

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

Ações da Insulina e do IGF-I sobre marcadores de ação hormonal em células de Sertoli de ratos em diferentes estágios de desenvolvimento

Gustavo Monteiro Escott

Orientador: Prof. Dr. Eloísa da Silveira Loss

Março, 2012

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

Ações da Insulina e do IGF-I sobre marcadores de ação hormonal em células de Sertoli de ratos em diferentes estágios de desenvolvimento

Gustavo Monteiro Escott

Orientador: Prof. Dr. Eloísa da Silveira Loss

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas – Fisiologia

Março, 2012

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Wanderli e Clarice, pelo exemplo de vida; por me mostrarem o valor dos estudos e por não medirem esforços para que eu chegasse até aqui.

Ao meu irmão, Leonardo, pela amizade e por me fazer escolher a profissão certa.

À minha namorada, Bianca, por toda ajuda e amor oferecido em todos os momentos.

À professora Eloísa Loss pela oportunidade, incentivo e dedicação.

À professora Ana Paula Jacobus pelos ensinamentos, apoio, dedicação e carinho. Por idealizar junto e me acompanhar em todos os momentos desse projeto.

Aos colegas Alexandre Luz de Castro, Luciana Abreu, Fernanda Cavalari, Lauren Oliveira, Laura Aires e Muriel Dornelles pela ajuda, amizade e por partilhar o dia-a-dia comigo.

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

A Elsa Pires e Rita Alves Pereira pelo carinho oferecido.

Aos meus amigos pela amizade e os bons momentos.

Ao CNPq, CAPES e PROPESQ-UFRGS pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	6
LISTA DE ABREVIATURAS	7
RESUMO	8
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	12
1.1 GÔNADA MASCULINA	12
1.2 CÉLULAS DE SERTOLI	13
1.3 FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA DO TIPO I (IGF-I)	15
1.4 INSULINA	16
1.5 RECEPTORES TIROSINA CINASE	18
1.5.1 Análogo Inativo do IGF-I (JB1).....	20
1.6 CANAIS DE CÁLCIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM (VDCC).....	20
1.6.1 Canais de Cálcio Dependentes de Voltagem do Tipo L	23
1.7 TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS.....	24
1.8 TRANSPORTE DE GLICOSE E PRODUÇÃO DE LACTATO	25
2 OBJETIVOS.....	28
2.1 OBJETIVO GERAL	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 MATERIAIS.....	29
3.1.1 Animais Experimentais	29
3.1.2 Soluções	29
3.1.2.1 Solução Tampão Krebs Ringer Bicarbonato	29
3.1.2.2 Solução de Lantânio	30
3.1.3 Substâncias Utilizadas	31
3.2 MÉTODOS.....	33
3.2.1 Técnica Eletrofisiológica de Registro Intracelular	33
3.2.1.1 Preparação dos Túbulos Seminíferos.....	33
3.2.1.2 Registro intracelular	33
3.2.2 Captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$	35
3.2.3 Transporte de [^{14}C]MeAIB.....	35
3.2.4 Transporte de [^{14}C]2-DG	35
3.2.5 Processamento das Amostras	36
3.2.6 Análise Estatística	36

3.2.7 Biossegurança	37
3.2.8 Considerações Éticas	37
4 RESULTADOS	38
4.1 AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DO IGF-I SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA DE CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DE 12 A 15 DIAS DE IDADE	38
4.2 EFEITO DO VERAPAMIL SOBRE A AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DO IGF-I EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DE 12 A 15 DIAS DE IDADE	38
4.3 EFEITO DO JB1 SOBRE A AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DO IGF-I EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DE 12 A 15 DIAS DE IDADE.....	39
4.4 AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DA INSULINA EM DIFERENTES DOSES SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA DE CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DE 12 A 15 DIAS DE IDADE	40
4.5 EFEITO DO VERAPAMIL SOBRE A AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DA INSULINA EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DE 12 A 15 DIAS DE IDADE	40
4.6 EFEITO DO JB1 SOBRE A AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DA INSULINA EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DE 12 A 15 DIAS DE IDADE	41
4.7 AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DO IGF-I EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DE 30 DIAS DE IDADE.....	42
4.8 COMPARAÇÃO DA AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DO IGF-I EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DE 12 A 15 E DE 30 DIAS DE IDADE	42
4.9 AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DA INSULINA EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DE 30 DIAS DE IDADE.....	43
4.10 COMPARAÇÃO ENTRE AS AÇÕES ELETROFISIOLÓGICAS DA INSULINA EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DE 12 A 15 E DE 30 DIAS DE IDADE	43
4.11 EFEITO DO JB1 SOBRE A AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DA INSULINA EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DE 30 DIAS DE IDADE	44
4.12 AÇÃO DO IGF-I SOBRE A CAPTAÇÃO DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$ EM TESTÍCULOS INTEIROS.....	44
4.13 AÇÃO DA INSULINA SOBRE A CAPTAÇÃO DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$ EM TESTÍCULOS INTEIROS	45
4.14 AÇÃO DO IGF-I SOBRE O TRANSPORTE DE ^{14}C MEAIB EM TESTÍCULOS INTEIROS	45
4.15 AÇÃO DA INSULINA SOBRE O TRANSPORTE DE ^{14}C MEAIB EM TESTÍCULOS INTEIROS.....	46
4.16 AÇÃO DO IGF-I SOBRE O TRANSPORTE DE ^{14}C 2-DG EM TESTÍCULOS INTEIROS	46
4.17 AÇÃO DA INSULINA SOBRE O TRANSPORTE DE ^{14}C 2-DG EM TESTÍCULOS INTEIROS	47
5 DISCUSSÃO	48
6 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS.....	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Biologia Celular do Testículo	7
Figura 1.2: Proliferação da célula de Sertoli em diferentes espécies	8
Figura 1.3: Representação do Receptor Tirosina-Cinase	14
Figura 1.4: Molécula de JB1	15
Figura 1.5: Representação de um Cav1 e suas subunidades	17
Figura 1.6: Classificação dos VDCC.....	17
Figura 4.1: Ação do IGF-I sobre o PM de células de Sertoli de 12 a 15 dias	33
Figura 4.2: Efeito do verapamil sobre a ação do IGF-I sobre o PM de células de Sertoli.....	33
Figura 4.3: Efeito do JB1 sobre a ação do IGF-I sobre o PM de células de Sertoli	34
Figura 4.4: Ação da insulina sobre o PM de células de Sertoli de 12 a 15 dias.....	35
Figura 4.5: Efeito do verapamil sobre a ação da insulina sobre o PM de células de Sertoli.....	35
Figura 4.6: Efeito do JB1 sobre a ação da insulina sobre o PM de células de Sertoli	36
Figura 4.7: Comparação da ação da insulina aos 180 segundos com e sem JB1	36
Figura 4.8: Ação do IGF-I sobre o PM de células de Sertoli de 30 dias	37
Figura 4.9: Comparação da ação do IGF-I sobre o PM de células de Sertoli de 12 a 15 e 30 dias de idade.....	37
Figura 4.10: Ação da insulina sobre o PM de células de Sertoli de 30 dias	38
Figura 4.11: Comparação da ação da insulina sobre o PM de células de Sertoli de 12 a 15 e 30 dias de idade	38
Figura 4.12: Efeito do JB1 sobre a ação da insulina sobre o PM de células de Sertoli de 30 dias de idade.....	39
Figura 4.13: Ação do IGF-I sobre captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em testículos inteiros.....	39
Figura 4.14: Ação da insulina sobre captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em testículos inteiros	40
Figura 4.15: Ação do IGF-I sobre o transporte de [^{14}C]MeAIB em testículos inteiros	40
Figura 4.16: Ação da insulina sobre o transporte de [^{14}C]MeAIB em testículos inteiros.....	41
Figura 4.15: Ação do IGF-I sobre o transporte de [^{14}C]2-DG em testículos inteiros	41
Figura 4.18: Ação da insulina sobre o transporte de [^{14}C]2-DG em testículos inteiros	42

LISTA DE ABREVIATURAS

α : Alfa

β : Beta

γ : Gama

δ : Delta

Ω : Ohm

μM : Micromolar

$^{45}\text{Ca}^{2+}$: Íon cálcio radioativo

Ca^{2+} : Íon cálcio

DM: Diabetes Mellitus

VDCC: Canais de Cálcio Dependentes de Voltagem

FSH: Hormônio Folículo Estimulante

GLUT: Transportador de glicose

GPCR: Receptor acoplado à proteína G

Hz: Hertz

I: Corrente

IGF-I: Fator de crescimento semelhante à insulina do tipo I

IGF-IR: Receptor de IGF-I

IGF-II: Fator de crescimento semelhante à insulina do tipo II

IGFBP: Proteína ligadora de IGF

IR: Receptor de insulina

KCl: Cloreto de Potássio

KRb: Solução de Krebs

LH: Hormônio Luteinizante

M Ω : Megaohms

M: Molar

MAPK: Proteína cinase ativada por mitógeno

ml: Mililitros

mM: Milimolar

ms: Milissegundos

mV: Milivolts

nA: Nanoampére

ng/ml: Nanogramas por mililitro

N-terminal: Terminal Amino

pH: Potencial Hidrogeniônico

PI3K: Fosfatidil Inositol-3-quinase

RTK: Receptor tirosina-cinase

V: Volts

RESUMO

A insulina e o IGF-I são hormônios que possuem alta homologia, isto é, apresentam grande semelhança estrutural no que se refere a sequência de aminoácidos. Assim como os hormônios, seus receptores de membrana também são semelhantes, e a similaridade de suas sequências de aminoácidos é em torno de 50%. Essas semelhanças permitem que ambos os hormônios se liguem aos seus receptores com alta afinidade e ao receptor do outro hormônio com menor afinidade. Tanto insulina como IGF-I desencadeiam uma série de efeitos sobre as células de Sertoli, como transporte de glicose e produção de lactato.

Dessa forma, este estudo tem por objetivo investigar a ação do IGF-I e da insulina sobre a captação de cálcio, o transporte de aminoácido e glicose, além de suas ações eletrofisiológicas em células de Sertoli de ratos de 12 a 15 dias e de 30 dias de idade.

Para o registro do potencial de membrana foram utilizados túbulos seminíferos isolados de testículos de ratos Wistar machos de 12 a 15 dias de idade e de 30 dias de idade. O registro intracelular da célula de Sertoli foi realizado utilizando microcapilares de borossilicato preenchidos com KCl 3 M acoplados a um eletrômetro. Foi realizada a aplicação tópica de IGF-I (100 ng/ml) e insulina (100 μ M) isoladamente e também após a perfusão com a verapamil (100 μ M) e JB1 (1 μ g/ml). A captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ foi investigada se utilizando testículos inteiros. Os tecidos foram pré-incubados em KRb com $^{45}\text{Ca}^{2+}$ por 60 minutos para equilibrar o meio intra e extracelular de $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Em seguida, as gônadas foram incubadas por 2 minutos em KRb com $^{45}\text{Ca}^{2+}$ com ou sem IGF-I ou insulina. O transporte de [^{14}C]MeAIB e [^{14}C]2-DG também foram investigados se utilizando de testículos inteiros. Com pré-incubação de 30 minutos em KRb sem [^{14}C]MeAIB ou [^{14}C]2-DG, e posterior incubação de 45 minutos com [^{14}C]MeAIB ou de 120 minutos com [^{14}C]2-DG, com ou sem o respectivo hormônio a ser investigado. Os resultados foram dados como média \pm SEM. Os dados foram analisados pelo teste T student para comparação entre dois grupos ou ANOVA para medidas repetidas com o pós-teste de Bonferroni.

IGF-I e insulina produziram um efeito despolarizante sobre o potencial de membrana das células de Sertoli de ratos imaturos. Este efeito é dependente do influxo de cálcio, uma vez que a perfusão com verapamil bloqueou a ação dos dois hormônios. A resposta despolarizante do IGF-I foi bloqueada pelo JB1, enquanto que a resposta à insulina foi parcialmente bloqueada. Em ratos de 30 dias, apenas a insulina apresentou uma despolarização significativa. IGF-I e insulina também estimularam a captação de cálcio, aminoácido e glicose. A ação da insulina sobre o transporte de cálcio foi totalmente bloqueada pelo JB1 enquanto que do IGF-I foi apenas parcialmente bloqueado. Já sobre o transporte de aminoácido, o JB1 não exerceu qualquer efeito sobre a ação da insulina, enquanto que o efeito do IGF-I foi parcialmente

bloqueado. E a estimulação do transporte de glicose pelo IGF-I não foi bloqueada pelo JB1, e a da insulina parcialmente bloqueada.

Esses dados mostram que IGF-I e insulina, em diferentes parâmetros, se utilizam não apenas de seus receptores cognatos, mas também de outros receptores de membrana. Dessa forma, ficou claro que a sinalização gerada por esses hormônios nas células de Sertoli depende da presença dos receptores de ambos os hormônios na membrana celular para que eles sejam capazes de interferir nos processos metabólicos e funcionais dessas células.

ABSTRACT

Insulin and IGF-I are hormones which have high homology. In other words, they have high structural similarity with regard to the sequence of amino acids. As well as the hormones, their membrane receptors are also similar, and the similarity of their amino acid sequences is around 50%. These similarities allow both hormones bind to their receptors with high affinity and to each other's receptor with lower affinity. Both insulin and IGF-I trigger a number of effects on the Sertoli cells, such as transporting glucose and lactate production.

Thus, this study aims to investigate the action of IGF-I and insulin on calcium uptake, transport of amino acids and glucose, as well as their electrophysiological actions in Sertoli cells from 12- to 15- and 30-days-old rats.

To record the membrane potential were used isolated seminiferous tubules from 12- to 15- and 30-days-old rats. The intracellular recording of Sertoli cells was performed using microcapillaries filled with 3 M KCl coupled to an electrometer. Was performed topical application of IGF-I (100 ng/ml) and insulin (100 mM) alone and also after infusion with verapamil (100 mM) and JB1 (1 µg/ml).

The uptake of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ was investigated using whole testes. Tissues were pre-incubated in KRb with $^{45}\text{Ca}^{2+}$ for 60 minutes to equilibrate intra and extracellular medium. Then, the gonads were incubated for 2 minutes in KRb with $^{45}\text{Ca}^{2+}$ and with or without IGF-I or insulin. The transport of [^{14}C]MeAIB and [^{14}C]2-DG were also investigated using whole testes. Which was pre-incubated for 30 minutes in KRb without [^{14}C]MeAIB or [^{14}C]2-DG, and further was incubated for 45 minute in KRb with [^{14}C]MeAIB or 120 minutes with [^{14}C]2-DG, with or without the respective hormone to be investigated.

The results are given as mean \pm SEM. Data were analyzed by Student's t test for comparison between two groups or ANOVA for repeated measures with Bonferroni post-test.

IGF-I and insulin produced a depolarizing effect on the membrane potential of Sertoli cells from immature rats. This effect is calcium influx dependent, since the verapamil infusion blocked the action of the two hormones. The depolarizing response of IGF-I was blocked by JB1, whereas the depolarizing response of insulin was partially blocked. In 30-day-old rats, only insulin showed a significant depolarization. Insulin and IGF-I also stimulated the uptake of calcium, amino acids and glucose. The action of insulin on calcium uptake was completely blocked by JB1 while IGF-I was only partially blocked. On amino acid transport, JB1 had no effect on the insulin action, while IGF-I effect was partially blocked. And stimulation of glucose transport by IGF-I was blocked by JB1 and partially blocked the insulin effect.

These data show that IGF-I and insulin on different parameters, use not only their cognate receptors, but also other membrane receptors. Thus, it became clear that the signal

generated by these hormones in Sertoli cells depends on the presence of receptors for both hormones in the cell membrane to they are able to interfere on the functional and metabolic processes of these cells.

1 INTRODUÇÃO

1.1 GÔNADA MASCULINA

Os testículos são órgãos pareados, ovoides e encapsulados (Santen e Bardin, 1973). Sua função básica é promover a produção dos espermatozoides e de hormônios esteroides e proteicos essenciais à função reprodutiva masculina (Fawcett *et al.*, 1970). Esses órgãos são constituídos de dois compartimentos funcional e morfológicamente distintos, envoltos por uma cápsula chamada de túnica albugínea, que configuram duas unidades funcionais: uma rede de túbulos seminíferos para a produção e transporte de espermatozoides e; um tecido intersticial composto pelas células de Leydig, que tem a função de produzir hormônios androgênicos, vasos sanguíneos e linfáticos responsáveis pelo movimento de hormônios e nutrientes para dentro e fora dos testículos (Skinner, 1991; O'donnell *et al.*, 2006). Os túbulos seminíferos estão fortemente enrolados e empacotados o que confere a eles uma maior extensão dentro dos testículos. Estes são revestidos pelas células mioides peritubulares, células germinativas primitivas e células de Sertoli (Ganong, 2006).

