

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia

EFEITO HIPERPOLARIZANTE DO ISOPROTERENOL NA
MEMBRANA DA CÉLULA DE SERTOLI DE RATOS IMATUROS:
ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES β_2 -ADRENÉRGICOS E DOS
CANAIS K^+ _{ATP}

Ana Paula Jacobus

Orientadora
Prof^a . Dr^a . Eloísa Da Silveira Loss

Dissertação de Mestrado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre.

Porto Alegre, (RS), Julho de 2004

*“Teorias nada mais são que verdades parciais e temporárias que
necessitamos,
como etapas, na investigação ao progresso...
O essencial princípio da experimentação está, portanto, na dúvida, aquela
dúvida filosófica que permite ao espírito liberdade e iniciativa...”*

Claude Bernard, 1865

*Ao meu amor, Alex, pelo apoio, carinho,
compreensão e por dividir
seus momentos e suas conquistas comigo.*

*À Maria Fernanda, por existir na minha vida
trazendo luz e brilho a todos os meus dias,
e ajudar a tornar-me uma pessoa melhor*

*À Professora Eloísa pela sua amizade,
incentivo, generosidade e dedicação
em todos os momentos
do nosso convívio*

*Ao Professor Wassermann por seus ensinamentos de vida;
por ser exemplo profissional e humano;
e por mostra-me que ciência se faz com dedicação e humildade.*

AGRADECIMENTOS

A Zaquer Costa, Débora Olmedo Rodrigues e Paola Borba, por me ajudarem na produção deste trabalho com amizade, companheirismo, dedicação e por partilharem cada dia comigo;

Ao professor Marcelo Grillo por todo o apoio e amizade durante este tempo de convívio;

Às colegas do Laboratório, Adriana e Márcia pela amizade e pelo apoio.

À Elsa Pires e à Alice pela atenção e carinho oferecido.

Aos Meus Pais Estela e Fleurivan pelo grande exemplo de vida, de luta e trabalho, pelo carinho que me oferecem e pela ajuda que sempre me dispensaram;

À minha irmã Daniela pela amizade e pelos momentos partilhados;

Às seguintes instituições pelo apoio financeiro: CNPq, **CAPES**, FAPERGS e PROPESQ-UFRGS.

ÍNDICE

1. OBJETIVOS	12
2. INTRODUÇÃO	13
2.1. CONTROLE DA FUNÇÃO TESTICULAR	13
2.1.1 <i>Controle Neuroendócrino</i>	13
2.1.2 <i>Inervação Testicular e Controle Adrenérgico</i>	15
2.1.2.1. Catecolaminas.....	17
2.1.2.1.1 Biosíntese de catecolaminas.....	17
2.1.2.2. Receptores Adrenérgicos	20
2.1.3 <i>Receptores β-Adrenérgicos</i>	23
2.1.3.1. Mecanismo de Ação	23
2.2. AÇÃO ADRENÉRGICA NOS TÚBULOS SEMINÍFEROS	26
2.3. CANAIS DE POTÁSSIO DEPENDENTES DE ATP (K^+_{ATP})	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1 MATERIAIS	35
3.1.1 <i>Animais</i>	35
3.1.2 <i>Soluções</i>	35
3.1.2.1 Tampão Krebs Ringer Bicarbonato (KRb).....	35
3.1.3 <i>Substâncias utilizadas</i>	37
3.2 MÉTODOS	37
3.2.1 <i>Eletrofisiologia</i>	37
3.2.1.1 Preparação dos Túbulos Seminíferos	37
3.2.1.2 Preparação do Microeletrodo	39
3.2.1.3 Equipamento e procedimento Eletrofisiológico.....	41
3.2.1.4 Cálculo da intensidade do Pulso aplicado	44
3.2.1.5 Cálculo da Resistência da Membrana	45
3.2.3 <i>Análise Estatística</i>	46
4. RESULTADOS	47
5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	66
6. CONCLUSÕES	72
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

LISTA DE ABREVIATURAS:

LH: Hormônio Luteinizante
FSH: Hormônio Folículo Estimulante
LHRH: Hormônio Liberador de Hormônio Luteinizante
GnRH: Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
SSN: Nervos Espermáticos Superiores
ISN: Nervos Espermáticos Inferiores
TH: Tirosina Hidroxilase
PNMT: Feniletanolamina-N-Metiltransferase
GPCR: Receptor acoplado a proteína G
N-terminal: Terminal Amino
C-terminal: Terminal Carboxila
 α : alfa
 β : beta
 γ : gama
GDP: Guanosina difosfato
GTP: Guanosina Trifosfato
 Ca^{2+} : íon cálcio
 $^{45}\text{Ca}^{2+}$: íon cálcio marcado radiotivamente
AMPc: Adenosina monofosfato cíclica
PKA: Proteína quinase A
PKC: Proteína quinase C
PIK₃: Fosfatidil Inositol-3-quinase
SCE: Enriquecido em Células de Sertoli
CCDV: Canais de Cálcio Dependentes de Voltagem
 K^+_{ATP} : Canais de Potássio Dependentes de ATP
 K^+_{ir} : Canais de Potássio Retificadores de Influxo
ATP: Adenosina Trifosfato
ADP: Adenosina Difosfato
M₁: Região Transmembrana 1
M₂: Região Transmembrana 2
M: Molar
mM: Milimolar
 μM : Micromolar
DMSO: Dimetilsulfóxido
mV: Milivolts
V: Volts
Hz: Hertz
ms: Milissegundos
mL: Mililitros
A: Ampére
nA: Nanoampére
I: Corrente
Ag: Prata
AgCl: Cloreto de Prata
KCl: Cloreto de Potássio
 Ω : Ohm

MΩ: Megaohms
pH: Potencial de Hidrogênios
KRb: Solução de Krebs
PLC: Fosfolipase C
DAG: Diacilglicerol
IP₃: Inositol-3,4,5-Trifosfato
PI: Fosfatidil Inositol
PIP: Fosfatidil Inositol-4-Fosfato
PIP₂: Fosfatidil Inositol-4,5-Bisfosfato
MgADP: Magnésio ligado a Adenosina Difosfato
SUR: Receptor de Sulfoniluréia
NBF: Sítio de Ligação a nucleotídeo
ABC: Proteínas cassete

LISTA DE FIGURAS

Fig 2.1.: Biossíntese de catecolaminas

Fig 2.2.: Esquema da estrutura e localização dos receptores alfa adrenérgicos na fenda sináptica

Fig 2.3.:(A) Esquema gráfico do receptor acoplado a proteína G no estado ativado ligado a GTP; **(B)** Estrutura tridimensional do receptor β -adrenérgico mostrando sítio de ligação ao agonista

Fig 2.4.: Classificação dos diferentes subtipos de canais de potássio retificadores de influxo(K_{ir})

Fig 2.5.: Representação da estrutura dos canais K⁺_{ATP} com suas diferentes subunidades (K_{ir} e SUR) (A) Adaptada de Baukowitz e Fakler, 2000; (B) Adaptada de Wassermann & Loss, 2004.

Fig 2.6.: Hidrólise de PIP₂ por ação de PLC gerando IP3 e DAG

Fig 3.1.: Câmara de perfusão com túbulos seminíferos fixados ao fundo.

Fig 3.2.: Câmara de Perfusão, onde podem ser observados, à esquerda eletrodo de referência (Ag/AgCL) e à direita o eletrodo de registro, conectado ao “holder”, ambos imersos na preparação.

Tabela 2.1. Afinidade dos receptores adrenérgicos com agonistas simpáticos.

Tabela 3.1. Composição salina e concentrações presentes nas soluções estoque de KRb e na solução final.

RESUMO

No presente estudo, foi investigado o mecanismo pelo qual, o isoproterenol hiperpolariza o potencial de membrana (PM) da célula de Sertoli em túbulos seminíferos de ratos, com quinze dias de idade (imaturos). Foram analisadas a modificação do potencial de membrana e a resistência, utilizando-se a técnica de registro intracelular.

O isoproterenol ($2 \times 10^{-6} \text{M}$) induziu uma hiperpolarização imediata e significativa na membrana da célula de Sertoli. O antagonista β_2 -adrenérgico butoxamina ($1 \times 10^{-6} \text{M}$) anulou a ação do isoproterenol. O antagonista β_1 -adrenérgico metoprolol ($1 \times 10^{-6} \text{M}$) teve efeito de reduzir a ação do isoproterenol, porém sem ser significativo.

A inibição dos canais K^+_{ATP} , com a sulfoniluréia glibenclamida, suprimiu a ação do isoproterenol. A testosterona, a qual atua despolarizando o potencial de membrana, através do fechamento de canais K^+_{ATP} , via PLC-PIP₂, impediu a hiperpolarização produzida pelo agonista β -adrenérgico. Os polycations como: espermina e LaCl_3 (cloreto de lantânio) reverteram o efeito hiperpolarizante do isoproterenol, despolarizando o potencial de membrana, provavelmente através de interações iônicas que neutralizam a ação do agonista β -adrenérgico nos canais K^+_{ATP} .

O agonista da adenilato ciclase, forskolina ($1 \times 10^{-7} \text{M}$), rapidamente hiperpolariza o potencial de membrana da célula de Sertoli, mimetizando o efeito do isoproterenol; db-AMPC também hiperpolariza o potencial de membrana destas células. Estes efeitos indicam que o isoproterenol age nos canais K^+_{ATP} , provavelmente, envolvendo a cascata: receptor β -adrenérgico/Gs/AC/AMPC/PKA.

Estes resultados sugerem que a hiperpolarização induzida por isoproterenol é mediada pela abertura de canais K^+_{ATP} , em células de Sertoli. Esta hiperpolarização β -adrenérgica, provavelmente, tem um papel fisiológico, na modulação do potencial de membrana, opondo-se à despolarização produzida pela testosterona, através do fechamento dos canais K^+_{ATP} .

1. OBJETIVOS

- Estudar a resposta eletrofisiológica da ativação do receptor β -adrenérgico na membrana das células de Sertoli:
 - observando a ação do agonista β inespecífico, isoproterenol, em diferentes concentrações;
 - verificando qual subtipo de receptor está envolvido nesta resposta, utilizados para tal, antagonistas específicos, metoprolol (β 1) e butoxamina (β 2).
- Verificar o envolvimento de canais K^+_{ATP} na ação do isoproterenol:
 - verificando se a modulação da atividade deste canal com sulfoniluréias e polications altera a resposta ao agonista β -adrenérgico;
- Verificar o envolvimento da via Adenilato Ciclase/AMPC nesta sinalização β -adrenérgica nas células de Sertoli, observando o efeito de agentes que modulam a concentração de AMPC sobre a ação do isoproterenol.

2. INTRODUÇÃO

2.1. CONTROLE DA FUNÇÃO TESTICULAR

2.1.1 Controle Neuroendócrino

A função testicular pode ser simplificada e dividida em duas principais atividades: a produção de testosterona pelas células de Leydig (esteroidogênese) e a produção de espermatozóides pelos túbulos seminíferos (espermatogênese). Estas funções são reguladas fundamentalmente por dois hormônios, LH (hormônio luteinizante) e FSH (hormônio folículo estimulante), respectivamente.

Os hormônios gonadotróficos, LH e FSH, são produzidos pela hipófise e secretados na corrente sanguínea agindo, respectivamente, nas células de Leydig e nas células de Sertoli.

O controle da liberação destes hormônios é feito pelo hipotálamo, por células localizadas na área anterior e medial do hipotálamo e na área pré-óptica, em primatas, também se localizam na porção basal média e no núcleo arcuado. As terminações nervosas secretoras, que promovem a secreção pulsátil de LHRH (ou GnRH) (hormônio liberador de hormônio luteinizante ou hormônio liberador de gonadotrofinas), projetam-se para a vasculatura portal, atingindo a circulação porta-hipotalâmica-hipofisiária na porção lateral da eminência média, entrando em contato com gonadotrofos na hipófise (McCann & Ojeda, 1996), que são as células produtoras e secretoras de LH e FSH. A frequência e a amplitude dos pulsos de LHRH são importantes na secreção diferencial de LH e FSH. A secreção pulsátil de LH e de FSH é mantida com um pulso de LHRH por hora, quando a frequência é aumentada. Elevando o

número de pulsos de LHRH por hora, inicia-se um aumento nos pulsos de LH e conseqüentemente, eleva-se a concentração sangüínea de LH (Reichlin, 1992). Em contraste, quando a freqüência de pulsos de LHRH diminui a uma vez a cada 3 horas, a secreção de FSH é preferencialmente estimulada (Reichlin, 1992). Juntamente à estimulação hipotalâmica, a secreção de LH e FSH também é regulada através de retroalimentação por esteróides, como testosterona, e peptídeos gonadais, como a inibina e a ativina, estes últimos, secretados pela célula de Sertoli sob ação do FSH. Tanto a testosterona, quanto a inibina exercem um controle sobre a hipófise e o hipotálamo, formando uma alça de retroalimentação negativa, enquanto que a ativina, tem um efeito de retroalimentação positiva sobre a secreção de FSH. Desta forma, estabelece-se um complexo sistema de comunicação neuroendócrino o qual regula, em machos, o comportamento sexual e a produção de espermatozóides. Entretanto, as gônadas estão sujeitas à regulação independente do eixo hipotálamo-hipófise-testículos exercidas por outros fatores, entre os quais, fatores de crescimento e neurotransmissores, produzidos localmente, como as catecolaminas. (Mayerhofer, 1999).

As catecolaminas estão presentes em concentrações relativamente altas, nas gônadas, suficientes para ativar seus receptores nos diversos tipos celulares presentes no interstício e nos túbulos seminíferos. Exercem uma importante função na regulação das células testiculares, que resulta em uma confluência de fatores, os quais regulam a função gonadal (Mayerhofer, 1999).

2.1.2 Inervação Testicular e Controle Adrenérgico

As gônadas recebem uma densa inervação simpática. As gônadas de mamíferos machos têm inervações sensoriais e eferentes do gânglio espinal e do plexo paravertebral. Fibras convergem para o testículo ao longo de duas vias principais: os nervos espermáticos superiores (SSN) e os nervos espermáticos inferiores (ISN) (Setchell, 1994).

Os SSN derivam dos plexos mesentérico e renal, acompanhando a artéria testicular, enquanto os ISN, originados do plexo pélvico e mesentérico inferior, acompanham o canal deferente e penetram o epidídimo (Setchell, 1994). Esta inervação é predominantemente simpática e as fibras pós-ganglionares tem como neurotransmissor a noradrenalina.

Nos testículos, os nervos adrenérgicos podem ser achados no tecido intersticial, em associação com vasos sanguíneos, particularmente na cápsula ou próximo a ela (Bell e McLeam, 1973). Estudos de ultraestrutura reportam a presença de terminais adrenérgicos na lâmina própria dos túbulos seminíferos (Prince, 1996).

Mayerhofer e colaboradores (1992) descreveram que as catecolaminas apresentam concentrações máximas, em testículos de hamsters, no primeiro dia após o nascimento, ocorrendo uma diminuição gradual pós-natal. A infusão de adrenalina, noradrenalina e isoproterenol (agonista β -adrenérgico), na artéria espermática, promove aumento da testosterona no leito vascular espermático do cão (EIK-Nes, 1969) e injeções sistêmicas de isoproterenol, resultam em hipertrofia das células de Leydig e aumento do peso dos testículos da ratos recém nascidos (Mayerhofer, 1992).

Os dados da literatura também mostram, que o efeito da desnervação e da injeção local de 6-hidroxidopamina, que destrói o terminal nervoso simpático no desenvolvimento do testículo de ratos, provocam uma redução gradual de 100% no peso dos testículos dos ratos, operados no 13^o dia e de 43% em ratos operados no 21^o dia, propondo um período crítico até os 15 dias de idade, onde o sistema adrenérgico estimularia o crescimento testicular, após estes 15 dias, a estimulação simpática poderia ser suplementada por atividade hormonal (Nagai, 1982). Utilizando 6-hidroxidopamina, os mesmos autores observaram que a simpatectomia local retarda o crescimento testicular.

Além da inervação extrínscica, recebida pelos testículos, Mayerhofer e colaboradores (1996) sugerem que haja uma fonte intragonadal de catecolaminas. Baseados em um estudo que demonstra em ovários de primatas uma rede de células como neurônios, onde algumas destas células apresentam enzimas envolvidas na síntese de catecolaminas (Dees 1995). Os autores relacionaram tal estudo, atentando para a possibilidade de haver uma fonte similar de catecolaminas nas gônadas masculinas. Eles demonstraram que os testículos de primatas, recebem estimulação catecolaminérgica dual, proveniente de inervação extrínscica, já bem demonstrada, e outra de células, localizadas na própria gônada. Onde a ação desta última, ocorre, predominantemente no período pré-puberal, em relação à vida adulta do animal (Mayerhofer, 1996).

