

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Estudo da participação dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  na resposta eletrofisiológica do  
FSH nas células de Sertoli de ratos imaturos

Manuscrito elaborado de acordo com as  
normas do periódico *Hormone and  
Metabolic Research*.

Débora Olmedo Rodrigues

131684

Prof<sup>a</sup> Orientadora: Eloísa da Silveira Loss

BIO  
BIO  
457

2008

RS - IBIO

# Estudo da participação dos canais de $\text{Ca}^{2+}$ na resposta eletrofisiológica do FSH nas células de Sertoli de ratos imaturos.

Rodrigues, DO<sup>a</sup>; Jacobus, AP<sup>a,b</sup>; Castro, AL<sup>a,c</sup>; Fracasso, BM<sup>a,c</sup>; Loss, ES<sup>a</sup> e Wassermann, GF<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Fisiologia, ICBS, UFRGS  
Rua Sarmiento Leite, 500, CEP 90050-170 Porto Alegre, RS, Brasil  
Fone/Fax: +55 (51) 33 08 33 02 e-mail: gwass@ufrgs.br

<sup>b</sup> Centro Universitário Metodista — IPA

<sup>c</sup> Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre — UFCSPA

Título Resumido: Participação dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  na resposta ao FSH

## Resumo

O FSH atua em células de Sertoli de ratos imaturos através de uma via já bem descrita que envolve GPCR/Adenilil ciclase/AMPC/PKA; entretanto, foram observados eventos independentes de AMPC/PKA, mas dependentes do influxo de  $Ca^{2+}$ , como o transporte de aminoácidos. Esta ação do FSH pode estar relacionada a uma via alternativa através de um receptor com características semelhantes ao receptor de IGF-1. Neste trabalho, utilizando a técnica de registro eletrofisiológico intracelular observou-se que a resposta eletrofisiológica do FSH modifica-se conforme a idade entre 15 e 18 dias. Também foi verificado que a nimodipina alterou o potencial de membrana (PM) das células provocando uma redução do efeito hiperpolarizante produzido pelo FSH. IGF-1 produziu despolarização imediata do PM das células de Sertoli. Esta ação pode estar relacionada ao aumento da captação de  $^{45}Ca^{2+}$  e do aumento do transporte de  $^{14}C$ -MeAIB, eventos deflagrados por este fator de crescimento. O FSH e o IGF-1 podem estar atuando sobre os mesmos parâmetros de forma sinérgica na função proliferativa durante a fase proliferativa das células de Sertoli.

**Palavras Chave:** FSH, IGF-1, Canais de  $Ca^{2+}$ , transporte de aminoácidos, células de Sertoli

## Abreviaturas

AMPC: adenosina-monofosfato cíclica  
CCDV: canal de cálcio dependente de voltagem  
DHPs: dihidropiridinas  
DMSO: dimetil sulfoxido  
ERK: cinase regulada por sinal extracelular  
FSH: hormônio folículo estimulante  
FSH-R1: receptor tipo 1 para hormônio folículo estimulante  
FSH-R3: receptor tipo 3 para hormônio folículo estimulante  
GPCR: receptor acoplado à proteína G  
IGF-1: tipo 1 do fator de crescimento semelhante à insulina  
 $K^+_{ATP}$ : canal de potássio sensível ao ATP  
KRb: Krebs-Ringer bicarbonato  
MeAIB: ácido metil-aminoisobutírico  
 $PI_3K$ : fosfatidil inositol-3-cinase  
PKA: proteína cinase A  
PKC: proteína cinase C  
PM: potencial de membrana  
 $R_0$ : resistência de membrana  
T/M: razão tecido/meio

## Introdução

As células de Sertoli de testículos de mamíferos exercem um papel de suporte: recebendo, integrando e enviando os sinais requeridos para o desenvolvimento do processo espermatogênico. Desta forma, as células de Sertoli fornecem às células germinativas os nutrientes e fatores biológicos necessários para seu desenvolvimento, através de uma comunicação célula-célula [1, 2]. Os principais mensageiros que atuam nas células de Sertoli são o hormônio folículo estimulante (FSH) e a testosterona [3-5], sendo que estes hormônios atuam através de diferentes vias, as quais variam com o estágio de maturação celular.

