

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

METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS
EM CÉLULAS DE SERTOLI

SIOMARA DA CRUZ MONTEIRO
Orientadora: Profa. Dra. Elena Aida Bernard

Dissertação apresentada ao 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
1998

“Não rezeis por uma vida fácil.
Rezai por serdes homens fortes.
Não rezeis por tarefas iguais às vossas forças.
Rezai por forças iguais às vossas tarefas.
Então o produto de vosso trabalho não será um milagre,
mas vós sereis um milagre.
E a cada dia ficareis deslumbrados com vós mesmos e
com a riqueza de vida que nos virá pela força de Deus.”

Philip Brooks

Ao Carlos, meu companheiro de todas as horas,
e ao meu filho Leonardo, que são os maiores
estímulos da minha vida, pelos momentos
que deixamos de compartilhar acreditando
sempre num melhor amanhã.

AGRADECIMENTOS

À Profa Elena Aida Bernard por sua dedicação, sempre incansável na realização deste trabalho, pela sua presença constante, ética profissional, conhecimento científico, pela oportunidade de formação profissional, e, principalmente pela compreensão e amizade em momentos difíceis.

Ao Prof. Perry por sua participação ativa, pela ajuda indispensável na realização e correção deste trabalho, pela sua amizade e dedicação.

Agradecimento especial ao Prof. José Cláudio pelas palavras de incentivo tão importantes.

À Profa. Fátima Guma pela ajuda nas culturas de células e pela sua disposição em ajudar sempre que foi preciso.

Aos amigos Emerson, Felipe, Tiago e Leandro pela colaboração e amizades tão indispensáveis e, a Ingrid e a Karla pela ajuda espontânea, meu abraço carinhoso.

As amigas Tatiana e Zivar, companheiras desde o início.

A Liane que tem o dom de ajudar sem esperar algo em troca, pela sua ajuda nos experimentos, pela realização dos gráficos e pela sua amizade.

A Dona Lia pelo seu carinho indispensável e por sua colaboração na realização deste trabalho.

Ao Carlos Felipe pela paciência e boa vontade em auxiliar com o computador.

A minha mãe e a Tata por sempre acreditarem que eu ainda chegaria a ser mais do que elas sonharam um dia.

Ao meu pai que é sempre um exemplo de sabedoria na qual eu me espelho.

A minha sogra Olga que tanto me ajudou nos momentos em que não pude estar com meu filho.

Aos amigos do Departamento de Bioquímica, as meninas da secretaria e ao pessoal do Biotério pelo apoio.

Ao Curso de Pós-Graduação desta Universidade, por ter oportunizado a realização deste trabalho.

À FINEP, CAPES, CNPq e PROPESP pelo apoio financeiro.

ABREVIATURAS

- aa - Aminoácidos
- ABP - Proteína carreadora de andrógenos
- AG - Ácido graxo
- C - Clorofórmio
- CMF-PBS - Solução salina fosfato tamponada sem cálcio e magnésio
- cpm - Contas por minuto
- DNA - Ácido desoxirribonuclêico
- EDTA - Ácido etilenodiaminotetra-acético
- FSH - Hormônio folículo estimulante
- HBSS - Solução salina tamponada de Hank
- IGF - Fator de crescimento semelhante a insulina
- LH - Hormônio luteinizante
- M - Metanol
- PLP - Piridoxal fosfato
- POP - 2,5-difeniloxazol
- POPOP - (1,4 di)-5-fenil-2-oxazolil-benzeno
- RBP - Proteína carreadora de retinol
- Rd - Radioatividade
- RE - Retículo endoplasmático
- RNA - Ácido ribonuclêico
- SFB - Soro fetal bovino
- SNC - Sistema nervoso central
- T3 - Triiodotironina
- TCA - Ácido tricloroacético
- TR - Transaminase
- v/v - Volume/volume

SUMÁRIO

I - INTRODUÇÃO	1
I.1 - A Célula de Sertoli	1
I.1.1 - Estrutura dos testículos	1
I.1.2 - Desenvolvimento testicular e espermatogênese	1
I.1.3 - Interações celulares	4
I.1.4 - Estrutura da célula de Sertoli	7
I.1.5 - Funções	8
I.1.6 - Metabolismo	13
I.2 - Os Aminoácidos	19
I.2.1 - Estrutura	19
I.2.1.1 - Classificação geral	20
I.2.2 - Metabolismo	22
I.2.2.1 - Síntese	22
I.2.2.2 - Degradação	25
I.3 - Objetivos.....	36a
II - MATERIAIS E MÉTODOS	37
II.1 - Materiais.....	37
II.1.2 - Animais experimentais	38
II.1.3 - Soluções salinas	38

II.2 - Métodos	40
II.2.1 - Isolamento de células de Sertoli	40
II.2.2 - Cultura de células de Sertoli	41
II.2.3 - Coleta das células de Sertoli cultivadas	43
II.2.4 - Experimentos realizados com células de Sertoli	43
II.2.4.1 - Condições de incubação com precursores Radioativos.....	43
II.2.4.1.1 - Medida da oxidação dos aa a CO ₂	45
II.2.4.1.2 - Determinação dos lipídios a partir dos aa	45
II.2.4.1.3 - Medida da incorporação dos aa a proteínas	45
II.2.4.1.4 - Análise dos produtos lipossolúveis por cromatografia em camada delgada	46
II.2.4.1.4.1 - Hidrólise alcalina dos compostos lipossolúveis.....	46
II.2.4.1.4.2 - Hidrólise ácida dos compostos lipossolúveis ...	48
III - RESULTADOS	49
III.1 - Relação entre o número de células de Sertoli incubadas e a incorporação de L-[U- ¹⁴ C] leucina a CO ₂ , lipídios e proteínas.....	49
III.2 - Metabolismo da L-[U- ¹⁴ C] leucina a CO ₂ , lipídios e proteínas em células de Sertoli <i>in vitro</i> em função do tempo de incubação.....	51
III.3 - Metabolismo da leucina em células de Sertoli <i>in vitro</i> em função da concentração de leucina.....	53

III.4 - Metabolismo da glicina em células de Sertoli <i>in vitro</i> em função da concentração de glicina.....	53
III.5 - Metabolismo da alanina e valina em células de Sertoli <i>in vitro</i> em função da concentração de alanina e valina respectivamente.....	56
III.6 - Análise comparativa do metabolismo dos diferentes aa estudados.....	59
III.7 - Análise dos produtos lipossolúveis	60
III.7.1 - Identificação dos lipídios neutros por cromatografia em camada delgada	60
III.7.2 - Hidrólise ácida suave	61
IV - DISCUSSÃO	63
V - CONCLUSÕES	71
VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

LISTA DE FIGURAS

I.1.1.1.1 - Corte transversal mostrando o túbulo seminífero de testículos de mamífero.	2
I.1.4.1 - Desenho de uma célula de Sertoli mostrando sua forma e indicando suas organelas e inclusões.....	9
I.1.5.1 - Diagrama demonstrando a relação de uma célula de Sertoli com vários estágios de células germinativas compondo o epitélio seminífero.....	10
I.2.1.1 - Estrutura geral dos aminoácidos mostrando o grupo amino e o grupo carboxila.....	19
I.2.1.2 - Formas L e D.....	20
I.2.1.1.1 - Demonstrativo das fórmulas químicas dos 20 aa agrupados de acordo com suas cadeias laterais.....	21
I.2.2.1.1 - Esquema geral da síntese de aminoácidos não essenciais.....	23
I.2.2.1 - Esquema da degradação dos aminoácidos.....	26
I.2.2.2 - Catabolismo da glicina.....	29
I.2.2.3 - Figura ilustrativa do catabolismo da alanina.....	30
I.2.2.4a - Primeiras três reações do catabolismo da valina.....	32
I.2.2.4b - Subsequente catabolismo do metacrilil CoA formado da L-valina.....	33
I.2.2.5 - Catabolismo da leucina.....	35
II.2.2.1 - Células de Sertoli em cultura.....	41
II.2.1.1 - Representação esquemática de isolamento e cultivo de células de Sertoli.....	42
II.2.4.1.1 - Esquema representativo das condições de incubação, avaliação da oxidação a CO ₂ , determinação de lipídios e medida da incorporação a proteínas.....	44
II.2.4.1.4.1 - Esquema representativo da metodologia utilizada para análise dos produtos lipossolúveis.....	47
III.1.1 - Relação entre o número de células de Sertoli incubadas e a oxidação de L-[U- ¹⁴ C] leucina a CO ₂ , sua transformação a lipídios e incorporação a proteínas.....	50
III.2.1 - Metabolismo da L-[U- ¹⁴ C]leucina a CO ₂ , lipídios e proteínas em células de Sertoli <i>in vitro</i> em função do tempo de incubação.....	52
III.3.1 - Metabolismo da leucina por células de Sertoli <i>in vitro</i> em função da concentração de leucina.....	54

III.4.1 - Metabolismo da glicina por células de Sertoli <i>in vitro</i> em função da concentração de glicina.....	55
III.5.1 - Metabolismo da alanina por células de Sertoli <i>in vitro</i> em função da concentração de alanina.....	57
III.5.2 - Metabolismo da valina por células de Sertoli <i>in vitro</i> em função da concentração de valina.....	58
III.7.1 - Identificação dos produtos lipossolúveis por cromatografia em camada delgada.....	61
IV.1. - Esquema mostrando os produtos finais do metabolismo da leucina e valina.....	66
IV.2 - Esquema da interrelação metabólica entre glicina e alanina.....	69

LISTA DE TABELAS

I.1.3.1 - Interações celulares nos testículos.....	5
I.2.2.1 - Classificação geral dos aa como glicogênicos, glicogênicos e cetogênicos ou cetogênicos.....	27
II.1.3.1 - Solução salina tamponada de Hank (HBSS).....	38
II.1.3.2 - Solução salina tamponada sem cálcio e magnésio (CMF-PBS).....	39
II.1.3.3 - Solução tampão Krebs-Ringer bicarbonato / glicose 5mM.....	40
III.1.1 - Correspondência entre o número de células de Sertoli e mg de proteína na suspensão.....	49
III.6.1 - Quadro comparativo dos resultados obtidos com os diferentes aminoácidos na concentração de 1 mM substrato.....	59
III.7.2.1 - Radioatividade da fração aquosa da porção lipídica após hidrólise ácida suave.....	62

RESUMO

A célula de Sertoli possui destacada importância em relação ao processo espermato gênico e possui uma relação direta com as células germinativas. Com isso torna-se importante a função destas células em gerar intermediários do metabolismo e a utilização destes por espermátócitos e espermátides.

Sabendo que os aminoácidos além de sua incorporação a proteínas podem ser usados como combustíveis metabólicos, procuramos esclarecer as rotas metabólicas de quatro aminoácidos em células de Sertoli *in vitro*.

Realizamos culturas primárias de células obtidas de ratos Wistars de 18 dias de idade. Os testículos foram sequencialmente digeridos com enzimas específicas e as células foram semeadas em garrafas plásticas (3×10^5 células/cm²) a 34°C em uma atmosfera com 95% de ar e 5% de CO₂ em meio 199 suplementado com 1% de soro fetal bovino. Após 24h as células foram lavadas e o meio readicionado. Ao quarto dia da cultura, as células foram tripsinizadas e a suspensão celular obtida. Nós investigamos a síntese protéica, síntese lipídica e oxidação a CO₂ causada pelo catabolismo da leucina, alanina, valina e glicina radioativas. Os experimentos foram realizados em frascos, após serem gazeificados com uma mistura de 95% O₂ : 5% CO₂ por um minuto, foram selados com tampa de borracha e incubados a 34°C por 1h de acordo com a metodologia de Dubnoff et al, 1975. A incubação foi cessada pela adição de TCA 50% e foi injetado no well central hidróxido de hiamina, para capturar o CO₂. Após 30 min o conteúdo do well foi transferido para viais e a radioatividade em CO₂ foi quantificada. O conteúdo dos frascos foi lavado com TCA 10% e os lipídios foram extraídos com clorofórmio:metanol (2:1), evaporado e a radioatividade medida. O precipitado resultante foi dissolvido em ácido fórmico concentrado e a radioatividade correspondente a incorporação a proteínas foi contada.

Nossos resultados mostraram que os maiores produtos obtidos da leucina e valina neste tipo celular foi a incorporação em proteínas e a oxidação a CO₂. A glicina foi o aminoácido menos utilizada dos quatro estudados e foi mais usada para síntese protéica. A alanina foi preferencialmente incorporada a lipídios.

Expandimos nossas pesquisas procurando esclarecer a classe de lipídios formada com cada aa analisando a fração lipossolúvel por cromatografia em camada delgada. Utilizou-se de um sistema solvente para identificação de lipídios neutros e, além disso, reações de hidrólises suaves alcalinas e ácida. Com a leucina e valina observou-se uma

incorporação a fosfolipídios, ácidos graxos, triglicerídios e ésteres de colesterol, confirmou-se a formação de ácidos graxos a partir de leucina após a reação de saponificação. Com a glicina encontrou-se incorporação em fosfolipídios provavelmente fosfatidilserina. Já com alanina visualizou-se fosfolipídios, ácidos graxos, triglicerídios e ésteres de colesterol e após a hidrólise alcalina confirmou a presença de radioatividade em fosfolipídios e ácidos graxos. A hidrólise ácida suave confirmou que toda a leucina está na fração lipossolúvel, provavelmente ácido graxo. No entanto, com a glicina, alanina e valina parte da radioatividade foi incorporada na porção lipossolúvel da molécula do fosfolipídio e parte na fração hidrossolúvel.

I. INTRODUÇÃO

I.1. A Célula de Sertoli

I.1.1. Estrutura dos testículos

Os testículos fazem parte do aparelho reprodutor masculino produzindo espermatozóides e hormônio sexual masculino. São envolvidos por uma espessa cápsula de tecido conjuntivo, a albugínea. Localizam-se nas bolsas escrotais que mantêm a temperatura alguns graus abaixo da temperatura abdominal.

Analisando a estrutura dos testículos dos mamíferos observamos dois compartimentos distintos: o tecido intersticial vascularizado e os túbulos seminíferos (FIGURA I.1.1.1). Nos túbulos seminíferos ocorre a espermatogênese e a espermiogênese.

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

Os túbulos seminíferos possuem as células de Sertoli (não proliferativas), componentes somáticos do epitélio seminífero que circundam as células germinativas (proliferativas). Durante a espermatogênese, as células germinativas são transformadas em espermatozóides através da formação intermediária de espermatogônias, espermatócitos e espermátides.

I.1.2. Desenvolvimento testicular e espermatogênese

O desenvolvimento dos testículos de mamíferos é um processo longo e contínuo que se inicia ainda no feto onde ocorre a diferenciação sexual das gônadas. Após o nascimento o desenvolvimento é classificado em três fases distintas:

1. Impúbere
2. Pré-púbere
3. Adulta

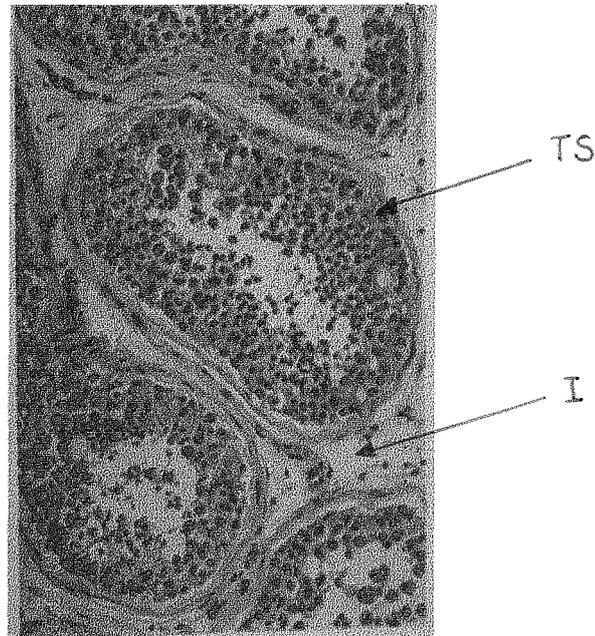


FIGURA I.1.1.1: Corte transversal mostrando o túbulo seminífero de testículo de mamífero. As setas mostram o túbulo seminífero (TS) e o interstício (I). Figura obtida na Internet.

O período de duração destas fases difere de espécie para espécie (COUROT & KILGOUR,1984). Cada fase possui características histológicas específicas. No feto e em testículos impúberes, os túbulos seminíferos são constituídos por dois tipos celulares:

- as células de suporte, precursoras da célula de Sertoli no adulto
- as células germinativas primordiais ou os gonócitos

Os núcleos das células de suporte localizam-se na periferia do túbulo com o citoplasma diferenciado para o centro. Nesta fase o túbulo ainda não tem lúmen. O número de células de suporte é bem maior que o de células germinativas e observam-se mitoses nestas duas populações celulares. As células germinativas ficam inseridas no citoplasma das células de suporte. A velocidade máxima proliferativa das células de suporte acontece no início da espermatogênese e termina durante as primeiras fases deste processo (COUROT & KILGOUR,1984).

A fase pré-púbere é um período de rápido crescimento testicular quando inicia-se a espermatogênese. A população celular das gônadas aumenta de forma notável, os gonócitos transformam-se em espermatogônias iniciando-se as três fases do desenvolvimento das células germinativas. Na primeira fase as espermatogônias indiferenciadas proliferam originando espermatogônias diferenciadas que originam os espermatócitos e uma nova geração de espermatogônias indiferenciadas. Na segunda fase os espermatócitos sofrem divisões meióticas formando espermátides haplóides. Na terceira fase, as espermátides diferenciam-se em células flageladas móveis denominadas espermatozóides durante o processo de espermiogênese (CLERMONT,1972).

Terminada a espermatogênese, o espermatozóide é expulso para a luz do túbulo e o citoplasma da espermátide fica retido junto a célula de Sertoli.

Os espermatozóides formados são transportados através do lúmen do túbulo até o epidídimo onde são armazenados até tornarem-se completamente maduros fisiologicamente.

A barreira hemato-testicular é originada dos complexos juncionais que se formam entre as células de Sertoli adjacentes e divide o túbulo seminífero em dois compartimentos: o basal e o adluminal. No compartimento basal estão as espermatogônias e os espermatócitos primários. O adluminal contém espermatócitos e espermátides (RUSSEL,1977 a).

A secreção ativa de compostos oriundos das células de Sertoli passando seletivamente por esta barreira provavelmente determine um meio ideal para o desenvolvimento das células germinativas (SKINNER,1991).

O início da espermatogênese e a sua manutenção dependem de FSH e da testosterona. Aceita-se que o efeito destes hormônios no ciclo espermatogênico são mediados pelas células de Sertoli já que estas possuem receptores para estes hormônios. Um dos efeitos do FSH e da testosterona sobre as células de Sertoli é a estimulação da produção de proteínas como a ABP - **androgen binding protein** e a inibina. A glicoproteína inibina inibe a secreção de FSH pela hipófise gerando um **feed-back** negativo entre os testículos e a hipófise . Outro **feed-back** negativo é a inibição da liberação de gonadotrofinas pela testosterona circulante (TOEBOSCH,1990).

Os dois compartimentos testiculares respondem a diferentes gonadotrofinas já que as células de Sertoli, nos túbulos seminíferos, respondem ao FSH e as células de Leydig , no interstício, respondem ao LH, produzindo testosterona. A regulação da proliferação celular é primordial para a geração de

espermatozóides. O papel de produzir células germinativas, precisa e coordenadamente, no epitélio seminífero, necessita de mecanismos regulatórios (LOSTHOH,1969).

Outros hormônios hipofisiários também podem afetar a espermatogênese mas seu papel parece ser secundário ao das gonadotrofinas.

Muitos modelos experimentais sugerem que a necessidade hormonal é diferente para fases distintas do processo espermatogênico. O FSH possui um papel fisiológico de desencadear nos testículos imaturos um evento essencial para que a espermiogênese se complete durante a primeira onda espermatogênica. Estabelecido o processo espermatogênico este continuará a menos que um fornecimento adequado de testosterona esteja a disposição (STEINBERGER & DUCKETT, 1967; STEINBERGER & STEINBERGER, 1974).

O FSH é importante para a espermatogênese , porém parece ter um efeito transitório limitado a etapa de maturação das espermátides durante a primeira onda espermatogênica. Seu papel fisiológico no macho adulto ainda não está bem definido. Sabe-se que este hormônio é requerido para restaurar o processo espermatogênico quando existe uma perda da estimulação gonadotrófica em adultos. É desconhecido o modo de ação deste hormônio quando no controle da espermatogênese. Provavelmente este controle envolva o crescimento e maturação das células de Sertoli regulando a síntese de seus vários produtos de secreção.

São os hormônios da hipófise que geram os estímulos essenciais para que ocorra a função testicular. Aparentemente são as complexas interações celulares do compartimento celular quem determina o tempo de duração e a intensidade da resposta das células testiculares. Uma série de fatores endócrinos e parácrinos produzidos no local foram sugeridos como participantes no controle e manutenção da função e diferenciação testicular.

I.1.3. Interações Celulares

As célula de Sertoli e as células germinativas interagem intensamente. O epitélio do túbulo seminífero pode ser dividido em três compartimentos: o compartimento das células mitóticas, onde ocorre produção de espermatogônias

resultado de divisões mitóticas, o compartimento das células meióticas, formado por espermatócitos primários e secundários e o compartimento das células espermiogênicas com espermátides em diferenciação. A célula de Sertoli estabelece relações espaciais e funcionais com estes três compartimentos que variam ao longo do túbulo mantendo o processo espermatogênico (KIERSZENBAUM & TRES,1981). Este ciclo funcional depende de sinais hormonais do eixo hipotálamo-pituitário (FSH,LH), do testículo (testosterona) e de sinais intratubulares oriundos das células localizadas nos três compartimentos citados onde a célula de Sertoli esta associada.

Com a evolução dos organismos multicelulares houve o aperfeiçoamento da interação celular. As interações célula-célula podem ser classificadas em três categorias:ambientais, nutricionais e regulatórias (SKINNER, 1991). Um resumo destas interações é demonstrado na tabela I.1.3.1.

TABELA I.1.3.1:

INTERAÇÕES CELULARES NOS TESTÍCULOS

Interação	Ambiental	Nutricional	Regulatória
Sertoli Germinativa	X	X	X
Sertoli Peritubular	X		X
Sertoli Leydig			X
Leydig Peritubular			X

Tabela adaptada de Skinner (1991).

Analisando as interações celulares no testículo nota-se que as ações do sistema endócrino são frequentemente e indiretamente mediadas por interações celulares locais. Como já foi mencionado anteriormente, os dois compartimentos testiculares respondem a gonadotrofinas diferentes. As células de Sertoli respondem ao FSH enquanto que as células de Leydig respondem ao LH produzindo testosterona. O início e a manutenção da espermatogênese dependem de FSH e testosterona. As células de Sertoli possuem receptores para estes dois hormônios cujos efeitos parecem ser mediados por estas células durante o processo de espermatogênese.

A comunicação entre estes dois tipos celulares inclui efeitos de compostos produzidos pelas células germinativas sobre as células de Sertoli. Foram observadas mudanças no padrão de secreção das células de Sertoli nos diferentes estágios da espermatogênese. Já foi demonstrado por PARVINEN (1982) que as células de Sertoli variam quantitativamente as suas propriedades no decorrer do ciclo. KIERSZEMBAUM & TRES (1981) evidenciaram uma das primeiras demonstrações desta função cíclica das células de Sertoli através de estudos autoradiográficos em camundongos visualizando variações nos padrões de marcação com [³H]-uridina e aminoácidos em áreas adjacentes do epitélio seminífero, indicando diferentes atividades metabólicas. KERR, 1988 verificou mudanças na ultra - estrutura das células de Sertoli que refletem alterações na atividade celular para a manutenção da espermatogênese. Foram observadas também variações no seu conteúdo lipídico (KERR & DE KRETZER, 1975).

Em coculturas contendo estes dois tipos celulares evidenciam-se: aumento na síntese de DNA e RNA pelas células germinativas, surgimento de antígenos de superfície e manutenção da síntese de glutatíon nas mesmas células germinativas (RIVAROLA et al, 1985; VAN DER DOONK et al, 1986 e LI et al, 1989). Por outro lado, meio condicionado de células germinativas estimula a fosforilação de proteínas específicas e a atividade da glutamil transpeptidase nas células de Sertoli, podendo também aumentar a produção de ABP, a produção e a expressão do gene para transferrina e diminuir a síntese de estradiol e RNA (SCHTEINGART et al, 1989; RIVAROLA et al, 1985; LE MAGUERESSE et al, 1988; DJAKIEW & DYM, 1988; STALLARD & GRISWOLD, 1990).

A maioria, se não todos os efeitos hormonais durante o ciclo espermatogênico são mediados pelas células de Sertoli. A ligação máxima do FSH e a secreção de várias proteínas das células de Sertoli são estágio específicas.

I.1.4. Estrutura da célula de Sertoli

As células de Sertoli foram distinguidas em testículo humano por Enrico Sertoli em 1865 (FIGURA I.1.4.1). A definição dos limites desta célula foi complicada devido sua estrutura que envolve as células germinativas, porém após dissociações vagarosas e delicadas do epitélio em solução de cloreto de mercúrio, Sertoli estabeleceu que as células de suporte eram individuais e de forma colunar mas possuíam processos ramificantes que se estendiam através do lúmen para envolver as células germinativas associadas (FAWCETT,1975).

Tais células formam centros ao redor dos quais as células germinativas estão arrançadas. Sua aparência sugere um tronco de árvore (ELFTMAN,1963).