As células de Sertoli são células grandes e complexas que contém glicogênio e que se estendem da lâmina basal do túbulo até seu lúmen. Essas células são essenciais no desenvolvimento das células germinativas (Ray, 1999). Possuem junções entre as células adjacentes, próximo à lâmina basal, denominadas junções apertadas. Essas junções formam a barreira hematotesticular, que impede a passagem de agentes nocivos e complexos imunológicos oriundos do tecido intersticial (Mruk e Cheng, 2004; Ganong, 2006). No entanto, as células de Sertoli e células de Leydig possuem a habilidade de receber sinais endócrinos da corrente sanguínea e transmiti-los de forma apropriada para as células germinativas em desenvolvimento (O'donnell *et al.*, 2006).



Figura 1.1: Biologia Celular do Testículo (adaptado de Silverthorn, 2010).

1.2 CÉLULAS DE SERTOLI

Ainda no período fetal, a célula de Sertoli é a primeira célula identificável a se diferenciar a partir da gônada bipotencial. Durante esse período ela promove a formação dos túbulos seminíferos, possibilita a diferenciação de outras células testiculares, impede a entrada das células germinativas em meiose e garante a regressão dos ductos de Müller através de secreção do hormônio anti-mülleriano (AMH). Além disso, o número de células de Sertoli irá determinar o número de células germinativas que serão suportadas na espermatogênese e, portanto, a extensão numérica da produção de espermatozoides do indivíduo adulto. Dessa forma, a célula de Sertoli exerce um papel central no desenvolvimento de um testículo funcional e, portanto, na expressão de um fenótipo masculino (Sharpe *et al.*, 2003; Silverthorn, 2010).

Portanto, o desenvolvimento e a proliferação normais das células de Sertoli são essenciais para uma função testicular adequada na vida adulta. A proliferação das células de Sertoli, em ratos, ocorre durante o período fetal e pré-puberal, que dura até, aproximadamente, os 15 dias de vida do animal (Steinberger e Steinberger, 1971; Sharpe *et al.*, 2003), esse período de proliferação varia de espécie para espécie (Figura 1.2) (Sharpe *et al.*, 2003).

Na puberdade, quando esses eventos já ocorreram, o papel das células de Sertoli muda e essas células passam a ser o principal componente estrutural dos túbulos seminíferos tendo como função fundamental o suporte físico e nutricional das células germinativas (Griswold, 1998; Sharpe *et al.*, 2003; Loss, Eloísa Silveira *et al.*, 2007).

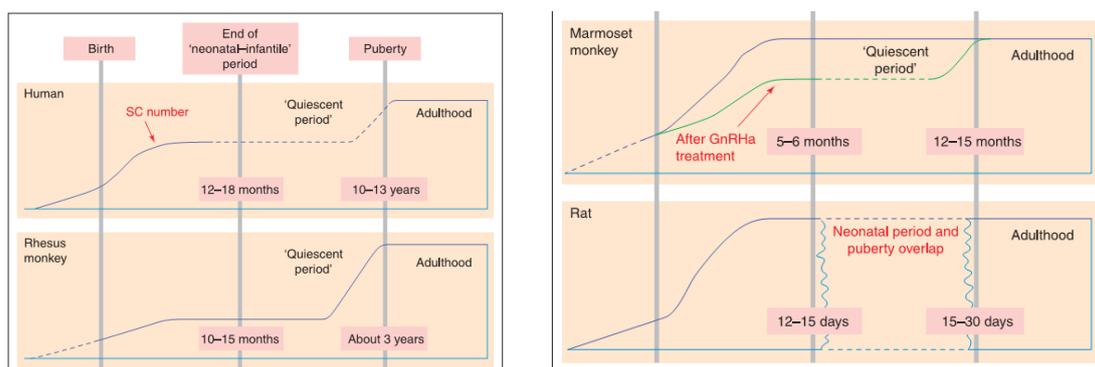


Figura 1.2: Proliferação da célula de Sertoli em diferentes espécies (adaptado de Sharpe *et al.*, 2003).

A célula de Sertoli desempenha um importante papel no desenvolvimento das células germinativas e o exato mecanismo da proliferação e diferenciação dessas células ainda requer maior elucidação (Nakayama *et al.*, 1999). No entanto, sabe-se que diversos hormônios – como FSH, LH, testosterona, insulina e IGF-I – estão envolvidos nesse processo e que é

necessário um controle hormonal hipofisário para que ele ocorra normalmente. A adeno-hipófise, por estímulo hipotalâmico, produz o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH). Esses hormônios atuam no processo da espermatogênese e na produção de esteroides, respectivamente (Vannelli *et al.*, 1988; Gnessi *et al.*, 1997; Griswold, 1998; Nakayama *et al.*, 1999). A ação hormonal do FSH e da testosterona promove as junções ocludentes. À medida que os espermátócitos vão amadurecendo e migrando em direção ao lúmen do túbulo novas junções entre as células de Sertoli se desenvolvem enquanto que as antigas se desfazem (Mruk e Cheng, 2004).

A formação dessas junções ocludentes determina uma relação parácrina entre a célula de Sertoli e as células germinativas, nos diferentes estágios de seu desenvolvimento (Jégou, 1993; Griswold, 1998). As células de Sertoli suprem as células germinativas com fatores de crescimento, proteínas ligadoras (como proteínas ligadoras de androgênios e transferrina) e garantem a principal fonte de energia de espermátócitos e espermátides: o lactato. Dessa forma, a célula de Sertoli promove o crescimento e a diferenciação das células germinativas além de manter o micro ambiente tubular (Froment *et al.*, 2007; Galardo *et al.*, 2008). Sabe-se que a insulina e os fatores de crescimento também possuem importante papel na diferenciação gonadal e na espermatogênese, um exemplo da atuação desses hormônios está relacionado com a estimulação da produção e secreção do lactato pela célula de Sertoli. (Oonk e Grootegoed, 1988; Galardo *et al.*, 2008).

Diversos mecanismos podem contribuir para o aumento da produção e secreção de lactato pela célula de Sertoli, um deles é o transporte da principal fonte de carbono para sua produção, a glicose (Galardo *et al.*, 2008). O transporte de glicose através da membrana da célula pode ser estimulado tanto por insulina como por IGF-I, através de seus receptores de membrana e de acordo com a fase do desenvolvimento em que se encontra o testículo (Oonk e Grootegoed, 1988; Mclachlan *et al.*, 2002). Galardo *et al.* (2008), demonstraram que hormônios reconhecidamente indispensáveis ao desenvolvimento dos testículos e das células germinativas, como o FSH e fatores de crescimento, ao estimularem o desenvolvimento testicular aumentam a captação de glicose e a produção de lactato por células de Sertoli em cultura.

Os fatores de crescimento atuam através de ações parácrinas e autócrinas, influenciando também no desenvolvimento e na diferenciação gonadal. Entre os fatores de crescimento envolvidos nestas ações encontram-se o fator de crescimento epidermal (EGF), o fator de crescimento tumoral (TGF- α) e o fator crescimento semelhante à insulina do tipo I (IGF-I) (Mclachlan *et al.*, 2002; Skinner e Griswold, 2005).

1.3 FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA DO TIPO I (IGF-I)

O IGF-I ou somatomedina é um peptídeo mitogênico que atua como um regulador positivo na proliferação e diferenciação celular. Primariamente produzido pelo fígado, sob controle do hormônio do crescimento (GH), o IGF-I é secretado na circulação e transportado por proteínas ligadoras de IGF (IGFBPs), sendo transportados até seus tecidos-alvos. Além desta atuação endócrina, o IGF-I também pode atuar em diversos tecidos de forma autócrina ou parácrina, podendo agir como regulador de crescimento (Froment *et al.*, 2007). Nestes casos o IGF-I pode ser produzido e secretado localmente. Esta ação localizada do IGF-I, bem como o estímulo para sua produção e de suas proteínas ligadoras, originou um conceito chamado de sistema IGF (Ritzén, 1983; Khan *et al.*, 2002). Em ambos os casos o IGF-I atua através da sinalização mediada por seu receptor de membrana (IGF-IR). O IGF-IR é um receptor do tipo tirosina-cinase, o qual pertence à família do receptor de insulina (RTK classe II) (Figura 3), classe em que estão classificados também o receptor de insulina (IR) e o IRR (*insulin-related receptor*) (Andersen *et al.*, 1992; Fantl *et al.*, 1993; Entingh-Pearsall e Kahn, 2004; Gauguin *et al.*, 2008).

As células de Sertoli têm um sistema autócrino completo de IGF-I com a presença de IGF-I (secretado pela própria célula por estimulação do FSH), de receptor de IGF-I (IGF-IR) e ainda com a produção de proteínas ligadoras de IGF, principalmente IGFBP3, que inibe os efeitos de IGF-I exógeno ao sistema tubular (Chatelain *et al.*, 1991; Rappaport e Smith, 1995; Nakayama *et al.*, 1999; Khan *et al.*, 2002). Dessa forma, a célula de Sertoli possui os componentes necessários para a síntese e a transdução de sinal do IGF-I, bem como para a modulação desse sistema, que pode ser regulado pelo FSH (Nakayama *et al.*, 1999; Khan *et al.*, 2002).

Diversos estudos sugerem que o IGF-I regula importantes funções testiculares como a proliferação e sobrevivência das células germinativas, a produção de testosterona pelas células de Leydig, e estimulam a atividade das células de Sertoli (Froment *et al.*, 2007).

Em células de Sertoli, o IGF-I atua regulando seu crescimento, diferenciação, proliferação e suas diversas funções de acordo com o estágio do desenvolvimento da célula. O IGF-I é capaz de estimular o transporte de glicose e a produção e secreção de lactato em células de Sertoli em cultura, possivelmente contribuindo para o controle das ações dessa célula sobre a espermatogênese (Oonk e Grootegoed, 1988; Meroni *et al.*, 2004).

Foi demonstrado por Jacobus *et al.* (2010), utilizando testículos inteiros de ratos imaturos, que o IGF-I estimula a captação de cálcio – um importante íon envolvido com a sinalização intracelular e diversos processos celulares. No mesmo estudo foi também descrita

a ação estimulante do IGF-I sobre o do transporte de aminoácidos, atuando provavelmente na fase de proliferação dessas células durante seu desenvolvimento.

Aparentemente as ações do IGF-I estão intensificadas durante a fase de proliferação da célula de Sertoli (em ratos até os 15 dias de vida) e à medida que o desenvolvimento progride a insulina atua com maior intensidade sobre os receptores tirosina-cinase dessas células (Oonk e Grootegoed, 1988).

1.4 INSULINA

A insulina é um hormônio anabólico produzido pelas células β pancreáticas e tem fundamental importância na regulação de diversos processos biológicos. Entre esses processos podemos citar a manutenção da homeostase da glicemia, o metabolismo lipídico e da glicose, expressão gênica, síntese proteica e o crescimento, a divisão e a sobrevivência celulares (Carvalho *et al.*, 2002; Jensen e De Meyts, 2009). Amplamente reconhecida por seu importante papel no controle da glicemia, a insulina mantém a homeostase da glicose atuando em diferentes alvos, como fígado, músculos e tecido adiposo. Dessa forma este hormônio regula, por exemplo, a captação periférica da glicose sanguínea e a sua produção hepática (Carvalho *et al.*, 2002).

Além de seus efeitos amplamente difundidos sobre a regulação do metabolismo energético, sabe-se que a insulina também exerce um papel fundamental na formação dos testículos, sendo seu receptor indispensável para o surgimento das gônadas e, portanto, para a diferenciação sexual masculina (Nef *et al.*, 2003; Kokk *et al.*, 2005). Em células de Sertoli a insulina é capaz de estimular o transporte de glicose e a produção e secreção de lactato, contribuindo para a espermatogênese (Oonk *et al.*, 1989).

Para desencadear seus efeitos nas diversas células a insulina atua através da ligação com seu receptor de membrana (IR). O IR pertence a uma família de receptores de fatores de crescimento que têm atividade tirosina cinase intrínseca, na qual se incluem o IR e o IGF-IR. Após a ligação da insulina com seu receptor, o mesmo sofre autofosforilação em múltiplos resíduos de tirosina. Isto resulta na ativação da cinase do receptor e consequente fosforilação em tirosina de uma família de substratos do receptor de insulina (IRS). As vias de sinalização decorrentes da ligação da insulina com seu receptor são complexas e nos mostram a diversidade de efeitos que esse hormônio pode gerar nas mais diferentes células do organismo (Saltiel e Kahn, 2001; Carvalho *et al.*, 2002). Entre esses efeitos estão incluídas a regulação da diferenciação, crescimento, sobrevivência e metabolismo celular (Fantl *et al.*, 1993; Carvalho *et al.*, 2002; Kokk *et al.*, 2005).

Atualmente, dez substratos do receptor de insulina já foram identificados. Quatro desses pertencem à família dos substratos do receptor de insulina, as proteínas IRS. Outros substratos incluem Shc, Gab-1, p60dok, Cbl, JAK2 e APS. Experimentos com camundongos knockout para IRS-1 e IRS-2 recentemente elucidaram suas funções fisiológicas. O animal que não expressa IRS-1 apresenta resistência à insulina e retardo no crescimento, porém sem hiperglicemia. Já aquele camundongo que não apresenta o IRS-2 possui hiperglicemia acentuada com diversas anormalidades na ação da insulina nos tecidos periféricos e a falência da atividade secretória das células β acompanhada de redução significativa da massa de células β pancreáticas. Os fenótipos de camundongos que não expressam IRS-3 e IRS-4 não se apresentam alterados (Carvalho *et al.*, 2002; Kokk *et al.*, 2007; Belfiore *et al.*, 2009).

Em testículos de ratos, Kokk *et al.* (2007) demonstraram a presença de IRS-1 e IRS-2. Nas células de Sertoli foram detectados tanto IRS-1 como IRS-2. Possivelmente essas duas proteínas estejam envolvidas no processo de transporte de glicose pela célula. Outros hormônios e citocinas, como o IGF-I, que utilizam os IRS, também poderiam valer-se da presença dessas proteínas para estimular o transporte de glicose (Kokk *et al.*, 2007).

A falha na sinalização da insulina ou a deficiência na sua produção caracterizam os dois tipos de uma doença denominada Diabetes Mellitus (DM). Estudos demonstraram uma redução acentuada da fecundidade em machos diabéticos, o que sugere fortemente que a DM prejudica a fertilidade masculina (Agbaje *et al.*, 2007). De fato, a DM pode afetar a função reprodutiva masculina seja devido a seus efeitos sobre o controle endócrino da espermatogênese ou prejudicando a ereção peniana e ejaculação (Agbaje *et al.*, 2007). Foi demonstrado por Ballester *et al.* (2004) uma redução marcante na fecundidade quando os animais do sexo masculino são diabéticos.

Os mecanismos que estão envolvidos na diminuição da fertilidade ainda não estão claramente descritos. No entanto, Agbaje *et al.* (2007) mesmo não encontrando alterações em parâmetros normais de avaliação do sêmen, como o volume, observaram danos no DNA de espermatozoides de homens diabéticos. Essa deficiência na produção dos gametas poderia comprometer a fertilidade masculina.

Dessa forma, fica claro que a insulina está intimamente relacionada com a produção e o desenvolvimento espermatogênico, embora mais estudos sejam necessários para compreender o papel desempenhado por esse hormônio na função testicular (Agbaje *et al.*, 2007).

1.5 RECEPTORES TIROSINA-CINASE

Tanto insulina quanto IGF-I provocam diferentes respostas biológicas essenciais para a regulação metabólica normal e a estimulação do crescimento nas mais diferentes células do corpo. Estes efeitos são mediados pela ligação e ativação de receptores específicos de superfície celular. Os receptores de insulina e de IGF-I são glicoproteínas de membrana com estrutura heterotetramérica, compostas por 2 subunidades α e 2 subunidades β ligadas por pontes dissulfeto (Figura 3). Esses receptores são ativados através da ligação do hormônio com seu sítio de ligação, desencadeando o acoplamento das subunidades por dimerização e clivagem proteolítica dos respectivos prorreceptores. A subunidade α é completamente extracelular e contém o sítio de ligação para o ligante. Por outro lado, a subunidade β é transmembrana e possui atividade tirosina cinase intrínseca (Figura 1.3). A atividade tirosina cinase da subunidade β é inibida constantemente pela subunidade α . A ligação do hormônio à subunidade α permite que a subunidade β adquira sua atividade cinase, o que leva a alteração conformacional e autofosforilação, iniciando a sinalização intracelular (Molina *et al.*, 2000; Carvalheira *et al.*, 2002; De Meyts e Whittaker, 2002). Essa organização estrutural semelhante dos receptores de insulina e IGF-I se reflete também no que diz respeito à sequência de aminoácidos, sendo que sua similaridade global se aproxima de 50% (Andersen *et al.*, 1992).

Assim como seus receptores, a Insulina e o IGF-I, também possuem sequências de aminoácidos semelhantes. Dessa forma, ambos os hormônios se ligam aos seus receptores com alta afinidade. No entanto, tais similaridades permitem que cada hormônio se ligue fracamente ao receptor do outro, embora estudos de ligação por deslocamento indiquem que os dois receptores têm um sítio de ligação com características comuns (Andersen *et al.*, 1992).