O FSH induz, nas células de Sertoli de ratos imaturos, um aumento no transporte de aminoácidos através do sistema A, que é um co-transportador  $\text{Na}^+$ -aminoácido [6]. Este efeito é dependente do influxo de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) através de canais de cálcio dependentes de voltagem (CCDV) [7]. O aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  induzido por FSH é independente da via da adenosina-monofosfato cíclica (AMPC) a qual é ativada pela ligação do FSH ao seu receptor acoplado à proteína G (GPCR) [8, 9]. O bloqueio dos CCDV com verapamil, níquel ou cobalto inibe o transporte de aminoácidos, indicando uma relação entre este transporte e a ativação de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  [7]. Experimentos eletrofisiológicos, em células de Sertoli de ratos imaturos, demonstraram que o FSH apresenta uma resposta bifásica, com uma rápida hiperpolarização (em menos de 5s), seguida de uma despolarização prolongada (mais de 6 minutos). Verapamil, bloqueando canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, atua inibindo a fase despolarizante da ação do FSH, mas não a hiperpolarização [10]. Esta hiperpolarização pode estar relacionada com canais de potássio dependentes de ATP ( $\text{K}^+_{\text{ATP}}$ ) [11] pois esta foi inibida por tolbutamida, uma sulfoniluréia com ação inibitória sobre estes canais, em células de Sertoli (dados preliminares). Foi descrito que os canais  $\text{K}^+_{\text{ATP}}$  estão envolvidos na ação hiperpolarizante do FSH em membrana de células foliculares de oócitos de *Xenopus* [12].

A via de sinalização do FSH, em resposta à ligação do hormônio com o receptor acoplado à proteína G (GPCR) já está bem descrita. Este receptor, também conhecido com FSH-R1, ativa adenilato ciclase

que, por sua vez, aumenta AMPc produzindo efeitos relacionados com o controle da síntese protéica. A complexidade das rotas de sinalização pós-receptor, em resposta ao FSH, indica a existência de outras vias de transdução de sinal, além desta via GPCR/Adenilil ciclase/AMPc/proteína cinase A (PKA) [13]. A ação do FSH sobre o transporte de aminoácidos, o qual é dependente da captação de cálcio através dos CCDV tipo L em células de Sertoli de testículos imaturos [14], parece estar relacionada com esta via alternativa. A presença de um receptor denominado FSH-R3, formado a partir de *splicing* alternativo, tem sido postulada como mecanismo plausível para a explicação do aumento da captação de  $Ca^{2+}$  estimulado por FSH. Este receptor foi caracterizado por Babu e colaboradores [15] apresentando características de receptor para IGF-1 e, nas células da granulosa ovariana, é responsável pela ativação da via de cinase regulada por sinal extracelular (ERK), sendo independente de AMPc, mas dependente do influxo de  $Ca^{2+}$  e da via da proteína cinase C (PKC) [15-18]. Este receptor FSH-R3 está relacionado com o desenvolvimento de tumor ovariano envolvendo proliferação das células da granulosa [19]. Este mecanismo alternativo, ainda necessita de confirmação suficiente por laboratórios independentes, visto que alternativas de sinalização foram propostas por diferentes pesquisadores (para revisão [20]).

É pertinente assinalar a importância do  $Ca^{2+}$  na proliferação em células de Sertoli, como foi demonstrado por Grasso e Reichert [8]. Um estudo de Dahia e Rao [21] observou que a mobilização seletiva de  $Ca^{2+}$  por FSH, em um minuto de incubação, ocorreu somente em células de Sertoli de ratos imaturos. Estes autores sugerem que a via, na qual o FSH atua sobre a captação de  $Ca^{2+}$ , é observada somente em animais imaturos e não nos adultos. Da mesma forma foi observado para o transporte de aminoácidos, onde o FSH aumenta o transporte somente nos animais imaturos [6]. Estes dados indicam que esta via, ativando captação de  $Ca^{2+}$ , pode ocorrer originando uma resposta diferencial ao FSH entre as células de Sertoli de ratos imaturos e de ratos adultos [21]. O efeito rápido do FSH na membrana das células de Sertoli tem sido descrito por diversos estudos [7, 8, 21, 22], mas ainda não foi formulada uma explicação satisfatória, apesar dos esforços na pesquisa. A existência de receptores