Através do uso de técnicas de microscopia eletrônica demonstrou-se que a morfologia das células de Sertoli era muito mais complexa. Perto da base, células de Sertoli adjacentes formam junções estreitas denominadas **tight junctions** que são responsáveis pela formação da barreira hemato testicular. No lado adluminal da barreira ocorrem projeções que circundam as células germinativas (RUSSEL & PETERSON,1985). Devido a presença desta barreira as células germinativas possuem acesso limitado às substâncias da circulação e por este motivo são dependentes do meio imediato circulante controlado pelas células de Sertoli. Este fato fornece evidências a função de célula nutritiva atribuída às células de Sertoli. Sugere também o possível mecanismo de ação pelo qual o FSH e a testosterona, que atuam diretamente sob as células de Sertoli, regulariam a espermatogênese (FRITZ,1978).

A célula de Sertoli é uma célula epitelial comprida, colunar e estrelada com uma base sólida numa membrana basal, um ápice que alcança o lúmen tubular numerosas projeções laterais semelhantes a processos que estendem-se ao redor de inúmeras células germinativas.

A maioria das organelas ficam bem representadas compondo seu vasto citoplasma. Um núcleo grande polimórfico localizado na região basal possui uma cromatina pálida e um nucléolo facilmente identificado. Possui poucos cariossomos e aglomerados de hetero cromatina comuns em muitas células somáticas. O nucleoplasma é homogêneo com uma grande porção de eucromatina condizente com célula que expressa grande parte do seu genoma. Os nucléolos incluem numerosos elementos vesiculares com membrana limitante típica (FAWCETT,1975).

O restante do citoplasma inclui um sistema contínuo de cisternas do retículo endoplasmático, um complexo de Golgi peri e supra nuclear formando uma rede contínua, mitocôndrias polimórficas, um aparelho endossomal-lisossomal e um extensivo citoesqueleto composto de filamentos e microtúbulos. O aparelho de Golgi não é uma simples organela localizada em uma posição definida. Consiste de múltiplos elementos separados através do citoplasma basal e ocasionalmente na região supra nuclear.

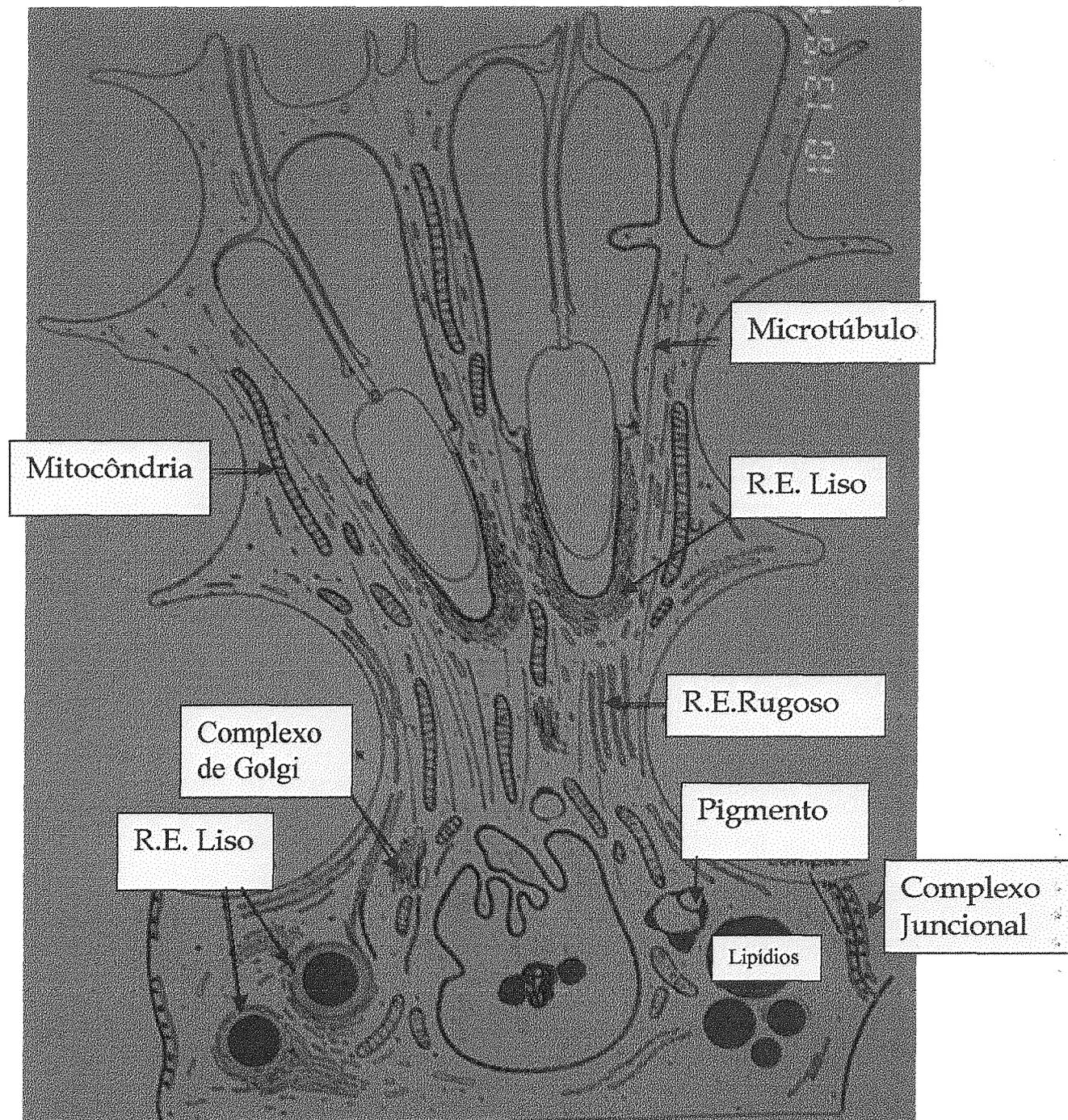
Em ratos têm sido demonstrado centríolos e peroxissomos. Há inúmeras vesículas pequenas, muitas servindo para carregar vários tipos de materiais. Existem também grânulos não secretórios. O citoplasma contém inclusões lipídicas e, na célula de Sertoli de humanos, cristais de proteína. Uma definição específica para o citoplasma da célula de Sertoli seria: um complexo formado por cisternas achatadas de retículo endoplasmático e filamentos de actina localizados próximo a membrana plasmática tornando adjacentes células de Sertoli e espermátides.

I.1.5. Funções da Célula de Sertoli.

As células de Sertoli possuem múltiplas funções especializadas, muitas das quais acontecem simultaneamente (FIGURA I.1.5.1). Algumas estão relacionadas com a diferenciação das células germinativas, outras são resultados de investigações de biologia molecular nos túbulos seminíferos.

A primeira a ser evidenciada é a mais óbvia função destas células - o papel de **sustentação** mantendo no seu devido lugar os clones de células germinativas diferenciadas localizadas no compartimento adluminal do epitélio seminífero que são os espermatócitos e espermátides. Já existem especulações a nível molecular a respeito desta função. Tal processo requer a formação e dissolução de planos juncionais entre as células de Sertoli e os espermatócitos. Sabe-se pouco a este respeito assim como o exato papel das glicoproteínas ligantes às interfaces entre as células de Sertoli e as células germinativas. O processo pelo qual as espermátides alongadas são colocadas dentro de intervalos pronunciados formados na parte apical da célula de Sertoli também é pouco explicado.

FIGURA I.1.4.1: Desenho de uma célula de Sertoli mostrando sua forma e indicando suas organelas e inclusões. Adaptado de FAWCETT,1975.



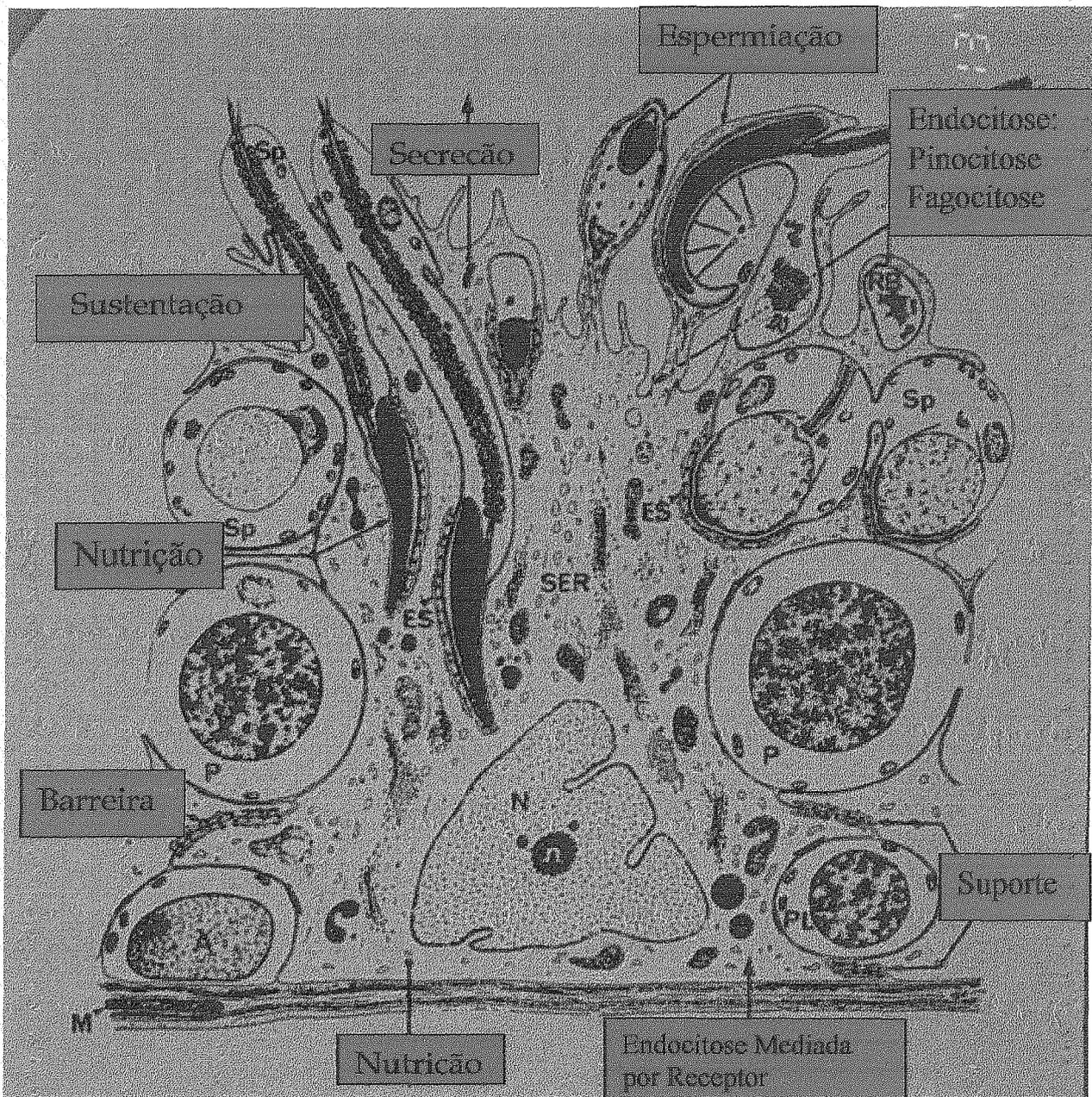


FIGURA I.1.5.1: Diagrama mostrando a relação de uma célula de Sertoli com vários estágios de células germinativas compondo o epitélio seminífero. Estão indicadas as principais funções de célula de Sertoli. Legenda: N: núcleo, n: nucléolo, SER: Sertoli, A: espermatogônia, PI: espermatócito pré leptotênico, P: espermatócito paquitênico, Sp: espermátides, RB: corpo residual, M: célula mióide na membrana basal. Adaptado de CLERMONT,1993.

A capacidade de fagocitar e eliminar corpos citoplasmáticos residuais que separam-se das espermatídes tardias durante a espermiacão foi analisada mais recentemente como sendo somente mais uma faceta da função endocítica da célula de Sertoli. Uma pinocitose ativa ou fase fluida aparece no ápice das células de Sertoli que resulta na formação de lisossomos. Estes, eventualmente fundem-se com os fagossomas e contribuem na sua eliminação do epitélio seminífero.

Uma endocitose mediada por receptor acontece na membrana plasmática basal. Vários fatos ainda devem ser esclarecidos como por exemplo o mecanismo de reconhecimento que permite uma internalização seletiva dos corpos residuais, se ocorre uma reciclagem dos produtos de degradação resultantes da lise dos corpos residuais, quais seriam as rotas intracitoplasmáticas e os mecanismos alvo para as glicoproteínas lisossomais do aparelho de golgi e também, quais seriam os mecanismos moleculares que controlam esta função cíclica endocítica-fagocítica.

Outra função emerge do fato de que células de Sertoli adjacentes unem-se por meio de **tight-junctions** intercelulares constituindo numa barreira de macromoléculas denominada hemato testicular, como já foi citado anteriormente. Isto resulta na formação de dois compartimentos dentro do epitélio seminífero: um basal contendo espermatogônias e espermatócitos recentes e um adluminal contendo espermatócitos meióticos e espermatídes em várias etapas de espermiogênese. Supõe-se então que a célula Sertoli envolva-se então no **transporte de substâncias** do compartimento basal para o compartimento adluminal nutrindo as células germinativas. Pouco se sabe sobre a exata significância biológica da barreira hemato testicular em termos de diferenciação das células germinativas localizadas adluminalmente.

Não menos importante é a **sustentação (suporte)** de espermatídes recentes do compartimento basal para o adluminal. Um grande grupo de espermatócitos são interconectados por pontes intercelulares abertas de células de Sertoli adjacentes que restabelecem contato e fixam-se uma nas outras por novas tight junctions lineares. Estas junções devem se dissolver permitindo a liberação de espermatócitos no compartimento adluminal. É um processo sincronizado envolvendo simultaneamente um grande número de células de Sertoli que seletivamente reconhece os espermatócitos que serão sustentados.

Na espermiogênese ocorre um **envolvimento da célula de Sertoli na espermiacão**. Durante a primeira das três fases distintas deste processo de liberação dos espermatozóides, ocorre a expulsão espermatídes tardias das células de Sertoli. Na última fase as cabeças das espermatídes desengatam-se dos processos das células

de Sertoli que seletivamente retém e fagocita restos citoplasmáticos e corpos residuais que se desprendem dos espermatozóides.

A função **nutritiva**, ou seja, o suprimento de substâncias nutritivas como glicídios, aminoácidos, lipídios, elementos metálicos, ... para as células germinativas é considerada plausível devido alta afinidade dos processos das células de Sertoli com cada célula germinativa que com ela se relaciona. Os espermátócitos meióticos e as espermátides desenvolvidas no compartimento adluminal são dependentes das células de Sertoli para terem acesso as substâncias nutritivas.

Um estudo feito através de microscopia eletrônica demonstra que as células de Sertoli desenvolvem processos semelhante a dedos que invaginam o citoplasma das espermátides alongadas e subsequentemente aparecem fragmentados em pedaços que são incorporados em vacúolos digestivos dentro das espermátides, talvez um possível modo de entregar produtos da células de Sertoli para espermátides metabolicamente ativas.

Açúcares ou aminoácidos marcados injetados intravascularmente ou intratesticularmente rapidamente atingem espermátócitos ou espermátides os quais são incorporados em proteínas ou glicoproteínas demonstrada por autoradiografias. Quanto ao envolvimento das células de Sertoli no transporte destas substâncias requer maiores investigações. GROOTEGOED & cols, 1986, mostraram o metabolismo de produtos marcados em células de Sertoli analisando o caminho metabólico da glicose, piruvato, glutamina e leucina. Obtiveram uma cultura de células de Sertoli com grau de pureza superior a 94%, utilizando-se de ratos imaturos. Em seus experimentos a taxa total de utilização da glicose excede as taxas de oxidação do piruvato, derivado da glicose, via ciclo de Krebs, e metabolismo da glicose via ciclo das pentoses. Este padrão de metabolismo glicolítico não foi efetivamente alterado após estimulação pelo FSH. Em meio contendo glicose e aminoácidos, a glutamina e a leucina foram convertidas a CO₂ em taxas consideráveis. Os autores então estimaram que a oxidação da glutamina e da leucina em adição com a glicose e ácidos graxos poderiam render muito do total de energia requerida pela célula de Sertoli. Tal análise partiu do princípio de que a célula de Sertoli e a célula germinativa possuem uma relação intrínseca quanto aos produtos secretados pela célula de Sertoli e o aproveitamento dos mesmos pela células espermato gênicas vizinhas.

A função **secretora** tem sido muito evidenciada. Sabe-se que a célula de Sertoli secreta uma grande variedade de proteínas, água, íons e muitas outras substâncias através de seus polos apical e basal. Há evidências quanto a secreção de proteínas tais como, proteínas ligadas a andrógenos, proteínas carregadoras de metais, proteases e inibidores, hormônios, fatores de crescimento e parácrinos de vários tipos. A maioria

destas informações foram derivadas de investigações in vitro de células de Sertoli imaturas isoladas.

Analisado as diversas funções pode-se dizer que esta célula produz uma série de fatores e desempenha uma multitudine de funções que indiretamente permite o bom funcionamento do programa genético que ocorre durante a diferenciação das células germinativas.

I.1.6. Metabolismo

O estudo do metabolismo das células de Sertoli iniciou com o desenvolvimento de técnicas para cultura destas células. Este passo foi crucial permitindo culturas livres de células germinativas e peritubulares garantindo dados corretos ao analisar células de Sertoli em cultura que refletia as mesmas condições destas em um testículo inteiro.

O metabolismo mais especializado das células de Sertoli é evidenciado após o término da divisão celular e a formação das **tight junctions** intercelulares. Como se sabe as células de Sertoli mantém os complexos juncionais e suportam direta ou indiretamente as células germinativas.

Outro fator importante é a influência de hormônios e fatores de crescimento. Sabe-se que ocorrem mudanças metabólicas de acordo com o estágio de desenvolvimento do indivíduo.

Inúmeros fatores tornam complexa a análise dos aspectos gerais do metabolismo da célula de Sertoli. O tamanho da célula que acopla um grande número de células germinativas sugere que a produção de energia e o fluxo de metabólitos dentro e através da célula seja muito grande. Mesmo estando mitoticamente inativa ela está metabolicamente ativa. Nota-se que os eventos metabólicos ocorrem a uma temperatura vários graus abaixo da temperatura ótima da maioria das reações catalizadas por enzimas. Destaque também para a superfície da membrana plasmática que interage com o sistema vascular via linfa testicular e portanto a superfície pela qual os metabólitos entram na célula é uma pequena percentagem do total da membrana plasmática celular.

O tamanho da célula de Sertoli relaciona-se diretamente com o acesso do oxigênio molecular. A entrada de diversos agentes metabólicos importantes para o interior celular é feita por difusão. A taxa de difusão destas substâncias limita-se ao tamanho

médio celular de 30 a 50 μm . A questão superfície-média dos volumes reflete provavelmente as diferenças reais das células de Sertoli em muitas espécies.

O tamanho da célula de Sertoli é um problema sob o ponto de vista metabólico. A molécula de O_2 ou outra pequena molécula podem penetrar a barreira linfática sangüínea mas devem superar enormes distâncias. Metabólitos de enorme peso molecular ou ligados a proteínas tais como o ferro a transferrina, vitamina A a RBP-retinol binding protein- ou lipídios associados com apolipoproteínas devem entrar na célula via aproximadamente 5% da área de superfície da membrana plasmática que é basal aos complexos **tight junctions**.

Deve-se relatar também o grande número de células germinativas cujo metabolismo é dependente da difusão de produtos do exterior do túbulo ou de produtos vindos diretamente das células de Sertoli. O túbulo seminífero possui um ambiente muito hipóxico. Resultados dos estudos de FREE & cols, onde os valores de PO_2 foram medidos nos compartimentos testiculares de ratos através de microeletródos, evidencia que os fluidos são muito baixos em O_2 . O PO_2 no compartimento interluminal não é menor do que no interstício. Atribuem a este fato a possível mistura de fluidos intertubulares com fluidos mais oxigenados.

Após vários estudos em testículos aspermatogênicos, FREE (1970) concluiu que as células que permaneciam, Leydig e Sertoli, continham substrato endógeno suficiente para manter as taxas máximas de respiração e que estas não metabolizavam glicose exógena. Também sugeriu que os lipídios exógenos seriam substratos para oxidação e que a glicose exógena é estimulatória porque recoloca intermediários ao ciclo do ácido cítrico e também para a formação de aminoácidos não essenciais.

O estudo sobre o metabolismo da glicose em célula de Sertoli iniciou com ROBINSON e FRITZ (1981). Culturas de células de Sertoli de ratos de 20 dias de idade foram incubadas com $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ glicose e subsequentemente as taxas de conversão a CO_2 o total de ânions, lactato, lipídios e glicogênio foram determinados. Somente 3% foi oxidado a CO_2 e menos de 2% foi convertido a lipídios ou glicogênio. A maioria da glicose foi convertida a lactato com uma taxa de 75%. Nestes experimentos a adição de insulina ou FSH teve um efeito mínimo sobre a utilização de glicose por células de Sertoli em cultura. A quantidade de glicose metabolizada pelos ciclo das pentoses foi pequena mas, foi estimulada pela adição de uma lançadeira de elétrons. Estes resultados sugeriram que o ciclo das pentoses não opera a níveis consideráveis em culturas de células de Sertoli e que os níveis de NADP^+ são muito baixos.

Muitos experimentos têm sido realizados com o objetivo de esclarecer dúvidas com respeito ao metabolismo da glicose em células de Sertoli. Num destes usando ratos de 3 ou 4 semanas que haviam sido previamente esterilizados por irradiação

para eliminar as células germinativas, a taxa total de utilização de glicose foi menor se comparada quando com a adição de FSH ou dbcAMP onde houve uma estimulação na taxa de utilização. Estes resultados mostram que 72% do piruvato foi convertido a lactato enquanto que somente 25% foi oxidado via ciclo do ácido cítrico (GROOTEGOED & cols,1986). Outros experimentos concluíram que o FSH, insulina e IGF-1 estimulam ligeiramente a produção de lactato por diferentes mecanismos. A insulina influencia a captação de glicose em culturas de células de Sertoli. O FSH também estimula o transporte de glicose. Em experimentos utilizando 2-deoxiglicose, OONK & cols (1989) concluíram que a insulina e não o FSH estimula o transporte da hexose em células de Sertoli em cultura. O FSH estimularia a atividade ou os níveis de enzimas glicolíticas.

Em geral os estudos demonstram que as células de Sertoli metabolizam a glicose que é na sua maioria convertida a lactato e não é oxidada via ciclo de Krebs. O meio ambiente entre os túbulos seminíferos contém 2% dos níveis de glicose encontrados no sangue e 50% dos níveis de lactato. As células germinativas em cultura preferem o lactato como fonte de energia. Tais observações reforçam o fato de que as células de Sertoli proveriam de lactato os espermátócitos e espermátides para produção de energia. Os experimentos de JUTTE & cols,1983, demonstraram que a produção de lactato por células de Sertoli isoladas, incubadas na ausência de FSH, foi aumentada quando variaram a idade dos ratos de 3 para 6 semanas. Isto poderia ser reflexo da alta taxa de metabolismo glicolítico em células de Sertoli isoladas de animais mais velhos.

Entretanto, tais idéias necessitam de evidências experimentais *in vivo*. Também, o lactato e o piruvato podem difundir livremente para fora das células nas quais eles são formados e poderiam refletir a taxa de glicólise entre as células.

Outro estudo, realizado por BERNARD & WASSERMANN,1982, conclui que a administração *in vivo* de FSH causa um aumento da incorporação *in vitro* de D-[1-³H] glicose, D-[U-¹⁴C] glucosamina ou D-[2-³H] manose em glicoproteínas de testículos de ratos imaturos eriquecidos de células de Sertoli. Tal efeito foi bloqueado utilizando a tunicamina, antibiótico utilizado para elucidar reações que envolvem síntese de glicoproteínas pela via ligada a asparagina.

Gotas de lipídios são facilmente observáveis nas células de Sertoli e a quantidade destas diferem com o estágio do ciclo do epitélio seminífero. É provável que tais gotas contenham triacilgliceróis que poderiam prover ácidos graxos livres para oxidação. JUTTE e cols foram pioneiros em utilizar culturas de células de Sertoli de ratos de 19 dias para analisar oxidação de lipídios. Utilizaram em seus experimentos [1-¹⁴C] ácido palmítico à uma concentração saturante na presença de albumina bovina como

carreador. Conforme as condições de seus experimentos, a máxima oxidação do palmitato foi obtida a uma concentração de 0,35 mM. As células foram incubadas por 5h e 66% da quantidade total oxidada foi a CO₂. Do restante dos produtos oxidados (34%) 1/3 encontrou-se nas células e 2/3 no meio de cultura como corpos cetônicos, 3-hidroxibutirato e acetoacetato. Somente uma pequena percentagem de palmitato radioativo estava em triacilglicerol ou lipídios esterificados. A adição de glicose exógena causou um substancial aumento na esterificação do palmitato porém teve pequena influência na quantidade de CO₂ ou corpos cetônicos formados.

A formação de corpos cetônicos é um indicativo de uma predominância de oxidação de ácidos graxos. Quando o metabolismo de carboidrato é insuficiente a concentração de oxaloacetato para a formação de citrato é baixa. Isto resulta na formação de acetilCoA por oxidação de ácidos graxos para a formação de acetoacetato e 3-hidroxibutirato. JUTTE e cols sugeriram que os corpos cetônicos formados pelas células de Sertoli poderiam ser usados pelas células germinativas como fonte de energia.

Em comparação com a quantidade de lactato secretado, a fração de corpos cetônicos foi pequena mas, os autores pontuam que poderia ser diferente em células de Sertoli *in vivo* ou na presença de hormônios.