Andersen *et al.* (1992), demonstraram que a substituição de 62 aminoácidos da subunidade N-terminal do receptor do IGF-I (IGF-IR) com os 68 aminoácidos correspondentes do receptor de insulina (IR) resulta em um receptor quimérico com um aumento de cerca de 200 vezes na afinidade para a insulina e apenas 5 vezes menor na afinidade para o IGF-I. Além disso, o autor sugere que o receptor IGF-I possa possuir sequências de aminoácidos de forma alternativa, que quando eliminadas possam permitir a ligação à insulina com maior afinidade.

Apesar dessa visível semelhança estrutural, IR e IGF-IR não são moléculas funcionalmente redundantes. Suas diferentes funções ficam claras em estudos com camundongos deficientes para um dos dois receptores. Camundongos sem IR nascem com leve retardo de crescimento, desenvolvem rapidamente cetoacidose diabética e morrem dentro de poucos dias após o nascimento. Por outro lado, camundongos sem IGF-IR possuem retardado severo de crescimento, apresentam anormalidades de crescimento e diferenciação

que são dependentes do receptor e morrem logo após o nascimento, provavelmente devido à insuficiência respiratória (Molina *et al.*, 2000; Entingh-Pearsall e Kahn, 2004).

Especificamente sobre os testículos, Nef *et al.* (2003) demonstraram que os receptores da família do receptor de insulina, incluindo IGF-IR e IR, são necessários para o aparecimento das gônadas masculinas e, portanto, para a diferenciação sexual masculina. Mesmo ratos que possuem cromossomos sexuais XY, se forem mutantes para esses receptores, desenvolverão ovários e apresentarão um fenótipo completamente feminino.

Oonk e Grootegoed (1988) demonstraram através de competição entre insulina e IGF-I pelos receptores tirosina-cinase em células de Sertoli, que o IGF-I tem afinidade muito maior por esses receptores até os 21 dias de idade, reduzindo seu efeito posteriormente. Ao passo que a insulina atua com maior intensidade após esta idade, assumindo as ações sobre esses receptores. Os autores discutem que o número de receptores de IGF-I e insulina pode ser regulado ao longo do desenvolvimento. Dessa forma, o IGF-I teria uma função mais importante que a insulina no que diz respeito ao desenvolvimento dos testículos e maturação das células de Sertoli, enquanto a insulina atuaria com maior intensidade na célula madura auxiliando na espermatogênese.

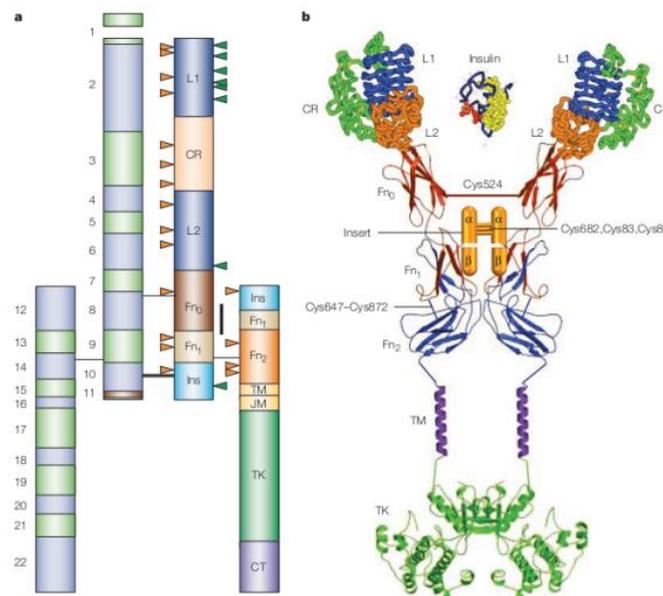


Figura 1.3: Representação do Receptor Tirosina-Cinase (adaptado de De Meyts e Whittaker, 2002).

1.5.1 Análogo Inativo do IGF-I (JB1)

A substituição do domínio D da molécula de IGF-I (estrutura que contribui para afinidade de ligação do IGF-I ao IGF-IR) produz o análogo inativo JB1, o qual possui alta afinidade pelo IGF-IR. O JB1 interage com o sítio de ligação do receptor para o fator de crescimento e impede a ligação do IGF-I, porém não altera o status de fosforilação do receptor (Figura 4) (Pietrkowski *et al.*, 1992).

Diversos estudos já demonstraram a ação do JB1 bloqueando os efeitos do IGF-I em diferentes células. Foi demonstrado por Pietrkowski *et al.* (1992) o efeito inibitório do JB1 sobre a estimulação do crescimento de células em cultura exercida pelo IGF-I. Malberg *et al.* (2007) também demonstraram que a administração de JB1 inibe os efeitos semelhantes a efeitos ansiolíticos e antidepressivos do IGF-I em ratos.

Em testículos de ratos, Jacobus *et al.* (2010) demonstraram que o JB1 inibe a estimulação da captação de cálcio e que o efeito despolarizante do IGF-I na membrana de células de Sertoli também foi bloqueado pelo JB1.

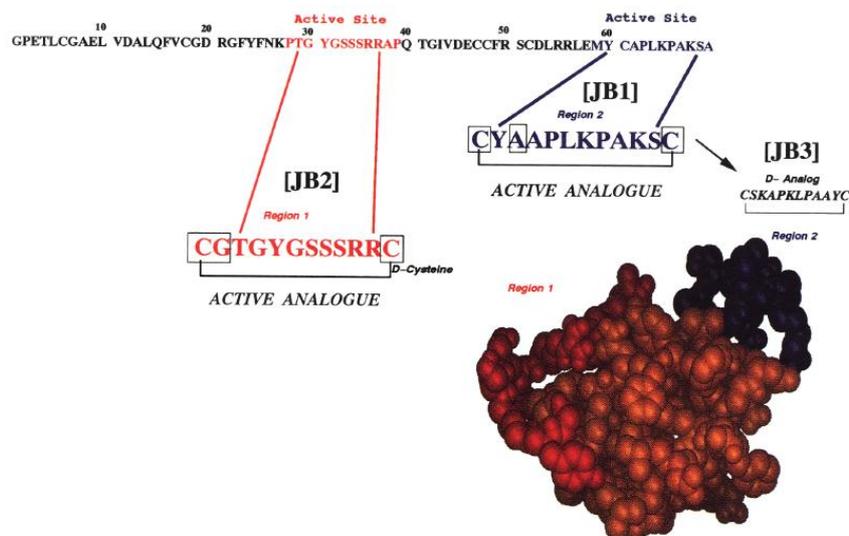


Figura 1.4: Substituição no domínio D da molécula de IGF-I produz o análogo inativo JB1 (Pietrkowski *et al.*, 1992).

1.6 CANAIS DE CÁLCIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM (VDCC)

Para se adaptar as mudanças ambientais as células necessitam de mecanismos de sinalização e comunicação. Essa sinalização necessita de mensageiros que variam suas concentrações ao longo do tempo. Nesse contexto, o cálcio se caracteriza como um dos

principais mediadores nos processos de sinalização e comunicação celular. Praticamente todas as ações celulares desencadeadas por atividade elétrica - como contração muscular, a liberação de neurotransmissores ou a secreção de hormônios - dependem de um aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} (Clapham, 2007; Pitt, 2007).

As funções de proteínas são governadas por sua forma e sua carga. A ligação do Ca^{2+} nas mais diversas proteínas causa alterações em suas formas e cargas e, conseqüentemente, em sua função em dado momento (Clapham, 2007).

Para que haja o fluxo de cálcio para dentro e para fora das células são necessárias proteínas de membrana que formam poros e permitem o movimento dos íons, chamados genericamente de canais de cálcio. Em geral, o fluxo de cálcio depende de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (VDCC). Sua presença é considerada uma das características principais de uma célula excitável e tendo uma visão simplista de outros canais iônicos poderia se afirmar que eles servem, principalmente, para regular o potencial de membrana da célula a fim de controlar os VDCC (Pitt, 2007).

Os VDCC são estruturas que formam canais na membrana plasmática e medeiam a entrada de Ca^{2+} para o interior da célula em resposta a despolarização da membrana. Diversos processos intracelulares como contração, secreção, neurotransmissão e expressão gênica nas mais diferentes células são regulados pela ação desses canais. Assim, a atividade dos VDCC é essencial para a associação entre sinalização elétrica e eventos fisiológicos celulares (Catterall, 2000). Os VDCC pertencem à superfamília de canais iônicos proteicos transmembrana, na qual estão incluídos os canais de potássio e de sódio dependentes de voltagem (Yu e Catterall, 2004).

A principal subunidade dos VDCC é chamada de subunidade $\alpha 1$, e as subunidades auxiliares são conhecidas como β , $\alpha 2$, δ e γ . Sendo que foram identificados, até agora, 10 genes para a subunidade $\alpha 1$, 4 genes para a subunidade β , 4 genes para o complexo $\alpha 2\delta$ e 8 genes para a subunidade γ . A subunidade $\alpha 1$ é a maior delas, e nela estão incluídos os sensores de voltagem, o poro de condução iônica e o componente de portão do canal. Além dos locais de regulação do canal, por drogas e toxinas. As subunidades auxiliares modulam as propriedades do complexo canal, gerando a diversidade eletrofisiológica e farmacológica, em associação com a subunidade $\alpha 1$ (Figura 1.5) (Hofmann *et al.*, 1999).

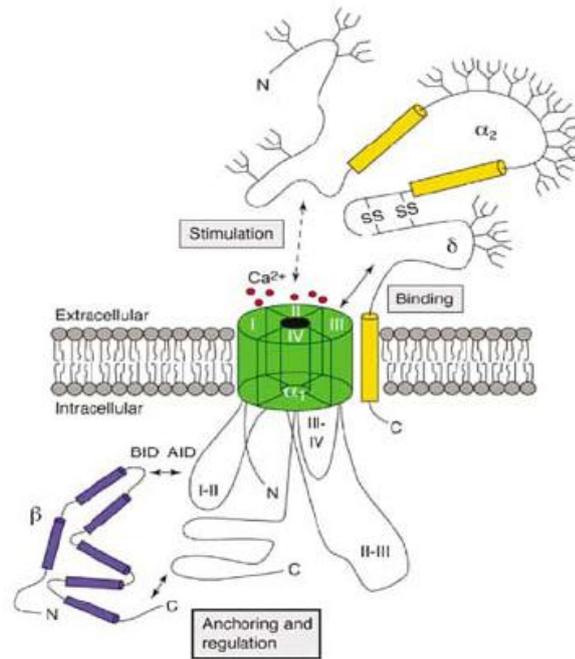


Figura 1.5: Representações do Cav1 e suas subunidades (adaptado de Dolphin, 2006)

Desde os primeiros registros de correntes de Ca^{2+} em miócitos cardíacos, tornou-se evidente a diversidade de tipos de canais de Ca^{2+} . Foram então descritas diferentes classificações: Farmacológica, Molecular e de acordo com o tipo de corrente (Catterall et al., 2005).

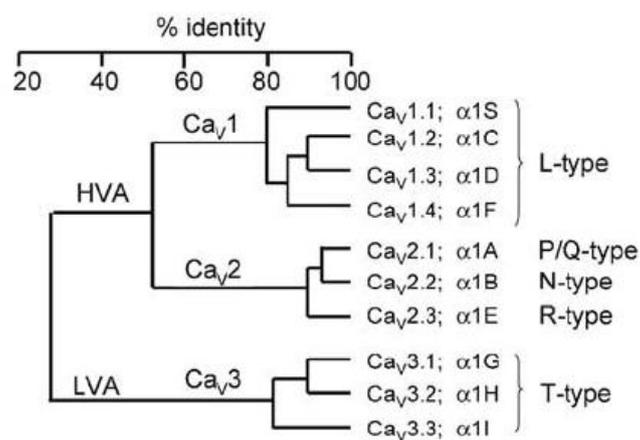


Figura 1.6: Classificação dos VDCC (Catterall et al., 2005)

1.6.1 Canais de Cálcio Dependentes de Voltagem do Tipo L

Os VDCC do tipo L foram originalmente caracterizados por sua sensibilidade à dihidropiridina (DHP) e por apresentarem uma condutância prolongada (long lasting) após a abertura do canal (Nowycky *et al.*, 1985), compondo esta classe estão quatro diferentes canais (Cav1.1- Cav1.4) (Ertel *et al.*, 2000).

Os canais de cálcio dependentes de voltagem tipo L (Cav1.n) tem uma estrutura homóloga aos demais VDCC. Entretanto, a composição de suas subunidades varia de acordo com o tecido e, conseqüentemente, varia sua função. Por exemplo, Cav1.2 pode ser coexpresso com várias subunidades β e $\alpha 2\delta$, e estudos de coexpressão heteróloga demonstraram que as 4 subunidades β já foram encontradas em associação com o VDCC, com diferentes voltagens de inativação e afinidades pelos antagonistas (Lacinova, 2005).

Como outros VDCC, canais Cav1 tem uma subunidade $\alpha 1$ que determina as propriedades fisiológicas e farmacológicas destes canais. Esta subunidade associa-se às subunidades auxiliares, as quais facilitam a localização do canal na membrana plasmática e influenciam na ativação e inativação em relação à dependência de voltagem (Catterall, 2000).

Além da diversidade da composição das subunidades outros fatores podem influenciar e modular a atividade do canal, como a presença de determinados fosfolipídios e modificações pós-translacionais (Kamp e Hell, 2000; Pitt, 2007). A atividade dos Cav1 também pode ser modificada por hormônios, neurotransmissores e mediadores acoplados à GPCR (Viard *et al.*, 1999), sendo que há relatos de que ambas as subunidades provenientes da ativação do GPCR ($G\alpha$ e $G\beta\gamma$), através de diferentes efetores, podem exercer esta modulação de Cav1 (Callaghan *et al.*, 2006). Já foi demonstrado em células de Sertoli (Jacobus *et al.*, 2010; Loss, E. S. *et al.*, 2011) que diversos hormônios como FSH, IGF-I e testosterona estimulam o influxo de cálcio mediado por VDCC do tipo L.

O FSH gera um efeito eletrofisiológico caracterizado por uma hiperpolarização inicial seguida de uma despolarização acentuada dependente do influxo de cálcio, semelhante àquela produzida pelo IGF-I. Jacobus *et al.* 2010, demonstraram através do bloqueio dos receptores de IGF-I, que apesar do FSH estimular a produção e secreção deste fator de crescimento pelas células de Sertoli de ratos imaturos, a ação despolarizante do FSH ocorre de forma independente do IGF-I. Portanto, ambos os hormônios são capazes de regular a abertura e fechamento dos VDCC do tipo L.

1.7 TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS

O transporte de aminoácidos através das membranas plasmáticas de células de mamíferos é um processo de fundamental importância fisiológica (McGivan e Pastor-Anglada, 1994). Para que o transporte de aminoácidos pela membrana seja realizado é necessária a presença de proteínas transportadoras. Os transportadores de aminoácidos são um grupo de proteínas de superfície celular que transportam diversos tipos de aminoácidos através da membrana, favorecendo o fornecimento de substratos para a biossíntese de proteínas e metabolismo de precursores de neurotransmissores e hormônios.

Dentre os diversos sistemas de proteínas transportadoras de aminoácidos, há características comuns a todos os sistemas como a alta estereoseletividade, onde aminoácidos levógiros (L-aminoácidos) são mais rapidamente transportados do que aminoácidos que desviam a luz polarizada para a direita. Os sistemas de transporte de aminoácidos tem baixa especificidade quando comparado com a maioria das enzimas, ou seja, em uma mesma célula há diferentes tipos de transportadores e cada um pode transportar vários aminoácidos, porém com características químicas e estruturais comuns entre eles. A configuração da estrutura química, bem como a característica iônica do aminoácido, são fatores que determinam o tipo de transportador desta molécula, através da membrana (McGivan e Pastor-Anglada, 1994; Jacobus *et al.*, 2010).

Os transportadores dividem-se em duas categorias gerais: transporte do tipo uniporte de aminoácidos e o transporte do tipo simporte acoplado ao Na^+ . Neste simporte, o gradiente de Na^+ determina o transporte de aminoácidos através da membrana. Há quatro principais sistemas de transporte de aminoácidos neutros (zwitteriônicos – com carga residual igual a zero) em células mamíferas:

- Sistema ASC: transporta alanina, serina e cisteína, mas pode reconhecer outros aminoácidos alifáticos, é dependente de cotransporte com Na^+ (Kilberg *et al.*, 1993).
- Sistema L: reconhece e transporta aminoácidos de cadeias ramificadas e aminoácidos aromáticos, sendo independente de Na^+ . Além disto, ambos os sistemas citados podem atuar como trocadores de aminoácidos (McGivan e Pastor-Anglada, 1994).
- Sistema N: este medeia a captação de glutamina, histidina e aspargina e também é um trocador de próton, íon que atua no cotransporte com Na^+ (Kilberg *et al.*, 1993).