de alta afinidade para IGF-1 em células de Sertoli foi reportada por Oonk e Grootegoed [23] que sugeriram que esta somatomedina exerça ação na diferenciação e funcionalidade das gônadas. O número de receptores para IGF-1 é variável com a idade, de forma que células de Sertoli de ratos com 21 dias de idade apresentam maior número de receptores do que células de Sertoli de ratos adultos (4 meses de idade). Estes autores não observaram ligação do FSH com o receptor de IGF-I, demonstrando a especificidade do receptor de IGF-I com seu hormônio.

Neste estudo, avaliamos a resposta eletrofisiológica do FSH no período de maturação sexual de ratos, a participação de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  e a ação de IGF-I sobre os parâmetros já descritos para o FSH, como captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  e transporte de  $^{14}\text{C-MeAIB}$ .

## Material e Métodos

Os fármacos FSH, IGF-1 e nimodipina foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co, St Louis, MO, EUA.

**Animais:** Os animais experimentais utilizados foram ratos Wistar imaturos (10-18 dias), oriundos do CREAL/UFRGS e mantidos em ambiente com ar condicionado ( $24^{\circ}\text{C}$ ) e período de luz controlado (luz das 6:00 a.m. até 8:00 p.m.). Ração (Purina, Nutripal, Porto Alegre, RS, Brasil) e água potável foram disponibilizados para as matrizes *ad libitum*. Os animais lactentes são mantidos com suas mães até o sacrifício por deslocamento cervical.

Este trabalho faz parte de um projeto que obteve a aprovação do CEP/UFRGS através do processo número 2007861.

**Experimentos Eletrofisiológicos.** Em cada experimento, um testículo foi decapsulado e cuidadosamente estirado com duas pinças, expondo de 3 a 10 túbulos seminíferos íntegros e fixado no fundo de uma câmara de perfusão, com fluxo de 1 mL/min de tampão Krebs Ringer bicarbonato (KRb) com glicose (5 mM) a  $34^{\circ}\text{C}$ , pH 7,4, gaseificado com  $\text{O}_2:\text{CO}_2$  (95:5; v/v). O potencial de membrana (PM) intracelular foi registrado com a utilização de um eletrodo de borosilicato (diâmetro de 1,2mm, World Precision Instruments), com resistência típica 15-25M $\Omega$ , acoplado a um *holder* preenchidos com

solução de KCl 3M. O empalamento das células foi realizado com o auxílio de um micromanipulador com controle visual do procedimento através de microscópio invertido (Diaphot TDM, Nikon Co., Tóquio, Japão). O PM foi amplificado por um eletrômetro (INTRA 767, World Precision Instruments) e monitorado através de um osciloscópio (TDS 200-series, Tektronix, Inc. Wilsonville, OR, EUA). Os dados foram armazenados através de placa de interface (TDS 200-series Tektronix, Inc.) e do *software* WaveStar Lite Version 1.0.10, 1996, Tektronix, Inc. Este método foi previamente descrito por von Ledebur *et al.* [24]. Pulsos de corrente quadrada de 0,5nA, 0,5 Hz e 250 ms de duração foram gerados por um estimulador (Modelo 548K, AstroMed, Inc. GRASS Instrument Division, West Warwick, RI, EUA) e aplicados através do microeletrodo intracelular para registro da resistência de membrana ( $R_0$ ). A  $R_0$  foi mensurada com um circuito-ponte de acordo com Wassermann *et al.* [10]. Após dois minutos de estabilização do potencial de repouso IGF-1 ou FSH foram aplicados topicamente e nimodipina foi perfundida por cinco minutos antes da aplicação do hormônio. Cada tratamento foi repetido pelo menos cinco vezes em diferentes células de diferentes animais e as variações do PM e  $R_0$  foram registradas. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  SEM.