GROOTEGOED e cols calcularam baseados nestes dados já analisados e em seus próprios achados sobre metabolismo de glicose que células de Sertoli de ratos de três semanas em cultura, derivam ATP com uma taxa de 15 nmoles/min/mg de proteína do palmitato e aproximadamente 2,5 a 15 nmoles/min/mg de proteína da oxidação da glicose. Tais valores correspondem a oxidação da glicose a lactato e uma pequena percentagem que é oxidada via ciclo do ácido cítrico e tal taxa oscila na presença de hormônios. Pode-se concluir destes estudos que a oxidação de ácidos graxos é a maior fonte de energia para cultura de células de Sertoli e não parece ser afetada pela presença de hormônios.

Outras fontes de energia também foram testadas em culturas de células de Sertoli. Foram utilizados os aminoácidos L-[U-¹⁴C] glutamina ou L-[1-¹⁴C] leucina. A glutamina é oxidada a CO₂ por conversão do glutamato e então a α-cetoglutarato o qual é subsequentemente oxidado via ciclo do ácido cítrico. 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* ainda não é clara. Sob condições experimentais GROOTEGOED e cols demonstraram que culturas de células de Sertoli poderiam obter 2 a 5 nmoles de ATP/min/mg de proteína da glutamina.

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. Em pesquisas feitas com leucina radioativa o 4-metil-2-oxopentanoato foi formado por transaminação que foi na sua maioria descarboxilado a isovaleril-CoA. Este foi então completamente oxidado via ciclo do ácido cítrico. Aproximadamente 15 a 30% do 4-metil-oxopentanoato foi liberado das células e tem sido demonstrado que o α -oxo ácido liberado pelas células de Sertoli poderia ser captado pelas células germinativas e então convertido ao 2-hidroxi-4-metilvalerato (JUTTE e cols, 1983). Esta não é uma reação de produção de energia e sua significancia biológica é desconhecida.

O maior interesse dos caminhos biossintéticos envolvendo carboidratos tem sido a conversão enzimática da glicose a mioinositol. Sabe-se que a concentração de mioinositol no fluido tubular é 50 vezes maior daquela encontrada no soro. No túbulo seminífero temos uma concentração de 3 a 5 mM e no epidídimo de 20 a 30 mM. Ainda nada se sabe da significância desta alta concentração.

ROBINSON & FRITZ (1979) mostraram que células de Sertoli em cultura são capazes de converter glicose em mioinositol e a adição de dibutilil AMPc ocasiona um ligeiro aumento nesta produção. Uma pequena fração do mioinositol foi encontrada no meio enquanto que uma fração maior permaneceu nas células após 72h de cultura. Ambas as enzimas sintase e fosfatase necessárias nas reações são encontradas nas células de Sertoli. Contrário aos resultados de ROBINSON & FRITZ, os níveis de sintase detectados por anticorpos no epidídimo foi somente uma pequena fração daqueles encontrados nos testículos.

Um número limitado de estudos têm examinado diretamente a síntese de lipídios em culturas primárias de células de Sertoli. Num destes, o acetato marcado foi incubado com células de Sertoli em cultura e a incorporação da radioatividade em várias classes de lipídios foi determinada. A radioatividade foi detectada em ácidos graxos, incluindo ácidos poliênicos. A maior porção do acetato marcado (70%) foi incorporada em fosfolipídios e triacilgliceróis. Comparando a taxa de incorporação do acetato com os baixos níveis de atividade da ATP-citrato liase detectados em células de Sertoli, sugerem que tais células utilizam acetato para síntese lipídica sem o envolvimento da mitocôndria (GUMA & cols, 1997). Em outro estudo foi demonstrado quando culturas de células de Sertoli foram incubadas com linoleato ou α -linolenato radioativos foram formados ácidos aracdônicos e ácidos polienóicos de cadeia longa. Tem sido evidenciado também que ácidos graxos poliênicos de 22 C são derivados da elongação do ácido linolêico. Diferentes formas de poliênos de 22 C acumulam-se em diferentes espécies. As células de Sertoli possuem um baixo conteúdo de fosfolipídios e um alto conteúdo de triacilgliceróis como foi evidenciado por BECKMAN & CONIGLIO (1979).

O metabolismo das células de Sertoli e suas relações com o desenvolvimento das células germinativas são áreas com muitas questões ainda para serem esclarecidas. Deve-se levar em conta as dificuldades associadas com os estudos de rotas metabólicas e suas interdependências com a diversidade de células encontradas nos testículos. Várias perguntas merecem ser respondidas dentre elas sobre os eventos metabólicos que são necessários nas células de Sertoli para a sobrevivência das células germinativas e com isso a garantia da espermatogênese e espermiogênese.

I.2. Os Aminoácidos.

I.2.1. Estrutura.

Os aminoácidos (aa) são unidades monoméricas das quais são formadas as proteínas e são, por conseguinte, os produtos primários da degradação protéica. Embora mais de 300 diferentes tipos de aminoácidos estejam descritos, somente 20 são comumente encontrados como constituintes de proteínas de mamíferos. Cada aminoácido, com exceção da *Prolina*, possui um grupo carboxila, um grupo amino e uma distinta cadeia lateral (grupo - R) ligados a um C α (FIGURA I.2.1.1). As cadeias laterais são quimicamente diversas e suas propriedades químicas determinam características específicas das proteínas nas quais os aminoácidos fazem parte.

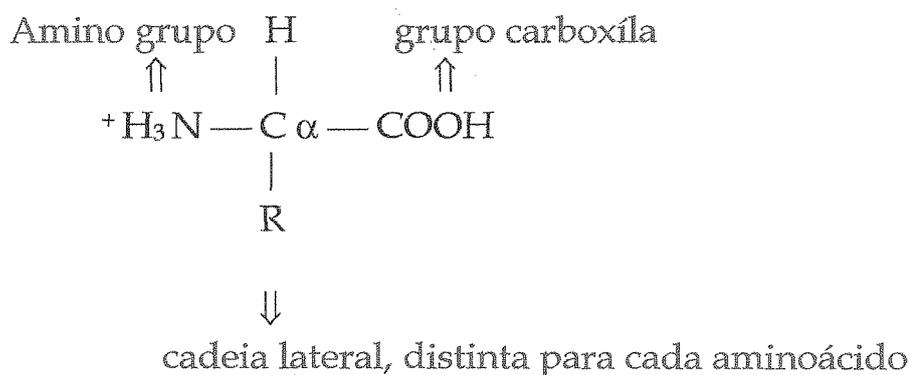


FIGURA I.2.1.1: Estrutura geral dos aminoácidos mostrando o grupo amino e o grupo carboxíla que são comuns para todos os α -aminoácidos e, a cadeia lateral que é distinta. Demonstrativo de sua forma protonada. Adaptada de CHAMPE & HARVEY, 1994.

A um pH fisiológico de aproximadamente 7.4 o grupo carboxíla é dissociado formando o íon carboxilato, - COO⁻, e o grupo amino é protonado, - NH₃⁺. Para 19 aminoácidos o C α lateral tem quatro constituintes diferentes: o grupo amino, o grupocarboxíla, a cadeia lateral e o átomo de hidrogênio. Portanto, o átomo de C é assimétrico e os aminoácidos podem existir na configuração D e L (FIGURA I.2.1.2).

Todos os aminoácidos encontrados no corpo, com exceção da *Glicina*, que não possui C assimétrico, estão na configuração L.

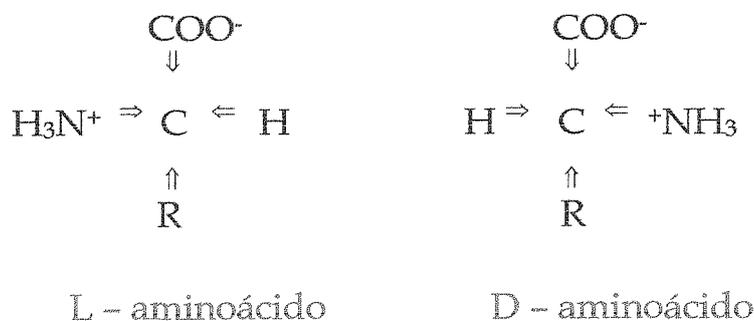


FIGURA I.2.1.2: Formas L e D. Adaptada de MARKS e cols, 1996.

I.2.1.1. Classificação Geral:

As funções de cada aminoácido individual e suas funções na estrutura proteica relatam principalmente as propriedades químicas de suas cadeias laterais (FIGURA I.2.1.1.1).

Aminoácidos com cadeia lateral alifática, não polar: Cada um destes aa possui uma cadeia lateral que não se liga ou doa prótons, ou participa de pontes de hidrogênio ou iônicas. A cadeia lateral comporta-se semelhante a um lipídio promovendo interações hidrofóbicas. Em proteínas encontradas em soluções aquosas, a cadeia lateral destes aa tendem a localizarem-se no interior da estrutura proteica. Tal fenômeno é devido a hidrofobicidade dos grupos-R não polares que reagem como gotas de gordura num ambiente aquoso. Estes grupamentos acomodam-se no interior da estrutura proteica enovelada promovendo-lhe uma forma tridimensional. As interações hidrofóbicas são importantes na estabilização das proteínas. São: *Glicina*, *Alanina*, *Prolina*, *Valina*, *Leucina* e *Isoleucina*. A *Glicina* possui um átomo de hidrogênio como cadeia lateral, permitindo uma grande flexibilidade estrutural quando presente compondo uma proteína. É o aa mais simples e o menos interativo. Já o aa *Prolina*, com sua estrutura cíclica, possui um α -amino nitrogênio incorporado ao seu formando uma estrutura

rígida, contendo um grupo imino. Já a *Alanina* e os aa de cadeia aberta (*Valina*, *Leucina* e *Isoleucina*) possuem cadeias laterais alifáticas e não polares. Estes últimos são extremamente hidrofóbicos.

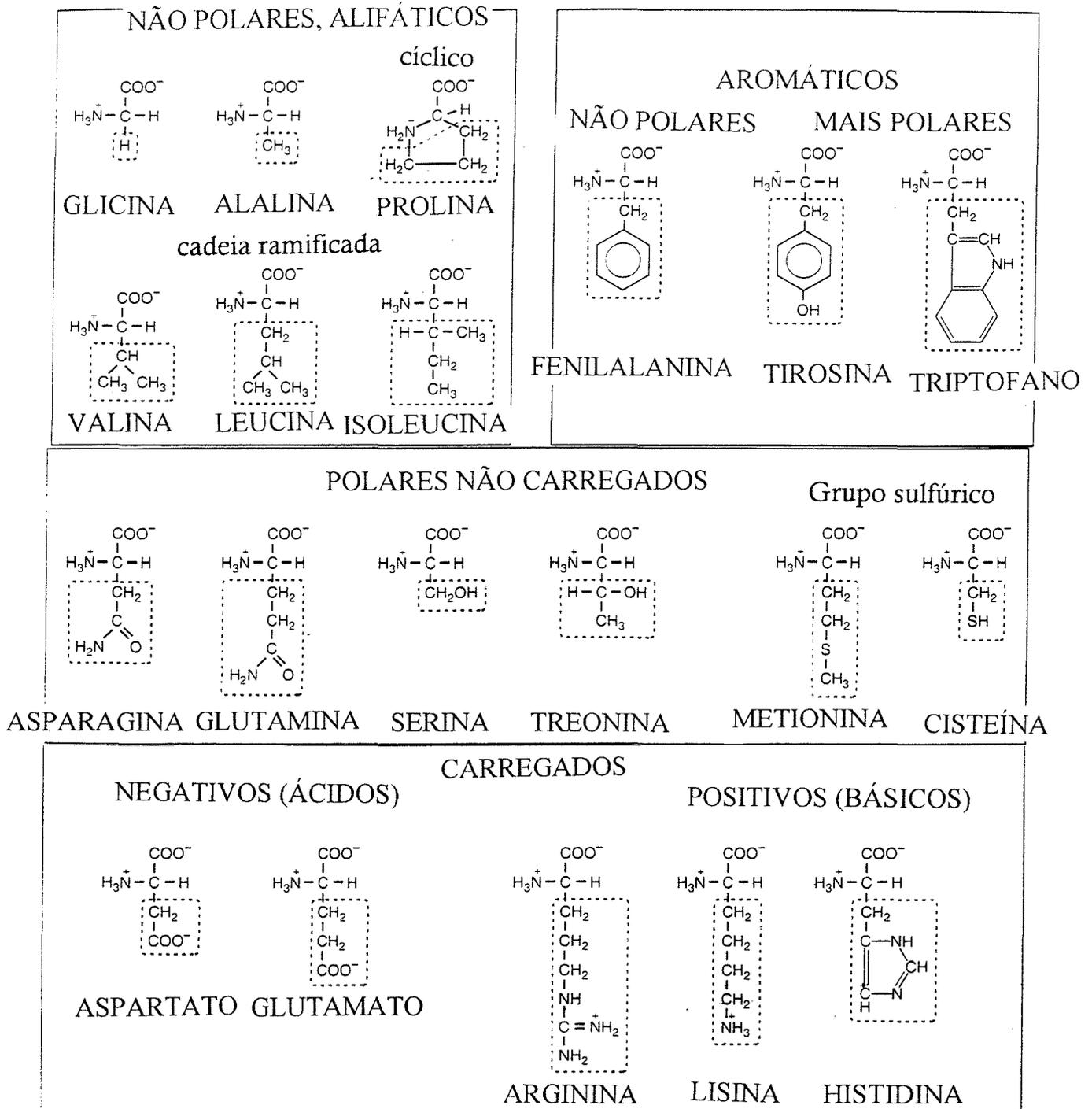


FIGURA I.2.1.1.1: Demonstrativo das fórmulas químicas dos 20 aminoácidos agrupados de acordo com suas cadeias laterais. Adaptado de MARKS & cols, 1996.

Aminoácidos com cadeia lateral aromática: São estruturalmente relacionados com a *Alanina*. Em cada caso um anel aromático é anexado ao carbono 3 (o β -carbono). O aa *Fenilalanina* contém um grupo fenil que é muito hidrofóbico. Os aa *Tirosina* e *Triptofano* são mais polares pois, contém um grupo fenólico e um nitrogênio respectivamente em seus anéis aromáticos.

Aminoácidos com cadeia lateral polar não carregada: Tais aa são hidrofílicos e em solução aquosa são frequentemente encontrados na superfície de proteínas globulares onde interagem com a água. A cadeia lateral da *Serina* e *Treonina* contém um grupo polar hidroxila. A *Asparagina* e a *Glutamina* são amidas dos aa *Aspartato* e *Glutamato*. Os grupos hidroxilas e os grupos amidas permitem a estes aa formarem pontes de hidrogênio com outro aa, com a água ou com outro componente polar que ligam-se às proteínas. Os aa *Cisteína* e *Metionina* são relativamente polares porque contém um átomo sulfúrico. Eles são os mais hidrofóbicos deste grupo. Este grupos sulfidrilas podem interagir com outros grupos sulfidrilas formando pontes bissulfídicas.

Aminoácidos com cadeia lateral carregada: Os *Ácidos Aspártico* e *Glutâmico* contém um grupo carboxila suas cadeias laterais. São os aa ácidos que num pH fisiológico os prótons são dissociados e a cadeia lateral carrega-se negativamente. As formas carregadas negativamente destes aa são denominadas *Aspartato* e *Glutamato*. Entretanto os aa *Arginina*, *Lisina* e *Histidina* contém um nitrogênio, podem ser protonados e carregados positivamente. Em um pH fisiológico as cadeias laterais da *Arginina* e *Histidina* são ionizadas e carregadas positivamente. Em contraste, a *Histidina* é fracamente básica, quando livre encontra-se sem carga porém, quando incorporada em uma proteína sua cadeia lateral pode estar positivamente carregada ou neutra, dependendo do ambiente iônico fornecido pelas cadeias polipeptídicas da proteína.

I.2.2. Metabolismo

I.2.2.1. Síntese

Devido a estrutura única de cada um dos 20 aa seus metabolismos seguem caminhos diferentes. Onze destes são sintetizados no corpo humano, os demais são requeridos na dieta. Dez destes aa não essenciais podem ser produzidos da glicose mais um surto de nitrogênio (FIGURA I.2.2.1.1). Já a *Tirosina* necessita se um aa essencial, a *Fenilalanina*, para sua síntese. Os aa *Alanina*, *Glicina*, *Serina* e *Cisteína* são produzidos da glicólise via componentes do caminho glicolítico. Intermediários do ciclo de Krebs, que são produzidos da glicose providenciam carbono para a síntese dos seis aa essenciais remanescentes.

O esqueleto de carbono dos 10 aa não essenciais derivados da glicose são produzidos de intermediários da glicose e do ciclo do ácido tricarboxílico. O α -ceto glutarato é o precursor para a síntese de *Glutamato*, *Glutamina*, *Prolina* e *Arginina*, já o oxaloacetato para a síntese de *Aspartato* e *Asparagina*.

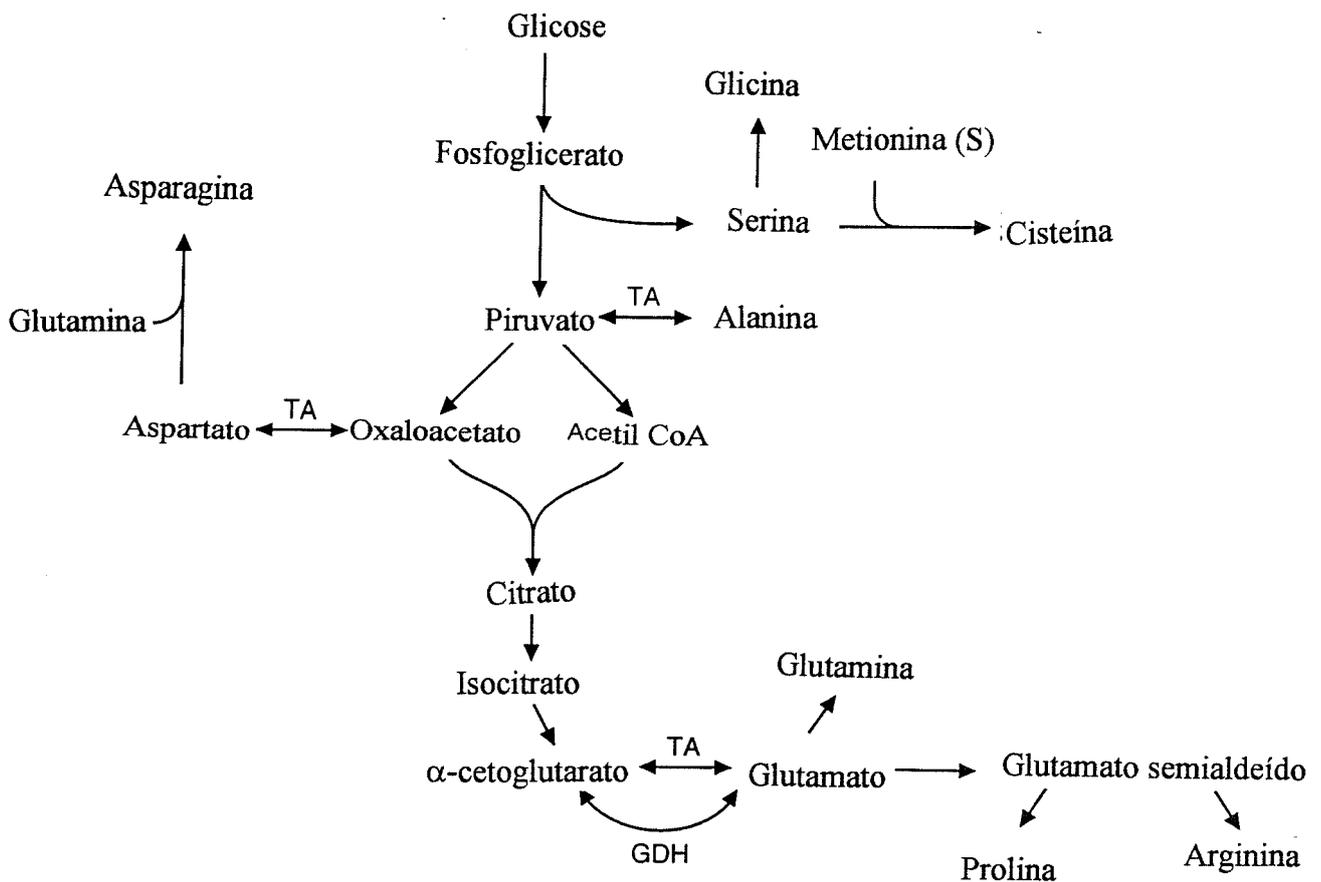


FIGURA I.2.2.1.1: Esquema geral da síntese de aminoácidos não essenciais. TA = reação de transaminação. Adaptado de MARKS & cols,1996.

Na biossíntese da *Serina* a partir da glicose, o 3-fosfoglicerato é primeiro oxidado a um componente 2-ceto que é transaminado para formar fosfoserina, onde uma fosfatase remove o fosfato formando serina.

A *Glicina* é metabolizada por várias rotas. É produzida da *Serina* por uma reação reverssível que envolve tetrahydrofolato. Também pode ser produzida por degradação da *Treonina*. Pode ser oxidada pela D - aminoácido oxidase cujo produto, o glioxalato, é convertido novamente a glicina por transaminação.

Tanto o carbono como o nitrogênio para a síntese da *Cisteína* são doados pela *Serina* e o grupo sulfúrico pela *Metionina*. A serina reage com a homocisteína para formar cistationina, reação catalisada pela cistationina sintase. A clivagem da cistationina pela cistationase produz cisteína e α -cetobutirato que forma succinil CoA via propionil CoA. Este é o maior caminho de degradação para a metionina. A cisteína inibe a cistationina sintase e, portanto, regula a sua própria produção. Havendo suficiente *metionina* a mesma fornece a quantidade necessária de *cisteína*.

A *Alanina* é produzida do piruvato por uma reação de transaminação catalisada pela alanina transaminase. É o maior aa gliconeogênico, sua produção em vários tecidos é devido o requerimento de nitrogênio para o fígado.

Dois grupos de aa são sintetizados de intermediários do ciclo de Krebs:

1. Aa relacionados com o α -cetogluturato :

Os cinco carbonos do *Glutamato* são derivados do α -cetogluturato por transaminação ou por uma reação envolvendo a glutamato desidrogenase. Como o α -cetogluturato pode ser sintetizado da glicose, todos os carbonos do *Glutamato* podem ser obtidos da glicose. A *Arginina*, *Prolina* e *Arginina* são derivadas do *Glutamato*. Uma outra função deste aa é providenciar a molécula glutamil ao glutatião que esta envolvido no transporte de aa em células do fígado e intestino.

A *Glutamina* é produzida do *Glutamato* pela glutamina sintetase que adiciona NH_4 ao grupo carboxila da cadeia lateral formando uma amida.

Na síntese da *Prolina*, o *Glutamato* é primeiro fosforilado e convertido a glutamato 5-semialdeído por redução da cadeia lateral do grupo carboxil a um aldeído. Este semialdeído cicliza-se formando uma base de Schiff interna. A redução deste componente cíclico forma *Prolina*.

A *Arginina* é sintetizada do *Glutamato* via o semialdeído que sofre transaminação para formar ornitina, um intermediário do ciclo da uréia, cujas reações produzem

Arginina. A quantidade de *Arginina* gerada é adequada somente a um adulto, durante o período de crescimento torna-se um aa essencial.

Embora a *Histidina* não possa ser sintetizada em humanos, em quantidades necessárias para um desenvolvimento adequado, cinco dos seus carbonos formam *Glutamato* quando é degradada.

2. Aa relacionados com o oxaloacetato:

O *Aspartato* é produzido por transaminação do oxaloacetato, reação reversível. Já a *Asparagina* é formada do *Aspartato* por uma reação em que a *Glutamina* providencia o N para a formação do grupo amida. Esta reação difere da síntese da *Glutamina* do *Glutamato* no qual o NH_4 providencia o N. Porém, a reação catalisada pela asparaginase, que hidrolisa a *Asparagina* a NH_4 e *Aspartato*, é análoga a reação catalisada pela glutaminase.

I.2.2. Degradação

O catabolismo dos 20 aa encontrados em proteínas envolve a remoção dos grupos α -aminos seguido da quebra do esqueleto de carbono resultante. O catabolismo converge para formar sete produtos: oxaloacetato, α -cetoglutarato, piruvato, fumarato, acetil CoA, acetoacetil CoA e succinil CoA. Estes entram no metabolismo intermediário resultando tanto a síntese de glicose, lipídio ou a produção de energia através da oxidação a CO_2 e H_2O pelo ciclo de Krebs (FIGURA I.2.2.1).

O destino dos carbonos dos aa depende do estado fisiológico do indivíduo e do tecido alvo onde ocorre a degradação. Os aa são degradados e seus carbonos são:

⇒ convertidos a CO_2 ,

⇒ convertidos a compostos que produzem glicose, no fígado - aa glicogênicos, piruvato e intermediários do ciclo de Krebs: α -ceto glutarato, succinil coA, fumarato e oxaloacetato e/ou

⇒ convertidos a corpos cetônicos ou seus precursores, acetoacetato e acetil coA - aa cetogênicos.