- O sistema A, o qual transporta aminoácidos neutros de forma dependente de Na^+ , particularmente alanina, serina e glutamina é muito similar ao sistema N (Reimer *et al.*, 2000).

Os sistemas A e N têm algumas características particulares, são inibidos em pH baixo, reconhecem aminoácidos N-metilados, como o aminoácido metil aminoisobutírico (MeAIB), um análogo não metabolizável da alanina amplamente utilizado para o estudo destes sistemas (Reimer *et al.*, 2000; Baird *et al.*, 2006). Estes dois sistemas têm suas atividades exercidas por estruturas pertencentes à família de proteínas transportadoras relacionadas ao gene SLC38. Foram descritas três diferentes isoformas para os transportadores do sistema A (SNAT1, 2 e 4), e duas isoformas do sistema N (SNAT 3,5) (Baird *et al.*, 2006). O sistema A apresenta uma estequiometria de 1:1 em relação ao cotransporte com Na^+ , sendo a isoforma SNAT2 a mais prevalente e responsável por mediar respostas aos estímulos endócrinos e nutricionais (Hyde *et al.*, 2007).

Vários hormônios são hábeis na regulação do sistema A de transporte, como o FSH nas células de Sertoli. Este hormônio modifica a velocidade da captação dos aminoácidos neutros por esse transportador e gera alterações em sua expressão gênica (Wassermann *et al.*, 1992b). O transporte de aminoácidos neutros pelo Sistema A é estimulado por FSH em células de Sertoli de ratos de 10, 12 e 15 dias de idade. A ausência de Na^+ no meio de incubação inibe a estimulação do FSH sobre esse transporte, embora a síntese de proteínas e a ação FSH sobre esse mecanismo esteja inalterado, o que demonstra que esse é um mecanismo dependente de Na^+ (Da Cruz Curte e Wassermann, 1985). Da mesma forma que o estímulo proveniente do FSH, já foi demonstrado que outros hormônios como IGF-I (Fang *et al.*, 2006) e a Insulina (Hyde *et al.*, 2002) também estimulam o transporte de aminoácidos pelo sistema A em diferentes tipos celulares.

1.8 TRANSPORTE DE GLICOSE E PRODUÇÃO DE LACTATO

A capacidade de transportar glicose através da membrana plasmática é uma característica comum a quase todas as células, desde a bactéria mais simples até o neurônio altamente especializado de mamíferos (Mueckler, 1994). O transporte de glicose através da membrana celular das células de Sertoli é um evento importante para a produção de lactato. O lactato é o substrato energético preferencial para espermatozoides e espermátides e sua produção se configura como uma das mais importantes funções das células de Sertoli. Essa produção parece ocorrer mesmo em condições adversas e o transporte de glicose é uma das várias etapas necessárias para que haja uma produção adequada de lactato. O transporte

passivo de glicose é mediado pelos transportadores de glicose (GLUTs), que podem ser modulados por hormônios. Até então já foram identificados 14 genes que codificam diferentes isoformas de GLUTs, sendo os transportadores denominados de GLUT1 a GLUT14. Essas isoformas apresentam sequências similares, mas diferem em sua regulação e em sua distribuição pelos tecidos (Riera *et al.*, 2009).

O GLUT1 parece ter a mais ampla distribuição das isoformas. A expressão dessa isoforma, em geral, é induzida por estímulos de crescimento. Uma consequência do aumento da necessidade de energia e biossíntese requeridas para o processo de divisão celular. Foi demonstrada que sua expressão é alterada por diversos estímulos diferentes, entre eles provenientes da ação do IGF-I e da insulina. O GLUT3 é bastante expresso em células parenquimais de cérebros adultos (Mueckler, 1994) e também células testiculares (Kokk *et al.*, 2007). Este transportador também aparenta ser regulado por hormônios. O GLUT4, apesar de ser o mais sensível à ação da insulina, está presente apenas em músculos e tecido adiposo que, por esse motivo, são chamados de tecidos sensíveis à insulina (Mueckler, 1994).

Em células de Sertoli, foi descrita a expressão de três isoformas de transportadores de glicose, GLUT1, GLUT3 e GLUT8 (Carosa *et al.*, 2005; Kokk *et al.*, 2007; Galardo *et al.*, 2008; Riera *et al.*, 2009). Sendo que o GLUT8 não foi localizado na membrana plasmática dessas células, o que exclui a possibilidade desses transportadores participarem do transporte de glicose do meio extracelular para o intracelular. Por outro lado, GLUT1 e GLUT3 já foram descritos na membrana plasmática de células de Sertoli e, possivelmente, esses transportadores estão envolvidos com a incorporação de glicose por essas células (Riera *et al.*, 2009).

Vários autores (Oonk *et al.*, 1989; Machado *et al.*, 1991) já descreveram o efeito estimulante de diversos hormônios no transporte de glicose em vários tipos celulares. Oonk *et al.* (1989) mostraram que o IGF-I e insulina estimulam o transporte de glicose e a produção de lactato em cultura de células de Sertoli. Também demonstraram que o FSH estimula a produção de lactato, mas não tem nenhuma ação sobre o transporte de hexose. Os autores postularam que esse efeito do FSH deve envolver a estimulação da atividade de enzimas glicolíticas sem alterar a atividade de GLUTs.

Mullaney *et al.* (1994) demonstraram que à medida que a célula de Sertoli amadurece o acúmulo de lactato pela célula aumenta, chegando a quase 5 vezes em células de Sertoli entre 10 e 20 dias de idade, e apenas um pequeno aumento é observado entre 20 e 35 dias de idade. Em todas as idades testadas o FSH e uma combinação de FSH, Insulina, retinol e testosterona (FIRT) aumentaram a produção de lactato. Sendo que, novamente, a produção máxima encontrada foi nas células de 10 a 20 dias de idade.

Os autores discutem que o aumento da produção de lactato durante o desenvolvimento da puberdade corresponde a sua importância na manutenção do desenvolvimento de células germinativas. E, ainda, que a redução ou perda da responsividade da célula de Sertoli a hormônios ao final do período púbere se deve ao fato da célula ter atingido um estado ideal de diferenciação e um aumento basal de funções específicas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a ação da Insulina e do IGF-I sobre marcadores da ação hormonal em testículos de ratos imaturos e seus efeitos sobre o potencial de membrana da célula de Sertoli de ratos de diferentes idades (12 a 15 e 30 dias de idade).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar e comparar as respostas eletrofisiológicas da Insulina e do IGF-I sobre células de Sertoli em túbulos seminíferos de ratos com 12 a 15 e 30 dias de idade.

- Verificar a captação [^{14}C]MeAIB através do estímulo de insulina e IGF-I em testículos de ratos de 12 a 15 dias de idade.

- Verificar o transporte de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ através do estímulo de insulina e IGF-I em testículos de ratos de 12 a 15 dias de idade.

- Verificar o transporte de Deoxi-D-Glicose, 2- $^{14}\text{C}(\text{U})$ através do estímulo de insulina e do IGF-I em testículos de ratos de 12 a 15 dias de idade.

- Observar a influência do bloqueador do receptor de IGF-I, JB1, sobre as ações do IGF-I e da insulina.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Animais Experimentais

Foram utilizados ratos Wistar machos com idades de 12 a 15 ou 30 dias, provenientes do Biotério (CREAL/UFRGS). Os ratos ficavam com as mães até o momento do experimento. No biotério, 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 12 horas (as luzes permaneceram acesas das 7hs às 19hs) e temperatura em torno dos 22°C. O ambiente do laboratório também foi aclimatado em temperatura em torno de 22°C. Os ratos foram mortos por deslocamento cervical imediatamente antes do início do experimento. Os testículos foram imediatamente removidos do animal por incisão abdominal, limpos e descapsulados.

3.1.2 Soluções

3.1.2.1 Solução Tampão Krebs Ringer Bicarbonato

Foi utilizada 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 1.

Tabela 1: Composição salina e concentrações presentes nas soluções estoque e final de KRb.

	Concentração das Soluções Estoque		Concentração Final da Solução KRb
	g/l	M	mM
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	9,6	0,065	2,5
Glicose C ₆ H ₁₂ O ₆	25	0,14	5,5

Para o preparo do KRb, foram adicionados volumes iguais de cada solução estoque, acrescentando-se por último o sulfato de magnésio e o cloreto de cálcio, nesta ordem. A solução era então completada até seu volume final com água destilada, para obterem-se as concentrações finais descritas na Tabela 1. A solução era 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.

3.1.2.2 Solução de Lantânio

Foi utilizada solução lantânio como forma de interromper o fluxo de cálcio nos experimentos de transporte de ⁴⁵Ca²⁺, preparado imediatamente antes da realização dos experimentos. Todos os reagentes eram de pureza “pró-análise” (P.A) da E. Merck (Darmstadt, Alemanha), exceto o HEPES proveniente da Sigma-Aldrich (USA). O preparo da solução foi feito momentos antes do experimento e mantido a 0°C até ser utilizado.

Tabela 2: Composição salina presente na solução lantânio

Sais	Peso
NaCl Cloreto de Sódio	1,862 g
KCl Cloreto de Potássio	0,085 g
MgCl₂ Cloreto de Magnésio	0,061 g
Glicose C ₆ H ₁₂ O ₆	0,495 g
LaCl₃ Cloreto de Lantânio	0,928 g
HEPES	0,595 g

3.1.3 Substâncias Utilizadas

a) **Isótopo radioativo de Cálcio ($^{45}\text{Ca}^{2+}$):** atividade específica 1 mCi/mg, adquirido da Du Pont – NEN Research Products. Em cada amostra foi adicionado 0,2 $\mu\text{Ci/ml}$. A meia vida é de 163 dias, e o decaimento era calculado a partir de uma tabela fornecida pela Du Pont-NEN Research Products, em função da data de fabricação.

b) **Ácido α -metilaminoisobutírico [$1\text{-}^{14}\text{C}$] ($[^{14}\text{C}]\text{MeAIB}$):** análogo não metabolizável da alanina. Atividade específica 50 mCi/mmol, adquirido da Du Pont-NEN Research Products. Em cada amostra foi adicionado 0,2 $\mu\text{Ci/ml}$.

c) **Deoxy-D-glucose, 2- $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ ($[^{14}\text{C}]\text{2-DG}$):** análogo não metabolizável da glicose. Atividade específica 50 mCi/mmol adquirido da PerkinElmer NEN Radiochemicals. Em cada amostra foi adicionado 0,15 $\mu\text{Ci/ml}$.

d) **Líquido de Cintilação:** Optiphase Hisafe 3 (PerkinElmer Inc., USA). Foi utilizado para a contagem da radioatividade das amostras.

e) **Fator de Crescimento Semelhante à Insulina Tipo I (IGF-I):** (Sigma-Aldrich, Inc-USA). IGF-I recombinante, expresso em *Escherichia coli*. IGF-I foi diluído em água ultrapura e estéril produzindo uma solução mãe de 100 $\mu\text{g/ml}$, sendo aliqüotados 20 μL por tubo e congelado em freezer -20°C , até seu uso.

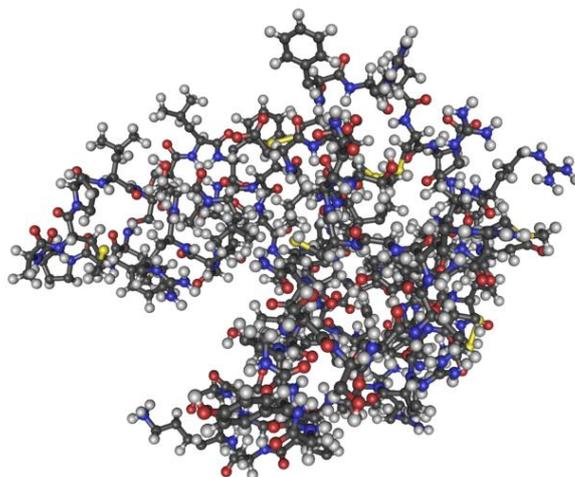


Figura 3.1: Estrutura cristalográfica de IGF-I humano (fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure>).

f) **Insulina:** Foi utilizada insulina comercial injetável regular, ampola com 10 UI/ml de insulina, em solução tamponada. Utilizou-se uma concentração final de 100 μM nos experimentos.

g) **JB1 (Bachem) Análogo inativo de IGF-I:** PM1249.52. Foi utilizada a dose de 1 µg/ml para os experimentos. JB1 foi pesado em balança analítica e diluído em KRb no momento do experimento (Figura 1.4).

h) **Verapamil:** PM:491,08,(Valeronitrila,5-((3,4-Dimetoxifenetil)(Metilamino)-2-(3,4-Dimetoxi-fenil)-2-Isopropil). Foi utilizado verapamil comercial injetável, ampola com 2,5 mg/ml de cloridrato de verapamil, em solução tamponada. Utilizou-se uma concentração final de 100 µM nos experimentos.

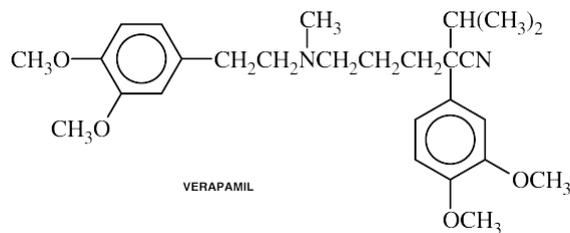


Figura 3.2: Molécula de verapamil

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Técnica Eletrofisiológica de Registro Intracelular

3.2.1.1 Preparação dos Túbulos Seminíferos

Após serem descapsulados os testículos foram cuidadosamente estirados em uma câmara de perfusão com o auxílio de duas pinças de ponta fina, os túbulos seminíferos expostos (5 a 10) foram presos no fundo da câmara com o auxílio de uma grade produzida com fio ortodôntico. A câmara foi preenchida com 1 ml de KRb e levado para perfusão. Os túbulos foram perfundidos com o fluxo de 1 ml/min de KRb glicosado (5 mmol/l), a 36°C, pH 7,4, equilibrado com O₂:CO₂ (95:5; v/v).

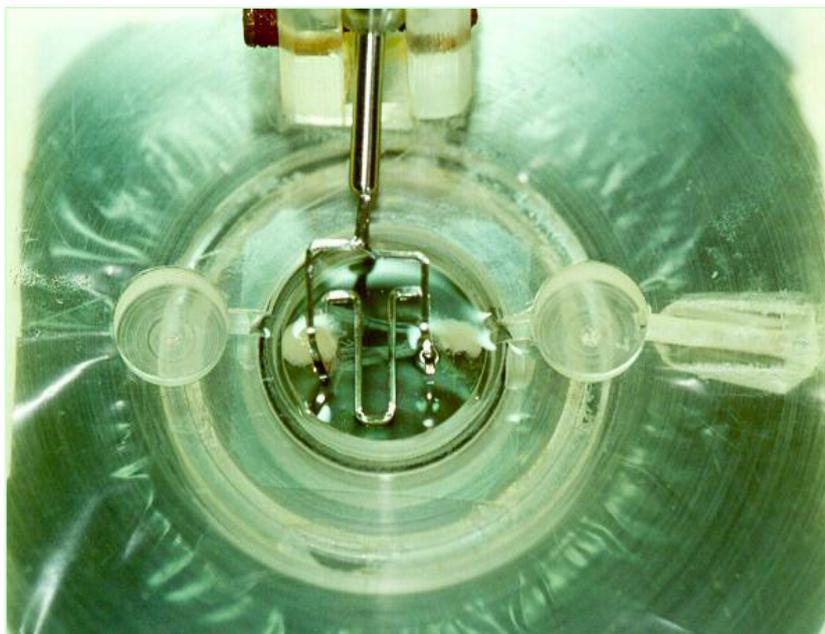


Figura 3.3: Câmara de perfusão com túbulos seminíferos fixados ao fundo

3.2.1.2 Registro intracelular

O potencial de membrana das células de Sertoli foi registrado com microeletrodos preenchidos com KCl 3 M com uma resistência de 15 a 25 MΩ. O microeletrodo foi conectado a um amplificador intracelular (Intra 767, WPI Inc UK) e o sinal era monitorado por um osciloscópio (Tektronix, 2 Channel Digital Oscilloscope TDS 210). Os traçados observados no osciloscópio eram adquiridos e armazenados em computador de um programa de interface

(Wavestar Lite Version 1.0.10). Pulsos quadrados de corrente (0,5 nA, 0,5 Hz e 200 ms) foram aplicados através do eletrodo de registro por um estimulador de pulso de corrente (S48K Astromed, Grass instruments) para avaliar a resistência da membrana. As substâncias testadas (IGF-I e insulina) foram aplicadas topicamente ao banho após a estabilização do potencial de repouso da célula por pelo menos 2 minutos. Antagonistas ou bloqueadores (JB1 e verapamil) foram aplicados 5 minutos antes do hormônio por perfusão na câmara. Os registros da variação do potencial de membrana e da resistência da membrana foram registrados com os diferentes tratamentos. Cada tratamento foi repetido por no mínimo de 5 vezes com diferentes células de diferentes animais.