**Experimentos de Transporte de  $^{14}\text{C}$ -MeAIB.** Testículos de cinco ratos imaturos (13 dias) foram removidos e uma gônada, alternadamente direita e esquerda, de cada rato foi utilizada como controle e sua contralateral foi utilizada nos tratamentos, resultando em  $n=5$  para cada grupo. Os testículos foram pesados, decapsulados e pré-incubados por 50 minutos em um incubador metabólico de Dubnoff em tampão KRb a  $34^\circ\text{C}$ , pH 7,4, gaseificado com  $\text{O}_2:\text{CO}_2$  (95:5; v/v). As gônadas foram incubadas por 30 minutos, com  $^{14}\text{C}$ -MeAIB (0,1  $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ ) e com ou sem IGF-1. Após a incubação, os testículos foram removidos com uma pinça para tubos com 1 mL de água destilada. As amostras foram congeladas e após 24 horas foram fervidas por dez minutos. Alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  do meio interno e do meio externo foram tomadas para medida de radioatividade em líquido de cintilação Optifase em um espectrômetro de cintilação líquida beta modelo 1215 (LKB-Producer AB, Bromma, Suécia). A eficiência de



contagem foi de 85-90%. Os experimentos foram feitos em duplicata. Os resultados foram expressos pela relação tecido/meio (T/M).

**Experimentos de Captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ .** Testículos de cinco ratos imaturos (10 dias) foram removidos e uma gônada, alternadamente direita e esquerda, de cada rato foi utilizada como controle e sua contralateral foi utilizada nos tratamentos, resultando em n=5 para cada grupo. Os testículos foram pesados, decapsulados e pré-incubados por 60 minutos em um incubador metabólico de Dubnoff em tampão KRb com  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  (0,2 $\mu\text{Ci/mL}$ ) a 34°C, pH 7,4, gaseificado com  $\text{O}_2:\text{CO}_2$  (95:5; v/v). As gônadas foram incubadas por dois minutos em KRb com  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  e com ou sem IGF-1. Para interromper a incubação foi utilizada a técnica relatada por Batra e colaboradores [25] com modificações. Foi adicionado às amostras 1 mL de tampão com cloreto de lantânio (10mM) a 0°C para interromper o fluxo de cálcio. O sobrenadante foi preservado para medida do meio externo e os testículos foram removidos para tubos contendo 1mL de água destilada para posterior medida do meio interno. Todos os tubos foram congelados e os testículos foram posteriormente fervidos por dez minutos. Alíquotas de 100 $\mu\text{L}$  do meio interno e externo foram tomadas para medida de radioatividade em líquido de cintilação, conforme previamente descrito. Os experimentos foram feitos em duplicata. Os resultados foram expressos pela relação tecido/meio (T/M).

O FSH foi diluído em KRb na dose de 4mU/2 $\mu\text{L}$  aplicados topicamente em 1mL contidos na câmara de perfusão. IGF-1 foi diluído em água destilada e estocado a 4°C; quando requerido, a solução-estoque foi diluída em KRb até a solução final de 25 ng/mL. Nimodipina foi diluída em dimetil sulfóxido (DMSO) e, posteriormente, em KRb até a concentração de 5  $\mu\text{M}$ . A concentração final de DMSO (0,1%) não afeta os parâmetros testados.

A análise estatística foi realizada por um teste-*t* não-pareado para diferenças entre dois grupos e ANOVA de uma via ou duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni para análise de variância, usando

o software GraphPad InStat versão 3.01, 32 bit para Windows 95/NT (GraphPad Software, São Diego, Califórnia, EUA, www.graphpad.com). As diferenças são consideradas significativas quando  $p \leq 0,05$ .

## Resultados

**Efeito da nimodipina na ação do FSH sobre o potencial de membrana (PM)** A aplicação de  $5\mu\text{M}$  de nimodipina altera o PM das células de Sertoli de ratos imaturos (15 dias), apresentando variação de  $-42\pm 0,3$  mV para  $-39,3\pm 0,72$ mV (60s)\* e  $-38,8\pm 0,56$ mV(120s)\*;  $n=10$ , \* $p<0,05$ . A prévia perfusão com nimodipina altera o padrão de resposta à aplicação tópica de FSH (4mU) reduzindo a duração da fase de hiperpolarização (Fig 1).