Outros estudos corroboram com esta hipótese, onde foi observada uma concentração catecolaminérgica maior, nos testículos na idade pré-puberal, do que no adulto (Zieher, 1971).

2.1.2.1.Catecolaminas

As catecolaminas são neurohormônios liberados pelo sistema nervoso central e pela medula supra renal, atuam na regulação de inúmeras funções fisiológicas, em particular, na integração das respostas a uma grande variedade de fatores estressantes que, de outra forma, poderiam ameaçar os mecanismos homeostáticos (Hoffmann, 2003).

A noradrenalina ou norepinefrina é o principal neurotransmissor no sistema simpático periférico, enquanto adrenalina ou epinefrina, constitui o principal hormônio secretado pela medula supra-renal nos mamíferos. A dopamina é a terceira catecolamina de origem natural, é encontrada, predominantemente, nos gânglios da base do sistema nervoso central porém, já foram identificadas terminações nervosas, bem como receptores dopaminérgicos, no sistema nervoso central e periférico (Hoffmann, 2003).

2.1.2.1.1 Biosíntese de catecolaminas

As catecolaminas são sintetizadas a partir da hidroxilação da tirosina (ver figura 2.1), reação catalizada pela tirosina-hidroxilase (TH). Esta síntese foi proposta por Blaschko, em 1939 onde a hidroxilação da tirosina é etapa limitante da velocidade de biossíntese das catecolaminas (Hoffmann, 2003).

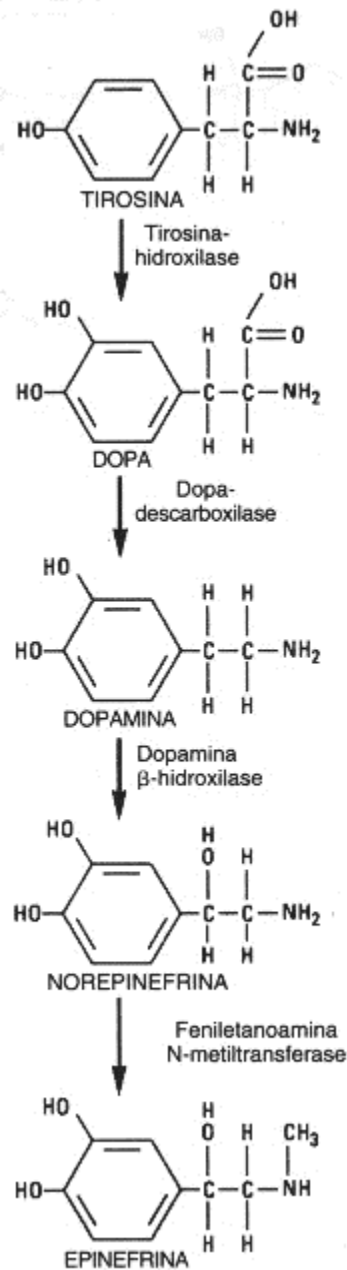


Fig 2.1.: Biossíntese de catecolaminas

As enzimas que participam da síntese da noradrenalina são sintetizadas nos corpos celulares dos neurônios adrenérgicos e transportadas até as terminações nervosas. A síntese ocorre a partir da hidroxilação da tirosina em DOPA e a descarboxilação da DOPA em dopamina, sendo que estas reações, ocorrem no citoplasma. Aproximadamente, metade da dopamina, formada no citoplasma, é transportada ativamente para as vesículas de armazenamento,

que contém a enzima β -hidroxilase, a qual converte dopamina em noradrenalina (Hoffmann, 2003).

A medula adrenal possui dois tipos celulares distintos, que contém catecolaminas, aqueles com noradrenalina e aqueles com adrenalina (Wassermann e Tramezzani, 1963). As células produtoras de adrenalina, além da enzima que converte dopamina em noradrenalina (β -hidroxilase), também contém a enzima feniletanolamina-N-metiltransferase (PNMT), convertendo a noradrenalina em adrenalina. Nestas células, a noradrenalina formada nos grânulos, é liberada para o citoplasma, onde é metilada, formando adrenalina. A adrenalina, então, retorna para os grânulos cromafins, onde é armazenada até a sua secreção (Hoffmann, 2003).

2.1.2.2. Receptores Adrenérgicos

As catecolaminas exercem suas ações na célula-alvo, interagindo com receptores de membrana específicos. Os receptores adrenérgicos fazem parte da superfamília de receptores acoplados à proteína G (GPCR), os quais, são caracterizados por apresentarem sete domínios transmembrana, importantes na transdução de sinal; uma porção N-terminal extracelular, responsável pelo reconhecimento do ligante e internalização da sinalização; e uma porção C-terminal intracelular, que faz a transdução do sinal, estando acoplada à proteína G.

Embora sejam relacionados estruturalmente, os diferentes receptores adrenérgicos regulam distintos processos fisiológicos, controlando processos de sinalização celular.

Ahlquist (1948) propôs, pela primeira vez, a existência de mais de um receptor adrenérgico. Ele baseou seus estudos nas diferenças de capacidade das catecolaminas endógenas e agonistas simpatomiméticos, ao regularem processos fisiológicos. Propondo, desta forma, as designações α e β para os receptores que produziam no músculo liso, respostas excitatórias e inibitórias, respectivamente, por estímulo das catecolaminas. Estes receptores estão representados na tabela 2.1 em relação a sua afinidade com os agonistas adrenérgicos

Tabela 2.1. Afinidade dos receptores adrenérgicos com agonistas simpáticos

Tipo de receptor	Afinidades dos agonistas adrenérgicos
Receptores α -adrenérgicos	Adrenalina \geq noradrenalina \gg isoproterenol
Receptores β -adrenérgicos	Isoproterenol $>$ Adrenalina \geq noradrenalina

Em estudos posteriores, os receptores β -adrenérgicos foram subdivididos em β_1 e β_2 , devido a sua afinidade com as catecolaminas e ao desenvolvimento de antagonistas, específicos para cada subtipo (Lands, 1967).

Além destes, já foram identificados outros dois subtipos de receptores β -adrenérgicos, β_3 e β_4 , que são chamados de receptores atípicos, por não interagirem com o antagonista propranolol (Strosberg, 1997). Os receptores β_3 parecem estar envolvidos na regulação do metabolismo de ácidos graxos (Granneman, 2001; Philipson, L.H. 2002). Receptores β_4 já foram isolados, clonados e caracterizados, alguns autores descrevem que, receptores adrenérgicos β_4 , são um estado modificado de receptores adrenérgicos β_1 (Granneman, 2001)

Também está demonstrada a heterogeneidade dos receptores α -adrenérgicos. A diferenciação inicial era baseada em considerações anatômicas e funcionais, pois se acreditava que noradrenalina e agonistas α -adrenérgicos, inibiam a própria liberação de noradrenalina pelos neurônios (Starke, 1987). Na realidade este efeito inibitório, por retroalimentação negativa da noradrenalina, é mediado por receptores α adrenérgicos pré-sinápticos, diferentes dos receptores α adrenérgicos pós-sinápticos clássicos. A estes receptores α -adrenérgicos pré-sinápticos foi dada a designação α_2 -adrenérgicos

e aos pós sinápticos, com efeitos excitatórios, chamou-se α_1 (Hoffmann, 2003) (fig 2.2.).

Na literatura, também está evidenciada uma maior heterogeneidade dos receptores α_1 e α_2 adrenérgicos (Scofield e col, 2002). Estudos, utilizando clonagem molecular, levaram a identificação de nove subtipos de receptores adrenérgicos (Philipp & Hein, 2004). Segundo estes autores houve confusão no passado a respeito da nomenclatura e divisão dos subtipos de receptores, porém, no momento atual, há consenso a respeito da terminologia destes nove grupos sendo α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} , α_{2A} , α_{2B} , α_{2C} , β_1 , β_2 e β_3 , embora não se tenha determinadas as precisas funções fisiológicas para todos os subtipos clonados, devido à carência de ligantes seletivos.

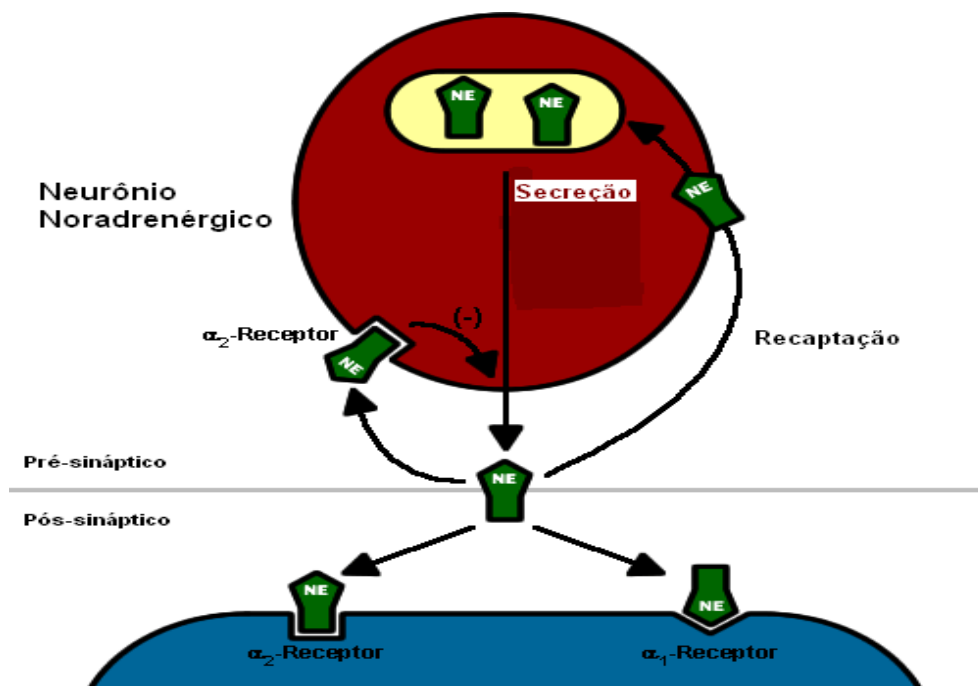


Fig2.2.:Esquema da estrutura e localização dos receptores alfa adrenérgicos na fenda sináptica

2.1.3 Receptores β -Adrenérgicos

2.1.3.1. Mecanismo de Ação

Os receptores β -adrenérgicos pertencem, como já descrito, à superfamília dos receptores acoplados a proteína G (GPCR).

Os GPCR são estruturas que tem sete domínios transmembrana, uma porção N-terminal extracelular e uma porção C-terminal intracelular. Os segmentos transmembrana têm a estrutura de α -hélice interconectada por alças alternadas extra e intracelular, formando uma estrutura heptahélica (Wong, 2003) (Fig 2.3). Interagindo com o terminal carboxila intracelular, a proteína G tem uma estrutura globular e é composta por 3 subunidades α , β e γ .

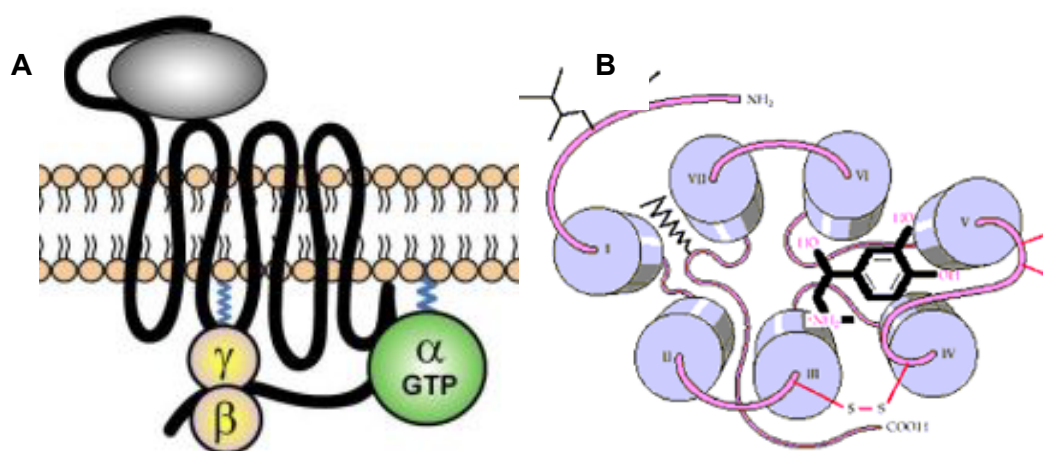


Fig 2.3.: (A) Esquema gráfico do receptor acoplado à proteína G no estado ativado ligado à GTP; (B) Estrutura tridimensional do receptor β -adrenérgico mostrando sítio de ligação ao agonista.

Um sinal extracelular dispara resposta intracelular, através de sua ligação ao GPCR, no caso, um receptor β -adrenérgico, interagindo com seu

sítio específico na superfície da membrana (ver fig 2.3A e. 2.3B). O agonista, ligado ao receptor, ativa a proteína G que está composta por um heterotrímero $\alpha\beta\gamma$. No seu estado basal, não ativado, a proteína G está ligada a GDP através da subunidade α que está fortemente associada a subunidade $\beta\gamma$. Após a ativação a subunidade α troca a ligação GDP por GTP no seu sítio de ligação ao nucleotídeo guanina, com subsequente dissociação da subunidade $\beta\gamma$. Ambos, $G\alpha$ e $G\beta\gamma$ regulam atividades de efetores intracelulares subsequentes (Wong, 2003).

Wong e colaboradores (2003) classificaram uma grande variedade de subunidades α identificadas dividindo-as em 4 subfamílias:

- 1)Subfamília G_s :que estimula adenilato ciclase (G_s e G_{olf}).
- 2)Subfamília $G_{i/o}$: que inibe a adenilato ciclase e regula canais iônicos (G_{i1} , G_{i2} , G_{i3} , G_{o1} , G_{o2} , G_{o3} , G_z , G_{t1} , G_{t2} e G_{gust}).
- 3)Subfamília $G_{q/11}$: ativa fosfolipase C β (G_q , G_{11} , G_{14} e $G_{15/16}$).
- 4)Subfamília $G_{12/13}$: que ativa a via trocadora de Na^+/H^+ (G_{12} e G_{13}).

Dependendo do subtipo da subunidade α da proteína G, esta pode interagir com receptor sozinha ou associada a outros efetores.

O complexo $\beta\gamma$ que ancora a subunidade α à membrana, também pode regular canais iônicos. Várias isoformas de subunidades β e de subunidades γ já foram identificadas. A combinação dos diferentes subtipos de subunidades α , β e γ promovem uma grande diversidade de vias de sinalização que podem ser reguladas pelos GPCR (Wong, 2003). Alguns autores também postulam que a transdução do sinal, a especificidade da resposta e a seletividade dos efetores subsequentes à ativação do receptor sejam consequência da compartimentalização celular dos elementos de sinalização (Jo, 2002)

Davare e colaboradores (2000) comunicaram, que em neurônios de hipocampo os receptores β_2 -adrenérgicos, encontram-se diretamente associados com um dos seus efetores finais: o canal de Ca^{2+} tipo L – $\text{Ca}_v 1.2$. Este complexo está, também, composto por proteína G, Adenil Ciclase, AMPc, PKA e a fosfatase PP2A. Registros eletrofisiológicos dos neurônios demonstraram uma transdução de sinal direta e altamente localizada do receptor adrenérgico ao canal iônico.

As catecolaminas interagem com seus receptores cognatos na porção N-terminal, ativando, tanto em receptores β_1 como em receptores β_2 adrenérgicos, proteínas Gs, que levam a ativação da adenilato ciclase, produção de AMPc e fosforilação de diversos substratos, pela proteína quinase A (PKA), incluindo canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L, levando a aumento de cálcio intracelular, que será sinalizador de diversos processos intracelulares (Xiang & Kobilka, 2003). Além da ligação a Gs, receptores β_2 adrenérgicos interagem com os GPCR, acoplados a proteína G_i , a qual inibe adenilato ciclase. O papel específico dos efetores subsequentes ainda não está muito claro. Estudos sugerem que fosfatidilinositol-3 quinase (PIK_3) pode ser ativada pela subunidade $G\beta\gamma$ (Xiang & Kobilka, 2003; Jo 2002).

2.2. AÇÃO ADRENÉRGICA NOS TÚBULOS SEMINÍFEROS

A presença de receptores adrenérgicos e suas ligações a eventos fisiológicos nos testículos têm sido sugerida, desde que se observou, que as catecolaminas estimulavam a produção de AMPc em homogenados testiculares (Jahnsen e col, 1984) e em células de Leydig purificadas (Cooke, 1982). Além disto, foi relatado o envolvimento das catecolaminas na redução e no aumento dos níveis de testosterona plasmática, por estas aminas (Gotz, 1983, Eik-Nes, 1969). As catecolaminas, também estimulam a secreção de andrógenos, em testículos decapsulados (Anakewe & Morger, 1984a) e em cultura de células de Leydig (Cooke, 1982). Posteriormente, demonstrou-se que as catecolaminas atuavam nas células de Leydig, via receptores β_2 -adrenérgicos (Anakewe e Morger, 1984b).

