

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**SINALIZAÇÃO RÁPIDA POR TESTOSTERONA NA MEMBRANA
PLASMÁTICA DA CÉLULA DE SERTOLI: CAPTAÇÃO DE
 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ E EFEITOS ELETROFISIOLÓGICOS**

ESTHER IRIS CHRISTINA FREIFRAU VON LEDEBUR

**Orientador
Prof. Dr. Guillermo Federico Wassermann**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Porto Alegre
2002

Ao meu amado Zé,

que me incentivou para essa jornada,
vibrou comigo nas mínimas conquistas
ajudou e consolou-me nos momentos difíceis
pelo amor, apoio, compreensão e presença constante
que foram essenciais para que eu conseguisse chegar até o fim

Ao meu anjinho Gabriel,

que mesmo antes de nascer
já ajudava nos experimentos chutando só de leve
e que ao chegar encheu minha vida de luz e alegria

Ao Professor Wassermann,
por ensinar-me a ciência da vida
pela orientação e amizade dispensados
nos últimos 11 anos e, acima de tudo,
por ser um modelo de profissional.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e familiares, pela compreensão e estímulo sempre presentes.

À minha sogra Cecile, à tia Emerita e à Doraci, que ao cuidarem com tanto carinho do Gabriel, me proporcionaram a paz de espírito necessária para finalizar bem o meu trabalho.

À amiga e colega Karin Tallini, pela amizade fidedigna e por compartilhar as alegrias e amarguras durante esta caminhada.

À colega Eloísa Loss, pela colaboração, amizade e apoio nos mais diferentes momentos da realização do trabalho.

À colega Laura Difini Leite, pela amizade e exemplo de objetividade e bom humor.

À estagiária Juliana Piva de Almeida, pela colaboração inabalável e convívio divertido, fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Endocrinologia Experimental, Márcia, Marcelo, Adriana, Fabiana, Bárbara e Marilene, que proporcionaram um bom ambiente de trabalho e nunca negaram ajuda.

À técnica Elsa Pires pela valiosa dedicação e constante alto astral.

Aos professores e colegas do Departamento de Fisiologia da UFRGS, pelo ambiente agradável.

Ao Departamento de Bioquímica da UFRGS pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Prof. Dr. Focko F. Rommerts pela co-orientação e ensinamentos, e aos colegas e funcionários do Departamento de Endocrinologia & Reprodução da Universidade de Roterdã, pela ajuda durante o período em que estive lá.

À Profa. Dra. Masako Oya Masuda pela inestimável ajuda no aperfeiçoamento da técnica de eletrofisiologia, pelo seu profissionalismo e afetividade.

Ao CNPq e à CAPES pelas bolsas concedidas.

Às seguintes instituições pelo apoio financeiro: CNPq, CAPES e FAPERGS.

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO.....	1
I. 1. SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO.....	1
I. 1.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS.....	1
I. 1.1.2. REGULAÇÃO FUNCIONAL DO TESTÍCULO.....	5
I. 1.1.2.1. EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-TESTÍCULO.....	5
I. 1.2. TESTOSTERONA.....	7
I. 1.2.1. REGULAÇÃO DA SÍNTESE DE ANDRÓGENOS PELO LH.....	8
I. 1.2.2. DISTRIBUIÇÃO E METABOLISMO DOS ANDRÓGENOS NO TESTÍCULO.....	11
I. 1.2.3. FUNÇÕES GONADAIS DOS ANDRÓGENOS	13
I. 1.2.4. MECANISMO DE AÇÃO DA TESTOSTERONA.....	14
I. 2. EFEITOS NÃO GENÔMICOS DE ESTERÓIDES.....	15
I. 3. CONCENTRAÇÃO IÔNICA E POTENCIAL DE REPOUSO.....	17
I. 4. GRADIENTE ELETROQUÍMICO E BOMBA Na^+/K^+	18
I. 5. CANAIS IÔNICOS ATRAVÉS DA MEMBRANA CELULAR.....	21
I. 6. PRINCÍPIOS GERAIS SOBRE REGISTROS INTRACELULARES.....	23
I. 7. CÁLCIO CELULAR.....	25
I. 8. CANAIS DE CÁLCIO	32
I. 8.1. CANAIS DE CÁLCIO LIGADOS AO RECEPTOR.....	32
I. 8.2. CANAIS DE CÁLCIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM.....	33
I. 8.2.1. CANAIS DO TIPO L.....	35
I. 8.2.2. CANAIS DO TIPO T.....	37
I. 8.2.3. CANAIS DO TIPO N.....	38

I. 8.2.4. CANAIS TIPO P/Q E TIPO R.....	39
I. 9. CANAIS DE POTÁSSIO.....	39
I. 9.1. CANAIS DE POTÁSSIO SENSÍVEIS AO ATP (K_{ATP}).....	43
I. 10. INTERAÇÕES IÔNICAS E ELÉTRICAS NA MEMBRANA PLASMÁTICA DE CÉLULAS DE SERTOLI.....	47
II. OBJETIVOS.....	51
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
III. 1. MATERIAIS.....	52
III. 1.1. ANIMAIS.....	52
III. 1.1.1. OBTENÇÃO DE RATOS COM TESTÍCULOS ENRIQUECIDOS EM CÉLULAS DE SERTOLI (SCE)	52
III. 1.2. SOLUÇÕES.....	53
III. 1.2.1. TAMPÃO KREBS RINGER BICARBONATO (KRB).....	53
III. 1.2.2. TAMPÃO KRB COM BAIXO CLORETO.....	54
III. 1.2.3. MEIO DME/HAM'S F-12 - EAGLE MODIFICADO DULBECCO (DME)/ MISTURA NUTRIENTE HAM'S F-12 (1:1).....	55
III. 1.3. SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS.....	55
III. 2. MÉTODOS.....	58
III. 2.1. ELETROFISIOLOGIA.....	58
III. 2.1.1. PREPARAÇÃO DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS.....	58
III. 2.1.2. PREPARAÇÃO DO MICROELETRODO.....	59

III. 2.1.3. EQUIPAMENTO E PROCEDIMENTO ELETROFISIOLÓGICO.....	61
III. 2.1.4. CÁLCULO DA INTENSIDADE DO PULSO APLICADO.....	62
III. 2.1.5. CÁLCULO DA RESISTÊNCIA DA MEMBRANA.....	63
III. 2.2. ISOLAMENTO DE CÉLULAS DE SERTOLI.....	64
III. 2.3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	66
III. 2.3.1. EXPERIMENTOS COM CÉLULAS ISOLADAS.....	66
III. 2.3.2. EXPERIMENTOS COM TESTÍCULOS INTEIROS.....	68
III. 2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	69
IV. RESULTADOS.....	70
IV. 1. PARÂMETROS ELETROFISIOLÓGICOS BASAIS DAS CÉLULAS DE SERTOLI DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE TESTÍCULOS DE RATOS IMATUROS.....	70
IV. 2. REGISTRO ELETROFISIOLÓGICO DO POTENCIAL DE REPOUSO DE CÉLULAS DE SERTOLI DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE TESTÍCULOS DE RATOS IMATUROS EM CONDIÇÕES BASAIS.....	71
IV. 3. EFEITO DO KRb NO POTENCIAL DE REPOUSO DE CÉLULAS DE SERTOLI DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE TESTÍCULOS DE RATOS IMATUROS	71
IV. 4. EFEITO DA TESTOSTERONA NO POTENCIAL DE REPOUSO DE CÉLULAS DE SERTOLI DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE TESTÍCULOS DE RATOS IMATUROS.....	72
IV.5. EFEITO DO 17 β -ESTRADIOL E DA PROGESTERONA NO POTENCIAL DE REPOUSO DE CÉLULAS DE SERTOLI DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE TESTÍCULOS DE RATOS IMATUROS....	73

IV. 6. EFEITO DA TESTOSTERONA NO POTENCIAL DE REPOUSO DE CÉLULAS DE SERTOLI DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE TESTÍCULOS DE RATOS ENRIQUECIDOS EM CÉLULAS DE SERTOLI DE DIFERENTES ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO.....	75
IV. 7. EFEITO DA TESTOSTERONA NO POTENCIAL DE REPOUSO DE CÉLULAS DE SERTOLI DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE TESTÍCULOS DE RATOS IMATUROS.....	76
IV.8. AÇÃO DA GLIBENCLAMIDA E DA DIAZOZIDA NOS PARÂMETROS ELETROFISIOLÓGICOS DE CÉLULAS DE SERTOLI DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE TESTÍCULOS DE RATOS IMATUROS.....	78
IV. 9. EFEITO DA RETIRADA DO CLORETO (Cl ⁻) NA AÇÃO DA TESTOSTERONA NOS PARÂMETROS ELETROFISIOLÓGICOS DE CÉLULAS DE SERTOLI DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE TESTÍCULOS DE RATOS IMATUROS.....	81
IV. 10. EFEITO DO VERAPAMIL NA AÇÃO DA TESTOSTERONA NOS PARÂMETROS ELETROFISIOLÓGICOS DE CÉLULAS DE SERTOLI DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE TESTÍCULOS DE RATOS IMATUROS.....	82
IV. 11. EFEITO DA TESTOSTERONA NO TRANSPORTE DE ⁴⁵ Ca ²⁺ EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DE DIFERENTES ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO.....	83
IV. 12. EFEITO DA TESTOSTERONA NO TRANSPORTE DE [¹⁴ C]MEAIB EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DE DIFERENTES ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO.....	85
V. DISCUSSÃO.....	86
VI. CONCLUSÕES.....	106
VII. BIBLIOGRAFIA.....	108
VIII. ARTIGOS PUBLICADOS.....	124

LISTA DE FIGURAS

Figura I.1	Diagrama esquemático mostrando os componentes do sistema reprodutor masculino humano.....	1
Figura I.2.	Representação esquemática do desenvolvimento dos dutos genitais masculinos e femininos.....	2
Figura I.3.	Biologia celular do testículo.....	3
Figura I.4.	Representação artística do testículo de rato e humano.....	4
Figura I.5.	Desenho esquemático da síntese de hormônios esteróides à partir do colesterol.....	10
Figura I.6.	Mecanismo de ação genômico de andrógenos numa célula alvo.....	14
Figura I.7.	Representação esquemática da membrana plasmática com canais de sódio, potássio e cloro, a bomba $\text{Na}^+ -\text{K}^+$ ATPase e a distribuição assimétrica dos íons e ânions orgânicos impermeáveis através da membrana.....	21
Figura I.8.	Aspectos temporais da sinalização de Ca^{2+}	27
Figura I.9.	Representação das concentrações de Ca^{2+} livre nos diferentes compartimentos celulares.....	30
Figura I.10.	Topologias de membrana e principais características dos subtipos de canais de potássio K_v e K_i	41
Figura I.11.	Fórmula molecular da Glibenclamida.....	46
Figura I.12.	Fórmula molecular da Diazoxida.....	46
Figura III.1.	Câmara de perfusão com túbulos seminíferos fixados ao fundo.....	58
Figura III.2.	Processo de obtenção de suspensão enriquecida em células de Sertoli.	65
Figura III. 3.	Representação esquemática do procedimento experimental para estudo da captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$	67

Figura IV-1	Registro eletrofisiológico de uma célula de Sertoli de túbulos seminíferos de testículo de rato imaturo.....	71
Figura IV-2	Efeito da aplicação tópica sobre o potencial de membrana de células de Sertoli de rato de 17 dias.....	72
Figura IV-3	Efeito da testosterona sobre o potencial de membrana de células de Sertoli de rato de 17 dias.....	73
Figura IV-4	Efeito do 17 β -estradiol sobre o potencial de membrana de células de Sertoli de rato de 17 dias.....	74
Figura IV-5	Efeito da progesterona sobre o potencial de membrana de células de Sertoli de rato de 17 dias.....	74
Figura IV-6	Efeito da testosterona sobre o potencial de membrana de células de túbulos seminíferos de testículos SCE de ratos de diferentes estágios de maturação.....	75
Figura IV-7	Seqüência esquemática de tempo das respostas do potencial de membrana a diferentes doses de testosterona.....	76
Figura IV-8	Efeito de diferentes doses de testosterona no potencial de membrana (A) e resistência de membrana (B) em 30 segundos.....	77
Figura IV-9	Efeito da glibenclamida sobre o potencial de membrana de células de Sertoli de rato de 17 dias.....	78
Figura IV-10	Ação da glibenclamida (10 μ M) no potencial de membrana e resistência da membrana de células de Sertoli em 1 minuto.....	79
Figura IV-11	Ação da diazoxida (400 μ M) no potencial de membrana de células de Sertoli e seu efeito preventivo na ação da testosterona (10 μ M).....	80
Figura IV-12	Modificação produzida no potencial de repouso pela diazoxida (400 μ M), pela testosterona (10 μ M) e pela diazoxida + testosterona....	80
Figura IV-13	Ausência de efeito da falta de Cl ⁻ na ação despolarizante da testosterona (10 μ M) em células de Sertoli.....	81
Figura IV-14	Ação do verapamil (2,5 μ M) no potencial de membrana de células de Sertoli e seu efeito amenizador na ação da testosterona (10 μ M).....	82

Figura IV-15	Efeito da testosterona, em porcentagem, na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em células de Sertoli isoladas de ratos de diferentes idades.....	84
Figura IV-16	Ação da testosterona (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) no transporte de [^{14}C]MeAIB em testículos de ratos de diferentes idades.....	85
Figura V-1	Desenho esquemático da hipótese da ação da testosterona.....	105

LISTA DE TABELAS

Tabela III-1.	Composição salina e concentrações presentes nas soluções estoque de KRb e na solução final.....	54
Tabela IV-1.	Potencial de repouso (E_m) e resistência elétrica (R) das células de Sertoli.....	70
Tabela IV-2	Ação da testosterona ($10\mu\text{G}/\text{mL}$) na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em células de Sertoli isoladas de ratos de diferentes idades.....	83

Lista de Abreviaturas

μCi	micro Curie
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
A	Ampère
AIB	ácido aminoisobutírico
ATP	adenosina trifosfato
CCDV	canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem
DNA	ácido desoxirribonucléico
Em	potencial de repouso
EP	erro padrão
FSH	hormônio foliculo estimulante
g	Gramas
GnRH	hormônio liberador de gonadotrofinas
Hz	Hertz
I	Corrente
IP_3	inositol trifosfato
K^+_{ATP}	canal de potássio sensível ao ATP
KRb	Krebs Ringer bicarbonato
L	Litros
LH	hormônio luteinizante
M	Molar
$\text{M}\Omega$	mega ohms
mCi	mili Curie
MeAIB	ácido metilaminoisobutírico
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmol	Milimol

mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
ms	Milisegundo
mV	Milivolt
nA	Nanoampère
nm	Nanômetro
PKC	proteína quinase C
R	resistência elétrica
RA	receptor nuclear de andrógenos
SCE	enriquecido em células de Sertoli
seg	Segundo
TM	relação tecido/meio
ΔV	diferença de potencial

I. INTRODUÇÃO

I. 1. SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO

I. 1.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS

O sistema reprodutor masculino é formado pelos testículos, cada qual com seu sistema de ductos (ductos eferentes, epidídimo, canal deferente e ducto ejaculador), pelas glândulas acessórias (vesículas seminais, próstata e glândulas bulbouretral) e pelo pênis.

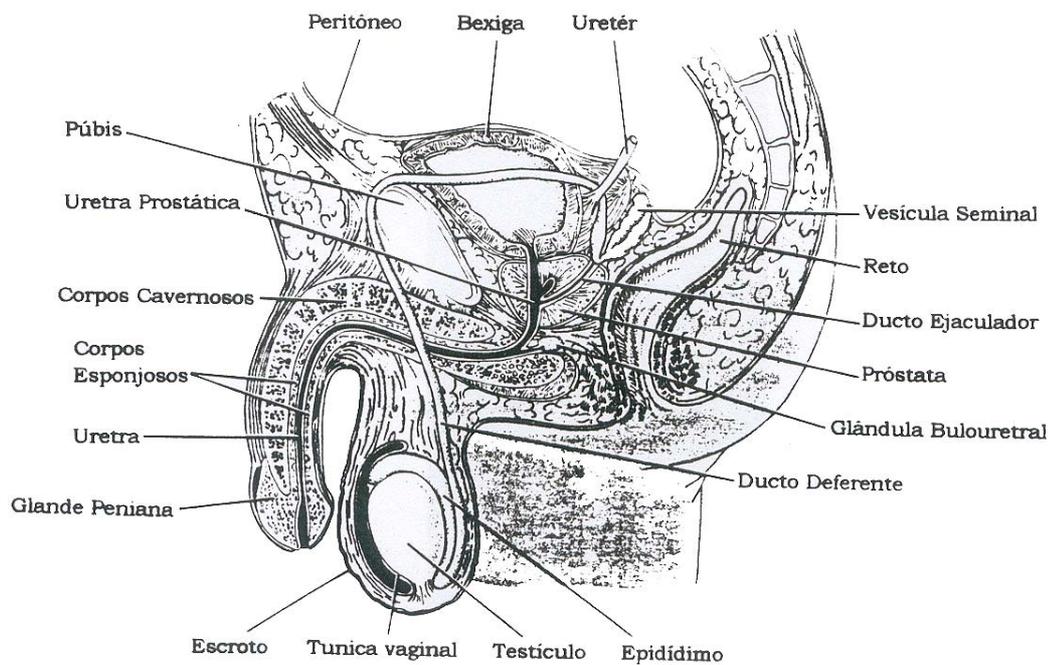


Figura I.1 Diagrama esquemático mostrando os componentes do sistema reprodutor masculino humano (ROSS *et al.*, 1995)

Durante o início do desenvolvimento embrionário em mamíferos, não há sexo fenotípico aparente. Embriões machos e fêmeas têm um conjunto duplo de dutos genitais rudimentares, e gônadas indiferenciadas que podem desenvolver-se em testículos ou ovários. A formação dos testículos inicialmente não é dependente de gonadotrofinas ou hormônios esteróides, e sim das atividades de células pré-Sertoli (que pode incluir a secreção de um fator que ativa a diferenciação das células de Leydig) e de células mióides peritubulares (MINTZ & RUSSELL, 1955; MERCHANT, 1975; McCOSHEN, 1982). No entanto na série de eventos que se seguem à determinação e diferenciação de testículos, a testosterona produzida pelas células de Leydig e o hormônio anti-Mülleriano produzido pelas células de Sertoli são de importância crítica no desenvolvimento das características masculinas primárias (e mais tarde secundárias), incluindo o papel proeminente da testosterona na iniciação da espermatogênese na puberdade e manutenção da espermatogênese no adulto.



Figura I.2. Representação esquemática do desenvolvimento dos dutos genitais masculinos e femininos. No estágio indiferenciado, as gônadas bipotenciais são formadas juntamente com os dutos de Wolff e de Müller. No macho, as gonadas se desenvolvem em testículos que secretam hormônio anti-Mülleriano (AMH) e testosterona. O AMH causa a regressão dos dutos de Müller, enquanto a testosterona estimula o desenvolvimento e diferenciação dos ductos de Wolff em epidídimo, os dutos deferentes e a vesícula seminal. Na fêmea, a falta de secreção de testosterona resulta na regressão dos dutos de Wolff, enquanto a falta do AMH resulta no desenvolvimento dos dutos de Müller em trompas de Falópio, útero e a parte superior da vagina (van ROIJEN, 1999).

Os testículos são órgãos pareados, ovóides, encapsulados por uma forte membrana fibrosa chamada túnica albugínea. Desenvolvem-se dentro da cavidade abdominal e, no homem, migram um pouco antes do nascimento do seu local de origem para o escroto. O mesenquima testicular pode ser grosseiramente dividido em dois principais compartimentos: o espaço intersticial e os túbulos seminíferos. O espaço intersticial contém células de Leydig, macrófagos, vasos sanguíneos e fluido linfático. A parede externa dos túbulos seminíferos é formada por células mióides peritubulares e células endoteliais. A lâmina basal (ou membrana basal) cobre a parede externa do túbulo. Sobre a membrana basal situam-se as células germinais tronco (espermatogônia) e as células de Sertoli. Extensões citoplasmáticas das células de Sertoli formam uma matriz estrutural altamente organizada dentro da qual a espermatogônia se desenvolve em espermatozóide maduro (SERTOLI, 1865).

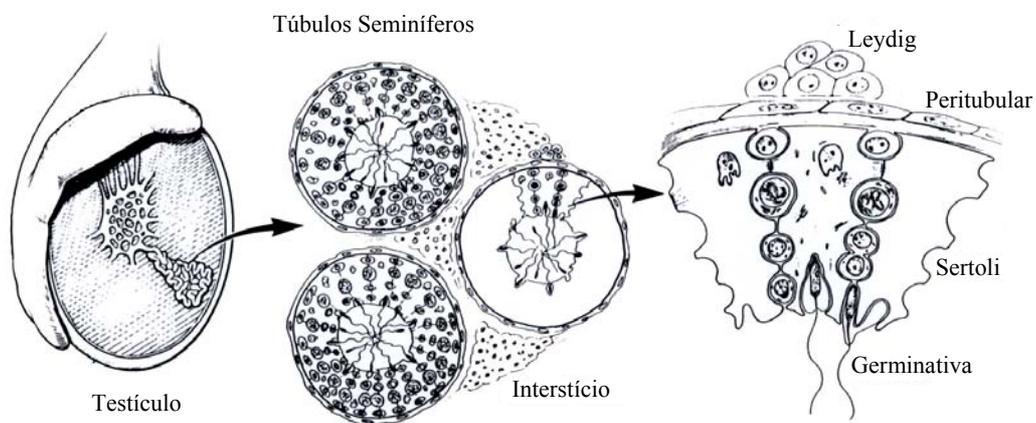


Figura I.3. Biologia celular do testículo. (SKINNER, 1991)

Células de Sertoli não apenas provêem suporte estrutural, mas têm também um importante papel no suporte de processos bioquímicos das células germinativas (RUSSEL,

1993). O instrumento para esse suporte é a barreira “hemato-testicular” ou “barreira de células de Sertoli” formada por complexos de junções ocludentes entre células de Sertoli adjacentes. (DYM & FAWCETT, 1970; RUSSEL & PETERSON, 1985). Essa barreira, impermeável às moléculas hidrofílicas maiores, divide o túbulo em um compartimento basal e um adluminal.

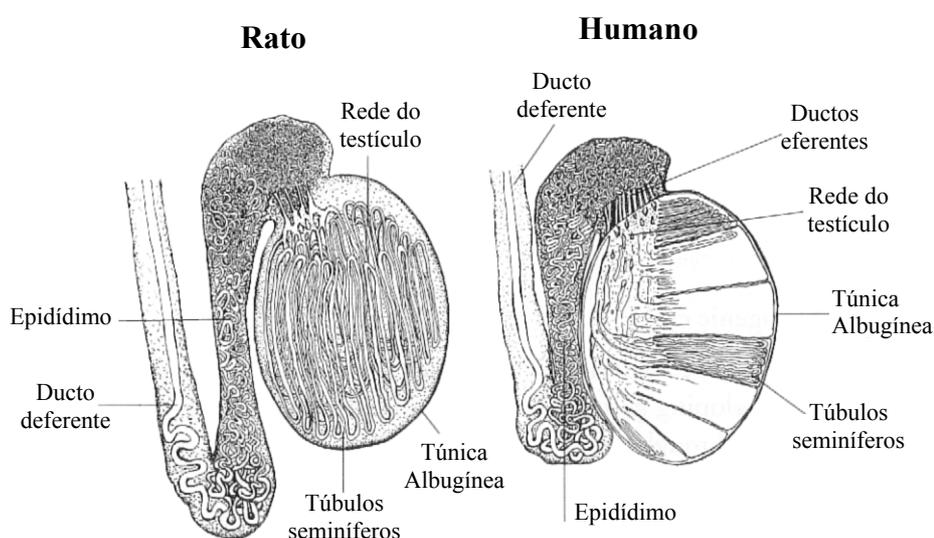


Figura I.4. Representação artística do testículo de rato e humano. O testículo de ambos, rato e humano, consiste de uma túnica albugínea fibrosa, que encapsula um grande número de túbulos seminíferos. O testículo humano é dividido em lóbulos, por numerosas partições fibrosas dentro do testículo. Estas partições estão ausentes no testículo de rato. Os túbulos seminíferos se unem dentro da rede do testículo (rete testis), de onde o fluido seminífero e os espermatozóides são transportados para dentro do epidídimo através de vários ductulos eferentes. No rato, os ductulos eferentes rapidamente se unem num túbulo único altamente contorcido que forma todo o epidídimo, e mais distalmente o ducto deferente. No humano, uma rede mais complexa de túbulos é formada no epidídimo proximal, que se une num único túbulo epididimal no caput distal. Este túbulo único subsequente forma o caput distal, o corpo e a cauda do epidídimo e o ducto deferente (VAN ROIJEN, 1999).

No compartimento basal residem apenas as espermatogônias e espermatídes em pré-leptóteno. As células que já entraram na prófase da meiose, começam a atravessar a barreira para alcançar o compartimento adluminal (RUSSELL, 1993). Centralmente dentro

do túbulo se localiza o lúmen tubular, que é preenchido com fluido seminífero tubular e espermatozóides. Todos os tubuli se unem na rete testis, de onde o conteúdo tubular é direcionado para dentro dos ductos eferentes e epidídimo.

I. 1.1.2. REGULAÇÃO FUNCIONAL DO TESTÍCULO

O testículo adulto tem duas funções primordiais: uma é sua função endócrina como uma glândula que produz testosterona, necessária para o desenvolvimento e manutenção de características sexuais masculinas primárias e secundárias. A outra envolve a produção de um imenso número de espermatozóides altamente especializados a partir de um pool de células tronco indiferenciadas (espermatogônias) que residem no compartimento basal dos túbulos seminíferos. O homem pode produzir 2×10^{12} espermatozóides ao longo de sua vida (GROOTEGOED, 1996). Isso não é apenas surpreendente pelos números, mas o testículo e o epidídimo cuidam do desenvolvimento e maturação das únicas células que são destinadas a viver e funcionar fora do corpo masculino. A dupla função do testículo, esteroidogênese e gametogênese é um processo finamente ajustado que envolve a interregulação de um considerável número de células.

I. 1.1.2.1. EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-TESTÍCULO

Este processo intrincadamente regulado antes mencionado, depende da secreção altamente controlada de um número de moléculas mensageiras (hormônios), cada uma delas gerando seus efeitos endócrinos, parácrinos e autócrinos específicos. Na base deste esquema de eventos está o eixo hipotálamo-hipófise-testículo. O hipotálamo secreta o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) que, através do sistema vascular porta,

alcança a hipófise estimulando a produção e secreção do hormônio luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH). O LH e o FSH se ligam a receptores transmembrana na membrana plasmática de diferentes tipos de células testiculares. As funções do hipotálamo e da hipófise são regulados via mecanismo de 'feed-back', onde a testosterona (produzida pelas células de Leydig estimuladas pelo LH) inibe GnRH, e assim a secreção de LH e FSH, e a inibina (produzida sob o controle do FSH pelas células de Sertoli) inibe mais especificamente a secreção de FSH (SWERDLOFF & WANG, 1998).

A secreção do GnRH ocorre em intervalos periódicos resultando por sua vez, em liberação episódica das gonadotrofinas. A natureza pulsátil do sinal é importante para manter a atividade secretória do LH e do FSH, já que a infusão contínua do GnRH diminui a secreção desses hormônios por gerar dessensitização nas células gonadotrofas (WEISS *et al.*, 1995). Em homens adultos, os pulsos de LH ocorrem numa frequência de 8-14 pulsos/24h, variando muito em magnitude, enquanto o FSH apresenta uma menor amplitude, em parte por causa de sua meia-vida mais demorada na circulação (GRIFFIN, 1996).

O FSH e o LH são secretados pelas mesmas células na hipófise. Ambos são glicoproteínas compostas de duas cadeias polipeptídicas designadas α e β . Compartilham a mesma sub-unidade α com a tireotrofina (TSH) e com a gonadotrofina coriônica (hCG), sendo que as diferentes características funcionais desses hormônios são determinadas pelas subunidade β . É necessária a presença de ambas subunidade para que haja uma completa atividade biológica (GRIFFIN & WILSON, 1992).

Embora a maior parte das células gonadotrofas na hipófise sintetize tanto o FSH como o LH, sinais externos tais como a frequência do pulso do GnRH, proveniente do hipotálamo (o pulso de alta frequência favorece a síntese do LH) e a modulação através do mecanismo de retroalimentação ('feedback') com os esteróides sexuais e os peptídios

gonadais parecem ser importantes para diferenciar a regulação desses hormônios (SCHWARTZ, 1995)

I. 1.2. TESTOSTERONA

Nos machos os andrógenos são essenciais para o desenvolvimento e manutenção de tecidos reprodutivos específicos como testículos, próstata, epidídimo, vesícula seminal e pênis, bem como para outras propriedades masculinas características como, aumento da força muscular, crescimento de pêlos e barba, etc. Para manter a concentração de andrógenos em níveis apropriados, a produção de andrógenos deve ser balanceada com a taxa de “clearance” metabólico e excreção. A ação de andrógenos em células alvo depende da quantidade de esteróide que pode penetrar nas células, do nível de conversão metabólica dentro das células, da integração com as proteínas receptoras e finalmente, da ação dos receptores de andrógenos à nível genômico.

No homem, a testosterona é o principal andrógeno circulante. Mais de 95% é secretado pelo testículo, que produz aproximadamente 6-7 mg por dia. Os passos metabólicos necessários para a conversão do colesterol em andrógenos ocorre nas células de Leydig, que constituem apenas uma pequena percentagem do volume testicular total. Apesar das células de Leydig serem as principais geradoras dos hormônios andrógenos circulantes, o córtex adrenal contribui com a produção de andrógenos menos potentes. A produção de esteróides não é limitada às clássicas glândulas endócrinas, mas pequenos volumes também podem ser produzidos em células do cérebro. Apesar da contribuição das células no sistema nervoso para os níveis hormonais circulantes ser muito pequena, a produção local de esteróides pode ser fisiologicamente muito importante para ação local (ROMMERTS, 1998).

I. 1.2.1. REGULAÇÃO DA SÍNTESE DE ANDRÓGENOS PELO LH

Os hormônios hipofisários hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH) são necessários para o desenvolvimento e manutenção das funções testiculares. O LH é o hormônio mais importante para o controle da produção de testosterona pela célula de Leydig. Dentro do testículo, o receptor de LH é encontrado exclusivamente nas células de Leydig. Estudos estimam que o número de células de Leydig é de 18 a 34×10^6 por testículo de rato (KERR *et al.*, 1987; MENDIS-HANDAGAMA *et al.*, 1988), representando aproximadamente 3% do volume total do testículo (EWING & KEENEY, 1993). A hipófise secreta LH de modo pulsátil para dentro da corrente sanguínea, através da qual atinge as células de Leydig dentro do testículo. O LH se liga ao receptor transmembrana na superfície da célula, resultando em estimulação da proteína G e adenilil ciclase, aumentando a formação de cAMP. Em consequência, o cAMP ativa proteína quinase A, que por sua vez efetua a fosforilação de proteínas específicas. Mudanças observadas dentro da célula de Leydig sob estimulação com LH *in vitro* são: 1) depleção de gotículas de lipídios intracelulares que estocam esteres de colesterol, 2) estimulação da hidrólise de ésteres de colesterol para produzir colesterol livre, 3) mudanças em elementos do citoesqueleto 4) transporte de colesterol para a membrana mitocondrial interna, local onde se situa a enzima P450^{scc}, e 5) estimulação da síntese de RNA e proteínas (DUFAU, 1988; EWING & KEENEY, 1993).

O precursor da síntese de esteróides é o colesterol. Este substrato pode ser sintetizado *de novo* a partir do acetato, mas pode também ser transportado de lipoproteínas do plasma. Gotículas de lipídios intracelulares, que contém ésteres de colesterol também podem funcionar como estoques intracelulares de colesterol. O nível de contribuição da

síntese e do suprimento das lipoproteínas ou das gotículas de lipídeos, depende da espécie animal e do grau de estimulação da produção de esteróides.

Os hormônios esteróides contêm 21 ou menos átomos de carbono, enquanto o colesterol contém 27. O primeiro estágio na síntese de hormônios esteróides é a remoção de 6 carbonos da cadeia lateral do colesterol para a formação de pregnenolona (STRYER, 1996). Essa conversão de colesterol a pregnenolona foi por muitos anos considerada o passo limitante na esteróidogênese testicular. Recentemente no entanto têm-se observado que o real passo limitante é o transporte do colesterol da membrana externa da mitocôndria para a membrana interna da mitocôndria, onde a enzima P450_{sc} está situada (revisto em STOCCO, 1998). A partir da pregnenolona é formada a progesterona e a partir desta são sintetizados os androgênios, que contém 19 átomos de carbono.

A síntese e secreção da testosterona são as funções mais conhecidas e mais importantes das células de Leydig. Durante a vida fetal, um pulso de testosterona é responsável pela diferenciação do sistema reprodutivo masculino, e durante o período neonatal um pulso subsequente efetiva o 'inprinting' dos tecidos dependentes de andrógenos.

No período puberal, o aumento na produção de testosterona é responsável pelo desenvolvimento das características sexuais masculinas secundárias, comportamento sexual masculino e o início da espermatogênese. Durante a vida adulta, a testosterona é necessária para a manutenção das características masculinas secundárias bem como para a manutenção da densidade dos ossos do esqueleto (EWING *et al.*, 1980).

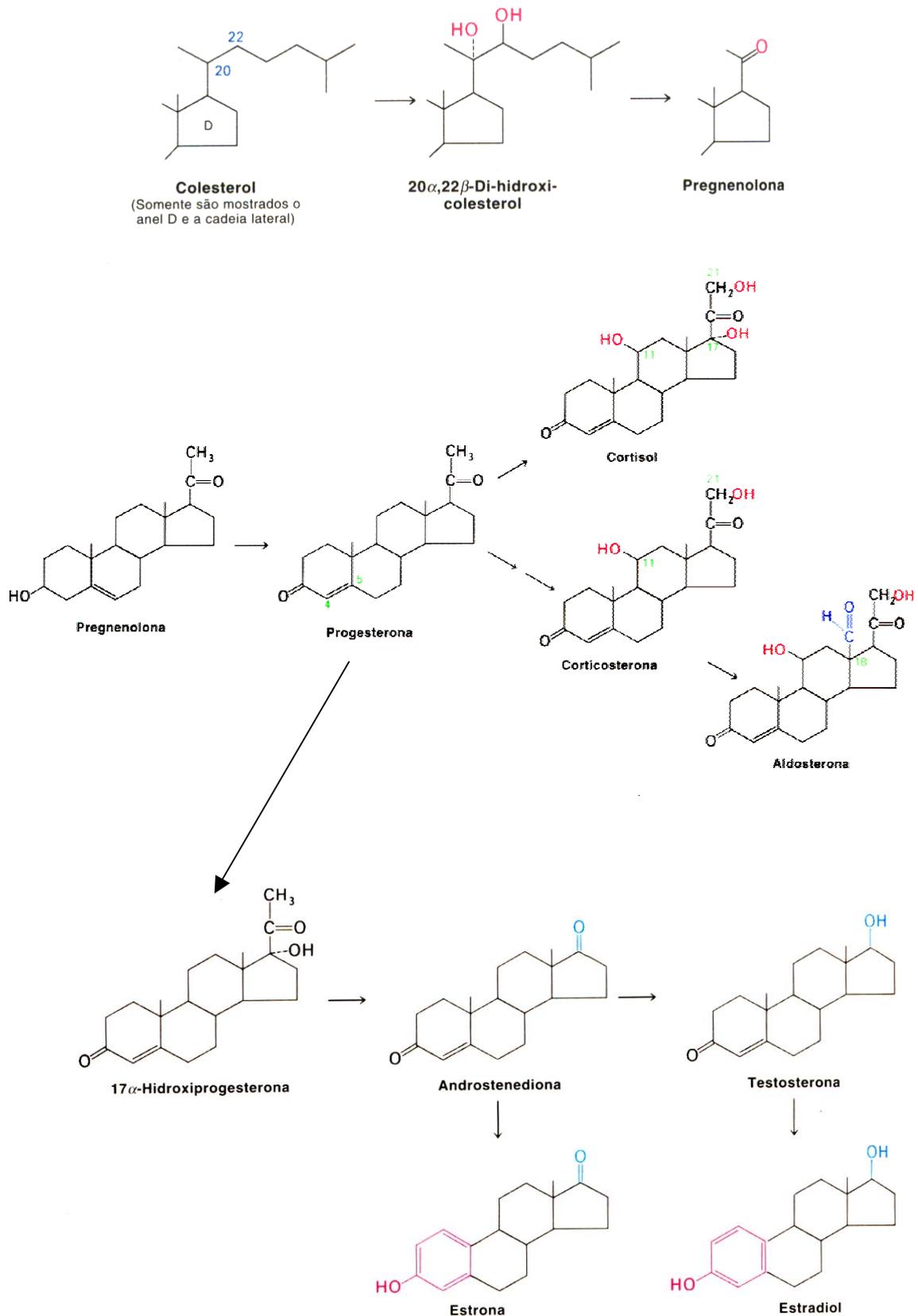


Figura I.5. Desenho esquemático da síntese de hormônios esteróides à partir do colesterol (STRYER, 1996).