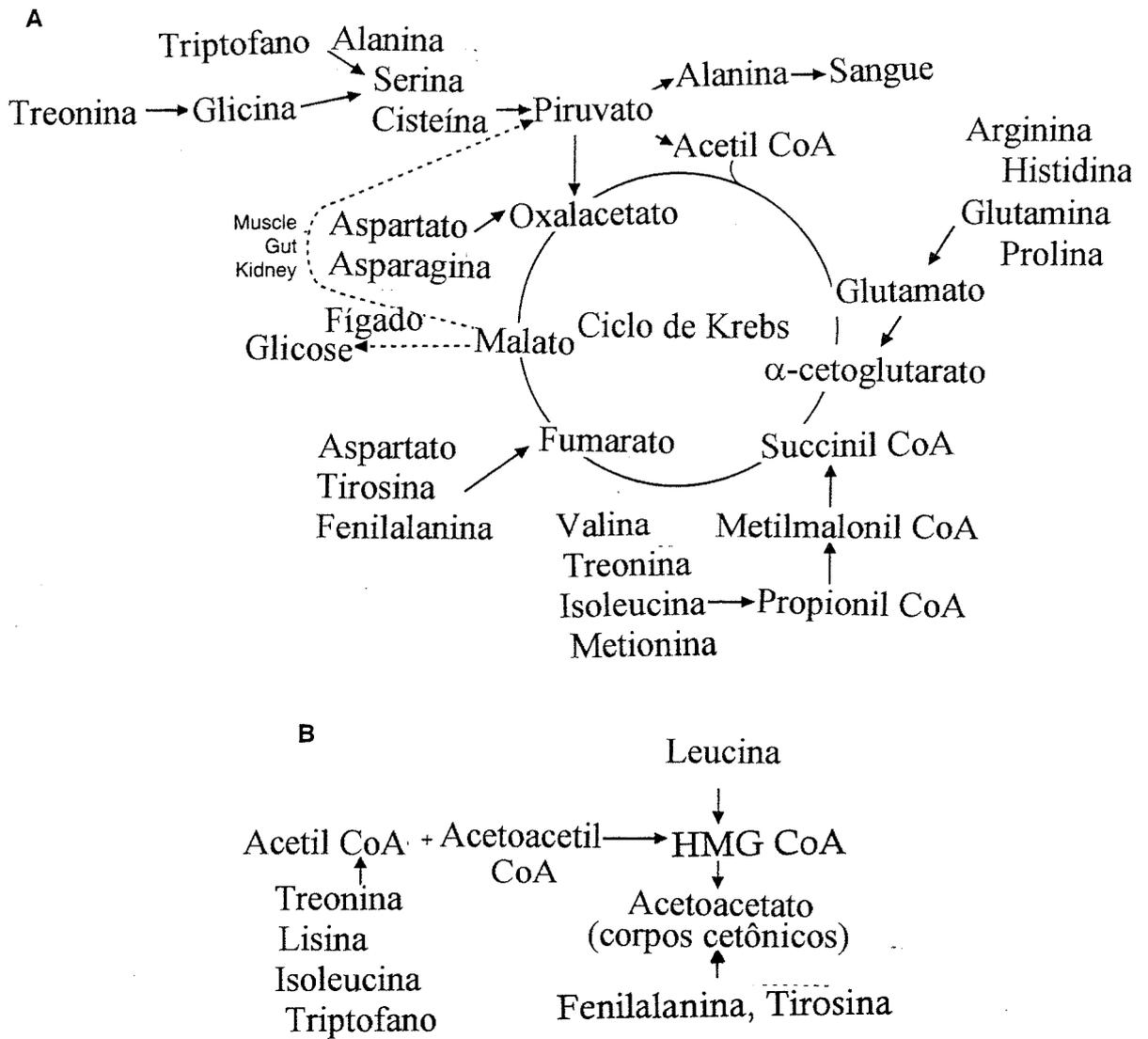


FIGURA I.2.2.1: Esquema da degradação dos aminoácidos. A - aa que produzem piruvato ou intermediários do ciclo de Krebs. B - aa que produzem acetil CoA ou corpos cetônicos. Adaptado de MARKS & cols, 1996.

Alguns aa contém carbonos que produzem glicose e outros carbonos que produzem acetil coA e acetoacetato sendo portanto, glicogênicos e cetogênicos. Os que produzem piruvato são considerados glicogênicos pois o fígado converte piruvato a glicose durante o jejum no momento em que a piruvato desidrogenase esta inativa e não há produção de acetil CoA e, conseqüentemente corpos cetônicos. Aa que foram sintetizados de intermediários da glicose produzem piruvato quando degradados e os sintetizados por intermediários do ciclo de Krebs são reconvertidos a estes durante a degradação (TABELA I.2.2.1).

GLICOGÊNICOS	GLICOGÊNICOS E CETOGÊNICOS	CETOGÊNICOS
--------------	----------------------------	-------------

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

TABELA I.2.2.1: Classificação geral dos aa como glicogênicos, cetogênicos ou glicogênicos, ou cetogênicos. Destaque em vermelho para os aa essenciais. Adaptada de CHAMPE et cols, 1987.

Alguns aa essenciais contêm carbonos que são convertidos a piruvato ou a intermediários do ciclo de Krebs. O *Triptofano* produz *Alanina* que é convertida a piruvato. A *Metionina*, *Treonina*, *Valina* e *Isoleucina* formam succinil coA e, a *Fenilalanina* forma fumarato após a conversão da *Tirosina*. Como o piruvato e os intermediários do ciclo de Krebs produzem glicose no fígado, tais aa são glicogênicos. Outros aa essenciais como o *Triptofano*, *Isoleucina* e *Treonina* produzem acetil coA, e a *Fenilalanina* produz acetoacetato – são glicogênicos e cetogênicos. A *Lisina* e a *Leucina* são exclusivamente cetogênicos.

Como já foi citado anteriormente a *Serina*, *Glicina*, *Cisteína* e *Alanina* são derivadas de intermediários da glicólise. Em muitos mamíferos a *Serina* é degradada pela serina desidratase e produz NH_4^+ e piruvato. Já em humanos, seu caminho preferencial de degradação é transaminação a hidroxipiruvato seguida por redução e fosforilação para formar 2-fosfoglicerato \rightarrow fosfoenol piruvato e então piruvato. A *Glicina* é metabolizada por várias rotas (FIGURA I.2.2.2). A principal via de metabolização deste aa no cérebro, fígado, rins e placenta é o Sistema de Clivagem da Glicina (SCG) (HIGARA et al, 1981; EWART et al, 1992). Esta via oxidativa envolve sua clivagem a CO_2 , NH_3 e um grupo metileno ($-\text{CH}_2^-$) que liga-se ao tetrahidrofolato formando N^5 , N^{10} – metileno tetrahidrofolato. A *Glicina* é oxidada pela D – aminoácido oxidase produzindo glioxalato que pode ser convertida novamente por transaminação e/ou, é oxidada a oxalato ou a CO_2 e H_2O . Pode ser convertida à *serina* numa reação catalisada pela serina hidroximetil transferase, seguida pela reação catalisada pela serina-desidratase que tem como produto o piruvato. Este por descarboxilação oxidativa forma acetil CoA que poderá ser oxidado através do ciclo de Krebs. Pesquisas revelaram que a maior taxa de utilização deste aa em hipocampus de ratos durante o período de crescimento cerebral, foi a 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 et cols, 1996).

A síntese de lipídios 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 $\text{NADPH}^+ + \text{H}^+$). O piruvato então é transportado à mitocondria 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 a externa, que é permeável, e vai ao citosol onde é clivado a oxaloacetato e acetil CoA. Este acetil CoA vai ser usado para síntese lipídica.

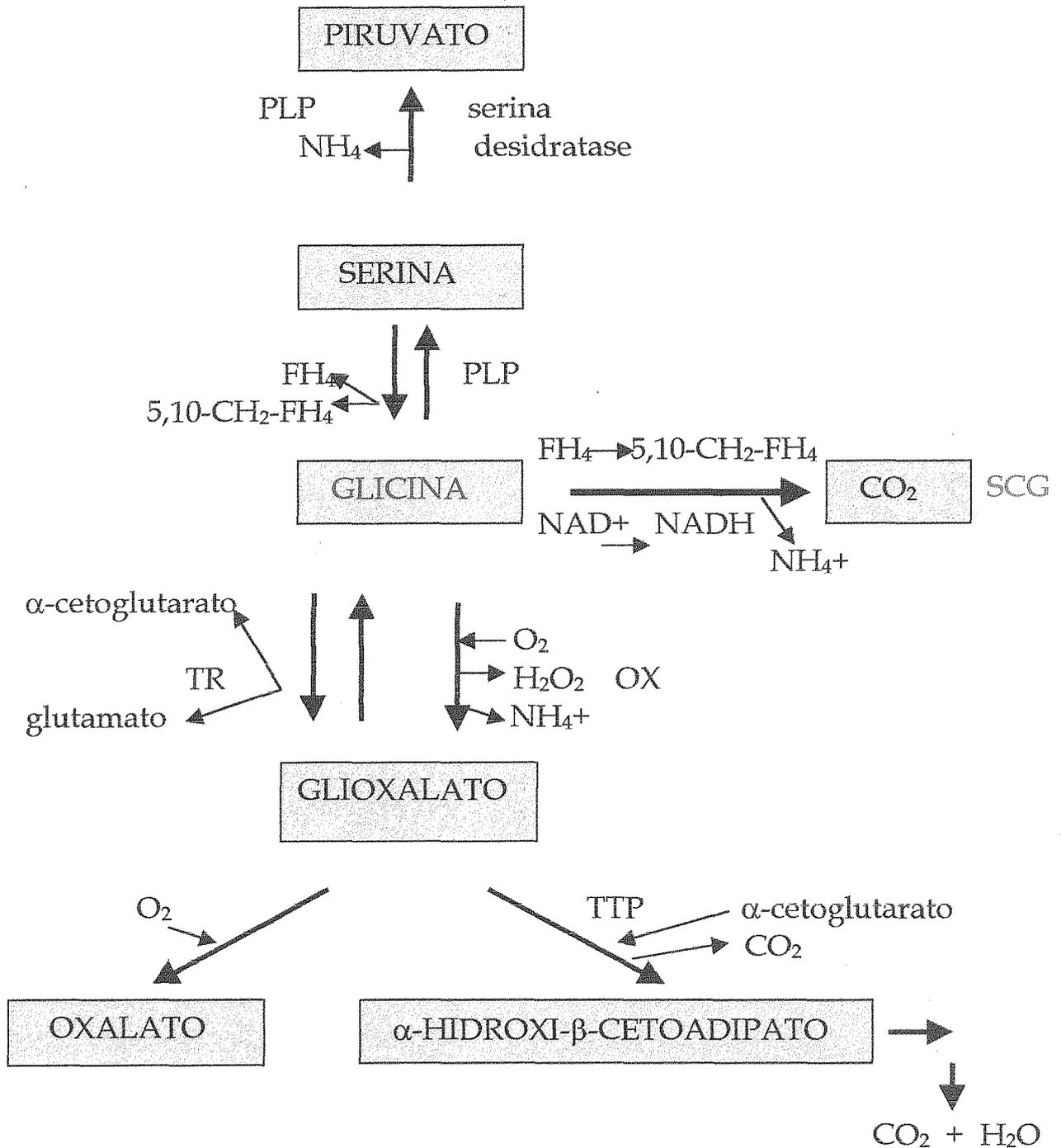


FIGURA I.2.2.2: Catabolismo da glicina. SCG = Sistema de clivagem da glicina, TR = transaminase, OX = D - aminoácido oxidase, FH_4 = tetraidrofolato, PLP = piridoxal P.

Quando a *Cisteína* é degradada o N é convertido a uréia, os C a piruvato e o grupo sulfúrico a sulfato que é excretado na urina.

A *Alanina* é o principal aa gliconeogênico pois sua produção em muitos tecidos é para transporte de N para o fígado. Para ser utilizada na via lipogênica deve ser transaminada a piruvato que através da piruvato desidrogenase é convertido a acetil CoA. O piruvato pode entrar no ciclo de Krebs para a produção de CO₂ e H₂O, metabolizada neste caso como um componente energético (FIGURA I.2.2.3).

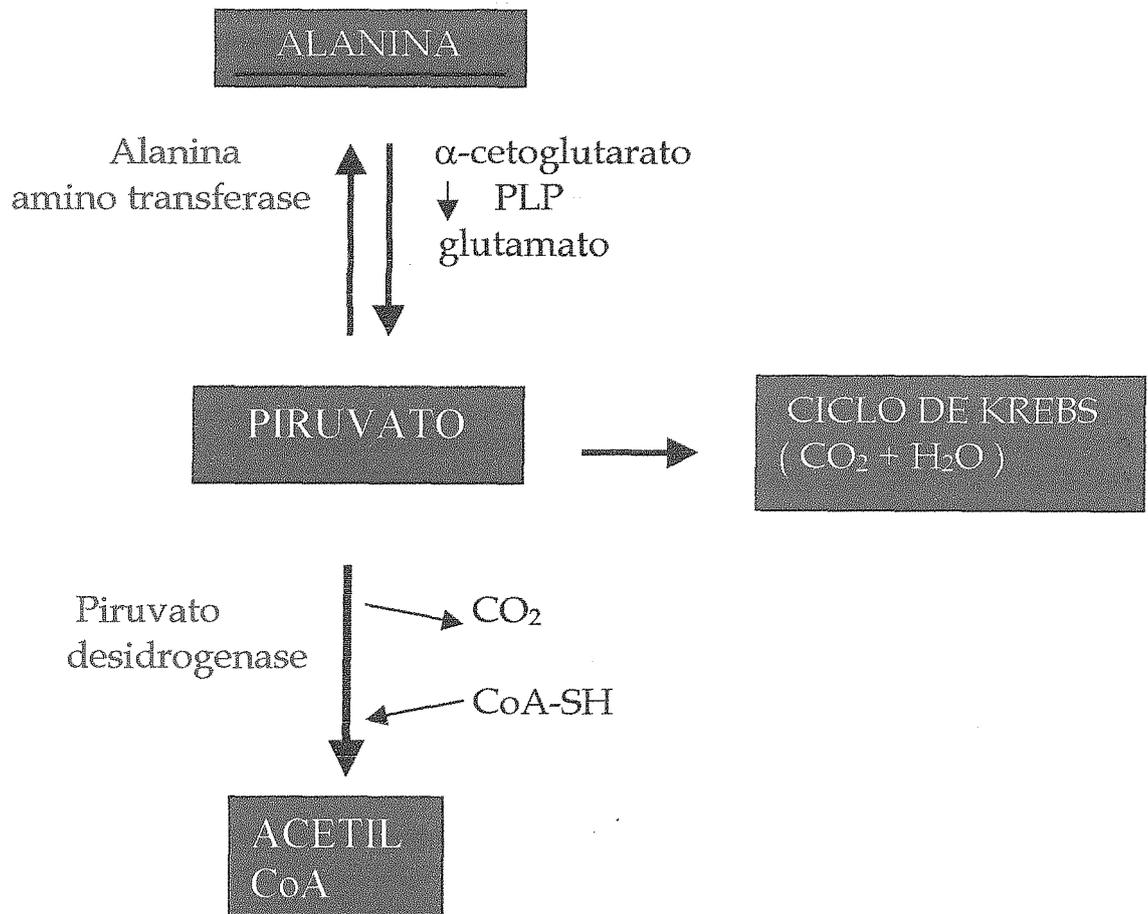


FIGURA I.2.2.3: Figura ilustrativa do catabolismo da alanina. PLP=piridoxal fosfato

Quanto aos aa relacionados com o ciclo de Krebs, sabe-se que o *Glutamato*, a *Glutamina*, *Prolina* e *Arginina* estão relacionadas com o α - cetoglutarato. O *Glutamato* quando degradado é convertido novamente a α - cetoglutarato tanto por transaminação como pela glutamato desidrogenase. No fígado o α - cetoglutarato forma malato que via gliconeogênese produz glicose. Portanto o *Glutamato* é derivado da glicose e reconvertido a glicose.

A *Glutamina* é reconvertida a *Glutamato* pela glutaminase, particularmente importante no rim. GROOTEGOED & cols,1986, analisaram o metabolismo da glutamina em células de Sertoli. L-[U-¹⁴C]Glutamina foi convertida a ¹⁴CO₂ a uma taxa considerável durante incubação em células de Sertoli. Esta taxa foi estimulada pelo dbcAMP.

A *Prolina* é convertida novamente a *Glutamato* semialdeído que é reduzido para formar *Glutamato*.

Em uma série de vários passos a *Histidina* é convertida a forminoglutamato no qual um de seus C é transferido ao pool tetrahydrofolato e libera NH₄⁺ e *Glutamato*.

O *Aspartato* e a *Asparagina* estão relacionados com o oxaloacetato. Embora a maior rota para o *Aspartato* disponível envolva a conversão a oxaloacetato, alguns C podem formar fumarato. O argininosuccinato, formado no ciclo da uréia de uma reação do *Aspartato* com a citrulina, é clivado formando *Arginina* e fumarato. No ciclo purina nucleotídeo o *Aspartato* reage com a inosina monofosfato para formar um intermediário que é clivado formando AMPc e fumarato.

A *Tirosina*, produzida da *Fenilalanina* ou obtida da dieta, é oxidada e forma por último acetoacetato e fumarato. Por formar *Malato*, o fumarato suplementa C para gliconeogênese.

Os aa que são degradados para formar succinil CoA não podem ser sintetizados em humanos. As reações que convertem propionil CoA a succinil CoA são comuns nos caminhos degradativos da *Metionina*, *Valina*, *Isoleucina* e *Treonina*. O propionil CoA é carboxilado numa reação que requer biotina e forma metil-malonil CoA. Com a participação de uma vitamina B₁₂ ocorre a produção de succinil CoA. As três primeiras reações do catabolismo da *valina* são semelhantes as dos outros dois aa de cadeia ramificada. Ocorre uma reação de transaminação gerando através de uma α -aminoácido aminotransferase um α -ceto ácido correspondente, no caso o ácido α -cetoisovalérico. Este sofre uma descarboxilação oxidativa gerando isobutiril CoA que é desidrogenado resultando no metacrilil CoA (FIGURA 1.2.2.4a). O metacrilil CoA inicia uma série de reações que são específicas do catabolismo da *valina*. É hidratado gerando β -hidroxiisobutiril-CoA que é desacilado a β -hidroxiisobutirato. Este é oxidado a metilmalonato semialdeído cujos destinos possíveis incluem transaminação

e conversão a succinil CoA. A transaminação forma α -aminoisobutirato, um aa 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.2.2.4 a/b).

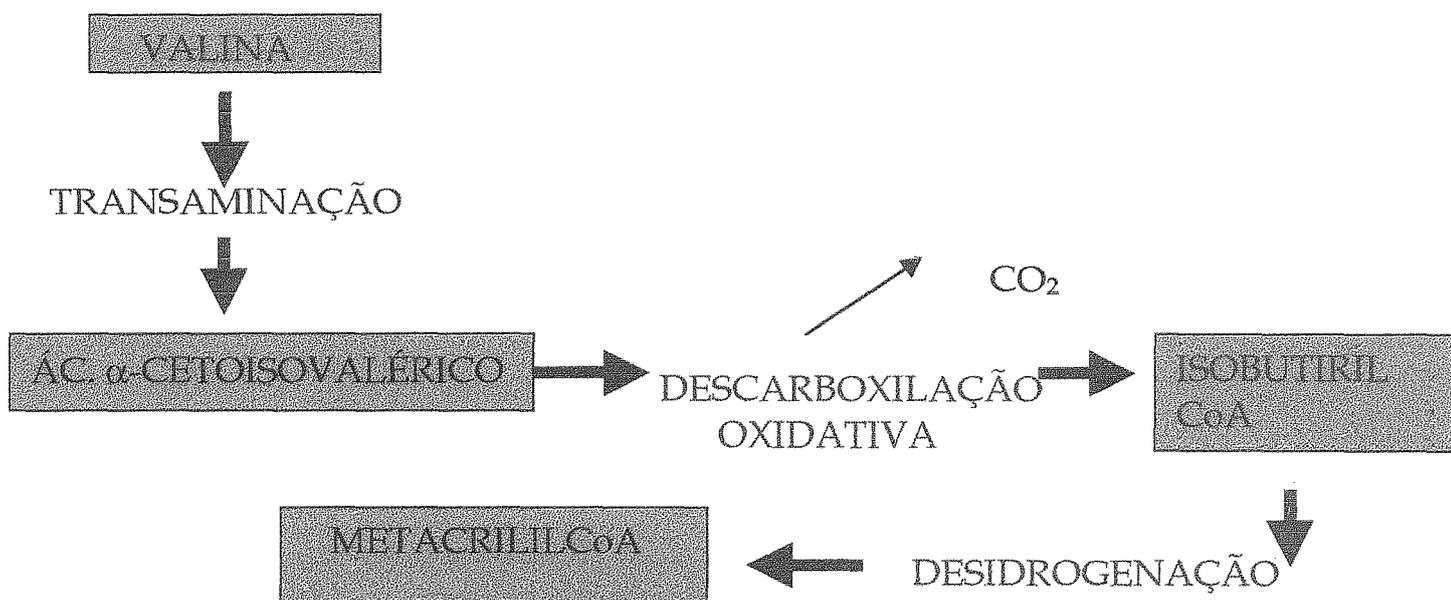


FIGURA I.2.2.4a: Primeiras três reações do catabolismo da valina.

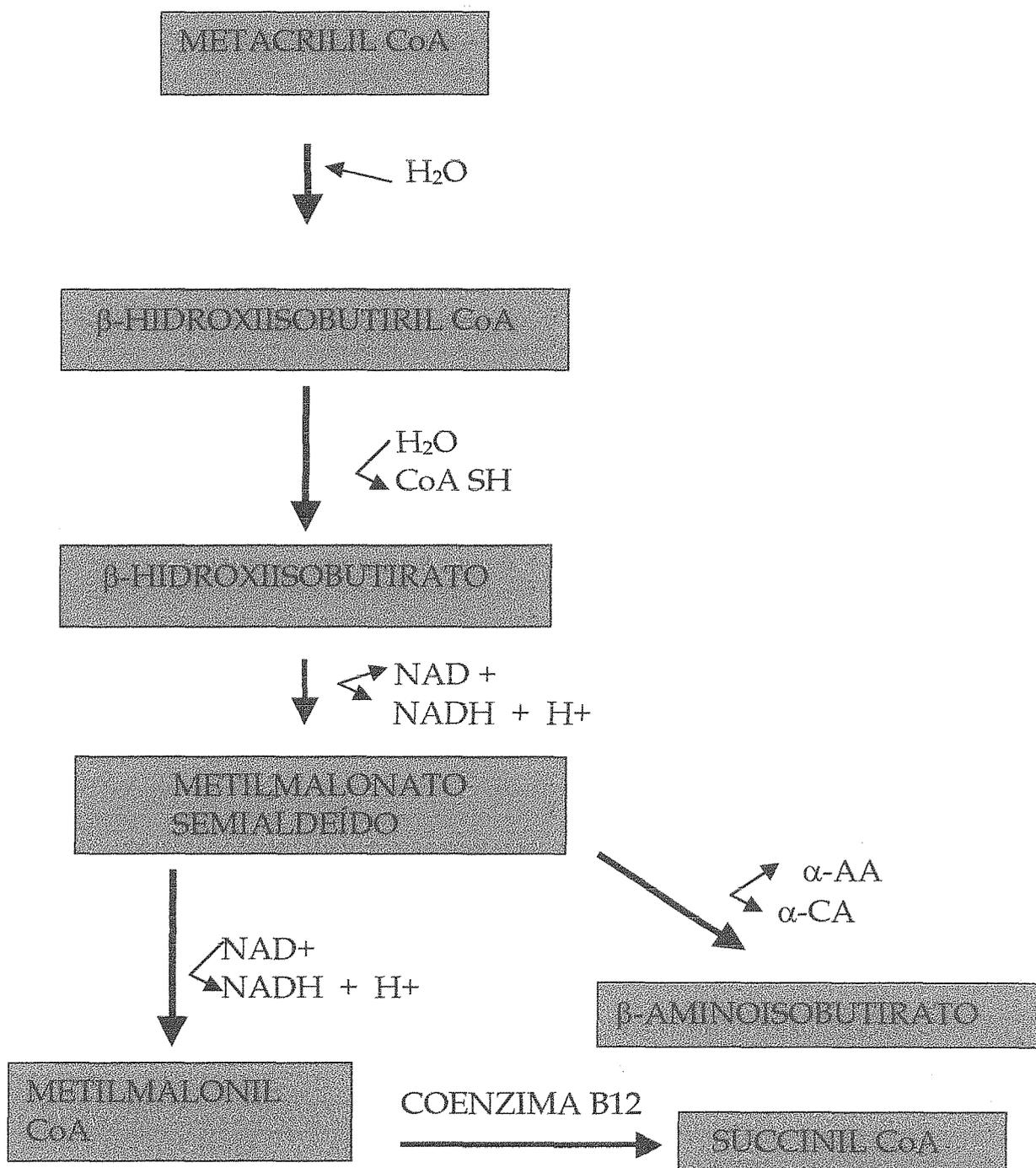


FIGURA I.2.2.4b: Subsequente catabolismo do metacrilil CoA formado da L-valina. $\alpha-AA$ = α -aminoácido e $\alpha-CA$ = α -cetoácido.

A *Metionina* é convertida a S-adenosil metionina que doa seu grupo metila a outros componentes por uma sequência de reações que produzem homocisteína. Este aa pode ser regenerado por uma reação que requer tetrahidrofolato e vitamina B₁₂. Os carbonos da homocisteína são convertidos a succinil CoA.

Já a *Treonina* é degradada por dois caminhos. É convertida a acetil CoA e glicina ou clivada por uma desidratase a amônia e α - cetoglutarato, que é descarboxilada para formar propionil CoA.