Em células de Sertoli, tem sido demonstrado que agonistas β -adrenérgicos, podem estimular a adenil ciclase e a produção de AMPc (Heindel e col, 1981; Tolszczuk e col, 1988; Eikvar e col., 1993 Troispoux e col, 1998) ou a síntese protéica (Wassermann e col, 1996).

As catecolaminas, também aumentam a produção de lactato e piruvato (Hanson, 1983) e estimulam a produção de proteína quinase em cultura de células de Sertoli de ratos (Tash, 1980).

Kierzembaum (1985) sugeriu, que células de Sertoli, adquiriam receptores adrenérgicos, quando em cultura, porém Tolszczuk e colaboradores (1988) confirmaram que ratos adultos possuem receptores β -adrenérgicos em células de Sertoli *in vivo*, após criptorquidismo. Em 1990, Skinner e Heindel

verificaram que hamsters tinham receptores β -adrenérgicos em células de Sertoli, sustentando um papel fisiológico para as catecolaminas nesta célula.

O subtipo de receptor envolvido, nas ações agonistas β -adrenérgicas em células de Sertoli, parece depender do fenômeno estudado e dos parâmetros utilizados. Em cultura destas células, Heindel e colaboradores (1981) e Eikvar e colaboradores (1993) tem observado, predominantemente, a expressão do subtipo β_1 , Tolszczuk e colaboradores (1988) observaram, com autorradiografia de testículo, que a maioria de receptores seriam do subtipo β_2 . Wassermann e colaboradores, utilizando testículos SCE (enriquecidos em células de Sertoli), descreveram a ação predominante de receptores β_1 , no estímulo do transporte de aminoácidos. Troispoux e colaboradores (1998) demonstraram que, em isolados frescos, sem ação enzimática, a maioria dos receptores expressados por células de Sertoli era do subtipo β_2 em relação aos β_1 , e que não havia subtipo β_3 expressado.

Em células de Sertoli, agonistas β -adrenérgicos (adrenalina e isoproterenol) estimularam a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, através dos CCDV tipo L, ocasionando em um aumento do transporte de aminoácidos pelo Sistema A (Loss e colaboradores, 1998).

Alguns estudos ao mensurar a importância do FSH no controle da função da célula de Sertoli, sugeriram que a infertilidade masculina é pouco afetada na ausência de FSH. Estas observações sugerem a existência de vias de transdução redundantes, levando a preservação da função da célula de Sertoli, talvez por estímulo adrenérgico, no período pré-puberal (Troispoux e col, 1998).

Em outros sistemas celulares, numerosos exemplos têm sido descritos, onde pares agonista/receptores acoplados à proteína G, apresentam habilidade para ativar a via do AMPc interagindo com um GPCR, que não é o seu específico (Wong,2003; Vassart,2004).

Um envolvimento direto do sistema β -adrenérgico, na modulação dos efeitos do FSH, em células de Sertoli, através de dessensitização heteróloga, também tem sido descrito (Laurent-Cadoret, 1994). Portanto, um papel potencial para as catecolaminas seria a modulação da sensibilidade das células de Sertoli ao FSH, através de mecanismos de dessensitização heteróloga. De fato já está bem documentado que agonistas β -adrenérgicos tem habilidade para desacoplar, funcionalmente, receptores transmembrana de FSH, da subunidade $G\alpha_s$ da proteína G, associada ao receptor protéico (Verhoeven, 1980; Attramadal, 1984).

Estas observações e a existência de terminais simpáticos, secretores de noradrenalina, localizados na lâmina própria dos túbulos seminíferos, juntamente com a capacidade de agonistas β -adrenérgicos em estimularem a produção da adenilato ciclase e de AMPc, síntese proteica e transporte de aminoácidos, em ratos imaturos e ainda que, a concentração de noradrenalina é alta, nos túbulos seminíferos, durante a fase proliferativa da célula de Sertoli (período pré-puberal), em relação a fase adulta (Zieher,1971) levam a questionar quanto à relevância fisiológica dos receptores β -adrenérgicos, em células de Sertoli, a qual sub-tipo pertencem os receptores e a que subtipo de proteína G estariam acoplados.

Estudos de nosso laboratório, utilizando a técnica de registro intracelular demonstraram que isoproterenol produz uma rápida e sustentada

hiperpolarização, dependente da dose, nas células de Sertoli, em ratos imaturos (Loss e col, 1998).

Com a utilização de técnica similar Nakashima e Vanhoutte (1995) demonstraram que o isoproterenol causa, em musculatura lisa vascular da veia safena de cães, hiperpolarização, através da abertura de canais K^+_{ATP} e Fujii e colaboradores (1999), usando artérias mesentéricas isoladas, também verificaram que a hiperpolarização, evocada por isoproterenol, ocorre por abertura de canais de K^+_{ATP} .

Em trabalhos recentes, Von Ledebur e colaboradores (2002) e Loss e colaboradores (2004), descreveram que a sulfoniluréia glibenclamida despolariza a membrana, fechando canais K^+_{ATP} , além de aumentar a captação de $^{45}Ca^{2+}$ e o transporte de aminoácidos, em células de Sertoli de testículos de ratos imaturos. A testosterona teve um efeito eletrofisiológico similar, onde evocou uma despolarização da membrana da célula de Sertoli *per se*, a qual foi anulada, na presença de diazoxida, agonista de canal K^+_{ATP} . Estes resultados indicam a presença destes canais nas células de Sertoli e apontam para a possibilidade de um importante papel fisiológico dos canais K^+_{ATP} nestas células.

2.3. CANAIS DE POTÁSSIO DEPENDENTES DE ATP (K^+_{ATP})

O fluxo de potássio, através das membranas, é determinante na geração do potencial de repouso da célula. A permeabilidade ao potássio no repouso é muitas vezes maior que aos demais íons, o que resulta em um valor do potencial de repouso celular, próximo ao do potencial de equilíbrio para o potássio (Schwartz, 1995).

Há uma grande variedade de isoformas de canais de potássio, reguladas por distintos fatores, entre os quais, está o canal de potássio retificador de influxo (K_{ir}). Os canais K_{ir} compreendem uma superfamília de canais protéicos, que são expressos em diversos tecidos (incluindo o testículo) e são responsáveis por importantes processos fisiológicos como excitabilidade celular, homeostasia do K^+ , secreção de insulina, tônus vascular, regulação da frequência cardíaca, entre outros. (Du e col, 2004; Schulze e col, 2003). Os canais K_{ir} regulam o potencial de repouso das células, através do fluxo transmembrana de K^+ , contrabalançando eventos que modifiquem o estado de repouso do potencial de membrana (Stanfield & Sutcliffe, 2003). Até agora os canais K_{ir} foram subdivididos em 7 subfamílias, entre elas está o canal de potássio dependente de ATP (K^+_{ATP}), que pertence à subfamília 6.x. (Du e col., 2004) (ver fig 2.4).

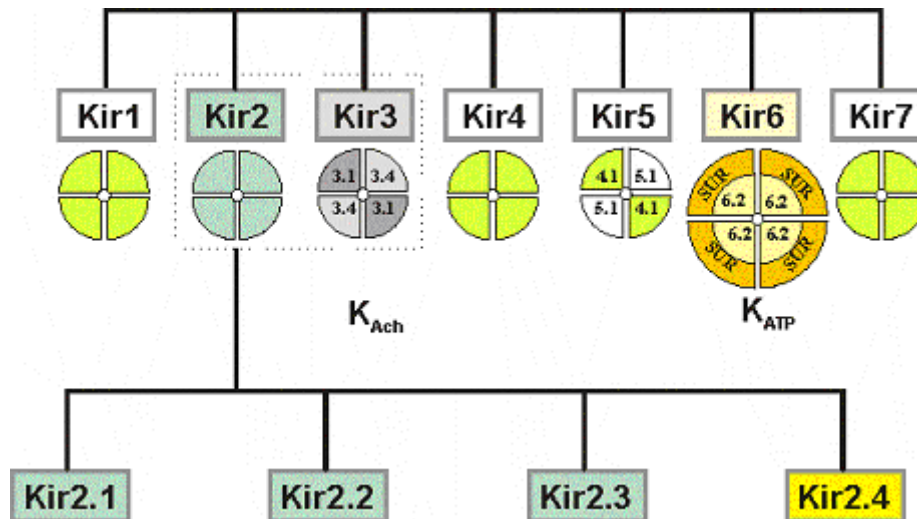


Fig 2.4. Classificação dos diferentes subtipos de canais de potássio retificadores de influxo (Kir)

Os canais de K_{ATP}^+ existem como um complexo heterooctamérico, contendo dois tipos distintos de subunidades protéicas. O canal de potássio retificador de influxo (K_{IR} 6.1 ou K_{IR} 6.2), que consiste de 4 subunidades, com duas regiões transmembrana cada (M1 e M2), formando um poro. Estes canais apresentam uma alça gerando um filtro de seletividade (Fig2.5). Tanto a região amino-terminal quanto a carboxi-terminal são intracelulares e passíveis de sofrerem influências de fatores regulatórios, como a proteína G, nucleotídeos e proteínas quinases (Quinn, 2003; Ashcroft, 2001). As subunidades SUR (receptores de sulfoniluréia,) são uma porção regulatória do canal e apresentam alças intracelulares com dois segmentos, com afinidade a nucleotídeos (NBF1 e NBF2), entre eles, MgADP. As subunidades SUR são membros da família de proteínas cassete (ABC,) que ligam ATP apresentando diversas isoformas (SUR 1, SUR2A, SUR2B) (Béguin e col., 1999; Baukrowitz e col., 2000; Brayden, 2000). Os canais K_{ATP}^+ conectam excitabilidade celular ao estado metabólico da célula em uma

grande variedade de tecidos. Os níveis intracelulares de ATP, ou a razão ATP/ADP variam a atividade do canal K^+_{ATP} ao agirem na subunidade K_{IR} , convertendo, desta forma, informação metabólica em excitabilidade da membrana (Kakei, 2003). Os canais K^+_{ATP} têm um complexo sistema regulatório intracelular, entre os fatores que compõem este sistema, está a alteração da concentração intracelular de ATP; o aumento desta concentração implica em fechamento do canal e conseqüente despolarização da membrana. Ao mesmo tempo, SUR age como uma subunidade regulatória sensível ao MgADP e a compostos farmacológicos, como as sulfoniluréias (Schulze,2003) (fig 2.5B).

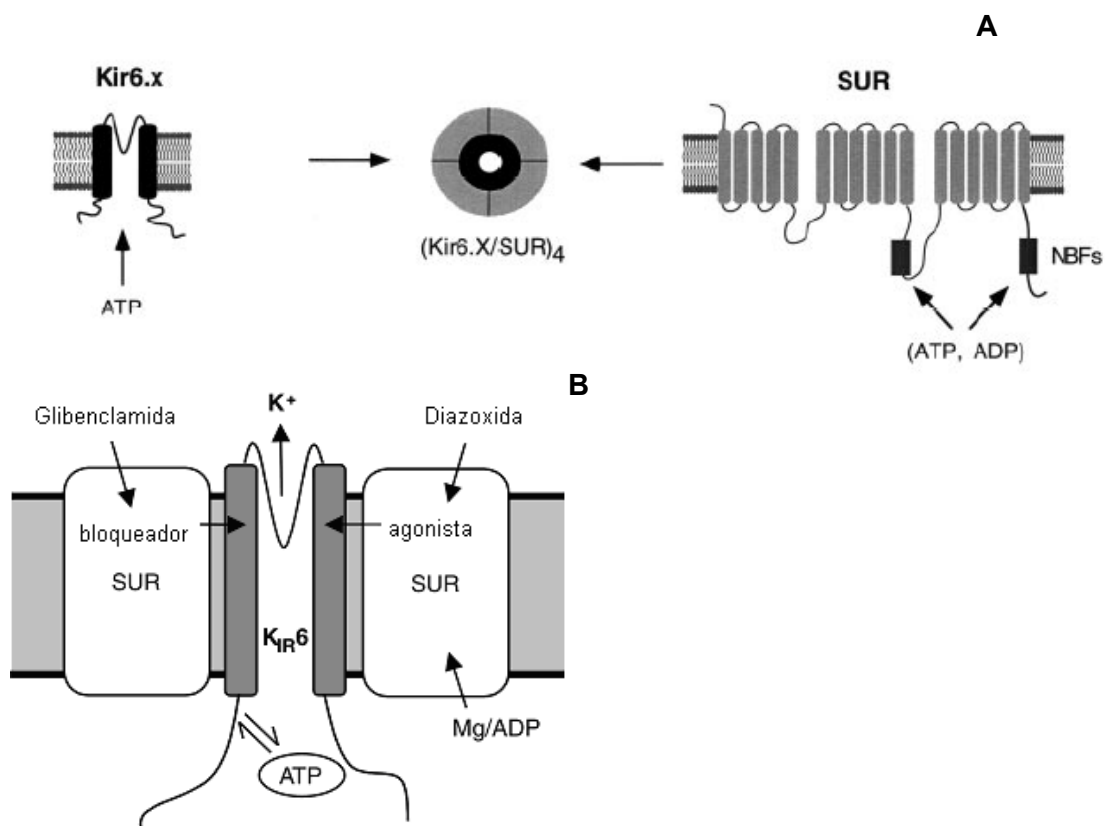


Fig 2.5.: Representação da estrutura dos canais K^+_{ATP} com suas diferentes subunidades (K_{IR} e SUR) (A) Adaptada de Baukrowitz e Fakler, 2000; (B) Adaptada de Wassermann & Loss, 2004.

Em recentes trabalhos, tem se demonstrando a grande importância do papel dos fosfolipídeos aniônicos de membrana, na modulação da atividade destes canais. Especificamente, tem se proposto o envolvimento do PIP₂ (fosfatidil inositol 4,5 bifosfato), nesta regulação, onde sua presença na membrana mantém o canal K⁺_{ATP} aberto (Baukrowitz, 2000; Quinn, 2003). PIP₂ é precursor do fosfatidil inositol (PI) com múltiplas funções em diversos tecidos. Sua hidrólise enzimática gera IP₃ (fosfatidil inositol-3-fosfato) e DAG (diacilglicerol) (Fig 2.7), além de reduzir o número de cargas negativas dos grupamentos fosfatos ligados à membrana ao liberar IP₃. Esta diminuição de cargas negativas diminui o impedimento do ATP intracelular em inibir a condutância do canal. Isto pode ser evidenciado em experimentos do grupo de Baukrowitz (2000), onde na presença de PIP₂ e ATP, o canal K⁺_{ATP}, apresentava uma alta condutância, quando se diminuía o número de grupamentos fosfatos (PIP, PI), também diminuía a condutância iônica do canal na presença das mesmas concentrações de ATP intracelular. Ao contrário, aplicações de polications reverteram à atenuação da sensibilidade ao ATP, aumentando a inibição da corrente de potássio, demonstrando uma regulação por interações iônicas (Takano, 2003). Fisiologicamente, o metabolismo de PIP₂ ocorre através da ativação de PLC (fosfolipase C), estimulada pelo receptor acoplado à proteína G_q, PLC ativa a hidrólise PIP₂, gerando IP₃ e DAG.

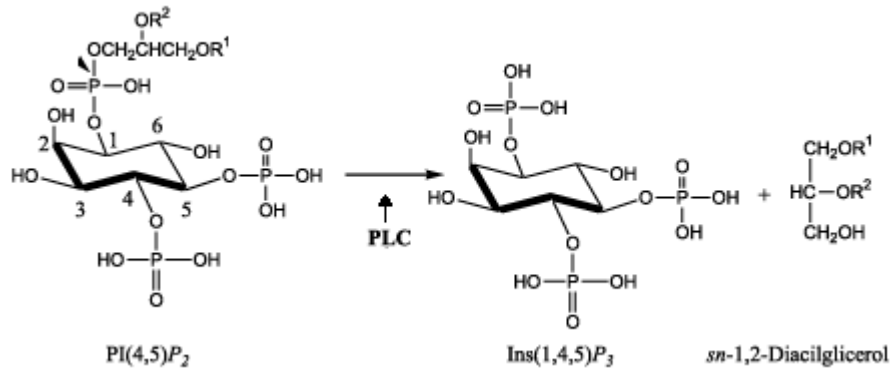


Fig 2.7.: Hidrólise de PIP_2 por ação de PLC gerando IP_3 e DAG

Esta regulação de canais K^+_{ATP} , através de fosfolipídeos de membrana, representa um efetivo mecanismo de controle da excitabilidade celular, através de vias de transdução de sinal, ligadas ao metabolismo de fosfolipídeos.