O nível de esteróides biologicamente ativos no corpo é determinado pelas taxas de síntese e de degradação. Para manter uma concentração estável de esteróides numa célula alvo, deve haver um equilíbrio entre o suprimento e a sua retirada. No lado externo da célula alvo, esses fatores são: taxa de fluxo de fluidos biológicos (sangue e linfa), liberação das proteínas ligadoras, transporte através das membranas, camadas de células de tecido conectivo e às vezes inativação do esteróide durante o transporte. Dentro das células alvo, reações de ativação e inativação locais e transporte para fora da célula têm influência. Existem diversas possibilidades para o metabolismo da testosterona. A aromatização ou a redução da ligação Δ^4 da testosterona geram, respectivamente, 17β -estradiol e 5α -dihidrotestosterona. Esses esteróides têm atividades biológicas diferentes uma vez que interagem com receptores distintos nas células. Dessa forma as ações da testosterona em tecidos alvo são significativamente modulados por reações metabólicas.

I. 1.2.2. DISTRIBUIÇÃO E METABOLISMO DOS ANDRÓGENOS NO TESTÍCULO

A testosterona é de longe o andrógeno testicular mais proeminente. As células de Leydig não estocam testosterona, e sim, a testosterona se difunde rapidamente para dentro do compartimento intersticial (DE JONG *et al.*, 1974; SHARPE, 1994). Subseqüentemente a testosterona pode difundir-se para dentro da rede de capilares de onde entra na corrente sanguínea periférica, ou pode ser transportada para dentro do túbulo seminífero. Um grande esforço tem sido feito na última década para elucidar os níveis reais de testosterona no testículo em relação ao nível de testosterona que é necessário para iniciação e manutenção da espermatogênese. Um número de diferentes estratégias de medidas de níveis intratesticulares de testosterona levaram a resultados discordantes. O fluido

intersticial tem sido coletado usando-se uma série de técnicas (SHARPE, 1979; TURNER *et al.*, 1984; JARROW *et al.*, 2001), dando-nos uma idéia da concentração de testosterona no compartimento extratubular. Os valores obtidos variam largamente entre os autores, mas caem na margem de 60-600ng/mL (SHARPE, 1994; JARROW, P.J. *et al.*, 2001).

Técnicas de micropunção de testículos de ratos *in situ* obtiveram resultados semelhantes (COMHAIRE & VERMEULEN, 1976, JARROW, P.J. *et al.*, 2001). O conteúdo de testosterona nos túbulos seminíferos tem sido estimada entre 80-90 ng/mL (AWONIYI *et al.*, 1989; TURNER *et al.*, 1984; JARROW *et al.*, 2001). Esse valor é semelhante ao encontrado em testículos homogeneizados de ratos (50-62 ng/mL) (SHARPE, 1994). A concentração de testosterona circulante no rato é da ordem de 1-3 ng/mL, aproximadamente 20 vezes menor que o conteúdo de testosterona nos túbulos seminíferos. Uma série de estudos mediram o nível de testosterona no sangue venoso testicular, retirado de vasos que se encontram na superfície do testículo, contendo sangue que acabou de passar pelo interstício. A concentração de testosterona no sangue testicular venoso parece estar na faixa de 25-100 ng/mL. Apesar das concentrações encontradas no fluido intersticial e no sangue testicular venoso muitas vezes se sobrepõem, quando medidas no mesmo animal a concentração de testosterona no fluido intersticial é sempre 2 a 3 vezes maior do que no sangue testicular venoso (SHARPE, 1994). O sangue obtido da veia espermática (corda espermática) tem consistentemente uma concentração de testosterona por volta de 25-50% menor do que a encontrada nas veias testiculares (MADDOCKS *et al.*, 1993; SHARPE, 1994). Aparentemente quando o sangue venoso flui para cima na corda espermática, ele é diluído pelo sangue da artéria testicular através das anastomoses arteriovenosas (WENSING & DIJKSTRA, 1981; WENSING *et al.*, 1981; HEES *et al.*, 1984; NOORDHUIZEN-STASSEN *et al.*, 1985). O número de 'shunting' entre a artéria testicular e o plexo venoso é extremamente variável, tornando o sangue

espermático venoso uma fonte não confiável quando se está interessado na concentração testicular de testosterona.

O sangue venoso periférico fornece uma boa indicação da função das células de Leydig, mas não oferece uma boa visão na concentração intratesticular de testosterona (MADDOCKS & SHARPE, 1989; MADDOCKS *et al.*, 1993).

I. 1.2.3. FUNÇÕES GONADAIS DOS ANDRÓGENOS

Andrógenos testiculares são necessários para o desenvolvimento e manutenção das características sexuais masculinas, incluindo a função espermatogênica do testículo e maturação do espermatozoide no epidídimo. Em 1930 foi estabelecido que a remoção da glândula hipófise resultou em degeneração da espermatogênese no rato. Essa degeneração foi no entanto prevenida com a suplementação de testosterona em altas doses (SMITH, 1930). Desde então um número considerável de pesquisas têm focado a regulação hormonal da espermatogênese e maturação do espermatozoide, com particular interesse na ação dos andrógenos. Surpreendentemente, os resultados dessas pesquisas ainda deixam espaço para muitas questões e muita discussão. Investigadores ainda precisam elucidar através de qual mecanismo os andrógenos estão envolvidos na iniciação e manutenção da espermatogênese. Há um consenso geral de que o testículo precisa de um nível muito mais elevado de testosterona para seu pleno funcionamento do que os outros tecidos dependentes de andrógenos. O porquê dessa necessidade de altas doses de testosterona e exatamente qual a concentração de testosterona requerida para que a espermatogênese ocorra, ainda é assunto de debate. Assim sendo, o que sabemos sobre andrógenos e gametogênese masculina então?

I. 1.2.4. MECANISMO DE AÇÃO DA TESTOSTERONA

A maioria das ações dos hormônios androgênicos ocorre através da ativação direta da transcrição de DNA via interações de alta afinidade com o receptor nuclear de andrógenos (RA). Este receptor é membro da superfamília de fatores de transcrição dependentes de ligantes. Outros membros dessa família incluem os receptores para todos os hormônios esteróides, hormônio tireóideo, retinoides, vitamina D₃ e uma série de receptores sem ligante conhecido (receptores órfãos) (TSAI & O'MALLEY, 1994). Quando o ligante (testosterona ou diidrotestosterona) associa-se com o RA no citoplasma ou no núcleo, o RA se dissocia das 'heat-shock proteins' (hsp90 e hsp70), forma um

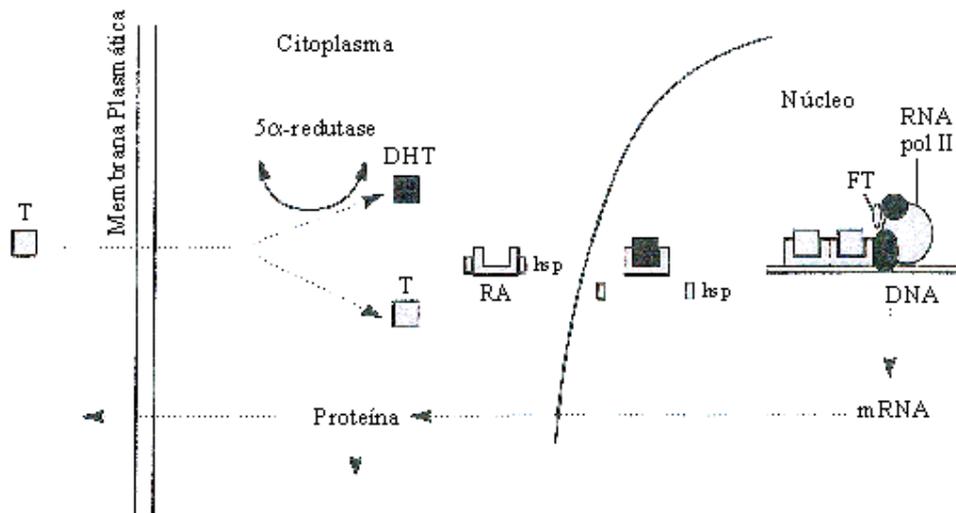


Figura I.6. Mecanismo de ação genômico de andrógenos numa célula alvo. Testosterona (T), difunde-se para dentro do citoplasma celular onde pode ser convertido à diidrotestosterona (DHT) pela enzima 5 α -redutase. Ambos, T e DHT podem se ligar ao receptor de andrógenos (RA) e ativá-lo. Ao ligar-se com o hormônio, o receptor de andrógenos se dissocia das 'heat shock proteins' (hsp), e se liga ao DNA como homodímero. FT= fator de transcrição; RNA pol II= RNA polimerase II (VAN ROIJEN, 1999).

dímero com uma segunda molécula de RA ativada e se liga a seqüência ‘enhancer’ específicas conhecidas como elementos responsivos a andrógenos presentes nas regiões 5’ adjacentes aos genes regulados por andrógenos (RIEGMAN *et al.*, 1991). Acredita-se que a ligação dos dímeros de RA aos elementos responsivos a andrógenos estabilize os fatores de transcrição nos promotores dos genes alvo, induzindo assim um alto nível de iniciação de transcrição (O’MALLEY & TSAI, 1992; JENSTER, 1998).

I. 2. EFEITOS NÃO GENÔMICOS DE ESTERÓIDES

Recentemente tem sido documentada uma variedade de efeitos rápidos não-genômicos de esteróides, geralmente envolvendo fluxo de íons, para ligantes como progesterona, estrógenos, corticosterona, aldosterona, andrógenos e vitamina D (DUVAL *et al.*, 1983; REVELLI *et al.*, 1998; CHRIST *et al.*, 1999).

Já foi reportada a presença de receptores funcionais não-genômicos de progesterona em espermatozoides humanos (LUCONI *et al.* 1998). Vários outros laboratórios também identificaram receptores de progesterona na membrana plasmática de oócitos de anfíbios (BRANN, *et al.*, 1995). A vitamina D3 produz uma hidrólise rápida, tempo dependente de esfingomiéline, resultando na geração de ceramida e fosforilcolina em células leucêmicas promielocíticas humanas HL-60, e a progesterona tem o mesmo efeito em oócitos de *Xenopus leavis* (OKAZAKI *et al.*, 1989; GOSH *et al.*, 1997).

O estrogênio pode disparar uma variedade de eventos de tradução de sinais, como a estimulação de cAMP, fluxo de cálcio, ativação da fosfolipase C, geração de inositol fosfato, bem como a rápida liberação de prolactina (RAZANDI, *et al.* 1999).

Tem-se demonstrado que também andrógenos induzem um rápido fluxo de cálcio numa variedade de tipos celulares classicamente dependentes de andrógenos. Fluxos de cálcio seguindo adição de concentrações picomolares de testosterona tem sido reportados em miócitos de coração de rato (KOENIG et al. 1989) e osteoblastos de ratos machos e de galinhas (LIEBERHERR & GROSSE 1994; ARMEN, 2000). STEINSAPIR e colaboradores (1991) demonstraram um aumento de cálcio intracelular em células de câncer de próstata humana após adição de 5 α -dihidrotestosterona e testosterona em dois minutos. Na maioria desses estudos pôde ser mostrado que fluxos de cálcio nas células foram causados por um influxo transmembrana de cálcio extracelular através da membrana plasmática.

A maioria desses efeitos não genômicos de esteróides poderia adicionar sinais complementares aos efeitos genômicos desses esteróides, mas há poucos exemplos onde os efeitos não genômicos dos esteróides são associados a respostas biológicas que não podem ser mediadas pelo mecanismo clássico de resposta aos esteróides. Sabe-se que a testosterona pode modificar a susceptibilidade de células-T à doenças infecciosas. Recentemente foram reportados efeitos da testosterona e da testosterona ligada à albumina sobre o fluxo de cálcio através da membrana plasmática de células-T (BENTEN *et al.*, 1997; BENTEN *et al.*, 1999). Uma vez que células-T não possuem o receptor clássico de andrógenos, esse efeito biológico indica o envolvimento de receptores de membrana plasmática para a expressão de efeitos de andrógenos. Um outro exemplo da ação não-genômica de andrógenos é a ativação rápida de receptores de membrana em neurônios do bulbo olfativo por concentrações nanomolares de androsterona (Δ 16-5 α -androsten-3-one) (ROMMERTS, 1998).

O fato da espermatogênese depender de altos níveis de testosterona é um bom exemplo da ação intratesticular de testosterona que não pode ser facilmente explicada baseando-se nas propriedades do receptor nuclear clássico. Já que os níveis de testosterona necessários para a manutenção da espermatogênese são muito maiores que o nível de saturação do receptor de alta afinidade de andrógeno, é possível que opere um sistema alternativo, diferente do receptor clássico (ROMMERTS, 1988; ROMMERTS, 1992).

I.3. CONCENTRAÇÃO IÔNICA E POTENCIAL DE REPOUSO

Na maioria das células, há uma diferença de potencial elétrico estável através da membrana plasmática, chamada de *potencial de repouso* (E_m). O potencial de repouso de uma célula é o potencial elétrico através da membrana plasmática na ausência de sinalizações. O potencial de repouso de uma célula é determinado, a qualquer momento, pela permeabilidade relativa a diferentes íons e pelos gradientes de concentração desses íons através da membrana. Ele é portanto mais próximo ao potencial de equilíbrio do íon para o qual a membrana é mais permeável. A bicamada lipídica que constitui a membrana plasmática é virtualmente impermeável a íons, funcionando como um isolante que separa duas soluções, o citoplasma e o líquido extracelular. Os íons apenas podem atravessar a bicamada lipídica difundindo-se através de canais iônicos específicos. Assim, a permeabilidade de uma membrana a um determinado íon depende do número de canais abertos para esse íon (SARGENT, 1992).

Os íons são distribuídos assimetricamente através da membrana celular. O citosol é rico em K^+ e em ânions orgânicos impermeáveis, constituídos basicamente por amino ácidos e proteínas. Já o fluido extracelular é rico em Na^+ e Cl^- (KANDEL *et al.*, 1995). A distribuição assimétrica de íons permeáveis resulta tanto da presença de ânions

impermeáveis quanto da bomba de Na^+/K^+ , que transporta Na^+ para fora da célula e K^+ para dentro (SARGENT, 1992).

I. 4. GRADIENTE ELETROQUÍMICO E BOMBA Na^+/K^+

Em células em repouso a permeabilidade da membrana ao K^+ é maior do que ao Na^+ , assim o K^+ tende a difundir-se de dentro para fora da célula, seguindo seu gradiente de concentração. Como resultado, a parte externa da membrana acumula cargas positivas devido ao pequeno excesso de K^+ e o interior acumula cargas negativas pela falta de K^+ e o conseqüente acúmulo de ânions. No entanto a difusão de K^+ para fora é auto-limitante, uma vez que a separação das cargas positivas e negativas, resultante dessa difusão de K^+ gera uma *diferença de potencial elétrico* através da membrana: positivo do lado de fora e negativo do lado de dentro. Quanto mais K^+ continua saindo, mais as cargas se separarão e maior será a diferença de potencial. A força elétrica resultante desse processo se opõe então à força do gradiente de concentração e impede que mais íons K^+ saiam. Num dado potencial, a força elétrica devido à separação de cargas se torna igual à força química na direção oposta (gradiente de concentração) e os íons K^+ fora da célula atingem um equilíbrio com os íons K^+ dentro da célula. Esse potencial é chamado *potencial de equilíbrio* do K^+ (E_K). Nesse potencial o movimento de íons K^+ para fora empurrado pelo seu gradiente de concentração (químico) é balanceado por um movimento igual e oposto de íons K^+ para dentro, empurrados pela diferença de potencial elétrico, ou seja, é atingido o equilíbrio eletroquímico desse íon (KANDEL *et al.*, 1995).

Como em células em repouso a permeabilidade da membrana ao K^+ é maior do que ao Na^+ , o potencial de membrana fica perto do potencial de equilíbrio para o K^+ .

No repouso há um fluxo constante de K^+ para fora da célula e um fluxo constante de Na^+ para dentro da célula. Apesar dessas correntes serem pequenas e não terem um efeito imediato sobre os gradientes de concentração, se perdurassem por horas ou dias, os gradientes de concentração diminuiriam e o potencial de membrana chegaria próximo a zero. No entanto o gradiente de concentração é mantido pela bomba Na^+/K^+ ATPase, que transporta Na^+ para fora e K^+ para dentro. O transporte ativo de Na^+ e K^+ pela bomba no entanto não é balanceado. Para cada molécula de ATP hidrolisada, três Na^+ são geralmente transportados para fora e dois K^+ são geralmente transportados para dentro.

Essa estequiometria desigual da bomba Na^+/K^+ tem três conseqüências importantes:

- 1) Como a bomba causa uma transferência líquida de cargas através da membrana, ela é *eletrogênica*. A corrente produzida pela bomba hiperpolariza a membrana e contribui para o potencial de membrana. A contribuição da bomba para o potencial de membrana depende da resistência elétrica da membrana, e na maioria das células é de 5 – 10mV.
- 2) Os movimentos passivos de Na^+ e K^+ são desiguais para que sejam mantidos os gradientes de concentração, ou seja, o influxo de Na^+ através de canais iônicos deve se igualar ao efluxo de Na^+ causado pela bomba da mesma maneira que o efluxo de K^+ deve se igualar ao influxo produzido pela bomba. Assim, no repouso, a corrente passiva para dentro de Na^+ é aproximadamente 1.5 vezes a corrente para fora de K^+ .
- 3) O balanço osmótico da célula. Apesar de os íons permeáveis, Na^+ , K^+ e Cl^- moverem-se passivamente através da membrana em resposta a forças elétricas e químicas, os grandes ânions internos não o fazem. Assim, numa célula sem bombas, os íons iriam se distribuir de uma maneira tal que o número de moléculas osmoticamente ativas dentro da célula seria maior que fora dela.

Com isso a água se moveria através de seu gradiente de concentração para dentro da célula. De fato, em células animais, a bomba Na^+/K^+ previne o influxo de água. Como mais Na^+ é bombeado para fora do que K^+ é bombeado para dentro, a bomba diminui a osmolaridade do fluido intracelular e equilibra o efeito dos ânions impermeáveis no citosol (SARGENT, 1992).

O cloreto é um íon abundante no fluido extracelular. No entanto, em muitas células o potencial de equilíbrio do cloreto (E_{Cl}) é muito próximo ao potencial de membrana. Em células que não possuem transporte ativo de cloreto, como fibras de músculo esquelético, o cloreto se distribui passivamente através da membrana de maneira a atingir o equilíbrio, ou seja: $E_{\text{Cl}} = \text{potencial de membrana}$. Se o potencial de membrana for alterado de maneira que o Cl^- não esteja mais em equilíbrio, o Cl^- se moverá através da membrana de maneira que seu gradiente de concentração equilibre o gradiente elétrico. Desta forma, o potencial de membrana determina o gradiente de concentração de Cl^- através da membrana, e não ao contrário. A permeabilidade ao cloreto é importante na determinação de quão facilmente a célula se despolariza (SARGENT, 1992)

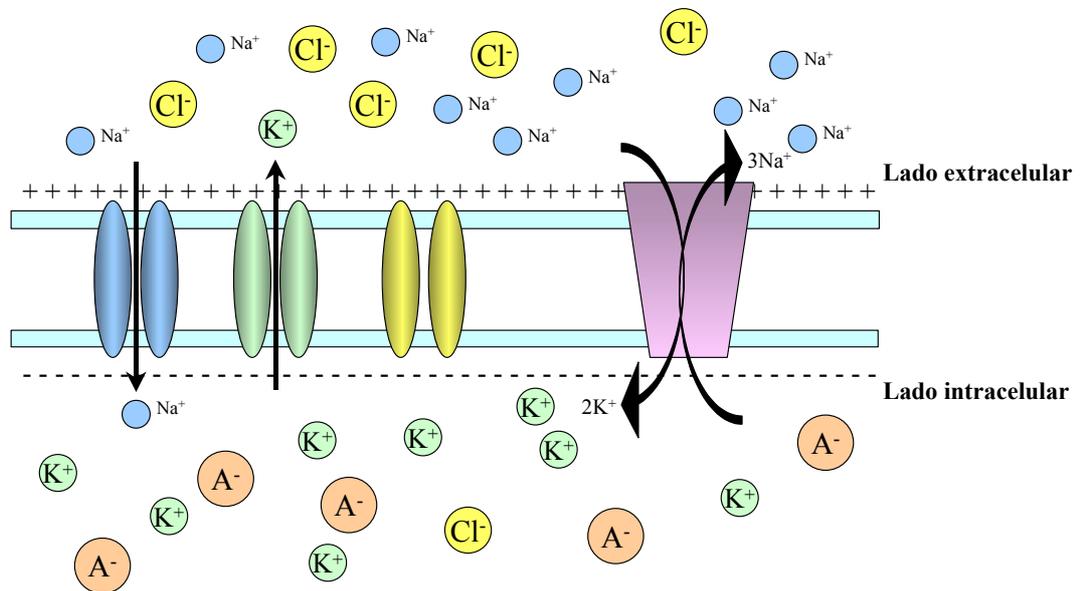


Figura I.7. Representação esquemática da membrana plasmática com canais de sódio (azul), potássio (verde) e cloro (amarelo), a bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPase}$ (lilás) e a distribuição assimétrica dos íons e ânions orgânicos impermeáveis (A^-) através da membrana. A $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPase}$ bombeia ativamente Na^+ para fora e K^+ para dentro da célula contra o seu gradiente eletroquímico. Em condições de equilíbrio, os fluxos de Na^+ e K^+ direcionados pela bomba são balanceados por correntes passivas desses íons através de canais específicos (Modificado de KANDELL, 1995).

I. 5.CANAIS IÔNICOS ATRAVÉS DA MEMBRANA CELULAR

A maior parte da membrana celular é quase completamente impermeável aos íons. Estes podem atravessá-la através de canais iônicos ou de transportadores, como a bomba Na^+/K^+ por exemplo. O fluxo de íons através de canais iônicos é passivo. A direção e o equilíbrio do fluxo iônico através de um canal não é determinado pelo canal, mas sim pela

força eletroquímica à qual um determinado íon é submetido. A força motriz eletroquímica é determinada por dois fatores: 1) a diferença de potencial elétrico através da membrana e 2) o gradiente de concentração do íon através da membrana.

Algumas células geram sinais elétricos periódicos de maneira autônoma, outras permanecem silenciosas até que sejam estimuladas. Esses sinais surgem da ação de várias combinações de canais iônicos, que são proteínas que atravessam a membrana plasmática. A abertura e o fechamento dos canais é altamente regulado, sendo que diferentes canais tem especificidades iônicas diferentes e diferentes modos de regulação. O gradiente de concentração iônico através da membrana é a base da energia para os sinais elétricos. Quando canais iônicos estão abertos, os íons se movem através do canal ao longo de seu gradiente eletroquímico. Seu movimento líquido através da membrana constitui uma corrente que altera o potencial de membrana e gera um sinal elétrico. A densidade, especificidade, modo de regulação e cinética dos canais iônicos na membrana determina suas propriedades elétricas e os sinais elétricos que vai gerar (SARGENT, 1992).

A maioria dos canais são altamente seletivos a apenas um tipo de íon que irá atravessá-los. Essa seletividade é baseada no tamanho, carga e hidratação dos íons. Todos os canais iônicos estudados até agora apresentam um ou mais estados conformacionais relativamente estáveis, ou seja, cada canal iônico tem pelo menos um estado aberto e um ou dois estados fechados. Alguns canais são regulados por ligantes químicos, que podem ser neurotransmissores ou hormônios no meio extracelular que se ligam ao lado extracelular do canal, ou podem ser segundo-mensageiros dentro da célula que atuam no lado citoplasmático do canal. Outros canais iônicos são influenciados por mudanças no potencial de membrana da célula e outros por estiramento mecânico ou pressão da célula. Alguns canais são regulados por mais de um desses três tipos de fatores. Um canal sob influência desses fatores reguladores pode então entrar em um dos três estados funcionais a

seguir: a-fechado e ativável (repouso) , b-aberto (ativo) e c-fechado e não ativável (refratário). Cada célula tem vários tipos de canais iônicos em suas membranas plasmáticas (KANDEL *et al.*, 1995). Contudo, os canais de cálcio e os de potássio dependentes de ATP serão analisados com maior ênfase por terem uma participação mais relevante neste trabalho.

I. 6. PRINCÍPIOS GERAIS SOBRE REGISTROS INTRACELULARES

Uma célula deriva suas propriedades elétricas primariamente das propriedades elétricas de sua membrana. Uma membrana por sua vez, adquire suas propriedades elétricas de seus lipídeos e proteínas, como os canais iônicos e transportadores. Existe uma *diferença de potencial elétrico* entre o interior e o exterior das células. Um objeto carregado (ion) ganha e perde energia conforme se move entre lugares de diferentes potenciais elétricos, da mesma maneira que um objeto com massa se move ‘para cima’ e ‘para baixo’ entre pontos com potencial gravitacional diferentes. Diferenças de potencial elétrico são normalmente denominadas como V ou ΔV e medidas em *volts* , por isso, potencial também é chamado de *voltagem*. A diferença de potencial através da célula relaciona o potencial do interior da célula com o da solução externa. O potencial da solução externa convencionou-se ser zero. Em outras palavras, o potencial de membrana (E_M), é definido como o potencial dentro da célula menos o potencial fora da célula e, como usualmente o potencial fora da célula é considerado zero, o potencial de membrana é simplesmente o potencial intracelular.

Diferenças de potencial entre dois pontos separados por um isolante são maiores do que as diferenças entre esses pontos separados por um condutor. Assim, a membrana lipídica, que é um bom isolante, tem uma diferença de potencial através dela. Essa

diferença de potencial (potencial transmembrana) é menor do que 0.1V, normalmente fica em torno de 30 a 90 mV em células animais, mas pode ser de até 150 – 200 mV em células vegetais. Por outro lado, as soluções ricas em sais do citoplasma e do sangue são condutores bastante eficientes, e portanto no equilíbrio, normalmente há apenas diferenças de potencial muito pequenas (raramente mais de poucos milivolts) entre quaisquer dois pontos dentro do citoplasma de uma célula ou dentro da solução extracelular.

Equipamentos eletrofisiológicos possibilitam que sejam medidas diferenças de potencial (voltagem) em sistemas biológicos. Potenciais de membrana podem ser medidos com microeletrodos de vidro, que são feitos de tubos capilares puxados para terem uma ponta muito fina e preenchidos com uma solução salina concentrada. Esse microeletrodo é conectado por um fio ao amplificador. Um fio de cloreto de prata também chega ao amplificador. Essa combinação de microeletrodo, fio de cloreto de prata e amplificador é uma ferramenta muito sensível para medir potenciais na região externa imediatamente adjacente à ponta do microeletrodo. Na prática, o amplificador é zerado com o fio de cloreto de prata e o microeletrodo fora da célula, ambos na mesma solução do banho, e então o microeletrodo é direcionado até que subitamente penetra através da membrana plasmática. Imediatamente o amplificador relata uma mudança negativa no potencial medido. Esse é o potencial de repouso da célula. Valores típicos ficam entre -40 e -100 mV (HILLE, 1992).

Equipamentos eletrofisiológicos também podem medir corrente, que é o fluxo de cargas elétricas passando por um ponto por unidade de tempo. *Corrente (I)* é medida em *ampères (A)*. Normalmente as correntes medidas por equipamentos eletrofisiológicos variam entre picoampères e microampères. Correntes fluem através de resistores e condutores. Os dois termos de fato são complementares, o primeiro indica as barreiras ao fluxo de corrente e o segundo indica os caminhos para a corrente. Em termos quantitativos

a resistência R (unidade: ohms (Ω)) é o inverso da condutância G (unidade: siemens (S)). Condutâncias lado a lado, ou seja, em paralelo, se somam (SHERMAN-GOLD, 1993).

Para eletrofisiologia, talvez a lei da eletricidade mais importante é a **lei de Ohm** que diz que a corrente (I) é igual ao produto da diferença de voltagem através do condutor (ΔV) e da condutância (G).

$$I = \Delta V \times G \quad \text{ou em termos de resistência:}$$

$$I = \Delta V / R$$

Alternativamente, a diferença de potencial (ΔV) entre dois pontos ligados por uma resistência R e uma corrente I é:

$$\Delta V = I \times R \quad \text{ou em termos de condutância:}$$

$$\Delta V = I / G$$

Os canais iônicos na membrana plasmática das células podem ser representados como resistores ou condutores em paralelo atravessando a membrana lipídica isolante. A condutância elétrica total da membrana é a soma de todas essas condutâncias unitárias em paralelo. É uma medida de quantos canais iônicos estão abertos, quantos íons podem passar por eles e com que facilidade os íons passam (HILLE, 1992).

I. 7. CÁLCIO CELULAR

Quase tudo que fazemos é controlado pelo Ca^{2+} - como nos movemos, como nossos corações batem e como nossos cérebros processam informações e guardam memórias. Para que tudo isso seja feito, o Ca^{2+} atua como um mensageiro intracelular, relacionando informações dentro das células para regular sua atividade. Por exemplo, Ca^{2+} inicia a vida

na fertilização e controla o desenvolvimento e diferenciação das células em tipos especializados. Ele media a atividade subsequente dessas células e finalmente, está invariavelmente envolvido na morte celular. Para coordenar todas essas funções, os sinais de Ca^{2+} devem ser flexíveis e ao mesmo tempo precisamente regulados. Essa versatilidade incrível se dá graças a possibilidade do íon de atuar nos diferentes contextos de espaço, tempo e amplitude (BERRIDGE *et al.*, 1998).

A nível celular o Ca^{2+} vem de duas fontes: externa e interna. Pode entrar de fora da célula passando por canais que atravessam a membrana plasmática ou pode ser liberado de estoques internos de Ca^{2+} , através de canais no retículo endoplasmático ou sarcoplasmático, redes membranosas que são também locais de síntese protéica e transporte.

Quando um canal de Ca^{2+} se abre, uma nuvem altamente concentrada de Ca^{2+} se forma ao redor de seu poro, dissipando-se rapidamente por difusão depois do canal se fechar. Esses sinais localizados, que podem se originar de canais na membrana plasmática ou nos estoques internos, representam os eventos elementares – as unidades básicas da sinalização com Ca^{2+} . As propriedades espaço-temporal desses eventos elementares, como os ‘sparks’ (picos) de Ca^{2+} e os ‘puffs’ (rajadas) de Ca^{2+} , diferem dependendo da natureza e localização dos canais. Caracterizando esses sinais, pode-se descobrir como o repertório de sinalização de Ca^{2+} é elaborado. Essencialmente, esses sinais elementares têm duas funções: eles podem ou ativar processos celulares altamente localizados nas proximidades imediatas dos canais, ou recrutando canais ao longo de toda a célula, podem ativar processos num nível global. Diferentes tipos celulares selecionam combinações de sinais elementares de Ca^{2+} com parâmetros precisos para encaixar-se em sua fisiologia .

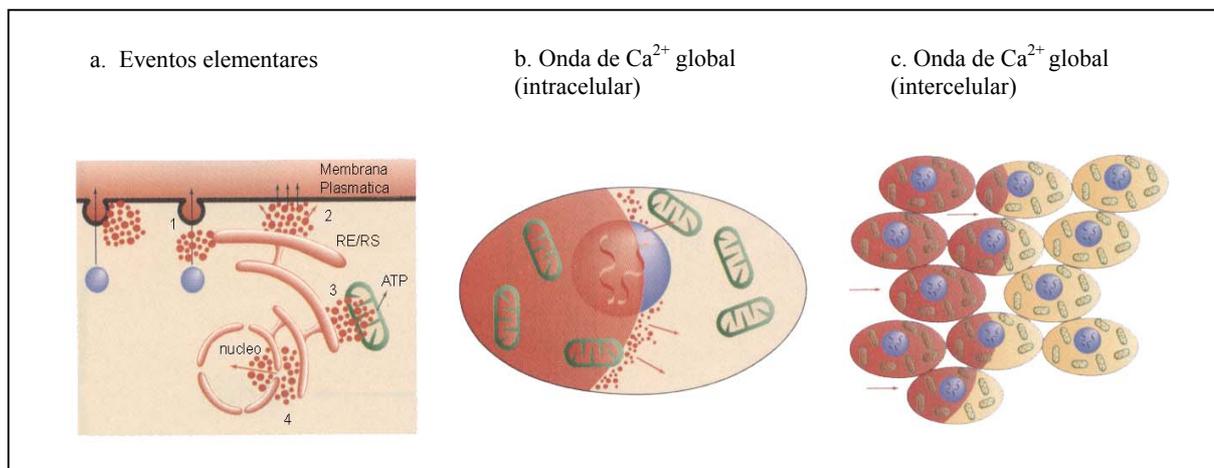


Figura I.8. Aspectos temporais da sinalização de Ca^{2+} . a., Eventos elementares (vermelho) resultam da entrada de Ca^{2+} externo através da membrana plasmática ou liberação de estoques internos no retículo sarcoplasmático ou endoplasmático. Eles geram concentrações localizadas de Ca^{2+} que podem ativar vários processos, incluindo exportação de material celular (1), abertura de canais de K^+ (2) e metabolismo na mitocôndria (3). Os sinais de Ca^{2+} também podem entrar no núcleo (4). Todos esses processos respondem a concentrações muito altas de Ca^{2+} que se formam dentro do sub-domínio dos eventos elementares. b., Sinais globais de Ca^{2+} são formados por coordenação da atividade de eventos elementares que produzem uma onda de Ca^{2+} através da célula. c., A atividade das células vizinhas dentro de um tecido pode ser coordenada por uma onda intercelular que é transmitida de uma célula à outra (BERRIDGE, *et al.*, 1998).

As propriedades espaço-temporais do aumento de Ca^{2+} intracelular, dependem da natureza e localização dos canais. A localização subcelular dos canais de Ca^{2+} é crucial para direcionar sinais elementares de aumento de Ca^{2+} intracelular para diferentes processos celulares. Por exemplo, em músculo liso ‘sparks’ de Ca^{2+} que surgem localmente perto da membrana plasmática, ativam canais de K^+ provocando o relaxamento muscular. No entanto, quando o aumento de Ca^{2+} intracelular se dá mais profundamente na célula, criando um sinal global de Ca^{2+} , o músculo se contrai. Este é um exemplo de como a organização espacial possibilita que o Ca^{2+} ative respostas celulares opostas na mesma célula (BERRIDGE *et al.*, 1998).

De uma maneira geral, os gradientes de concentração locais de Ca^{2+} podem ser agrupados em quatro categorias: 1) ondas de Ca^{2+} (isto é, aumentos que se originam num local específico da célula e se alastram através do citoplasma); 2) aumentos locais de Ca^{2+} que podem durar vários segundos e manterem-se restritos a uma parte da célula; 3) eventos altamente localizados, do tamanho de poucos microns, como os ‘puffs’ ou ‘sparks’ de Ca^{2+} e 4) microdomínios, na ordem de nanômetros, como aqueles gerados na boca dos canais de Ca^{2+} (ZACCOLO *et al.*, 2002).

Para que pontos de liberação de sinais elementares de Ca^{2+} produzam respostas globais, os canais individuais devem se comunicar entre si para gerar ondas de Ca^{2+} . Se as células forem conectadas, essas ondas intracelulares podem se alastrar para células vizinhas e transformar-se em ondas intercelulares que coordenam respostas celulares dentro de um tecido (BERRIDGE *et al.*, 1998).

Apesar das elevações de Ca^{2+} serem necessárias para que possa agir como um sinal, aumentos prolongados na concentração de Ca^{2+} podem ser letais. As células evitam a morte usando sinais de Ca^{2+} de baixa amplitude, ou mais freqüentemente, liberando os sinais de forma breve e transitória (‘transients’). Esses princípios se aplicam tanto aos sinais elementares como aos globais. Os ‘transients’ únicos são usados para ativar certos processos celulares, como secreção de material celular de vesículas ligadas à membrana ou contração muscular. No entanto, quando a informação deve ser mantida por períodos mais longos de tempo, as células usam sinais repetitivos, conhecidos como oscilações de Ca^{2+} . Tanto os eventos elementares como os sinais globais podem oscilar, mas eles têm períodos bem diferentes. Por exemplo, enquanto o período de ‘sparks’ elementares de Ca^{2+} em músculo arterial liso é de 0.1-0.5 segundos, ele é de 10-60 segundos para ondas globais em células do fígado, 1-35 minutos para ondas de Ca^{2+} em ovos humanos após a fertilização, e 10-20 horas para os ‘transients’ espontâneos de Ca^{2+} que controlam a divisão celular.