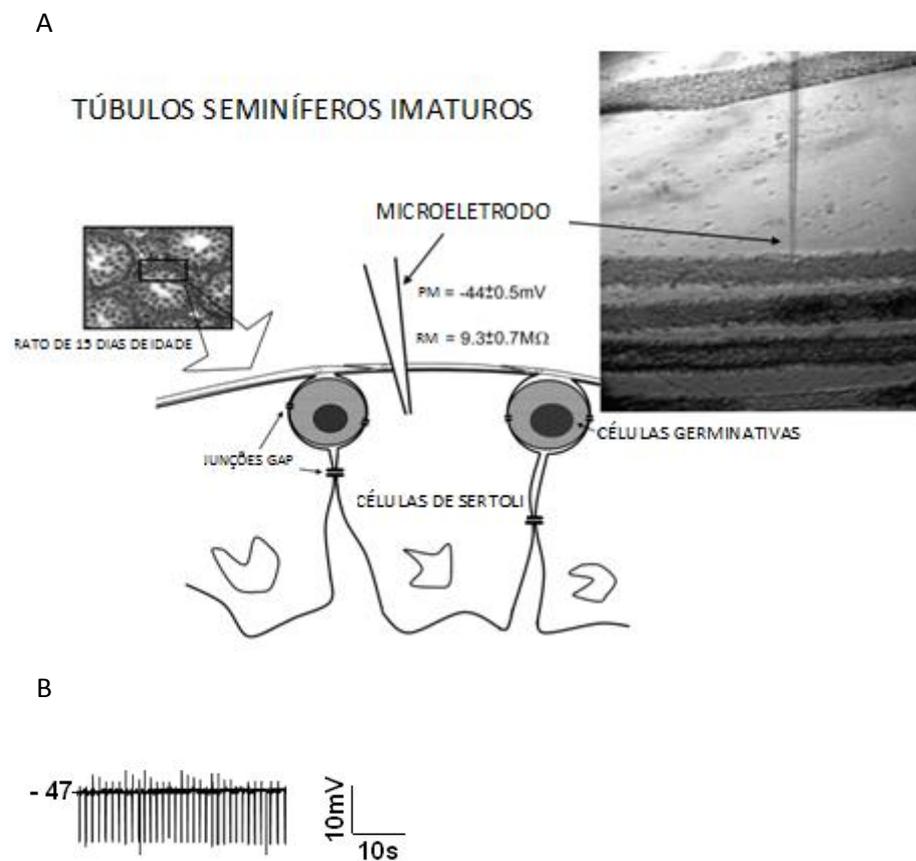


Figura 3.4: **A.** Representação esquemática da técnica eletrofisiológica em túbulos seminíferos com a média dos valores basais de potencial de membrana (PM) e resistência da membrana (RM). **B.** representação de um registro de controle de uma célula com potencial de membrana de -47 mV. Os traços verticais correspondem à resistência da membrana pela aplicação de pulsos de 0,5nA.

3.2.2 Captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$

Os testículos foram removidos, limpos, pesados e descapsulados. As gônadas foram colocadas em tubos controle e experimental, alternadamente esquerda e direita, contendo 1 ml de KRb (Krebs Ringer bicarbonato). A seguir, as gônadas foram incubadas em um incubador metabólico Dubnoff, em temperatura de 34°C em ambiente gaseificado com carbogênio ($\text{O}_2:\text{CO}_2$, 95:5, v/v), para a manutenção do pH. O período de pré-incubação era de 60 minutos em 800 μl de KRb com $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (4,44 KBq/20 ng ou 0,2 μCi) para alcançar o equilíbrio intra e extracelular de $^{45}\text{Ca}^{2+}$.

O período de incubação foi de 2 minutos a partir da aplicação de KRb com $^{45}\text{Ca}^{2+}$ com ou sem IGF-I ou Insulina. Quando aplicados bloqueadores (JB1 e verapamil) estes eram adicionados a partir do início do período de pré-incubação. Para finalizar a incubação foi adicionado a cada tubo, 1 ml de uma solução salina contendo cloreto de lantânio (LaCl_3) (10 mM) à 0°C, interrompendo o fluxo de cálcio na preparação (Batra e Sjogren, 1983). O sobrenadante foi preservado, e os testículos foram removidos para tubos com 1 ml de água destilada e congelados.

3.2.3 Transporte de $[^{14}\text{C}]\text{MeAIB}$

Os animais foram mortos e os testículos imediatamente removidos por incisão abdominal, limpos, pesados e descapsulados. As gônadas foram colocadas em tubos controle e experimental, alternadamente esquerda e direita, contendo 1 ml de KRb. A seguir, foram pré-incubadas, por 30 minutos, em um incubador metabólico Dubnoff, em temperatura de 34°C em ambiente gaseificado com carbogênio ($\text{O}_2:\text{CO}_2$, 95:5, v/v), para a manutenção do pH.

O período de incubação foi de 45 minutos na presença de 0,2 μCi de $[^{14}\text{C}]\text{MeAIB}$, com ou sem IGF-I ou insulina. Quando utilizado JB1 e verapamil, estes foram aplicados 10 minutos antes e durante a incubação.

No fim dos experimentos de transporte de aminoácidos, os testículos foram removidos de seu meio de incubação, o qual foi reservado, e o tecido foi congelado e armazenado em tubos com 1 ml de água destilada.

3.2.4 Transporte de $[^{14}\text{C}]\text{2-DG}$

Os testículos foram colocados em tubos controle e experimental, alternadamente esquerda e direita, contendo 1 ml de KRb (Krebs Ringer bicarbonato). Em seguida, foram pré-

incubados por 30 minutos em um incubador metabólico Dubnoff em temperatura de 34°C em ambiente gaseificado com carbogênio (O₂:CO₂, 95:5, v/v), para a manutenção do pH.

O período de incubação foi de 120 minutos na presença de 0,15 µCi de Deoxy-D-glucose, 2-[1-¹⁴C], com ou sem IGF-I ou insulina. Quando utilizado JB1 e verapamil, foi realizada a aplicação 10 minutos antes da incubação e durante ela.

No fim dos experimentos de transporte de glicose, os testículos foram removidos de seu meio de incubação, o qual foi reservado, e o tecido foi congelado e armazenado em tubos com 1 ml de água destilada.

3.2.5 Processamento das Amostras

Ao final da incubação, os testículos foram retirados do tampão, secos em papel filtro umedecido com KRb para remover o excesso de aminoácido, glicose ou cálcio radioativo aderido à superfície externa da amostra e acondicionados em tubos de vidro com tampa rosca, contendo 1 ml de água destilada. Esses tubos foram congelados a -20°C, durante 24 horas e posteriormente fervidos por 10 minutos, para romper a membrana extracelular e obter o equilíbrio entre o líquido intracelular e a água adicionada. Desse meio foram retiradas alíquotas de 100 µl e colocados em 3 ml de líquido de cintilação. Essas amostras representam o meio intracelular.

Do meio de incubação que permaneceu nos tubos de incubação, foram retiradas também alíquotas de 100 µl e colocadas em 3 ml de líquido de cintilação. Essas amostras representam o meio extracelular.

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

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

3.2.6 Análise Estatística

Nos experimentos de registro intracelular os tratamentos eram repetidos pelo menos 5 vezes. O número de amostras por grupo era de no mínimo 5 nos experimentos de transporte de aminoácidos, glicose e de captação de ⁴⁵Ca²⁺, cálculo amostral realizado com software Winpepi versão 9, utilizando um poder amostral de 80% e um intervalo de confiança de 95%.

Para a análise estatística foram utilizados o Teste-t de Student para comparação entre dois grupos ou ANOVA de uma ou duas vias, conforme o experimento, seguido do pós-teste de Bonferroni. Foi utilizado o programa InStat, versão 3.01, 32 bit para Windows®, da (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA). Os testes específicos utilizados em cada experimento estão citados nos resultados. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

3.2.7 Biossegurança

Durante a execução dos experimentos, os pesquisadores envolvidos utilizaram luvas de procedimento e jalecos como forma de proteção individual. Quando necessário, foram utilizados óculos de proteção e máscaras cirúrgicas para o caso de substâncias que necessitam de preparação na capela de exaustão.

O descarte de resíduos não-tóxicos, como soluções salinas que não foram utilizadas, foi feito em esgoto comum. Os resíduos químicos derivados dos experimentos foram acondicionados em frascos para serem, posteriormente, encaminhados para o Centro de Gestão e Tratamento de resíduos químicos da UFRGS para o correto procedimento de descarte. Os resíduos radioativos foram encaminhados conforme as instruções do Serviço de Proteção Radiológica da UFRGS. As carcaças dos animais e os demais resíduos biológicos foram congelados e entregues ao Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS.

3.2.8 Considerações Éticas

Este trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS (CEUA/UFRGS) sob o número 18097.

Cada um dos procedimentos descritos neste projeto é classificado como leve, conforme o Guia de Severidade de Procedimentos Científicos (CEUA/UFRGS). Essa classificação reflete o grau de dor, sofrimento, incômodo ou prejuízo duradouro a ser experienciado pelo animal durante a execução dos procedimentos. Uma vez que o animal é morto por deslocamento cervical antes de se iniciar qualquer procedimento, entende-se que o grau de sofrimento ao qual o animal é submetido é mínimo.

4 RESULTADOS

4.1 AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DO IGF-I SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA DE CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DE 12 A 15 DIAS DE IDADE

O IGF-I aplicado nas células de Sertoli de ratos Wistar de 12 a 15 dias de idade provocou a despolarização do potencial de membrana de forma significativa aos 180 segundos na dose de 100 ng/ml.

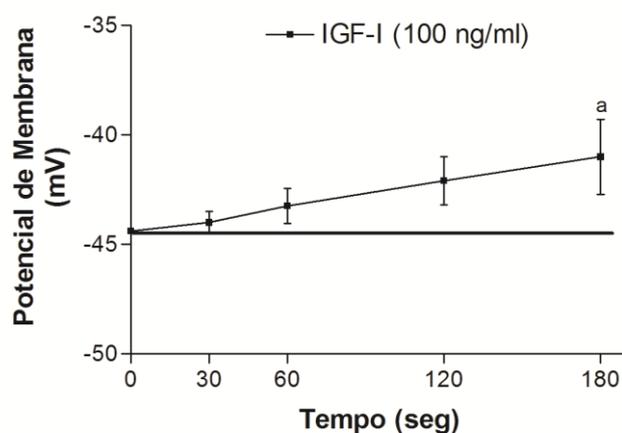


Figura 4.1: Efeito do IGF-I (100 ng/ml) sobre o potencial de membrana das células de Sertoli comparado ao potencial de membrana basal. (ANOVA de duas vias, ^ap<0,05; n = 7).

4.2 EFEITO DO VERAPAMIL SOBRE A AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DO IGF-I EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DE 12 A 15 DIAS DE IDADE

A perfusão de verapamil 5 minutos antes da aplicação do IGF-I inibiu o efeito despolarizante do fator de crescimento no potencial de membrana das células de Sertoli de ratos Wistar de 12 a 15 dias de idade.

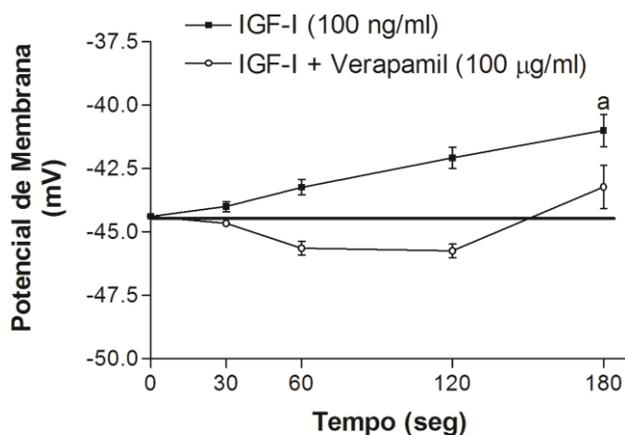


Figura 4.2: Efeito do verapamil sobre a ação do IGF-I (100 ng/ml) no potencial de membrana das células de Sertoli comparado ao potencial de membrana basal. (ANOVA de duas vias, ^ap<0,05; n = 7)

4.3 EFEITO DO JB1 SOBRE A AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DO IGF-I EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DE 12 A 15 DIAS DE IDADE

A ação despolarizante do IGF-I no potencial de membrana das células de Sertoli de ratos Wistar de 12 a 15 dias de idade foi parcialmente bloqueada pelo JB1.

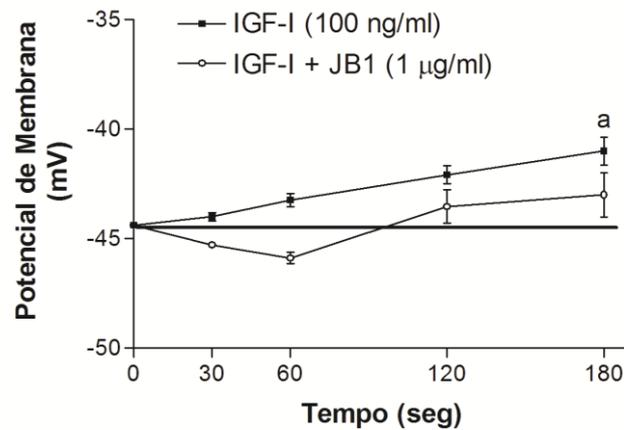


Figura 4.3: Efeito do JB1 sobre a ação do IGF-I (100 ng/ml) no potencial de membrana das células de Sertoli comparado ao potencial de membrana basal. (ANOVA de duas vias, ^ap<0,05; n = 7)

4.4 AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DA INSULINA SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA DE CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DE 12 A 15 DIAS DE IDADE

A insulina provocou uma despolarização do potencial de membrana nas células de Sertoli de ratos Wistar de 12 a 15 dias de idade, sendo significativo aos 60, 120 e 180 segundos na dose de 100 nM. Não foi observada alteração do potencial de membrana nas doses de 50 nM e 200 nM.

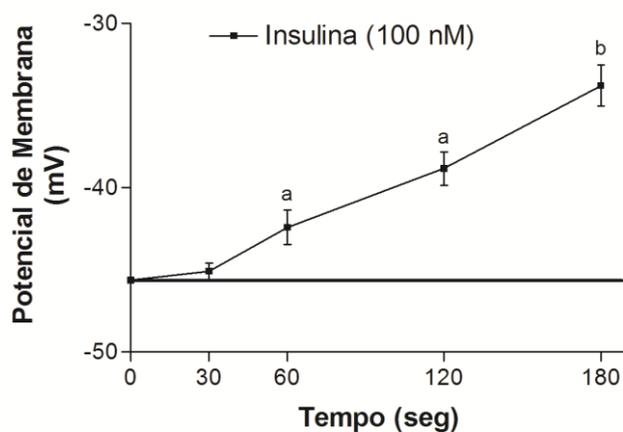


Figura 4.4: Efeito da Insulina (100 nM) sobre o potencial de membrana das células de Sertoli comparado ao potencial de membrana basal. (ANOVA de duas vias, ^ap<0,05; ^bp<0,01; n = 6)

4.5 EFEITO DO VERAPAMIL SOBRE A AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DA INSULINA EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DE 12 A 15 DIAS DE IDADE

O efeito despolarizante da insulina no potencial de membrana das células de Sertoli de ratos Wistar de 12 a 15 dias de idade foi completamente bloqueado pela ação do verapamil.

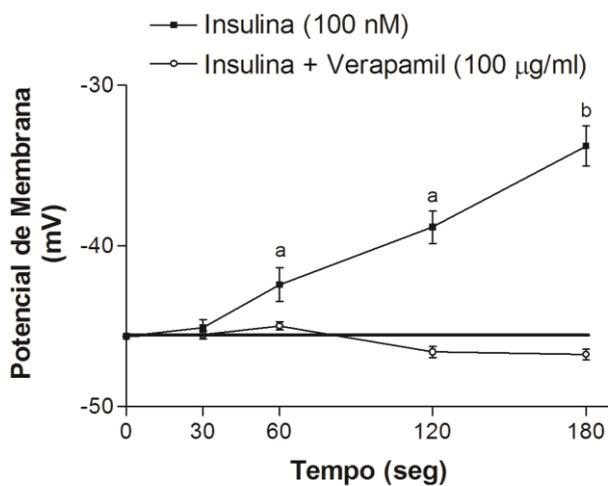


Figura 4.5: Efeito do verapamil sobre a ação da insulina (100 nM) no potencial de membrana das células de Sertoli comparado ao potencial de membrana basal. (ANOVA de duas vias, ^ap<0,05; ^bp<0,01; n = 6)

4.6 EFEITO DO JB1 SOBRE A AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DA INSULINA EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DE 12 A 15 DIAS DE IDADE

A ação despolarizante da insulina no potencial de membrana das células de Sertoli de ratos Wistar de 12 a 15 dias de idade foi parcialmente bloqueada pelo JB1.