**Resposta eletrofisiológica ao FSH em células de Sertoli de ratos de 15 e de 18 dias.** A alteração do padrão de resposta ao FSH de acordo com a fase de maturação pode ser observada na figura 2. Com 15 dias de idade, obtém-se como resposta à aplicação tópica de FSH (4mU) uma hiperpolarização seguida de uma despolarização. Durante a hiperpolarização há uma leve redução da resistência da membrana enquanto que na despolarização ocorre um aumento da resistência (variando de  $19,1\pm 0,4$  M $\Omega$  em 30 seg até  $25,6\pm 3^*$  em 180 seg após a aplicação do hormônio (\* $p<0,05$ )). Em ratos de 18 dias a despolarização ocorre em menos tempo e com maior intensidade e duração (Fig 2). Uma resposta similar foi obtida com a utilização de nimodipina.

**Resposta eletrofisiológica ao IGF-1.** A aplicação tópica de IGF-1 (25ng/mL) produz uma despolarização do PM imediata, com valor de significância  $p<0,05$ ,  $n=10$  (Fig 3). Com esta dose não foi observada diferença significativa sobre o aumento da resistência da membrana.

**Captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  e de  $^{14}\text{C-MeAIB}$  em resposta ao IGF-1.** IGF-1 (25ng/mL) produz aumento do acúmulo de  $^{14}\text{C-MeAIB}$  em testículos de ratos imaturos (13 dias), em 30 minutos de incubação (Fig 4A). Com a mesma dose de IGF-1 observa-se aumento da captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  em testículo de ratos (10 dias) com 2 minutos de incubação (Fig 4B).

## Discussão

Ao produzir despolarização no PM das células de Sertoli e induzir redução no efeito hiperpolarizante do FSH, a nimodipina apresentou efeito diferente do esperado. Tem sido descrito que as DHPs e alguns de seus derivados apresentam sítios de ligação em canais de  $K^+_{ATP}$  [26, 27] modulando a corrente destes canais. A possibilidade de que esta substância estar atuando no canal de  $K^+_{ATP}$  é plausível, uma vez que a célula de Sertoli tem presentes estes canais, como já descrito anteriormente pela ação de sulfoniluréias onde foi observado que a tolbutamida produz despolarização imediata, além de produzir aumento na captação de  $^{45}Ca^{2+}$  nestas células [20, 28]. Talvez por esse motivo a nimodipina produza uma alteração no PM, alterando também a duração do período hiperpolarizante produzido pelo FSH (Fig. 1). Desta forma, estes bloqueadores não se apresentaram como um instrumento eficiente para provar a ação do FSH sobre os CCDV.

A resposta bifásica eletrofisiológica ao FSH está, provavelmente, relacionada com uma sobreposição de efeitos do hormônio, ao produzir ativação de diferentes tipos de receptores ou vias metabólicas. Em células de Sertoli de ratos de 18 dias de idade, a resposta despolarizante está mais acentuada em relação ao mesmo tratamento aos 15 dias de idade (Fig. 2). Esta diferença de resposta pode estar vinculada às diversas alterações que estas células passam durante o período de maturação. Foi descrito que o número de receptores para IGF-1 aumenta durante a fase púbere, tendo seu pico aos 21 dias de idade, enquanto que, no adulto, o número desses receptores diminui [23]. O IGF-1 provoca uma resposta despolarizante no potencial de membrana das células de Sertoli já aos 15 dias de idade (Fig.3).

Da mesma forma que foi observado para o FSH [7, 9], o IGF-1 também aumenta a captação de  $^{45}Ca^{2+}$  e o transporte de aminoácidos na fase pré-púbere, evidenciando a ação proliferativa de ambos hormônios nesta fase. Já foi visto em células cromafins que IGF-1 produz aumento na transporte de aminoácidos via sistema A de transporte de aminoácidos e este é dependente de fosfatidil inositol-3-cinase ( $PI_3K$ ) [29].

