Por outro lado, no metabolismo da L-[U- ^{14}C]valina, quando incubamos juntos piruvato e glutamina, o piruvato não modificou a significativa diminuição na oxidação da valina ocasionada pela glutamina, ou seja, piruvato não interfere metabolicamente nas rotas de oxidação a CO_2 , conversão a lipídeos e incorporação a proteínas da L-[U- ^{14}C]valina, quando a glutamina se faz presente.

VI. CONCLUSÕES:

De acordo com os procedimentos experimentais desenvolvidos no trabalho aqui apresentado foi possível chegar-se às seguintes conclusões:

- Os aminoácidos alanina, glutamina, leucina e valina são utilizados em maior porcentagem para a produção de CO₂ pelas células de Sertoli.
- A glicina é pouco utilizada pelas células de Sertoli para a obtenção de energia.
- Como substrato energético, a glutamina é o mais utilizado pelas células de Sertoli para a obtenção de energia, mesmo na presença de outros nutrientes tais como; glicose, ácido palmítico e piruvato.
- Dentre os nutrientes energéticos utilizados neste trabalho, o ácido palmítico é o menos proveitoso para a obtenção de energia pelas células.
- Valina: a glicose estimulou sua oxidação a CO₂, conversão a lipídeos e incorporação a proteínas. Quando juntos glicose e ácido palmítico houve uma diminuição da oxidação da leucina. Piruvato diminuiu a oxidação da valina, entretanto, quando juntos piruvato e glutamina, piruvato não interferiu nas mudanças metabólicas que a glutamina ocasionou na L-[U-¹⁴C]valina.
- Leucina: a glicose inibiu a oxidação a CO₂ e estimulou a conversão a lipídeos sem mudar a incorporação a proteínas, quando juntos glicose e ácido palmítico, o ác. palmítico não interferiu nas mudanças metabólicas que a glicose ocasionou no metabolismo da L-[U-¹⁴C]leucina.

- A presença da glicose no metabolismo da L-[U-¹⁴C]glutamina não modificou nenhum dos parâmetros estudados, já leucina e alanina diminuíram a oxidação a CO₂ da L-[U-¹⁴C]glutamina.
- Alanina: a glicose diminui a oxidação a CO₂, aumentando sua conversão a lipídeos e sua incorporação a proteínas.

Os processos pelos quais alguns substratos energéticos que utilizamos neste trabalho modificaram o metabolismo dos aminoácidos alanina, leucina, valina e glutamina não são claros e provavelmente envolvam uma série de interações complexas, ativações e inibições enzimáticas que, certamente no futuro, deverão ser pesquisadas, para melhor entendermos as vias metabólicas destas células.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AVELDAÑO M.I., ROBINSON B.S. JONHSON D.W., POULOS A. Long and very long chain polynsaturated fatty acids of the n-6 series in rat seminiferous tubules. Active desaturation of 24:4n-6 to 24:5n-6 and concomitant formation of odd on even chain tetraenoic and pentaenoic fatty acids up to C32. **Journal Biol. Chem.**, v.268, p. 11663-11669, 1993.

BOWDEN, J. A. & CONNELLY, J. L. Branched chain alpha-keto acid metabolism II. Evidence for the common identity of alpha-ketoisocaproic acid and alpha-keto-beta-methyl-valeric acid dehydrogenases **The Journal of Biological Chemistry**, V. 12, p. 3526-3531, 1968.

BORLAND K., MITA M., OPPENHEIMER C. L., BLINDERMAN L. A., MASSGUE J., HALL P. F., CZECH M .P. The action of insulin-like growth factors I and II on cultured Sertoli cells. **Endocrinology**, V. 114, p. 240-246, 1984.

CONNELLY. J. L., DANNER D. J. & BOWDENJ. A. Branched chain alpha-keto acid metabolism. I. Isolation, purification and partial characterzation of bovine liver alpha-ketoisocaproic and alpha-keto-beta-methyl-valeric acid dehydrogenase. **The Journal of Biological Chemistry**, V. 243, p. 1198-1203, 1968.