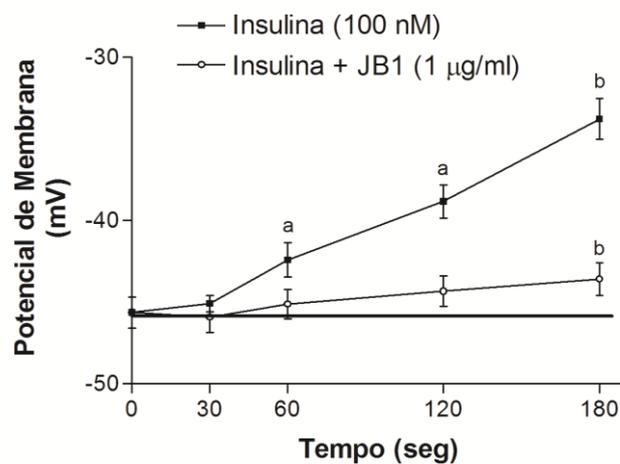


Figura 4.6: Efeito do JB1 sobre a ação da insulina (100 nM) no potencial de membrana das células de Sertoli comparado ao potencial de membrana basal. (ANOVA de duas vias, ^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$; $n = 6$)

Houve diferença significativa entre a ação da insulina com e sem a perfusão com JB1 aos 180 segundos.

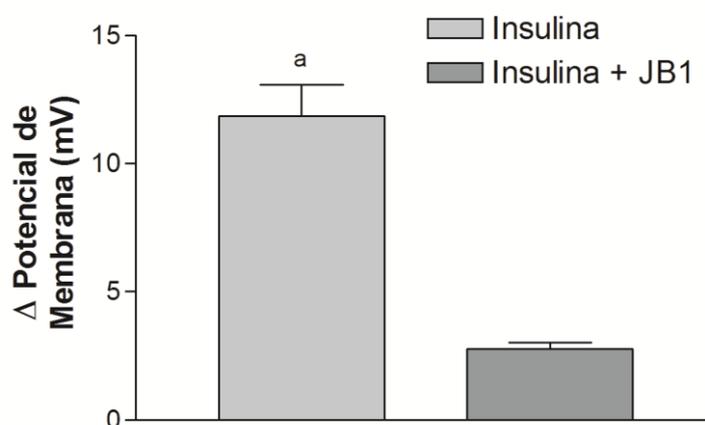


Figura 4.7: Comparação do efeito da insulina aos 180 segundos com e sem a perfusão com JB1. (Teste T de Student, ^a $p < 0,01$; $n = 6$).

4.7 AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DO IGF-I EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DE 30 DIAS DE IDADE

O IGF-I não provocou uma despolarização significativa do potencial de membrana de células de Sertoli de ratos Wistar de 30 dias de idade.

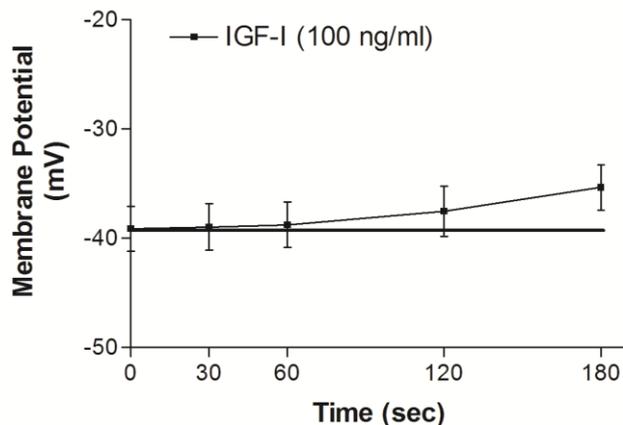


Figura 4.8: Ação do IGF-I (100 ng/ml) no potencial de membrana das células de Sertoli comparado ao potencial de membrana basal. (ANOVA de duas vias, $n = 7$)

4.8 COMPARAÇÃO DA AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DO IGF-I EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DE 12 A 15 E DE 30 DIAS DE IDADE

A despolarização gerada pelo IGF-I sobre o potencial de membrana de ratos de 12 a 15 dias de idade foi mais intensa do que aquela gerada nas células de Sertoli de ratos Wistar de 30 dias de idade.

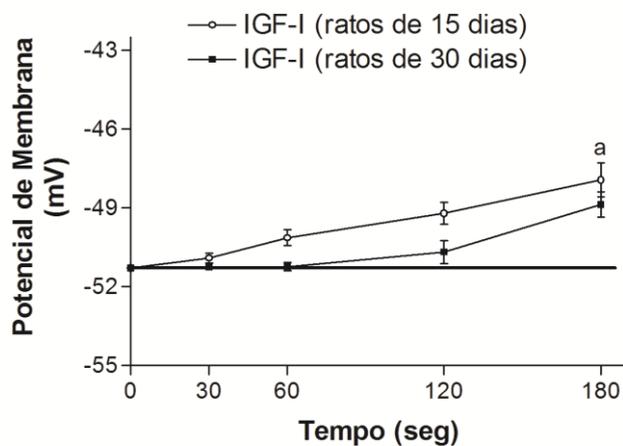


Figura 4.9: Comparação da ação do IGF-I sobre o potencial de membrana de células de Sertoli de ratos de 12 a 15 e de 30 dias de idade (ANOVA de duas vias, ^a $p < 0,05$; $n = 7$)

4.9 AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DA INSULINA EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DE 30 DIAS DE IDADE

A insulina provocou uma despolarização do potencial de membrana nas células de Sertoli de ratos Wistar de 30 dias de idade, sendo significativo aos 180 segundos na dose de 100 nM.

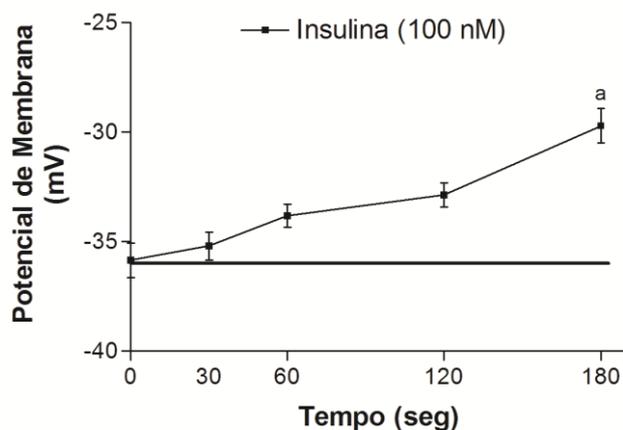


Figura 4.10: Ação da insulina (100 nM) sobre potencial de membrana das células de Sertoli comparado ao potencial de membrana basal. (ANOVA de duas vias, ^a $p < 0,05$; $n = 6$)

4.10 COMPARAÇÃO DA AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DA INSULINA EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DE 12 A 15 E DE 30 DIAS DE IDADE

O efeito despolarizante apresentado pela insulina sobre a membrana de células de Sertoli de ratos Wistar de 12 a 15 dias foi muito mais intenso do que aquela gerada em células de Sertoli de ratos de 30 dias.

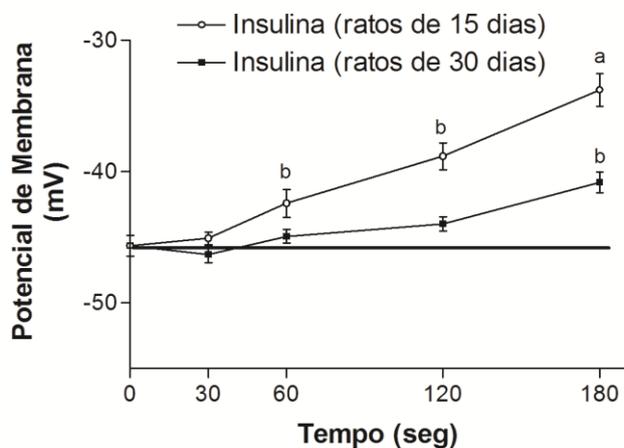


Figura 4.11: Comparação entre as ações do IGF-I sobre o potencial de membrana de células de Sertoli de ratos de 12 a 15 e de 30 dias de idade (ANOVA de duas vias, ^a $p < 0,01$; ^b $p < 0,05$)

4.11 EFEITO DO JB1 SOBRE A AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DA INSULINA EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DE 30 DIAS DE IDADE

O efeito despolarizante da insulina nas células de Sertoli de ratos Wistar de 30 dias de idade também foi bloqueado pela ação do JB1.

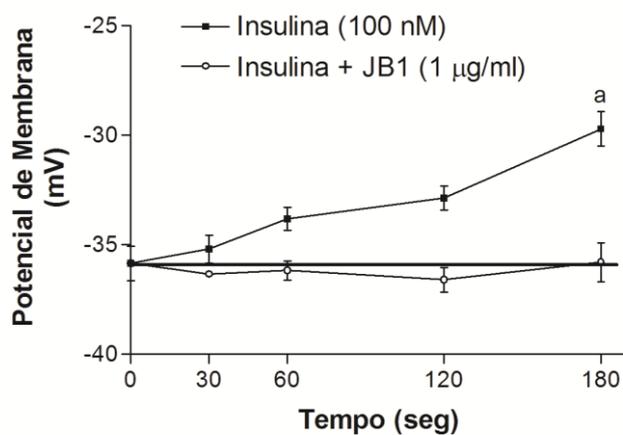


Figura 4.12: Efeito do JB1 sobre a ação da insulina (100 nM) no potencial de membrana das células de Sertoli comparado ao potencial de membrana basal. (ANOVA de duas vias, ^ap<0,05; n = 6)

4.12 AÇÃO DO IGF-I SOBRE A CAPTAÇÃO DE ⁴⁵Ca²⁺ EM TESTÍCULOS INTEIROS

O IGF-I (100 ng/ml) estimulou a captação de ⁴⁵Ca²⁺ em testículos inteiros de ratos imaturos (12 a 15 dias de idade), resultando em valores estatisticamente significativos em relação ao controle. Essa estimulação foi parcialmente bloqueada pela ação do JB1.

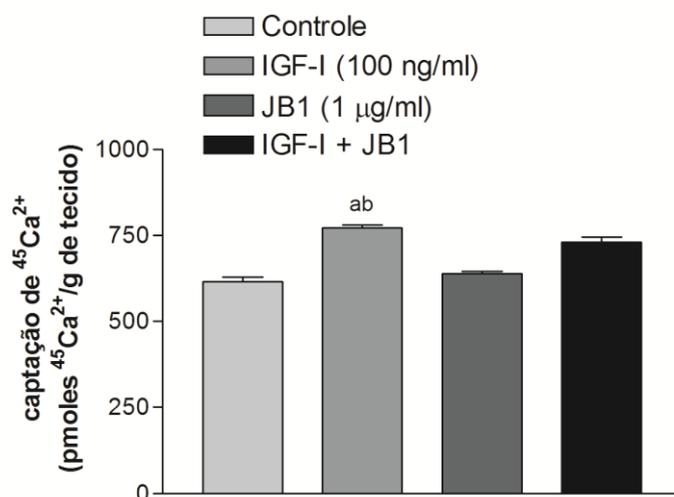


Figura 4.13: Ação do IGF-I (100 ng/ml) sobre a captação de ⁴⁵Ca²⁺ (pmoles de ⁴⁵Ca²⁺/g de tecido) (ANOVA de duas vias ^ap<0,01 comparado ao controle; ^bp<0,01 comparado ao grupo JB1; n = 5)

4.13 AÇÃO DA INSULINA SOBRE A CAPTAÇÃO DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$ EM TESTÍCULOS INTEIROS

A insulina (100 nM) estimulou a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em testículos inteiros de ratos imaturos (12 a 15 dias de idade), resultando em valores estatisticamente significativos em relação ao controle. Essa estimulação foi completamente bloqueada pela ação do JB1.

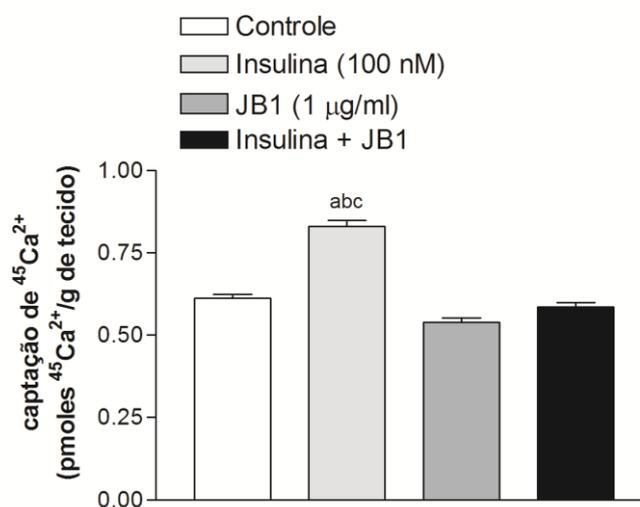


Figura 4.14: Ação da Insulina (100 nM) sobre a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (pmoles de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ /g de tecido) (ANOVA de duas vias ^a $p < 0,05$ comparado ao controle; ^b $p < 0,01$ comparado ao grupo JB1; ^c $p < 0,05$ comparado ao grupo Insulina + JB1; $n=15$)

4.14 AÇÃO DO IGF-I SOBRE O TRANSPORTE DE $[^{14}\text{C}]\text{MeAIB}$ EM TESTÍCULOS INTEIROS

O IGF-I (100 ng/ml) estimulou o transporte de $[^{14}\text{C}]\text{MeAIB}$ em testículos inteiros de ratos imaturos (12 a 15 dias de idade), resultando em valores estatisticamente significativos em relação ao controle. Essa estimulação foi parcialmente bloqueada pela ação do JB1.

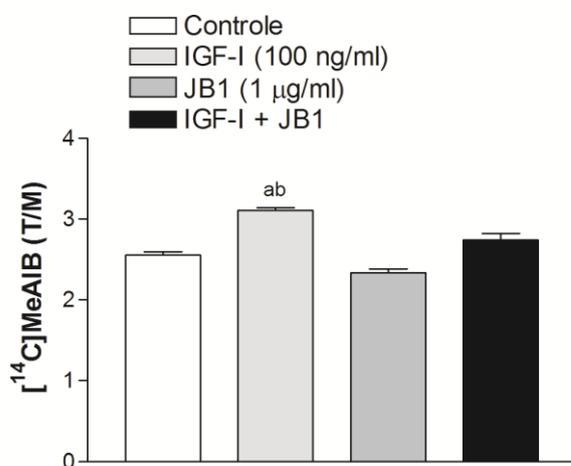


Figura 4.15: Ação do IGF-I (100 ng/ml) sobre o transporte de $[^{14}\text{C}]\text{MeAIB}$ (T/M). (ANOVA de duas vias ^a $p < 0,05$ comparado ao controle; ^b $p < 0,01$ comparado ao grupo JB1; $n=10$)

4.15 AÇÃO DA INSULINA SOBRE O TRANSPORTE DE $[^{14}\text{C}]\text{MeAIB}$ EM TESTÍCULOS INTEIROS

A insulina (100 nM) estimulou o transporte de $[^{14}\text{C}]\text{MeAIB}$ em testículos inteiros de ratos imaturos (12 a 15 dias de idade), resultando em valores estatisticamente significativos em relação ao controle. Essa estimulação não foi bloqueada pela ação do JB1.

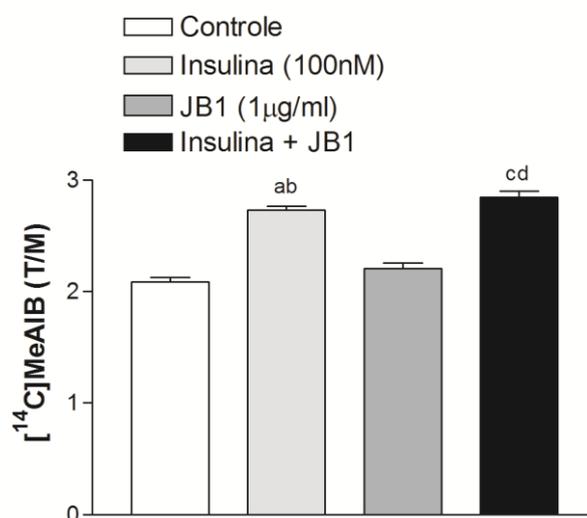


Figura 4.16: Ação do IGF-I (100ng/ml) sobre o transporte de $[^{14}\text{C}]\text{MeAIB}$ (T/M). (ANOVA ^a $p < 0,05$ comparado ao controle; ^b $p < 0,01$ comparado ao grupo JB1; ^c $p < 0,05$ comparado ao controle; ^d $p < 0,01$ comparado ao grupo JB1; $n = 15$)

4.16 AÇÃO DO IGF-I SOBRE O TRANSPORTE DE $[^{14}\text{C}]\text{2-DG}$ EM TESTÍCULOS INTEIROS

O IGF-I (100 ng/ml) estimulou o transporte de $[^{14}\text{C}]\text{2-DG}$ em testículos inteiros de ratos imaturos (12 a 15 dias de idade), resultando em valores estatisticamente significativos em relação ao controle. Essa estimulação não foi bloqueada pela ação do JB1.