Sete aa produzem acetil CoA e/ou acetoacetato e portanto são categorizados como cetogênicos. A *Isoleucina*, *Treonina* e os aa aromáticos *Fenilalanina*, *Tirosina* e *Triptofano* são convertidos em compostos que produzem tanto glicose e acetil CoA ou acetoacetato. A *Fenilalanina* é convertida a *Tirosina* que suporta degradação oxidativa. O último passo produz fumarato e acetoacetato. O *Triptofano* é oxidado para produzir *Alanina* (dos C fora do anel), formato e acetil CoA. É portanto, glicogênico e cetogênico. O NAD e NADP podem ser produzidos da estrutura anelar do *Triptofano*.

Em um dos passos degradativos da *Treonina* são produzidos *Glicina* e acetil CoA no fígado que pode ser utilizada para síntese de corpos cetônicos ou oxidada a CO₂. A *Isoleucina* pode produzir glicose e corpos cetônicos no fígado.

A *Lisina* contém dois amino grupos que não podem suportar transaminação direta. É degradada por um caminho complexo cujos intermediários são saccharopina, α -ceto adipato e crotonil CoA.

O catabolismo da *Leucina* envolve a formação de 4-metil-2-oxopentanoato através de uma reação de transaminação. Este é degradado por reações semelhantes com as que ocorrem no ciclo de Krebs e oxidação de ácidos graxos, é oxidativamente descarboxilado a *isovaleril CoA* por um complexo α -ceto desidrogenase de cadeia ramificada. Este 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* (STRYER,1995) (FIGURA I.2.2.5).

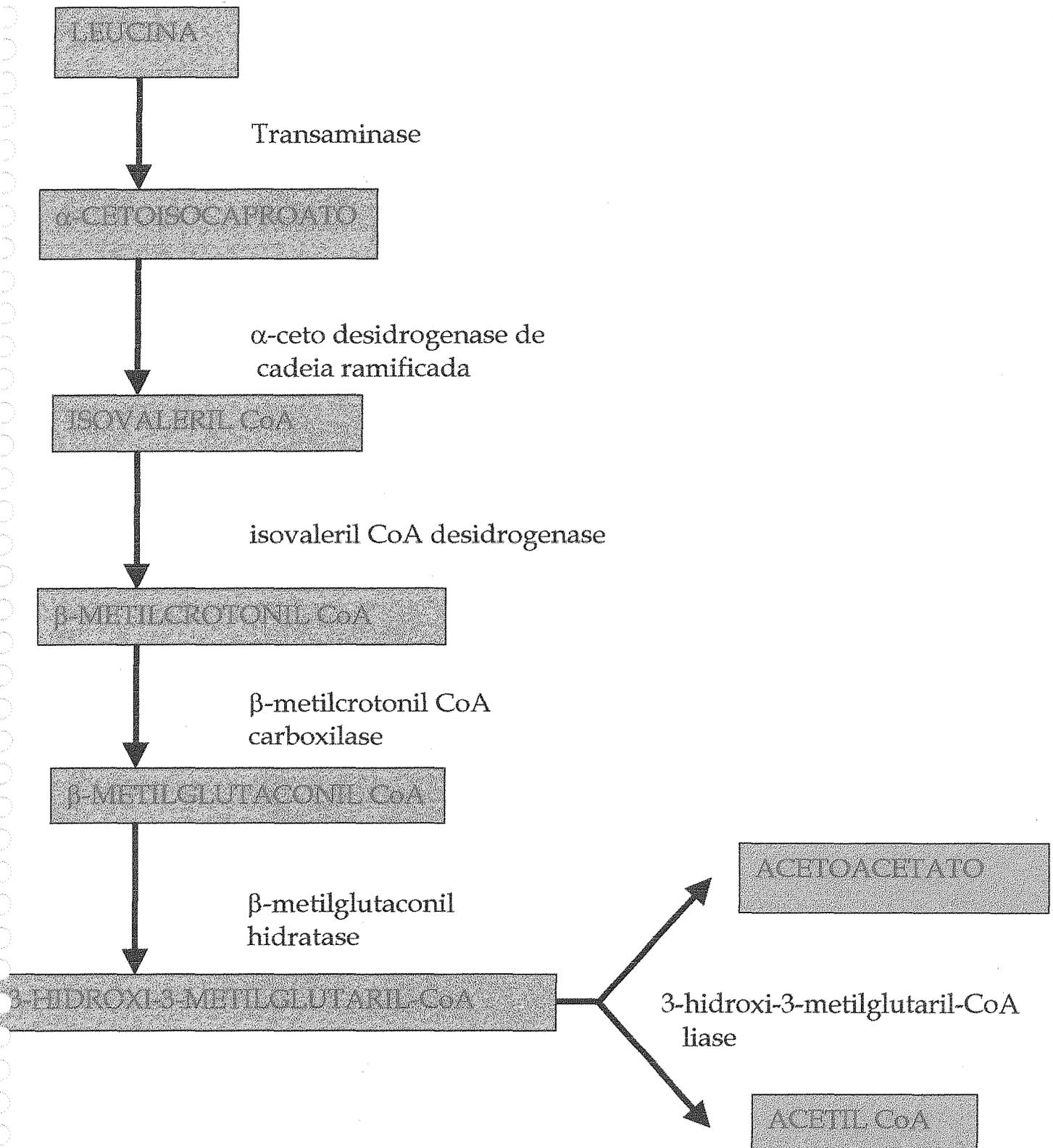


FIGURA I.2.2.5: Catabolismo da leucina.

Estudos em células de Sertoli revelaram que o ^{14}C da L-[1- ^{14}C]leucina é incorporado em $^{14}\text{CO}_2$ quando o 4-metil-2-oxopentanoato é convertido por descarboxilação oxidativa a isovaleril-CoA. Este é então convertido a acetoacetato e acetil CoA seguido por completa oxidação via ciclo de Krebs (GROOTEGOED et cols,1986). Sabe-se que no epitélio seminífero de ratos, a aminotransferase, que catalisa a conversão de aa como *Valina, Leucina e Isoleucina*, está presente em células de Sertoli. Estas convertem *Leucina*, via transaminação a 4-metil-2-oxovalerato, e os espermatócitos e as espermátides reduzem o 4-metil-2-oxovalerato a 2-hidroxi-4-metilvalerato, que é então liberado pelas células espermatogênicas (GROOTEGOED, JUTTE, JANSEN & VAN DER MOLEN, 1983). Outro estudo, não menos importante analisa a célula de Sertoli como alvo da ação do hormônio da tireóide e sua influência no metabolismo protéico. As culturas de célula foram incubadas com meio contendo [^3H] leucina. Os resultados demonstraram que o T3 (tri-iodotironina) pode diretamente estimular o processo de síntese protéica, sem afetar significativamente o processo de degradação (PALMERO & cols, 1996).

Como pode ser visto vários estudos têm sido realizados com o objetivo de esclarecer o metabolismo energético em células de Sertoli e este pode envolver um número de diferentes substratos e caminhos. A participação dos aminoácidos pode render muito da energia requerida pelas células, em conjunto com a glicose e os ácidos graxos.

I.3. Objetivos

Considerando que os aminoácidos além de sua incorporação a proteínas podem ser usados como combustíveis metabólicos e que estudos, como o de GROOTEGOED et cols, 1986, mostram o envolvimento de substratos e de diferentes caminhos na obtenção de energia em células de Sertoli, decidimos:

- Estudar comparativamente o metabolismo de dois aa de cadeia ramificada: um cetogênico, a leucina e, um glicogênico, a valina; um glicogênico muito utilizado pelo SNC, a glicina e um aa essencialmente glicogênico, a alanina, em células de Sertoli *in vitro*, medindo a sua utilização como precursores na síntese protéica e lipídica, e na oxidação a CO₂;
- Identificar os produtos lipossolúveis formados com cada aminoácido.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

II.1. Materiais

Listagem dos materiais utilizados:

Tripsina 1:250 (Difco)
Inibidor de tripsina tipo I-S (Soybean) (Sigma)
Colagenase tipo I (Sigma)
Hialuronidase tipo 1-S (Sigma)
DNase tipo I (Sigma)
Soro Albumina bovina (Sigma)
Soro fetal bovino SFB (Cultilab)
Fungizone (Laborclin)
Garamicina (Schering-Plough)
Solução salina tamponada de Hank - HBSS (Sigma)
Meio de cultura 199 com L-glutamina e Sais de Earle (Sigma)
Solução salina tamponada sem cálcio e magnésio (CMF-PBS)
EDTA tritriplex III (Merk)
Padrões de fosfolipídios (Sigma)
Padrões de lipídios neutros (Sigma)
Placas de sílica gel para cromatografia em camada delgada (Merk)
Filmes para autoradiografia Hyperfilm - ³H (Amersham)
Glicina (Sigma)
L-Alanina (Sigma)
L-Valina (Sigma)
L-Leucina (Sigma)
Solução tampão Krebs Ringer-bicarbonato (pH=7,4)
L-[U-¹⁴C] Leucina. Atividade específica: 11.7 GBq/mmol, 315 mCi/mmol (Amersham)
[1-¹⁴C] Glicina. Atividade específica: 2.11 GBq/mmol, 57.0 mCi/mmol (Amersham)
L-[U-¹⁴C] Alanina. Atividade específica: 5.81GBq/mmol, 157 mCi/mmol (Amersham)
L-[U-¹⁴C] Valina. Atividade específica: 9.8 GBq/mmol, 266 mCi/mmol (Amersham)
Ácido Tricloro Acético (Merk)
Hidróxido de Hiamina
EDTA, Tritriplex III (Merk)
Todos os demais reagentes e solventes foram de pureza "pró-análise" (PA).

O material utilizado nas culturas de células de Sertoli (pipetas, vidrarias em geral, material cirúrgico, filtros,...) foi lavado cuidadosamente com Extran alcalino (Merk), enxaguado exaustivamente com água da torneira e deixados em imersão na água destilada. O material passa por sete trocas de água destilada para perfeita remoção do detergente.

Toda vidraria e o material cirúrgico foram esterilizados por autoclavagem a 120 °C e 1 atm/40 min. Posteriormente eram mantidos em estufa seca a 120 °C até o momento de serem utilizados. Os filtros com membranas de 0,2 µm foram autoclavados por 20 min a 120 °C a 1 atm.

Todas as soluções salinas, enzimas e meios de cultura utilizados nas culturas foram esterilizados por filtração através de filtros com membranas de 0,2 µm. A esterilidade de todas as soluções foi testada por semeadura em caldo de carne para cultura bacteriana pelo menos 24h antes de serem utilizados.

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.

II.1.2. Animais Experimentais

As células de Sertoli foram isoladas de testículos de ratos Wistars de 16-18 dias de idade, provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

II.1.3. Soluções Utilizadas

1) Solução Salina Tamponada de Hank (HBSS)

Utilizada no preparo da colagenase, inibidor de tripsina e para lavagem das células durante as culturas (TABELA II.1.3.1)

NaCl	136.86 mM
KCl	5.36 mM
Na ₂ PO ₄	0.34 mM
KH ₂ PO ₄	0.44 mM
Glicose	5.55 mM

pH=7.4

2) Solução Salina Fosfato Tamponada Sem Cálcio e Magnésio (CMF - PBS)

Utilizada no preparo da solução de tripsina e na lavagem das culturas antes das incubações (TABELA II.1.3.2)

NaCl	136.90 mM
KCl	5.36 mM
Na ₂ HPO ₄	0.28 mM
KH ₂ PO ₄	1.10 mM
Na ₂ SO ₄	0.70 mM
Glicose	6.10 mM

pH= 7.4

3) Solução tampão Krebs-Ringer bicarbonato / glicose 5mM (pH=7,4)

Utilizada para ressuspender a solução celular para posterior incubação.(TABELA II.1.3.3)

NaCl	118,0 mM
KCl	4,6 mM
KH ₂ PO ₄	1,19mM
MgSO ₄	1,11mM
CaCl ₂	2,5 mM
NaHCO ₃	25,0 mM
Glicose	5,0 mM

pH=7,4

II.2. Métodos

II.2.1. Isolamento de Células de Sertoli

As células de Sertoli foram isoladas de testículos de ratos Wistar de 16 - 18 dias de idade, de acordo com o método descrito por DORRINGTON & FRITZ (1975) modificado

posteriormente por TUNG & FRITZ (1984), com o objetivo de obter-se culturas de células de Sertoli com alto grau de pureza (FIGURA II.2.1.1)

Os animais foram mortos por asfixia com éter, os testículos retirados em condições estéreis (capela de fluxo laminar), dissecados da túnica albugínea e fragmentados com bisturi.

Os tratamentos enzimáticos foram acompanhados de agitação e, durante as trocas de soluções, de sucessivas aspirações com pipetas Pasteur para ajudar na liberação das células. A preparação resultante foi lavada 2 vezes com HBSS e centrifugada a baixa rotação (10 min/40g) para remover as demais células peritubulares.

Ao término deste processo, as células de Sertoli foram ressuspensas em um volume conhecido de meio de cultura. Uma alíquota deste homogeneizado foi retirada para contagem em hemocitômetro pelo método da exclusão, usando Azul de Tripan, para determinar a quantidade de células viáveis. 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. Esta característica pode explicar a variabilidade encontrada nos resultados obtidos porém, não interfere na reprodutividade das diferenças experimentais detectadas.

II.2.2.Cultura de Células de Sertoli

Após o isolamento, as células de Sertoli de ratos Wistars entre 16-18 dias de idade, foram semeadas na densidade de 3×10^5 células/cm² e cultivadas por 24h em meio 199 suplementado com 1% de Soro Fetal Bovino (SFB). Após este período, as células foram lavadas com HBSS e cultivadas em meio 199 sem SFB mantidas à 34°C em atmosfera normal (5% de CO₂, 95% de ar).

As culturas foram observadas diariamente em microscópio invertido binocular Nikon (ELWD 0.3) com contraste de fase (FIGURA II.2.2.1)

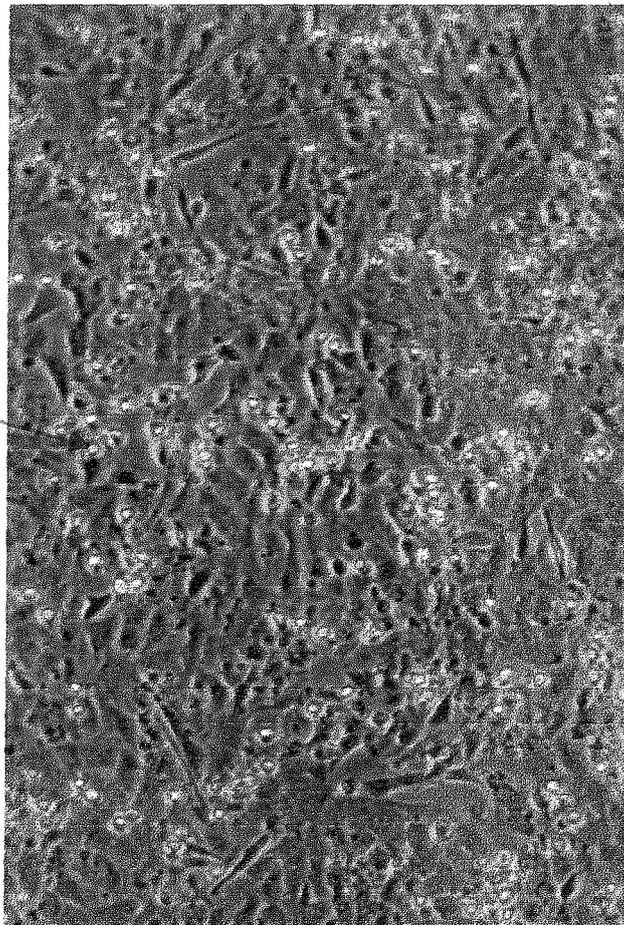
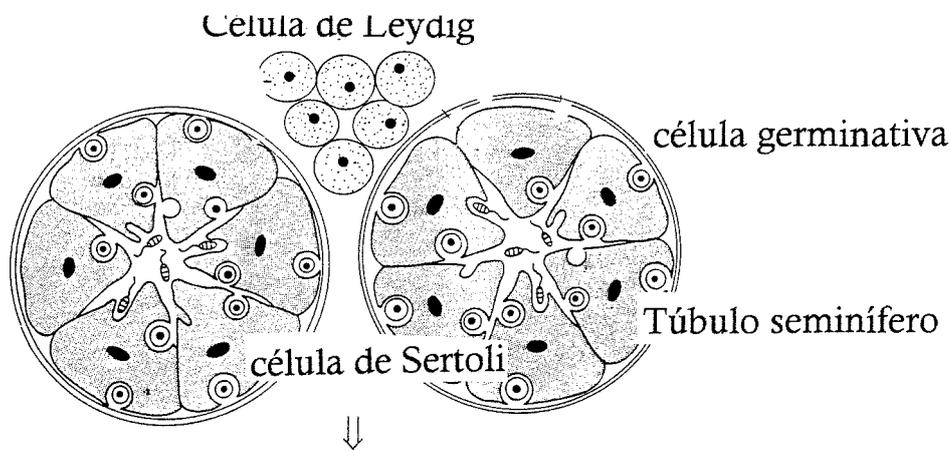


FIGURA II.2.2.1: Células de Sertoli em cultura (seta). Aumento de 200X.



Tripsina 0,25% - DNase 10µg/ml - 30 min / 34°C

Centrifugação 5 min / 750g

Inibidor de Tripsina 300 µg/ml

Centrifugação 5 min/750g

Colagenase 1 mg/ml - Hialuronidase 1 mg/ml - 30 min/ 34°C

Centrifugação 10 min / 40g

Lavagem com HBSS / Centrifugação 10 min / 40g

Hialuronidase 1 mg/ml - 30 min/34°C

Duas lavagens com HBSS - Centrifugação 10 min/40 g

Semeadura em substrato plástico

FIGURA II.2.1.1: Representação esquemática de isolamento e cultivo das células de Sertoli sobre plástico.

II.2.3. Coleta das Células de Sertoli Cultivadas

Após 24 h com meio 199/1% SFB, eram mantidas em meio 199 sem SFB por mais 48h, sendo o meio renovado e as células lavadas a cada 24h. Ao término das incubações as células foram coletadas por tratamento das culturas com Tripsina 0.1% / EDTA 0.05% em CMF-PBS durante 1 min. A reação foi interrompida por adição de igual volume de meio 199 5% SFB.

II.2.4. Experimentos Realizados com Células de Sertoli cultivadas

As células tripsinizadas, como indicado, foram coletadas em um tubo cônico plástico, centrifugadas por 10 min/750g, ressuspendidas em solução tampão Krebs Ringer bicarbonato (pH=7,4) com 5 mM de glicose. As células foram então contadas e observadas em microscópio invertido binocular Nikon (ELWD 0.3) para comprovação da integridade celular. Uma alíquota da suspensão celular foi utilizada de acordo com LOWRY et al, 1951, para determinação de proteína usando soro albumina bovina como padrão.

II.2.4.1 Condições de Incubação com Precursores Radioativos

As células de Sertoli, aproximadamente 2,0 mg de proteína / 6×10^6 células, foram incubadas em frascos de penicilina com as concentrações de aminoácidos indicados em cada figura. O conteúdo dos frascos foi gaseificado com carbogênio (95% de oxigênio 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 dobrados em forma de "V", e então 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 II.2.4.1.1).

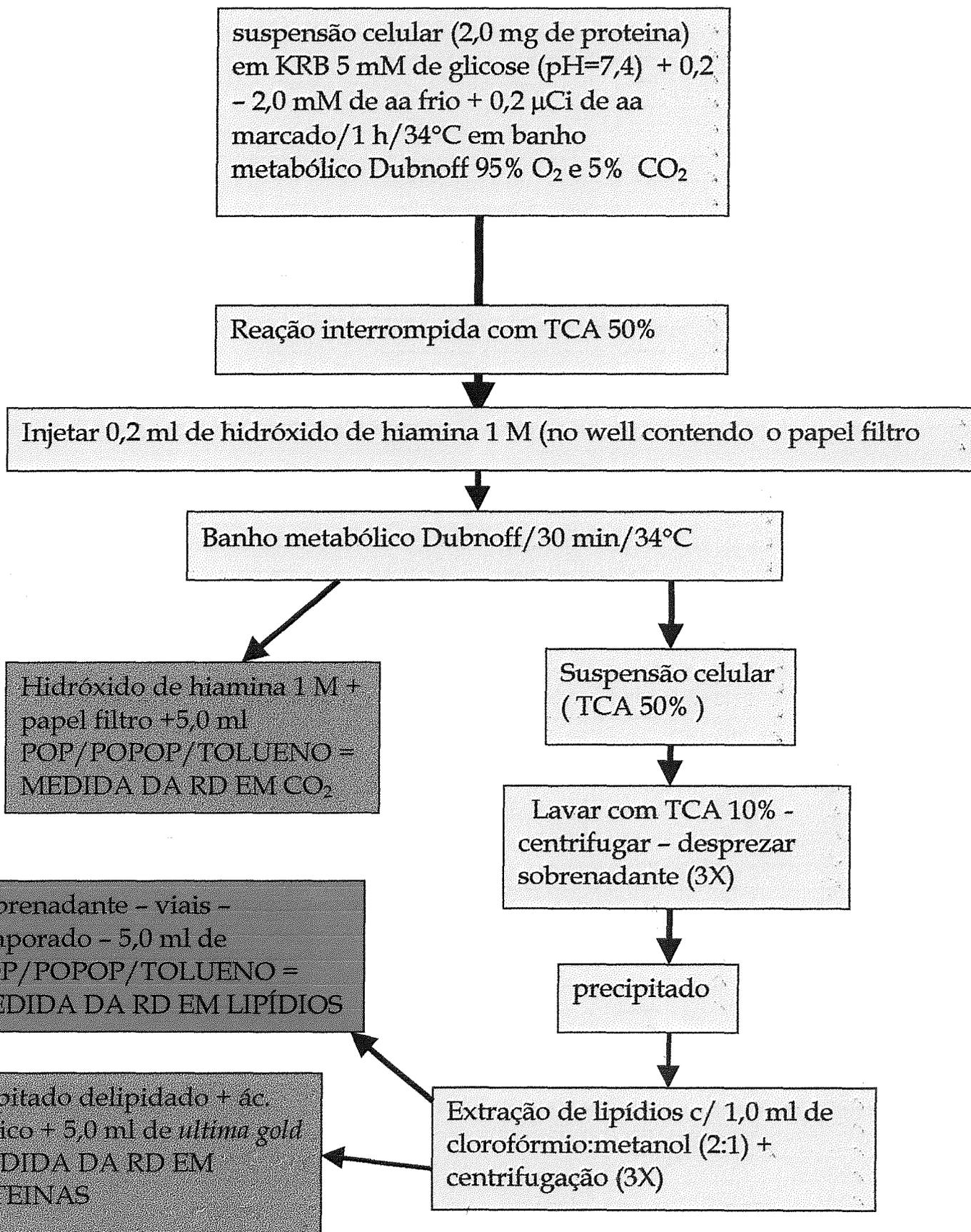


FIGURA II.2.4.1.1: Esquema representativo das condições de incubação, avaliação da oxidação a CO₂, determinação de lipídios e medida da incorporação a proteínas.

II.2.4.1.1: Medida da oxidação dos aminoácidos a CO₂.

Após o tempo de incubação, a reação foi interrompida pela adição, por meio de uma seringa de insulina, de 0,2 ml de tricloroacético (TCA) 50% através de tampas de borracha. Então 0,2 ml de hidróxido de hiamina 1M, foi injetado centralmente nos *wells* 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. O conteúdo dos poços de vidro (hidróxido de hiamina + papel-filtro) foi transferido para *viails* com auxílio de uma pinça. Cerca de 5,0 ml de líquido de cintilação POP/POPOP/TOLUENO (4,0 g de POP, 50,0 mg de POPOP e 1000 ml de tolueno) foram adicionados para contagem da radioatividade medida em contador de cintilação líquida WALLAC 1409 (FIGURA II.2.4.1.1).

II.2.4.1.2: Determinação dos lipídios a partir dos aminoácidos

O conteúdo de cada frasco foi cuidadosamente extravazada a tubos de centrifuga, centrifugados (2000 rpm/10 min) e o pellet foi lavado com TCA 10% , sendo o sobrenadante desprezado (procedimento realizado 3x). Para extração dos lipídios o precipitado foi ressuspendido com 1,0 ml de clorofórmio:metanol (2:1 v/v), deixado 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 *viails* através de pipeta Pasteur. Após total evaporação do solvente foi adicionado aos *viails* 5,0 ml do líquido de cintilação POP/POPOP/TOLUENO e a radioatividade expressando a incorporação de lipídios foi medida em contador de cintilação líquida WALLAC 1409 (FIGURA II.2.4.1.1).

II.2.4.1.3: Medida da incorporação dos aminoácidos a proteínas

O *pellet* proteico delipidado foi dissolvido em 0,2 ml de ácido fórmico concentrado, recebendo 5,0 ml de líquido de cintilação *Ultima Gold* . O volume total foi transferido para os *viails* com o auxílio de uma pipeta Pasteur e a radioatividade medida em contador de cintilação líquida WALLAC 1409 (FIGURA II.2.5.1).

II.2.4.1.4: Análise dos produtos lipossolúveis por cromatografia em camada delgada (FIGURA II.2.4.1.4.1)

As cromatografias foram feitas em placas cromatográficas de sílica gel (Merk) previamente ativadas a 120°C durante 30 min.

Para separação dos lipídios neutros foi utilizada a seguinte mistura de solventes: n-heptano : éter isopropílico : ác. Fórmico (60 : 40 : 2 ;v/v/v). Nesta cromatografia foram usados como padrões: colesterol, ácido graxo, diacilglicerol, triglicerídio e éster de colesterol.

A saturação da cuba com o sistema solvente foi de 1h. Após a corrida, a placa cromatográfica foi colocada em uma cuba previamente saturada com vapores de iodo para que os lipídios padrões pudessem ser revelados.