DUNLOP D. S., VAN ELDEN W.& LAJTHA A. Measurements of rates of protein synthesis in rat brain slices. **Journal of Neurochemistry**, V. 22, p.821-839, 1974.

FAWCET D. W. Ultrastructure and function of Sertoli cell. **Handbook of Physiology, V. 5**, p. 21-55, 1975.

FAWCET D. W. Tratado de Histologia. Mexico: **Interamericana. McGraw-Hill**, 11^a ed., cap.31, p. 802-857, 1993.

FRICK G. P., TAI L. R., BLINDER L AND GOODMAN H. M. L-Leucine activates branched chain alpha-keto acid dehydrogenase in rat adipose tissue. **Journal Biol. Chem. V.256**, p.2618-2620, 1981

FRICK G. P., BLINDER L. AND GOODMAN H. M. Transamination and oxidation of leucine and valine in rat adipose tissue. **Journal Biol. Chem.V. 263**, p. 3245-3249, 1988.

FISHER D. M. & CONIGLIO J. G. Composition of, and [¹⁴C] acetate incorporation into, lipids of rat Sertoli cells in culture. **Biochim. Biophys Acta, v. 751**, p. 27-32, 1983.

GRISWOLD, M. D. Unique aspects of the biochemistry and metabolism of Sertoli cells **In the Sertoli Cell. Editores:L.D. Russel & M.D. Griswold.** Cache River Press, 1993.

GROOTEGOED J. A., JUTTE N. H., ROMMERTS F. F., VAN DER MOLEN H. J. Exogenous lactate is essential for metabolic activities in isolated rat spermatocytes and spermatids. **Journal Reprod. Fertil., V. 62**, p. 399-405, 1981.

GROOTEGOED J. A., JANSEN R. & VAN DER MOLEN H. J. Hormonal activation of the supporting role of Sertoli cells in spermatogenesis. **In Hormones and cell regulation**, v. 7, p. 299-316, 1983.

GROOTEGOED J. A., JANSEN R. & VAN DER MOLEN H. J. Intercellular pathway of leucine catabolism in rat spermatogenic epithelium. **Biochem. Journal**, V. 226, p. 889-892, 1985.

GROOTEGOED J. A., OONNK R. B., JANSEN R. & VAN DER MOLEN, H. J. Metabolism of radiolabelled energy-yielding substrates by rat Sertoli cells. **Journal of Reproduction and Fertility**, V. 77, p. 109-118, 1986.

GUMA F. C. R., WAGNER M., MARTINI L. H. & BERNARD E. A. Effect of FSH and insulin on lipogenesis in cultures of Sertoli cells from immature rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, V. 30, p. 591-597, 1997.

JUTTE N. H. P., GROOTEGOED J. A., ROMMERTS F. F. G. & VAN DER MOLEN H. J. Exogenous lactate is essential for metabolic activities in isolated rat spermatocytes and spermatids. **Journal of Reproduction and Fert.**, V. 62, p. 399-405, 1981.

JUTTE N. H., JANSEN R., GROOTEGOED J. A., ROMMERS F. F. AND VAN DER MOLEN H. G. FSH stimulation of the production of pyruvate and lactate by rat Sertoli cells may be involved in hormonal regulation of spermatogenesis. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 68, p. 219-226, 1983.

JUTTE N. H., EIKVAR L., LEVY F. O & HANSSON V. Metabolism of palmitate in cultured rat Sertoli cells. **Journal of Reproduction Fertility**, V. 73, p. 497-503, 1985.

KERR J.B. & DE KRETZER M. D. Cyclic variations in the Sertoli cell lipid content throughout the spermatogenic cycle of the rat. **Journal of Reproduction and Fertility**, V. 43, p. 1-8, 1975.