Quinn e colaboradores (2003) discutem a possibilidade de haver mecanismos distintos de regulação para as diferentes isoformas de $\text{K}_{\text{IR}} 6$, dados estabelecidos na literatura demonstram uma regulação dos canais K^+_{ATP} , mediada por proteínas quinases, porém, seus dados apontam para uma regulação diferencial das isoformas $\text{K}_{\text{IR}} 6.1$ e $\text{K}_{\text{IR}} 6.2$, onde foi demonstrada uma diferença na afinidade pelos fosfolipídeos e pelas proteínas quinase (Quayle, 1997). A isoforma $\text{K}_{\text{IR}} 6.1/\text{SUR2B}$ parece ser regulada por PKC onde os fosfolipídeos tem um papel como cofatores enzimáticos, em contraste ao $\text{K}_{\text{IR}} 6.2/\text{SUR2B}$, que parece ser regulada pela variação da concentração de PIP_2 na membrana, mas não por PKC.

Também foi descrito que PKA pode ser capaz de regular o K^+_{ATP} , através da via que ativa proteína Gs (Lyn e col., 2000; Béguin e col., 1999). Todos estes dados indicam que existe um complexo sistema regulatório na atividade dos canais K^+_{ATP} , que podem variar, de acordo com o tecido ou com o estímulo, sendo alvo de inúmeros fatores.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos imaturos com idade entre 14-16 dias de idade. Provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde – UFRGS. Os ratos ficavam com as mães até o momento do experimento. As mães eram mantidas com no máximo 8 filhotes em gaiolas individuais onde recebiam ração Purina, Nutripal (Porto Alegre -RS) e água “*ad libitum*”, com iluminação controlada em ciclos de 12horas e a temperatura controlada a aproximadamente 24°C.

3.1.2 Soluções

3.1.2.1 Tampão Krebs Ringer Bicarbonato (KRb)

Foi utilizado solução tampão Krebs-Ringer bicarbonato (KRb), como meio de incubação em todos os experimentos, preparado imediatamente antes da realização dos experimentos. Todos os reagentes eram de pureza ‘pró-análise’ (P.A) da *E. Merck* (Darmstadt, Alemanha). O preparo da solução foi feito a partir de soluções estoques conforme tabela 3.1.

	Concentração das Soluções Estoque		Concentração Final na Solução KRb (mM)
	(g/L)	(M)	
NaCl CLORETO DE SÓDIO	180,00	3,08	146
KCl CLORETO DE POTÁSSIO	9,20	0,123	4,7
KH₂PO₄ FOSFATO DE POTÁSSIO MONOBÁSICO	4,22	0,031	1,2
NaHCO₃ BICARBONATO DE SÓDIO	54,60	0,65	25
MgSO₄.7H₂O SULFATO DE MAGNÉSIO	7,64	0,031	1,2
CaCl₂.2H₂O CLORETO DE CÁLCIO	9,60	0,065	2,5
C₆H₁₂O₆ GLICOSE	25,00	0,14	5,5

Tabela 3.1 Composição salina e concentrações presentes nas soluções estoque de KRb e na solução final.

Para o preparo do KRb, foram misturados volumes iguais de cada solução estoque, acrescentando-se por último o sulfato de magnésio e o cloreto de cálcio. A solução era então avolumada com água destilada até o volume desejado, de modo a obterem-se as concentrações finais descritas na tabela 3.1. A solução era então gaseificada com carbogênio (O₂:CO₂, 95:5, v/v), até que se atingisse o pH de 7,4, monitorado em pHmetro. A solução assim obtida era mantida em gelo durante a preparação do experimento.

3.1.3 Substâncias utilizadas

Isoproterenol, testosterona, espermina, forskolin, butoxamina, metoprolol, ioimbina e N-6,2'-O-dibutiriladenosina-3',5'- monofosfato cíclico sódico (dibutiril-AMPC), foram adquiridos de Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA. A sulfoniluréia glibenclamida, Research Biochemicals International, Natick, MA, USA. LaCl₃ foi adquirido de Acros-organics, New Jersey, USA.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Eletrofisiologia

3.2.1.1 Preparação dos Túbulos Seminíferos

Os ratos foram sacrificados por deslocamento cervical. Os testículos foram imediatamente removidos por incisão abdominal e decapsulados. Um dos testículos, escolhido aleatoriamente, era esticado com duas pinças de maneira a isolar 4 a 8 túbulos seminíferos. Estes eram presos ao fundo da câmara de perfusão com auxílio de uma grade feita de fio ortodôntico. A câmara, cujo volume era de 1 mL, estava preenchida com KRb glicosado (figura 3.1).

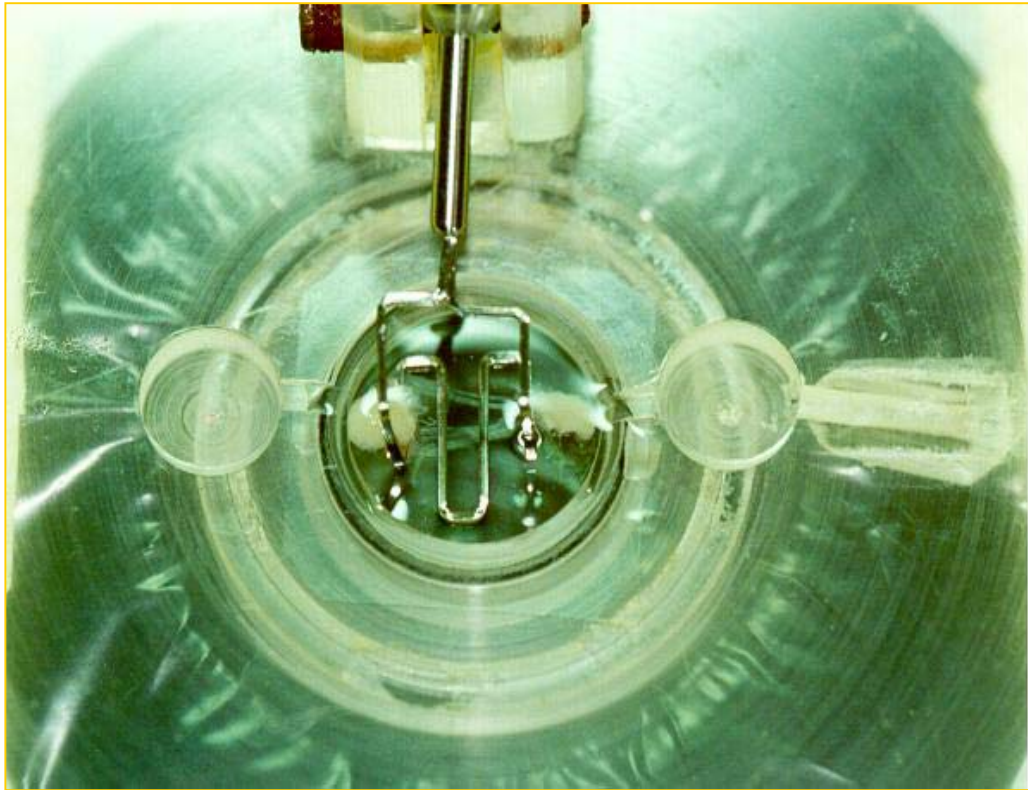


Fig 3.1.: Câmara de perfusão com túbulos seminíferos fixados ao fundo.

Todo o KRb utilizado nos experimentos de eletrofisiologia foi glicosado e foi filtrado em papel filtro antes da sua utilização. A preparação foi então levada ao microscópio invertido (*Nikon- Inverted Microscope Diaphot – TMD*) e conectada ao sistema de perfusão do KRb. O KRb foi mantido num banho a 36°C e chegava na câmara de perfusão em 32°C. O pH foi mantido em 7.4 com carbogênio durante todo o experimento. O fluxo foi mantido a 1 mL/min com auxílio de uma bomba peristáltica (*Rainin Instrument Co. Inc. – Dynamax, modelo RP-1*). A preparação ficava 30 minutos se estabilizando antes do início dos registros. Após esse período, uma célula de Sertoli era empalada com uma microeletrodo de vidro, sob controle visual.

3.2.1.2 Preparação do Microeletrodo

Para o registro intracelular foram utilizados microeletrodos, feitos a partir de uma micropipeta de vidro de borosilicato com diâmetro externo de 1,2mm, com filamento interno, que facilita seu posterior preenchimento (*World Precision Instruments, Inc., USA*). A ponta das micropipetas foi estirada para possibilitar o empalamento, num estirador de pipetas vertical (*David Kopf Instruments, Tujunga, California - Vertical Pipette Puller – modelo 700C*). A intensidade do calor e a força do estiramento foram reguladas independentemente, até serem alcançados os parâmetros ideais para viabilizar o empalamento das células de Sertoli. A resistência ideal do microeletrodo para o empalamento de células de Sertoli é de 15 a 25 megaohms ($M\Omega$) (von Lebedur *et al.*, 2002). A fim de obterem-se resultados reprodutíveis na confecção dos microeletrodos, as correntes de ar eram excluídas e a temperatura ambiente era mantida estável em 21 - 22°C.

Uma vez confeccionados, os microeletrodos foram preenchidas com solução KCl 3M e conectadas a um “*holder*” (eletrodo de prata), que também foi preenchido com a mesma solução de KCl 3M, e fazendo contato elétrico com o eletrodo. O KCl utilizado era filtrado em papel filtro diariamente. O conjunto era então conectado ao eletrômetro. A movimentação mecânica do eletrodo para aproximação das células e empalamento era feita por um micromanipulador mecânico (Narishige-Japão), capaz de movimentos macros e micros nos três eixos.

O eletrodo de referência era mergulhado na câmara de perfusão e conectado através de um fio ao terminal “terra” do eletrômetro. Este eletrodo consiste em um fio de prata cloretado (Ag/AgCl). A cloretação era feita diariamente antes do início do experimento, limpando-se o fio de prata com esponja de aço e o mergulhando em solução de hipoclorito de sódio comercial (hipoclorito de sódio, hidróxido de sódio, cloreto de sódio e água) por no mínimo 30min. Antes de mergulhá-lo na câmara de perfusão, o fio era enxaguado com água destilada.

O potencial de membrana da célula é apenas um dos muitos fatores que contribuem para a diferença de potencial medida entre o eletrodo de registro intracelular e o eletrodo de referência. Diferenças de potenciais que ocorrem mesmo com ambos eletrodos mergulhados no líquido extracelular são devido a diferenças no comportamento elétrico que ocorre nas interfaces entre soluções e o metal, ou entre soluções de composições diferentes. Essas diferenças são anuladas através de dispositivos específicos no eletrômetro, para podermos visualizar somente o potencial de membrana.



Fig 3.3: Câmara de Perfusão , onde podem ser observados , à esquerda eletrodo de referência (Ag/AgCL) e à direita o eletrodo de registro, conectado ao “holder”, ambos imersos na preparação.

3.2.1.3 Equipamento e procedimento Eletrofisiológico

Os dois eletrodos, de registro e de referência, eram conectados a um pré-amplificador de alta impedância, Eletrômetro Intra 767 (*World Precision Instruments, Inc., USA*), e o sinal era monitorado nele e num osciloscópio (*Tektronix, 2 Channel Digital Oscilloscope TDS 210*). Os traçados observados no osciloscópio eram armazenados num computador através de uma placa e um programa de interface (*Wavestar Lite Version 1.0.10*)

Além dos elementos de interesse biológico, o sistema de registro eletrofisiológico possui resistência e capacitância próprias. Esses elementos conferem “ruídos” ao sistema e devem ser neutralizados antes do início do experimento através de dispositivos no eletrômetro. Desta forma, quando

ambos eletrodos estavam em líquido extracelular, ajustava-se à leitura próximo de zero no eletrometro e no osciloscópio, nenhuma diferença de potencial era registrada. No momento em que o eletrodo de registro penetrava uma célula, um salto abrupto na direção negativa era visualizado no eletrômetro e no osciloscópio, e registrado no computador. A intensidade desta queda fornece o potencial de membrana da célula empalada.

Ao mesmo tempo em que se media o potencial de repouso da membrana, o eletrômetro passava pulsos de corrente de 0,5nA na célula. Esta corrente era originada em um estimulador capaz de gerar pulsos retangulares de corrente contínua, (S48 Stimulator - *Grass Instrument Division*, W. Warwick, RI, USA). Este estimulador regulava a frequência (0,5Hz) e a duração (250ms) desses pulsos. O eletrômetro apresenta uma resistência de 20×10^6 ohms, que reduz a corrente destes pulsos que chega às células em níveis suportáveis.

Quando uma célula era empalada, esperava-se que seu potencial de membrana e sua resistência de membrana permanecessem estáveis por no mínimo 2 minutos, e só então os agentes a serem investigados eram aplicados. Para evitar trabalhar com células germinativas, se utilizou apenas células cujos potenciais de membrana eram mais negativos que -35mV , já que esse potencial de membrana é comumente registrado em células de Sertoli de túbulos seminíferos normais (Eusebi e col., 1983), e em túbulos seminíferos SCE (enriquecidos em células de Sertoli) (Wasserman e col., 1992).

A resistência da membrana foi medida de acordo com Wassermann e colaboradores (1992). As substâncias isoproterenol, testosterona, espermina, LaCl_3 , forskolina, glibenclamida e db-AMPC foram aplicados topicamente no banho com pipeta automática após a estabilização do potencial de membrana

por aproximadamente 2 minutos ou associados ao tratamento com outras drogas. Soluções de butoxamina, metoprolol foram perfundidas nas células por 3 minutos, após foi aplicado topicamente isoproterenol.

A testosterona foi diluída em etanol em uma solução estoque de 1mM que subseqüentemente foi diluída até as concentrações finais desejadas em KRb. A solução final continha no máximo 0,1% de etanol. Glibenclamida e forskolin foram diluídos em DMSO em solução estoque de 1mM e 10mM respectivamente e, da mesma forma, foram diluídas em KRb até as concentrações finais desejadas

3.2.1.4 Cálculo da intensidade do Pulso aplicado

Para aplicar pulsos de corrente de 0,5nA, utilizou-se a lei de Ohm, como segue, para calcular a voltagem a ser aplicada pelo estimulador. Essa voltagem passava antes pelo eletrômetro, cuja resistência era de $20 \times 10^6 \Omega$.

corrente (A- ampère)

V = voltagem (V- volts)

R= resistência (Ω - ohms)

LEI DE OHM:

$$I = V/R \Rightarrow \boxed{V = I \times R}$$

$$V = (0,5 \times 10^{-9} \text{ A}) \times (20 \times 10^6 \Omega)$$

$$V = 10 \times 10^{-3} \text{ V}$$

$$V = 10 \text{ mV}$$

Assim, o estimulador era regulado para aplicar uma voltagem de 10mV, que resultava numa corrente de 0,5nA na ponta do eletrodo de vidro.

3.2.1.5 Cálculo da Resistência da Membrana

A resistência da membrana (R), foi calculada utilizando-se a lei de Ohm como segue abaixo:

I = corrente (A- ampère)

V = voltagem (V- volts)

R= resistência (Ω - ohms)

LEI DE OHM:

$$I=V/R \Rightarrow \boxed{R=V/I}$$

Resistência da membrana = Voltagem registrada no osciloscópio / Pulso de Corrente aplicado.

A voltagem registrada no osciloscópio corresponde às “franjas” obtidas no traçado do potencial da célula em decorrência do pulso de corrente aplicado, e seu valor era obtido medindo-se essas franjas. O pulso de corrente aplicado era de 0,5nA.

3.2.3 Análise Estatística

Para a análise estatística foi utilizado o Teste-T pareado, quando comparadas as modificação do potencial de membrana das células com o seu potencial no repouso ou ANOVA seguido do pós-teste bonferroni, quando comparadas os tratamentos efetuados nas células, usando o programa *InStat*, versão 3.01,32 bit para Windows 95/NT, da (*GraphPad Software*, San Diego, Califórnia, USA). Os testes específicos utilizados em cada experimento estão citados nos resultados. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

Artigo submetido à *HORMONE AND METABOLIC RESEARCH*

In Sertoli cells from immature rats, Isoproterenol opens K^+_{ATP} channels associated a β_2 adrenoceptor mechanism.

Jacobus AP, Rodrigues DO, Borba PF, Loss ES, Wassermann GF*

*Departamento de Fisiologia ICBS, UFRGS
Rua Sarmiento Leite, 500, CEP 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil
Phone/Fax: +55 (51) 33 16 33 02 e-mail: gwass@ufrgs.br

Short running title: Isoproterenol opens K^+_{ATP} channels via β_2 -adrenoceptor mechanism

ABSTRACT

In the present study we investigated by what means the isoproterenol hyperpolarises the membrane potential (MP) of Sertoli cells from seminiferous tubules of 15 day old-rat testes. The modification of MP and resistance (R_0) was analysed using conventional intracellular glass microelectrodes.

Isoproterenol ($2 \times 10^{-6} \text{M}$) induces an immediate and significant hyperpolarisation in the Sertoli cell membrane. The β_2 -AR antagonist, butoxamine ($1 \times 10^{-6} \text{M}$), nullifies the isoproterenol action. The β_1 antagonist, metoprolol ($1 \times 10^{-6} \text{M}$) effect was light and non significant.