As células usam frequência modulada (FM) para variar a intensidade e natureza da resposta fisiológica. Por exemplo, as artérias podem se dilatar quando a frequência dos ‘sparks’ de Ca^{2+} é aumentada, o que leva o músculo liso que recobre a artéria a se relaxar. Além disso, variando-se a frequência dos sinais de Ca^{2+} globais, diferentes genes podem ser ativados. Para usar a sinalização por FM, as células desenvolveram decodificadores que respondem à frequência e longevidade dos sinais de Ca^{2+} . O mais bem conhecido exemplo é provavelmente a enzima chamada proteína-quinase II dependente de calmodulina. Ela é encontrada tanto em células animais como vegetais e regula outras enzimas que dependem do Ca^{2+} . Ela funciona “contando” os sinais breves e transitórios de Ca^{2+} e variando sua atividade de maneira correspondente. A enzima é composta de muitas subunidades idênticas, e essas são ativadas em diferentes graus, dependendo da frequência das oscilações de Ca^{2+} (BERRIDGE *et al.*, 1998).

Além dos sinais de Ca^{2+} serem altamente regulados, sua distribuição nos diversos compartimentos celulares também o é, pois como já foi mencionado, o Ca^{2+} livre em altas concentrações leva à morte celular. O gradiente de concentração de Ca^{2+} existente através da membrana plasmática é de 10.000 vezes, quando considerado o cálcio livre. A manutenção deste gradiente depende de diversos fatores relacionados com a movimentação do íon na membrana plasmática e na membrana de organelas que são capazes de armazenar o cálcio. Os compartimentos e a concentração de Ca^{2+} livre ou ligado a proteínas estão representados na figura I.9 (RASMUSSEN & BARRET, 1988).

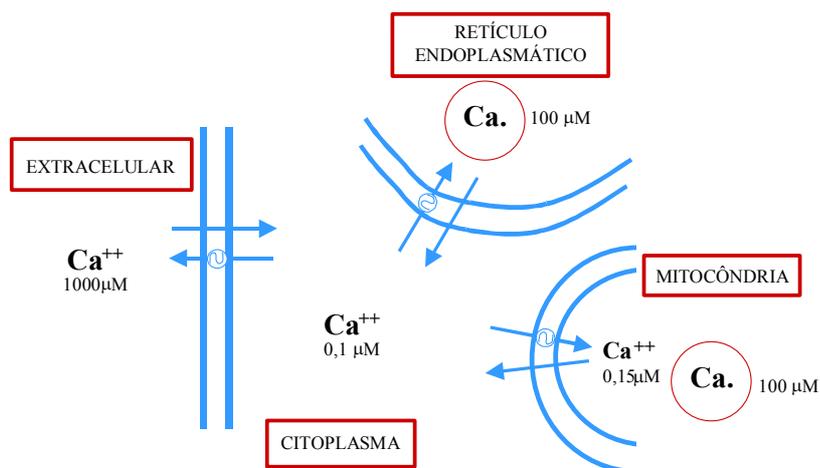


Figura I.9. Representação das concentrações de Ca^{2+} nos diferentes compartimentos celulares. Ca^{++} - cálcio livre; Ca. - cálcio liga à proteínas.

Em cada membrana há 1) um fluxo passivo de cálcio a favor do gradiente de concentração e 2) um bombeamento no sentido inverso, dependente de energia.

Como o gradiente de concentração de Ca^{2+} é muito alto na membrana plasmática, é necessário manter baixa a concentração de Ca^{2+} intracelular com gasto de energia. A energia necessária para manter este gradiente representa menos de 1% do consumo basal de energia da célula. O baixo consumo é devido ao fato de a permeabilidade da membrana ao Ca^{2+} ser muito baixa. Sua entrada na célula está restrita a canais específicos que são controlados por diversos fatores. As características destes canais serão discutidas mais adiante.

A célula, quando ativada por um hormônio ou transmissor, aumenta de 2 a 4 vezes a taxa de influxo de Ca^{2+} através dos canais de Ca^{2+} na membrana plasmática. Este influxo leva a um aumento transitório da concentração intracelular de Ca^{2+} , gerando assim, um

sinal mensageiro, como já foi descrito acima. Para manter a homeostase do Ca^{2+} no citoplasma, as membranas plasmática, do retículo endoplasmático e das mitocôndrias contém um sistema autorregulatório que bombeia o Ca^{2+} para fora do citoplasma, reduzindo assim sua concentração citoplasmática.

Na membrana plasmática existem pelo menos dois tipos de mecanismos dependentes de energia que bombeiam o Ca^{2+} para fora da célula. O primeiro é o sistema de troca $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$, que utiliza o gradiente de Na^+ através da membrana (mantido pela atividade da bomba de Na^+) para dirigir o efluxo de Ca^{2+} . Este sistema apresenta uma estequiometria de 3Na^+ para 2Ca^{2+} . Este sistema opera com alta capacidade e baixa afinidade, sendo importante para dirigir grandes quantidades de Ca^{2+} para fora da célula, e ocorre principalmente nas células eletricamente excitáveis. O segundo sistema é a bomba Ca^{2+} -ATPase, que é caracterizado por ter baixa capacidade e alta afinidade. Este sistema é relevante na manutenção da homeostase intracelular. Esta bomba de Ca^{2+} é regulada por diversos fatores. O aumento da concentração citoplasmática do Ca^{2+} leva ao aumento da atividade da bomba, com gasto de energia. Sua atividade é modulada principalmente através da ativação da calmodulina (PETERSEN *et al.*, 1994).

No retículo endoplasmático o Ca^{2+} é capturado para ser armazenado ligado a proteínas. Nesta membrana o fluxo de Ca^{2+} é feito também através de uma bomba de Ca^{2+} -ATPase. Já a liberação do Ca^{2+} de seu estoque é feita principalmente através de canais de Ca^{2+} induzidos por inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3). Esta liberação é controlada por hormônios que ativam o metabolismo do IP_3 (TSE *et al.*, 1994).

A mitocôndria têm um papel secundário na homeostase do Ca^{2+} celular. Sua função se restringe a um depósito em momentos em que ocorre excessiva captação de Ca^{2+} pela célula. A concentração de Ca^{2+} livre na matriz é semelhante à do citoplasma quando a célula está em repouso e aumenta em função do aumento da concentração do Ca^{2+}

citoplasmático. O movimento do íon se faz através de um uniporte dirigido por um gradiente próton-eletróquímico na membrana.

I.8. CANAIS DE CÁLCIO

Existe uma grande diversidade de canais de cálcio, caracterizados por diferenças fundamentais nos mecanismos que governam sua abertura e fechamento. Alguns canais se abrem quando um neurotransmissor ou um hormônio ocasiona variações na diferença de potencial elétrico através da membrana e são denominados canais de cálcio dependentes de voltagem (CCDV). Outros se abrem quando o ligante interage com o receptor de membrana celular associado a canais de membrana e são chamados canais de cálcio ligados ao receptor. Neste caso, a abertura dos canais pode se dar pela ação de segundos mensageiros, pela fosforilação do canal, por ação da proteína G, pelo próprio Ca^{2+} intracelular ou pela ligação direta do hormônio ou neurotransmissor ao próprio canal.

I. 8.1. CANAIS DE CÁLCIO LIGADOS AO RECEPTOR

A atividade dos canais de Ca^{2+} ligados ao receptor está relacionada com a ativação direta do canal iônico através da ligação do receptor com o hormônio. Estes canais geralmente têm uma cinética rápida e como exemplo pode ser citado o receptor nicotínico da acetilcolina ou do GABA_A (DOLPHIN, 1991). Tem-se descrito também um fluxo de cálcio independente da voltagem na ativação de α -adrenoceptores e de receptores de aminoácidos excitatórios (SPEDDING & PAOLETTE, 1992). O receptor do glutamato está diretamente associado a dois tipos de canais catiônicos não-seletivos: p AMPA (ácido

S α - amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazopropiônico) e o NMDA (ácido N-metil-D-aspartico), envolvidos na transmissão sináptica (JONAS, 1993).

Pouco é conhecido sobre a biologia molecular de canais seletivos ao Ca²⁺ associados ao receptor. Sua ativação pode ser direta, com a ligação do hormônio a seu receptor, ou pode ser regulada pela intermediação da proteína G, ou por eventos de fosforilação e defosforilação do canal (HOSEY & LAZDUNSKI, 1988). Entretanto tem-se apontado cada vez mais que os eventos de regulação através da proteína G e de fosforilação do canal servem como intermediário sobre a ativação de canais de cálcio dependentes de voltagem (WICKMAN & CLAPMAN, 1995; XIONG, *et al.*, 1994).

I. 8.2. CANAIS DE CÁLCIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM

Os canais de cálcio dependentes de voltagem (CCDV) fazem parte de uma grande família de canais que consistem em proteínas de membrana cuja atividade é modulada pela variação do potencial de membrana. Os canais sensíveis à voltagem podem existir em três estados funcionalmente distintos: fechados, abertos e inativos. Tanto o estado fechado como o inativado não são condutores. Os CCDV podem ser inativados por uma despolarização prolongada quando se tornam refratários (CATTERRAL, 1995). Apesar da predominância do controle do canal ser a modificação do potencial da membrana, esta sensibilidade pode ser modificada por alguns fatores como: a fosforilação do canal, a ligação de uma proteína G ao canal e a ligação de fármacos com afinidade específica aos canais. Por isso deve-se tomar cuidado quanto à classificação em relação à faixa de voltagem no qual o canal é ativado pois, esta sensibilidade pode variar em função dos fatores supra citados (SPEDDING & PAOLETTE, 1992)

A descrição inicial de correntes de Ca^{2+} no miocárdio por REUTER (1967) iniciou uma série de trabalhos para definir as propriedades dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem. TSIEN e colegas (1990) identificaram eletrofisiologicamente e farmacologicamente diferentes canais que foram chamados tipo L (para “long lasting”; de longa duração) tipo T (para “transient, tiny”; transitório, minúsculo) e tipo N (para neuronal, nem L nem T). Subseqüentemente, LLINAS e colegas (1989) mostraram evidências da existência de canais de cálcio voltagem dependentes com alto limiar de ativação que foram chamados de canais tipo P (para células de Purkinje) (SPEDDING & PAOLETTI, 1992).

Canais de cálcio dependentes de voltagem, causam um rápido influxo de Ca^{2+} para dentro das células quando a membrana é despolarizada. Eles têm um papel importante em neurônios, músculo esquelético, cardíaco e liso, mas também em células não excitáveis como células endócrinas, linfócitos e espermatozóitos. Esses canais estão envolvidos em eventos sinápticos de transmissão de sinais, acoplamento excitação-contração, acoplamento excitação-secreção, função marcapasso, crescimento celular, proliferação celular e apoptose (STAES *et al.*, 2001).

Baseados em suas propriedades eletrofisiológicas e farmacológicas, os canais de cálcio dependentes de voltagem podem ser funcionalmente classificados em seis classes de correntes de Ca^{2+} designadas L-, N-, T-, P/Q-, e R- (TSIEN *et al.* 1991; HOFMANN *et al.*, 1999). Os canais de cálcio consistem de complexos de uma subunidade formadora de canal - α_1 com subunidades α_2 , δ , β e γ . Canais de Ca^{2+} que contém subunidade $\text{Ca}_v2.2$ α_1 (antigamente chamada de α_{1B}) são responsáveis por correntes tipo N, e canais de Ca^{2+} contendo subunidade $\text{Ca}_v2.1$ α_1 (antigamente chamada de α_{1A}) são responsáveis pelas correntes de Ca^{2+} tipo P e Q (HERLITZE *et al.*, 2001).

I. 8.2.1. CANAIS DO TIPO L

Canais do tipo L são amplamente distribuídos nos tecidos, particularmente no coração e músculo liso. Estes canais são caracterizados por serem ativados por faixas de alta voltagem e inativados lentamente. Apresentam uma condutância de 22 a 27 ps quando registrado um só canal. São altamente sensíveis a três classes de fármacos: as fenilalquilaminas, as benzodiazepinas e as dihidropiridinas (SPEDDING & PAOLETTI, 1992).

⇒ *Fenilalquilaminas*: o verapamil é a fenilalquilamina mais utilizada clinicamente por sua capacidade de bloquear os canais tipo L, sendo utilizado principalmente no tratamento de arritmias cardíacas. O sítio de ligação do verapamil no CCVD está localizado na subunidade α -1. A afinidade das fenilalquilaminas aos canais do tipo L depende das mudanças conformacionais moduladas pela variação do potencial. O estado inativado do canal tem mais afinidade, seguido pelos estados aberto e fechado. Além disso, a ligação das fenilalquilaminas é alostérica, inibindo a ligação das demais classes de drogas (HOCKERMAN *et al.*, 1997).

⇒ *Benzodiazepinas*: o diltiazem é o composto desta classe mais utilizado clinicamente. Esta substância é relativamente seletiva para os CCDV do tipo L, sendo que em altas concentrações é capaz de bloquear outros tipos de CCDV (DIOCHOT *et al.*, 1995). O bloqueio provocado pelo diltiazem se dá pela sua rápida ligação no estado aberto do canal, além de se ligar ao estado inativado preferencialmente. (HOCKERMAN *et al.*, 1997). O sítio de ligação se encontra na subunidade α 1 do canal. Devido à ligação das benzodiazepinas ser alostérica, sua ligação no sítio inibe a ligação das fenilalquilaminas e estimula a ligação das dihidropiridinas no canal L (De POVER *et al.*, 1982).

⇒ *Dihidropiridinas*: as dihidropiridinas são moduladores alostéricos e podem agir sobre os CCDV do tipo L tanto como agonistas, favorecendo o estado aberto, como antagonistas, favorecendo o estado inativado. Esta ação específica depende da estrutura da droga, mas pode depender também do potencial de membrana, da frequência de estimulação e do estado conformacional resultante do canal (McDONALD *et al.*, 1994). As dihidropiridinas mais usadas são o Bay K 8644 (agonista) e a nifedipina (antagonista).

O cálcio que entra em miócitos cardíacos através de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (CCDV) do tipo L, é a base do platô do potencial de ação e inicia a contração. As correntes de Ca^{2+} do tipo L são dinamicamente reguladas por proteínas quinase ativadas por segundo-mensageiro e proteínas G. A atividade aumentada dos canais de Ca^{2+} tipo L devido à ativação de receptores β -adrenérgicos e fosforilação de proteínas quinase dependentes de cAMP, contribui para um aumento na frequência cardíaca e força de contração quando o sistema nervoso simpático atua (McDONALD *et al.*, 1994).

Os canais do tipo L são constituídos por 5 subunidades, conhecidas como α_1 , α_2 , β , γ e δ . Estudos de clonagem molecular revelaram que as corrente de Ca^{2+} do tipo L em miócitos cardíacos são originadas de canais de $\text{Ca}_v1.2$ que consistem de subunidades $\alpha_{1,2}$, β_1 ou β_2 e $\alpha_2\delta$. A subunidade α_1 contém locais de fosforilação importantes e pontos de ligação para alguns antagonistas de cálcio. É a subunidade α_1 que forma o poro íon-seletivo, possui o sensor de voltagem e contém o ponto de ligação para as drogas antagonistas de cálcio. As subunidades β e $\alpha_2\delta$ modulam as funções do canal e aumentam a expressão funcional (HOFMANN *et al.*, 1999).

A regulação dos canais de Ca^{2+} do tipo L em células de músculo liso e músculo cardíaco por mecanismos de sinalização por receptor que ativam proteína quinase C (PKC) está bem estabelecida: agonistas α -adrenérgicos, ATP intracelular, ATP extracelular,

glicocorticóides, arginina-vasopressina, polipeptídeo ativador da adenilato-ciclase da pituitária e angiotensina II, todos regulam correntes de Ca^{2+} do tipo L através do mecanismo da PKC. A modulação dessas correntes pela PKC resulta num aumento transitório seguido de um decréscimo ou apenas num decréscimo da atividade do canal em miócitos cardíacos isolados e células de músculo liso. As razões para as diferentes respostas dos canais à ativação da PKC observada em diferentes estudos são desconhecidas (Mc HUGH *et al.*, 2000).

I. 8.2.2. CANAIS DO TIPO T

Os canais do tipo T (transitório) tem características eletrofisiológicas muito diferentes das dos canais do tipo L. São ativados em potenciais muito negativos, variando entre -50 a -30 mV com corrente de pico por volta de -20 mV e por isso são também chamados de canais ativados por baixa voltagem. A inativação da corrente macroscópica é voltagem dependente mas Ca^{2+} independente. Canais do tipo T se desativam lentamente, originando correntes de cauda de longa duração durante a repolarização. Essas propriedades são funcionalmente importantes para indução de grandes correntes para dentro de Ca^{2+} seguindo rápidas despolarizações durante um potencial de ação (STAES *et al.*, 2001). Parecem ser importantes para atividade marcapasso em diferentes tecidos. Eles são encontrados numa variedade de tecidos e estão em alta concentração no nodo sinoatrial, no nodo atrioventricular, no tecido de condução especializado do coração, em células de músculo liso e em neurônios (SPEDDING & PAOLETTI, 1992).

A composição das subunidades dos canais tipo T ainda é desconhecida, mas contém ao menos uma subunidade α_1 , responsável pela sensibilidade à voltagem,

seletividade iônica, condutância iônica e ligação à alguns bloqueadores de canal (HOFMANN *et al.*, 1999).

Existem poucos bloqueadores específico para canais do tipo T , contudo o Ni⁺⁺, amiloride e octanol possuem alguma seletividade para o canal (MORI *et al.*, 1993).

I. 8.2.3. CANAIS DO TIPO N

O canal do tipo N é caracterizado por ser ativado por alta voltagem como o canal tipo L, mas difere deste último por ser insensível as dihidropiridinas. A atividade destes canais está relacionada com a liberação dos neurotransmissores, ou eventos que seguem a despolarização do terminal nervoso na transmissão sináptica em neurônios. Estes canais podem também ser modulados por sistemas de segundo mensageiros ligados à membrana, como a proteína G, em diversos tecidos (SPEDDING & PAOLETTI, 1992). Ele é sensível a ω -conotoxina, toxina produzida por um molusco marinho, *Conus geographus*. Esta proteína é altamente seletiva aos canais tipo N e sua ligação irreversível produz a inibição da atividade do canal. Toda uma gama de conotoxinas foram descritas como tendo seletividade para subtipos de canais tipo N (OLIVERA *et al.*, 1994; GANDIA *et al.*, 1997).

A estrutura molecular do canal tipo N está bem estabelecida, sendo que sua estrutura apresenta homologia em três subunidades com o canal do tipo L: α_1 , α_2 e β (MORI *et al.*, 1993). O complexo protéico do canal tipo N apresenta uma subunidade Ca_v2.2 α_1 que o diferencia dos outros tipos de canal de cálcio (HERLITZE *et al.*, 2000).

I. 8.2.4. CANAIS TIPO P/Q E TIPO R

Canais do tipo P foram inicialmente descritos baseando-se em correntes em células cerebrais de Purkinje resistentes às dihidropiridinas e às conotoxinas e mais tarde foram descritos em diversos outros neurônios centrais e periféricos através de estudos de ‘binding’ com ω -Aga IVA. Estes canais são ativados por alta voltagem. O bloqueador específico dos canais tipo P/Q é a ω -Aga IVA, uma toxina presente no veneno da aranha americana “funnel-web”, *Agelenopsis aperta*. Esta toxina requer o estado aberto do canal para ter acesso ao seu sítio de ligação e quando se liga inativa-o (OLIVERA *et al.*, 1994). Canais de Ca^{2+} que contém uma subunidade $\text{Ca}_v2.1 \alpha_1$ são responsáveis pelas correntes de Ca^{2+} tanto do tipo P quanto do tipo Q (HERLITZE *et al.*, 2000).

O canal do tipo R corresponde a uma corrente residual de Ca^{2+} que permanece em cultura de neurônios quando bloqueados os canais tipo L, N e P/Q. Sua função permanece desconhecida (OLIVERA *et al.*, 1994).

I. 9. CANAIS DE POTÁSSIO

Os íons potássio apresentam funções relacionadas com a geração de sinais elétricos na membrana e com a manutenção do potencial de membrana no repouso, juntamente com os íons cloro. Estas propriedades se devem ao fato de o potencial de equilíbrio do potássio se encontrar em valores muito negativos, geralmente abaixo do nível de repouso, e apresentar uma permeabilidade relativamente alta. Assim sendo, partindo do repouso, quando houver maior fechamento dos canais de K^+ ocorrerá uma despolarização devido à redução do efluxo de K^+ , e quando houver maior abertura desses canais ocorrerá uma hiperpolarização pelo aumento do efluxo do íon (HODGKIN & HOROWICZ, 1959).

Canais de K^+ , originalmente identificados como as entidades moleculares que mediam fluxos de íons K^+ através da membrana dos nervos na geração de potenciais de ação, são agora conhecidos em virtualmente todos os tipos celulares em todos os organismos, onde eles estão envolvidos numa variedade de funções fisiológicas (MILLER, 2000).

Os canais de K^+ são os mais numerosos e com maior diversidade se comparados aos demais canais. Existe uma grande variabilidade dos canais de K^+ nos diferentes tecidos e entre os tipos celulares do mesmo órgão, quando consideramos os tipos e/ou a densidade de canais (BARRY & NERBONNE, 1996). Eles são proteínas tetraméricas integrais da membrana que formam poros aquosos transmembrana através dos quais especificamente o K^+ permeia. Muitas subfamílias moleculares de canais de K^+ são conhecidas, e essas correspondem grosseiramente aos sinais fisiológicos pelos quais a abertura dos canais é controlada, como por exemplo voltagem, Ca^{2+} , proteína G e poliaminas. A estrutura do canal de K^+ bacteriano é conhecida com alta resolução, e ela revela a base química para a permeação seletiva do K^+ . Os genomas de humanos, *Drosophila* e *Caenorhabditis elegans* contém 30-100 genes de canais de K^+ cada, e alguns deles ainda estão sujeitos a “splicing” alternativos. Várias doenças genéticas humanas, como as patologias envolvendo arritmias cardíacas, surdez, epilepsia, diabetes e má regulação da pressão arterial, são causadas pela ruptura de genes para canais de K^+ .

Os canais de K^+ são os membros fundadores da “superfamília-S4” de canais iônicos dedicados à sinalização elétrica, os quais, excetuando-se os canais de K^+ , são encontrados exclusivamente em eucariotos. Os canais dependentes de nucleotídeos cíclicos (cAMP por exemplo) evoluíram dos canais de K^+ via a aquisição de um domínio de ligação para nucleotídeos cíclicos perto do terminal carboxil; os canais de Ca^{2+} e Na^+ , cada um dos quais é um monômero contendo quatro repetições internas, evoluíram dos canais de K^+

através de duas duplicações de genes, sendo que os canais de Ca^{2+} surgiram em organismos unicelulares como os protistas e os canais de Na^+ surgiram com o aparecimento de neurônios em organismos multicelulares (MILLER, 2000).

Existem duas grandes classes de canais de K^+ definidas pela topologia transmembrana: o subtipo com seis hélices transmembrana ligado à voltagem (K_v) e o subtipo de duas hélices transmembrana com retificação para dentro (inward-rectifier) (K_{ir}).

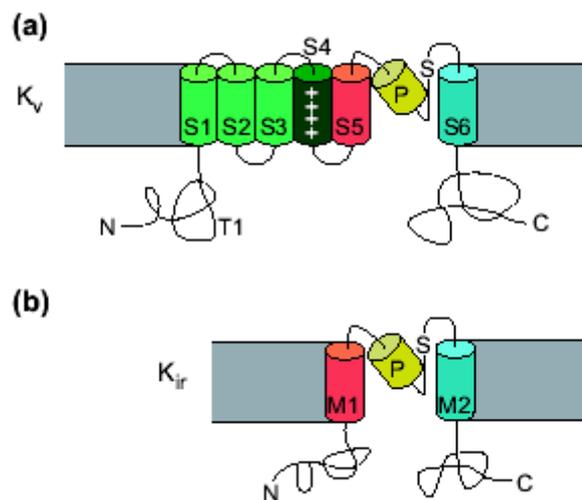


Figura I.10. Topologias de membrana e principais características dos subtipos de canais de potássio K_v e K_{ir} (a, b). Representação esquemática da topologia de membrana de canais (a) K_v e (b) K_{ir} . Note que apenas uma subunidade da estrutura tetramérica é mostrada. Hélices transmembrana são numeradas S1-S6 em canais K_v e M1 e M2 em canais K_{ir} ; P= hélice do poro; S=seqüência de assinatura; N=terminação amino; C=terminação carboxil; T1=domínio conservado T1. O lado extracelular é o lado de cima do esquema. (MILLER, 2000)

Os canais de K^+ são encontrados em tantos tipos celulares diferentes efetuando tantas tarefas biológicas distintas que é impossível resumir todos eles aqui. Todos os canais de K^+ no entanto efetuam uma função básica: a formação de um “vazamento” extremamente específico para íons K^+ . Como já foi dito anteriormente, praticamente todas as células mantêm uma concentração citoplasmática de K^+ muito mais alta que a extracelular e a abertura de um canal de K^+ automaticamente implica numa mudança na voltagem elétrica através da membrana plasmática em direção à negatividade. Essa mudança é chamada de hiperpolarização e ocorre em diferentes contextos fisiológicos para diferentes propósitos.

De um modo geral, as atividades dos canais de K^+ são reguladas de maneira elaborada e estreita, tanto por controles de transcrição específicos de cada tecido como por ações bioquímicas nas proteínas do canal. Alguns canais de K^+ são constitutivamente ativos, mas a maioria atua transitoriamente, sendo regulados por sinais fisiológicos. Os canais K_v são ativados por mudanças de voltagem despolarizantes, alguns canais de K^+ ativados por Ca^{2+} são sensíveis tanto à voltagem quanto aos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} , enquanto outros respondem apenas ao Ca^{2+} , diferentes classes de canais K_{ir} são diretamente regulados por fatores intracelulares como proteínas G, nucleotídeos ou poliaminas. Além disso, a fosforilação de proteínas muitas vezes modula a sensibilidade dos canais de K^+ para os sinais fisiológicos propriamente ditos, ou é ela mesma o sinal de ativação (MILLER, 2000).

Nesta seção não serão descritos todos os tipos de canais de K^+ , devido à sua grande diversidade e complexidade. Desta forma, serão descritos apenas os canais envolvidos diretamente no foco deste trabalho.

I. 9.1. CANAIS DE POTÁSSIO SENSÍVEIS AO ATP (K_{ATP})

Os canais K_{ATP} são amplamente distribuídos em uma variedade de tecidos e tipos celulares onde eles acoplam mudanças do metabolismo intracelular à atividade elétrica da membrana plasmática, tendo portanto um importante papel tanto na fisiologia normal quanto na patofisiologia. A abertura dos canais K_{ATP} levará o potencial de membrana em direção ao potencial de equilíbrio do íon potássio (perto de -80mV para a assimetria fisiológica de K^+ extracelular/ K^+ intracelular) (AGUILAR-BRYAN *et al.*, 1998).

Os canais de K_{ATP} foram descobertos originalmente em coração e mais tarde foram encontrados em muitos outros tecidos incluindo células β do pâncreas, músculo esquelético, músculo liso, cérebro, hipófise e rim. A atividade dos canais K_{ATP} é controlada pela concentração de ATP e ADP intracelular ou seja, pelo equilíbrio ATP/ADP. Quando há um aumento da razão ATP/ADP, os canais se fecham e quando há uma redução dessa razão os canais se abrem. Desta forma sua função está estreitamente relacionada com o estado metabólico das células (MIKI *et al.*, 1999).

Em miócitos cardíacos e esqueléticos, e em músculo liso vascular e neurônios ainda há controvérsia se os canais de K_{ATP} são ativos em condições fisiológicas normais. Já é aceito no entanto que canais de K_{ATP} podem ser abertos, mesmo em miócitos isolados quiescentes, por condições de hipóxia ou isquemia, e sua corrente para fora é suficiente para reduzir a duração do potencial de ação. Essa redução diminui o influxo de Ca^{2+} , diminuindo a força contrátil, o que reduz o consumo de ATP e que acaba por proteger a célula durante períodos de restrição metabólica. Em células de músculo liso, que da mesma forma que as células- β têm alta resistência, um pequeno número de canais de K_{ATP} pode influenciar o tônus vascular. Em neurônios, a abertura de canais de K_{ATP} reduz a

freqüência de potenciais de ação, tendo novamente uma função protetora (AGUILAR-BRYAN *et al.*,1998).

As propriedades funcionais dos canais de K_{ATP} foram melhor caracterizadas em células β do pâncreas. Desde o descobrimento dos canais K_{ATP} em células β , o modelo no qual a liberação de insulina dependente de glicose é dependente do fechamento dos canais K_{ATP} tornou-se amplamente aceito. Neste modelo, o aumento da razão ATP/ADP decorrente do metabolismo da glicose, leva os canais K_{ATP} a se fecharem, despolarizando a membrana das células- β , levando à abertura de canais de cálcio voltagem dependentes e permitindo o influxo de Ca^{2+} . O aumento na concentração de cálcio intracelular nas células- β então dispara a exocitose dos grânulos de insulina. Além disso, sulfonilurías como tolbutamida e glibenclamida, que são amplamente usadas no tratamento de diabetes mellitus não dependente de insulina, estimulam a liberação de insulina por fecharem diretamente os canais K_{ATP} (MIKI *et al.*,1999).

Os canais de K_{ATP} têm propriedades de canais de K^+ com retificação interna (inward rectification). A estrutura molecular dos canais K_{ATP} foi revelada clonando-se o receptor de sulfoniluría (SUR) e membros da subfamília de canais de K^+ com retificação interna ($K_{ir6.0}$) (MIKI *et al.*, 1999). A clonagem e reconstituição das subunidades desses canais demonstrou que de fato, os canais K_{ATP} são hetero-multímeros de subunidades dos canais de K^+ com retificação interna ($K_{ir6.x}$) e receptores de sulfonilurías (SUR), membros da superfamília “ATP-binding cassette” (ABC). Estudos recentes indicam que SUR e $K_{ir6.x}$ se associam para formar um grande canal tetramérico (SUR/ $K_{ir6.x}$)₄. As subunidades $K_{ir6.x}$ formam o poro do canal enquanto SUR é requerida para ativação e regulação (AGUILAR-BRYAN *et al.*, 1998).

Estudos de reconstituição de canal indicam que os canais K_{ATP} de células β pancreáticas são provavelmente hetero-octâmeros formados por quatro subunidades SUR1, e quatro subunidades $K_{ir}6.2$ (MIKI *et al.*, 1999).

Como SUR1 não é expresso em músculo cardíaco e esquelético onde canais de K_{ATP} estão presentes, sugeriu-se a presença de uma isoforma de SUR1 nesses tecidos. Foi encontrada a isoforma SUR2A. No entanto essa isoforma tem a afinidade ~ 500 vezes menor por glibenclamida que a SUR1. Altos níveis de mRNA de SUR2A é expresso em coração, músculo esquelético e ovário e níveis moderados são encontrados em ilhotas pancreáticas, cérebro, língua, testículo e glândula adrenal (MIKI *et al.*, 1999).

Glibenclamida $1\mu M$, concentração suficiente para bloquear correntes de canais K_{ATP} de células β , inibiu apenas moderadamente a atividade do canal SUR2A/ $K_{ir}6.2$. Por outro lado, abridores de canal K_{ATP} cardíaco, cromakalina e pinacidil, ativaram canais SUR2A/ $K_{ir}6.2$. No entanto, diazoxida $100\mu M$, concentração suficiente para ativar canais K_{ATP} de células β , não ativou os canais SUR2A/ $K_{ir}6.2$. Portanto, as propriedades farmacológicas e eletrofisiológicas de canais SUR2A/ $K_{ir}6.2$ são similares àquelas dos canais K_{ATP} descritos em músculo esquelético e cardíaco. Estudos até agora sugerem que diferentes combinações de isoformas de SUR e suas variações e $K_{ir}6.2$ ou $K_{ir}6.1$ podem ser responsáveis em parte pela diversidade molecular e funcional dos canais K_{ATP} (MIKI *et al.*, 1999).

Os canais K_{ATP} são muito conhecidos como alvo da ação das sulfoniluréias, drogas muito usadas como hipoglicemiantes como foi descrito acima. As sulfoniluréias mais utilizadas como antagonistas (“fechadoras de canais”) são a glibenclamida (gliburida), a tolbutamida e a glipzida. Alguns agonistas (“abridores de canais”) utilizados são a cromakalina, a diazoxida e o pinacidil.

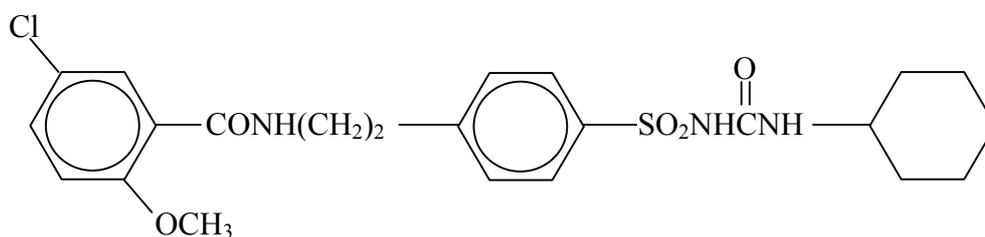


Figura I.11. Fórmula molecular da Glibenclamida. (HARDMAN *et al.* 1996)

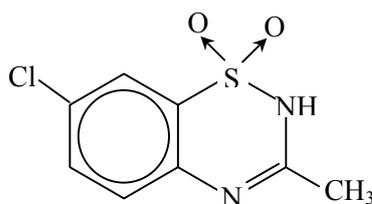


Figura I.12. Fórmula molecular da Diazoxida. (HARDMAN *et al.*, 1996)

Há várias outras descrições de envolvimento de canais de K^+ na ação hormonal, como por exemplo, a investigação dos efeitos da melatonina sobre correntes de K^+ em cultura de células cerebelares de rato, onde se demonstrou a presença de um receptor funcional de melatonina e que a ativação desse receptor pode modular as correntes para fora de K^+ “outward current” ligando-se à uma proteína G sensível à toxina pertussis (HUAN *et al.*, 2001). Em células foliculares que circundam os oócitos de *Xenopus*, a aplicação tanto de FSH ou de adenosina sob voltage clamp induz uma corrente de K^+ . Essa corrente de K^+ se produz por um aumento de cAMP intracelular e é inibida por ATP. Essa inibição pode ser mediada por ativação da PKC sendo que o local de ação da PKC parece ser em algum ponto descendente na produção de cAMP envolvida na abertura dos canais

de K^+ (FUJITA *et al.*, 2001). 17- β estradiol provoca uma queda no potencial da membrana plasmática de osteoclastos isolados de ave. Esta queda se dá em segundos após a administração do estradiol e é bloqueada por ouabaína (bloqueador específico da Na^+K^+ ATPase) e por $BaCl_2$ (inibidor do canal de K^+ com retificação para dentro). Verapamil e cloreto de lantânio ($LaCl_3$), inibidores de canais para dentro de Ca^{2+} e 4',4'-diisotiocianatostibene-2',2'-ácido dissulfônico (DIDS), um inibidor de canais de Cl^- , não afetaram a despolarização. Os autores sugerem que o estrogênio regula osteoclastos através da atividade de canais iônicos (BRUBAKER & GAY, 1999). Em miócitos cardíacos, foi sugerido que o fechamento dos canais K^+_{ATP} pela glibenclamida leva à uma despolarização da membrana e conseqüente aumento da permeabilidade ao Ca^{2+} através da ativação dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L (KIM *et al.*, 1997). Em túbulos seminíferos de testículos enriquecidos em células de Sertoli, a glibenclamida rapidamente estimula (20 segundos) a captação de Ca^{2+} através de canais do tipo L e produz alterações eletrofisiológicas na membrana de células de Sertoli, resultando numa despolarização prolongada (MIRANDA *et al.*, 1998).