O FSH, por seus efeitos de membrana e por aumentar o transporte de aminoácidos e a captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  [20], pode estar atuando sinergicamente ao IGF-1 durante a fase de maturação.

### Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo CNPq e PROPESQ-UFRGS.

### Bibliografia

1. *Skinner MK*. Cell-cell interactions in the testis. *Endocr Rev* 1991; 12: 45-77
2. *Jegou B*. The Sertoli-germ cell communication network in mammals. *Int Rev Cytol* 1993; 147: 25-96
3. *Cheng CY, Mruk DD*. Cell junctions dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiol Rev* 2002; 82: 825-874
4. *Carreau S, Foucault P, Drosowsky MA*. La Cellule de Sertoli: aspects fonctionnels compares chez le rat, le porc et l'homme. *Ann Endocrinol* 1994; 55: 203-220
5. *Silva FRMB, Leite LD, Wassermann GF*. Rapid signal transduction in Sertoli cells. *Eur J Endocrinol* 2002; 147: 425-433
6. *Irusta D, Wassermann GF*. Factors influencing the uptake of [ $\alpha$ - $^{14}\text{C}$ ] aminoisobutyric acid by rat testes. *J Endocrinol* 1974; 60: 463-471
7. *Wassermann GF, Monti Bloch L, Gillo ML, Silva FRMB, Loss ES, McConnell LL*. Biochemical factors involved in the FSH action on amino acid transport in immature rat testes. *Horm Metab Res* 1992; 24: 276-279
8. *Grasso P, Reichert LE*. Follicle-stimulating hormone receptor mediated uptake  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  by proteoliposomes and culture rat sertoli cells: evidence for involvement of voltage-activated and voltage independent calcium channels. *Endocrinology* 1989; 125: 3029-3036

9. *Grasso P, Reichert LE.* Follicle-stimulating hormone receptor-mediated uptake of  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  by cultured rat sertoli cells does not require activation of cholera toxin- or pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide binding proteins or adenylate cyclase. *Endocrinology* 1990; 127: 949-956
10. *Wassermann GF, Monti Bloch L, Grillo ML, Silva FRMB, Loss ES, Mcconnell LL.* Electrophysiological changes of Sertoli cells produced by acute administration of aminoacid and FSH. *Horm Metab Res* 1992; 24: 326-328
11. *Loss ES, Jacobsen M, Costa ZSM, Jacobus, AP, Borelli, F & Wassermann, GF.* Testosterone modulates  $\text{K}^+$ ATP channels in Sertoli cell membrane by a PLC-PIP2 pathway. *Horm Metab Res* 2004; 36: 519-525
12. *Fujita R, Kimura S, Kawasaki S, Watanabe S, Watanabe N, Hirano H, Matsumoto M, Sasaki K.* Electrophysiological and pharmacological characterization of the  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channel involved in the  $\text{K}^+$ -current responses to FSH and adenosine in the follicular cells of *Xenopus* oocyte. *J Physiol Sci* 2007; 57: 51-61
13. *Marinissen MJ, Gutkind JS.* G protein-coupled receptors and signalling networks: emerging paradigms. *TRENDS Trends Pharmacol Sci* 2001; 22: 368-376.
14. *Wassermann GF, Loss ES.* Effect of calcium channel blocker, verapamil, on amino acid uptake stimulated by FSH in rat testes. *ICRS Medical Science Research* 1989; 17: 779-780
15. *Babu PS, Danilovich N, Sairam MR.* Hormone-induced receptor gene splicing: enhanced expression of the growth factor type I follicle-stimulating hormone receptor motif in the developing mouse ovary as a new paradigm in growth regulation. *Endocrinology* 2001; 142: 381-389
16. *Touyz RM, Jiang L, Sairam MR.* Follicle-stimulating hormone mediated calcium signaling by the alternatively spliced growth factor type I receptor. *Biol Reprod* 2000; 62: 1067-1074