The inhibition of the K^+_{ATP} channels with the sulphonylurea glibenclamide, suppress the isoproterenol action, and testosterone, that depolarizes the Sertoli cell MP closing the K^+_{ATP} channels through the PLC/PIP₂ pathway, impedes the hyperpolarisation produced by the β -AR agonist. Also the polications, LaCl_3 and spermine revert the hyperpolarisation effect of isoproterenol depolarizing the membrane potential, probable through ionic interaction neutralising the action of isoproterenol on K^+_{ATP} channels . The adenylate cyclase agonist, forskolin ($0.1 \mu\text{M}$) rapidly hyperpolarises the Sertoli cell MP mimicking isoproterenol effect, dbAMP also hyperpolarise the MP. These effects indicated that the isoproterenol action on K^+_{ATP} channel probably involves the known signalling cascade β -AR /Gs/AC/cAMP/PKA.

These results suggest that the isoproterenol-induced hyperpolarisation is mediated by the opening of K^+_{ATP} channels in Sertoli cells, this β -adrenergic hyperpolarisation probably plays a physiological role in the modulation of MP by opposing to the depolarisation produced by testosterone through the closing of K^+_{ATP} channels.

Key words: Isoproterenol, K^+_{ATP} channels, Sertoli cells, β_2 adrenoceptor, membrane potential.

INTRODUCTION

It has been described the presence of relatively abundant adrenergic innervation in the testis of mammals [1, 2, 3] together with the presence of physiologically relevant quantities of noradrenaline (NA) in their interstitial fluids [2, 4]. These data arouse the interest of the functional role of the catecholamines in the regulation of testicular cells functions from the interstitium (Leydig cells) or seminiferous tubules (Sertoli cells). In these last cells it was found that β -adrenergic agonists can stimulate cAMP production [5, 6]; and in freshly isolated Sertoli cells isoproterenol, a non selective β -adrenergic agonist stimulates the cAMP production and the tissue-type plasminogen activator secretion through a predominant β 2 AR mechanism [7].

The receptor sub-type involved in β -adrenergic actions on Sertoli cells varies with experimental design or the phenomena analysed: Heindel et al [8], Eikvar et al [9] and Wassermann et al [10] have observed a mediation of β 1 subtype, on the other hand Tolszczuk et al [11] and Troispoux [7] found a predominant expression of β 2 sub-type.

It has been reported that previous exposure to FSH or isoproterenol results in a dose-and time-dependented state of desensitization with respect to the production of cAMP. These data imply a direct involvement of the β -adrenergic system in the modulation of FSH effect in Sertoli cell through heterologous desensitization, and also that β agonist can functionally uncouple FSH receptors from $G\alpha_s$ [12, 13]. Beside these effects, isoproterenol stimulates amino acid accumulation in immature rat testes and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in freshly isolated Sertoli cells from testes of 13-day-old rats [14]. The same authors in electrophysiological studies using an intracellular recording technique demonstrated that isoproterenol produces a rapid and sustained dose dependent hyperpolarisation on the membrane potential (MP) of Sertoli cells from testes of 13-day-old rats [14].

With the utilization of similar technique Nakashima and Vanhoute [15], reported that isoproterenol causes, in vascular smooth muscle of canine saphenous vein, hyperpolarisation through opening of K^+_{ATP} channels and Fujii et al [16], using isolated mesenteric arteries of rat, also found that isoproterenol elicits hyperpolarisation via an opening of K^+_{ATP} channels.

Recently it was described that testosterone and the sulphonylurea glibenclamide depolarize the Sertoli cell membrane closing the K^+_{ATP} channels. These results point to the presence of these channels in Sertoli cells and call the attention on their possible important physiological role in these cells [17, 18, 19].

Based in these experimental evidences, the aim of this paper is to analyse the possible mediation of the K^+_{ATP} channels in the hyperpolarisation produced by isoproterenol on the Sertoli cell MP from testes of 15-day-old rats. The type of the β adrenoceptor involved in this action is also investigated.

MATERIAL AND METHODS

Isoproterenol, testosterone, spermine, forskolin, and N-6,2'-O-dibutyryl-adenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt (dibutyryl-cAMP), were purchased from Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA. The sulphonylurea glibenclamide, came from Research Biochemicals International, Natick, MA, USA.

The experimental animals were immature Wistar rats (14-16 days of age). These animals were bred in our animal quarters and housed in an air-conditioned room (about 24°C) with controlled lighting (lights on from 6:00 a.m. to 8:00 p.m.). Pelleted food (Purina, Nutripal, Porto Alegre, RS, Brazil) and tap water were available to the mothers *ad libitum*.. The suckling rats were kept with their mothers until sacrificed by cervical dislocation.

Electrophysiological experiments. One whole testes was decapsulated and carefully stretched with two callipers, exposing 3 to 10 undisrupted seminiferous tubules and fixed to the bottom of one superfusion chamber, with 1ml/minute of Krebs Ringer bicarbonate (KRb) buffer with glucose (5 mmol/l), at 32°C, pH 7.4, equilibrated with $O_2:CO_2$ (5:95; v/v). The membrane potential of Sertoli cells was recorded with microelectrodes filled with 3 mol/L KCl (15 to 25 M Ω), connected to an amplifier (Intra 767, World Precision Instruments, Inc.UK) and displayed on the screen of an oscilloscope (TDS 200-series Tecktronix, Inc. Wilsonville, OR, USA). Data were recorded through a data acquisition plate (TDS 200-series Tecktronix, Inc.) and a software package (Wave Star Lite Version 1.0.10, 1996 Tectronix, Inc.). Square current pulses of 0.5 nA, 0.5 Hz, and 250 ms of duration were applied through the intracellular electrode by a square pulse stimulator (Model S48K, Astro-Med, Inc. GRASS Instrument Division, West Warwick, RI, USA) through the intracellular electrode for membrane resistance estimate. The input resistance (R_0) was measured with a bridge

circuit according to Wassermann et al [20]. Isoproterenol, testosterone, glibenclamide, spermine and LaCl_3 , forskolin, and dibutyryl-cAMP were applied topically to the bath after stabilisation of the resting potential for at least 2 minutes. Each treatment was repeated at least four times with different cells, and variations in MP and R_0 were registered. The results are given as means \pm SEM.

Testosterone was diluted in ethanol to a final concentration below 0.1%. The application of ethanol up to a concentration of 40 $\mu\text{l/ml}$ was without significant effect on the MP (control: -44 ± 0.5 , ethanol: -43.8 ± 0.2). Glibenclamide and forskolin were prepared in dimethyl sulphoxide (DMSO). This stock solution was diluted in KRb to achieve the final concentration at the time of use. DMSO (0.1%) did not affect the membrane potential (data not shown). The drug concentration used in each experiment is included in the legend of the figures.

Statistical evaluation was performed by a paired t-test and one-way ANOVA with Bonferroni's post test, using GraphPad InStat version 3.01, 32 bit for Windows 95/NT (GraphPad Software, San Diego, California, USA, www.graphpad.com). Differences were considered to be significant when $p < 0.05$.

RESULTS

Dose dependent hyperpolarisation of MP by isoproterenol.

In our experimental conditions, the basal electrical characteristics of impaled Sertoli cells from isolated seminiferous tubules of 15-day-old rats had resting membrane potential of -47.0 ± 0.8 mV ($n=112$) and the input resistance was $15.7 \pm 0.6 \text{M}\Omega$ ($n=112$). The administration of isoproterenol to the seminiferous tubules from immature rats induced an immediate hyperpolarisation of the MP in impaled Sertoli cells. After five minutes the MP return to the resting values (Fig 1A). This response was inversely proportional to the dose. The maximal effect was elicited by a $2 \times 10^{-6} \text{M}$ concentration of isoproterenol (Fig 1B, 1B insert). At $1 \times 10^{-3} \text{M}$ the effect was significantly minor.

Effects of β - AR antagonists on the isoproterenol action.

Figure 2 shows the blocking action of the β_1 (metoprolol) and β_2 (butoxamine) AR's inhibitors in the hyperpolarisation evoked by $2 \times 10^{-6} \text{M}$ of isoproterenol. In the presence of butoxamine the hyperpolarisation produced by isoproterenol was nullified ($p < 0.05$)

and in the presence of metoprolol, the blocker induced a light and non significant diminution of isoproterenol effect.

Effect of glibenclamide on the action of isoproterenol on the MP of Sertoli cell.

The application of the sulphonylurea glibenclamide ($1 \times 10^{-5} \text{M}$), antagonist of K^+_{ATP} channels, 30 seconds after isoproterenol, reverts its hyperpolarisation effect (Fig 3A). The administration of isoproterenol (30 seconds) after glibenclamide, diminished the depolarisation normally produced by the sulphonylurea (Fig 3B, 3C).

Testosterone modification of the isoproterenol effect on the Sertoli cell MP.

The previous topical application of testosterone ($1 \times 10^{-5} \text{M}$) on Sertoli cells, prevents the hyperpolarisation response produced by isoproterenol (Fig. 4A) and the β -agonist decrease the MP depolarisation response of the cell evoked by testosterone. The application of isoproterenol 30 seconds before testosterone prevents the depolarization (Fig. 4B) normally produced by the androgen (Fig. 4C).

Ionic interactions in the isoproterenol effect.

Topical application of polycations, LaCl_3 ($1 \times 10^{-4} \text{M}$) or spermine ($10 \times 10^{-3} \text{M}$), that “per se” depolarize MP through ionic interaction (Fig 5A), reverts the hyperpolarisation produced by isoproterenol (Fig 5B and 5C). Lesser concentrations of LaCl_3 ($1 \times 10^{-5} \text{M}$) or spermine ($5 \times 10^{-3} \text{M}$) were ineffective (data not shown).

Effect of forskolin and Db-cAMP on the MP of Sertoli cells

The adenylyl cyclase agonist, forskolin ($1 \times 10^{-7} \text{M}$), rapidly hyperpolarise the MP of the Sertoli cell (Fig. 6A). The administration of Db-cAMP ($2 \times 10^{-3} \text{M}$) after a latency period of 2 min produce a short (1 minute) hyperpolarisation effect of $1,9 \pm 0,8 \text{mV}$ ($n=7$) depolarizing the MP afterwards (data not shown). Similarly to isoproterenol the administration of glibenclamide prevents the hyperpolarisation produced by forskolin.

DISCUSSION

The results of the present experiments allow the following conclusion: isoproterenol induce a rapid and statistically significant hyperpolarisation in the Sertoli cell

membrane. The β 2-AR antagonist butoxamine, nullified the isoproterenol action, the action of β 1 antagonist metoprolol was light and non significant.

The inhibition of the K^+_{ATP} channels with the sulphonylurea glibenclamide nullified the hyperpolarisation elicited by isoproterenol. Testosterone that depolarize the Sertoli cell membrane closing the K^+_{ATP} channels through the PLC-PIP2 pathway [18] reduces the hyperpolarisation produce by the β - AR agonist isoproterenol.

ATP sensivity of KATP channels is not a fixed physiological parameter but rather a parameter controlled by the phosphatidyl inositol phosphates (PIPs) in the plasma membrane [19]. The effects of PIPs on ATP inhibition is believed to involve an electrostatic mechanism, because this action is depending upon the negatively charged phosphate groups at the inositol ring [21]. This means that the KATP channels are also modulated by ionic interactions. Polycations such as polylysine, polyamines, neomycin, $LaCl_3$, which are known to bind to phospholipids and neutralize their negative charges, abolish the effect of PIPs on ATP inhibition [22].

In our experiments $LaCl_3$, as well as the polyamine spermine after a small latency period, reverts the hyperpolarisation effect of isoproterenol, depolarizing the membrane. This effect is probably caused by cationic interaction with the negative membrane charges neutralizing the action of isoproterenol on the K^+_{ATP} channels.

In Sertoli cells , as well as in other cells the β -AR involved in adrenergic actions seems to be dependent on the phenomena studied [7,9,10,11,23,24]. As Xiao et al (1999) [25] suggest the stimulation of β -AR subtypes elicit distinct cellular responses through different signalling pathways. In the stimulation of the α -methyl amino isobutyric acid transport the β 1 antagonist metoprolol (1×10^{-6} M) blocks the isoproterenol action with a potency of two-order of magnitude higher than the β 2 antagonist butoxamine (1×10^{-4} M) [10]. On the other hand the β -AR that mediates the hyperpolarisation evoked by

isoproterenol probably belongs to the β_2 -subtype since butoxamide, inhibitor of β_2 -AR, nullified the response of the agonist. This last results is similar to the ones obtained by Nakashima and Vanhoute in vascular smooth muscle of saphenous vein [15].

Our result shows an inverted concentration-dependent hyperpolarisation produced by isoproterenol. These results can be explained by the possible stimulation of the α_2 -AR caused by elevated doses of the β agonist [15]. It was reported that isoproterenol in high concentration causes activation of α - AR and this α_2 - AR stimulation produces depolarisation of the canine saphenous vein [26].

Our results demonstrate that the MP modification produced by isoproterenol on the Sertoli cells is mimetized by forskolin and partially reproduced by db-cAMP. The hyperpolarisation effect of isoproterenol in other tissues is related to the AC-cAMP intermediation through an ill defined mechanism but probably through the known signalling cascade: β - AR /Gs/AC/cAMP/PKA/ K_{ATP} [15, 16].

K_{ATP}^+ channels are activated by cAMP-dependent PK in the smooth muscle cells of porcine coronary artery [27] and as it was suggest [15], this effect can be reinforced or associated to the decrease of $[ATP]_i$ as consequence of the adenyly cyclase activation by isoproterenol. This $[ATP]_i$ diminution will reduce the $[ATP]_i/[ADP]_i$ ratio causing a opening of the K_{ATP}^+ channel. This complementary mechanism will produce a efficient opening of the $[ATP]_i$ depending K^+ channel.

It has been recently described that testosterone interacting with putative GPCR coupled receptor activates the PLC-PIP₂ pathway, resulting in a diminution of the highly negative charges of PIP₂ in the membrane modifying electrostatic interactions [18]. As a consequence K_{ATP} channels close and the MP depolarize. Concomitantly the hydrolysis of PIP₂ yields IP₃ and DAG that activates PKC [28]. Considering these evidences we

suggest that in the Sertoli cells are present two antagonistic mechanisms stimulated by isoproterenol and testosterone respectively: Isoproterenol activates G_s-AC-cAMP-PKA pathway and decrease the [ATP]_i opening the K⁺_{ATP} channels; on the other hand testosterone activates G_q-PLC-PIP₂ pathway that reduce the PIP₂ pool of the membrane closing the K⁺_{ATP} channel.

Finally the hindrance of the effects of testosterone by the action of isoproterenol opens a very interesting possibility: testosterone and β₂ agonist can produce antagonistic effect on the K_{ATP} channels modulating the MP and consequently Ca²⁺ uptake and other membrane-bound effects that mediate some of the physiological actions of these compounds.

Acknowledgments

This work was supported by grants from CNPq, FAPERGS, CAPES, PROPESQ-UFRGS. The authors are grateful to Prof. Dr. Guido Lenz for the generous gift of forskolin.

References

1. Setchell BP, Maddocks S, Brooks DE. Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive tract. In: Knobil E, Neill JD (Eds.), *The Physiology of Reproduction* 2nded. Raven Press, New York, 1994; 1063-1175.
2. Campos MB, Vitale ML, Ritta MN, Chioccio SR, Calandra RS. Catecholamine distribution in adult rat testis. *Andrologia* 1990; 22: 247-250.
3. Rauchenwald M, Steers WD, Desjardins C. Efferent innervation of the rat testis. *Biol Reprod* 1995; 52: 1136-1143.
4. Zieher LM, Debeljuk L, Iturriza F, Mancini RE. Biogenic Amine Concentration in testes of rats at different ages. *Endocrinology* 1971; 88: 351-354.