I. 10. INTERAÇÕES IÔNICAS E ELÉTRICAS NA MEMBRANA PLASMÁTICA DE CÉLULAS DE SERTOLI

Em ratos adultos foi feita a medida do potencial transepitelial nos túbulos seminíferos, e foi registrada uma diferença de potencial entre o meio intratubular e o plasma de aproximadamente 6mV, sendo o lúmen mais negativo (GLANDWELL, 1977). Já CUTHBERT & WONG (1975) realizaram um extensivo estudo das características elétricas das células em túbulos seminíferos de ratos adultos utilizando a técnica de registro

intracelular. Registraram o potencial de membrana das células ($E_m = -28 \pm 0.3 \text{ mV}$, $n=808$). Este potencial variou em função da modificação da concentração de K^+ externo. Não observaram efeito de vários hormônios: FSH, LH, hCG e ocitocina, sendo que somente prostaglandina E_1 causou uma despolarização. Neste trabalho foi registrada uma resposta fásica em um tipo celular diferenciado, onde ocorreu uma variação periódica do potencial de membrana (± 3 por min) com aproximadamente 10 segundos de duração. Esta atividade pode estar associada com contrações das células mióides. Em ratos adultos a porção do túbulo em que ocorrem estas atividades espontâneas parece estar relacionada com o ciclo do epitélio.

Mais tarde, em uma seqüência de estudos, Joffre e colaboradores observaram que o FSH causa uma hiperpolarização em células de Sertoli em cultura, de ratos de 17 dias e de ratos de 7 a 37 dias com testículos enriquecidos em células de Sertoli. As células foram submetidas a um pré-tratamento de 24 horas com FSH, o que causou uma hiperpolarização dessas células independentemente da idade do rato, e os autores sugeriram que essa hiperpolarização era relacionada à ativação da bomba Na^+/K^+ , a um aumento no influxo Na^+/Ca^{2+} e um efluxo de K^+ . Os autores observaram ainda que sob as mesmas condições, o dibutilil AMP cíclico produziu um efeito similar ao FSH e que o hCG não teve efeito sobre o potencial de membrana (JOFFRE *et al.*, 1988; JOFFRE & ROCHE, 1988; ROCHE & JOFFRE, 1989).

Em uma aplicação aguda do FSH em túbulos seminíferos de testículos enriquecidos em células de Sertoli, foi observado que este hormônio produziu uma rápida hiperpolarização seguida de uma despolarização mais lenta e mais pronunciada. Ambas respostas foram dependentes da dose do FSH e a fase despolarizante foi bloqueada por verapamil indicando um envolvimento dos canais de Ca^{2+} voltagem dependente (WASSERMANN *et al.*, 1990). A fase despolarizante produzida pelo FSH é potenciada e

prolongada com a aplicação do aminoácido não metabolizável metilaminoisobutírico (MeAIB) (WASSERMANN *et al.*, 1992).

No primeiro estudo a utilizar a técnica de patch-clamp em células de Sertoli em cultura, foi registrada uma corrente transitória de cálcio para dentro, provocada por uma despolarização da membrana. Os autores sugerem tratar-se de uma corrente de cálcio comparável às do tipo T encontradas em células excitáveis (LALEVÉE *et al.*, 1997).

A estimulação β -adrenérgica em testículos de ratos imaturos foi investigada por WASSERMANN e colaboradores (1996). Foi observado que a adrenalina, a noradrenalina e o isoproterenol, uma amina simpaticomimética sintética, que atua como um potente agonista β -adrenérgico não seletivo, com baixa afinidade para receptores α -adrenérgicos, promovem um aumento dos níveis de captação do aminoácido ^{14}C -MeAIB. Este aumento da captação de aminoácido se dá por um mecanismo relacionado aos receptores do tipo $\beta 1$ e é independente da estimulação da síntese protéica (WASSERMANN *et al.*, 1996). O isoproterenol, aplicado tópicamente, mostrou uma resposta bifásica no potencial de membrana de células de Sertoli: uma hiperpolarização que iniciou 7-10 segundos depois da aplicação da droga, seguida de despolarização (LOSS *et al.*, 1998). Em ambas as fases a resistência diminuiu. Concomitantemente, o isoproterenol estimula a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em células de Sertoli isoladas. Este efeito estimulatório é potenciado pelo Bay K 8644, uma diidropiridina agonista dos canais de Ca^{2+} tipo L. Os autores, baseando-se em seus resultados com a nifedipina (antagonista de canais de Ca^{2+} tipo L), sugerem que o isoproterenol aumenta a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ por abertura dos canais de cálcio voltagem dependentes do tipo L, e que esses canais seriam ainda mais ativados com adição do Bay K 8644, que potencializaria esse influxo. O influxo de Ca^{2+} , além da sua ação como segundo mensageiro, estimularia então o sistema de cotransporte de Na^+ -aminoácido. No mesmo estudo foi comparado o efeito do retinol, vitamina A, substância fundamental para a função

testicular e espermatogênese (SKINNER, 1991). O retinol, aplicado tópicamente sobre os túbulos seminíferos isolados, causou uma resposta oscilatória imediata ($<1s$) no potencial de membrana da célula de Sertoli, e induziu uma redução na resistência da membrana (LOSS *et al.*, 1998). O retinol também estimulou o acúmulo de aminoácidos em testículos de ratos imaturos e o transporte de $^{45}Ca^{2+}$ em células de Sertoli isoladas e este efeito também é potenciado pelo Bay K 8644. No entanto os resultados com o uso da nifedipina não foram capazes de esclarecer o mecanismo de ação do retinol neste processo.

Em um estudo recente, foi demonstrado que células de Sertoli despolarizam rapidamente sob ação de ATP externo, e que essa despolarização é dependente de um influxo de Na^+ . Além disso, as células de Sertoli secretaram estradiol sob a ação do ATP de uma maneira dose-dependente, e sugeriu-se a presença de receptores purinérgicos-P2, cuja ativação induz aumento de Ca^{2+} e Na^+ intracelular, e uma despolarização da membrana dependente de Na^+ que leva à secreção de estradiol (ROSSATO *et al.*, 2001).

O hormônio T3 também foi apontado como tendo efeito no potencial de membrana de células de Sertoli. Foi observada uma hiperpolarização dose dependente em células de testículos de ratos imaturos (SILVA *et al.*, 2001).

I. II. OBJETIVOS

A transmissão de sinal é um dos temas dominantes da biologia hoje em dia. O estudo da transmissão de sinal procura essencialmente explicar o comportamento celular elucidando os eventos moleculares pelos quais sinais extracelulares promovem uma resposta intracelular. Não há dúvidas de que a transmissão efetiva e bem regulada desses sinais é crucial para o comportamento celular normal.

Dentro dessa perspectiva ampla, o trabalho aqui apresentado teve como objetivo geral, investigar os mecanismos de tradução de sinal rápidos na membrana, ou seja, a ação não genômica da testosterona em células de Sertoli. Para tanto, foram estabelecidos os seguinte objetivos específicos:

- 1- Avaliar o efeito da testosterona sobre a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em tempos curtos.
- 2- Testar o efeito da testosterona sobre o transporte do aminoácido não metabolizável [^{14}C]-MeAIB.
- 3- Verificar a ação da testosterona sobre o potencial de membrana e sobre a resistência da membrana.
- 4- Analisar o mecanismo iônico responsável pelo efeito da testosterona nos parâmetros eletrofisiológicos.

II. III. MATERIAIS E MÉTODOS

III. 1. MATERIAIS

III. 1.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos nas idades indicadas em cada série de experimentos, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde – UFRGS. Os ratos ficavam com as mães até o momento do experimento. As mães eram mantidas com no máximo 8 filhotes em gaiolas individuais onde recebiam ração Purina, Nutripal (Porto Alegre-RS) e água “ad libitum”, com iluminação controlada em ciclos de 12 horas.

Em alguns experimentos foram utilizados ratos com testículos enriquecidos com células de Sertoli (SCE).

III. 1.1.1. OBTENÇÃO DE RATOS COM TESTÍCULOS ENRIQUECIDOS EM CÉLULAS DE SERTOLI (SCE)

Os animais, machos e fêmeas, eram colocados em salas coletivas desde o desmame. O acasalamento era monogâmico, sendo que 4 fêmeas de 90 dias de idade eram colocadas com 4 machos de 60-90 dias de idade em gaiolas separadas durante três dias. A partir desse momento, efetuou-se o controle da gestação, sendo considerado o seu início o segundo dia de acasalamento.

Para a obtenção de testículos enriquecidos em células de Sertoli (SCE), os fetos foram irradiados 'in utero'. As ratas mães, entre o 19º e o 21º dia de gestação foram imobilizadas em um habitáculo para rato, e irradiadas com 125 rads de uma fonte de cobalto [Co^{60}] com uma delimitação do campo abdominal de 10X10 cm e uma distância fonte-pele de 50cm. Com o objetivo de determinar a efetividade da irradiação, foram utilizadas técnicas de controle histológico, onde testículos de ratos de 55 a 70 dias de idade que foram submetidos à irradiação, foram comparados com testículos de ratos da mesma idade não irradiados (grupo controle). Os testículos foram retirados por uma incisão abdominal, seccionados ao meio e fixados em Bouin durante 6 horas. O material foi então desidratado em álcool etílico e incluído em paraplast. Os cortes de 3 μ Mm foram corados com hematoxilina e eosina (H.E.) e montados com entelan.

III. 1.2. SOLUÇÕES

III. 1.2.1. TAMPÃO KREBS RINGER BICARBONATO (KRB)

Foi utilizado solução tampão Krebs-Ringer bicarbonato (KRb), como meio de incubação em todos os experimentos, preparado imediatamente antes da realização dos experimentos. Todos os reagentes eram de pureza 'pró-análise' (P.A) da E. Merck (Darmstadt, Alemanha). O preparo da solução foi feita a partir de soluções estoques conforme tabela II.1.

	<i>Concentração das Soluções Estoque (g/L)</i>	<i>Concentração Estoque (M)</i>	<i>Concentração Final no KRb (mM)</i>
<i>NaCl</i> <i>CLORETO DE SÓDIO</i>	180,00	3,08	118
<i>KCl</i> <i>CLORETO DE POTÁSSIO</i>	9,20	0,123	4,7
<i>KH₂PO₄</i> FOSFATO DE <i>POTÁSSIO MONOBÁSICO</i>	4,22	0,031	1,2
<i>NaHCO₃</i> <i>BICARBONATO DE SÓDIO</i>	54,60	0,65	25
<i>MgSO₄.7H₂O</i> <i>SULFATO DE MAGNÉSIO</i>	7,64	0,031	1,2
<i>CaCl₂.2H₂O</i> <i>CLORETO DE CÁLCIO</i>	9,60	0,065	2,5
<i>C₆H₁₂O₆</i> <i>GLICOSE</i>	25,00	0,14	5,5

Tabela III-1. Composição salina e concentrações presentes nas soluções estoque de KRb e na solução final.

Para o preparo do KRb, foram misturados volumes iguais de cada solução estoque, acrescentando-se por último o sulfato de magnésio e o cloreto de cálcio. A solução era então avolumada com água destilada até o volume desejado, de modo a obterem-se as concentrações finais descritas na tabela II-1. A solução era então gaseificada com carbogênio (O₂:CO₂, 95:5, v/v), até que se atingisse o pH de 7,4, monitorado em pH-metro. A solução assim obtida era mantida em gelo durante a preparação do experimento.

III. 1.2.2. TAMPÃO KRb COM BAIXO CLORETO

Para os experimentos com baixo cloreto, o cloreto de sódio do tampão foi substituído por gluconato de sódio (C₆H₁₁NaO₇) em igual molaridade.

III. 1.2.3. MEIO DME/HAM'S F-12 - EAGLE MODIFICADO DULBECCO (DME)/ MISTURA NUTRIENTE HAM'S F-12 (1:1)

O meio DME/Ham's F-12 foi adquirido da Irvine (Santa Ana, CA, USA). Este meio foi desenvolvido especificamente para cultivo de células somáticas testiculares, segundo MATHER & PHILLIPS (1984), e tem sido o mais satisfatório para estudos com hormônios nestas células. Foi utilizado durante todo o procedimento de isolamento das células de Sertoli.

Foi preparado conforme o fabricante, ou seja, 10,3g de meio para 1 litro de água destilada. Além disso foi acrescentado HEPES (3,5 g/L) e Bicarbonato de Sódio (1,2 g/L). O pH foi acertado em 7,4 com NaOH 1N.

III. 1.3. SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS

Enzimas

- Colagenase/Dispase (Boehringer Mannheim – Alemanha). Esta enzima era pesada e dissolvida em meio DME/Ham's F12 no momento da preparação das células isoladas, conforme descrito adiante.
- Inibidor de Tripsina (Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo, USA). Da mesma forma que a anterior, esta substância também era preparada no momento do isolamento celular.

Testosterona-Obtida da Sigma (Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo, USA). O hormônio foi diluído em etanol e adicionado à preparação para obter-se as concentrações finais desejadas. A solução final continha no máximo 1% de etanol.

17 β -estradiol- Obtido da Sigma (Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo, USA). O hormônio foi diluído em etanol e adicionado à preparação para obter-se a concentração final desejada.

Progesterona- Obtida da Sigma (Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo, USA). O hormônio foi diluído em etanol e adicionado à preparação para obter-se a concentração final desejada.

Glibenclamida- Obtida da Reseach Biochemicals International (RBI-Natick, MA, USA). Foi dissolvida em dimetilsulfoxido (DMSO), numa solução mãe de 10mM. A solução final era de 10 μ M (0,1% DMSO).

Diazoxida- Obtida da Reseach Biochemicals International (RBI-Natick, MA, USA). Foi dissolvida em etanol ao qual se acrescentou NaOH 1N, de modo a obter-se solução de NaOH 0,05N em etanol. A diluição foi conseguida mantendo-se a solução em banho-maria a 40°C. A solução final de uso era de 250 ou 400 μ M (0,2% etanol e 0,05 μ M NaOH).

Verapamil- Obtido da Knoll, sob a forma de Dilacorón, solução injetável de 5,5mM de cloridrato de verapamil. Era diluído diretamente em KRb na hora do experimento.

Cálcio radioativo [$^{45}\text{Ca}^{2+}$]- atividade específica 1mCi/mg, adquirido da Du Pont – NEN Research Products. Em cada amostra foi adicionado 0,2 μ 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.

Ácido α -metilaminoisobutírico [1- ^{14}C] ([^{14}C]-MeAIB)- atividade específica 50 mCi/ mmol, adquirido da Du Pont-NEN Research Products. Em cada amostra foi adicionado 0,2 $\mu\text{Ci/mL}$.

Líquido de Cintilação- Optiphase Hisafe III (Wallac, Finlândia). Foi utilizado para a contagem da radioatividade das amostras.

III. 2. MÉTODOS

III. 2.1. ELETROFISIOLOGIA

III. 2.1.1. PREPARAÇÃO DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS

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

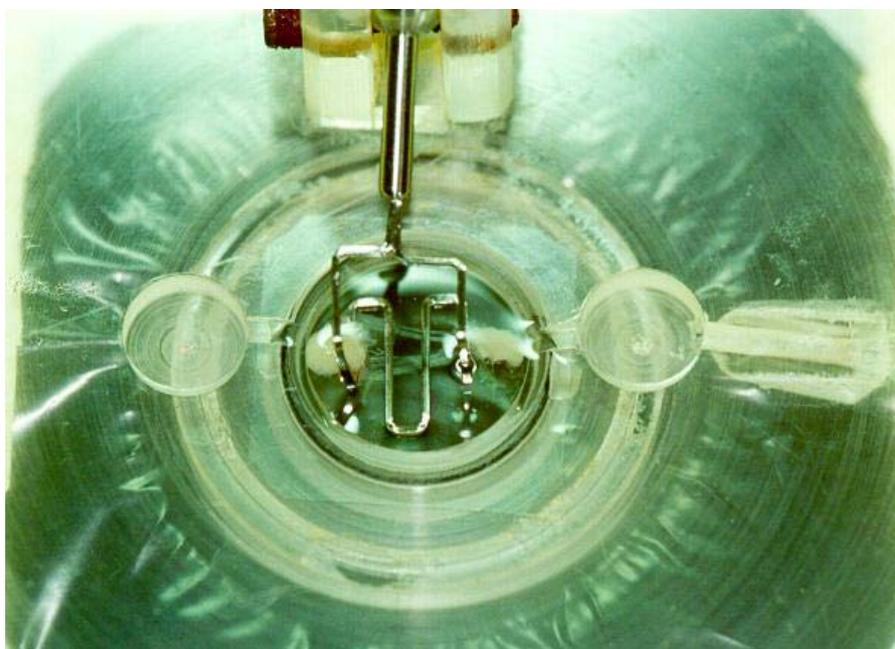


Figura III.1. Câmara de perfusão com túbulos seminíferos fixados ao fundo.

Todo o KRb utilizado nos experimentos de eletrofisiologia era glicosado e era filtrado em papel filtro antes da sua utilização. A preparação era então levada ao microscópio invertido (Nikon- Inverted Microscope Diaphot – TMD) e conectada ao

sistema de perfusão do KRb. O KRb era mantido num banho a 36°C e equilibrado com carbogênio durante todo o experimento. O fluxo era mantido a 1 mL/min com auxílio de uma bomba peristáltica (Rainin Instrument Co. Inc. – Dynamax, modelo RP-1). A preparação ficava 30 minutos se estabilizando antes do início dos registros. Após esse período, uma célula de Sertoli era empalada com uma micropipeta de vidro, sob controle visual.

III. 2.1.2. PREPARAÇÃO DO MICROELETRODO

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

Uma vez confeccionados, os microeletrodos foram preenchidas com solução KCl 3M e conectadas a um “holder” (eletrodo de prata cloretado), que também era preenchido com o mesmo KCl 3M e fazia contato elétrico com o eletrodo. O KCl utilizado era filtrado

em papel filtro diariamente. O conjunto era então conectado ao eletrômetro. A movimentação mecânica do eletródio para aproximação das células e empalamento era feita por um micromanipulador mecânico (Narishige-Japan), capaz de movimentos grossos (macro) e finos (micro) nos três eixos.

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

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

III. 2.1.3. EQUIPAMENTO E PROCEDIMENTO ELETROFISIOLÓGICO

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

Além dos elementos de interesse biológico, o sistema de registro eletrofisiológico possui resistência e capacitância próprios. Esses elementos conferem “ruído” ao sistema e devem ser neutralizados antes do início do experimento através de dispositivos no eletrômetro. Desta forma, quando ambos eletrodos estavam em líquido extracelular, nenhuma diferença de potencial era registrada. No momento em que o eletrodo de registro penetrava uma célula, um salto abrupto na direção negativa era visualizado no eletrômetro e no osciloscópio, e registrado no computador. A intensidade desta queda fornece o potencial de membrana da célula empalada.

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

Quando uma célula era empalada, esperávamos que seu potencial de membrana e sua resistência de membrana permanecessem estáveis por no mínimo 2 minutos, estes eram registrados, e só então os agentes a serem investigados eram aplicados. Para evitar trabalharmos com células germinativas, utilizamos apenas células cujos potenciais de membrana eram mais negativos que -35mV , já que esse potencial de membrana é comumente registrado em células de Sertoli de túbulos seminíferos normais (EUSEBI *et al.*, 1983) ou SCE de ratos pré-púberes ($-44\text{mV} \pm 0,5$, $n=48$ (LEITE *et al.*, 1999) e $-50\text{mV} \pm 0,68$, $n=186$ (MIRANDA, *et al.*, 1998)). Os esteróides foram aplicados topicamente ao banho com pipeta automática. Os agonistas ou antagonistas de canais eram perfundidos sobre as células por 5 minutos antes da aplicação tópica de testosterona ou, dependendo do experimento, eram aplicados topicamente.

III. 2.1.4. CÁLCULO DA INTENSIDADE DO PULSO APLICADO

Para aplicarmos pulsos de corrente de $0,5\text{nA}$, utilizamos a lei de Ohm, como segue, para calcularmos a voltagem a ser aplicada pelo estimulador. Essa voltagem passava antes pelo eletrômetro, cuja resistência era de $20 \times 10^6 \Omega$.

I = corrente (A- ampère)

V = 10×10^{-3} V

V = voltagem (V- volts)

V = 10mV

R = resistência (Ω - ohms)

LEI DE OHM:

$I = V/R \Rightarrow$

$V = I \times R$

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

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

III. 2.1.5. CÁLCULO DA RESISTÊNCIA DA MEMBRANA

Para calcularmos a resistência da membrana (R_m), utilizamos a lei de Ohm como segue abaixo:

I = corrente (A- ampère)

V = voltagem (V- volts)

R = resistência (Ω - ohms)

LEI DE OHM:

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

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

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

III. 2.2. ISOLAMENTO DE CÉLULAS DE SERTOLI

Para obtermos uma suspensão de células de Sertoli, utilizamos o método de MATHER & PHILIPS (1984) de separação de células somáticas testiculares. Esta técnica foi desenvolvida para obtenção de células para cultura primária com o mínimo dano celular possível. A separação enzimática é feita acrescentando-se colagenase-dispase em dois momentos. O inibidor de tripsina foi acrescentado nesses passos, para evitar ou reduzir qualquer ação trípica sobre os receptores ou outras proteínas de membrana que, em nosso estudo de ação hormonal, devem ser mantidos o mais intactos possível. Este método usa com muita intensidade a separação mecânica, que é facilitada especificamente em ratos por neles existir uma quantidade muito pequena de tecido conjuntivo ao redor dos túbulos seminíferos. O espaço intersticial é preenchido principalmente por linfa, células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos. Na fig II.1 está descrito esquematicamente o processo de isolamento das células para obtenção de suspensão enriquecida em células de Sertoli.

Após o isolamento das células era retirada uma alíquota da suspensão para determinação quantitativa em câmara de Neubauer com tripan blue. Apenas preparações com mais de 90% de células viáveis eram utilizadas.

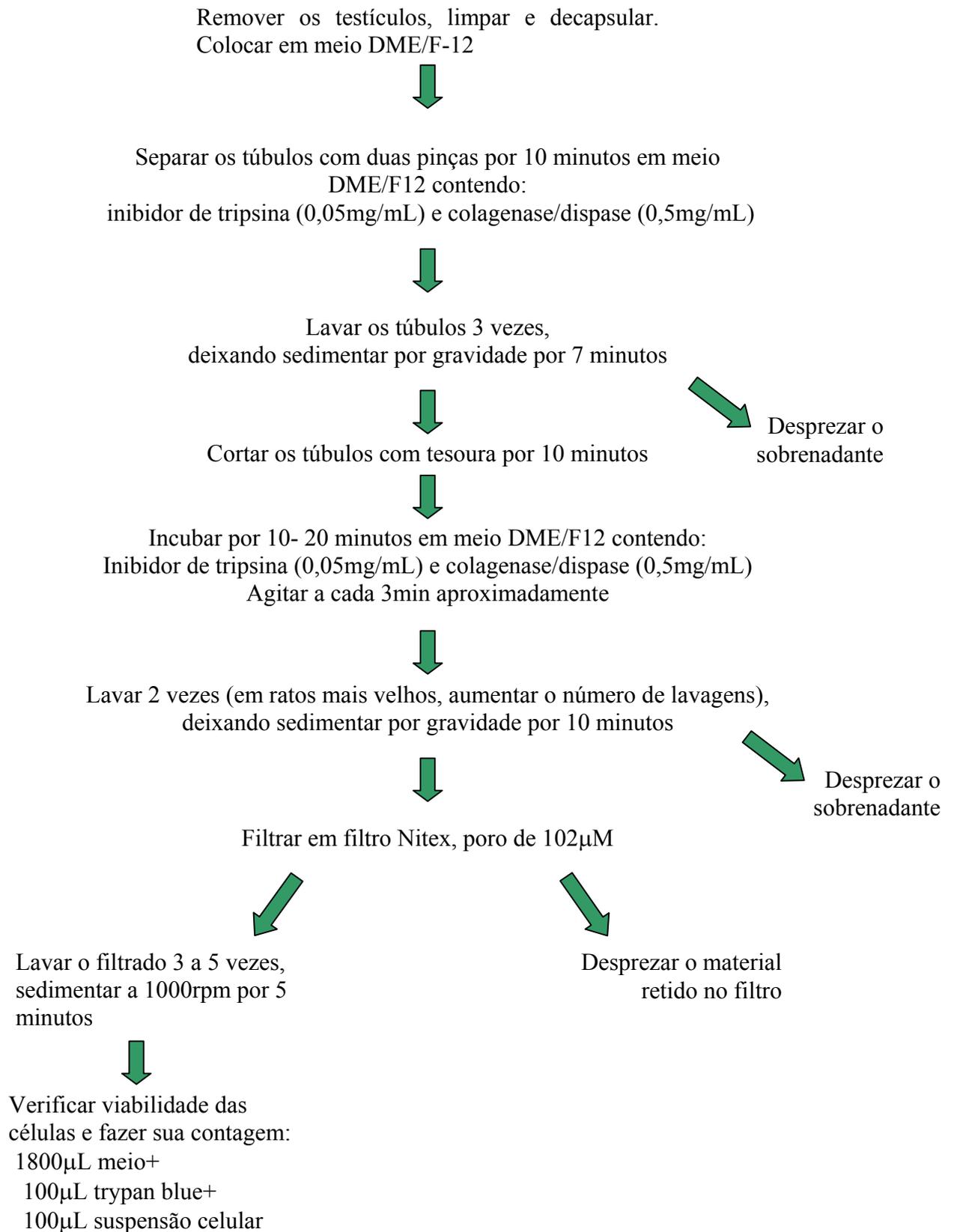


Figura III.2. Processo de obtenção de suspensão enriquecida em células de Sertoli

Esta técnica de isolamento tem bons resultados para estudos com receptores celulares e de resposta hormonal da célula. Para garantir bons resultados, foi necessário observarmos alguns pontos críticos do procedimento:

- A concentração de colagenase teve que ser adaptada tanto à quantidade de tecido como à idade dos ratos. A proporção da quantidade de tecido que é utilizada em relação à quantidade de colagenase deve ser 1:10-20. Em relação à idade, quanto mais jovem o rato, mais rápida é a dissociação, assim sendo, ajustamos a quantidade de colagenase para cada caso.
- É necessária uma monitorização visual durante todo o processo de isolamento, especialmente durante a segunda digestão enzimática que, indicará o momento exato de parar a digestão.
- Nas lavagens devem ser utilizados grandes volumes de meio, de 10 a 20 vezes o volume da preparação, pois lavagens incompletas reduzem a viabilidade das células.

O primeiro passo do isolamento, separa as células tubulares das células livres dos testículos. O segundo passo de tratamento enzimático separa as células mióides, resultando uma preparação enriquecida em células de Sertoli. Por fim, as diversas lavagens e centrifugações ao final do procedimento tiveram como objetivo retirar restos de gorduras e alguma protease liberada pelos tecidos que tenham sido danificados.

III. 2.3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

III. 2.3.1. EXPERIMENTOS COM CÉLULAS ISOLADAS

a) Incubação

Depois de obtidas as células isoladas, estas foram imediatamente utilizadas para o experimento. O procedimento experimental de captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ foi baseado no trabalho de GORKZINSKA & HANDELSMAN (1995) com algumas adaptações como segue:

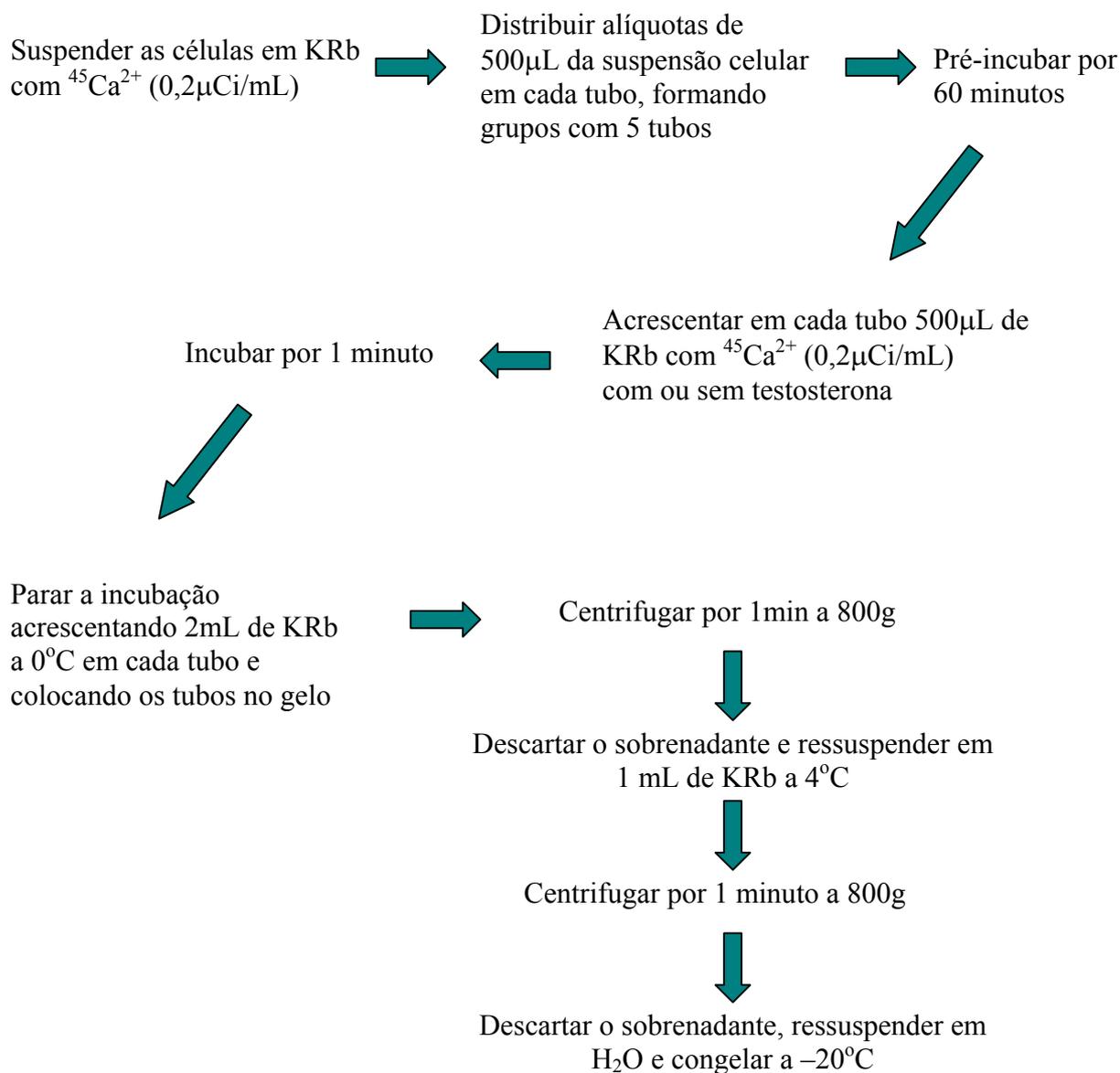


Figura III. 3. Representação esquemática do procedimento experimental para estudo da captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$.

Ao longo de todo experimento era utilizado KRb sem glicose, pH 7,4. As células eram utilizadas logo depois de terminado o isolamento. As incubações foram feitas num incubador metabólico Dubnoff, a temperatura de 34°C e em atmosfera de carbogênio (95% O_2 :5% CO_2 v/v).

Os grupos experimentais consistiam de 5 tubos controle e 5 tratados onde as células eram distribuídas de forma homogênea. A quantidade de células era de aproximadamente 2×10^6 células por tubo.

b) Processamento das amostras

As amostras eram descongeladas e sonicadas por 30seg a 40mA para rompimento das membranas. Em seguida eram centrifugadas por 10 minutos a 2400g. Era retirada uma alíquota de 50µL de cada amostra e colocados em 3mL de líquido de cintilação. A radioatividade era assim dosada em contas por minuto (cpm) num Espectrômetro de Cintilação LKB Rack-Beta modelo 1215 (LKB Produkter AB, Bromma, Suécia) com eficiência de 85 a 90%. O valor em cpm era convertido à pmoles de cálcio, de acordo com o decaimento da atividade específica do $^{45}\text{Ca}^{2+}$, fornecido pelo fabricante.

O restante da amostra foi utilizado para dosagem de proteínas. Cada amostra foi dosada em duplicata à partir da fração insolúvel do precipitado com TCA (ácido tricloroacético), pelo método de LOWRY *et al.*, 1951.

Os resultados foram expressos em pmoles de Ca^{2+} por mg de proteína.

III. 2.3.2. EXPERIMENTOS COM TESTÍCULOS INTEIROS

a) Incubação

Testículos de ratos de 5, 10, 12, 15, 20 e 35 dias foram extraídos depois dos animais serem sacrificados por deslocamento cervical. Os testículos foram limpos, pesados e retirou-se a túnica albugínea. Foram colocados individualmente em tubos plásticos contendo 1 mL de KRb sem glicose, pH 7,4, distribuídos de forma que um testículo foi para o grupo controle e o contralateral para o grupo tratado, alternadamente. Cada grupo experimental consistia de 5 testículos.

As gônadas foram então pré-incubadas por 30 minutos num agitador metabólico Dubnoff a 34°C em atmosfera de carbogênio (95% O_2 :5% CO_2 v/v). Ao final da pré-incubação, os testículos foram transferidos para tubos idênticos contendo 1 mL KRb com 0,1µCi/mL do aminoácido marcado MeAIB[^{14}C] e 10µg/mL de testosterona e incubados por 45 minutos.

b) Processamento das amostras

Ao final da incubação, os testículos foram retirados do tampão, delicadamente secos em papel filtro umedecido em KRb para remover o excesso de aminoácido 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 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 $50\mu\text{L}$ e colocados em 3mL de líquido de cintilação. Essas amostras representam o meio intracelular.

Do meio de incubação que permaneceu nos tubos de incubação, foram retirados também alíquotas de $50\mu\text{L}$ e colocadas em 3mL 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).

$$T/M = \frac{(\text{cpm interno} \times 1000) / \text{peso do testículo}}{\text{cpm externo}}$$

III. 2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foi utilizado o programa InStat, versão 3.0 para Windows, da GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA. Os testes específicos utilizados em cada experimento estão citados nos resultados.

III. IV. RESULTADOS

IV. 1. PARÂMETROS ELETROFISIOLÓGICOS BASAIS DAS CÉLULAS DE SERTOLI DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE TESTÍCULOS DE RATOS IMATUROS

Com o objetivo de obter medidas dos potenciais intracelulares, os túbulos seminíferos foram diretamente observados ao microscópio invertido, empaladas com um microeletrodo de registro conforme o método experimental, e o potencial de repouso (E_m) visualizado na tela do osciloscópio e no eletrômetro. A tabela IV-1 mostra a média dos potenciais de repouso para 174 células empaladas.

A fim de determinar os valores das resistências para cada célula das 174 citadas acima, pulsos de corrente de 0.5nA, 0.5Hz e 250ms de duração foram aplicados pelo estimulador de pulso quadrado. Através da aplicação da Lei de Ohm as resistências foram calculadas e a média obtida está na tabela I.

	<i>média ± EP</i>	<i>nº de células empaladas</i>
<i>E_m (mV)</i>	-46.8 ± 0.5	174
<i>R (MΩ)</i>	11.7 ± 0.3	174

TABELA IV-1. POTENCIAL DE REPOUSO (E_m) E RESISTÊNCIA ELÉTRICA (R) DAS CÉLULAS DE SERTOLI.

IV. 2. REGISTRO ELETROFISIOLÓGICO DO POTENCIAL DE REPOUSO DE CÉLULAS DE SERTOLI DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE TESTÍCULOS DE RATOS IMATUROS EM CONDIÇÕES BASAIS

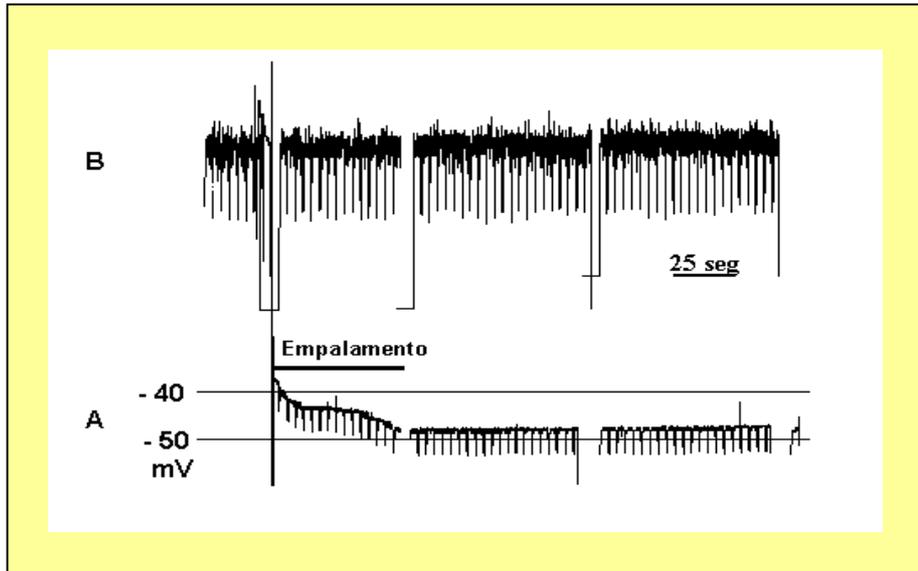


FIGURA IV-1 REGISTRO ELETROFISIOLÓGICO DE UMA CÉLULA DE SERTOLI DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE TESTÍCULO DE RATO IMATURO

- A. Comportamento de uma célula de Sertoli com $E_m = -48\text{mV}$ em condições basais
- B. Pulsos de corrente hiperpolarizante (0.5nA , 0.5Hz , 250ms duração). Fluxo da solução = $1\text{mL}/\text{min}$.