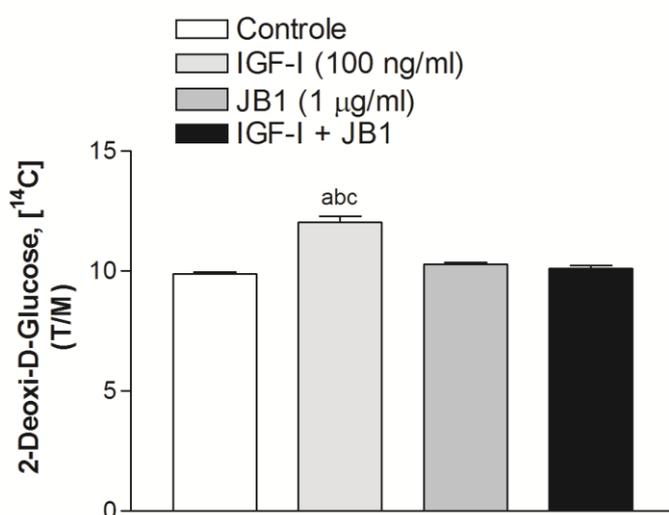


Figura 4.17: Ação do IGF-I (100 ng/ml) sobre transporte de $[^{14}\text{C}]\text{2-DG}$. (ANOVA de duas vias ^a $p < 0,01$ comparado ao controle; ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo JB1; ^c $p < 0,05$ comparado ao grupo IGF-I + JB1; $n = 6$)

4.17 AÇÃO DA INSULINA SOBRE O TRANSPORTE DE $[^{14}\text{C}]2\text{-DG}$ EM TESTÍCULOS INTEIROS

A insulina (100 nM) estimulou o transporte de $[^{14}\text{C}]2\text{-DG}$ em testículos inteiros de ratos imaturos (12 a 15 dias de idade), resultando em valores estatisticamente significativos em relação ao controle. Essa estimulação foi parcialmente bloqueada pela ação do JB1.

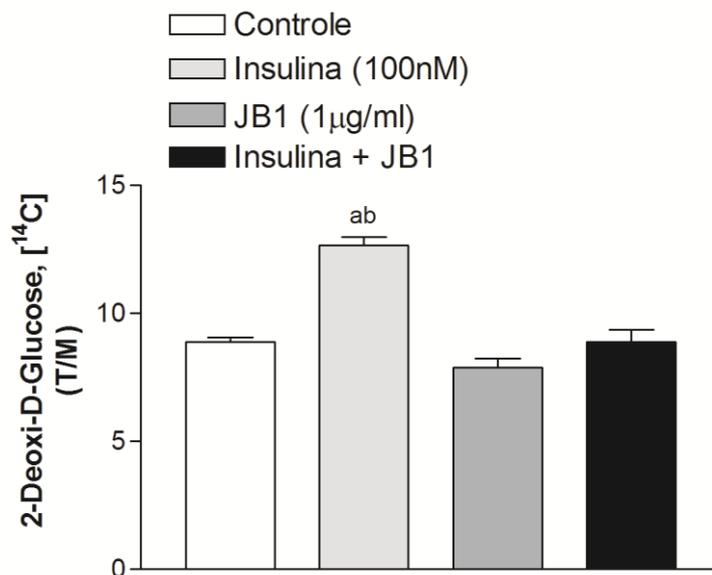


Figura 4.18: Ação da insulina (100 nM) sobre transporte de $[^{14}\text{C}]2\text{-DG}$. (ANOVA de duas vias ^a $p < 0,05$ comparado ao controle; ^b $p < 0,01$ comparado ao grupo JB1; $n = 10$)

5 DISCUSSÃO

Levando em consideração a complexidade estrutural dos testículos, as características eletrofisiológicas das células de Sertoli foram analisadas usando túbulos seminíferos inteiros desprovidos de células de Leydig. Dessa forma, preservou-se a integridade funcional das células tubulares bem como das junções comunicantes e de fatores parácrinos, mantendo-se o ambiente tubular tão próximo quanto possível das suas condições fisiológicas (Loss, E. S. *et al.*, 2011).

Em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa (Wassermann *et al.*, 1992a) foi descrito que a média do potencial de repouso de células de Sertoli em túbulos seminíferos de ratos de 12 a 15 dias é de $-44 \text{ mV} \pm 0,5$ ($n = 48$), com uma variação de -35 mV a -60 mV . Levando em conta esses resultados e a fim de eliminar possibilidades de erros devido à população heterogênea dos túbulos seminíferos, apenas as células com um potencial de repouso mais negativo do que -35 mV foram incluídos nos experimentos eletrofisiológicos. A resistência da ponta utilizada ($15\text{-}25 \text{ M}\Omega$) é apropriada para o empalamento preferencial de células de tamanho similar às células de Sertoli. Esse diâmetro dificilmente permite o empalamento de células menores, como células mioides peritubulares (Von Ledeber *et al.*, 2002).

Conforme descrito por Sharpe *et al.* (2003), a maturação das células de Sertoli envolve a perda de sua capacidade proliferativa, a formação de junções ocludentes entre as células de Sertoli adjacentes e a expressão de funções que não estão presentes em células de Sertoli imaturas. Em ratos, a proliferação das células de Sertoli cessa em torno dos 15 dias de idade e a mudança da célula de Sertoli de imatura para adulta ocorre durante a puberdade. Assim, no presente trabalho foram utilizadas células de ratos com 12 a 15 dias de idade como células imaturas e de ratos de 30 dias de idade como células maduras.

Foi demonstrado em estudos recentes que o FSH produz um efeito eletrofisiológico em células de Sertoli de ratos imaturos caracterizado por uma hiperpolarização inicial seguida de acentuada despolarização (Jacobus *et al.*, 2010; Loss, E. S. *et al.*, 2011). O IGF-I, por sua vez, produz rápida despolarização do potencial de membrana de células de Sertoli de ratos imaturos. Uma vez que o FSH estimula a produção e secreção de IGF-I pelas células de Sertoli de ratos imaturos (Khan *et al.*, 2002), Jacobus *et al.* (2010) avaliaram a possibilidade da despolarização tardia gerada pela ação do FSH ser devida a secreção e atuação autócrina do IGF-I.

Para tanto, os autores testaram os efeitos de um anticorpo anti-IGF-I e de um análogo inativo do IGF-I, JB1, sobre os efeitos eletrofisiológicos gerados pelo FSH e pelo IGF-I

em células de Sertoli de ratos imaturos. Tanto o anticorpo quanto o análogo inativo do IGF-I aboliram a despolarização causada pela ação desse hormônio. No entanto, não interferiram na modificação típica do potencial de membrana produzido pelo FSH, demonstrando que tanto os efeitos de hiperpolarização quanto os de despolarização do FSH ocorrem independentemente da ação do IGF-I (Loss, Eloísa Silveira *et al.*, 2007; Jacobus *et al.*, 2010).

Assim, neste trabalho procurou-se avaliar os efeitos do IGF-I sobre seu receptor tirosina-cinase. Assim como da insulina que além de suas semelhanças estruturais com IGF-I é um hormônio estreitamente relacionado com o metabolismo da glicose e que, provavelmente, atua sobre a célula de Sertoli regulando o transporte de glicose e a produção de lactato (Oonk *et al.*, 1989; Andersen *et al.*, 1992; Belfiore *et al.*, 2009).

Dessa forma, os resultados obtidos nesse estudo demonstram que tanto o IGF-I (Figura 4.1) quanto a insulina (Figura 4.4) produzem um efeito despolarizante sobre o potencial de membrana de células de Sertoli de ratos de 12 a 15 dias. No entanto, apenas a insulina desencadeou uma despolarização significativa em ratos de 30 dias de idade (Figuras 4.8 e 4.10).

O JB1 é um antagonista do IGF-I, o qual é altamente seletivo para o IGF-IR em relação ao receptor do fator de crescimento semelhante a insulina tipo II (IGF-IIR) (Elmlinger *et al.*, 1998). Este bloqueador do receptor de IGF-I foi escolhido para investigar se os hormônios estudados desencadeavam suas ações pelo IGF-IR por conta de sua seletividade e por se ligar ao receptor de forma a impedir a ligação do hormônio ao seu sítio de ligação, porém mantendo o estado de fosforilação da célula.

O efeito despolarizante produzido pela aplicação do IGF-I sobre células de Sertoli de ratos de 12 a 15 dias foi parcialmente bloqueado pela perfusão com JB1 (Figura 4.3). Este resultado demonstra que o IGF-I pode atuar nessas células não apenas através do seu receptor cognato, mas possivelmente através de outros receptores tirosina-cinase, tais como o IR e IGF-IIR (Andersen *et al.*, 1992).

Por outro lado, a ação despolarizante da insulina foi completamente bloqueada em ratos de 12 a 15 dias de idade pela perfusão com JB1 (Figuras 4.6 e 4.7). Este resultado mostra que nesta fase do desenvolvimento a insulina provoca muitas das suas ações sobre as células de Sertoli, provavelmente, através do receptor de IGF-I, especialmente aquelas que dependem do influxo de cálcio.

A despolarização da membrana produzida por IGF-I e insulina foi bloqueada pelo verapamil mostrando que estas respostas são dependentes de influxo de cálcio através dos canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L (Figuras 4.2 e 4.5). Efeito este que já havia sido descrito para o IGF-I por Jacobus *et al.* (2010). Já foi demonstrado também que em células

precursoras de oligodendrócitos os receptores tirosina-cinase aumentam o influxo de cálcio induzido pela despolarização da membrana das células (Paez *et al.*, 2010).

Diversos dos efeitos biológicos causados pelo IGF-I em células de Sertoli dependem da ativação da fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) (Khan *et al.*, 2002; Jacobus *et al.*, 2010). Dessa forma, o efeito despolarizante causado pelo IGF-I sobre a membrana de células de Sertoli imaturas é provavelmente desencadeado através de um mecanismo dependente de cálcio o qual é mediado pela ativação do PI3K, uma vez que o efeito do IGF-I é bloqueado por wortmannin (Jacobus *et al.*, 2010). Assim como o IGF-I (Figura 4.13), a insulina também produziu um aumento na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em células de Sertoli imaturas e este efeito foi bloqueado pelo JB1 (Figura 4.14), demonstrando mais uma vez que a insulina se utiliza do receptor de IGF-I para estimular a captação de cálcio.

De forma similar ao observado por Mullaney *et al.* (1994) sobre a produção de lactato, o qual afirma que a responsividade da célula de Sertoli a hormônios diminui ao longo do desenvolvimento, a resposta despolarizante causada pela aplicação tópica tanto de IGF-I como de insulina foi mais intensa em células de Sertoli de ratos de 12 a 15 dias de idade do que em células de ratos de 30 dias de idade (Figuras 4.8 e 4.10). Demonstrando, assim, uma alteração no padrão de resposta dessas células aos hormônios à medida que o desenvolvimento testicular avança. O IGF-I não apresentou uma resposta despolarizante significativa em células de Sertoli de ratos de 30 dias de idade (Figuras 4.8 e 4.9). Por outro lado, a insulina mostrou um efeito despolarizante significativo sobre o potencial de membrana dessas células (Figuras 4.10 e 4.12), no entanto, este efeito curiosamente foi bloqueado pela ação do JB1 (Figura 4.11).

De acordo com Oonk e Grootegoed (1988), em células de Sertoli de ratos imaturos existe uma elevada afinidade do IGF-I pelos receptores tirosina-cinase e esta afinidade diminui ao longo do desenvolvimento. Eles também descreveram que a insulina tem uma menor afinidade para estes receptores em ratos imaturos e aumenta a sua afinidade com a maturação da célula. Os resultados deste trabalho mostram que, nos parâmetros estudados, o IGF-I atua com menor intensidade sobre os receptores da família do receptor de insulina expressos em células de Sertoli de ratos de 30 dias de idade do que em células de ratos de 12 a 15 dias de idade (Figura 4.9), enquanto a insulina mantém sua afinidade durante o desenvolvimento das células de Sertoli e permanece atuando através do IGF-IR (Figura 4.11).

Em relação ao transporte de $[^{14}\text{C}]\text{MeAIB}$, Jacobus *et al.* (2010) descreveram que de forma similar ao que ocorreu com o efeito despolarizante do IGF-I e do FSH, o anticorpo anti-IGF-I inibiu a estimulação do transporte de $[^{14}\text{C}]\text{MeAIB}$ causado pelo IGF-I em todas as concentrações testadas, mas não inibiu a atividade do FSH. Portanto, mostrando que o efeito

estimulante de ambos os hormônios no transporte de [¹⁴C]MeAIB ocorre de forma independente.

Neste estudo, o efeito estimulante do IGF-I sobre o transporte de [¹⁴C]MeAIB foi parcialmente bloqueado pelo JB1 em ratos de 12 a 15 dias de idade (Figura 4.15). Enquanto o efeito estimulante da insulina não teve qualquer alteração após a incubação com JB1 (Figura 4.16). Isso demonstra que sobre esse parâmetro especificamente a insulina não age sobre o receptor de IGF-I enquanto o IGF-I possivelmente deva se utilizar de outros receptores tirosina-cinase para estimular o transporte de aminoácido, como o IR. Sabe-se que o FSH estimula a síntese e secreção de IGF-I pelas células de Sertoli que, por sua vez, atua de maneira autócrina nestas células. Este sistema autócrino de IGF-I presente nas células de Sertoli é mais evidente em ratos pré-púberes (Khan *et al.*, 2002; Meroni *et al.*, 2004). Estes resultados suportam a hipótese de Oonk e Grootegoed (1988) de que o IGF-I deve possuir um papel mais importante em células de Sertoli imaturas que ainda estão em processo de proliferação, enquanto que insulina tem uma ação mais intensa após a maturação destas células, regulando a espermatogênese através do controle do transporte de glicose, por exemplo.

Uma vez que o lactato é o substrato energético preferencial de espermatócitos e espermatídes, a sua produção se configura como uma das mais importantes funções das células de Sertoli. Essa produção parece ocorrer mesmo em condições adversas. Várias etapas são necessárias para que se tenha uma produção adequada de lactato e o transporte glicose através da membrana celular é um evento importante para todo esse processo (Riera *et al.*, 2009).

O transporte de glicose passivo é mediado pelos transportadores de glicose (GLUTs), os quais podem ser regulados por hormônios (Riera *et al.*, 2009). Em células de Sertoli, foi descrita a expressão de três isoformas de transportadores de glicose: GLUT1, GLUT3 e GLUT8 (Carosa *et al.*, 2005; Kokk *et al.*, 2007; Galardo *et al.*, 2008; Riera *et al.*, 2009). Oonk *et al.* (1989) mostraram que o IGF-I e a insulina estimulam o transporte de glicose e a produção de lactato em cultura de células de Sertoli. O FSH apesar de estimular a produção de lactato não apresentou nenhuma ação sobre o transporte de hexoses. Os autores postularam que esse efeito do FSH envolve principalmente a estimulação da atividade de enzimas glicolíticas e não a atividade dos GLUTs.

Tanto GLUT1 quanto GLUT3 podem estar envolvidos nesse processo de transporte de glicose para o interior das células de Sertoli, uma vez que esses transportadores foram localizados na membrana plasmática basal das células de Sertoli. No entanto, o GLUT8 não foi localizado na membrana plasmática o que exclui a possibilidade desse transportador de estar envolvido nesse processo (Carosa *et al.*, 2005; Galardo *et al.*, 2008).

Os resultados descritos neste trabalho em relação ao transporte de glicose mostraram que tanto IGF-I (Figura 4.17) quanto a insulina (Figura 4.18) estimulam o transporte de glicose em células de Sertoli de ratos de 12 a 15 dias de idade. A estimulação do transporte de glicose pelo IGF-I foi completamente bloqueada quando o tecido foi incubado com JB1 (Figura 4.17). Curiosamente, o efeito da insulina sobre o transporte de glicose foi parcialmente bloqueado pelo JB1 (Figura 4.18). Aparentemente, estes dados sugerem que nestas células, enquanto que o IGF-I atua através da ligação ao seu próprio receptor, a insulina pode estimular o transporte de glicose não apenas através do seu receptor cognato, mas também pelo receptor de IGF-I. Possivelmente a capacidade da insulina em estimular o transporte de glicose através do IGF-IR possa ser uma via alternativa para garantir o transporte de glicose para a produção de lactato pela célula de Sertoli mesmo em condições em que a sinalização mediada pelo IR esteja comprometida (Riera *et al.*, 2009).