5. Verhoven G, Dierickx P, de Moor P. Stimulation effect of neurotransmitters on the aromatization of testosterone by Sertoli cell-enriched cultures. *Mol Cell Endocrinol* 1979; 13: 241-253.
6. Attramadal H, Le Gac F, Jahnsen T, Hansson V. β -Adrenergic regulation of Sertoli cell adenylyl cyclase: desensitization by homologous hormone. *Mol Cell Endocrinol* 1983; 34: 1-6.
7. Troispoux C, Reiter E, Combarnous Y, Guillou F. β_2 adrenergic receptors mediate cAMP, tissue-type plasminogen activator and transferrin production in rat Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol* 1998; 142: 75-86.
8. Heindel JJ, Steinberger A, Strada SJ. Identification and characterization of a β_1 -adrenergic receptor in Sertoli cell. *Mol Cell Endocrinol* 1981; 22: 349-358.
9. Eikvar L, Bjornerheim R, Attramadal H, Hansson V. β -Adrenoceptor mediated responses and subtypes of β -adrenoceptor in cultured rat Sertoli cells. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1993; 1: 85-91.
10. Wassermann GF, Ludwig MS, Barreto KP. β -adrenergic stimulation of amino acid transport in Sertoli cell-enriched testes of rats is independent of its action on protein synthesis. *Med Sci Res* 1996; 24: 149-151.
11. Tolszczuk M, Follea N, Pelletier G. Characterization and localization of β -adrenergic receptors in control and cryptorchidized rat testis by in vitro autoradiography. *J Androl* 1988; 3: 172-177.
12. Verhoeven G, Cailleau J, de Moor P. Desensitization of cultures rat Sertoli cells by follicle-stimulating hormone and by L -isoproterenol. *Mol Cell Endocrinol* 1980; 20: 113-126.
13. Laurent-Cardonet V, Guillou F, Combarnous Y. Heterologous and homologous desensitization of the plasminogen activator response of rat Sertoli cells by FSH and isoproterenol. *Endocrinol J* 1994; 2: 805-812.
14. Loss ES, Barreto KP, Leite L, Wassermann GF Comparative study of the actions of isoproterenol and retinol on amino acid accumulation, $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake and membrane potential in Sertoli cells. *Med Sci Res* 1998; 26: 195-199.
15. Nakashima M, Vanhoutte PM. Isoproterenol causes hyperpolarisation through opening of ATP-sensitive potassium channels in vascular smooth muscle of the canine saphenous vein. *J Pharmacol Exp_Ther* 1995; 272: 379-384.

16. Fujii K, Onaka U, Goto K, Abe I, Fujishima M. Impaired isoproterenol induced hyperpolarisation in isolated mesenteric arteries of aged rats. *Hypertension* 1999; 34: 222-228.
17. von Ledebur EICF, Almeida JP, Loss ES, Wassermann GF. Rapid effect of testosterone on rat Sertoli cell membrane potential. Relationship with K^+_{ATP} channels. *Horm Metab Res* 2002; 34: 550-555.
18. Loss, ES, Jacobsen, M, Costa ZSM, Jacobus AP, Borelli, F, Wassermann GF. Testosterone modulates K^+_{ATP} channels in Sertoli cell membrane by PLC-PIP₂ pathway. *Horm Metab Res* 2004; 36(8): 000-000.
19. Wassermann, G.F. and Loss E.S. Testosterone action on the Sertoli cell membrane: A $K_{IR6.x}$ channel related effect. *Curr Pharm Design* 2004; 10: 000-000.
20. Wassermann GF, Monti Bloch L, Grillo ML, Silva FRMB, Loss ES, McConnell LL. Electrophysiological changes of Sertoli cells produced by the acute administration of amino acid and FSH. *Horm Metab Res* 1992; 24: 326-328.
21. Baukrowitz T, Fakler B. K_{ATP} channels gated by intracellular nucleotides and phospholipids. *Eur J Biochem* 2000; 267: 5842-5848.
22. Deutsch N, Matsuoka S, Weiss JN. Surface charge and properties of cardiac ATP-sensitive K^+ channels. *J Gen Physiol* 1994; 104: 773-800.
23. Jo SH, Leblais V, Wang PH, Crow MT, Xiao RP. Phosphatidylinositol 3-kinase functionally compartmentalized the concurrent Gs signaling during β_2 -adrenergic stimulation. *Circ Res* 2002; 91: 46-56.
24. Xiao RP, Zhang SJ, Chakir K, Avdonin P, Zhu W, Bond RA, et al. Enhanced Gi signaling selectively negates β_2 -adrenergic receptor (AR)- but not β_1 -AR-mediated positive inotropic effect in myocytes from failing rat hearts. *Circulation* 2003; 108: 1633-1639.
25. Xiao R.P., Cheng H., Zhou Y.Y., Kuschel M., Lakatta E.G. Recent Advances in Cardiac β_2 -adrenergic signal transduction. *Circ. Res.* 1999; 85:1092-1100
26. Komori K, Flavahan NA, Miller VM, Vanhoutte PM. Electrophysiological analysis of adrenergic neurotransmission and its modulation by chronic denervation in canine saphenous veins. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 252: 1197-1201.

27. Miyoshi H, Nakaya Y. Activation of ATP-sensitive K⁺ channels by cyclic AMP-dependent protein kinase in cultured smooth muscle cells of porcine coronary artery. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 193: 240-247.
28. Quinn KV, Cui Y, Giblin JP, Clap LH, Tinker A. Do anionic phospholipids serve as cofactors or second messengers for the regulation of activity of cloned ATP-sensitive K⁺ channels? *Circ Res* 2003; 93: 646-655.

FIGURES

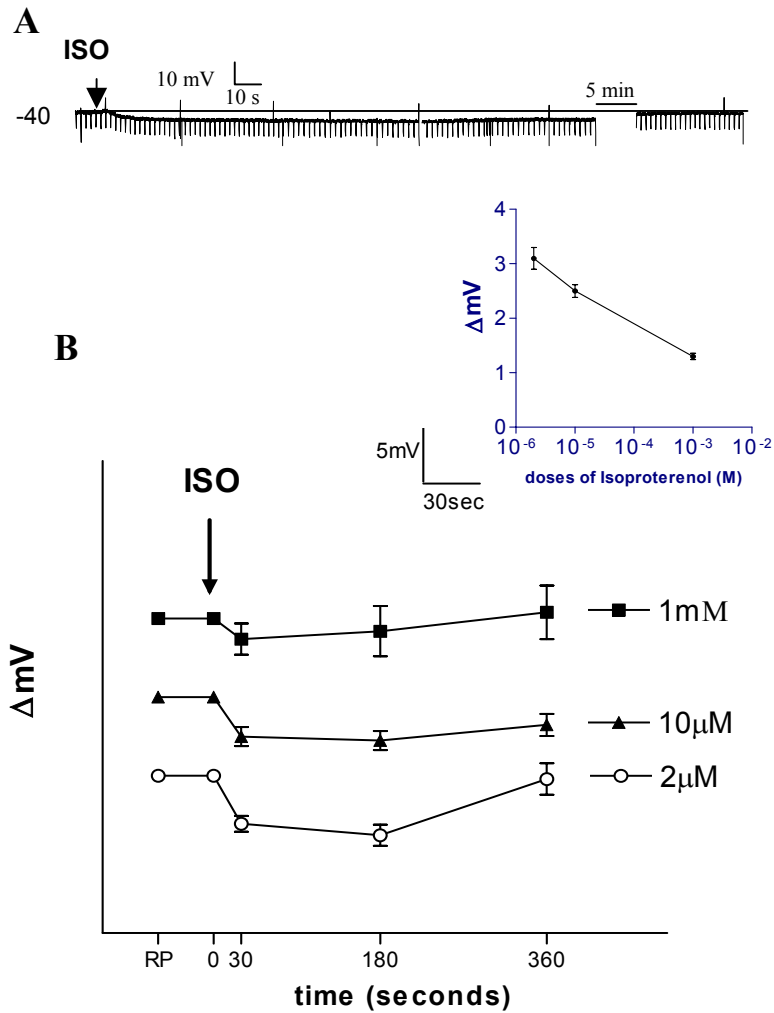


Figure 1. Hyperpolarisation of the MP of the Sertoli cells produced by isoproterenol. Representative response of the isoproterenol ($2 \times 10^{-6} M$) response (A). Inverted dose response hyperpolarisation of the MP by different concentrations of isoproterenol (B, B insert). It was made paired t-test, as compared treated with the resting values $*(p < 0.05)$ (Means \pm SEM, $n=6$).

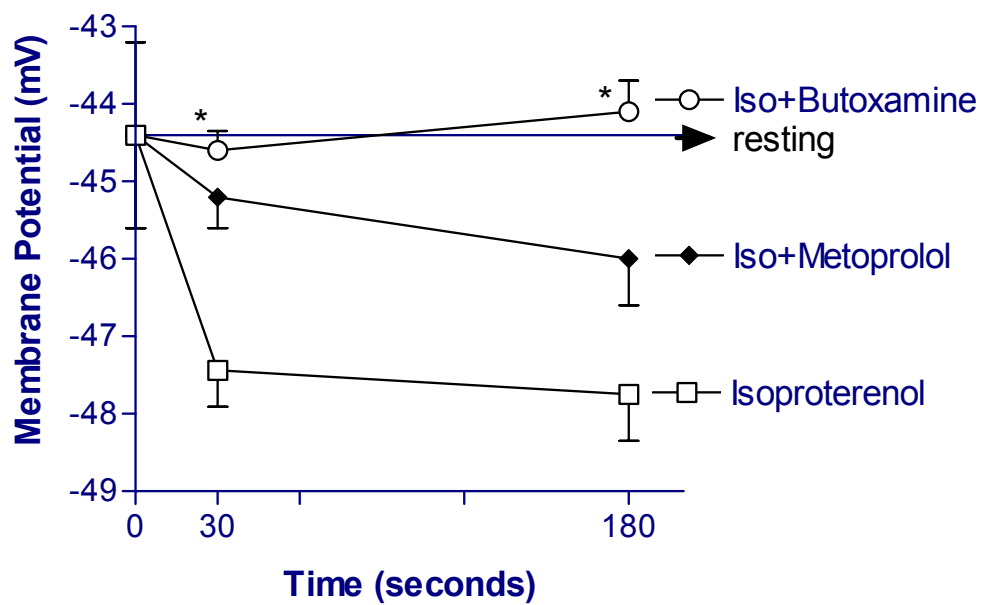


Figure 2. Effect of the adrenoceptor inhibitor β_1 , metoprolol ($1 \times 10^{-6} \text{M}$) and β_2 butoxamine ($1 \times 10^{-6} \text{M}$) on the action of isoproterenol ($2 \times 10^{-6} \text{M}$) on MP of Sertoli cells. It was made one way ANOVA followed by Bonferroni post-test as compared with isoproterenol treated *($p < 0.05$) (Means \pm SEM, $n=8$).

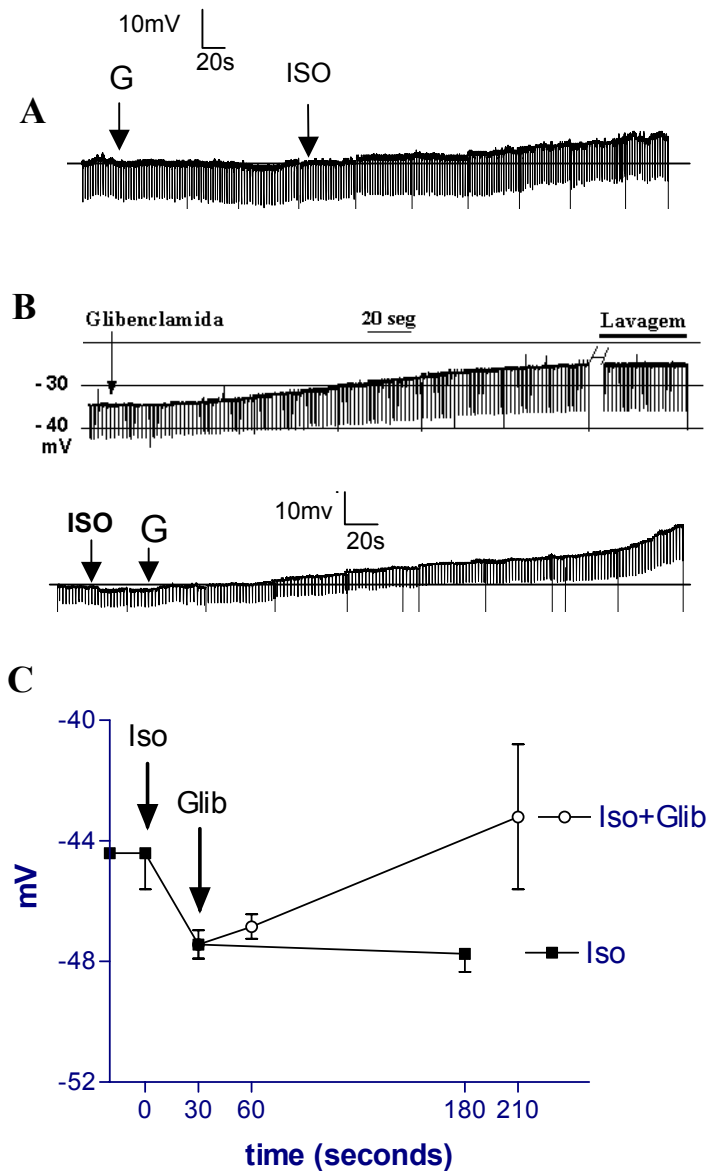


Figure 3. Effect of glibenclamide on the action of isoproterenol on the MP of Sertoli cells. Diminution of the depolarisation effect produced by glibenclamide ($1 \times 10^{-5} \text{M}$) by the action of isoproterenol ($2 \times 10^{-6} \text{M}$) (A). Reversion of the hyperpolarisation produced by isoproterenol by the action of glibenclamide (B and C). In C it was made one way ANOVA followed by Bonferroni post-test as compared with isoproterenol treated $*(p < 0.05)$ (Means \pm SEM, $n = 5$).

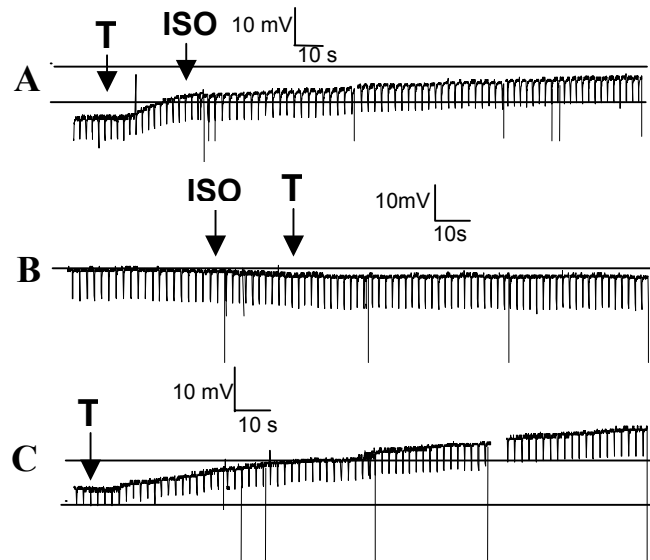


Figure 4. Topical application of testosterone ($1 \times 10^{-5} \text{M}$) on Sertoli cells, prevents the hyperpolarization response produced by isoproterenol (A) and the β agonist decrease the MP depolarization response of the cell evoked by testosterone. The application of isoproterenol before testosterone prevent the depolarization (B) normally produced by the androgen (C).

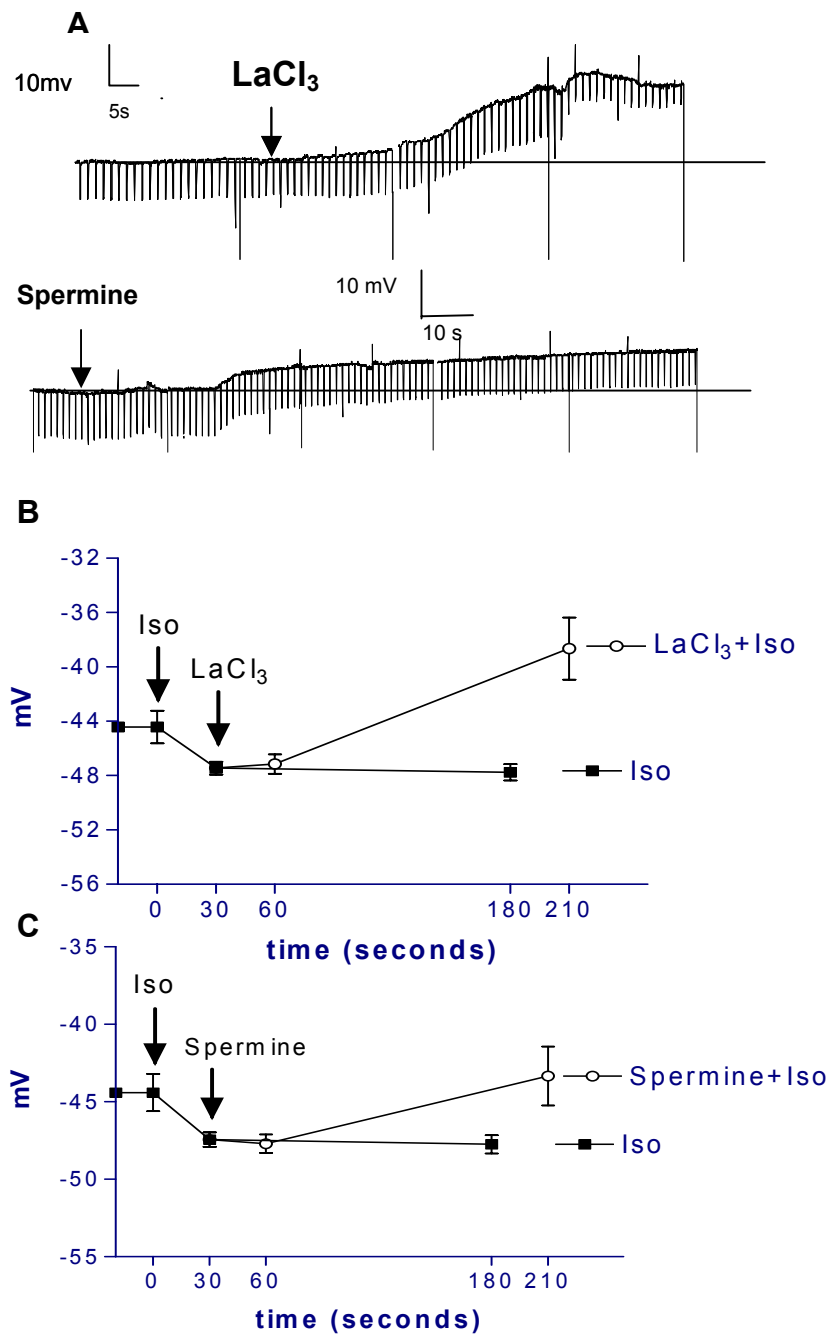


Figure 5. Effects of polycations on the action of isoproterenol on MP. LaCl₃ (1x10⁻⁴M) or spermine(10x10⁻³M) depolarize the Sertoli cell MP (A) and revert the hyperpolarisation produced by isoproterenol (2x10⁻⁶M) (B and C). In B and C it was made one way ANOVA followed by Bonferroni post-test as compared with isoproterenol treated *(p<0.05) (Means±SEM, n=5).