IV. 3. EFEITO DO KRb NO POTENCIAL DE REPOUSO DE CÉLULAS DE SERTOLI DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE TESTÍCULOS DE RATOS IMATUROS

Antes da realização dos experimentos, KRb foi adicionado às preparações como controle. Constatou-se que nenhuma modificação foi produzida nos parâmetros elétricos

basais das células de Sertoli. A figura IV-2 mostra a resposta típica de uma aplicação tópica de KRb em uma célula de Sertoli.

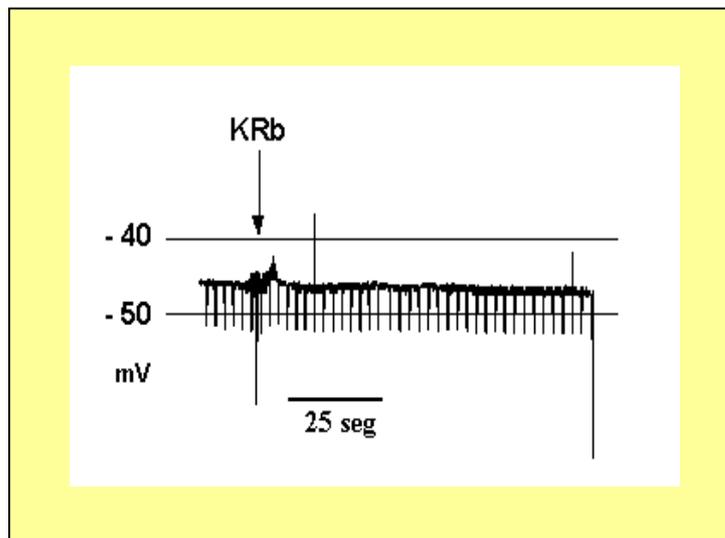


FIGURA IV-2 EFEITO DA APLICAÇÃO TÓPICA SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA DE CÉLULAS DE SERTOLI DE RATO DE 17 DIAS. RESPOSTA TÍPICA NUMA CÉLULA COM POTENCIAL DE REPOUSO DE $E_m = -47\text{mV}$.

IV. 4. EFEITO DA TESTOSTERONA NO POTENCIAL DE REPOUSO DE CÉLULAS DE SERTOLI DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE TESTÍCULOS DE RATOS IMATUROS

Foi observado o efeito da administração tópica de testosterona sobre os túbulos seminíferos de ratos de 17 dias. Pudemos observar que a testosterona produz uma despolarização imediata em células de Sertoli empaladas. Essa resposta aumenta com o tempo, atingindo seu máximo por volta de 5 minutos. A lavagem com KRb, fluxo de 1mL/min, leva o potencial de membrana a retornar a valores próximos aos valores de repouso em 5 minutos Fig IV-3.

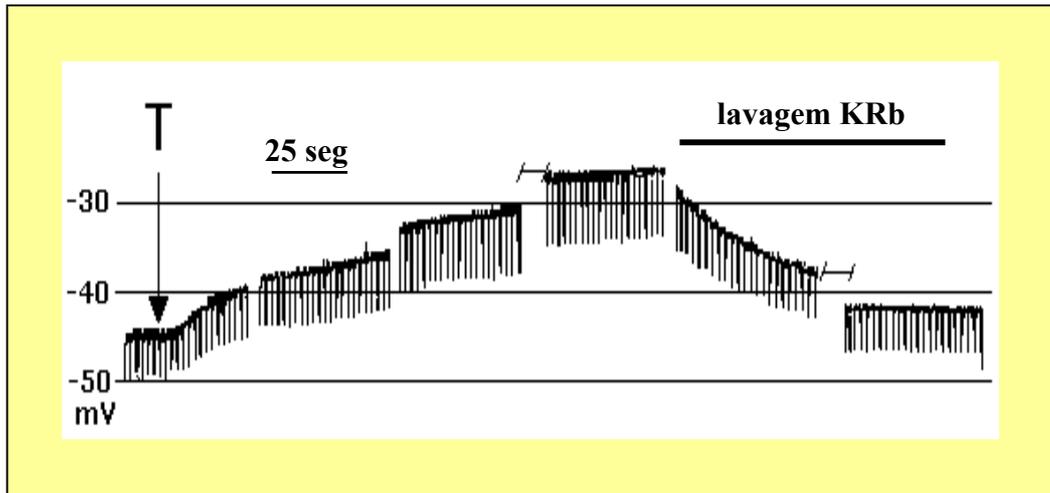


FIGURA IV-3 EFEITO DA TESTOSTERONA SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA DE CÉLULAS DE SERTOLI DE RATO DE 17 DIAS. RESPOSTA TÍPICA DE $10\mu\text{M}$ DE TESTOSTERONA NUMA CÉLULA COM POTENCIAL DE REPOUSO DE $E_m = -46\text{mV}$.

IV. 5. EFEITO DO 17β -ESTRADIOL E DA PROGESTERONA NO POTENCIAL DE REPOUSO DE CÉLULAS DE SERTOLI DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE TESTÍCULOS DE RATOS IMATUROS

Para avaliarmos a especificidade do efeito da testosterona, realizamos testes com outros dois esteróides: 17β -estradiol e progesterona. A aplicação tópica de $10\mu\text{M}$ de 17β -estradiol ou de progesterona produziu uma pequena e não significativa hiperpolarização aos 30 segundos (Fig.IV-4 e Fig. IV-5). A variação observada no potencial de membrana foi de $0,43 \pm 0,37 \text{ mV}$ ($n=7$) para o 17β -estradiol e de $0,33 \pm 0,37 \text{ mV}$ ($n=9$) para a progesterona. O potencial de membrana voltou aos valores normais dentro de 1 minuto. A aplicação de testosterona 10 minutos depois da administração de 17β -estradiol ou progesterona, causou a despolarização observada normalmente com este andrógeno (resultado não mostrado).

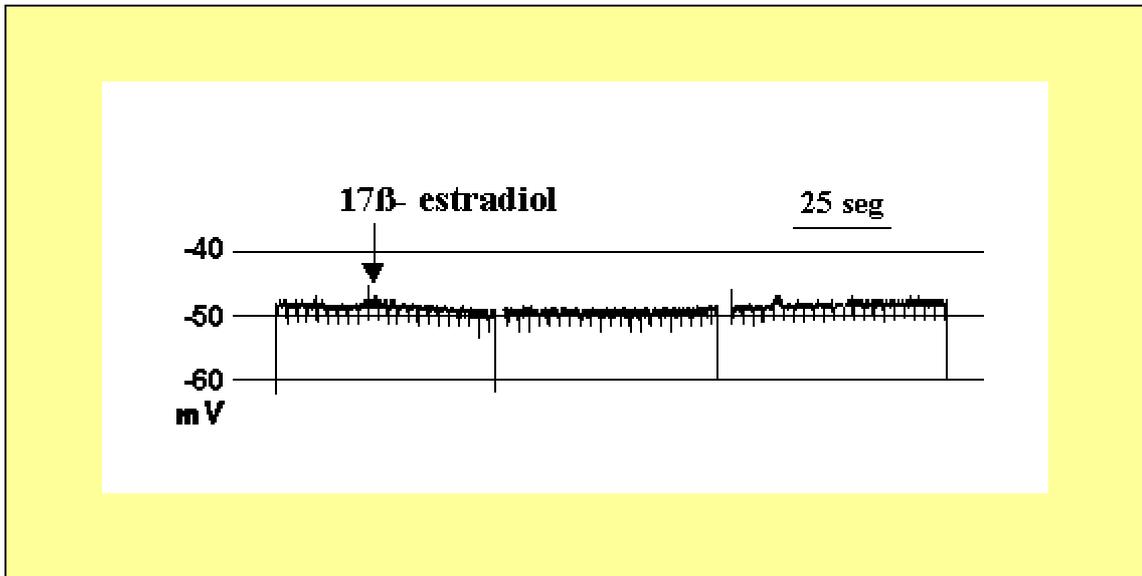


FIGURA IV-4 EFEITO DO 17β -ESTRADIOL SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA DE CÉLULAS DE SERTOLI DE RATO DE 17 DIAS. RESPOSTA TÍPICA DE $10\mu\text{M}$ DE 17β -ESTRADIOL NUMA CÉLULA COM POTENCIAL DE REPOUSO DE $E_m = -49\text{mV}$.

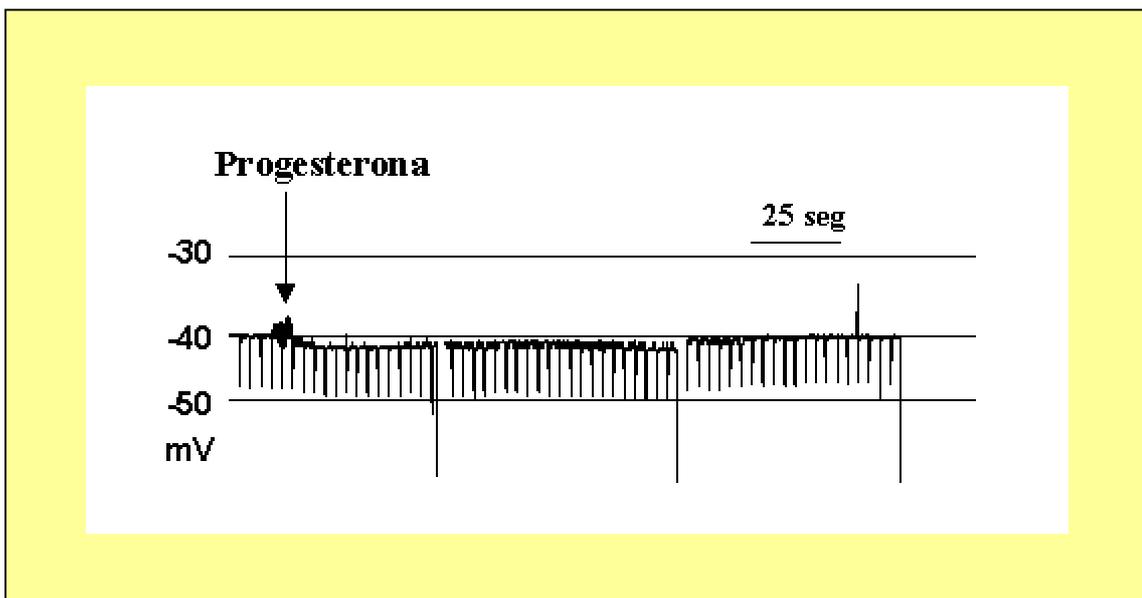


FIGURA IV-5 EFEITO DA PROGESTERONA SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA DE CÉLULAS DE SERTOLI DE RATO DE 17 DIAS. RESPOSTA TÍPICA DE $10\mu\text{M}$ DE PROGESTERONA NUMA CÉLULA COM POTENCIAL DE REPOUSO DE $E_m = -40\text{mV}$.

IV. 6. EFEITO DA TESTOSTERONA NO POTENCIAL DE REPOUSO DE CÉLULAS DE SERTOLI DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE TESTÍCULOS DE RATOS ENRIQUECIDOS EM CÉLULAS DE SERTOLI DE DIFERENTES ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO

Foi feita uma comparação do efeito da testosterona em diferentes estágios de maturação de testículos de ratos enriquecidos em células de Sertoli. A fig IV-6 mostra que houve uma despolarização significativa produzida por 40 μ g/mL em células de Sertoli de ratos pré-púberes (15-21 dias de vida) e ratos púberes (27-33 dias de vida). Em testículos adultos (45-60 dias de vida) a testosterona foi ineficiente.

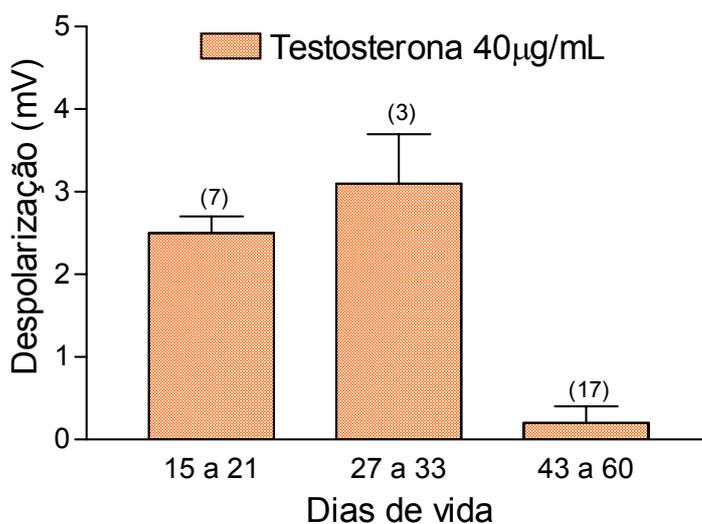


FIGURA IV-6 EFEITO DA TESTOSTERONA SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA DE CÉLULAS DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE TESTÍCULOS SCE DE RATOS DE DIFERENTES ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO (MÉDIA \pm EP; NÚMERO DE CÉLULAS EM PARÊNTESES)

IV. 7. EFEITO DA TESTOSTERONA NO POTENCIAL DE REPOUSO DE CÉLULAS DE SERTOLI DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE TESTÍCULOS DE RATOS IMATUROS

Com base nos resultados já descritos, foi decidida a utilização de ratos imaturos, de 16 a 18 dias. Foi elaborada então uma curva de dose de testosterona. A fig IV-7 mostra esquematicamente os perfis de resposta obtidos por diferentes concentrações de testosterona e pela lavagem subsequente. Em todas as concentrações testadas, a seqüência das respostas foi similar, diferenciando-se apenas suas intensidades.

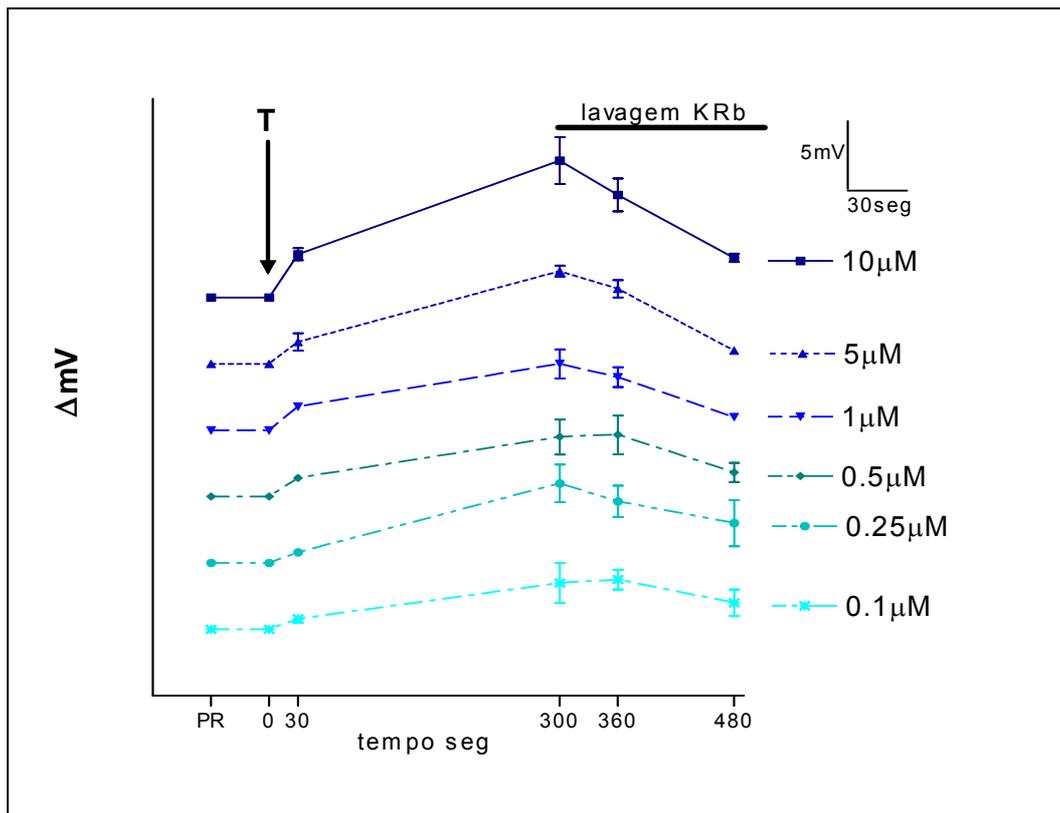


FIGURA IV-7 SEQÜÊNCIA ESQUEMÁTICA DE TEMPO DAS RESPOSTAS DO POTENCIAL DE MEMBRANA A DIFERENTES DOSES DE TESTOSTERONA

A figura IV-8 mostra as modificações em 30 segundos, do potencial de membrana (A) e da resistência da membrana (B) produzidas por diferentes concentrações de testosterona.

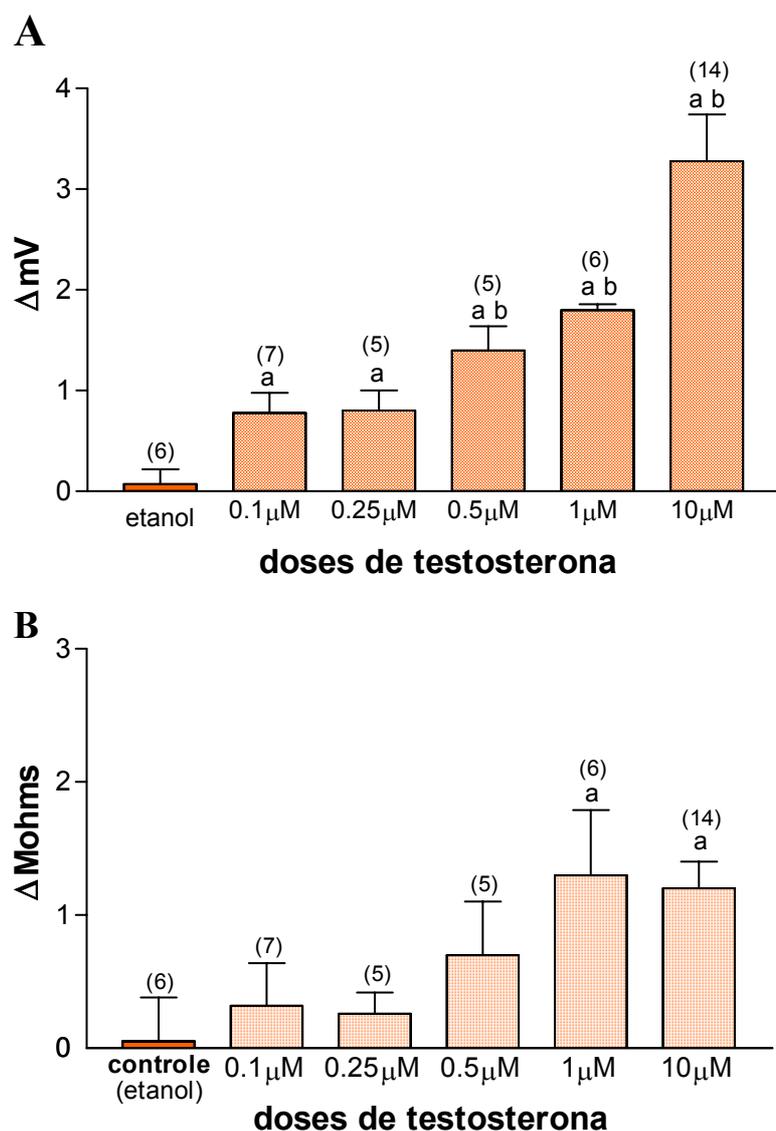


FIGURA IV-8 EFEITO DE DIFERENTES DOSES DE TESTOSTERONA NO POTENCIAL DE MEMBRANA (A) E RESISTÊNCIA DE MEMBRANA (B) EM 30 SEGUNDOS. EM PARÊNTESES NÚMERO DE AMOSTRAS. a-TESTE-t PAREADO (REPOUSO VS. TESTOSTERONA PARA CADA CÉLULA) ($P < 0.02$); b-ANOVA COM PÓS-TESTE BONFERRONI ($P < 0.05$)

Os valores se alteram de forma dose dependente. Aplicando-se o teste t pareado nos grupos tratados, comparando-se o potencial de repouso de uma célula e o potencial de membrana registrado 30 segundos após aplicação da testosterona na mesma célula, a ação de todas as doses de testosterona usadas se mostraram significativas, com $p < 0.02$. Aplicando-se ANOVA, as variações entre o controle (etanol) e os tratamentos aos 30 segundos foram consideradas extremamente significativas ($p < 0.0001$).

IV.8. AÇÃO DA GLIBENCLAMIDA E DA DIAZOZIDA NOS PARÂMETROS ELETROFISIOLÓGICOS DE CÉLULAS DE SERTOLI DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE TESTÍCULOS DE RATOS IMATUROS

Para avaliarmos o envolvimento dos canais de K_{ATP} na ação da testosterona, utilizamos o agonista de canais de K_{ATP} , diazoxida e o antagonista desses canais, glibenclamida.

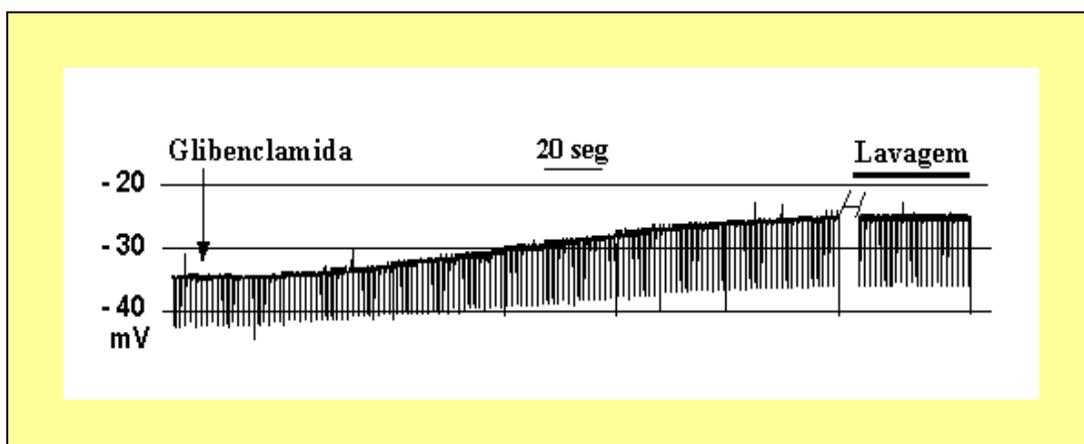


FIGURA IV-9 EFEITO DA GLIBENCLAMIDA SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA DE CÉLULAS DE SERTOLI DE RATO DE 17 DIAS. RESPOSTA TÍPICA DE $10\mu\text{M}$ DE GLIBENCLAMIDA NUMA CÉLULA COM POTENCIAL DE REPOUSO DE $E_m = -35\text{mV}$.

Glibenclamida, na dose de 10 μ M, despolarizou a membrana e aumentou a sua resistênça depois de uma latência de 1 minuto e essas modificações foram irreversíveis com a lavagem (FigIV-9 e figIV-10).

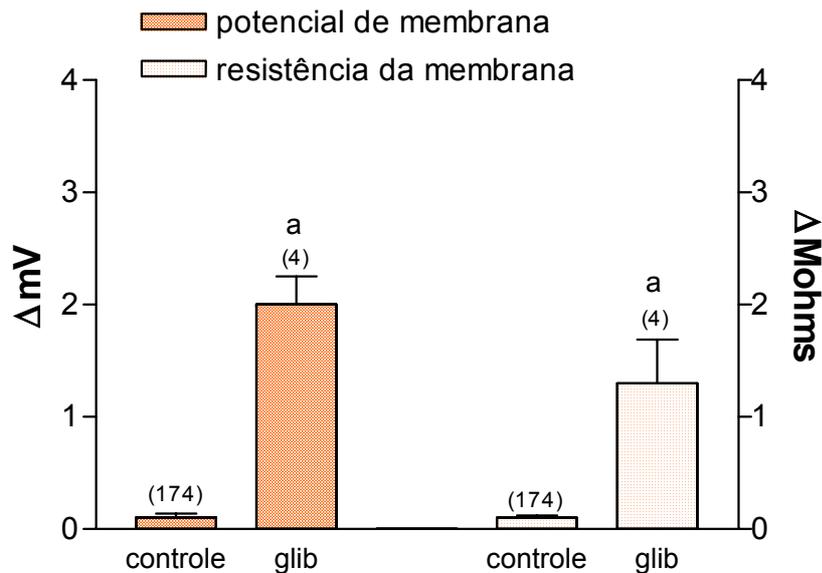


FIGURA IV-10 AÇÃO DA GLIBENCLAMIDA (10 μ M) NO POTENCIAL DE MEMBRANA E RESISTÊNCIA DA MEMBRANA DE CÉLULAS DE SERTOLI EM 1 MINUTO. EM PARÊNTESES NÚMERO DE AMOSTRAS. a-TESTE-t ($p<0.05$).

A perfusão dos túbulos com KRb com diazoxida, causou a hiperpolarização do potencial de membrana. Esse efeito foi visível com doses de 250 e 400 μ M. A concentração de 400 μ M anulou o efeito da testosterona em 30 segundos como mostram as figuras IV-11 e IV-12. Doses menores de diazoxida diminuíram a despolarização da testosterona sem suprimi-la totalmente.

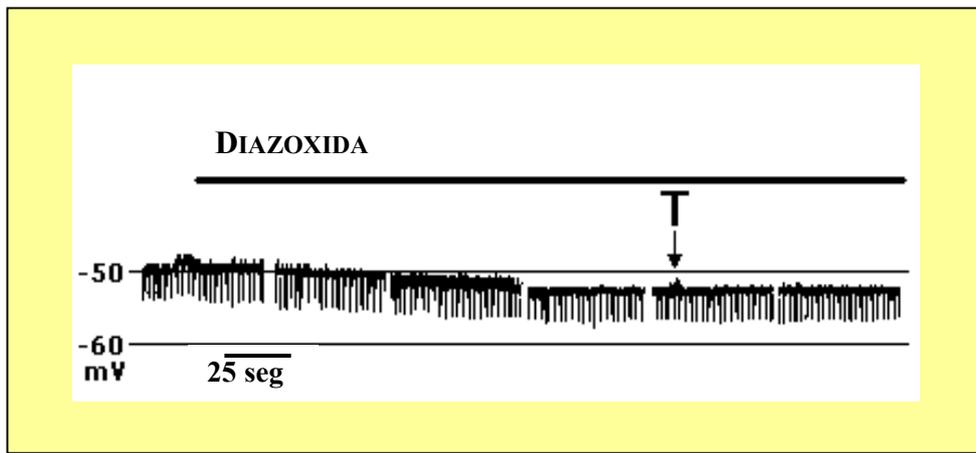


FIGURA IV-11 AÇÃO DA DIAZOXIDA ($400\mu\text{M}$) NO POTENCIAL DE MEMBRANA DE CÉLULAS DE SERTOLI E SEU EFEITO PREVENTIVO NA AÇÃO DA TESTOSTERONA ($10\mu\text{M}$). RESPOSTA TÍPICA NUMA CÉLULA COM POTENCIAL DE REPOUSO $E_m = -49\text{mV}$.

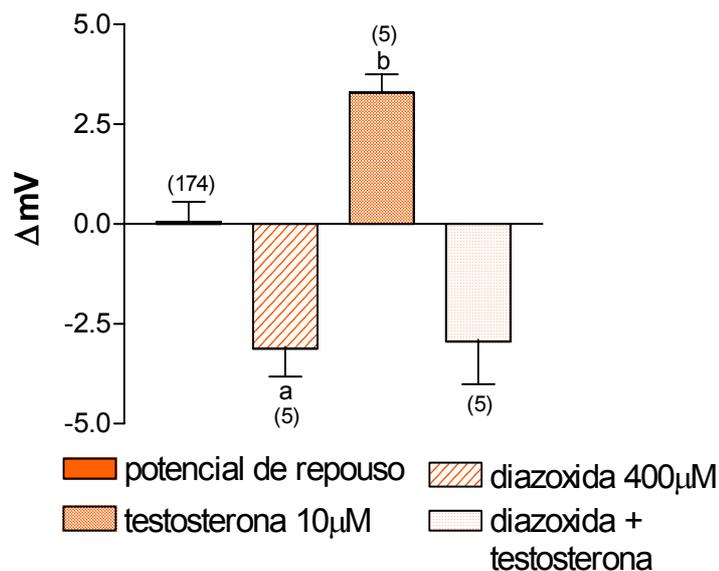


FIGURA IV-12 MODIFICAÇÃO PRODUZIDA NO POTENCIAL DE REPOUSO PELA DIAZOXIDA ($400\mu\text{M}$), PELA TESTOSTERONA ($10\mu\text{M}$) E PELA DIAZOXIDA+TESTOSTERONA (MÉDIAS \pm ERRO PADRÃO). EM PARÊNTESES NÚMERO DE AMOSTRAS. **a**-POTENCIAL DE REPOUSO VS. DIAZOXIDA $P=0.02$; **b**-POTENCIAL DE REPOUSO VS. TESTOSTERONA $P=0.0001$; DIAZOXIDA VS. DIAZOXIDA + TESTOSTERONA = NS.

IV. 9. EFEITO DA RETIRADA DO CLORETO (Cl⁻) NA AÇÃO DA TESTOSTERONA NOS PARÂMETROS ELETROFISIOLÓGICOS DE CÉLULAS DE SERTOLI DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE TESTÍCULOS DE RATOS IMATUROS

Para avaliarmos o envolvimento do Cl⁻ na ação da testosterona, retiramos este íon do meio extracelular substituindo o cloreto de sódio do tampão KRb por gluconato de sódio. Como mostra a figIV-13, a perfusão dos túbulos seminíferos com KRb com baixo Cl⁻ não alterou o efeito despolarizante da testosterona.

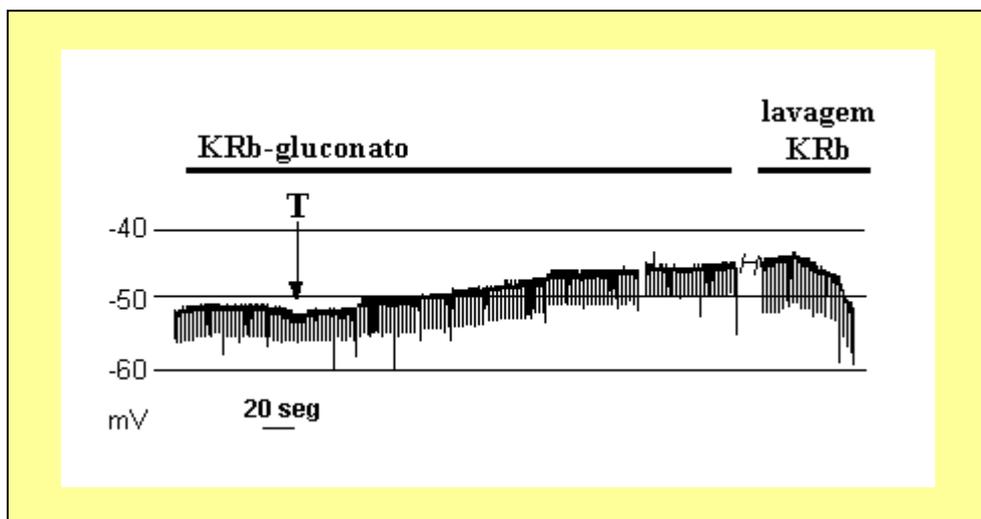


FIGURA IV-13 AUSÊNCIA DE EFEITO DA FALTA DE Cl⁻ NA AÇÃO DESPolarIZANTE DA TESTOSTERONA (10 μ M) EM CÉLULAS DE SERTOLI. RESPOSTA TÍPICA NUMA CÉLULA COM POTENCIAL DE REPOUSO Em= -51mV.

IV. 10. EFEITO DO VERAPAMIL NA AÇÃO DA TESTOSTERONA NOS PARÂMETROS ELETROFISIOLÓGICOS DE CÉLULAS DE SERTOLI DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE TESTÍCULOS DE RATOS IMATUROS

Para avaliarmos o envolvimento dos canais de cálcio no efeito da testosterona, utilizamos o verapamil, uma fenilalquilamina bloqueadora dos canais de cálcio dependentes de voltagem (CCDV) tipo L. Seus efeitos sobre os parâmetros eletrofisiológicos das células de Sertoli e sobre os efeitos da testosterona está sendo investigado em nosso laboratório, e os nossos resultados preliminares (Fig IV-14 indicam que ele bloqueia parcialmente seus efeitos.

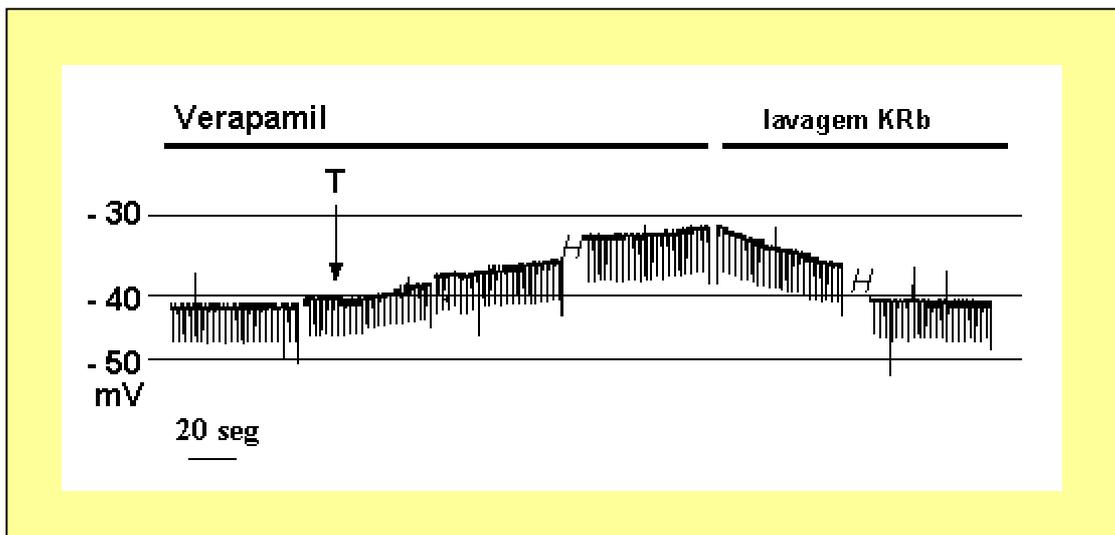


FIGURA IV-14 AÇÃO DO VERAPAMIL ($2,5\mu\text{M}$) NO POTENCIAL DE MEMBRANA DE CÉLULAS DE SERTOLI E SEU EFEITO AMENIZADOR NA AÇÃO DA TESTOSTERONA ($10\mu\text{M}$). RESPOSTA TÍPICA NUMA CÉLULA COM POTENCIAL DE REPOUSO $E_m = -42\text{mV}$.

IV. 11. EFEITO DA TESTOSTERONA NO TRANSPORTE DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$ EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DE DIFERENTES ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO

A resposta de células de Sertoli isoladas de ratos de 20, 30, 45 e 60 dias de idade foi testada quanto ao transporte de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 1 minuto após a aplicação de testosterona (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Como mostra a tabela IV-2 houve um estímulo em todas as idades testadas.

<i>Dias de vida</i>	<i>Controle</i>	<i>Testosterona</i>
20	3.2 \pm 0.3	4.27 \pm 0.2*
30	27.8 \pm 0.7	36.9 \pm 1.04*
45	27.5 \pm 2.2	36.9 \pm 1.1*
60	48.6 \pm 2.4	59.0 \pm 2.9*

* $p < 0.05$ quando comparado como basal para cada idade, $n=5$ para cada grupo

TABELA IV-2 AÇÃO DA TESTOSTERONA (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) NA CAPTAÇÃO DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$ EM CÉLULAS DE SERTOLI ISOLADAS DE RATOS DE DIFERENTES IDADES (pmoles/mg DE PROTEÍNA).

Observamos que a testosterona, em células de Sertoli isoladas, estimulou a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em aproximadamente 30% em todas as idades testadas, da pré-puberdade à idade adulta, como mostrado na figura IV-15.