17. *Sairam MR, Jiang LG, Yarney TA, Khan H.* Alternative splicing converts the G-protein coupled follitropin receptor gene into a growth factor type I receptor: implications for pleiotropic actions of the hormone. *Mol Reprod Dev* 1997; 48: 471-479
18. *Simoni M, Nieschlag E & Grommol J.* Isoform and single nucleotide polymorphisms of the FSH receptor gene: implications for human reproduction. *Hum Reprod Update* 2002; 8: 413-421
19. *Li Y, Ganta S, Cheng C, Ganta RR, Freeman LC.* FSH stimulates ovarian cancer cell growth by action on growth factor variant receptor. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 267: 26-37
20. *Loss ES, Jacobus AP, Wassermann GF.* Diverse FSH and testosterone signaling pathways in the Sertoli cell. *Horm Metab Res* 2007; 39: 806-812
21. *Dahia CL, Rao AJ.* Regulation of FSH receptor, PKI $\beta$ , IL-6 and calcium mobilization: Possible mediators of differential action of FSH. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 247: 73-81
22. *Sharma OP, Flores JA, Leong DA, Velhuis JD.* Cellular basis for follicle-stimulating hormone-stimulation in single rat Sertoli cells: possible dissociation from effects of adenosine 3',5'-monophosphate. *Endocrinology* 1994; 134: 1915-1923
23. *Oonk RB, Grootegoed JA.* Insulin-like growth factor I (IGF-I) receptors on Sertoli cells from immature rats and age-dependent testicular binding of IGF-I and insulin. *Mol Cell Endocrinol* 1988; 55: 33-43
24. *von Ledebur EICF, Almeida JP, Loss ES, Wassermann GF.* Rapid effect of testosterone on rat Sertoli cell membrane potential. Relationship with K<sup>+</sup>ATP channels. *Horm Metab Res* 2002; 34: 550-555
25. *Batra S, Sjogren C.* Effect of estrogen treatment on calcium uptake by the rat uterine smooth muscle. *Life Sci* 1983; 32: 315-319
26. *Takahashi D, Oyuncul L, Onoue S, Ito Y, Uchida S, Simsek R, Gunduz MG, Safak C, Yamada S.* Structure-activity relationships of receptor binding of 1,4-dihydropyridine derivatives. *Biol Pharm Bull* 2008; 31: 473-479

27. *Mannhold R.* Structure-activity relationships of K(ATP) channel openers. *Curr Top Med Chem* 2006; 6: 1031-1047
28. *Wassermann GF, Loss ES.* Testosterone action on the Sertoli cell membrane: a KIR6.x channel related effect. *Curr Pharm Des* 2004; 10: 2649-2656
29. *Karlsen TV, Serck-Hanssen G.* Acute stimulation by IGF-1 of amino acid transport system A in cromafin cells depends on PI3 kinase activation and the electrochemical gradient of Na+. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 971: 573-575

## Legendas

**Figura 1.** Resposta eletrofisiológica de células de Sertoli de ratos de 15 dias à aplicação tópica de FSH (4mU) e à aplicação tópica de FSH após perfusão com nimodipina (5  $\mu$ M) por 5 minutos. Média  $\pm$  SEM (n=6), \*p < 0,05 quando comparado com FSH nos mesmos tempos.

**Figura 2.** Efeito da aplicação tópica de FSH (4mU) no PM de células de Sertoli de ratos com 15 dias de idade (n=8) e 18 dias de idade (n=6), Média  $\pm$  SEM, curva com p<0,05. Na comparação através do pós-teste de Bonferroni, há diferença entre as idades \*p<0,05 e \*\*p<0,01.

**Figura 3.** Resposta à aplicação tópica de IGF-1 (25ng/mL) no PM de células de Sertoli de ratos com 15 dias de idade. A variação entre os tempos é significativamente maior que o esperado, segundo o teste ANOVA de uma via. Média  $\pm$  SEM (n=10), p<0,05.

**Figura 4.** Efeito do IGF-1 (25ng/mL) em testículos de ratos imaturos (10 dias de idade). Acúmulo de  $^{14}\text{C}$ -MeAIB em 30 minutos de incubação (A). Captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  com 2 minutos de incubação (B). Média  $\pm$  SEM (n=10), teste T \*p < 0,05 quando comparado com os controles.