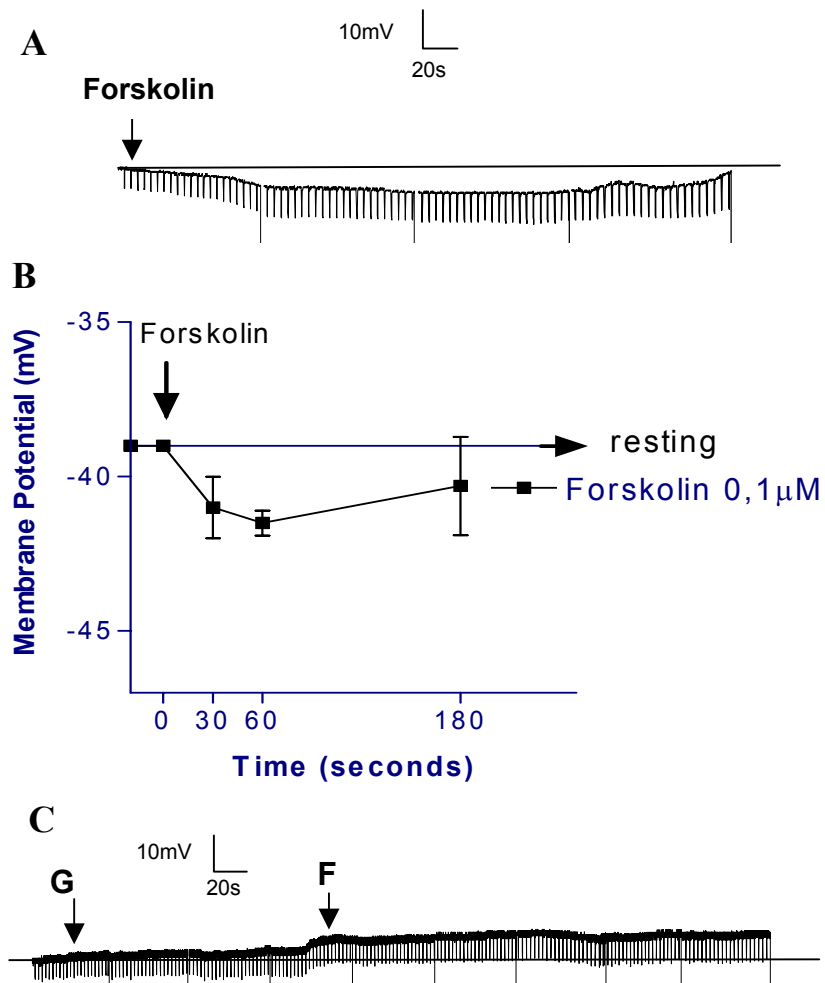


Figure 6. Effect of Forskolin ($1 \times 10^{-7} \text{M}$) produces an immediate hyperpolarisation of the MP in Sertoli cells(A and B). Diminution of the hyperpolarisation effect produced by forskolin ($1 \times 10^{-7} \text{M}$) by the action of glibenclamide ($2 \times 10^{-5} \text{M}$) (C). It was made paired t-test, comparing: treated vs resting values $*(p < 0.05)$ (Means \pm SEM, $n=6$).

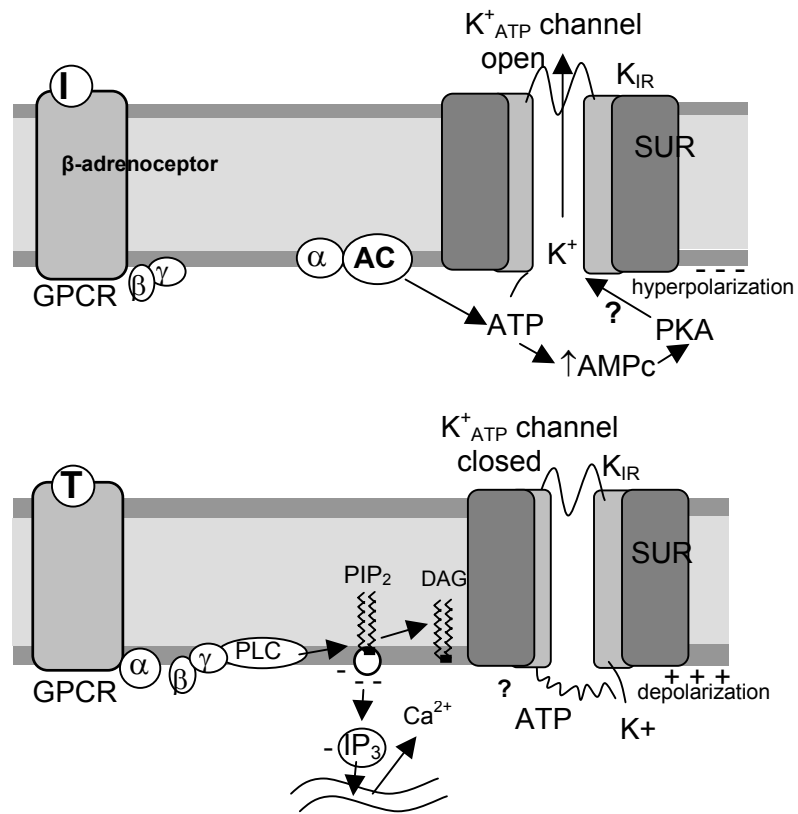


Figure 7. Hypothetical representation of the mechanism of action of isoproterenol and testosterone on the Sertoli cell membrane.

5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Neste trabalho, demonstrou-se que o isoproterenol induziu uma rápida e significativa hiperpolarização da membrana da célula de Sertoli, sendo o maior efeito na menor dose testada ($2 \times 10^{-6} \text{M}$). O antagonista β_2 -adrenérgico, butoxamina, anulou a ação do isoproterenol, e o antagonista β_1 -adrenérgico, metoprolol, reduziu, ligeiramente, a resposta ao isoproterenol.

Nas células de Sertoli, os subtipos de receptores β -adrenérgicos, envolvidos na ação do isoproterenol, parecem depender do fenômeno estudado (Heindel e col, 1981; Tolszczuk e col, 1988; Eikvar e col., 1993; Troispoux e col, 1998; Wassermann e col, 1996; Jo e col, 2002, Xiao e col., 2003). No estímulo de transporte de aminoácidos, utilizando o aminoácido não metabolizável α -metil aminoisobutírico, o antagonista β_1 -adrenérgico, metoprolol ($1 \times 10^{-6} \text{M}$) bloqueou a ação do isoproterenol com uma potência em duas ordens de magnitude maior que o antagonista β_2 -adrenérgico, butoxamina ($1 \times 10^{-4} \text{M}$) (Wassermann e col, 1996). Por outro lado o receptor β_2 -adrenérgico parece mediar a hiperpolarização induzida por isoproterenol, uma vez que a butoxamina inibidor β_2 -adrenérgico, anulou a resposta ao agonista e o metoprolol (inibidor β_1 -adrenérgico) somente reduziu parcialmente a hiperpolarização evocada pelo agonista β -adrenérgico.

Resultados semelhantes foram obtidos por Nakashima e Vanhoute (1995) em musculatura vascular lisa da veia safena.

Nossos resultados mostram que a menor dose utilizada de isoproterenol ($2 \times 10^{-6} \text{M}$) evocou a maior resposta hiperpolarizante onde a intensidade da resposta foi diminuindo conforme a dose aumentava. Estes resultados podem

ser explicados por uma possível estimulação α -adrenérgica causada por doses maiores do agonista β -adrenérgico. Na literatura, há relatos de que há estimulação α -adrenérgica por doses elevadas de isoproterenol (Nakashima & Vanhoutte, 1995). Outros autores verificaram que a estimulação α_2 -adrenérgica produz, por sua vez, uma despolarização na veia safena de cão (Komori e col., 1990).

A inibição dos canais K^+_{ATP} com a utilização da sulfoniluréia glibenclamida, a qual atua na subunidade SUR dos canais K^+_{ATP} (Baukrowitz & Fakler, 2000), atenuou a hiperpolarização evocada por isoproterenol, em células de Sertoli, evidenciando que este agonista β -adrenérgico poderia atuar através da abertura destes canais. Foi demonstrado por Nakashima e Vanhoutte (1995), em musculatura lisa vascular, da veia safena de cães, que a hiperpolarização produzida pelo isoproterenol ocorria através da abertura de canais de K^+_{ATP} , onde também foi observado uma redução do efeito do isoproterenol com a aplicação da glibenclamida.

A testosterona, que despolariza a membrana da célula de Sertoli, fechando canais K^+_{ATP} , através da via PLC-PIP₂ (Loss e col., 2004), também reduz a hiperpolarização produzida pelo agonista β -adrenérgico isoproterenol.

A sensibilidade dos canais K^+_{ATP} ao ATP não é um parâmetro fisiológico fixo, mas um parâmetro controlado por fosfatidil inositol fosfato (PIP), na membrana plasmática (Baukrowitz & Fakler, 2000; revisado por Wassermann & Loss, 2004).

Os efeitos do PIP₂ na inibição ao ATP, mantendo os canais de K^+_{ATP} abertos, parecem envolver mecanismos eletrostáticos, uma vez que a

efetividade desta ação é proporcional ao número de grupamentos fosfatos carregados negativamente, ligados ao anel inositol (Baukrowitz & Fakler, 2000).

Polications como polilisina, poliaminas, neomicina e cloreto de lantânio (LaCl_3), interagem com os fosfolipídeos aniônicos de membrana, neutralizando suas cargas negativas, abolindo desta forma, o efeito do PIP_2 na inibição ao ATP (Deutsch e col., 1994). O tratamento enzimático com fosfolipase, que cliva PIP_2 , reduzindo suas cargas negativas, também reduziram ou eliminaram seu efeito, sugerindo que o balanço de cargas é crítico para a modulação dos canais K^+_{ATP} , que parece ocorrer por interações iônicas (Fan & Makielski, 1997).

Em nossos experimentos, LaCl_3 , bem como, a poliamina espermina, após uma pequena latência, reverteram o efeito hiperpolarizante da ação do isoproterenol nos canais K^+_{ATP} .

Os trabalhos de Xiao et al (1999) em miocárdio, permitiram postular que a diversidade da sinalização β , nestas células, deve-se à bifurcação dos eventos pós-receptores, pelo sub tipo da proteína G associada. A via clássica linear G_s - adenilato ciclase – AMPc – PKA tem sido associada ao receptor adrenérgico β_1 ($A\text{-}\beta_1$). Por outro lado, tem-se observado que o receptor β_2 -adrenérgico apresenta uma bifurcação de seu efeito a nível da proteína G associada. Estes receptores podem estar associados tanto a uma G_s como a uma G_i . A G_s desencadeia a cascata que aumenta PKA, descrita acima, e a G_i , a qual inibe, via $G\beta\gamma$, a PKA. Esta última, provavelmente, atua via a ativação da fosfatidilinositol kinase (PI_3K) promovendo, desta forma, um ajuste complexo entre o relaxamento e a contração do músculo (Jo e col., 2002, Xiao e col,

1999, Xiao e col., 2003). Esta teoria evidencia que ao contrário do mecanismo estabelecido, onde cada receptor está acoplado a uma proteína G específica, poderia ocorrer um acoplamento de 2 subtipos de proteínas G α (Gs e Gi) a um mesmo receptor. Ampliando a diversidade de efeitos da sinalização pós receptor, além de apresentar uma co-localização espacial e temporal na coordenação destes sinais. Desta forma, está se evidenciando um delicado balanço entre Gs e Gi, onde o acoplamento adicional de Gi, confere um controle no sinal estimulante da subunidade Gs aumentando, desta forma, a especificidade da sinalização do receptor (Xiao, 2000). Além disso, tem sido descrito que o receptor β_2 -adrenérgico modula um canal de Ca²⁺ tipo L de forma direta, onde ele está associado ao receptor. Neste complexo os receptores β_2 -adrenérgicos encontram-se diretamente associados com um dos seus efetores finais: o canal de Ca²⁺ tipo L – Ca_v 1.2. Este complexo está também composto pela proteína G, adenilato ciclase, AMPc, PKA e a fosfatase PP2A. Registros eletrofisiológicos, dos neurônios de hipocampo, demonstraram uma tradução de sinal, do receptor adrenérgico, altamente localizada do receptor ao canal, sendo que esta sinalização não ocorre quando estimulada de forma remota (Davare e col., 2000)

As modificações no potencial de membrana, produzidas por isoproterenol, demonstradas em nossos resultados, são mimetizadas por forskolina, agonista da adenilato ciclase, e parcialmente reproduzidas por db-AMPc, análogo permeável do AMPc. Estes resultados indicam que o isoproterenol atua na membrana da célula de Sertoli via β_2 -AR/Gs/AC/AMPc/PKA/ K⁺_{ATP}.

Os canais K^+_{ATP} são ativados por proteína quinase dependente de AMPc, em células musculares lisas, em artéria coronária suína (Miyoshi & Nakaya, 1993). Nakashima e Vanhoutte (1995) sugerem, que este feito é reforçado ou associado ao decréscimo de $[ATP]_i$, como consequência da ativação da adenilato ciclase por isoproterenol. Esta diminuição do $[ATP]_i$ poderia reduzir a razão $[ATP]_i/[ADP]_i$, causando abertura dos canais K^+_{ATP} , como foi descrito para outras células. Este mecanismo complementar poderia produzir uma eficiente abertura dos canais K^+ dependendo de $[ATP]_i$.

Também foi descrito que a testosterona atua através de um suposto receptor acoplado a proteína G ativando a via PLC-PIP₂, resultando na diminuição das cargas associadas ao PIP₂ na membrana, modificando as interações eletrostáticas entre o canal e os fosfolipídeos aniônicos (Loss e col, 2004). Como consequência, canais K^+_{ATP} fecham e há despolarização do potencial de membrana. Concomitante e associado à hidrólise de PIP₂, é gerado IP₃ e DAG, o que ativa também PKC (Quinn e col, 2003).

Considerando estas evidências, nós sugerimos que nas células de Sertoli estão presentes dois mecanismos antagônicos sobre o canal de K^+_{ATP} , estimulados por isoproterenol e testosterona, respectivamente: Isoproterenol ativa a via GPCR-AC-AMPc-PKA e diminui a $[ATP]_i$, abrindo os canais K^+_{ATP} ; por outro lado, a testosterona ativa a via Gq-PLC-PIP₂, reduzindo a concentração de PIP₂ na membrana, fechando canais K^+_{ATP} .

Esta sobreposição dos efeitos da testosterona sobre os efeitos do isoproterenol abre uma possibilidade interessante: testosterona e isoproterenol podem produzir efeitos antagônicos nos canais K^+_{ATP} , modulando o potencial de membrana e a consequente captação de Ca^{+2} , além de outros efeitos

ligados à membrana, os quais resultam nas ações fisiológicas destes compostos.