Posteriormente, foram submetidas a autoradiografias, colocando-as em contato com um Hyperfilm - ³H (Amersham) durante 15 dias a - 70°C.

A incorporação do ¹⁴C aos diferentes lipídios foi analisada considerando as zonas radioativas identificadas a partir da autoradiografia.

II.2.4.1.4.1: Hidrólise alcalina dos compostos lipossolúveis

Parte dos compostos lipossolúveis foram submetidos a hidrólise alcalina na presença de hidróxido de sódio 0,5M em etanol 90%, a 25°C durante 15 min (WHITE & WAECHTER, 1975).

O material hidrolisado foi resfriado, neutralizado com ácido acético glacial, evaporado e ressuspenso em clorofórmio : metanol (2:1;v/v). Posteriormente foi aplicado em cromatografia de camada delgada em sílica gel utilizando o sistema solvente para lipídios neutros.

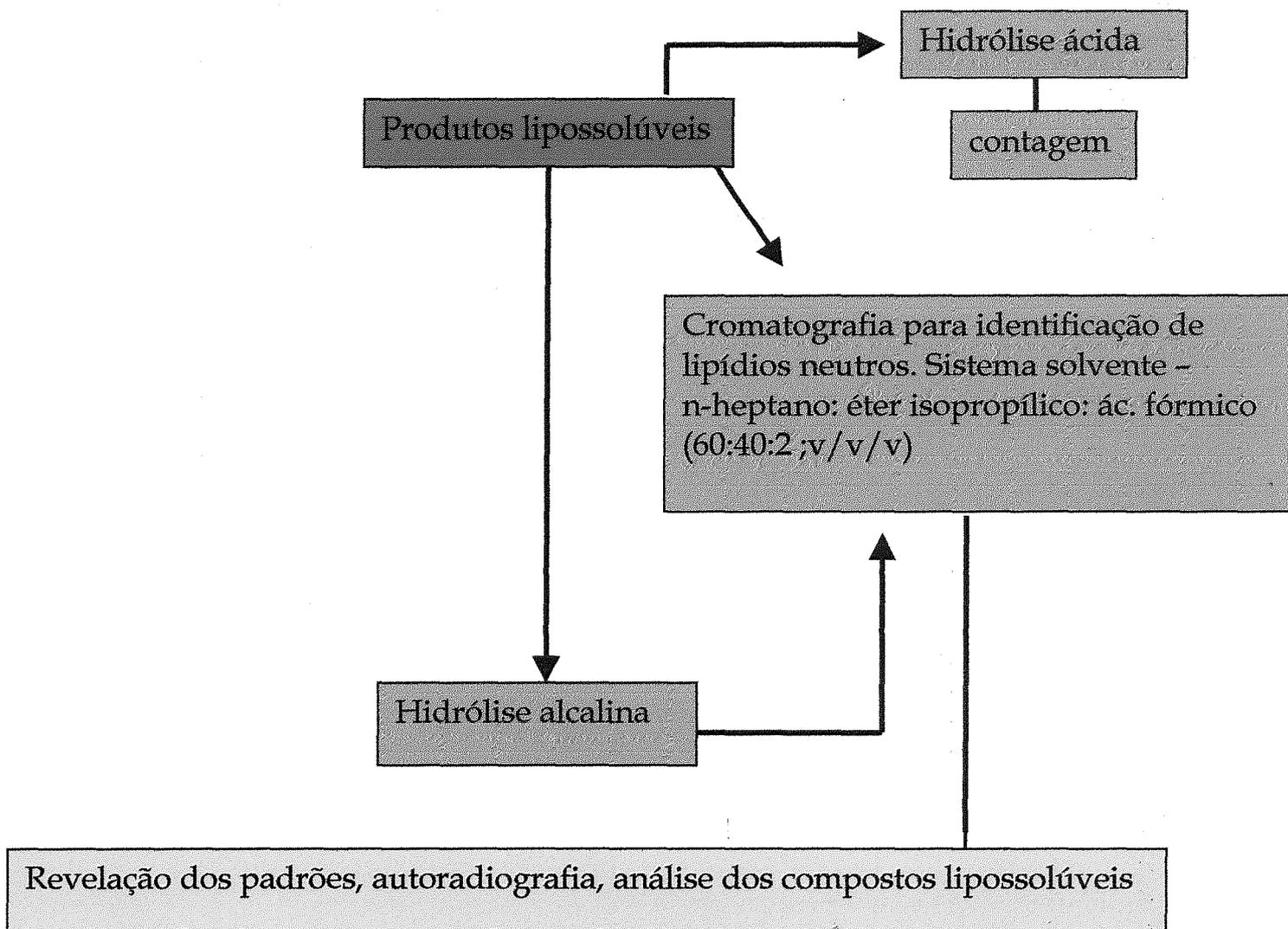


FIGURA II.2.4.1.4.1: Esquema representativo da metodologia utilizada para análise dos produtos lipossolúveis.

III.2.4.1.4.2: Hidrólise ácida dos compostos lipossolúveis

Parte dos compostos solúveis em C:M (2:1;v/v) foram submetidos a hidrólise ácida suave na presença de HCl 0,1N em propanol 50%, a 50°C durante 30 minutos (SPEAKE & WHITE, 1978).

O material hidrolisado foi evaporado e ressuspenso em clorofórmio:metanol:água (3:2:1;v/v/v). Após centrifugação, separou-se a fração superior, lavou-se a fração inferior com corofórmio:metanol:água (3:48:47;v/v/v) e novamente centrifugou-se. As frações aquosas foram reunidas e quantificadas (FIGURA III.2.4.1.4.1).

III. RESULTADOS

III.1. Relação entre o número de células de Sertoli incubadas e a oxidação da L-[U-¹⁴C] leucina a CO₂, sua transformação a lipídios e incorporação a proteínas.

Para iniciar nosso estudo elegemos o aminoácido leucina por ser o mais analisado em metabolismo de células de Sertoli em estudos já publicados.

Após a cultura destas células por 4 dias realizamos a determinação de proteína de acordo com LOWRY et al,1951 e relacionamos com o número total de células obtidas. Recorremos a alíquotas da suspensão celular de acordo com concentração protéica crescente de 1,3 mg, 2,7 mg e 5,4 mg. Realizamos o experimento com leucina na concentração de 0,2 mM e analisamos a velocidade das reações de oxidação a CO₂, transformação a lipídios e incorporação a proteínas a partir de L-[U-¹⁴C] leucina em células de Sertoli (FIGURA III.1.1)

Nossos resultados mostraram relação linear entre o número de células incubadas e a concentração de proteína, o que pode ser observado na TABELA III.1.1. Optamos em trabalhar com uma suspensão celular de 2,0 mg de proteína.

Número de células	mg / proteína
6,5 x 10 ⁶ células	1,8
13,2 x 10 ⁶ células	2,7
26,5 x 10 ⁶ células	5,4

TABELA III.1.1: Correspondência entre o número de células de Sertoli e mg de proteína na suspensão.

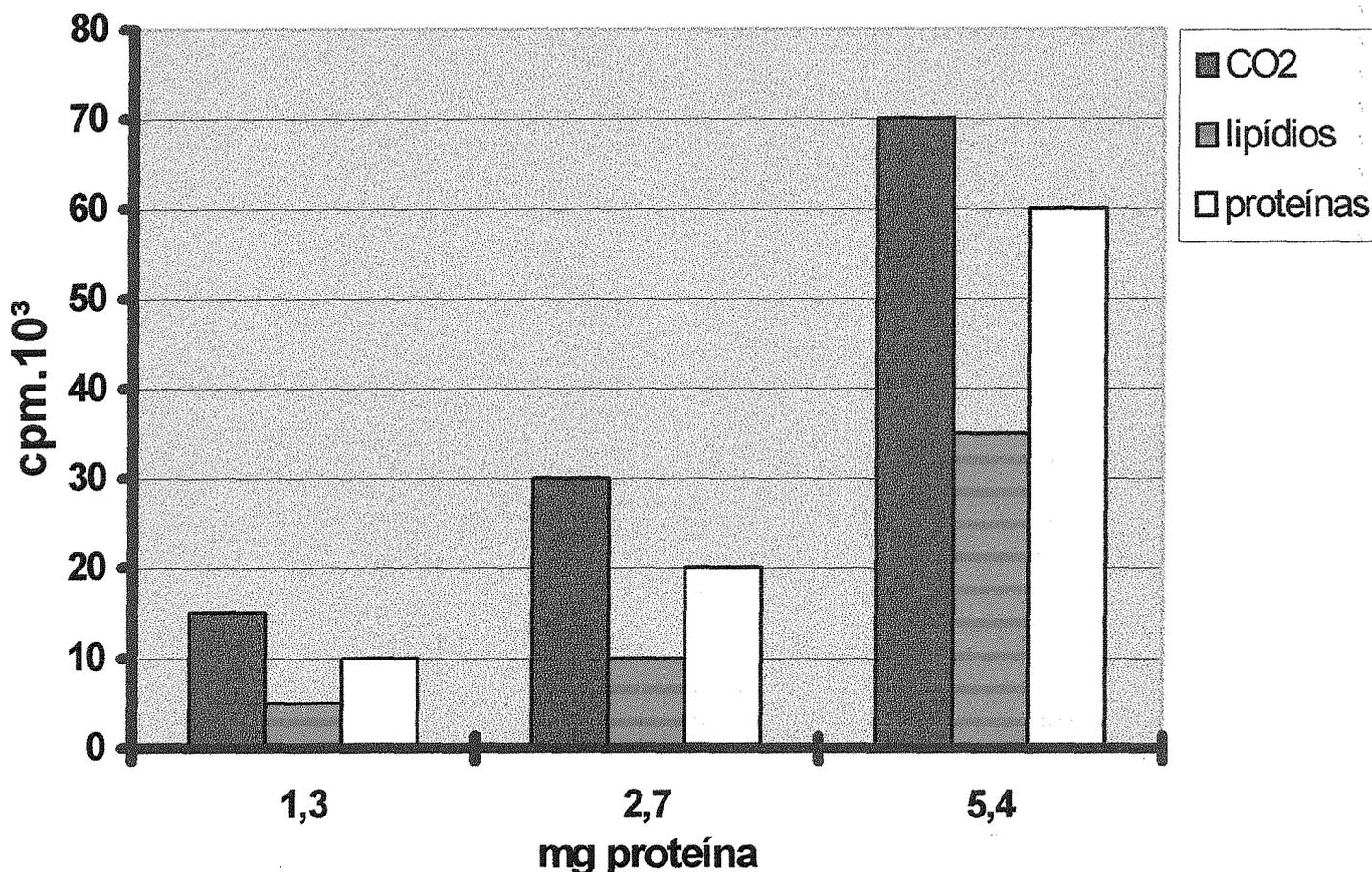


FIGURA III.1.1: RELAÇÃO ENTRE O NÚMERO DE CÉLULAS DE SERTOLI INCUBADAS E A OXIDAÇÃO DE L-[U-¹⁴C] LEUCINA A CO₂, SUA TRANSFORMAÇÃO A LIPÍDIOS E INCORPORAÇÃO A PROTEÍNAS. A análise foi desenvolvida conforme descrito em materiais e métodos, variando o número de células na suspensão celular determinada pela quantidade de proteínas. Cada dado representa a média de um experimento duplicado. Cada experimento foi realizado pelo menos duas vezes, cpm.10³ representa a medida da radioatividade de L-[U-C¹⁴] leucina incorporada.

III.2. Metabolismo da L-[U-¹⁴C] leucina a CO₂, lipídios e proteínas em células de Sertoli *in vitro* em função do tempo de incubação.

No quarto dia de cultura as células eram tripsinizadas, como indicado, e a suspensão celular era preparada observando a viabilidade celular. Uma alíquota era separada para dosagem de proteína (LOWRY et al,1951). A suspensão celular era separada em alíquotas de 2,0mg de proteína já que esta concentração foi escolhida para os experimentos seguintes.

Realizamos uma curva de tempo de incubação de 30, 60, 90 e 120 min. Verificamos a incorporação da L-[U-¹⁴C] leucina a proteínas, e sua oxidação a CO₂ e a transformação a lipídios a partir dos acetil CoA provenientes da L-[U¹⁴C] leucina em células de Sertoli (FIGURA III.2.1).

Os resultados mostraram que variando o tempo de incubação, a velocidade das reações permaneceram constante até o tempo de 2 h de incubação.

Optamos trabalhar com o tempo de 60 min por nos fornecer uma adequada metabolização da leucina e segurança quanto a constância da velocidade das reações da metabolização da mesma.

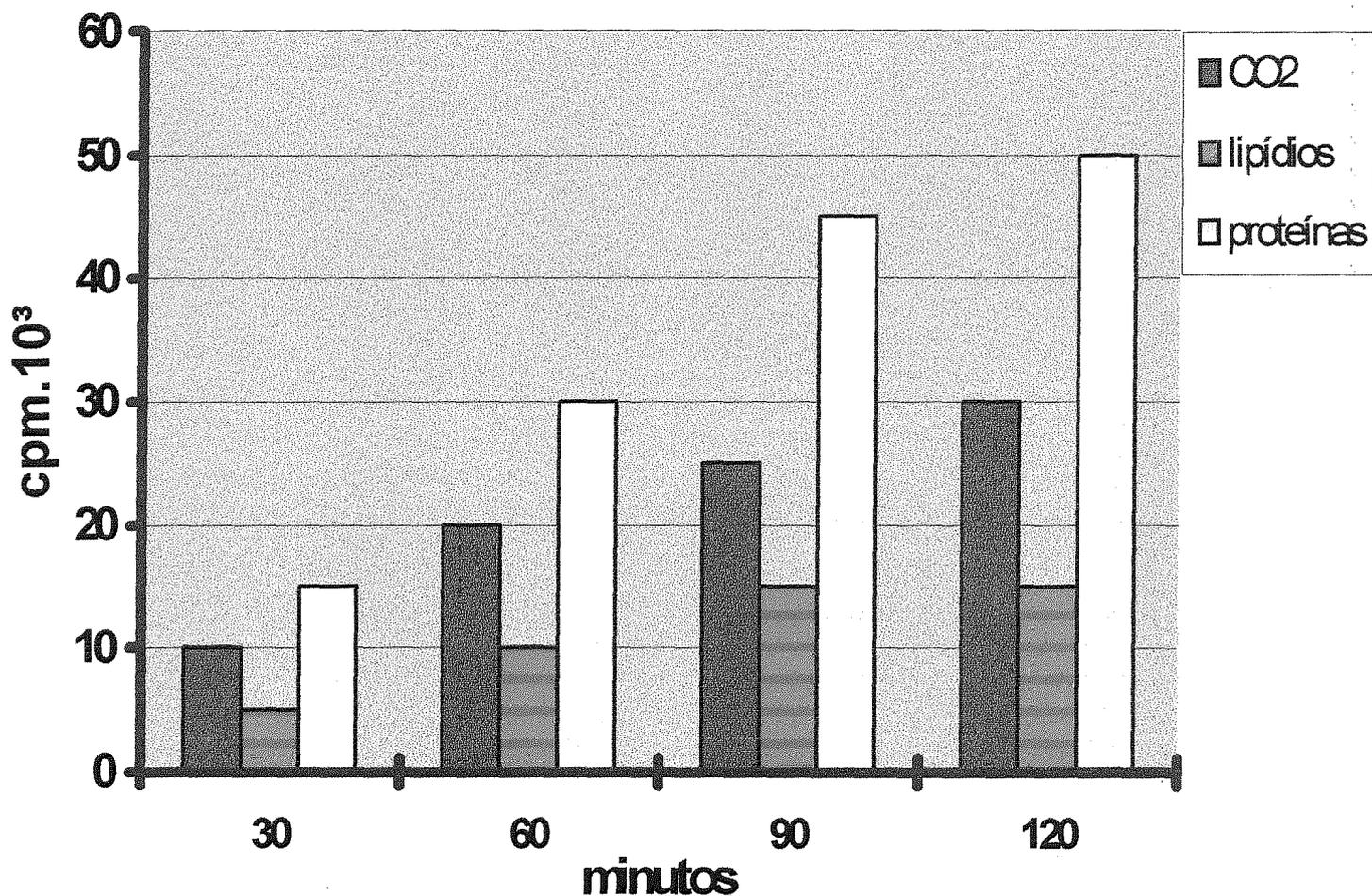


FIGURA III.2.1: METABOLISMO DA L-[U-¹⁴C] LEUCINA A CO₂, LIPÍDIOS E PROTEÍNAS EM CÉLULAS DE SETOLI *IN VITRO* EM FUNÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO. A análise foi desenvolvida conforme materiais e métodos, variando-se o tempo de incubação na presença de 0,2 mM de L-leucina. Cada dado representa a média de um experimento duplicado. Cada experimento foi realizado pelo menos duas vezes, cpm.10³ representa a medida da radioatividade de L-[U-¹⁴C]leucina incorporada.

III.3. Metabolismo da leucina em células de Sertoli *in vitro* em função da concentração de leucina.

Trabalhamos com o aminoácido leucina nas concentrações de 0,2; 0,5; 1,0 e 2,0 mM. Observou-se que a incorporação deste substrato varia linearmente até a concentração de 1,0 mM, nos três parâmetros estudados.

Como pode ser observado na FIGURA III.3.1, a oxidação da leucina a CO₂ e a sua incorporação a proteínas foram superiores à sua transformação a lipídios a partir de seus acetil CoA.

III.4. Metabolismo da glicina em células de Sertoli *in vitro* em função da concentração de glicina.

Com exceção da glicina, que não possui C assimétrico, todos os demais aminoácidos analisados são L-aminoácidos.

Inicialmente trabalhamos com o aminoácido glicina nas concentrações de 0,2; 0,5; 1,0 e 2,0 mM (resultados não mostrados). Como nossos resultados mostraram uma não saturação nos parâmetros estudados resolvemos aumentar a curva de concentração para 5,0 mM. Mesmo assim, não houve saturação nas velocidades das reações de oxidação a CO₂, transformação a lipídios e incorporação a proteínas a partir de [1-¹⁴C] glicina.

Analisando os três parâmetros em células de Sertoli *in vitro* percebe-se que a incorporação deste aminoácido é inferior daquela encontrada com leucina. Como pode ser observado na FIGURA III.4.1 a incorporação da glicina a proteínas é maior do que 4 vezes a sua oxidação a CO₂, bem como sua conversão a lipídios.

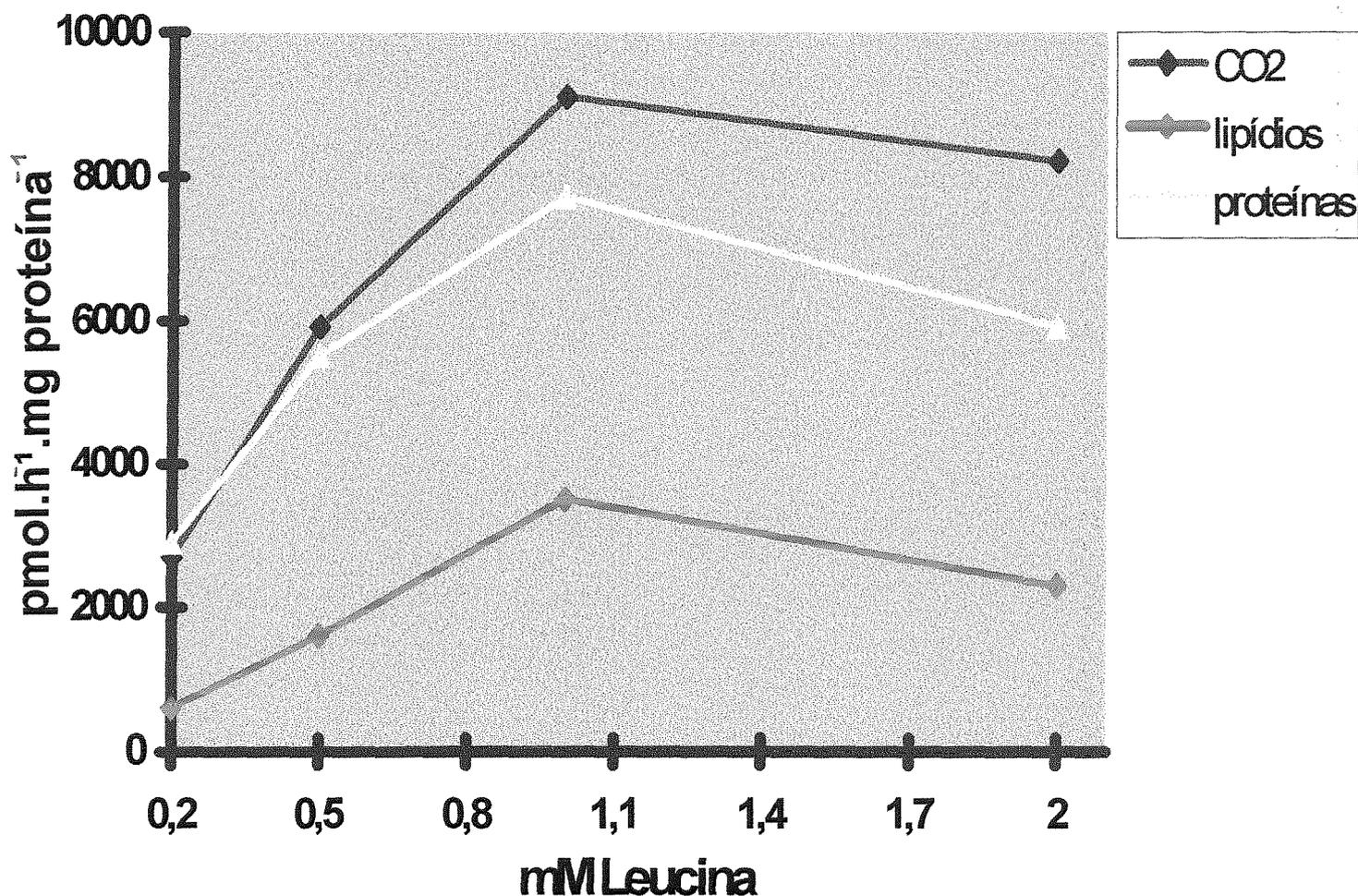


FIGURA III.3.1: METABOLISMO DA LEUCINA POR CÉLULAS DE SERTOLI *IN VITRO* EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LEUCINA. Incubou-se concentrações crescentes de L-leucina em uma suspensão de células de Sertoli como descrito em materiais e métodos. Cada dado representa a média de um experimento realizado duplicado. Cada experimento foi realizado pelo menos duas vezes. pmol. h⁻¹. mg proteína⁻¹ representa a quantidade de L-[U-¹⁴C] leucina oxidada a CO₂, transformada em lipídios e incorporada em proteínas .

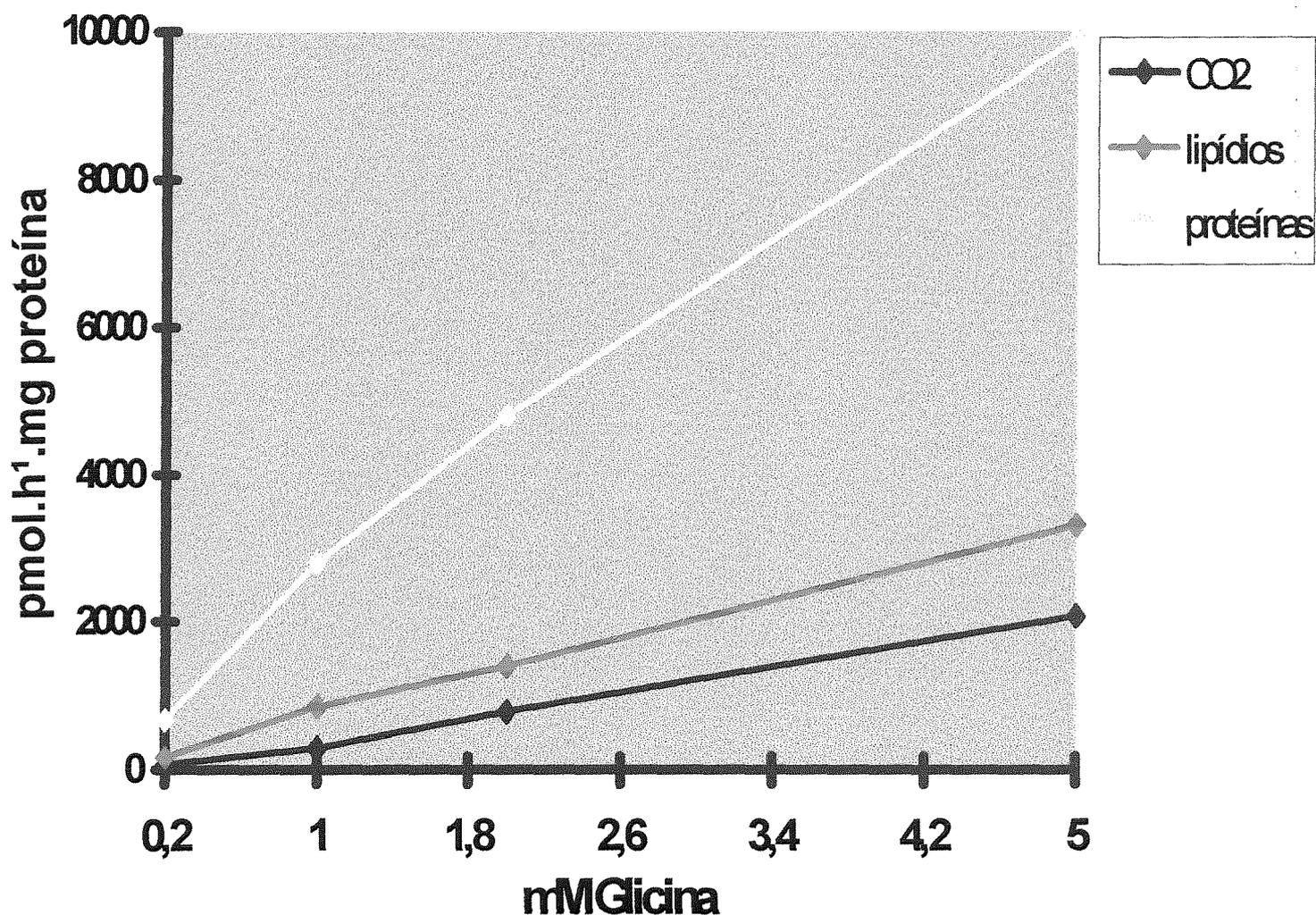


FIGURA III.4.1: METABOLISMO DA GLICINA POR CÉLULAS DE SERTOLI *IN VITRO* EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICINA. Incubou-se concentrações crescentes de glicina em uma suspensão de células de Sertoli como descrito em materiais e métodos. Cada dado representa a média de um experimento duplicado. Cada experimento foi realizado pelo menos duas vezes. $\text{pmol.h}^{-1}.\text{mg proteína}^{-1}$ representa a quantidade de $[1-^{14}\text{C}]$ glicina oxidada a CO_2 , transformada em lipídios e incorporada em proteínas.