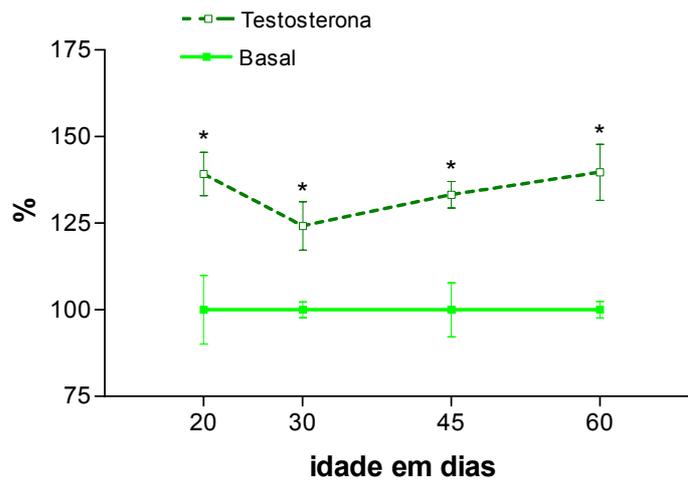


FIGURA IV-15 EFEITO DA TESTOSTERONA ($10\mu\text{g/mL}$), EM PORCENTAGEM, NA CAPTAÇÃO DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$ EM CÉLULAS DE SERTOLI ISOLADAS DE RATOS DE DIFERENTES IDADES. (MÉDIA \pm EP; N=5). * $P < 0.05$ QUANDO COMPARADO COM BASAL.

IV. 12. EFEITO DA TESTOSTERONA NO TRANSPORTE DE [¹⁴C]MEAIB EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS DE DIFERENTES ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO

Foi testado o efeito da testosterona (10µM/mL) no transporte do aminoácido modelo [¹⁴C]MeAIB em células isoladas de diferentes estágios de maturação. A figura IV-16 mostra que a testosterona foi ineficiente em estimular o transporte desse aminoácido em qualquer das idades testadas.

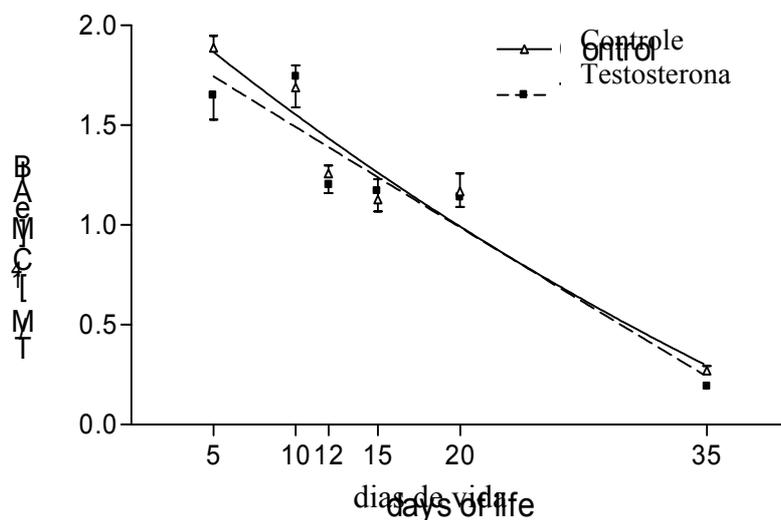


FIGURA IV-16 AÇÃO DA TESTOSTERONA (10µg/mL) NO TRANSPORTE DE [¹⁴C]MEAIB EM TESTÍCULOS DE RATOS DE DIFERENTES IDADES (MÉDIAS ± EP). PARA 5 E 15 DIAS, N=11, TODAS AS OUTRAS IDADES, N=6. ANOVA - NS.

V. DISCUSSÃO

A função primordial da célula de Sertoli é criar um ambiente apropriado para o desenvolvimento das células germinativas. Para desempenhar sua função, esta célula está sob o comando de vários hormônios, fatores de crescimento, vitaminas e proteínas, além de manter uma sinalização neuro-endócrina e uma inter-relação muito estreita com as células de Leydig, as peritubulares e as germinativas. Para que os efeitos moleculares e celulares da estimulação de hormônios e outras substâncias sejam esclarecidos, é importante definir os mecanismos de sinalização através dos quais eles atuam e interagem.

O objetivo primário deste trabalho foi estudar o efeito rápido da testosterona, principal andrógeno circulante nos machos, sobre as células de Sertoli. Para tanto lançamos mão de diversas abordagens, usando desde células isoladas, túbulos seminíferos isolados até testículos inteiros, e observando diferentes parâmetros: transporte de aminoácidos, captação de cálcio e registro elétrico intracelular, que se vale dos gradientes iônicos e elétricos, através da superfície da membrana, para estudar as variações evocadas pelo hormônio sobre o potencial de repouso e a resistência da célula.

Efeito da testosterona no transporte de aminoácidos em testículos de ratos de diferentes idades

É bem conhecido que a testosterona estimula a síntese de proteína nas células de Sertoli. Em córtex renal de rato, a testosterona estimula o transporte de aminoácidos, além da excitose e do transporte de hexose (KOENIG *et al.*, 1989). No entanto, no presente trabalho a testosterona não estimulou o transporte de aminoácidos em células de testículos de ratos de nenhuma idade estudada, de 5 a 35 dias (Fig. IV-16). Essa característica da testosterona difere do FSH, do retinol e do isoproterenol, que estimulam a síntese protéica

e o transporte de aminoácidos em células de ratos de 5 a 25 dias (WASSERMANN *et al.*, 1992; SILVA *et al.*, 1995; WASSERMANN *et al.*, 1996; LOSS *et al.*, 1998).

Efeito da testosterona na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em células isoladas de testículos de ratos de diferentes idades

Nos últimos anos, uma variedade de efeitos de membrana têm sido documentada para diversas classes de esteróides tais como progesterona (BALDI *et al.*, 1995; BRUCKER *et al.*, 1995), estrógeno (AUDY *et al.*, 1996; ŻYLIŃSKA, *et al.*, 1999), corticosterona (IBARROLA *et al.*, 1991), aldosterona (WEHLING *et al.*, 1994; SCHNEIDER *et al.*, 1997; ESTRADA *et al.*, 2000), e vitamina D (NEMERE, 1995). Vários desses esteróides induzem elevações transitórias de cálcio intracelular dentro de 1 minuto, e muitos autores vêm explicando esse fenômeno postulando a existência de receptores para esteróides na membrana plasmática que diferem dos receptores nucleares.

Andrógenos também são capazes de induzir fluxos rápidos de cálcio numa variedade de tipos celulares, incluindo células de câncer de próstata humano (LNCaP) (STEINSAPIR *et al.*, 1991; LYNG *et al.*, 2000), em miócitos de ratos (KOENIG *et al.*, 1989), em osteoblastos de ratos machos (mas não de fêmeas) (LIEBERHERR & GROSSE, 1994), em células T de camundongo, nas quais não pôde ser demonstrada a presença do receptor funcional de andrógenos clássico (BENTEN *et al.*, 1997; BENTEN *et al.*, 1999), e em células de músculo esquelético (ESTRADA, *et al.*, 2000). Recentemente foi demonstrado que células da granulosa humana apresentam uma resposta de cálcio à androstenediona, mas não à testosterona (MACHELON *et al.*, 1998).

Em nossos experimentos, a testosterona estimulou a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em células de Sertoli isoladas em 1 minuto. A captação basal de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ variou com a idade dos ratos. No entanto, a ação estimulatória da testosterona na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em porcentagem (%) foi

independente da idade, como mostra a fig IV-15. Esses resultados estão de acordo com o encontrado por GORCZYNSKA & HANDESLMAN, 1995, e LYNG et al., 2000, que mostraram aumento rápido de cálcio intracelular sob ação da testosterona, seu análogo R1881, e dihidrotestosterona em células de Sertoli de ratos.

Características elétricas basais das células de Sertoli

Com a utilização da técnica de registro intracelular foram obtidos alguns dados eletrofisiológicos básicos para as células de Sertoli. Observamos, com o empalamento de 174 células, um potencial de membrana de -46.8 ± 0.5 mV (tabela IV-1).

Nos histogramas apresentados no trabalho de EUSEBI e colaboradores, 1983, onde foram comparados túbulos de testículos normais e de testículos enriquecidos em células de Sertoli (SCE), é possível observarmos dois picos de potenciais de membrana em repouso de células de túbulos seminíferos de testículos normais: um com valores girando em torno de -20 mV a -25 mV, e outro com valores ao redor de -40 mV a -45 mV. Este último pico é também predominante no histograma de potenciais de membrana em repouso de células de túbulos enriquecidos em células de Sertoli (SCE). Em um trabalho de LOSS e colaboradores, 1998, observou-se um potencial de membrana de repouso em túbulos SCE de ratos de 15 dias de -51 ± 0.4 mV (n=121), com valores variando de -30 mV a -65 mV. Considerando esses dados, e visando excluir uma possível fonte de erro por causa da população heterogênea dos túbulos seminíferos aqui utilizados, nós trabalhamos apenas com células que apresentavam um potencial de repouso mais negativo que -35 mV. Desta forma, a chance de estarmos trabalhando com células que não sejam células de Sertoli foi reduzida.

A resistência basal da membrana encontrada em 174 células empaladas foi de 11.7 ± 0.3 M Ω . A determinação dos valores de resistência celular é importante pois representa

uma maneira adicional de verificar os efeitos de hormônios no movimento de íons através de seus canais. O método de estudo usual consiste em determinar a resistência basal da célula empalada e então medir a resistência da mesma célula após a aplicação de alguma substância. Dessa forma, verificamos se a substância adicionada evocava um aumento ou redução na resistência basal.

A fim de determinarmos os valores de resistência para cada célula, pulsos de corrente de 0.5nA, a cada 2 segundos (0.5Hz) de 250ms de duração eram aplicados. A corrente consistia de um pulso quadrado hiperpolarizante. A fig.IV-1B ilustra pulsos de corrente hiperpolarizantes de 0.5nA de intensidade e 250ms de duração aplicados a uma célula de -45mV . O efeito destes pulsos sobre o potencial de repouso pode ser observado no traço A da figIV-1.

Os valores de resistência basal encontrados no presente trabalho em túbulos normais são mais baixos que os encontrados em túbulos SCE (WASSERMANN *et al.*,1992; LOSS *et al.*,1998). Resultados semelhantes foram encontrados por EUSEBI e colaboradores, 1983. Essa resistência baixa é uma evidência do acoplamento elétrico existente entre as células de Sertoli no túbulo seminífero, e o fato dela ser menor em túbulos normais do que SCE, é uma indicação de que exista também o acoplamento elétrico entre células de Sertoli e células germinativas (EUSEBI *et al.* 1983). Por este motivo usamos túbulos seminíferos inteiros no presente trabalho, num esforço de preservar as junções do tipo “gap” das células de Sertoli imaturas. Desta forma, o meio ambiente das células nos túbulos foi mantido o mais próximo possível de sua integridade funcional.

Com a finalidade de descartar qualquer artefato ou interferência devidos à utilização dos equipamentos eletrofisiológicos, antes de adição do hormônio e dos agonistas e antagonistas, um registro basal era obtido. Para certificarmos que o efeito constatado pelo uso de determinada substância era inerente à mesma, antes de cada

experimento KRb era adicionado à preparação como controle. Observava-se apenas uma interferência no sinal devido à presença da mão do experimentador dentro da gaiola de Faraday durante a aplicação (fig.IV-2).

Efeito da testosterona no potencial de repouso da célula de Sertoli

O testículo tem duas funções importantes: a produção de espermatozoides e a síntese de testosterona. O controle de ambas funções é guiado pelo sistema nervoso central (SNC) numa alça de feedback endócrina clássica, onde o hormônio foliculo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH) são os sinais hormonais chave. O LH atua primariamente sobre as células de Leydig no interstício testicular para promover a síntese de testosterona, enquanto o FSH atua principalmente nas células de Sertoli e células germinativas estimulando a espermatogênese. A secreção de FSH e de LH na pituitária anterior é regulada por sinais hormonais tanto do SNC como das gônadas, incluindo a testosterona e seus metabólitos e a inibina. Enquanto o LH não tem ações diretas conhecidas no epitélio seminífero, ele o faz indiretamente ao estimular o aumento dos níveis intratesticulares de testosterona.

Assim sendo, a espermatogênese depende da ação conjunta do FSH e da testosterona na célula de Sertoli, que serve como mediadora dos efeitos destes hormônios nas células germinativas. O FSH, hormônio peptídico, atua através de mecanismos clássicos de receptores de hormônios protéicos, envolvendo um receptor transmembrana associado à proteína G. Depois da ligação do hormônio, a adenilato ciclase é ativada, levando à um aumento em AMPc intracelular, que ativa fosforilações mediadas por proteínas quinase e os efeitos celulares da gonadotrofina (AMORY & BREMNER, 2001). A testosterona, hormônio esteróide, tem seu principal mecanismo de ação via receptores de alta afinidade no núcleo que ativam a transcrição de DNA.

Apesar de apresentarem mecanismos moleculares tão distintos, o FSH e a testosterona atuam em alguns eventos bioquímicos de maneira sinérgica nas células de Sertoli durante a espermatogênese (GORCZINSKA & HANDELSMAN, 1995). A vitamina A (retinol) também é essencial para a manutenção da espermatogênese, e os receptores para retinóides são funcional e estruturalmente relacionados aos receptores dos hormônios esteróides e tireoideanos (VIEIRA *et al.*,1995). Conforme estudos realizados por WASSERMANN e colaboradores, 1993, o retinol tem efeitos similares ao FSH em vários processos metabólicos na célula de Sertoli: o retinol estimula o transporte de aminoácidos em células de Sertoli, através do sistema A de transporte e de um mecanismo que envolve canais de cálcio dependentes de voltagem. Além disso, assim como o FSH, o efeito estimulatório do retinol no transporte de aminoácido é independente da síntese protéica *de novo* (SILVA *et al.*,1995). Foi também verificado que o retinol produz respostas oscilatórias imediatas (< 1s) no potencial de membrana de células de Sertoli. Portanto, esses resultados indicam que além de seu efeito nuclear clássico, o retinol estimula um mecanismo periférico produzindo fenômenos diretamente relacionados com a membrana plasmática.

Além dessas, há várias evidências experimentais recentes que indicam que alguns esteróides, adicionalmente à suas ações genômicas bem documentadas, podem produzir efeitos rápidos não-genômicos, e são moduladores potentes de proteínas da membrana plasmática, incluindo canais iônicos dependentes de voltagem e de ligantes ou receptores ligados à proteína G (ZILINSKA *et al.*,1999). A interação dos esteróides com a membrana plasmática produz vários efeitos imediatos (1-60 segundos). WEHLING e colaboradores, 1994 descreveram efeitos rápidos da aldosterona (30s) no movimento de cálcio livre intracelular em células de músculo vascular liso e células endoteliais. Em osteoclastos de ratos machos, a testosterona aumenta o cálcio intracelular em 5 segundos através do

aumento de influxo de cálcio. Ela também aumentou a formação de IP3 e DAG nessas células em 10 segundos (LIBERHERR & GROSSE, 1994). Os resultados de BENTEN e colaboradores, 1999, fornecem evidências experimentais para a presença de locais de 'binding' de receptores de testosterona ligados funcionalmente à canais de Ca^{2+} na membrana plasmática. Usando aplicações microiontoforéticas, ORSINI e colaboradores, 1985, observaram que a testosterona aumenta dentro de segundos a frequência de pulsos de mais da metade dos neurônios testados no hipotálamo lateral de rato macho. YAMADA, 1979, usando ratos machos adultos, observou que aplicações eletroforéticas de testosterona em neurônios individuais no hipotálamo anterior e no núcleo septal, resultou num aumento da frequência de disparos com uma latência na resposta de 2-30 segundos. Em células de Sertoli, a testosterona produz um aumento imediato na concentração de cálcio (GORKZYNSKA & HANDELSMAN, 1995; LYNG *et al.*, 2000).

Tendo em vista o cenário de evidências acima descrito, buscamos neste trabalho abordar os efeitos rápidos da testosterona nos fluxos iônicos na célula de Sertoli, usando uma metodologia que proporciona uma visão abrangente do fenômeno, a eletrofisiologia.

A figura IV-3 ilustra uma resposta eletrofisiológica típica na membrana plasmática de células de Sertoli de ratos de 16-19 dias à uma aplicação tópica de testosterona ($10\mu\text{M}$). Pode-se observar um nítido efeito despolarizante imediato, que chega a seu ponto máximo aos 5 minutos aproximadamente, e o retorno do potencial de membrana ao nível próximo ao basal depois da lavagem com KRb. Esse resultado nos indica que a testosterona atua em canais da membrana plasmática de células de Sertoli por um mecanismo que, pela sua alta velocidade, dificilmente pode ser explicado como sendo através de sua ação nos receptores nucleares clássicos.

Efeito do 17 β -estradiol e da progesterona no potencial de membrana de células de Sertoli de ratos imaturos.

Com a intenção de confirmar que o efeito eletrofisiológico da testosterona não era devido à interações não-específicas do esteróide com a membrana plasmática, adicionamos à preparação outros dois esteróides, o 17 β -estradiol e a progesterona. Ambos hormônios, numa concentração de 10 μ M, não foram capazes de alterar significativamente o potencial de membrana das células, confirmando-se desta forma a especificidade da ação da testosterona (Fig IV-4 e IV-5).

Efeito da testosterona no potencial de membrana de células de Sertoli de ratos de diferentes estágios de maturação

Uma vez confirmada a ação da testosterona no potencial de membrana de células de Sertoli, avaliamos seu efeito em diferentes estágios de maturação testicular; pré-púberes (15-21 dias), púberes (27-33 dias) e adultos (43-60 dias). Nestes experimentos utilizamos testículos SCE, uma vez que testículos mais maduros têm maior número de células germinativas, que atrapalhariam o empalamento das células de Sertoli. A figura IV-6 mostra o efeito despolarizante da testosterona nos três grupos. Podemos observar que a testosterona foi estatisticamente significativa apenas em células de ratos pré-púberes e púberes. Baseando-se nesses resultados, optamos por usar ratos pré-púberes para os experimentos subseqüentes de eletrofisiologia.

Estudo de diferentes doses de testosterona nos parâmetros eletrofisiológicos de células de Sertoli

A espermatogênese ocorre quando os níveis testiculares de andrógenos são muito mais altos que os níveis periféricos de andrógenos. Apesar de a discussão à respeito da

quantidade mínima de testosterona necessária para a manutenção da espermatogênese ainda não estar finalizada, não há dúvidas que concentrações mais altas que as concentrações periféricas normais são necessárias. A concentração de testosterona dentro do testículo de rato é normalmente 30 a 40 vezes mais alta que no plasma (TURNER *et al.*, 1984) e precisa ser pelo menos 10 vezes mais alta que níveis plasmáticos normais para manter a espermatogênese quantitativamente normal (AWONIYI *et al.*, 1992). Como as células de Sertoli são centrais para a regulação da espermatogênese, é possível que certas funções específicas só sejam suficientemente estimuladas por essas altas concentrações de andrógenos.

As concentrações de testosterona usadas no presente trabalho que produziram uma resposta eletrofisiológica em células de Sertoli são similares às encontradas normalmente dentro dos testículos de ratos (0.2 – 0.3 μ M) (Fig. IV-7 e Fig. IV-8). Em testículos de ratos foram descritos valores de 0.2 – 0.25 μ M de testosterona (TURNER *et al.* 1984). Em sangue venoso testicular de ratos foram detectados 0.3 μ M de testosterona (MADDOCKS *et al.*, 1993). Em estudo recente, onde se utilizou uma técnica de coleta de fluido testicular minimamente invasiva, foram detectados 0.2 μ M de testosterona em ratos e 2.0 μ M em aspirado testicular de humanos (JARROW *et al.*, 2001).

Com nossos experimentos podemos concluir que a testosterona aplicada topicamente, em concentrações observadas em fluidos testiculares do rato, produz uma despolarização imediata tempo e dose dependente (figIV-7). Essa ação é estatisticamente significativa em 30 segundos (fig IV-8A). O efeito aumenta com o tempo, chegando ao seu máximo aos 5 minutos aproximadamente. Depois da lavagem com KRb, o potencial de membrana volta a valores próximos aos valores de repouso.

Vale a pena ser lembrado aqui que o padrão secretório de testosterona pelas células de Leydig no microambiente intersticial segue as características pulsáteis da

secreção de LH. Pela organização das células dentro do testículo, sua concentração próximo às células de Sertoli deve ser muito alta, o que tem um papel importante na regulação parácrina entre essas células.

HAKOLA e colaboradores (1998) observaram que liberações pulsáteis de LH, seguindo seu biorritmo, produzem *quanta* de testosterona secretados em ratos machos. MULLIGAN e colaboradores (1997) mostraram que rajadas secretórias de testosterona seguem o modo pulsátil de secreção de LH, e WINTERS e colaboradores (1999) descreveram que a testosterona e outros esteróides são co-secretados no interstício testicular em resposta a secreção pulsátil de LH. Em touros, foi demonstrado que também os níveis de testosterona periférica circulante são pulsáteis, seguindo o padrão do ritmo secretório do LH (DIXIT *et al.*, 1998).

Todos esses dados indicam a presença de concentrações muito altas de testosterona na porção basal das células de Sertoli, seguindo as rajadas de secreção hormonal. Em nossos experimentos usamos aplicações tópicas de testosterona com o intuito de mimetizar esses pulsos fisiológicos.

Em nossos experimentos, observamos que após a aplicação da testosterona, a resistência da membrana da célula empalada aumenta. Esse aumento se dá de forma dose dependente (fig IV-8B). O fato da resistência mostrar-se aumentada, significa que o fluxo de íons através da membrana se dá com maior dificuldade, ou seja, é um indicativo de que canais iônicos estão se fechando.

Efeito da glibenclamida no potencial de repouso da célula de Sertoli

A glibenclamida é um bloqueador de canais de K_{ATP} que pertence à classe das sulfoniluréias. Ela produz despolarização e estimula a captação de $^{45}Ca^{2+}$ e o transporte de aminoácidos em células de Sertoli (MIRANDA, *et al.*, 1998) e interfere com canais de cloreto reguladores de condutância transmembrana da fibrose cística (CFTR) (SHEPPARD & ROBINSON, 1997). Em nossos experimentos ela evocou uma despolarização da membrana e aumentou sua resistência depois de uma latência de 1 minuto (fig IV-9 e IV-10). Essa ação é homóloga à resposta eletrofisiológica da testosterona nas células de Sertoli, o que sugere um possível envolvimento dos canais de K_{ATP} na resposta da testosterona.

Efeito da diazoxida na ação da testosterona no potencial de membrana de células de Sertoli

A diazoxida é um agonista de canais de K_{ATP} . A superfusão dos túbulos com diazoxida em doses 250 e 400 μ M causou uma hiperpolarização do potencial de membrana das células de Sertoli. (fig IV-11 e fig IV-12). Esse efeito está de acordo com o esperado para essa droga, uma vez que a abertura de canais de K^+ provocada pela diazoxida, leva à uma saída deste íon da célula direcionada pelo seu gradiente eletroquímico através da membrana. Com a saída de cargas positivas, o interior da célula torna-se mais negativo, o que se traduz numa hiperpolarização da membrana.

A aplicação de testosterona sobre células com seus canais de K_{ATP} ativados pela diazoxida, não causou nenhuma variação nos parâmetros eletrofisiológicos da célula empalada. (fig IV-11 e fig IV-12). Isso nos mostra que a diazoxida suprimiu totalmente os efeitos da testosterona sobre as células de Sertoli. Somando-se essa observação à de que a glibenclamida, ao fechar os canais de K_{ATP} , evoca uma resposta semelhante à da

testosterona, nos permite especular que há um envolvimento dos canais de K_{ATP} na ação deste hormônio. Adicionando-se à isso, o fato da ação desaparecer com a lavagem, é mais um indicativo de que a ação observada da testosterona se dá ao nível da membrana plasmática.

Em estudos com osteoclastos de galinhas (BRUBAKER & GAY, 1999) e ratos (OKABE *et al.*, 2000), o 17β -estradiol causou uma despolarização da membrana associada à uma redução da condutância, ou seja, um aumento na resistência. Em ambos estudos os autores sugerem que o 17β -estradiol exerce seu efeito atuando sobre canais de K^+ , indicando um efeito semelhante deste esteróide na membrana plasmática de osteoclastos.

Efeito da retirada do CF na ação da testosterona no potencial de membrana de células de Sertoli

Foi demonstrado que células de Sertoli expressam o regulador de condutância transmembrana da fibrose cística (CFTR) (BOOCKFOR *et al.*, 1998). Acredita-se que o CFTR funcione como um canal de Cl^- ativado por proteína quinase dependente de AMPc. Ele está localizado principalmente na membrana apical de células epiteliais polarizadas. É bem reconhecido que células de Sertoli secretam muitos dos componentes nutricionais e regulatórios que são responsáveis pela modulação e manutenção das células germinativas durante a espermatogênese. De fato, esses componentes formam muito do microambiente especializado dentro do túbulo seminífero que é necessário para o desenvolvimento adequado das células germinativas. Uma das funções mais importantes da célula de Sertoli em criar e manter esse microambiente, é o controle do balanço de fluídos. Em outros tecidos como pulmão, pâncreas e intestino, os canais de Cl^- CFTR têm um papel importante no transporte de fluídos e eletrólitos.

A aplicação de ATP sobre o lado apical de células de Sertoli em cultura causa um estímulo grande e sustentado de uma corrente de curto circuito (Ics). Sugere-se que esta corrente para dentro (uma corrente para dentro corresponde à um *influxo de cargas positivas* através da membrana celular) pode ser atribuída à secreção de Cl⁻ (KO *et al.*, 1998).

Em células de Sertoli-TM4, JUNGWIRTH *et al.*, 1997, descreveram que a despolarização causada pelo FSH foi totalmente abolida com a retirada do cloreto da perfusão. Assim sendo eles sugerem que o FSH é capaz de ativar uma condutância de cloreto nessas células.

Em duto eferente de ratos, observa-se uma corrente de curto circuito (Ics) que pode ser estimulada por forskolina (que aumenta o AMPc intracelular). Sugere-se que a maior parte dessa corrente se deve à secreção de ânions. A testosterona e a 5 α -dihidrotestosterona inibiram tanto a Ics basal como estimulada por forskolina dentro de 10-20 segundos, e essa inibição foi dose dependente, com IC₅₀ de aproximadamente 1 μ M, e inibição máxima com 10 μ M de testosterona. Os experimentos de substituição de íons indicaram que a queda na Ics depois da adição da testosterona se deve à queda da secreção de cloreto, já que a inibição foi prevenida pela retirada do cloreto da solução de banho (LEUNG, *et al.* 2001).

Ao substituímos o Cl⁻ pelo ácido orgânico gluconato no KRb de superfusão dos túbulos seminíferos, não observamos um efeito significativo na ação da testosterona (figIV-13). Tal resultado nos sugere que esse ânion não é essencial para o efeito despolarizante da testosterona nas células de Sertoli.

Efeito de bloqueadores de canais de Ca^{2+} na ação da testosterona no potencial de membrana de células de Sertoli

A fase despolarizante da alteração bifásica gerada pelo FSH no potencial de membrana das células de Sertoli é bloqueada por verapamil, um bloqueador de canais de Ca^{2+} tipo-L (WASSERMANN, *et al.* 1992). Adicionalmente, LALEVÉE e colaboradores, 1997, registraram em cultura de células de Sertoli uma corrente transitória para dentro. Como essa corrente foi suprimida na ausência de Ca^{2+} extracelular, os autores alegam que esse cátion seja o responsável pela corrente para dentro evocada por despolarizações na membrana. Essas correntes foram caracterizadas como correntes do tipo-T.

Canais de cálcio do tipo N também parecem estar presentes em células de Sertoli em cultura, já que a ω -conotoxina bloqueou a secreção de proteínas estimuladas por FSH nessas células (TARANTA, *et al.*, 1997).

Como já discutimos anteriormente, nossos resultados mostram que a testosterona estimula o transporte de $^{45}Ca^{2+}$ em células de Sertoli isoladas, e que a captação basal de $^{45}Ca^{2+}$ variou com a idade (Tabela IV-2), ao passo que a ação estimulatória da testosterona (em %) foi independente da idade (figIV-16). A dissociação do efeito da testosterona na captação de $^{45}Ca^{2+}$ e despolarização da membrana em células de ratos mais velhos que 34 dias, indica que é interessante estudar os canais de cálcio envolvidos na ação da testosterona durante o desenvolvimento.

O efeito do verapamil, uma fenilalquilamina bloqueadora dos canais de cálcio dependentes de voltagem (CCDV) tipo L, sobre os parâmetros eletrofisiológicos das células de Sertoli está sendo investigado, e os nossos resultados preliminares (Fig IV-14) indicam que ela bloqueia parcialmente seus efeitos. Isto sugere algum envolvimento dos canais de Ca^{2+} nesta ação da testosterona. Uma investigação mais completa sobre esse assunto está sendo realizada no nosso laboratório.

Como já foi discutido, os níveis de testosterona encontrados dentro dos testículos são muito mais altos que os níveis plasmáticos. A maioria dos efeitos de andrógenos são mediados pelo seu receptor nuclear, já bem caracterizado. Níveis de testosterona ao redor de 1nM, são suficientes para estimular o receptor nuclear de andrógenos, o que torna difícil o entendimento de como esses receptores podem responder a níveis mais altos de andrógenos quando eles já estão saturados. Um sistema alternativo de percepção de variações dos níveis de andrógenos acima do nível de saturação dos receptores nucleares poderia estar atuando em conjunto com os mesmos. Um possível sistema alternativo seriam os receptores não-genômicos de andrógenos. Vários efeitos não-genômicos de esteróides já foram descritos para praticamente todas as classes de esteróides (CHRIST *et al.*, 1999).

Sugere-se que, além dos já descritos receptores nucleares de esteróides, haja receptores de esteróides localizados na membrana plasmática. Para alguns esteróides tais receptores já foram identificados, dentre eles o de estrógeno (RAZANDI *et al.*, 1999), e o de progesterona (FALKENSTEIN *et al.*, 1998; LUCONI *et al.*, 1998; ROSSATO *et al.*, 1999).

No presente trabalho foram apresentados efeitos rápidos da testosterona: sua ação estimulatória na captação de cálcio, sua capacidade de alterar imediatamente o potencial de repouso das células de Sertoli, provocando uma despolarização, de maneira dose dependente e reversível com a lavagem. Além disso há indicações de que os canais de potássio dependentes de ATP estejam envolvidos nesta ação, e possivelmente os de cálcio voltagem dependentes do tipo L. Todas essas observações são mais um indicativo da presença de um mecanismo de ação na membrana plasmática da testosterona nas células de Sertoli.

Há cada vez mais evidências de que a membrana plasmática das células, não é apenas uma bicamada lipídica inerte, e os próprios lipídeos são hoje participantes ativos da vida celular. O conceito de mosaico-fluido de Singer-Nicholson de como a membrana celular é organizada ainda é o modelo adotado por livros texto. Porém, biofísicos acreditam que os lipídios existam em diferentes fases em bicamadas lipídicas modelo, incluindo gel, estado líquido ordenado e estado líquido desordenado, citados aqui em fluidez crescente. No estado gel, os lipídios estão semi-congelados, enquanto no outro extremo, no estado líquido desordenado, toda a bicamada lipídica é fluída, como foi proposto pelo modelo de Singer-Nicholson. Na fase líquida ordenada, os fosfolipídeos com cadeias de carbono saturadas, se agrupam firmemente com o colesterol, mas mesmo assim continuam móveis no plano da membrana. No entanto, apesar da caracterização biofísica detalhada do modelo de membranas, tem sido difícil demonstrar que os lipídeos existem nessas diferentes fases no complexo meio ambiente celular.

Porém, há mais de dez anos, surgiu a hipótese de balsas de lipídios ('lipid rafts'). Ela se originou de estudos sobre polaridade das células, e sua postulação central era a existência de grupamentos dinâmicos de colesterol e esfingolipídeos na camada exoplasmática da bicamada lipídica, formando balsas de lipídeos. A preponderância de cadeias de hidrocarbono saturadas em esfingolipídeos celulares, permite que o colesterol se intercale firmemente, numa organização semelhante à do estado líquido ordenado nos modelos de membrana. A membrana a volta das balsas de lipídeos é mais fluída, e consiste principalmente de fosfolipídeos com cadeias laterais insaturadas e colesterol. Em outras palavras, balsas de lipídeos formam fases líquido-ordenadas na bicamada lipídica, dispersas numa matriz líquido-desordenada de glicerolipídeos insaturados. Uma das mais importantes propriedades das balsas de lipídeos, é que podem incluir ou excluir proteínas

de maneira variável. O papel mais importante das balsas na superfície da célula pode ser sua função na transmissão de sinal (SIMONS & TOOMRE, 2000).

A visão atual sobre as balsas de lipídeos, é que se trata de estruturas especializadas da membrana plasmática, formando microdomínios que concentram uma variedade de moléculas sinalizadoras, incluindo receptores ligados à proteína G, proteínas G heterotriméricas e pequenas, adenilil ciclase, proteína quinase C (PKC), óxido nítrico sintase, além de receptores individuais, ativados por ligação do ligante. Se a ativação de um receptor se dá numa balsa de lipídeo, o complexo de sinalização está protegido de enzimas que não fazem parte da balsa, como as fosfatases de membrana, que de outra forma poderiam interferir na transmissão do sinal.

Têm sido propostos várias explicações para o significado da associação dessas moléculas sinalizadoras dentro dos microdomínios. Uma teoria é que servem como andaimes para o recrutamento de componentes de cascatas sinalizadoras, aumentando sua eficiência e ligando rapidamente os receptores a mais de um sistema sinalizador e assim, as interações em um microdomínio desses poderia compartimentalizar, modular e integrar sinais na membrana plasmática. Uma teoria alternativa é de que essas estruturas podem manter as moléculas sinalizadoras em seu estado inativo, até que se tornem ativas para liberar a mensagem, ou podem atrair componentes sinalizadores para finalizar o sinal do receptor (HUR & KIM, 2002).

Uma característica convergente nos modelos existentes, é que balsas individuais se agrupam em 'clusters' para conectar proteínas da balsa de modo a formar um complexo sinalizador. Apesar de estarmos numa fase em que é possível apenas a sugestão de hipóteses de trabalho, podemos vislumbrar que segundos mensageiros como fosfoinosítídeos ou esfingosídeos, estimulados por esteróides como por exemplo a progesterona (GOSH *et al.*, 1997) e a testosterona, poderiam influenciar no movimento e

comportamento das balsas ou ‘clusters’ de balsas, regulando a interação (‘cross-talk’) de diferentes cascatas sinalizadoras.

Tomando os resultados apresentados neste trabalho, podemos afirmar que a testosterona, ao interagir com a membrana plasmática das células de Sertoli, através de um possível receptor de membrana, fecha os canais de K^+ , o que leva à uma conseqüente despolarização da membrana plasmática. Além disso a testosterona estimula a entrada de Ca^{2+} nas células de Sertoli. Em células β do pâncreas, sulfoniluréias como tolbutamida e glibenclamida, que são amplamente usadas no tratamento de diabetes mellitus não dependente de insulina, fecham os canais de K^+ , esse fechamento produz uma despolarização da membrana das células β , o que leva à abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem, permitindo a entrada de Ca^{2+} . Esse aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} dispara a exocitose dos grânulos de insulina (MIKI *et al.*, 1999).

Baseados na semelhança dos efeitos observados podemos propor que, de maneira análoga à glibenclamida em células β , a testosterona fecha os canais de K^+ das células de Sertoli, este fechamento provoca a despolarização da membrana, com a conseqüente abertura dos canais de Ca^{2+} e aumento do Ca^{2+} intracelular. Assim, o fato do bloqueio dos canais de Ca^{2+} não anular a despolarização provocada pela testosterona, se explica na medida em que a entrada de Ca^{2+} não é causa, e sim conseqüência do fechamento dos canais de K^+ .

A habilidade das células de reagir de maneira apropriada a uma variedade de estímulos do meio ambiente requer um alto nível de especificidade na sinalização que vai da membrana plasmática até o núcleo. Chama a atenção como uma especificidade tão alta é conseguida, dado o número relativamente reduzido de cascatas de segundos mensageiros já elucidadas. A contribuição de diferentes sinais de Ca^{2+} para esta especificidade têm sido o alvo de vários estudos nos últimos anos.

O cálcio é um segundo mensageiro ubíquo, envolvido na regulação de uma variedade de funções celulares, entre elas, modulação da atividade dos microfilamentos do citoesqueleto, ativação da calmodulina, ativação da proteína quinase C, ativação da fosfolipase C com conseqüente formação de inositol 1,4,5-trifosfato, e regulação da expressão gênica (BOOTMANN *et al.*, 2001; BUGRIM, 1998; DOLMETSCH *et al.*, 1997; GHOSH & GREENBERG, 1995).