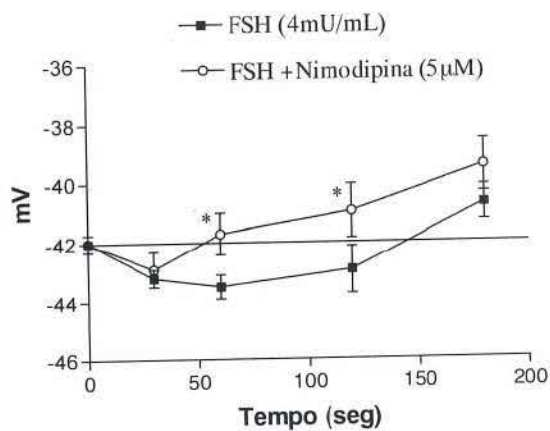


Figura 1

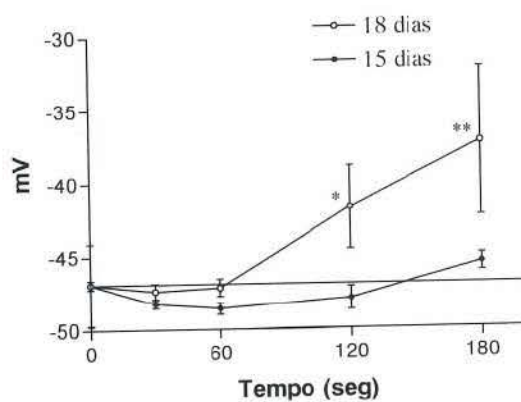


Figura 2

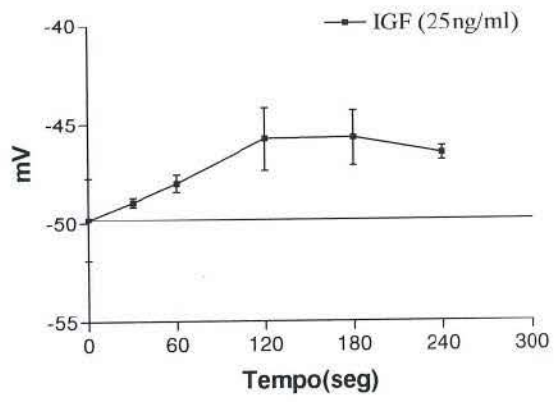


Figura 3

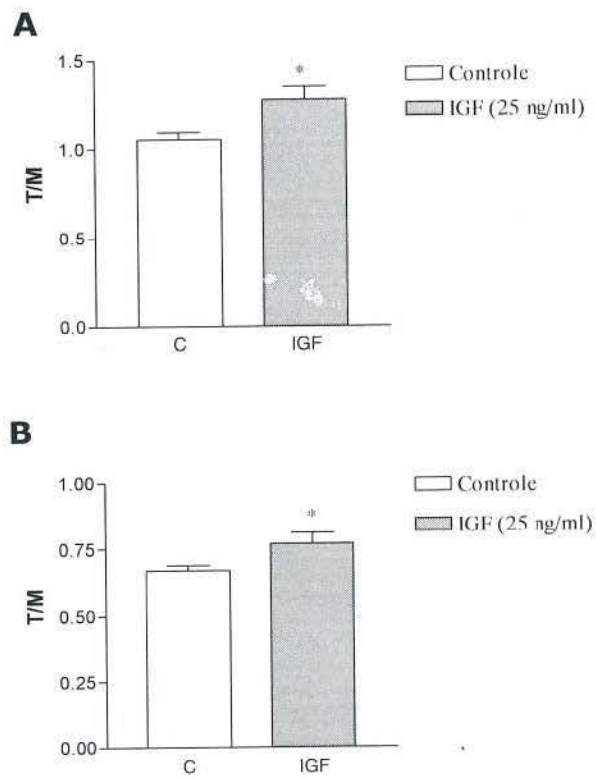


Figura 4