III.5. Metabolismo da alanina e valina em células de Sertoli *in vitro* em função da concentração de alanina e valina respectivamente.

De maneira semelhante ao já analisado com leucina e glicina expandimos o nosso estudo testando mais dois aminoácidos catabolizados em vias metabólicas distintas. Utilizamos as concentrações de 0,2; 0,5; 1,0 e 2,0 mM e observamos a oxidação a CO₂, transformação em lipídios e incorporação a proteínas a partir de L-[U-¹⁴C] alanina e L-[U-¹⁴C] valina respectivamente.

A velocidade máxima na metabolização da alanina a CO₂, a lipídios e sua incorporação a proteínas foi obtida com a concentração de 1,0 mM de alanina. Houve grande transformação em lipídios. Com relação a oxidação a CO₂ e incorporação a proteínas os valores foram semelhantes (FIGURA III.5.1).

Como pode ser observado na FIGURA III.5.2, a oxidação da L-valina a CO₂ foi superior a sua incorporação a proteínas, e esta superior a sua transformação em lipídios a partir da mesma. A velocidade máxima da oxidação da L-valina a CO₂, bem como de sua incorporação a proteínas foi obtida com a concentração de 1,0 mM de L-valina. A concentração de 2,0 mM de L-valina não saturou o sistema enzimático responsável pela transformação a lipídios a partir deste aminoácido.

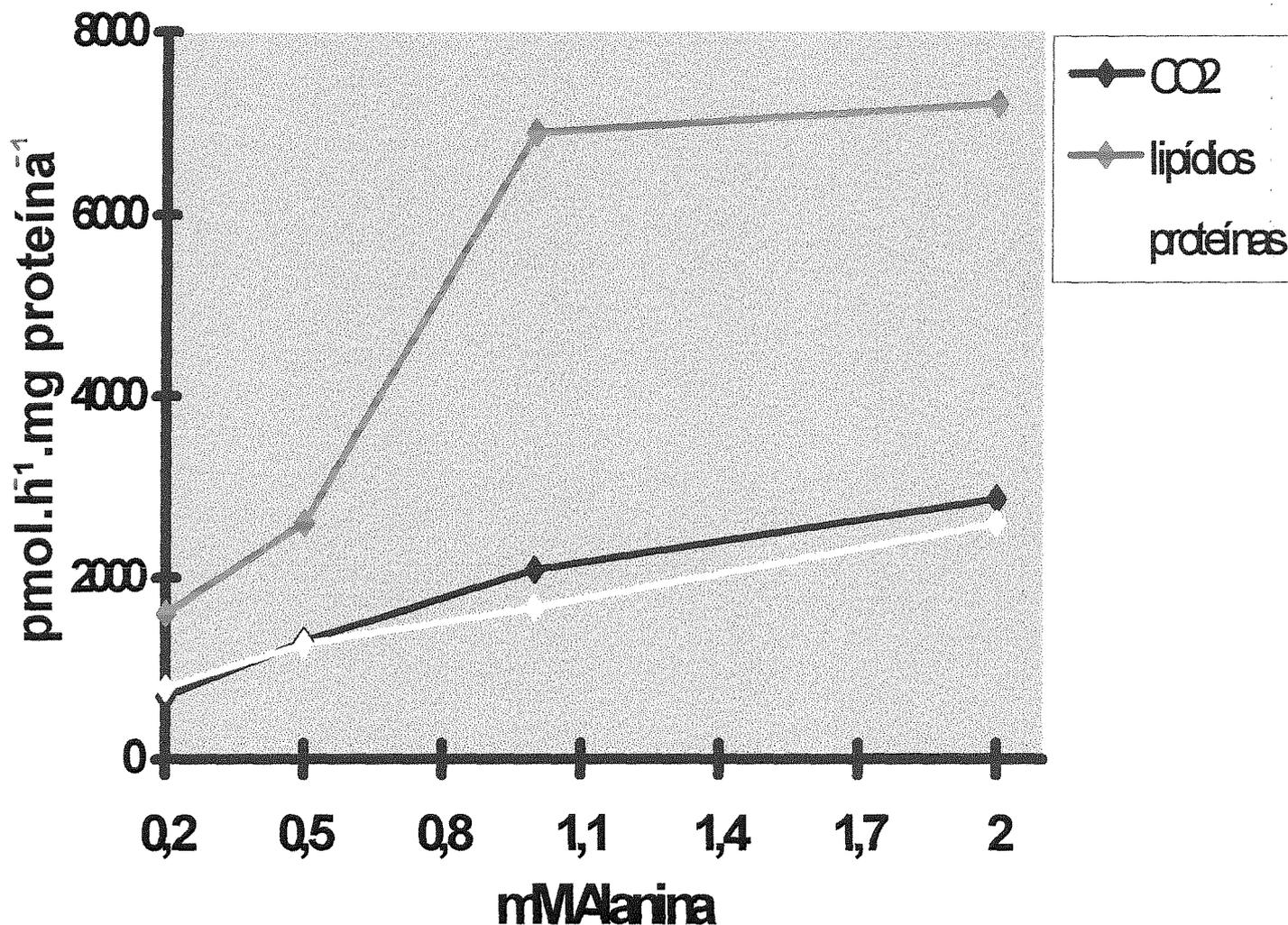


FIGURA III.5.1: METABOLISMO DA ALANINA EM CÉLULAS DE SERTOLI *IN VITRO* EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ALANINA. Incubou-se concentrações crescentes de alanina em uma suspensão de células de Sertoli como descrito em materiais e métodos. Cada dado representa a média de um experimento realizado duplicado. Cada experimento foi realizado pelo menos duas vezes. pmol.h⁻¹.mg proteína⁻¹ representa a quantidade de L-[U-¹⁴C] alanina oxidada a CO₂, transformada em lipídios e incorporada a proteínas.

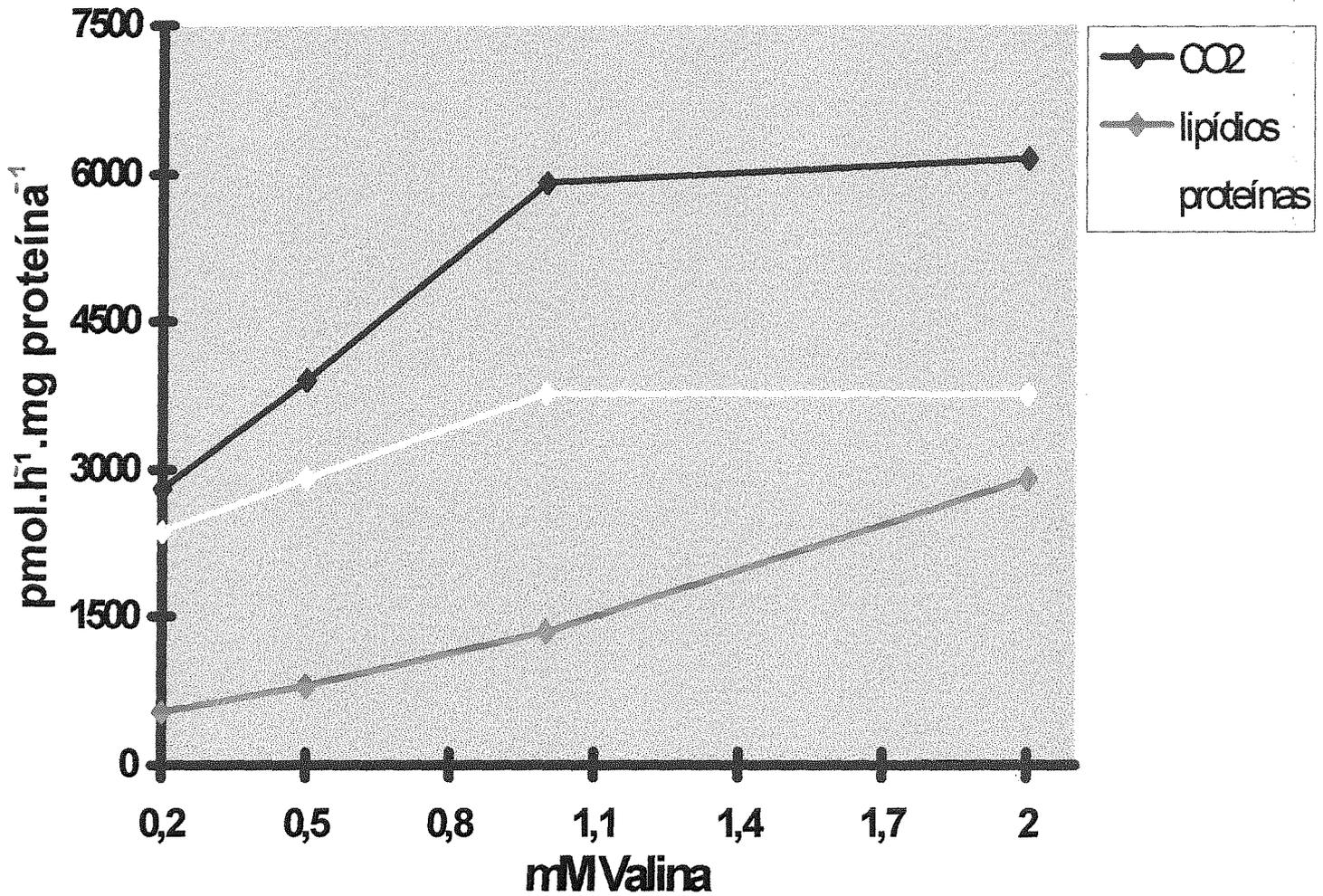


FIGURA III.5.2: METABOLISMO DA VALINA EM CÉLULAS DE SETOLI *IN VITRO* EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE VALINA. Incubou-se concentrações crescentes de valina em uma suspensão celular de células de Sertoli com descrito em materiais e métodos. Cada dado representa a média de um experimento duplicado. Cada experimento foi realizado pelo menos duas vezes. pmol.h⁻¹.mg proteína⁻¹ representa a quantidade de L-[U-¹⁴C] valina oxidada a CO₂, transformada em lipídios e incorporada a proteínas.

III.6. Análise comparativa do metabolismo dos diferentes aminoácidos estudados.

Para melhor comparar os diferentes resultados obtidos com os quatro aminoácidos escolheu-se a concentração de 1mM de substrato. Os dados estão visualizados na TABELA III.6.1.

Verifica-se que alanina é aproveitada em grande parte para síntese lipídica enquanto que os aminoácidos de cadeia ramificada, leucina e valina, foram principalmente utilizados para oxidação a CO₂. A glicina foi menos utilizada pelas células de Sertoli e 76% do seu aproveitamento está na incorporação a proteínas. Dos aa ensaiados, as células de Sertoli *in vitro* metabolizam principalmente leucina.

	CO ₂	LIPÍDIOS	PROTEÍNAS	TOTAL pmol
LEUCINA	9 (46%)	3,2 (16%)	7,5 (38%)	19,7
GLICINA	0,3 (8%)	0,8 (20%)	2,8 (72%)	3,9
ALANINA	2 (18%)	7,8 (69%)	1,5 (13%)	11,3
VALINA	6 (55%)	1,8 (16%)	3,2 (29%)	11,0

TABELA III.6.1: Quadro comparativo dos resultados obtidos com os diferentes aminoácidos na concentração de 1mM de substrato. Os números em **preto** correspondem aos **pmoles do aminoácido** em cada parâmetro utilizado. Nos parênteses estão as percentagens do total metabolizado.

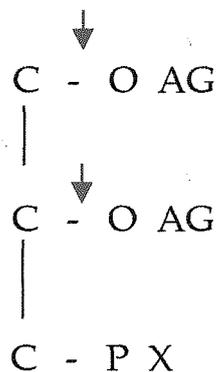
III.7. Análise dos produtos lipossolúveis.

III.7.1. Identificação dos lipídios neutros por cromatografia em camada delgada

Após procedimento detalhado em materiais e métodos, a fração lipídica foi submetida a cromatografia em camada delgada para identificação dos diferentes lipídios considerando-se as zonas radioativas.

Observa-se uma transformação da: L-[U-¹⁴C] leucina, L- [U-¹⁴C] valina e L-[U-¹⁴C] alanina a fosfolipídios, ácidos graxos, triglicerídios e ésteres de colesterol e, da [1-¹⁴C] glicina a fosfolipídios (FIGURA III.7.1.1).

Após hidrólise alcalina suave de uma fração dos compostos lipossolúveis, como já está descrito, procedeu-se novamente a análise por cromatografia. Pode se observar uma transformação da L-[¹⁴C] alanina e L-[¹⁴C] leucina a fosfolipídios e a ácidos graxos e, da L-[¹⁴C] valina e [1-¹⁴C] glicina a fosfolipídios (resultados não mostrados). Nas condições usadas as ligações ésteres são hidrolisadas pelo álcali nas uniões mostradas pela seta na estrutura abaixo, liberando os ácidos graxos.



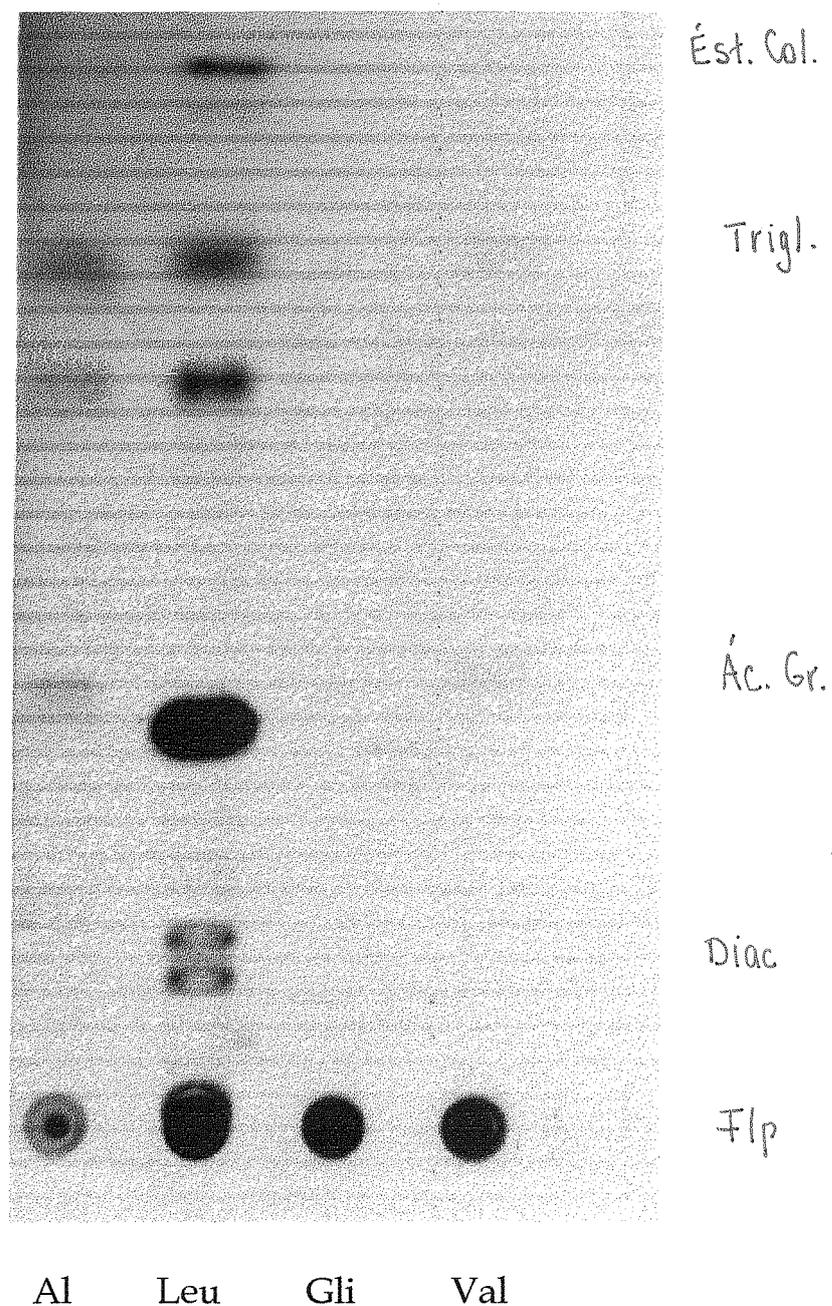


FIGURA III.7.1: Identificação dos produtos lipossolúveis por cromatografia em camada delgada. Utilizou-se o sistema solvente para lipídios neutros como descrito em materiais e métodos. Al=alanina, Leu=leucina, Gli=glicina, Val=valina, Flp=fosfolipídios, Diac=diacilglicerol, Ác. Gr=ácido graxo, Trigl=triglicerídios, Ést. Col=ésteres de colesterol.

IV. DISCUSSÃO

A célula de Sertoli possui destacada importância em relação ao processo espermatogênico. Possui ligação direta com as células germinativas e o seu papel tem sido elucidado com inúmeros trabalhos. Sabe-se que sustentam as células germinativas e que são alvo de hormônios, porém são as células germinativas que necessitam da ação dos mesmos (FRITZ,1978). Pesquisas direcionam-se ao estudo da função destas células em gerar intermediários do metabolismo e a utilização destes por espermatozoides e espermátides. GROOTEGOED et al,1984, observaram que estes dois tipos celulares citados requerem uma alta concentração de lactato exógeno para produção de ATP. No entanto, são as células de Sertoli que produzem lactato a uma taxa considerável (JUTTE et al,1981; ROBINSON & FRITZ,1981). Análises validaram as células de Sertoli como sendo alvos para a ação de hormônio da tireóide a nível testicular e confirmaram o papel fundamental deste hormônio na regulação do crescimento e diferenciação das células germinativas (PALMERO et al,1996).

Nosso trabalho procurou esclarecer as rotas metabólicas de diferentes tipos de aminoácidos em células de Sertoli *in vitro*. Os aminoácidos além de sua incorporação a proteínas, podem ser usados como combustíveis metabólicos. A degradação destes fornece intermediários metabólicos para serem convertidos em glicose ou serem oxidados pelo ciclo de Krebs.

Iniciamos com o aminoácido leucina, pois haviam referências bibliográficas de pesquisas em células de Sertoli demonstrando a existência de enzimas específicas envolvidas no catabolismo deste aminoácido (GROOTEGOED et al,1985).

A leucina, como já foi mencionado anteriormente, é um aminoácido essencial de cadeia ramificada. É dita cetogênica no seu catabolismo, formando acetil CoA e acetoacetato.

Analisando seu catabolismo (FIGURA IV.1.1 e FIGURA I.2.2.5), primeiramente é transaminada ao seu correspondente α -ceto ácido: α -cetoisocaproato. Este é degradado por reações semelhantes com as que ocorrem no ciclo de Krebs e oxidação de ácidos graxos, é oxidativamente descarboxilada a *isovaleril* CoA por um complexo α -ceto desidrogenase de cadeia ramificada.

O final da degradação completa da leucina produz acetoacetato e acetil CoA que servem como substrato energético e lipogênico. PATEL & OWEN (1978) mostraram

que a incorporação de leucina a proteínas foi maior do que sua oxidação a CO_2 , em cérebros de ratos no período de aleitamento, e que a glicose 5mM estimulou estas incorporações. PERRY (1988) investigou a influência de vários nutrientes energéticos sobre a incorporação de L-[1- ^{14}C] leucina a proteínas de córtex cerebral de ratos com 10 dias de idade. Seus resultados mostraram ser a glicose o principal estimulador da incorporação da aa a proteínas.

Sabe-se que as células de Sertoli e não as células germinativas contêm uma alta atividade da enzima aminotransferase para aminoácidos de cadeia ramificada (GROOTEGOED et al,1983). As células de Sertoli convertem leucina via transaminação em 4-metil-2-oxovalerato, e espermátocitos e espermátides reduzem o 4-metil-2-oxovalerato a 2-hidroxi-4-metilvalerato que é então liberado pelas células espermátogênicas, revelando um caminho intercelular da leucina no epitélio espermátogênico de rato (GROOTEGOED et al, 1985).

Outro estudo analisa o metabolismo de substratos energéticos em células de Sertoli. Em meio contendo glicose e todos os aminoácidos, ^{14}C - glutamina e ^{14}C - leucina foram convertidas a CO_2 em taxas consideráveis. Tal oxidação juntamente com a glicose e os ácidos graxos poderiam prover muito da energia requerida pela célula de Sertoli (GROOTEGOED et al,1986).

Nossos resultados mostram que a utilização da leucina foi menor para síntese lipídica em células de Sertoli de ratos imaturos, em relação a incorporação a proteínas e a sua oxidação a CO_2 , que foram bastante similares. Observa-se uma saturação na concentração de 1,0 mM de L-leucina (FIGURA III.3.1).

Ao estudarmos a fração lipossolúvel, obtida nas incubações com leucina marcada, observa-se uma transformação a fosfolipídios, diacilglicerol, ácidos graxos, ésteres de colesterol e triglicerídios (FIGURA III.7.1). Promovendo uma hidrólise alcalina suave confirma-se que a radioatividade incorporada nestes lipídios está nos ácidos graxos. Não foi encontrada radioatividade que correspondesse ao colesterol livre. Na reação de hidrólise ácida suave somente 5% do C marcado permaneceu na fração aquosa confirmando a formação de ácidos graxos a partir do acetil CoA proveniente do catabolismo da leucina (TABELA III.6.1).

Pouco se sabe sobre o metabolismo específico da valina em células de Sertoli.

Este aminoácido é dito gliconeogênico e possui uma cadeia ramificada a qual inicia seu catabolismo de maneira semelhante ao da leucina. Junto com a isoleucina e a metionina formam succinil CoA.

As três primeiras reações do seu catabolismo são semelhantes as dos outros dois aminoácidos de cadeia ramificada. Ocorre uma reação de transaminação gerando, através de um α -aminoácido aminotransferase, um α -ceto ácido correspondente, no caso o ácido α -cetoisovalerato. Este sofre uma descarboxilação oxidativa gerando isobutiril CoA que é desidrogenado resultando no metacrilil CoA. As reações subsequentes, como já foi visto na introdução culminam no metilmalonato semialdeído cujos destinos incluem transaminação formando α -aminoisobutirato e conversão a succinil CoA (FIGURA III.5.2 e FIGURA I.2.2.4a e 4b).

Em nossos trabalhos utilizamos L-[U-C¹⁴] valina para analisarmos o catabolismo deste aminoácido.

Semelhante ao observado com leucina houve pouca incorporação a lipídios se comparada com a oxidação a CO₂ e síntese protéica. Sugere-se que o succinil CoA formado é utilizado para produção de energia em células de Sertoli estudadas conforme nosso modelo experimental (FIGURA III.5.1).

Ao estudarmos a fração lipossolúvel observa-se uma transformação maior a fosfolipídios seguido de ácidos graxos e triglicerídios. Após hidrólise alcalina suave apareceu ligeira radioatividade na zona de ácidos graxos e, uma radioatividade evidente em fosfolipídios. A reação de hidrólise ácida suave revelou uma distribuição semelhante entre a fração aquosa e lipídica sugerindo proporções semelhantes de compostos polares e apolares.

A valina apresenta um padrão de metabolização semelhante ao da leucina em células de Sertoli *in vitro*. Estes aminoácidos são preferencialmente utilizados para a produção de energia e síntese protéica. No citoplasma existe uma enzima acetoacetil CoA sintase (tiolase citoplasmática) que transforma o acetoacetato em acetoacetil CoA. A tiolase citoplasmática transforma o acetoacetil CoA em acetil CoA. Esta enzima, já evidenciada no SNC, pode também estar presente nas células de Sertoli. Isto justificaria uma maior síntese lipídica a partir da leucina em relação a valina (FIGURA IV.1.1). O acetoacetato poderia também ser exportado para as células germinativas sendo, em experimentos com cultura de células de Sertoli, detectado no meio de cultura.