Numa interpretação que liga a ação da testosterona na membrana plasmática e no receptor nuclear, poderíamos propor que: a entrada do cálcio estimulada pela testosterona, ativa através de mecanismos ainda não identificados o trânsito acelerado da própria testosterona ao núcleo onde atua, como ocorre por exemplo com as proteínas citosólicas específicas chamadas ‘inibidor da dissociação do nucleotídeo guanina’ (guanine nucleotide dissociation inhibitor – GDI) que interagem com formas específicas da família de pequenas proteínas G, as Rab, de maneira que as GDI sejam protegidas do meio ambiente polar do citosol enquanto transitam entre os diferentes compartimentos membranosos da célula (CASEY, 1995).

Uma outra sugestão nesse sentido seria que o Ca^{2+} atuaria como regulador da transcrição genômica, modulando a ação nuclear, como já foi descrito em neurônios (GHOSH & GREENBERG, 1995), e em linfócitos-B, onde a amplitude e a duração dos sinais de cálcio controlam a ativação diferenciada de diversos reguladores de transcrição (DOLMETSCH *et al.*, 1997).

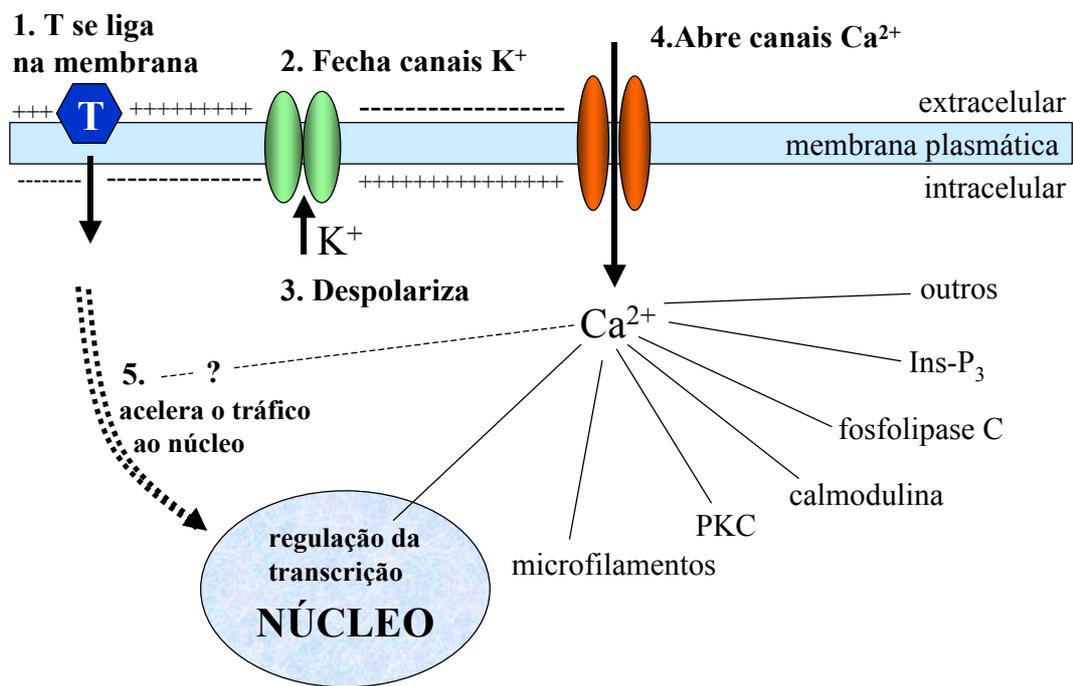


Figura V-1 Desenho esquemático da hipótese da ação da testosterona

VI. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos em nossas condições experimentais, podemos concluir que:

1. A testosterona provoca um aumento da captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em 1 minuto em células de Sertoli isoladas de ratos. Este aumento é constante em diversos estágios de maturação testados, independentemente do fato de a captação basal ser maior proporcionalmente à idade do rato.
2. A testosterona não altera o transporte de aminoácidos em testículos de ratos em nenhuma das idades testadas.
3. A testosterona causa uma despolarização imediata no potencial de membrana de células de Sertoli de ratos pré-púberes e púberes.
4. A ação despolarizante da testosterona em células de Sertoli de ratos pré-púberes, é dose e tempo dependente, e é acompanhada de um aumento na resistência da membrana. Essas ações são significativas aos 30 segundos e aumentam até 5 minutos aproximadamente. Tanto as modificações do potencial de membrana quanto da resistência são reversíveis com lavagem.
5. Os experimentos de retirada do cloreto sugerem que esse ânion não é essencial para o efeito eletrofisiológico da testosterona.
6. A diazoxida, um agonista dos canais de K_{ATP} , anula a ação da testosterona nos parâmetros eletrofisiológicos aos 30 segundos. A glibenclamida, um antagonista dos canais de K_{ATP} , produz uma ação homóloga à da testosterona nos parâmetros eletrofisiológicos. Estes resultados sugerem que há o envolvimento de canais de K_{ATP}

na ação do hormônio. Obviamente nossos resultados não excluem a possibilidade de que a testosterona produza outros efeitos além do fechamento de canais K_{ATP} .

7. Resultados preliminares com bloqueadores de canais de Ca^{2+} indicam um possível envolvimento parcial na ação despolarizante da testosterona.

VII. BIBLIOGRAFIA

- AGUILAR-BRYAN, L.; CLEMENT IV, J.P.; GONZALEZ, G.; KUNJILWAR, K.; BABENKO, A.; BRYAN, J. Toward understanding the assembly and structure of K_{ATP} channels. *Physiol. Rev.* **78**: 227-245, 1998.
- AMORY, J.K.; BREMNER, W. Endocrine regulation of testicular function in men: implications for contraceptive development. *Mol. Cell Endocrinol.* **182**: 175-179, 2001.
- ARMEN, T.A.; GAY, C.V. Simultaneous detection and functional response of testosterone and estradiol receptors in osteoblast plasma membranes. *J. Cell. Biochem.* **79**:620-627, 2000.
- AUDY, M.C.; VACHER, P.; DUFY, P. 17β -Estradiol stimulates a rapid Ca^{2+} influx in LNCaP human prostate cancer cells. *Eur. J. Endocrinol.* **135**: 367-373, 1996.
- AWONIYI, C.A.; SANTULLI, R.; SPRANDO, R.L.; EWING, L.L.; ZIRKIN, B.R.. Restoration of advanced spermatogenic cells in the experimentally regressed rat testis: quantitative relationship to testosterone concentration within the testis. *Endocrinol.*, **124**: 1217-1223, 1989.
- BALDI, E.; KRAUSZ, C.; LUCONI, M.; BONACCORSI, L.; MAGGI, M.; FORTI, G. Actions of progesterone on human sperm: a model of non-genomic effects of steroids. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **53**: 199-203, 1995.
- BARRY, D.M.; NERBONNE, J.M. Myocardial potassium channels: electrophysiological and molecular diversity. *Annu. Rev. Physiol.* **58**: 363-394, 1996.
- BENTEN, W.P.M.; LIBERHERR, M.; SEKERIS, C.E.; WUNDERLICH, F. Testosterone induces Ca^{2+} influx via non-genomic surface receptors in activated T cells. *FEBS Lett.* **407**: 211-214, 1997.
- BENTEN, W.P.M.; LIBERHERR, M.; GIESE, G.; WREHLKE, C.; STAMM, O.; SEKERIS, C.E.; MOSSMANN, H.; WUNDERLICH, F. Functional testosterone receptors in plasma membranes of T cells. *FASEB J.* **13**: 123-133, 1999.
- BERRIDGE, M.J.; BOOTMAN, M.D.; LIPP, P. Calcium - a life and death signal. *Nature*, **395**: 645-648, 1998.
- BOOCKFOR, F.R.; MORRIS, R.A.; DeSIMONE, D.C.; HUNT, D.M.; WALSH, K.B. Sertoli cell expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am. J. Physiol.*, **274 (Cell. Physiol. 43)**: C922-C930, 1998.
- BOOTMAN, M.D.; LIPP, P.; BERRIDGE, M.J. The organisation and function of local Ca^{2+} signals. *J. Cell Sci.* **114**: 2213-2222, 2001.
- BRANN, D.W.; HENDRY, L.B.; MAHESH, V.B. Emerging diversities in the mechanism of action of steroid hormones. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **52**:113-133, 1995.
- BRUBAKER, K.D.; GAY, C.V. Depolarization of osteoclast plasma membrane potential by 17β -estradiol. *J. Bone Miner. Res.*, **14**: 1861-1866, 1999.

- BRUCKER, C.; LIPFORD, G.B.; The human sperm acrosome reaction: physiology and regulatory mechanisms. An update. *Hum. Reprod. Update* 1:51-62, 1995.
- BUGRIM, A.E. Regulation of Ca²⁺ release by cAMP-dependent protein kinase A mechanism for agonist-specific calcium signaling? *Cell Calcium* 25(3):219-226, 1999.
- CARREAU, S; FOUCAULT, P; DROSDOWSKY, MA. La cellule de Sertoli: Aspects fonctionnels comparés chez le rat, le porc et l'homme. *Ann. Endocrinol.* (Paris) 55: 203-220, 1994.
- CASEY, P.J. Protein lipidation in cell signalling. *Science* 268: 221-225, 1995.
- CATTERAL, W.A. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Ann. Rev. Biochem.* 64:493-531, 1995.
- CHRIST, M.; HASEROTH, K.; FALKENSTEIN, E.; WEHLING, M. Nongenomic steroid actions: fact or fantasy? *Vitamins and Hormones.* 57:325-373, 1999.
- COMHAIRE, FH, VERMEULEN, A. Testosterone concentration in the fluids of seminiferous tubules, the interstitium and the rete testis of the rat. *J. Endocrinol.* 70: 229-235, 1976.
- CUTHBERT, A.W.; WONG, P.Y.D. Intracellular potentials in cells of the seminiferous tubules of rats. *J.Physiol.* 248:173-191, 1975.
- DE JONG, F.H.; HEY, A.G.; VAN DER MOLEN, H.J. Oestradiol-17 β and testosterone in rat testis tissue: effect of gonadotrophins, localization and production in vitro. *J. Endocrinol.* 60:409-419,1974.
- De POVER, A.; MTLIB, M.A.; LEE, S.W.; DUB'E, G.P.; GRUPP, I.L. Specific binding of [³H]nitrendipine to membranes from coronary arteries and heart in relation to pharmacological effects. Paradoxical stimulation by diltiazem. *Biochem. Biophys. Res. Commun.m.* 108: 110-117, 1982.
- DIOCHOT, S.; RICHARD, S; BALDY-MOULINIER, M.; NARGEOT, J.; VALMIER, J. Dihydropyridines, phenylalkilamines and benzothiazepines block N-, P/Q and R-type calcium currents. *Pflügers Archiv* 431: 10-19, 1995.
- DIXIT, V.D.; SINGH, B.; SINGH, P.; GEORGIE, G.C.; GALHOTRA, M.M.; DIXIT V.P. Circadian and pulsatile variations in plasma levels of inhibin, FSH and testosterone in adult Murrah buffalo bulls. *Theriogenology.* 50: 283-292, 1998.
- DOLMETSCH, R.E.; LEWIS, R.S.; GOODNOW, C.C.; HEALY, J. Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature* 386: 855-858, 1997.
- DOLPHIN, A.C. Regulation of calcium channel activity by GTP binding proteins and second messengers. *Biochim. Biophys. Acta,* 1091: 68-80, 1991.
- DUFAU, M.L. Endocrine regulation and communicating functions of the Leydig cell. *Ann. Rev. Physiol.* 50: 483-508, 1988.
- DUVAL, D.; DURANT, S. ; HOMO-DELARCHE, F. Non-genomic effects of steroids – Interactions of steroid molecules with membrane structures and functions. *Biochim. Biophys. Acta.* 737:409-442, 1983.

- DYM, M.; FAWCETT, D.W. The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol. Reprod.* **3**: 308-326, 1970.
- ESTRADA, M.; LIBERONA, J.L.; MIRANDA, M.; JAIMOVICH, E. Aldosterone- and testosterone-mediated intracellular calcium response in skeletal muscle cell cultures. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **279**: E132-E139, 2000.
- EUSEBI, F.; ZIPARO, E.; FRATAMICO, G.; RUSSO, M.A.; STEFANINI, M. Intracellular communication in rat seminiferous tubules. *Dev. Biol.* **100**: 249-255, 1983.
- EWING, L.L.; DAVIS, J.C.; ZIRKIN, B.R. Regulation of testicular function: a spatial and temporal view. Em *Reproductive Physiology III international Review of Physiology*. R.O. Greep, ed. Baltimore: University Park Press:41-115, 1980.
- EWING, L.L.; KEENEY, D.S. Leydig cells: structure and function. Em: *Cell and Molecular Biology of the Testis*. C. Desjardins e L.L. Ewing, eds. New York: Oxford University Press: 137-165, 1993.
- FALKENSTEIN, E.; SCHMIEDING, K.; LANGE, A.; MEYER, C.; GERDES, D.; WELSCH, U.; WEHLING, M. Localization of a putative progesterone membrane binding protein in porcine hepatocytes. *Cell. Mol. Biol.* **44**: 571-578, 1998.
- FUJITA, R.; KIMURA, S.; KAWASAKI, S.; TAKASHIMA, K.; MATSUMOTO, M.; HIRANO, H.; SASAKI, K. ATP suppresses the K(+) current responses to FSH and adenosine in the follicular cells of Xenopus oocyte. *Jpn. J. Physiol.* **51**: 491-500, 2001.
- GANDIA L.; LARA B.; IMPERIAL J.S.; VILLARROYA M.; ALBILLOS A.; MAROTO R.; GARCIA A.G.; OLIVERA B.M. Analogies and differences between omega-conotoxins MVIIC and MVIID: binding sites and functions in bovine chromaffin cells. *Pflügers Arch.* **435**(1):55-64, 1997.
- GLANDWELL, R.T. The effect of temperature on the potential difference and input resistance of rat seminiferous tubules. *J. Physiol.* **268**:11-121, 1977.
- GORKZYNSKA, E.; HANDELSMAN, D.J. Androgens rapidly increase the cytosolic calcium concentration in Sertoli cells. *Endocrinology* **136**: 2052-2059, 1995.
- GOSH, A.; GREENBERG, M.E. Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science* **268**: 239-247, 1995.
- GOSH, S.; STRUM, J.C.; BELL, R.M. Lipid biochemistry: functions of glycerolipids and sphingolipids in cellular signaling. *FASEB J.* **11**:45-50, 1997.
- GRIFFIN, J.E. Male Reproductive Function. Em: *Textbook of endocrine physiology*. Griffin, J.E., Ojeda, S.R. Oxford University Press, New York/Oxford, p. 201-222, 1996.
- GRIFFIN, J.E.; WILSON, J.D. Disorders of the testes and the male reproductive tract. Em: *William's textbook of endocrinology*. 8ª edição, Wilson J.D. and Foster, D.W.W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA, p. 799-852, 1992.
- GROOTE GOED, J.A. The testis: Spermatogenesis. Em: *Scientific Essentials of Reproductive Medicine*. S.G.Hillier, H.C. Kitchener. J.P. Neilson Eds. Philadelphia, Saunders. p.172-184, 1996.

- HAKOLA, K.; PIERROZ, D.D.; AEBI, A.; VUAGNAT, B.A.M.; AUBERT, M.L.; HUHTANIEMI, I. Dose and time relationships of intravenously injected rat recombinant luteinizing hormone and testicular testosterone secretion in the male rat. *Biol. Reprod.* **59**: 338-343, 1998.
- HARDMAN, J.G.; GILMAN, G.A.; LIMBRID, L.E. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9^a. edição, International Edition, The McGraw-Hill Companies, Inc. USA, 1996.
- HEES, H.; LEISER, R.; KOHLTER, T.; WROBEL, K.H. Vascular morphology of the bovine spermatic cord and testis. *Cell Tissue Res.* **237**: 31-38, 1984.
- HERLITZE, S.; ZHONG, H.; SCHEUER, T.; CATTERALL, WA. Allosteric modulation of Ca²⁺ channels by G proteins, voltage-dependent facilitation, protein kinase C and Ca_vβ subunits. *PNAS- Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 4699-4704, 2000.
- HILLE, B. Ohm's law is central em *Ionic channels of excitable membranes*, 2a edição. Sinauer Associates Inc Publishers, Sunderland, Massachusetts, USA. cap 1 p. 1-20, 1992.
- HOCKERMAN, G.H.; PETERSON, B.Z.; JOHNSON, B.D.; CATTERALL, W.A. Molecular determinants of drug binding and action on L-type calcium channels. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**: 361-196, 1997.
- HODGKIN, A.L.; HOROWICZ, P. The influence of potassium and chloride ions on the membrane potential of single muscle fibres. *J. Physiol.* **148**: 127-160, 1959.
- HOFMANN, F.; LACINOVÁ, L.; KLUGBAUER, N. Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Rev. Physiol., Biochem. Pharmacol.*, **139**: 33-87, 1999.
- HOSEY, M.M.; LAZDUNSKI, M. Calcium channels: molecular pharmacology, structure and regulation. *J. Membr. Biol.* **104**:81-105, 1988.
- HUAN, C.; ZHOU, M; WU, M; ZHANG, Z; MEI, Y. Activation of melatonin receptor increases a delayed rectifier K⁺ current in rat cerebellar granule cells. *Brain Res.*, **917**: 182-190, 2001.
- HUR, E-M.; KIM, K-T. G protein-coupled receptor signalling and cross-talk. Achieving rapidity and specificity. *Cell. Signal.* **14**: 397-405, 2002.
- IBARROLA, I.; OGIZA, D.; MARINO, A.; MACARULLA, J.M.; TRUEBA, M. Steroid hormone specifically binds to rat kidney plasma membrane. *J. Bioenerg. Biomembr.* **23**: 919-926, 1991.
- JACOB, M.K.; WHITE, R.E. Diazepam, gamma-aminobutyric acid, and progesterone open K(+) channels in myocytes from coronary arteries. *Eur. J. Pharmacol.*, **403**: 209-219, 2000.
- JAROW, J.P.; CHEN, H.; ROSNER, W.; TRENTACOSTE, S.; ZIRKIN, B.R.. Assessment fo the androgen environment within the human testis: minimally invasive method to obtain intratesticular fluid. *J. Androl.*, **22**: 640-645, 2001.
- JENSTER, G. Coactivators and corepressors as mediators of nuclear receptor function: an update. *Mol. Cell. Endocrinol.* **143**:1-7, 1998.
- JOFFRE, M.; ROCHE, A. Follicle-stimulating hormone induces hyperpolarization of immature rat Sertoli cells in monolayer culture. *J. Physiol.*, **400**: 481-499, 1988.

- JOFFRE, M.; ROCHE, A.; DUCHATELLE, P. Electrophysiological studies of the action of gonadotropins on Leydig and Sertoli cells from rat testis. *Reprod. Nutr. Dev.* **28**: 1019-1029, 1988.
- JONAS, P. Glutamate receptors in the central nervous system. *Ann. N.Y.Acad. Sci.* **707**: 126-135, 1993.
- JUNGWIRTH, A.; WEIGER, T.; SINGH, S.K.; PAULMICHL, M.; FRICK, J. Follicle-stimulating hormone activates a cAMP-dependent chloride conductance in TM4 Sertoli cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322(1)**: 203-206, 1997.
- KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M. Membrane Potential em *Essentials of Neural Science and Behavior*, Prentice Hall International Inc., London, UK, Sessão III, cap. 8, p.133-147, 1995.
- KERR, J.B.; BARTLETT, J.M.S.; SHARPE, R.M. Origin of regenerating Leydig cells in the testis of the adult rat: an ultrastructural, morphometric and hormonal assay study. *Cell Tissue Res.* **249**: 367-377, 1987.
- KIM, A.H.; CHO, K.W.; CHANG, S.H.; KIM, S.Z.; CHAE, S.W. Glibenclamide suppresses stretch-activated ANP secretion: involvement of K^+_{ATP} channels and L-type Ca^{2+} channel modulation. *Pflügers Arch – Eur. J. Physiol.* **434**: 362-372, 1997.
- KO, W.H.; CHAN, H.C.; CHEW, S.B. WONG, P.Y.D. Regulated anion secretion in cultured epithelia from Sertoli cells of immature rats. *J. Physiol.* **512**: 471-480, 1998.
- KOENIG, H.; FAN, C-C.; GOLDSTONE, A.D.; LU, C.Y.; TROUT, J.J. Polyamines mediate androgenic stimulation of calcium fluxes and membrane transport in rat heart myocytes. *Circ. Res.* **64**:415-426, 1989.
- LALEVÉE, N.; PLUCIENNIK, F.; JOFFRE, M. Voltage-dependent calcium current with properties of T-type current in Sertoli cells from immature rat testis in primary cultures. *Biol. Reprod.*, **56**: 680-687, 1997.
- LEITE, L.; LUCHI, R.; VON LEDEBUR, E.I.C.F.; LOSS, E.S.; WASSERMANN, G.F. Testosterone induces immediate membrane depolarization and stimulates $^{45}Ca^{2+}$ uptake in Sertoli cells from rats of different maturation stages. *Med. Sci. Res.* **27**: 25-28, 1999.
- LEUNG, G.P.H.; CHENG-CHEW, S.B.; WONG, P.Y.D. Nongenomic effect of testosterone on chloride secretion in cultured rat efferent duct epithelia. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **280**: C1160-C1167, 2001.
- LIEBERHERR, M.; GROSSE, B. Androgens increase intracellular calcium concentrations and inositol 1,4,5-triphosphate and diacylglycerol formation via a pertussis toxin sensitive G protein. *J. Biol. Chem.* **269**: 7219-7223, 1994.
- LLINAS, R.R.; SUGIMORI, M.; CHERKSEY, B. Voltage-dependent calcium conductances in mammalian neurons: the P channel. *Ann. N.Y.Acad. Sci.* **560**: 103-111, 1989.
- LOSS, E.S.; BARRETO, K.P.; LEITE, L.; WASSERMANN, G.F. Comparative study of the actions of isoproterenol and retinol on amino acid accumulation, $^{45}Ca^{2+}$ uptake and membrane potential in Sertoli cells. *Medical Science Research*, **26**: 195-199, 1998.

- LUCONI, M.; BONACCORSI, L.; MAGGI, M.; PECCHIOLI, P.; KRAUSZ, C.; FORTI, G.; BALDI, E. Identification and characterization of functional nongenomic progesterone receptors on human sperm membrane. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**: 877-885, 1998.
- LYNG, F.; JONES, G.R.; ROMMERTS, F.F.G. Rapid androgen actions on calcium signalling in rat Sertoli cells and two human prostatic cell lines: similar biphasic responses between 1 picomolar and 100 nanomolar concentrations. *Biol. Reprod.* **63**: 736-747, 2000.
- MACHELON, V.; NOMÉ, F.; TESARIK, J. Nongenomic effects of androstenedione on human granulosa luteinizing cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**: 263-269, 1998.
- MADDOCKS, S.; HARGREAVE, T.B.; REDDIE, K.; FRASER, H.M.; KERR, J.B.; SHARPE, R.M. Intratesticular hormone levels and the route of secretion of hormones from the testis of the rat, guinea-pig, monkey and human. *Int. J. Androl.* **16**: 272-278, 1993.
- MADDOCKS, S.; SHARPE, R.M.. Dynamics of testosterone secretion by the rat testis: implications for measurement of the intratesticular levels of testosterone. *J. Endocrinol.* **122**: 323-329, 1989.
- MADDOCKS, S; HARGREAVE, TB; REDDIE, K; FRASER, HM; KERR, JB; SHARPE, RM. Intratesticular hormone levels and the rout of secretion of hormones from the testis of the rat, guinea pig, monkey and human. *Int. J. Androl.* **16**: 272-278, 1993.
- MAGUIRE, D.; MacNAMARA, B.; CUFFE, J.E.; WINTER, D.; DOOLAN, C.M. URBACH, V.; O'SULLIVAN, G.C.; HARVEY, B.J. Rapid responses to aldosterone in human distal colon. *Steroids.* **64**: 51-63, 1999.
- MATHER, J.P.; PHILLIPS, D.M. primary culture of testicular somatic cells. Em: *Methods for serum-free culture of cells of the endocrine system*. Animous, Alas R. Liss, Inc; New York, NY, p.29-45, 1984.
- McCOSHEN, J.A. In vivo sex differentiation of congeneic germinal cell aplastic gonads. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **142**: 83-88, 1982.
- McDONALD, T.F. PELZER, S. TRAUTWEIN, W. PELTZER, D. Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells *Physiol. Rev.* **74**: 365-507, 1994.
- McHUGH, D.; SHARP, E.M.; SCHEUER, T.; CATTERALL, W.A. Inhibition of cardiac L-type calcium channels by protein kinase C phosphorylation of two sites in the N-terminal domain. *PNAS-Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**: 12334-12338, 2000.
- MENDIS-HANDAGAMA, S.M.L.C.; ZIRKIN, B.R.; EWING; L.L. Comparison of components of the testis interstitium with testosterone secretion in the hamster, rat and guinea pig testes perfused in vitro. *Am. J. Anat.*, **181**: 12-22, 1988.
- MERCHANT, H. Rat gonadal and ovarian organogenesis with and without germ cells. An ultrastructural study. *Dev. Biol.* **44**: 1-21, 1975.
- MIKI, T.; NAGASHIMA, K.; SEINO, S. Review - The structure and function of the ATP-sensitive K⁺ channel in insulin-secreting pancreatic β -cell. *J. Mol. Endocr.* **22**: 113-123, 1999.

- MILLER, C. Review - An overview of the potassium channel family. *Genome Biology*, 1(4): 0004.1-0004.5, 2000.
- MINTZ, B.; RUSSEL, E.S. Developmental modifications of primordial germ cells, induced by W-series genes in the mouse embryo. *Anat. Rec.* 122: 443-449, 1955.
- MIRANDA, M.J.; LIEDKE, P.E.R.; LEITE, L.; LOSS, E.S.; WASSERMANN, G.F. Glibenclamide changes membrane potential and stimulates $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake and amino acid accumulation in Sertoli cells of immature rats. *Med. Sci. Res.* 26: 703-706, 1998.
- MORI, Y.; NIIDOME, T.; FUJITA, Y.; MYNLIEFF, M.; DIRKSEN, R.T.; BEAM, K.G.; IWABE, N.; MIYTA, T.; FURUTAMA, D.; FURUICHI, T.; MIKOSHIBA, K. Molecular diversity of voltage-dependent calcium channel. *Annals N.Y. Acad. Sci.* 707:87-108, 1993.
- MULLIGAN, T.; IRANMANESH, A.; GHEORGHIU, S.; GODSCHALK, M.; VELDHUIS, J.D. Amplified nocturnal luteinizing hormone (LH) secretory burst frequency with selective attenuation of pulsatile (but not basal) testosterone secretion in healthy aged men: possible Leydig cell desensitization to endogenous LH signalization – a clinical research center study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80: 3025-3031, 1997.
- NEMERE, I. Non-genomic effects of 1,25-dihydroxyvitamin D-3: potential relation of a plasmalemmal receptor to the acute enhancement of intestinal calcium-transport in chick. *J. Nutr.* 125 (suppl 6): S1695-S1698, 1995.
- NOORDHUIZEN-STASSEN, E.N.; CHARBON, G.A.; DE JONG, F.H.; WENSING, C.J.G.. Functional arterio-venous anastomoses between the testicular artery and the pampiniform plexus in the spermatic cord of rams. *J. Reprod. Fertil.* 75: 193-201, 1985.
- O'MALLEY, B.W.; TSAI, M.J. Molecular pathways of steroid receptor action. *Biol. Reprod.* 46:163-167,1992.
- OKABE, K.; OKAMOTO, F.; KAJIYA, H.; TAKADA, K.; SOEDA, H. Estrogen directly acts on osteoclasts via inhibition of inward rectifier K^+ channels. *Naunyn-Schmiedeberger's Arch. Pharmacol.* 361: 610-620, 2000.
- OKAZAKI, T; BELL, RM; HANNUN, YA. Sphingomyelin turnover induced by vitamin D3 in HL-60 cells. Role in cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 264(32): 19076-19080,1989.
- OLIVERA B.M.; MILJANICH G.P.; RAMACHANDRAN J.; ADAMS M.E. Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the omega-conotoxins and omega-agatoxins. *Annu Rev Biochem*, 63:823-867, 1994.
- ORSINI, J.C.; BARONE, F.C.; ARMSTRONG, D.L.; WAYNE, M.J. Direct effects of androgens on lateral hypothalamic neuronal activity in the male rat: I. A microiontophoretic study. *Brain Res. Bull.* 15: 293-297, 1985.
- PETERSEN, O.H.; PETERSEN C.C.H.; KASAI, H. Calcium and hormone action. *Annual Review of Physiology*, 56: 297-319, 1994.
- RASMUSSEN, H.; BARRETT, P.Q. Mechanism of action of Ca^{2+} -dependent hormones. Em: *Hormone and their actions. Part II*. Eds.: Cooke, B.A.; King, R.J.B; van der Molen, H.J. Elsevier Science Publishers BV. p. 93-111, 1988.

- RAZANDI, M.; PEDRAM, A.; GREENE, G.L.; LEVIN, E.R. Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ER α and ER β expressed in chinese hamster ovary cells. *Mol. Endocrinol.* **13**: 307-319, 1999.
- REUTER, H. The dependence of slow inward current in Purkinje fibres on the extracellular calcium concentration. *J. Physiol. (Lond.)* **192**: 479-492, 1967.
- REVELLI, A.; MASSOBRIO, M.; TESARIK, J. Non-genomic actions of steroid hormones in reproductive tissues. *Endocr. Rev.* **19**: 3-17, 1998.
- RIEGMAN, P.H.J.; VLIESTSTRA, R.J.; VAN DER KORPUT, J.A.G.M.; BRINKMANN, A.O.; TRAPMAN, J. The promoter of the prostate specific antigen gene contains a functional androgen response element. *Mol Endocrinol.* **5**:1921-1930, 1991.
- ROCHE, A.; JOFFRE, M. Effect of uncoupling treatments on FSH-induced hyperpolarization of immature rat Sertoli cells from Sertoli cell-enriched cultures. *J. Reprod. Fertil.* **85**: 343-354, 1989.
- ROMMERTS, F.F.G. Testosterone: an overview of biosynthesis, transport, metabolism and nongenomic actions. Em *Testosterone, action, deficiency, substitution*. E Meschlag, H.M. Behre, 2^a Edição, Springer Verlag, Berlin, cap.1:1-31, 1998.
- ROMMERTS, FFG. Cell surface actions of steroids: A complementary mechanism for regulation of spermatogenesis? em *Spermatogenesis, Fertilization and Contraception (Molecular, Cellular and Endocrine Events in Male Reproduction)*, Schering Foundation Workshop 4, Nieschlag E and Habenicht UF (eds), Springer Verlag, Berlin: 1-19, 1992.
- ROMMERTS, FFG. How much androgen is required for maintenance of spermatogenesis? *J. Endocr.* **116**: 7-9, 1988.
- ROSS, T.R.; ROMRELL, L.J.; KAYE, G.I. Male reproductive system, em *Histology A Text and Atlas*. 3^a Edição, Williams&Williams, Baltimore, Maryland, cap. 21:636-676, 1995.
- ROSSATO, M.; MERICO, M.; BETTELLA, A.; BORDON, P.; FORESTA, C. Extracellular ATP stimulates estradiol secretion in rat Sertoli cells *in vitro*: modulation by external sodium. *Mol. Cel. Endocrinol.*, **178**: 181-187, 2001.
- ROSSATO, M.; NOGARA, A.; MERICO, M.; FERLIN, A.; FORESTA, C. Identification of functional binding sites for progesterone in rat Leydig cell plasma membrane. *Steroids* **64**: 168-175, 1999.
- RUSSEL, L.D. Morphological and functional evidence for Sertoli-germ cell relationships. Em *The Sertoli Cell*. L.D. Russel e M.D. Griswold eds., Clearwater, Cache River Press. p. 365-390, 1993.
- RUSSEL, L.D.; PETERSON, R.N. Sertoli cell junctions: morphological and functional correlates. *Int. Rev. Cytol.* **94**: 177-211, 1985.
- SARGENT, P.B.. Electrical Signaling em *An Introduction to Molecular Neurobiology*, Hall, A.W. e 11 contribuidores, Sinauer Associate, Ibnc. Publishers, Sunderland, Massachusetts, USA. cap.2 p.33-80, 1992.
- SCHMIDT, BMW; CHRIST, M.; WHELING, M. Nongenomic steroid ations: Completing a puzzle - Aldosterone as an example. *Exp. Clin Endocrinol Diabetes* **106** p. 441-445, 1998.

- SCHNEIDER, M.; ULSENHEIMER, A.; CHRIST, M. WEHLING, M. Nongenomic effects of aldosterone on intracellular calcium in porcine endothelial cells. *Am. J. Physiol.* **272 (Endocrinol. Metab. 35)**: E616-E620, 1997.
- SCHWARTZ, N.B. The 1994 Stevenson Award Lecture. Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone: a tale of two gonadotropins. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **73(6)**: 675-684, 1995.
- SERTOLI, E. E lesistenza di particolari cellule ramificate nei canalicoli seminiferi dell' testicolo umano. *Morgagni* **7**: 31-40, 1865.
- SHARPE, RM. Gonadotrophin-induced accumulation of interstitial fluid in the rat testis. *J. Reprod. Fertil.*, **55**: 365-371, 1979.
- SHARPE, RM. Regulation of spermatogenesis. Em *The Physiology of Reproduction*. Knobil, E. e Neill, JD, eds. New York: Raven Press, p. 1363-1434, 1994.
- SHEPPARD, D.N.; ROBINSON, K.A. Mechanism of glibenclamide inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channels expressed in a murine cell line. *J. Physiol.* **503(2)**: 333-346, 1997.
- SHERMAN-GOLD, R. Bioelectricity. Em *The Axon-Guide for electrophysiology & biophysics laboratory techniques*, cap.1, p.1-16, 1993.
- SILVA, F.R.; LEITE, L.D.; BARRETO, K.P.; D'AGOSTINI, C.; ZAMONER, A. Effect of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine on amino acid accumulation and membrane potential in Sertoli cells of the rat testis. *Life Sci.*, **69**: 977-986, 2001.
- SILVA, F.R.M.B.; RENCK, L.; WASSERMANN, G.F. Retinol stimulates amino acid transport in Sertoli cell by a mechanism unrelated to protein synthesis. *Med. Sci. Res.* **23**: 155-156, 1995.
- SIMONS, K.; TOOMRE, D. Lipid rafts and signal transduction. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **1**: 31-39, 2000.
- SKINNER, M.K. Cell-cell interactions in the testis. *Endocrine Reviews*, **12**: 45-77, 1991.
- SMITH, P.E. Hypophysectomy and a replacement therapy in the rat. *Am. J. Anat.* **45**: 205-256, 1930.
- SNYDER, S.H.; SKLAR, P.B.; PEVSNER, J. Molecular mechanisms of olfaction. *J. Biol. Chem.* **263**: 13971-13974, 1988.
- SPEEDING, M.; PAOLETTE, R. III. Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying channel function. *Pharmacol. Rew.* **44**: 363-376, 1992.
- STAES. M.; TALAVERA, K; KLUGBAUER, N.; PRENEN, J.; LACINOVÁ, L.; DROOGMANS, G.; HOFMANN, F.; NILIUS, B. The amino side of the C-terminus dermines fast inactivation of the T-type calcium channel α_{1G} . *J. Physiol.* **530**: 35-45, 2001.
- STEINSAPIR, J.; SOCCI, R.; REINACH, P. Effects of androgen on intercellular calcium of LNCaP cells. *Biochem. Biophys Res Commun.* **179**: 90-96, 1991.
- STOCCO, D.M. Steroidogenic acute regulatory protein and steroidogenesis. Em *Testicular Function: From Gene Expression to Genetic Manipulation*. M. Stefanini, C. Boitani, M. Galdieri, R. Geremia, F. Palombi, eds. Springer-Verlag, Berlin: 179-211, 1998.