LE GAC F., ATTRAMADAL H., BORREBAECK B., HORN R., FROYSA A, TVERMYR M., THANSON V. Effects of FSH, isoproterenol and cyclic AMP on the production of lactate and pyruvate by cultured Sertoli cells. **Arch Andrology**, V. 10, p. 149-154.

LIN C. H., FRITZ I. B. Studies on spermatogenesis in rats.IV. Rates of oxidation of palmitate and pyruvate by various testicular cell populations. **Can Journal Biochem**. V. 9, p. 963-968,1972.

LOWRY O. H., ROSEBROUGH A. L., FARR A. L. & RANDALL R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**,V. 193, p. 265-275,1951.

MEANS A. R., FAKUNDING J. L., HUCKINNS C., TINDALL D. L., VITALE R.. Follicle stimulating hormone, the Sertoli cell and spermatogenesis. **Recent Progress in Hormone Research**, V.32, p. 477-527,1976.

MITA M., PRICE J. M., HALL P. F. Stimulation by follicle-stimulating hormone of synthesis of lactate by Sertoli cells from rat testis. **Endocrinology**, V. 26, p. 445-455,1982.

MONTEIRO S. C. (1998) Metabolismo de aminoácidos em células de Sertoli. **Dissertação do Curso de Pós Graduação em Ciências Biológicas- Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.**

NAKAMURA M., HINO A., KATO J. Stimulation of protein synthesis in round spermatids from rat testes by lactate. **Journal Biochem.(tokyo), V. 89**, p. 1309-1315,1981.

NIEMI,M. & KORMANO,M. Cyclical changes in and significance of lipids and acid phosphatase activity in the seminiferous tubules of the rat testis. **Anat. Rec., V.151**, p.159-170, 1965.

OONK R. B., GROOTEGOED J. A. AND VAN DER MOLEN H. J. Comparison of the effects of insulin and follipin on glucose metabolism, by Sertoli cells from immature rats. **Molecular and Cellular Endocrinology, V. 55**, p. 39-48,1985.

ORTH, J. M. The role of follicle-stimulating hormone in controlling Sertoli cell proliferation in testes of fetal rats. **Endocrinology, V.115**, p. 1255-1982.

PALMERO S., BOTTAZZI C., COSTA M., LEONE M., FUGASSA E. Metabolic effects of L-carnitine on prepubertal rat Sertoli cells. **Horm. Metabol. Res., V. 21**, p. 87-90, 2000.

PARKER. P. J., RANDLE, P. J. Branched chain 2-oxo-acid dehydrogenase complex of rat liver. **FEBS Lett, V. 90**, p.183-186,1978.

ROBINSON,R. & FRITZ, I. B. Metabolism of glucose by Sertoli cells in culture. **Biological Reproduction**,V. 24, p. 1032-1041,1981.

RUSSEL L. D. AND PERTERSON R. N. Sertoli cell junctions: morphological and functional correlates. **International Review of Cytology**, V. 94, p.177-211,1985.

SAR M. S. HALL, E. WILSON AND F. FRENCH. Androgen regulation of Sertoli cell. In: L.D.RUSSELL and M.D.GRISWOLD, eds. **The Sertoli cells**. Cache river press, 1993 clearwater, Florida, p. 509-516.

STEINBERGER A. AND STEINBERGER E. Replication pattern of Sertli cell in maturing rat testes in vivo and in organ culture. **Biology of Reproduction**, V.4, p.84-87,1971.

SKINNER, M. K. Cell-cell interations in the testis. **Endocrine Reviews**, V. 12, p.45- 77,1991.

TUNG P. S. & FRITZ I. B. Extracelular matrix rat Sertoli cell histotype expression in vitro. **Biology of reproduction**, V.30, p.213-227, 1984.

ZIELKE H. R., OZAND P. T., TILDON J. T., SEVDALIAN D. A., CORNBLATH M. Reciprocal regulation of glucose and glutamine utilization by cultured human diploid fibroblasts. **Journal Cell Physiol** V.95, p. 41-48, 1978.