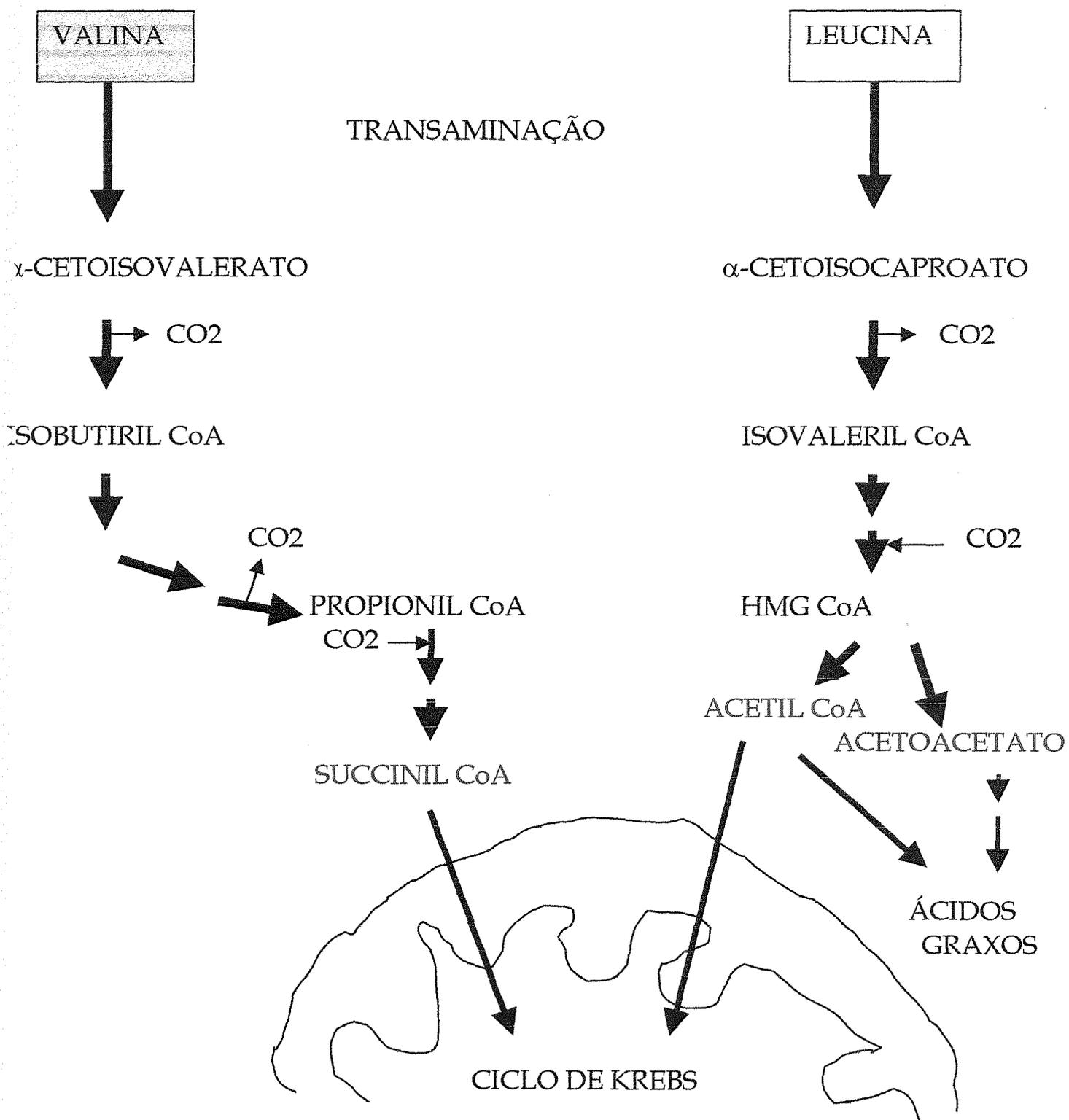


FIGURA IV.1: Esquema demonstrando os produtos finais do metabolismo da leucina e valina.

A glicina, como já foi visto, é um aminoácido não essencial e o mais simples sob o ponto de vista estrutural.

Sabe-se que a glicina é metabolizada por várias rotas. Seu catabolismo pode gerar serina (reação reversível) e posteriormente piruvato e/ou transferir um átomo de C (carbono 2) ao tetrahidrofolato formando CO_2 e NH_4 (Sistema de Clivagem da Glicina). Também é oxidada pela D-aminoácido oxidase cujo produto, glioxalato pode ser convertido novamente a glicina por transaminação, oxidado a oxalato ou oxidado a CO_2 e H_2O (FIGURA III.4.1 e FIGURA I.2.2.2). A glicina tem seu esqueleto carbônico incorporado em purinas, glutatião (DEN BOER et al, 1989), creatina, δ -aminolevulinato, o precursor da porfirina e do heme.

Vários estudos têm evidenciado a utilização da glicina em cérebro de rato onde está intimamente relacionada com o metabolismo intermediário, além de ser um precursor de proteínas. No SNC pode ser facilmente sintetizada a partir da serina, através da remoção de um átomo de carbono pela serina hidroximetil transferase (DALY et al, 1976). Provavelmente é o aminoácido mais utilizado pelo SNC como fonte de energia.

Em nossos experimentos utilizamos $[1-^{14}\text{C}]$ glicina.

Os resultados demonstram que a glicina foi mais utilizada para formação de proteínas seguida pela transformação a lipídios e pouco na oxidação a CO_2 . Utilizando células de Sertoli *in vitro* de ratos imaturos observou-se menor incorporação se comparada com a leucina. A curva de concentração de glicina não apresentou saturação até uma concentração de 5,0 mM (FIGURA III.4.1). Trabalho referente ao consumo da glicina por células cerebrais de ratos em cultura verificaram que 2,0 mM deste aminoácido satura a rota de oxidação do mesmo a CO_2 (BIXEL & cols, 1993). EWART & cols, 1992, mostra que no fígado a rota de oxidação da glicina satura em torno de 30 mM. PERRY (comunicação pessoal) trabalhou com 10 mM de glicina no fígado e não ocorreu saturação em relação a oxidação a CO_2 . Porém, ocorreu saturação quanto a incorporação a proteínas e sua transformação a lipídios. A saturação em diferentes tecidos é diferente devido a diferenças entre as isoenzimas, ou, devido a sistemas degradativos diferentes.

Analisando a fração lipossolúvel encontrou-se incorporação a fosfolipídios o que pode ser visualizado na autoradiografia da cromatografia em camada delgada. Provocando reação de hidrólise alcalina suave não percebe-se a presença de ácidos

graxos. Com a hidrólise ácida suave demonstrou-se que 55% da radioatividade passou a fração aquosa provavelmente sendo fosfoserina ou fosfoetanolamina.

Sugere-se que a célula de Sertoli de ratos imaturos utiliza glicina principalmente para síntese protéica e também para a formação de serina que é utilizada para síntese de fosfolipídios.

Decidimos finalizar nossos estudos analisando o metabolismo da alanina em células de Sertoli *in vitro*.

É o principal aminoácido glicogênico e, estando relacionada com o metabolismo da glicose está sujeita a variações decorrentes de modificações do suprimento energético e de condições nutricionais.

Sabe-se que este aminoácido é dito glicogênico e pode ser utilizada na via lipogênica ao ser transaminada a piruvato que é convertido a acetil CoA. O piruvato também pode entrar no ciclo de Krebs para produção de CO₂ e H₂O (FIGURA III.5.1 e FIGURA 2.2.3)

Analizamos a oxidação da L-[U-¹⁴C] alanina a CO₂, sua transformação em lipídios e sua incorporação a proteínas em nosso modelo experimental. Verificamos uma grande transformação a lipídios parecendo ser esta a via preferencial de metabolização deste aminoácido em células de Sertoli *in vitro* (FIGURA V.2). GOVINATZKI e cols, 1996 mostrou que no hipocampo a principal rota de utilização da alanina foi sua oxidação a CO₂. No caso das células de Sertoli foi sua conversão a lipídios.

Após identificação dos componentes da fração lipossolúvel, visualizou-se fosfolipídios, ácidos graxos, ésteres de colesterol e triglicerídios. Após hidrólise alcalina suave evidenciou-se a presença de fosfolipídios e de ácidos graxos. Após hidrólise ácida suave constatou-se que a radioatividade nos compostos polares e apolares está distribuída igualmente.

Em células de Sertoli *in vitro* a alanina não parece evidenciar sua característica gliconeogênica.

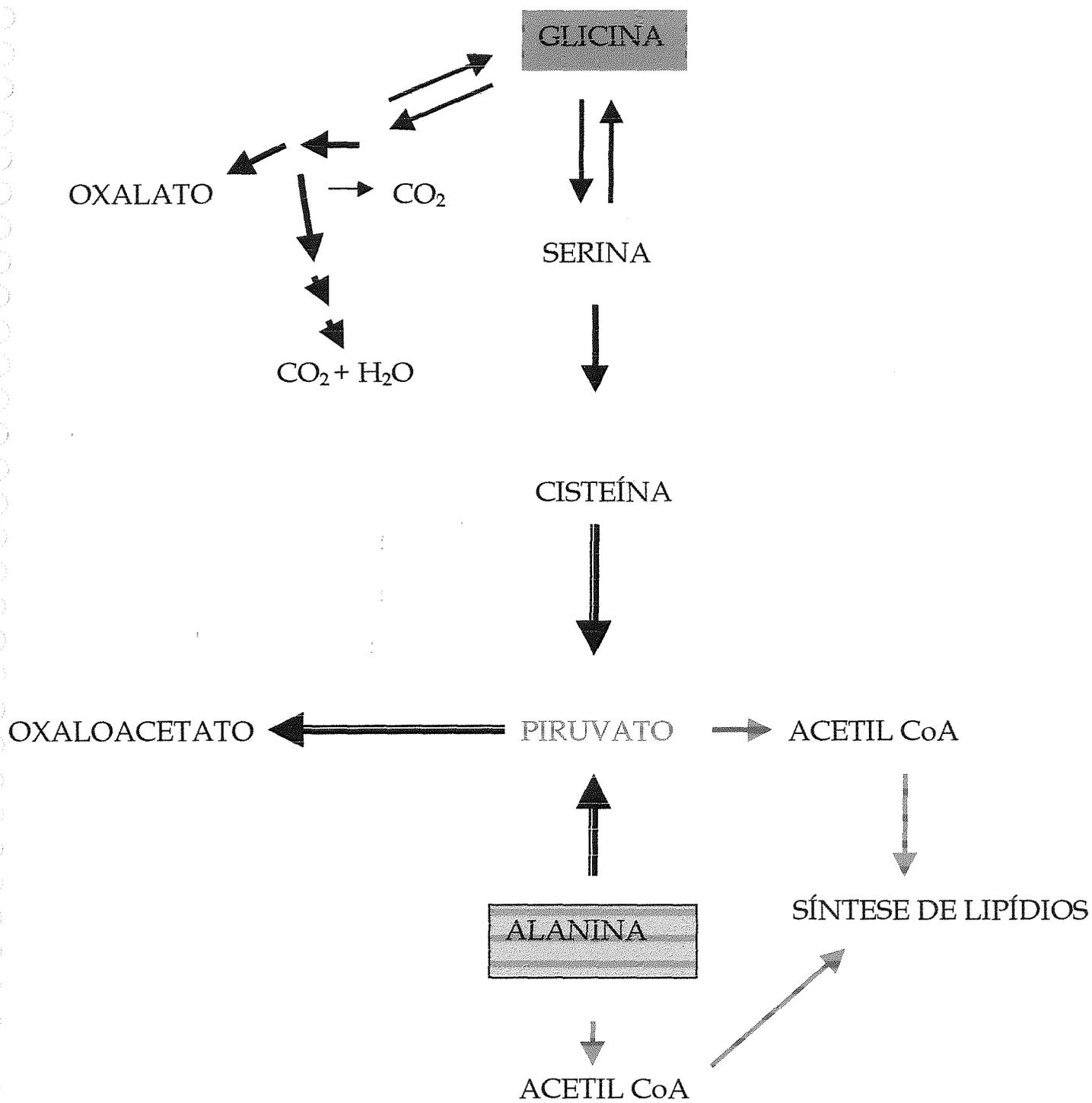


FIGURA IV.2: Esquema da interrelação metabólica entre glicina e alanina.

Os tecidos utilizam diferentemente os aminoácidos e no mesmo tecido, as diferentes células que o compõe, também os utilizam de maneira diferente. No SNC temos os astrócitos que possuem o Sistema de Clivagem da Glicina (SATO & cols, 1991). O fígado, por exemplo, não possui praticamente as transaminases dos aminoácidos ramificados, por isso não pode metaboliza-los. Porém possui em alta quantidade a descarboxilase dos cetoácidos dos aminoácidos ramificados podendo utilizados eficientemente quando fornecidos pelo músculo.

Nossas pesquisas procuraram esclarecer algumas dúvidas a respeito da utilização dos aminoácidos pelas células de Sertoli. Além de serem fontes de energia o que pode ser elucidado com a oxidação de leucina e valina, estes podem ser formadores de lipídios, observado com a boa incorporação de L-[¹⁴C] alanina em nossos experimentos. Os lipídios são importantes sob o ponto de vista estrutural, como componentes de membranas celulares e como biomensageiros. Vários estudos demonstram o catabolismo de aminoácidos a substratos que são utilizados para síntese lipídica. PATEL & OWEN, 1978 verificaram que a completa oxidação da leucina levaria a intermediário marcados que poderiam ser utilizados na biossíntese de lipídios em cérebros de ratos em desenvolvimento e na fase adulta.

A síntese protéica a partir dos aminoácidos é semelhante nos tecidos, pois são analisados o conjunto de suas proteínas e neste os aminoácidos estão na mesma proporção. Porém a incorporação destes aminoácidos a proteínas também é de muita relevância. Sabe-se que a maturação funcional da célula de Sertoli é caracterizada por um aumento na síntese protéica (SANBORN & cols, 1986). Estudos como o que realizamos são importantes ferramentas para a identificação do *pool* de aminoácidos que servem como precursores de proteínas. As células de Sertoli sofrem ação de vários hormônios. O FSH tem sido citado como estimulador da síntese protéica neste tipo celular (PERRARD et al, 1985; DAVIES et al, 1980; ROMMERTS et al, 1978). PALMERO & cols, 1996 estudaram o metabolismo protéico sob influência do hormônio da tireóide em células de Sertoli. Evidenciaram que o T3 pode aumentar a síntese protéica implicando um envolvimento direto na diferenciação das células de Sertoli. Todos os aminoácidos por nós estudados tiveram uma boa incorporação a proteínas. Destaque para glicina que apesar de sua pouca utilização teve uma destacada incorporação a proteínas.

V. CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos pode-se concluir que em células de Sertoli *in vitro*:

- 1- Os aminoácidos ramificados, leucina e valina, são utilizados em maior porcentagem para a produção de CO₂.
- 2- A alanina é preferencialmente utilizada para a síntese de lipídios.
- 3- 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 fosfolipídios.
- 4- Os quatro aminoácidos utilizados em nosso trabalho são utilizados em quantidades semelhantes para a síntese protéica.
- 5- A hidrólise ácida suave mostrou que praticamente toda leucina está na fração lipossolúvel, provavelmente como ácido graxo e, que a alanina, glicina e valina foram incorporadas parte na porção lipoprotéica da molécula de fosfolipídio e parte na fração hidrossolúvel.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BECKMAN, J. K. & CONIGLIO, J. G. The metabolism of polyunsaturated fatty acids in rat Sertoli and germinal cells. **Lipids**, v.14, p. 262 - 267, 1979.

BERNARD, E. A. & WASSERMAN, G. F. Testicular glycoprotein biosynthesis stimulated by in vivo administration of follicle stimulating hormone. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 44, p. 45 - 47, 1982.

BIXEL, G., DRINGER, R., WIESING, H. STOCK, W. & HAMPRECHT, B. Consumption of branched-chain amino acids and glycine by astroglia-rich rat brain cell cultures. **Biol. Chem. Hoppe-Seyer**, v. 374, p. 915 , 1993.

CHAMPE, P. C. & HARVEY, R. A. Nitrogen metabolism. Unit: V. In: **Biochemistry. Lippincott's Illustrated Review. J. B. Lippincott Company. 2nd edition, 1994.**

CLERMONT, Y. Introduction to the Sertoli cell. In: **The Sertoli Cell. Editores: L. D. RUSSEL & M. D. GRISWOLD. Cache River Press. 1993.**

CLERMONT, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. **Physiological Reviews**, v. 52, p. 198 - 236, 1972.

COUROT, M. & KILGOUR, R. J. Endocrine control of mammalian testicular ontogenesis. **Archivos de Biologia y Medicina Experimentales**, v. 17, p. 249 - 255, 1984.

DALY, E. C., NADI, N. S. & APRISON, M. H. 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**, v. 36, p. 179 - 185, 1976.

DAVIES, A. G. & LAWRENCE, N. R. Autoradiographic study of lysine and arginine incorporation stimulated by follicle-stimulating hormone in the mouse testis *in vivo*. **J. Endocrinol.**, v. 84, p. 43 - 48, 1980.

DEN BOER, P.J., MACKENBACH, P. & GROOTEGOED, J. A. Glutathione metabolism in cultured Sertoli cells and spermatogenic cells from hamsters. **Journal of Reprod. Fert**, v. 87, p. 391 - 400, 1989.

DJAKIEW, D. & DYM, M. Pachytene spermatocyte proteins influence Sertoli cell function. **Biology of Reproduction**, v. 39, p. 1193 - 1205, 1988.

DORRINGTON, J. H. & FRITZ, M. R. Cellular localization of 5-reductase and 3-hidroxy-steroid dehydrogenase in the seminiferous tubules of the rat testes. **Endocrinology**, v. 96, p. 889 - 889, 1975.

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 - 830, 1974.

ELFTMAN, H. Sertoli cells and testis structure. **Am. Journal of Anat.**, v. 113, p. 25 - 32, 1963.

EWART, H. S., JOIS, M. & BROSNAN, J. T. Rapid stimulation of the hepatic glycine-cleavage system in rats fed on a single high-protein meal. **Biochemistry Journal**, v. 283, p. 441 - 447, 1992.

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

FREE, M. J. Carbohydrate metabolism in the testis. In: Johnson A. D., GOMES, W. R., VANDERMARK, N. L. (ed), **The Testis**. New York: Academic Press. P. 125 - 193, 1970.

FRITZ, I. B. Sites of action of androgens and follicle stimulating hormone on cells of the seminiferous tubule. Em: **Biochemical actions of hormones**. Academic Press, New York, v.5, p. 249 - 281.1978.

GOVINATZKI, M. T. A., VELLEDA, L. S., TRINDADE, V. M. T., NAGEL, F. M., BUENO, D. & PERRY, M. L. S. Amino acid metabolism by rat hippocampus during the period of brain growth spurt. **Neurochemistry Research**, v. 22, p. 23 - 26, 1997.

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.

GRISWOLD, M. D. Actions of the FSH on mammalian Sertoli cells. In: **The Sertoli Cell**. Editores: L. D. RUSSEL & M. D. GRISWOLD. Cache River Press. 1993.

GROOTEGOED, J. A., JUTTE, N. H. P. M., 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. The role of glucose, pyruvate and lactate in ATP production by rats spermatocytes and spermatids. **Biochem. Biophys. Acta** v. 767, p. 248 - 256. 1984.

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., OONK, 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.

HIGARA, K., KOCHI, H., HAYASAKA, K., KIKUCHI, G. & NYHAN, W. L. Defective glycine cleavage system in nonketotic hiperglycinemia, occurrence of a less active glycine decarboxylase and na abnormal aminomethyl carrier protein. **Journal Clinical Invest.**, v. 68, p. 525 - 534, 1981.

JUTTE, N. H. P. M., 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. & 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.

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.

KERR, J. B. Na ultrastructural and morphometric analysis of the Sertoli cell during the spermatogenic cycle of the rat. **Anatomy and Embryology**, v. 179, p. 191 - 203, 1988.

KIERSZENBAUM, A. L. & TRES, L. L. The structural and functional cycle of Sertoli cells in culture. **Bioregulators of Reproduction**. Jagiello, G. & Vogel, H. J. (eds.), Academic Press, New York, p. 207 - 228, 1981.

LE MAGUERESSE, B., PINEAU, C., GUILLOU & JÉGOU, B. Influence of germ cells upon transferrin secretion by rat Sertoli cells in vitro. **Journal of Endocrinology**, v. 118, p. r13 - r16, 1988.

LI, L. Y., SEDDON, A. P., MEISTER, A. & RISLLEY, M. S. Spermatogenic cell-somatic cell interactions are required for maintenance of spermatogenic cell glutathione. **Biology of Reproduction**, v. 40, p. 317, 1989.

LOSTHOFF, A. J. Regulation by FSH and ILSH (LH) at reproductive function in the immature male rat. **Endocrinology**, v. 85, p. 438 - 440, 1969.

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.

MARKS, D. B., MARKS, A. D. & SMITH, C. M. Nitrogen Metabolism. Section VII. In: **Basic Medical Biochemistry. A Clinical Approach**. Williams & Wilkins Ed., 1996.

OONK, R. B., JANSEN, R. & GROOTEGOED, J. A. Differential effects of follicle-stimulating hormone, insulin and insulin-like growth factor I on hexose uptake and lactate production by rat Sertoli cells. **Journal of Cell Physiology**, v. 139, p. 210 - 218, 1989.

PALMERO, S., BARDI, G., BOLLA, F. & FUGASSA, E. Influence of thyroid hormone on Sertoli cell protein metabolism in the prepubertal pig. **Journal of Biological Research**. v. LXXII, p.163 - 170. 1996.

PARVINEN, M. Regulation of seminiferous epithelium. **Endocrine Reviews**, v. 3, p. 404 - 417, 1982.

PATEL, M. S. & OWEN, O. E. The metabolism of leucine by developing rat brain: Effect of leucine and 2-oxo-4-metilvalerato on lipid synthesis from glucose and ketone bodies. **Journal of Neurochemistry**. v. 30, p. 775 - 782. 1978.

PERRARD, M. H., SAEZ, J. M & DAZORD, A. FSH stimulation of cytosolic protein synthesis in cultured pig Sertoli cells. **J. Steroid Biochem.**, v.22, p. 281 - 284, 1985.

PERRARD, M. H., SAEZ, J. M. & DAZORD, A. FSH stimulation of cytosolic protein synthesis in cultured pig Sertoli cells. **J. Steroid Biochem.**, v. 22, p. 281 - 284, 1985.

PERRY, V. L. T. **Efeito de nutrientes energéticos na incorporação de aminoácidos a proteínas de cortex cerebral de ratos**. Dissertação de mestrado apresentada ao curso de pós-graduação em bioquímica da UFRGS, Porto Alegre - RS, 1988.

RIVAROLA, M. A., SANCHEZ, P. & SAENZ, J. M. Stimulation of ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid synthesis in spermatogenic cells by their co-culture with Sertoli cell. **Endocrinology**, v. 117, p. 1976 - 1802, 1985.

ROBINSON, R. & FRITZ, I. B. Metabolism of glucose by Sertoli cells in culture. **Biol. Reprod.** v.24, p. 1032 - 1041. 1981.

ROMMERS, F. F., KRUGER, S. B., VAN WOERKOM BLIK, A. GROOTEGOED, J. A. & VAN DER MOLEN, H. J. Secretion of proteins by Sertoli cell enriched cultures: effects of follicle stimulating hormone, dibutiril cAMP and testosterone and correlation with secretion of estradiol and androgen binding protein. *Mol. Cell Endocrinol.*, v. 10, p. 39 - 55, 1978.

RUSSEL, L. D. & PETERSON, R. N. Sertoli cells junctions: morphological and functional correlates. *International Review of Cytology*, v. 94, p. 177 - 211, 1985.

RUSSEL, L. D. Observations on rat Sertoli ectoplasmic (juncional) specializations in their association with germ cells of the rat testis. *Tissue & Cell*, v. 9, p. 475 , 1977 a.

SANBORN, B. M., WAGLE, J. R., STEINBERGER. A. & GREER - EMMERT, D., SATO, K., YOSHIDA, S., FUJIWARA, TADA, K. & TOHYAMA, M. Glycine cleavage system in astrocytes. *Brain Research*, v. 567, p. 64 - 70, 1991.

SCHTEINGART, H. F., RIVAROLA, M. ^a & CIGORRAGA, S. B. Hormonal and paracrine regulation of gamma-glutamyl transpeptidase in rat Sertoli cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 67, p. 73 - 80, 1989.

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

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

SKINNER, M. K. Secretion of growth factors and others regulatory factors. In: *The Sertoli Cell*. Editores: L. D. RUSSEL & M. D. GRISWOLD. Cache River Press. 1993.

SPEAKE, B. K. & WHITE, D. A. The formation of lipid-linked sugars as intermediates in glycoprotein synthesis in Rabbit mammary gland. *Biochem. J.*, v. 170, P. 273 - 283, 1978.

STALLARD, B. J. & GRISWOLD, M. D. Germ cell regulation of Sertoli cell transferrin m RNA levels. *Molecular Endocrinology*, v. 4, p. 393 - 401, 1990.

STEINBERGER, E. & DUCKETT, G. E. Hormonal control of spermatogenesis. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 2, p. 117 - 123, 1967.

STEINBERGER, E. & STEINBERGER, A. Hormonal control of testicular function in mammals. In: **Handbook of Physiology**, v.4, Knobil E., Sawyer W. H. (eds.), p. 325, American Physiological Society, 1974.

STRYER, L. Amino acid degradation and the urea cycle. Chapter: 25. In: **Biochemistry. Fourth Edition**. W. H. Freeman and Company. New York, 1995.

TUNG, P. S. & FRITZ, I. B. Extracellular matrix promotes rat Sertoli cell histotype expression *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 30, p. 213 - 227, 1984.

VAN DER DOONK, J. A., DE RUITER-BOOTSMA, A. ULTEE-VAN GESSEL, A. M. & WAUBEN-PENRIS, P. J. Cell-cell interaction between rat Sertoli cells and mouse germ cells *in vitro*. **Experimental Cell Research**, v. 164, p. 191, 1986.

WHITE, D. A. & WAECHTER, C. J. A manosyl-carrier lipid of bovine adrenal medulla and rat parotid. **Biochem. Journal**, v. 146, p. 645 - 651, 1975.