- STRYER, L. *Bioquímica*, 4ª edição, Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro-RJ, 1996.
- SWERDLOFF, R.S.; WANG, C. Physiology of hypothalamic-pituitary function. Em: *Campbell's Urology*. P.C. Walsh, A.B. Retik, E.D. Vaughan, A.J. Wein Eds., Philadelphia, Saunders. p. 1239-1253, 1998.
- TARANTA, A; MORENA, A.R.; BARBACCI, E.; D'AGOSTINO, A. ω -conotoxin-sensitive Ca^{2+} voltage-gated channels modulate protein secretion in cultured rat Sertoli cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **126**: 117-123, 1997.
- TSAI, M.J.; O'MALLEY, B.W. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Ann. Rev. Biochem.* **63**: 451-486, 1994.
- TSE, A.; TSE, F.W.; HILLE, B. Calcium homeostasis in identified rat gonadotrophs. *J. Physiol.* **477**: 511-525, 1994.
- TSIEN, R.W.; ELLINOR, P.T.; HORNE, W.A. Molecular diversity of voltage-dependent Ca^{2+} channels. *Trends in Pharmacological Sciences*, **12**: 349-354, 1991.
- TSIEN, R.W.; TSIEN, R.Y. Calcium channels, stores, and oscillations. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **6**: 715-760, 1990.
- TURNER, T.T.; JONES, C.E.; HOWARDS, S.S.; EWING, L.L.; ZEGEYE, B.; GUNSALUS, G.L. On the androgen microenvironment of maturing spermatozoa. *Endocrinol.* **115**: 1925-1932, 1984.
- VAN ROIJEN, J.H. Basic studies in andrology – spermatogenesis and sperm maturation in rodents and men. *Tese de doutorado apresentada na Erasmus Universiteit Rotterdam*, 1999.
- VIEIRA, A.V.; SCHNEIDER, W.J.; VIEIRA, P.M. Retinoids: transport, metabolism, and mechanisms of action. *J. Endocrinol.* **146**: 201-207, 1995.
- WASSERMANN, G.F.; LUDWIG, M.S.; BARRETO, K.P. β -adrenergic stimulation of amino acid transport in Sertoli cell-enriched testes of rats is independent of its action on protein synthesis. *Medical Science Research*, **24**: 149-151, 1996.
- WASSERMANN, G.F.; MONTI BLOCH, L.; GRILLO, M.L.; SILVA, F.R.M.B.; LOSS, E.S.; McCONNEL, L.L. Electrophysiological changes of Sertoli cells produced by the acute administration of amino acid and FSH. *Horm. Metab. Res.*, **24**: 326-328, 1992.
- WASSERMANN, G.F.; MONTI BLOCH, L.; McCONNEL, L.L.; GRILLO, M.L. FSH-induced hyperpolarization followed by a Ca^{2+} channel-mediated depolarization in rat Sertoli cells. *Med. Sci. Res.*, **18**: 175-176, 1990.
- WASSERMANN, G.F.; SILVA, F.R.M.B.; GRILLO, M.L.; LOSS, E.S.; LEITE, L.; VON LEDEBUR, E.i.C.F. Retinol simulates amino acid transport in Sertoli cell by a Ca^{2+} related mechanism. *Med. Sci. Res.* **21**: 473-438, 1993.
- WEISS, J.; COTE, C.R.; JAMESON, J.L.; CROWLEY, W.F. Jr. Homologous desensitization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-stimulated luteinizing hormone secretion in vitro occurs within the duration of an endogenous GnRH pulse. *Endocrinology*. **136(1)**:138-143, 1995.

- WENSING, C.J.C.; DIJKSTRA, G.; FRANKENHUIS, M.T. The intricate morphological relations between the testicular artery and pampiniform plexus. *Int. J. Androl. Suppl.* **4**: 77-78, 1981.
- WENSING, CJC; DIJKSTRA, G. The morphological relation between the testicular artery and the pampiniform plexus in the spermatic cord. *Acta Morphol. Neer. Scand.* **19**: 162, 1981.
- WHELING, M.; ULSENHEIMER, A.; SCHNEIDER, M.; NEYLON, C.; CHRIST, M. Rapid effects of aldosterone on free intracellular calcium in vascular smooth muscle and endothelial cells: subcellular localization of calcium release by single cell imaging. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204**: 475-481, 1994.
- WICKMAN, K.; CLAPHAM, D.E. Ion channel regulation by G proteins. *Physiol. Rev.* **75**: 865-884, 1995.
- WINTERS, S.J.; TAKAHASHI, J.; TROEN, P. Secretion of testosterone and its Δ^4 precursor steroids into spermatic vein blood in men with varicocele-associated infertility. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84**: 997-1001, 1999.
- XIONG, Z.; SPERALAKIS, N.; FENOGLIO-PREISER, C. Isoproterenol modulates calcium channels through two different mechanisms in smooth-muscle cells from rabbit portal vein. *Pfugers Archiv: Eur. J. Physiol.* **428**: 105-113, 1994.
- YAMADA, Y. Effect of testosterone on unit activity in rat hypothalamus and septum. *Brain Res.* **172**: 165-168, 1979.
- ZACCOLO, M.; MAGALHÃES, P.; POZZAN, T. Compartmentalization of cAMP and Ca^{2+} signals *Curr. Opin. Cell. Biol.* **14**: 160-166, 2002.
- ŻYLIŃSKA, L.; GROMADZIŃSKA, E.; LACHOWICZ, L. Short-time effects of neuroactive steroids on rat cortical Ca^{2+} -ATPase activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1437**: 257-264, 1999.

VIII. ARTIGOS PUBLICADOS

O trabalho aqui apresentado resultou em dois artigos, um já publicado e o outro no prelo, ambos citados abaixo e cópias em anexo.

LEITE, L.; LUCHI, R.; VON LEDEBUR, E.I.C.F.; LOSS, E. S.; WASSERMANN, G.F. Testosterone induces immediate membrane depolarization and stimulates $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in Sertoli cells from rats of different maturation stages. *Medical Science Research*, v. 27: 25-28, 1999.

VON LEDEBUR, E.I.C.F.; ALMEIDA, J.P.; LOSS, E.S.; WASSERMANN, G.F. Rapid effect of testosterone on rat Sertoli cell membrane potential. Relationship with K^+_{ATP} channels. *Hormone and Metabolic Research*, no prelo.

Rapid effect of testosterone on the rat Sertoli cell membrane potential. Relationship with K^+ _{ATP} channels

E. I. C. F. VON LEDEBUR¹, J. P. ALMEIDA², E. S. LOSS² AND G. F. WASSERMANN²

¹Department of Biochemistry and ²Department of Physiology, ICBS, UFRGS. Porto Alegre, RS, Brazil.

Correspondence should be sent to:

Prof. G. F. Wassermann, MD

Departamento de Fisiologia, ICBS, UFRGS

Rua Sarmiento Leite, 500

CEP: 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

Phone/Fax: +55 51 3316 3302, e-mail: gwass@vortex.ufrgs.br

SUMMARY

Changes in the electrophysiological parameters of Sertoli cells in seminiferous tubules from 17-19 day-old rats produced by testosterone were investigated. Using conventional intracellular microelectrode techniques, we analysed the membrane potential and its input resistance. The entire tubules were fixed in a superfusion chamber continuously perfused with Krebs Ringer bicarbonate buffer (pH 7.4, 32°C). Visual control of cell impalement was achieved with an inverted microscope. The parameters analysed were passed through an amplifier and recorded on a proprietary software system.

The topical application of testosterone (0.1 to 10 μ Molar) produced an immediate (30 seconds) and significant dose-dependent depolarization of the membrane potential of the cell at all concentrations used. Concomitantly, the input resistance of the cell membrane underwent a significant increment at 30 seconds. These changes returned to resting values after washout. The topical administration of 17 β -estradiol or progesterone (10 μ M) did not change the membrane potential.

The addition to the perfusion buffer of the K⁺_{ATP} channel agonist diazoxide nullified the depolarization effect of testosterone at 30 seconds. This result suggests that the immediate action of testosterone is associated with the closing of K⁺_{ATP} channels, thereby depolarizing of the membrane.

Key words

Androgen membrane action; Sertoli cell electrophysiology; rat seminiferous tubules; diazoxide.

Introduction

Fundamentally, Sertoli cells are regulated by two hormones, follicle stimulating hormone (FSH) and testosterone. The main function of these cells is to maintain the integrity and trophism of the seminiferous epithelium, by regulating numerous metabolic events through their receptors. Besides FSH action on protein synthesis, calcium uptake, and other metabolic parameters (1), this gonadotrophin alters rapidly and specifically the membrane potential of Sertoli cells producing a biphasic modification characterised by an immediate and short hyperpolarization (<5sec) followed by a long depolarization (>6min) that is blocked by verapamil (an L-type voltage dependent calcium channel (VDCC) blocker) (2).

FSH increases intracellular Ca^{2+} in Sertoli cells in a dose-dependent manner by means of an influx from extracellular calcium sources through voltage dependent Ca^{2+} channels (3, 4) or through a more complex mechanism (5).

Similarly, testosterone increases intracellular calcium in Sertoli cells rapidly and specifically, probably acting through a cell surface short term signalling pathway (6, 7, 8). This androgen also produces a rapid (within seconds) Ca^{2+} response through plasma membrane receptors in chicken and rat osteoblasts (9, 10).

Using Sertoli cell-enriched (SCE) seminiferous tubules from rats irradiated “in utero” with 1Gray of ^{60}Co between the 19th and 20th day of pregnancy (11) it was reported in a preliminary communication that testosterone induces an immediate (<1sec) and transitory depolarization in the membrane potential of Sertoli cells. The hormone also produced an increase in $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake within 60sec in isolated Sertoli cells (7).

The role of adenosine triphosphate-sensitive K^+ (K^+_{ATP}) channels in endocrine cells is being extensively studied. In pancreatic β -cells, increased ATP production inhibits K^+_{ATP} channels, depolarizes the membrane, and thereby increases Ca^{2+} influx and insulin

secretion. Similar effects were obtained with the administration of glibenclamide, a K^+_{ATP} channel blocker (12). Kim *et al.* (13) have also suggested that glibenclamide induces depolarization in cardiac atrium, leading to an increase in Ca^{2+} permeability through L-type voltage dependent Ca^{2+} channels. Using SCE seminiferous tubules, glibenclamide rapidly stimulates (20sec) Ca^{2+} uptake through L-type Ca^{2+} channels and produces electrophysiological changes in the membrane of Sertoli cells, resulting in a prolonged depolarization (14).

Based on these results, the aim of the present study was to analyse the electrophysiological response of Sertoli cells to different testosterone concentrations, including those found in the testis of rats (15). The involvement of K^+_{ATP} channels in these events was also studied through the use of an agonist, diazoxide, and an antagonist, glibenclamide, of these channels.

Material and Methods

Testosterone, 17β -estradiol and progesterone were purchased from Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA. The agonist and antagonist of K^+_{ATP} channels, diazoxide and glibenclamide, were obtained from Research Biochemicals International, Natick, MA, USA.

The experimental animals were immature Wistar rats (17-19 days of age). These animals were bred in our animal quarters and housed in an air-conditioned room (approximately 24°C) with controlled lighting (lights on from 06:00 to 20:00 h). Pellet food (Purina, Nutripal, Porto Alegre, RS, Brazil) and tap water were available for the mothers *ad libitum*. The suckling rats were kept with their mothers until sacrificed by cervical dislocation.

For the intracellular recording study, the seminiferous tubules were placed in a superfusion chamber. One whole testis was decapsulated and carefully stretched with two pairs of calipers, exposing 3 to 10 undisrupted seminiferous tubules. A home-made grating of orthodontic wire was used to fix the tubules to the bottom of the chamber. The preparation was perfused with 1mL/min of Krebs Ringer bicarbonate (KRb) buffer with glucose (5 mmol/L), at 32°C, pH 7.4, equilibrated with O₂:CO₂ (5:95; v/v). Visual control of impalement was achieved with an inverted microscope (Diaphot TMD, Nikon Co. Tokyo, Japan). The membrane potential (MP) of Sertoli cells was recorded with microelectrodes filled with 3 mol/L KCl (tip resistance between 15 and 25 MΩ), connected to an amplifier (Intra 767, World Precision Instruments Inc., UK) and displayed on the screen of an oscilloscope (TDS 200-series Tecktronix, Inc., Wilsonville, OR, USA). Data were recorded through a data acquisition plate (TDS 200-series Tecktronix Inc.) and a software package (Wave Star Lite Version 1.0.10, 1996, Tecktronix Inc.). Square current pulses of 0.5 nA, 0.5 Hz, and of 250 ms duration were applied by a square pulse stimulator (Model S48K, Astro-Med, Inc. GRASS Instrument Division, West Warwick, RI, USA) through the intracellular electrode for estimation of membrane resistance. The input resistance (R₀) was measured with a bridge circuit according to Wassermann *et al.* (2).

To avoid working with germinal cells, only cells with a resting potential (RP) more negative than -35mV were included in the experiments, since this RP is commonly found in Sertoli cells from normal (16) or SCE seminiferous tubules from pre-pubertal rats (-44mV ± 0.5, n=48 (7) and -50mV ± 0.68, n=186 (14)).

The tip resistance used (15-25 mΩ) is appropriate for the preferential impalement of cells with a size similar that of Sertoli cells (L. Monti Bloch, personal communication). This tip diameter hardly permits the impalement of smaller (peritubular/myoid) cells.

Testosterone, 17 β -estradiol and progesterone were diluted in ethanol to a final concentration of 0.1%. A stock solution of glibenclamide was prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) and stored at -20°C until required. This stock solution was diluted in KRb to the appropriate final concentration at the time of use. DMSO (0.1%) did not affect the membrane potential. Diazoxide was freshly prepared in 0.05N NaOH for each experiment and the final concentration of NaOH in the KRb was 0.001N.

The steroids were applied topically to the bath after achieving a stable resting potential for at least 2 minutes. Glibenclamide was superfused on the cells for 5 minutes, at which point it reached its maximal action. The cells were perfused with diazoxide in KRb for 5 minutes before topical application of testosterone. Each treatment was repeated at least three times, and variations of MP and R_o were registered. The results are given as means \pm SEM.

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

Results

In our experimental conditions, the basal electrical characteristics of impaled Sertoli cells were: resting potential -46.8 ± 0.5 mV (n=174) and membrane resistance 11.7 ± 0.3 M Ω (n=174).

The topical administration of testosterone on seminiferous tubules from immature rats produced an immediate depolarization response in impaled Sertoli cells. This response increased with time, reaching a maximum after approximately 5 minutes. After washing with KRb the membrane potential returned close to resting values within 5 minutes (Fig. 1A).

In cells with a resting potential of -47 ± 1.8 (n=16), topical application of $10\mu\text{M}$ 17β -estradiol or progesterone produced a small and non-significant hyperpolarization at 30 sec. The variation in the observed membrane potential was 0.43 ± 0.37 mV (n=7) for 17β -estradiol and 0.33 ± 0.37 (n=9) for progesterone; membrane potential returned to basal values within 1 minute. The sequential application of testosterone after 10 min of 17β -estradiol or progesterone administration, produced the depolarization normally observed with this androgen.

Fig. 1B represents schematically the response profiles obtained by different concentrations of testosterone as well as after washing. At all concentrations tested, despite their different intensities, the sequence of the response was very similar.

Fig. 2 shows the changes in the membrane potential (A) and input resistance (B) produced by different concentrations of testosterone after 30 seconds. These values changed in a dose dependent manner. Using paired t test to compare resting and treated groups, the action of all doses of testosterone was found to be significant ($p < 0.02$). Using ANOVA, the variation between treatments at 30 seconds was found to be extremely significant ($p < 0.0001$) (Fig. 2).

Although the depolarization can be seen with low doses of testosterone, to test de K^+_{ATP} channel agonist action, $10\mu\text{M}$ of testosterone was chosen because it elicits the maximal effect.

The effect on the electrophysiologic parameters of diazoxide and glibenclamide, respectively an agonist and an antagonist of K^+_{ATP} channels, is shown in Fig. 3. Glibenclamide (10 μ M) depolarized and increased the resistance after a latency of 1 min and these changes were irreversible (Fig. 3). Perfusion of the tubules with KRb plus diazoxide caused hyperpolarization of the membrane potential. This effect was visible with doses of 250 and 400 μ M. Using the latter concentration, diazoxide nullified the depolarization effect of testosterone at 30 seconds (Fig. 4B). Lower doses of diazoxide diminished this depolarization without suppressing it.

Discussion and Conclusions

The results reported here allow the following conclusions: testosterone, at concentrations from 0.1 to 10 μ M, produces a time and dose dependent depolarization and an increase in input resistance in Sertoli cell membrane. These actions are immediate and statistically significant at 30 seconds ($p < 0.02$); thereafter, they rise for up to 5 minutes approximately. After washing with KRb, the potential and the resistance of the membrane return to near the resting values. The perfusion of diazoxide (K^+_{ATP} channel agonist) nullified the action of testosterone at 30 seconds. 17 β -estradiol and progesterone failed to significantly alter the resting potential of the cells.

In the histograms presented by Eusebi et al. (16), it is possible to observe two peaks of resting potential from the cells of whole seminiferous tubules: one with values around -20mV to -25mV, the other with values around -40mV to -45 mV. This last peak is predominant in the histogram of resting potential of cells from Sertoli cell enriched (SCE) tubules. In a previous study by our group (17), it was found that in SCE tubules from 15-day-old rats the resting potential of the Sertoli cells was -51 ± 0.4 mV (n=121), the range being from -30mV to -65mV. Taking these results into consideration, and in order to

exclude the possible source of error due to the heterogeneous population of seminiferous tubules, only cells having a resting potential more negative than -35mV were included in the experiments. To impale small cells, such as peritubular/myoid cells, a small tip (high tip resistance) is needed. The tip resistance used was $15\text{-}25\text{m}\Omega$, which is the appropriate resistance for impaling larger cells with a similar size to that of Sertoli cells (L. Monti Bloch - personal communication). In this way, the possibility of working with cells other than Sertoli is reduced. The membrane input resistance found in this experiment is lower than that found in a previous experiment when we used SCE tubules (2, 7, 17). Similar results were found by Eusebi et al. (16); the low membrane resistance is probably due to the fact that, in normal seminiferous epithelium, Sertoli cells are electrically coupled to each other and to the germinal cells. Entire seminiferous tubules were used in the present work in an effort to preserve the gap junctions of immature Sertoli cells. By this means the environment was kept as close as possible to its functional integrity (16).

Recent experimental evidence indicates that some steroids, apart from their well-documented genomic actions, can produce rapid, non-genomic effects, and also are potent modulators of plasma membrane proteins, including voltage- and ligand-operated ion channels and G protein-coupled receptors (18, 19). Interaction of the steroids with the plasma membrane produces manifold immediate effects (1-60 seconds). 17β -estradiol rapidly (less than 1 minute) hyperpolarizes GnRH neurons (20). In osteoclasts $10\mu\text{M}$ 17β -estradiol produced a depolarization that was associated with a decrease in membrane conductance (21). Similar results were reported by Brubaker and Gay (22). Using intracellular recording techniques, it was reported that testosterone modified the resting membrane potential of neurons in the major pelvic ganglion by triggering a slow depolarization, and was without significant effect on the resting potential of coeliac ganglion neurons (23). In rat hepatocytes, the addition of progesterone ($1\text{-}100\mu\text{mol/l}$)

induces a rapid and completely reversible depolarization of the cell membrane by decreasing its K^+ conductance (24).

Using microiontophoretic application, Orsini et al. (25) found that testosterone increased within seconds the spike frequency of more than half of the neurons tested in the lateral hypothalamus of the male rat. The results of Benten et al. (26) provide experimental evidence for the presence of testosterone receptor binding sites functionally coupled to Ca^{2+} channels in the plasma membrane of T cells. In male rat osteoblasts testosterone increased intracellular Ca^{2+} within 5 seconds via Ca^{2+} influx, and increased IP3 and DAG formation within 10 seconds (10). Testosterone produces an immediate increase in the concentration of Ca^{2+} in Sertoli cells (6, 7, 8) as well as immediate modifications of the membrane potential (7).

Some of the concentrations of testosterone employed in this work which produced an electrophysiological response in Sertoli cells are similar to the values found normally within the testes of the rat (0.2 – 0.3 μ M) (27,28). Turner et al. (15) reported values of 0.2 – 0.25 μ M in the testis of the rat and Jarow et al. (29) found values around 0.2 μ M in rat and 2.0 μ M in human aspirated testicular fluid. Maddocks et al. (30) found 0.3 μ M of testosterone in the testicular venous blood of rats. Furthermore, it has to be remembered that the secretory pattern of testosterone by the Leydig cells in the interstitial microenvironment follows the pulsatile characteristics of LH secretion, and therefore its concentration near the Sertoli cells should be very high (paracrine regulation).

Hakola et al. (31) reported that pulsatile LH release, following its biorhythm, produces quantal testosterone secretion in male rats. Barttke and Dalterio (32) reported that in rodents testicular testosterone secretory episodes are interspersed with periods of minimal steroidogenic activity. Coquelin and Desjardins (33) demonstrated unequivocally that LH and testosterone are discharged into the circulation in discontinuous pulses in male mice.

These pulses follow a one-to-one coupling pattern. The peripheral circulating testosterone level has been reported to be pulsatile also in bulls, following the rhythmic LH secretory patterns (34). Based on these findings, we suggest that all these data point towards the presence of very high concentrations of testosterone in the basal portion of Sertoli cells following bursts of hormone secretion. In our experiments, we used topic applications of testosterone, in order to mimic its physiological bursts.

Glibenclamide, a K^+_{ATP} channel blocker, produces depolarization and Ca^{2+} uptake in Sertoli cells (14) and interferes with the Cystic Fibrosis Transmembrane conductance regulator (CFTR Cl^- channel) (35). The administration of the sulphonylurea glibenclamide causes an effect homologous to that of testosterone in terms of the electrophysiological response of the Sertoli cells: depolarization with an increment of the membrane resistance. The similar response of Sertoli cell membrane to the application of testosterone and glibenclamide and the suppression of the testosterone effect with the K^+_{ATP} agonist diazoxide permits us to speculate on the involvement of K^+_{ATP} channels in the action of the hormone. Obviously our results do not exclude the possibility that testosterone produces effects other than the closure of K^+_{ATP} channels.

The replacement of Cl^- for the organic acid gluconate did not have a significant effect on the action of testosterone (data not shown), suggesting that this anion is probably not essential for this effect. Taking these results as a whole, it seems reasonable to suggest that the immediate (30 seconds) action of testosterone is to close the K^+_{ATP} channels, increasing the membrane resistance, causing membrane depolarization and, consequently, opening of the voltage dependent Ca^{2+} channels (L-type) and the influx of Ca^{2+} (7). At 5 min, the effect of testosterone on membrane potential and resistance was more evident. The effect of the Ca^{2+} channel blockers on the action of testosterone has been investigated already, and preliminary results indicate that they partially block the depolarizing action of

testosterone. A more complete investigation of the subject is currently underway in our laboratory.

In conclusion, this paper presents strong evidence that Sertoli cells, in seminiferous tubules of the rat, respond to concentrations of testosterone, some of them normally found in the testicular fluids, by means of an immediate and significant membrane potential depolarization, as well as an increase in input resistance. These parameters return to resting values after washing and this effect seems to involve K^+_{ATP} channels.

Acknowledgments

This work was supported by grants from FAPERGS, PROPESP-UFRGS, CAPES, CNPq and FINEP. The authors are indebted to Prof. Dr. Masako Masuda for her support in these studies.

References

1. Carreau, S., P. Foucault, M. A. Drosdowsky (1994): La cellule de Sertoli: Aspects fonctionnels comparés chez le rat, le porc et l'homme. *Ann. Endocrinol. (Paris)* 55: 203-220.
2. Wassermann, G. F., L. Monti Bloch, M. L. Grillo, F. R. M. B. Silva, E. S. Loss, L. L. McConnell (1992): Electrophysiological changes of Sertoli cells produced by the acute administration of amino acid and FSH. *Horm. Metab. Res.* 24: 326-328.
3. Gorkzynska, E., J. Spaliverio, D. J. Handelsman (1994): The relationship between 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate and calcium in mediating follicle stimulating hormone signal transduction in Sertoli cells. *Endocrinology* 134: 293-300.
4. Taranta, A., A. R. Morena, E. Barbacci, A. D'Agostino (1997): Ω -Conotoxin-sensitive Ca^{2+} voltage-gated channels modulate protein secretion in cultured Sertoli cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 26: 117-123.
5. Lalevée, N., R. Christian, B. Frédéric, M. Joffre (1999): Acute effects of adenosine triphosphates, cyclic 3',5'-adenosine monophosphates, and follicle-stimulating

- hormone on cytosolic calcium level in cultured immature rat Sertoli cells. *Biol. Reprod.* 61: 343-352.
6. Gorkzynska, E., D. J. Handelsman (1995): Androgens rapidly increase the cytosolic calcium concentration in Sertoli cells. *Endocrinology* 136: 2052-2059.
 7. Leite, L., R. Luchi, E. I. C. F. von Ledebur, E. S. Loss, G. F. Wassermann (1999): Testosterone induces immediate membrane depolarization and stimulates $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in Sertoli cells from rats of different maturation stages. *Med. Sci. Res.* 27: 25-28.
 8. Lyng, F.M., G.R. Jones, F.F. Rommerts (2000): Rapid androgen actions on calcium signaling in rat Sertoli cells and two human prostatic cell lines: similar biphasic responses between 1 picomolar and 100 nanomolar concentrations. *Biol. Reprod.* 63:736-747.
 9. Armen, T. A., C. V. Gay (2000): Simultaneous detection and functional response of testosterone and estradiol receptors in osteoblast plasma membranes. *J. Cell. Biochem.* 79: 620-627.
 10. Lieberherr, M., B. Grosse (1994) Androgens increase intracellular calcium concentration and inositol 1,4,5-trisphosphate and diacylglycerol formation via a pertussis toxin-sensitive G-protein. *J. Biol. Chem.* 269: 7217-7223.
 11. Wassermann, G.F., L. Monti Bloch, M.L. Grillo, F.R.M.B. Silva, E.S.Loss, L.L. McConnell (1992): Biochemical factors involved in the FSH action on amino acid transport in immature rat testes. *Horm. Metab. Res.* 24: 326-328.
 12. Dunne, W.J., O.H. Petersen (1991): Potassium selective ion channels in insulin secreting cells: physiology, pharmacology and their role in insulin secreting cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1071: 67-82.
 13. Kim, S.H., K.W. Cho, S.H. Chang, S.Z. Kim, S.W. Chae (1997). Glibenclamide suppresses stretch-activated ANP secretion. Involvement of K^+_{ATP} channels and L-type Ca^{2+} channel modulation. *Pflügers Arch.* 434: 362-372.
 14. Miranda, M.J., P.E.R. Liedke, L. Leite, E.S. Loss, G.F. Wassermann (1998). Glibenclamide changes membrane potential and stimulates $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake and amino acid accumulation in Sertoli cells of immature rats. *Med. Sci. Res.* 26: 703-706.
 15. Turner, T.T., C.E. Jones, S. S. Howards, L.L. Ewing, B. Zegeye, G. L. Gunsalus (1984): On the androgen microenvironment of maturing spermatozoa. *Endocrinology.* 115: 1925-1932.

16. Eusebi, F., E. Ziparo, G. Fratamico, M.A. Russo, M. Stefanini (1983): Intracellular communication in rat Seminiferous tubules. *Dev. Biol.* 100: 249-255.
17. Loss, E.S., K.P. Barreto, L.Leite, G. F. Wassermann (1998): Comparative study of the actions of isoproterenol and retinol on amino acid accumulation, $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake and membrane potential in Sertoli cells. *Med. Sci. Res.* 26: 195-199.
18. Zilinska, L., E. Gromadzinska, L. Lachowics (1999): Short-time effects of neuroactive steroids on rat cortical Ca^{2+} -ATPase activity. *Biochim. Biophys. Acta.* 1437: 257-264.
19. Brann, D. W., L.B. Hendry, V.B. Mahesh (1995): Emerging diversities in the mechanism of action of Steroids hormones. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 52: 113-133.
20. Langrange, A.H., Rønnekleiv, O.K., Kelly, M.J. (1995) Estradiol-17 β and μ -Opiod peptides rapidly hyperpolarize GnRH neurons: a cellular mechanism of negative feedback? *Endocrinology.* 136: 2341-2344.
21. Okabe, K., F. Okamoto, H. Fajita, K. Takada, H. Soeda. (2000): Estrogen directly acts on osteoclasts via inhibition of inward rectifier K^{+} channels. *Naunyn-Schmiedeberger's Arch. Pharmacol.* 361: 610-620.
22. Brubaker, K.D., C.V. Gay. (1999): Depolarization of osteoclast plasma membrane potential by 17beta-estradiol. *J. Bone Miner. Res.* 14: 1861-1866.
23. Felix, B., D. Catalin, J.P.Miolan, J.P. Niel. (2001): Effects of testosterone on the electrical properties and nicotinic transmission of the major pelvic and coeliac ganglion neurones. *J. Neuroendocrinol.* 13: (2) 193-198.
24. Waldegger, S., F. Beisse, H. Apfel, S. Breit, H.A. Kolb, D. Haussinger, F. Lang (1995): Electrophysiological effects of progesterone on hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1266 (2): 186-190.
25. Orsini, J. C., F. C. Barone, D. L. Armstrong, M. J. Wayner (1985): Direct effects of androgens on lateral hypothalamic neuronal activity in the male rat: I. A microiontophoretic study. *Brain. Res. Bull.* 15: 293-297.
26. Benten, W. P. M., M. Lieberherr, G. Giese, C. Wrehlke, O. Stamm, C. E. Sekeris, H. Mossmann, F. Wunderlich (1999): Functional testosterone receptors in plasma membranes of T cells. *FASEB J.* 13: 123-133.
27. Awoniyi, C.A., R. Santulli, R. L. Sprando, L. L. Ewing, B. R. Zirkin (1989): Restoration of advanced spermatogenic cells in the experimentally regressed rat testis:

- quantitative relationship to testosterone concentration within the testis. *Endocrinology*. 124: 1217-1223.
28. Rommerts, F.F. (1988): How much androgen is required for maintenance of spermatogenesis? *J. Endocr.* 116: 7-9.
 29. Jarrow, J. P., H. Chen, W. Rosner, S. Trentacoste, B. R. Zirkin. (2001): Assessment of the androgen environment within the human testis: minimally invasive method to obtain intratesticular fluid. *J. Androl.* 22: 640-645.
 30. Maddocks, S., T. B. Hargreave, K. Reddie, H. M. Fraser, J.B. Kerr, R. M. Sharpe (1993): Intratesticular hormone levels and the route of secretion of hormones from the testis of rat, guinea-pig, monkey and human. *Int. J. Androl.* 16: 272-278.
 31. Hakola, K., D.D. Pierroz, A. Aebi, B.A.M. Vuagnat, M.L. Aubert, I. Huhtaniemi (1998): Dose and time relationships of intravenously injected rat recombinant luteinizing hormone and testicular testosterone secretion in the male rat. *Biol. Reprod.* 59: 338-343.
 32. Bartke, A., Dalterio, S. (1975): Evidence for episodic secretion of testosterone in laboratory mice. *Steroids*. 26: 749-756.
 33. Coquelin, A., Desjardins, C. (1982): Luteinizing hormone and testosterone secretion in young and old male mice. *Am. J. Physiol.* 243: E257-E263.
 34. Dixit, V.D., B. Singh, P. Singh, G.C. Georgie, M.M. Galhotra, V.P. Dixit (1998): Circadian and pulsatile variations in plasma levels of inhibin, FSH and testosterone in adult Murrah buffalo bulls. *Theriogenology*. 50: 283-292.
 35. Sheppard, D. N., K. A. Robinson (1997): Mechanism of glibenclamide inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channels expressed in a murine cell line. *J. Physiol.* 503: 333-346.

Legends to the figures

Fig 1

Effect of testosterone on the membrane potential of Sertoli cells. **(A)** Typical response to 10 μ M testosterone in a cell with resting potential of $E_m = -46\text{mV}$. **(B)** Schematic time sequence of the responses of the membrane potential to different doses of testosterone. T= testosterone; RP= resting potential

Fig 2

Effect of different doses of testosterone on the membrane potential **(A)** and input resistance **(B)** at 30 sec. Number of samples in brackets. a- paired t-test ($p < 0.02$); b- Bonferroni post-test ($p < 0.05$)

Fig 3

Action of glibenclamide (10 μ M) on the membrane potential and input resistance of Sertoli cells. Number of samples in brackets. a- t-test ($p < 0.05$)

Fig 4

Effect of diazoxide (400 μ M) on the membrane potential of Sertoli cells and its preventive effect on the action of testosterone (10 μ M). **(A)** Typical response in a cell with a resting potential of $E_m = -49\text{mV}$. **(B)** Modification of resting potential produced by diazoxide, testosterone and diazoxide + testosterone (means \pm standard error of the means). Number of samples in brackets. a- Resting potential vs diazoxide $p = 0.02$; b- Resting potential vs testosterone $p = 0.0001$; diazoxide vs diazoxide + testosterone = ns.

Fig 1

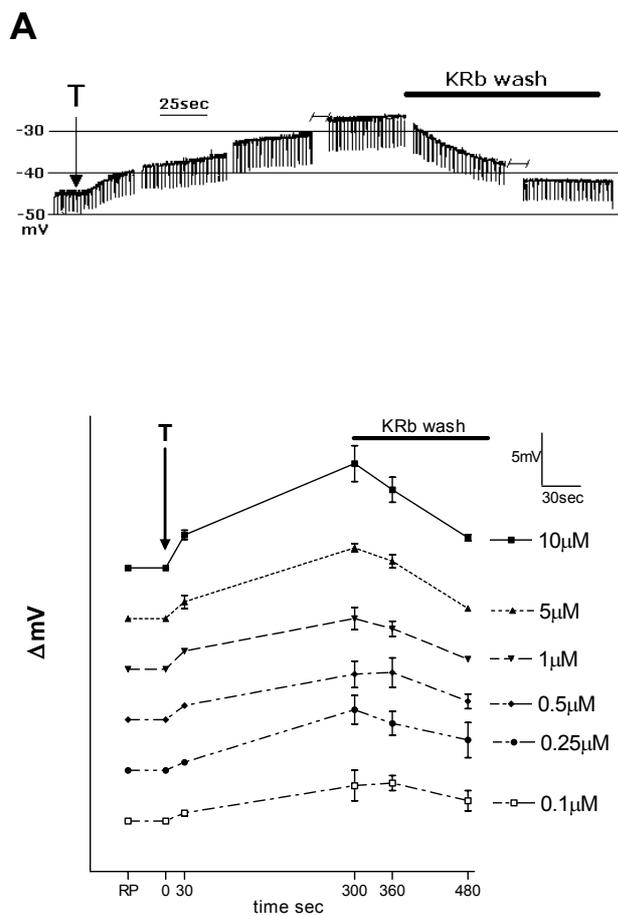
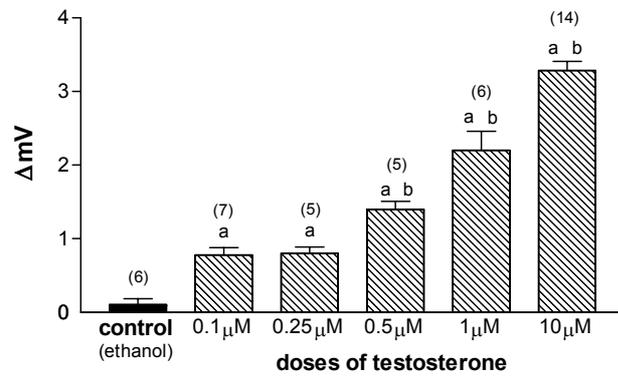
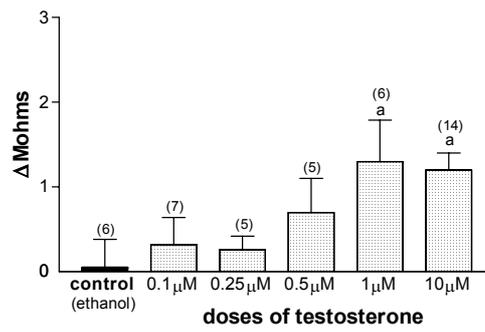


Fig 2



A



B

Fig. 3

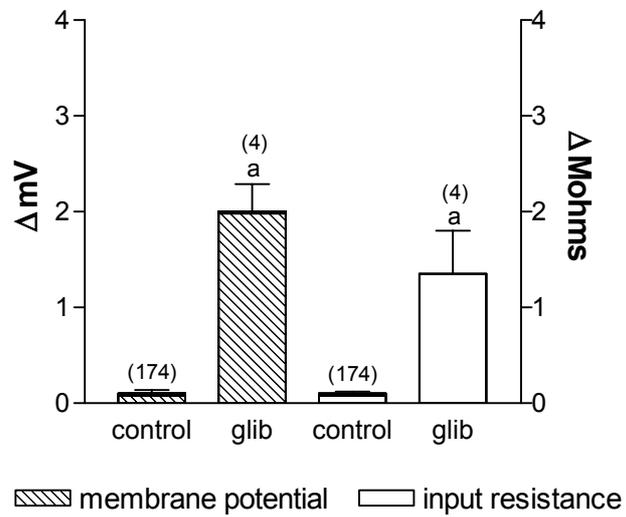


Fig. 4.