Além da similaridade estrutural do IGF-I e da insulina e da capacidade deles se ligarem a ambos os receptores, IR e IGF-IR ativam diversas vias de sinalização intracelular idênticas. Dessa forma, a separação dos efeitos de cada hormônio fica ainda mais difícil quando são estudados em células que expressam tanto IR quanto IGF-R (Khan *et al.*, 2002; Entingh-Pearsall e Kahn, 2004). A elevada homologia destes dois hormônios e seus receptores pode ser uma explicação para os resultados descritos. Uma vez que, apesar das suas semelhanças estruturais, IR e IGF-IR não são moléculas funcionalmente redundantes, como pode ser observado pelos fenótipos diferentes de ratos deficientes para IR e IGF-IR (Khan *et al.*, 2002; Entingh-Pearsall e Kahn, 2004; Belfiore *et al.*, 2009). No entanto, Oonk e Grootegoed (1988) discutem que o número de receptores de IGF-I e de insulina em testículos pode ser regulado ao longo do desenvolvimento, o que alteraria a afinidade desses hormônios para este tecido e, conseqüentemente, os efeitos destes hormônios em um período específico do desenvolvimento.

6 CONCLUSÃO

Tanto o IGF-I quanto a insulina produzem um efeito despolarizante sobre a membrana de células de Sertoli de túbulos seminíferos inteiros. Ambos os hormônios também aumentaram a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ e o transporte de $[^{14}\text{C}]\text{MeAIB}$ e $[^{14}\text{C}]\text{2-DG}$ em testículos inteiros durante a fase proliferativa das células de Sertoli.

Ficou evidente que o IGF-I perde afinidade ao longo do desenvolvimento das células de Sertoli, uma vez que a intensidade da despolarização gerada por esse hormônio diminuiu consideravelmente das células imaturas para as células maduras.

Finalmente, ficou claro frente aos dados apresentados que a ativação das vias de sinalização envolvidas nas ações de IGF-I e insulina dependem da presença dos receptores de ambos os hormônios na membrana celular de células de Sertoli para que eles sejam capazes de interferir nos processos metabólicos e funcionais dessas células.

REFERÊNCIAS

- AGBAJE, I. M. et al. Insulin dependant diabetes mellitus: implications for male reproductive function. **Human Reproduction**, v. 22, n. 7, p. 1871–1877, 2007.
- ANDERSEN, A. S. et al. Identification of Determinants That Confer Ligand Specificity on the Insulin Receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 19, 5, p. 13681-13686, 1992.
- BAIRD, F. E. et al. Evidence for allosteric regulation of pH-sensitive System A (SNAT2) and System N (SNAT5) amino acid transporter activity involving a conserved histidine residue. **The Biochemical Journal**, v. 397, p. 369-375, 2006.
- BALLESTER, J. et al. Insulin-Dependent Diabetes Affects Testicular Function by FSH- and LH-Linked Mechanisms. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 5, p. 706-719, 2004.
- BATRA, S.; SJOGREN, C. Effect of estrogen treatment on calcium uptake by the rat uterine smooth muscle. **Life Science**, v. 32, p. 315-319, 1983.
- BELFIORE, A. et al. Insulin Receptor Isoforms and Insulin Receptor/Insulin-Like Growth Factor Receptor Hybrids in Physiology and Disease. **Endocrine Reviews**, v. 30, n. 6, p. 583-623, 2009.
- CALLAGHAN, B.; ZHONG, J.; KEEF, K. D. Signaling pathway underlying stimulation of L-type Ca^{2+} channels in rabbit portal vein myocytes by recombinant $G\beta\gamma$ subunits. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 291, p. H2541-H2546, 2006.
- CAROSA, E. et al. Ontogenetic profile and thyroid hormone regulation of type-1 and type-8 glucose transporters in rat Sertoli cells. **International Journal of Andrology**, v. 28, n. 2, p. 99-106, 2005.
- CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 419-425, 2002.
- CATTERALL, W. A. Structure and Regulation of Voltage-gated Ca^{2+} Channels. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 16, p. 521-555, 2000.
- CATTERALL, W. A. et al. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels. **Pharmacological Reviews**, v. 57, n. 4, p. 411-425, 2005.
- CHATELAIN, P. et al. Paracrine and autocrine regulation of insulin-like growth factor I. . **Acta Paediatrica**, v. 80, n. S372, p. 92-95, 1991.
- CLAPHAM, D. E. Calcium Signaling. **Cell**, v. 131, n. December 14, p. 1047-1058, 2007.
- DA CRUZ CURTE, A.; WASSERMANN, G. F. Identification of amino acid transport systems stimulated by FSH in rat testes. **Journal of Endocrinology**, v. 106, p. 291-294, 1985.
- DE MEYTS, P.; WHITTAKER, J. Structural Biology of Insulin and IGF1 Receptors: Implications for Drug Design. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, p. 769-783, 2002.
- DOLPHIN, A. C. A short history of voltage-gated calcium channels. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. S56–S62, 2006.

ELMLINGER, M. W. et al. Elevated insulin-like growth factor (IGF) binding protein (IGFBP)-2 and IGFBP-4 expression of leukemic T-cells is affected by autocrine/paracrine IGF-II action but not by IGF type I receptor expression. **European Journal of Endocrinology**, v. 138, p. 337-343, 1998.

ENTINGH-PEARSALL, A.; KAHN, C. R. Differential Roles of the Insulin and Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) Receptors in Response to Insulin and IGF-I. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 36, p. 38016-38024, 2004.

ERTEL, E. A. et al. Nomenclature of Voltage-Gated Calcium Channel. **Neuron**, 2000.

FANG, J. et al. IGF regulation of neutral amino acid transport in the BeWo choriocarcinoma cell line (b30 clone): evidence for MAP kinase-dependent and MAP kinase-independent mechanisms. **Growth Hormone & IGF Research**, v. 16, n. 5-6, p. 318-325, 2006.

FANTL, W. J.; JOHNSON, D. E.; WILLIAMS, L. T. Signalling by receptor tyrosine kinases. **Annual Reviews of Biochemistry**, v. 62, p. 453-481, 1993.

FAWCETT, D. W.; LEAK, L. V.; HEIDGER, P. M. J. Electron microscopic observations on the structural components of the blood-testis barrier. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement.**, v. 10, p. 105-122, 1970.

FROMENT, P. et al. Inactivation of the IGF-I receptor gene in primary Sertoli cells highlights the autocrine effects of IGF-I. **Journal of Endocrinology**, v. 194, p. 557-568, 2007.

GALARDO, M. N. et al. Regulation of expression of Sertoli cell glucose transporters 1 and 3 by FSH, IL1 β , and bFGF at two different time-points in pubertal development. **Cell and Tissue Research**, v. 334, n. 2, p. 295-304, 2008.

GANONG, W. F. **Review Of Medical Physiology**. 22^a. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006.

GAUGUIN, L. et al. Structural Basis for the Lower Affinity of the Insulin-like Growth Factors for the Insulin Receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 5, p. 2604-2613, 2008.

GNESSI, L.; FABRI, A.; SPERA, G. Gonadal Peptides as Mediators of Development and Functional Control of the Testis: An Integrated System with Hormones and Local Environment. **Endocrine Reviews**, v. 18, n. 4, p. 541-609, 1997.

GRISWOLD, M. D. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. **Cell and Development Biology**, v. 9, p. 411-416, 1998.

HOFMANN, F.; LACINOVA, L.; KLUGBAUER, N. Voltage-dependent calcium channels: From structure to function. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v. 139, p. 33-87, 1999.

HYDE, R. et al. Distinct Sensor Pathways in the Hierarchical Control of SNAT2, a Putative Amino Acid Transceptor, by Amino Acid Availability. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 27, p. 19788-19798, 2007.

HYDE, R.; PEYROLIER, K.; HUNDAL, H. S. Insulin Promotes the Cell Surface Recruitment of the SAT2/ATA2 System A Amino Acid Transporter from an Endosomal Compartment in Skeletal Muscle Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 16, n. April 19, p. 13628-13634, 2002.

JACOBUS, A. P.; LOSS, E. S.; WASSERMANN, G. F. Pertussis toxin nullifies the depolarization of the membrane potential and the stimulation of the rapid phase of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ entry through L-type calcium channels that are produced by follicle stimulating hormone in 10- to 12-day-old rat Sertoli cells. **Frontiers in Physiology**, v. 1, p. 1-11, 2010.

JÉGOU, B. The Sertoli-germ cell communication network in mammals. **International Review of Cytology**, v. 147, p. 25-96, 1993.

JENSEN, M.; DE MEYTS, P. Chapter 3 Molecular Mechanisms of Differential Intracellular Signaling From the Insulin Receptor. **Vitamins & Hormones**, v. 80, p. 51-75, 2009.

KAMP, T. J.; HELL, J. W. Regulation of Cardiac L-Type Calcium Channels by Protein Kinase A and Protein Kinase C. **Circulation Research**, v. 87, p. 1095-1102, 2000.

KHAN, S. A. et al. Follicle-Stimulating Hormone Amplifies Insulin-Like Growth Factor I-Mediated Activation of AKT/Protein Kinase B Signaling in Immature Rat Sertoli Cells. **Endocrinology**, v. 143, n. 6, p. 2259-2267, 2002.

KILBERG, M. S.; STEVENS, B. R.; NOVAK, D. A. Recent advances in mammalian amino acid transport. **Annual Review of Nutrition**, v. 13, p. 137-165, 1993.

KOKK, K. et al. Expression of insulin receptor substrates 1–3, glucose transporters GLUT-1–4, signal regulatory protein 1 α , phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B at the protein level in the human testis. **Anatomical Science International**, v. 80, p. 91-96, 2005.

KOKK, K. et al. Expression of Insulin Signaling Transmitters and Glucose Transporters at the Protein Level in the Rat Testis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1095, p. 262-273, 2007.

LACINOVA, L. Voltage-dependent calcium channels. **General Physiology and Biophysics**, v. 24, n. Supplement 1, p. 1-78, 2005.

LOSS, E. S.; JACOBUS, A. P.; WASSERMANN, G. F. Diverse FSH and Testosterone Signaling Pathways in the Sertoli Cell. **Hormone and Metabolic Research**, v. 39, p. 1-7, 2007.

LOSS, E. S.; JACOBUS, A. P.; WASSERMANN, G. F. Rapid signaling responses in Sertoli cell membranes induced by follicle stimulating hormone and testosterone: Calcium inflow and electrophysiological changes. **Life Sciences**, v. 89, p. 577-583, 2011.

MACHADO, V. L. A.; WASSERMANN, G. F.; MARQUES, M. *In Vitro* Effect of Insulin on the Uptake of Glucose and α -Aminoisobutyric Acid in the Thyroid Gland of the Turtle (*Chrysemys dorsalis*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 82, p. 8-13, 1991.

MALBERG, J. E. et al. Increasing the Levels of Insulin-Like Growth Factor-I by an IGF Binding Protein Inhibitor Produces Anxiolytic and Antidepressant-Like Effects. **Neuropsychopharmacology**, v. 32, p. 2360-2368, 2007.

MCGIVAN, J. D.; PASTOR-ANGLADA, M. Regulatory and molecular aspects of mammalian amino acid transport. **Biochemical Journal**, v. 299, p. 321-334, 1994.

MCLACHLAN, R. I. et al. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 57, n. 1, p. 149-179, 2002.

MERONI, S. B. et al. FSH activates phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signaling pathway in 20-day-old Sertoli cells independently of IGF-I. **Journal of Endocrinology**, v. 180, p. 257-265, 2004.

MOLINA, L. et al. Structural domains of the insulin receptor and IGF receptor required for dimerisation and ligand binding. **FEBS Letters**, v. 467, p. 226-230, 2000.

MRUK, D. D.; CHENG, C. Y. Sertoli-Sertoli and Sertoli-Germ Cell Interactions and Their Significance in Germ Cell Movement in the Seminiferous Epithelium during Spermatogenesis. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 5, p. 747-806, 2004.

MUECKLER, M. Facilitative glucose transporters. **European Journal of Biochemistry**, v. 219, p. 713-725, 1994.

MULLANEY, B. P.; ROSSELLI, M.; SKINNER, M. K. Developmental regulation of Sertoli cell lactate production by hormones and the testicular paracrine factor, PModS. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 104, p. 67-73, 1994.

NAKAYAMA, Y.; YAMAMOTO, T.; ABÉ, S.-I. IGF-I, IGF-II and insulin promote differentiation of spermatogonia to primary spermatocytes in organ culture of newt testes. **International Journal of Developmental Biology**, v. 43, p. 343-347, 1999.

NEF, S. et al. Testis determination requires insulin receptor family function in mice. **Nature**, v. 426, n. 291-295, p. 291-295, 2003.

NOWYCKY, M. C.; FOX, A. P.; TSIEN, R. W. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. **Nature**, v. 316, p. 440-443, 1985.

O'DONNELL, L. et al. **Chapter 21: Endocrine Regulation of Spermatogenesis**. Third Edition. Elsevier, 2006.

OONK, R. B.; GROOTEGOED, J. A. Insulin-like growth factor I (IGF-I) receptors on Sertoli cells from immature rats and age-dependent testicular binding of IGF-I and insulin. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 55, p. 33-43, 1988.

OONK, R. B.; JANSEN, R.; GROOTEGOED, J. A. Differential effects of follicle-stimulating hormone, insulin, and insulin-like growth factor I on hexose uptake and lactate production by rat Sertoli cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 139, n. 1, p. 210-218, 1989.

PAEZ, P. M. et al. Multiple kinase pathways regulate voltage-dependent Ca²⁺ influx and migration in oligodendrocyte precursor cells. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 18, p. 6422-6433, 2010.

PIETRZKOWSKI, Z. et al. Inhibition of Cellular Proliferation by Peptide Analogues of Insulin-like Growth Factor 1. **Cancer Research**, v. 52, n. December 1, p. 6447-6451, 1992.

PITT, G. S. Calmodulin and CaMKII as molecular switches for cardiac ion channels. **Cardiovascular Research**, v. 73, p. 641-647, 2007.

RAPPAPORT, M. S.; SMITH, E. P. Insulin-Like Growth Factor (IGF) Binding Protein 3 in the Rat Testis: Follicle-Stimulating Hormone Dependence of mRNA Expression and Inhibition of IGF-I Action on Cultured Sertoli Cells. **Biology of Reproduction**, v. 52, p. 419-425, 1995.

RAY, R. The prepubertal testis: a quiescent or a silently active organ? **Histology and Histopathology**, v. 14, p. 991-1000, 1999.

REIMER, R. J. et al. Amino acid transport System A resembles System N in sequence but differs in mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 14, p. 7715-7720, 2000.

RIERA, M. F. et al. Molecular mechanisms involved in Sertoli cell adaptation to glucose deprivation. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 297, p. E907-E914, 2009.

RITZÉN, E. M. Chemical messengers between Sertoli cells and neighbouring cells. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 19, n. 1, p. 499-504, 1983.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, 2001.

SANTEN, R. J.; BARDIN, C. W. Episodic Luteinizing Hormone Secretion in Man: Pulse Analysis, Clinical Interpretation, Physiologic Mechanisms. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 52, p. 2617-2628, 1973.

SHARPE, R. M. et al. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. **Reproduction**, v. 125, p. 769-784, 2003.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia Humana - Uma Abordagem Integrada**. 5ª. Porto Alegre: Artmed, 2010.

SKINNER, M. K. Cell-Cell Interactions in the Testis. **Endocrine Reviews**, v. 12, p. 45-77, 1991.

SKINNER, M. K.; GRISWOLD, M. D. **Sertoli Cell Biology**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005.

STEINBERGER, A.; STEINBERGER, E. Replication Pattern of Sertoli Cells in Maturing Rat Testis in Vivo and in Organ. **Biology of Reproduction**, v. 4, p. 84-87, 1971.

VANNELLI, B. et al. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor in human testis: an immunohistochemical study. **Fertility and Sterility**, v. 49, n. 4, p. 666-669, 1988.

VIARD, P. et al. Gbg dimers stimulate vascular L-type Ca²⁺ channels via phosphoinositide 3-kinase. **The FASEB Journal**, v. 13, p. 685-694, 1999.

VON LEDEBUR, E. L. et al. Rapid effect of testosterone on rat Sertoli cell membrane potential, Relationship with K⁺ATP channels. **Hormone and Metabolic Research**, v. 34, p. 550-555, 2002.

WASSERMANN, G. F. et al. Electrophysiological changes of Sertoli cells produced by acute administration of amino acid and FSH. **Hormone and Metabolic Research**, v. 24, p. 326-328, 1992a.

WASSERMANN, G. F. et al. Biochemical Factors Involved in the FSH Action on Amino Acid Transport in Immature Rat Testes. **Hormone and Metabolic Research**, v. 24, n. 6, p. 276-279, 1992b.

YU, F. H.; CATTERALL, W. A. The VGL-Chanome: A Protein Superfamily Specialized for Electrical Signaling and Ionic Homeostasis. **Sci. STKE**, v. 253, p. re15, 2004.