6. CONCLUSÕES

Este trabalho sugere que:

- O Isoproterenol hiperpolariza o potencial de membrana da célula de Sertoli, provavelmente, atuando em receptor β_2 -adrenérgico, considerando que o bloqueador específico β_2 -adrenérgico, butoxamina inibiu a resposta do agonista β -adrenérgico. Quando se utilizou o bloqueador β_1 -adrenérgico, metoprolol, a resposta do isoproterenol foi levemente atenuada, não sendo significativa;
- A resposta hiperpolarizante do Isoproterenol depende da dose aplicada; uma vez que, a menor dose testada ($2 \times 10^{-6} \text{M}$), evocou a maior amplitude de hiperpolarização, atuando em receptores β_2 -adrenérgicos.
- A resposta eletrofisiológica do isoproterenol parece ocorrer através da abertura de canais K^+_{ATP} :
 - Quando as células de Sertoli estavam sob perfusão da sulfoniluréia glibenclamida, bloqueador dos canais K^+_{ATP} , a ação hiperpolarizante do isoproterenol foi inibida;
 - O mesmo ocorreu quando foram feitos tratamentos concomitantes de testosterona e isoproterenol, na mesma preparação eletrofisiológica, onde a resposta ao agonista β -adrenérgico foi atenuada, na presença do esteróide;
 - Evidenciando, novamente, a atuação hiperpolarizante do isoproterenol através da abertura de canais K^+_{ATP} ,

modulou-se a condutância destes canais na presença de polycations (Espermina e LaCl_3), que diminuem a corrente iônica do canal K^+_{ATP} , interagindo com fosfolipídeos aniônicos da membrana (PIP2), sendo observada uma reversão no efeito hiperpolarizante do isoproterenol, significando uma atuação do agonista β -adrenérgico na abertura destes canais;

- Também foi observado um efeito hiperpolarizante, similar ao do isoproterenol, pelo agonista da adenilato ciclase, forskolina, o que nos mostra que a ativação da corrente de potássio através da abertura de canais K^+_{ATP} que ocorre via receptor β -adrenérgico /proteína Gs / Adenilato Ciclase / AMPc / PKA (?) / K^+_{ATP}

Com todas estas evidências podemos postular que a ativação do agonista β -adrenérgico, em células de Sertoli, produz abertura dos canais de K^+_{ATP} via ativação de um receptor β_2 -adrenérgico, predominantemente, mecanismo pelo qual ocorre aumento de AMPc, ativando, por sua vez, o canal K^+_{ATP} . Esta ativação do canal K^+_{ATP} ocasiona aumento da corrente de potássio e hiperpolarização da membrana.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHLQUIST, R.P. (1948) A study of adrenotropic receptors. *American Journal of Physiology*. 153 p 586-600.
- ANAKWE, O.O. & MORGER W.E. (1984a) Ontogeny of rodent testicular androgen production in response to isoproterenol and luteinizing hormone in vitro. *Biology of Reproduction* 30 p 1142-1152
- ANAKWE, O.O. & MORGER W.E. (1984b) β_2 -adrenergic stimulation of androgen production by culture mouse testicular interstitial cells *Life Science* 35 p. 2041-2047.
- ATTRAMADAL, H.; LE GAC, F.; JAHNSEN, T.; HANSSON, V. (1984) β -Adrenergic regulation of Sertoli cell adenylyl ciclase: Desensitization by homologue hormone. *Mol.Cell Endocrinology*, **34**:1-6.
- BAUKROWITZ T, FAKLER B. (2000) K_{ATP} channels gated by intracellular nucleotides and phospholipids. *Eur J Biochem*; 267: 5842-5848
- BEGUIN P, NAGASHIMA K, NISHIMURA M, GONOI T, SEINO S. (1999) PKA-mediated phosphorylation of the human K (ATP) channel: separate roles of Kir6.2 and SUR1 subunit phosphorylation. *EMBO J*. Sep 1; 18 (17):4722-32.
- BELL, C. & McLEAN, J.R. (1973) The autonomic innervation of rat testicular capsule. *Journal of Reproduction Fertility* 23 p 253-258.
- COOKE BA, GOLDING M, DIX CJ. (1982) Catecholamine stimulation of steroidogenesis in Leydig cells. *Biochem Soc Trans*. Dec; 10(6):491-3.
- DAVARE, M.A.; AVDONIN, V.; HALL,D.D.; PEDEN,E.M.; BURETTE, A.; WEINBERG, R.J.; HORNE,M.C.; HOSHI,T.; HELL,J.W. (2001). A β_2 Adrenergic Receptor Signaling Complex Assembled with the Ca^{2+} Channel $Ca_v1.2$. *Science*, v.293: 98-101.
- DEUTSCH N, MATSUOKA S, WEISS JN. (1994) Surface charge and properties of cardiac ATP-sensitive K^+ channels. *J Gen Physiol*; 104: 773-800
- DU X, ZHANG H, LOPES CM, MIRSHAHI T, ROHACS T, LOGOTHETIS DE (2004) Characteristic interactions with PIP2 determine regulation of Kir channels by diverse modulators. *J Biol Chem*. May 20 *in press*

- EIK-NES, K.B. (1969) An effect of isoproterenol on rates of synthesis and secretion of testosterone. *American Journal of Physiology* 217 (6) p 1764-1770.
- EIKVAR L, BJORNERHEIM R, ATTRAMADAL H, HANSSON V. (1993) β -Adrenoceptor mediated responses and subtypes of β -adrenoceptor in cultured rat Sertoli cells. *J Steroid Biochem Molec Biol*; 1: 85-91.
- FAN, Z.; MAKIELSKI, J.C. (1997) Anionic phospholipids activate ATP-sensitive potassium channels. *The Journal of Biol. Chem.* 272 (9) Feb, p 5388-5395.
- FUJII K, ONAKA U, GOTO K, ABE I, FUJISHIMA M. (1999) Impaired isoproterenol induced hyperpolarization in isolated mesenteric arteries of aged rats. *Hypertension* 34: 222-228.
- GOTZ F, STAHL F, ROHDE W, DORNER G (1983) The influence of adrenaline on plasma testosterone in adult and newborn male rats. *Exp Clin Endocrinol.* May; 81(3):239-44.
- GRANEMANN, J.G. (.2001)The putative beta4-adrenergic receptor is a novel state of the beta1-adrenergic receptor. *Am J Physiol Endocrinol Metab* Feb; 280(2):E199-202.
- HANSON, V.; JEGOU, B.; ATTRAMADAL, H. (1983) Regulation of Sertoli cell function and response. In: *D'Agata, R.G.; Lipsett, M.B.; Polosa, f.; Van der Molen, H.J. eds. Recent advances in male reproduction: Molecular Basis and Clinical Implications. New York Raven Press,p 53-58*
- HEINDEL JJ, STEINBERGER A, STRADA SJ. (1981) Identification and characterization of a β 1-adrenergic receptor in Sertoli cell. *Mol Cell Endocrinol*; 22: 349-358.
- HOFFMANN, B.B. (2003) Catecolaminas, fármacos simpaticomiméticos e antagonistas de receptores adrenérgicos. In: *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*, McGraw-Hill-Rio de Janeiro, pp 163-203
- JAHNSEN T, KARPE B, ATTRAMADAL H, RITZEN M, HANSSON V. (1984) Changes in isoproterenol-stimulated adenylate cyclase activity in rat testicular tissue during cryptorchidism and after orchidopexy. *J Reprod Fertil.* Mar; 70(2):443-8.
- JO SH, LEBLAIS V, WANG PH, CROW MT, XIAO RP. (2002) Phosphatidylinositol 3-kinase functionally compartmentalized the concurrent Gs signaling during β 2-adrenergic stimulation. *Circ Res*; 91: 46-56.

- KIERZENBAUM, A.L.; SPRUILL, W.A.; WHITE, M.E. (1985) Rat Sertoli cells acquire a β -adrenergic response during primary culture. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 82, p 2049-2053.
- KOMORI K, FLAVAHAN NA, MILLER VM, VANHOUTTE PM. (1990) Electrophysiological analysis of adrenergic neurotransmission and its modulation by chronic denervation in canine saphenous veins. *J Pharmacol Exp Ther*; 252: 1197-1201.
- LANDS, A.M.; ARNOLD, A.; McAULIFF, J.P. (1967) Differentiation of receptors systems activated by sympathomimetic amines. *Nature* 214 p 597-598.
- LAURENT-CARDONET V, GUILLOU F, COMBARNOUS Y. (1994) Heterologous and homologous desensitization of the plasminogen activator response of rat Sertoli cells by FSH and isoproterenol. *Endocrinol J*; 2: 805-812.
- LIN YF, JAN YN, JAN LY.(2000) Regulation of ATP-sensitive potassium channel function by protein kinase A-mediated phosphorylation in transfected HEK293 cells.*EMBO J.* Mar 1;19(5):942-55.
- LOSS, E.S.; BARRETO, K.P.; LEITE, L.; WASSERMANN, G.F. (1998). Comparative study of the actions of isoproterenol and retinol on amino acid accumulation, $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake and membrane potential in Sertoli cells. *Medical Science Research*, 26:195-199.
- LOSS, ES, JACOBSEN, M, COSTA ZSM, JACOBUS AP, BORELLI, F, WASSERMANN GF. (2004) Testosterone modulates K^+_{ATP} channels in Sertoli cell membrane by PLC-PIP₂ pathway. *Horm Metab Res* 36(8):000-000; *in press*.
- MAYERHOFER, A.; DANILCHIK, M.; FRANCIS PAU, K.Y.; LARA, H.E.; RUSSEL, L.D.; OJEDA,S.R. (1996) Testis of prepubertal rhesus monkeys receives a dual catecholaminergic input provided by the extrinsic innervation and intragonadal source of catecholamines. *Biology of Reproduction* 55 p 509-518.
- MAYERHOFER, A.; STEGER, F.W.; GOW, G.; BARTKE, A. (1992) Catecholamines stimulated testicular testosterone release of the immature golden hamsters via interaction with alpha and beta adrenergic receptors. *Acta Endocrinol.* 127 p 526-530.
- MCCANN, S.M.; OJEDA, S.R. (1996) The anterior pituitary and hypothalamus. *In:Textbook of Endocrine Physiology, Griffin j. e Ojeda S.R. eds, 3a ed , Oxford University Press, pp 101-130.*

- MIYOSHI H, NAKAYA Y. (1993) Activation of ATP-sensitive K⁺ channels by cyclic AMP-dependent protein kinase in cultured smooth muscle cells of porcine coronary artery.; *Biochem Biophys Res Commun.*193: 240-247.
- NAGAI, K.; MURANO, S.; MONOKOSHI, Y.; OKUDA, H.; KINUTANI, M. (1982) Effects of denervation and local 6-hydroxidopamine injection on testicular growth in rats. *Experientia* 38 p 592-594.
- NAKASHIMA M, VANHOUTTE PM. (1995) Isoproterenol causes hyperpolarization through opening of ATP-sensitive potassium channels in vascular smooth muscle of the canine saphenous vein. *J Pharmacol Exp_Ther*; 272: 379-384
- NAKASHIMA M, VANHOUTTE PM.(1995) Isoproterenol causes hyperpolarization through opening of ATP-sensitive potassium channels in vascular smooth muscle of the canine saphenous vein. *J Pharmacol Exp_Ther*; 272: 379-384
- PHILIPP, M.; HEIN, L. (2004) Adrenergic receptor knockout mice: distinct function of 9 receptor subtypes. *Pharmacology & Therapeutics* 101 p 65-74.
- PHILIPSON, L.H. (2002)Beta-Agonists and metabolism.*J Allergy Clin Immunol.* Dec; 110(6 Suppl):S313-7.
- PRINCE, F.P. Ultrastructural evidence of adrenergic, as well as cholinergic, nerve varicosities in relation to the lamina propria of the seminiferous tubules during childhood *Tissue Cell* 28 p 507-513.
- QUAYLE JM, NELSON MT, STANDEN NB. (1997) ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol Rev.* Oct;77(4):1165-232.
- QUINN KV, CUI Y, GIBLIN JP, CLAP LH, TINKER A. (2003) Do anionic phospholipids serve as cofactors or second messengers for the regulation of activity of cloned ATP-sensitive K⁺ channels? *Circ Res*; 93: 646-655.
- REICHLIN S. (1992) Hypothalamus and Pituitary: Neuroendocrinology *In: Textbook of Endocrinology 8a ed, Wilson-Foster eds, WB Saunders Company-Philadelphia,* pp 158-161.
- SCHULZE D, KRAUTER T, FRITZENSCHAFT H, SOOM M, BAUKROWITZ T. (2003) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) modulation of ATP and pH sensitivity in Kir channels. A tale of an active and a silent PIP₂ site in the N terminus.*J Biol Chem.* Mar 21; 278(12):10500-5

- SCHWATRZ, J H (1995) Signalling within nerve cells: Membrane Potential *In: Essentials of Neural Science and Behavior* Kandell E.R ; Schwatzr,J H; Jessel T.M eds, 1st ed, pp 133-148.
- SCOFIELD MA, DEUPREE JD, BYLUND DB.(2002) Adrenergic receptor genes: cDNA and genomic library construction. *Mol Biotechnol* Jun;21(2):171-97.
- SETCHELL BP, MADDOCKS S, BROOKS DE (1994) Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive tract. *In: Knobil E, Neill JD (Eds.), The Physiology of Reproduction 2nded. Raven Press, New York* pp.1063-1175.
- SKINNER, T.J.; HEINDEL, J.J. (1990) Identification and characterization of a beta-adrenergic receptor in hamster Sertoli cells. *J Androl.* May-Jun;11(3):293-300.
- STARKE, K. (1987) Presynaptic alpha-autoreceptors.*Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1987;107:73-146.
- STROSBURG, A.D. (1997) Structure and function of the beta 3-adrenergic receptor. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*; 37:421-50.
- TASH, J.S.; WELSH, M.J.; MEANS, R.R. (1980) Protein kinase inhibitor as an intracellular marker of FSH action on the Sertoli cell. *In: Steinberg, A.; Steinberg, E. eds, Testicular development, structure and function. New York Raven Press,* p 167-189.
- TOLSZCZUK M, FOLLEA N, PELLETIER G. (1988) Characterization and localization of β -adrenergic receptors in control and cryptorchidized rat testis by in vitro autoradiography. *J Androl*; 3: 172-177
- TROISPOUX C, REITER E, COMBARNOUS Y, GUILLOU F. (1998) β 2 adrenergic receptors mediate cAMP, tissue-type plasminogen activator and transferrin production in rat Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol*; 142: 75-86.
- VASSART, G.; PARDO, L.; COSTAGLIOLA, S. (2004) A molecular dissection of the glycoprotein hormone receptors. *TRENDS in Biochemical Sciences* 29 (3) p 119-126
- VERHOEVEN,G.; CAILLEAU,J.; DE MOOR, P. (1980) Desensitization of cultured rat Sertoli cells by follicle stimulating hormone and by L-isoproterenol. *Mol. Cell. Endocrinology*, **20**:113-126.
- VON LEDEBUR EICF, ALMEIDA JP, LOSS ES, WASSERMANN GF. (2002) Rapid effect of testosterone on rat Sertoli cell membrane potential. Relationship with K^+ _{ATP} channels. *Horm Metab Res*; 34: 550-555.

- WASSERMANN, G.F. AND LOSS E.S.(2004) Testosterone action on the Sertoli cell membrane: A $K_{IR6.x}$ channel related effect. *Curr Pharm Design*; 10: 000-000
- WASSERMANN, G.F.; LUDWIG, M.S.; BARRETO, K.P. (1996) β -adrenergic stimulation of amino acid transport in Sertoli cell-enriched testes of rats is independent of its action on protein synthesis. *Med Sci Res*; 24: 149-151.
- WASSERMANN, G.F.; TRAMEZZANI, J.H. (1961) Complete separation of adrenaline and noradrenaline-secreting cells in a snake's adrenal gland. *Acta Physiol Lat Am*. 11:148-9.
- WONG, S.K.-F. (2003) G protein selectivity is regulated by multiple intracellular regions of GPCRs. *Neurosignals* 12 p 1-12.
- XIANG Y, KOBILKA BK.(2003) Myocyte adrenoceptor signaling pathways.*Science*. Jun 6;300(5625):1530-2.
- XIAO R.P., CHENG H., ZHOU Y.Y., KUSCHEL M., LAKATTA E.G. (1999) Recent Advances in Cardiac β_2 -adrenergic signal transduction. *Circ. Res.*; 85:1092-1100
- XIAO RP, ZHANG SJ, CHAKIR K, AVDONIN P, ZHU W, BOND RA. (2003) Enhanced G_i signaling selectively negates β_2 -adrenergic receptor (AR)- but not β_1 -AR-mediated positive inotropic effect in myocytes from failing rat hearts. *Circulation*; 108: 1633-1639.
- XIAO, R.P. (2000) Cell logic for a dual coupling of a single class of receptors to G_s and G_i proteins. *Circ. Res.* 87, p 635-637.
- ZIEHER LM, DEBELJUK L, ITURRIZA F, MANCINI RE (1971). Biogenic Amine Concentration in testes of rats at different ages. *Endocrinology*; 88: 351-354.