

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

**METABOLISMO DA ESFINGOMIELINA EM CÉLULAS DE SERTOLI
EFEITO DO RETINOL**

IZABEL CRISTINA CUSTODIO DE SOUZA

ORIENTADORA:

Profa. Dra. FÁTIMA T. COSTA RODRIGUES GUMA

**Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas -Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas-Bioquímica.**

**Porto Alegre - RS
1998**

Agradeço ao meu marido pelo carinho, amor e incentivo em todos os momentos, e à nossa filha que está chegando para encher nossa vida de luz e de amor.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Fátima Guma, por sua orientação, amizade e dedicação durante os anos em que estou no departamento.

À Ana Luiza, pelo apoio, amizade e auxílio no desenvolvimeto deste trabalho.

À Profa. Dra. Elena Bernard, pela colaboração para que este trabalho fosse realizado.

À minha família, pela compreensão e apoio nos momentos da realização deste trabalho.

À Prof. Dr. José Claudio, pela oportunidade de ingressar no departamento de Bioquímica.

Ao amigo Carlos José, incansável e sempre prestativo.

Às secretárias Cléia e Janaína, pela eficiência, dedicação.

Aos amigos dos laboratórios 21,23 e 25, pelo auxílio e compreensão durante a realização deste trabalho.

À todos colegas e amigos do departamento de Bioquímica.

À FINEP e CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

1. - INTRODUÇÃO	1
1.1 - ORGANIZAÇÃO DOS TESTÍCULOS:.....	1
1.2 - CÉLULAS DE LEYDIG:.....	1
1.3 - CÉLULAS MIÓIDES PERITUBULARES:.....	3
1.4 - CÉLULAS GERMINATIVAS:.....	5
1.5 - ESPERMATOGÊNESE.....	5
1.6 - BARREIRA HEMATO - TESTICULAR:	6
1.7 - CÉLULAS DE SERTOLI	8
1.8 - CÉLULAS DE SERTOLI EM CULTURA	10
1.9 - RETINOL	13
1.10 - METABOLISMO DA VITAMINA A.....	16
1.11 - RECEPTORES NUCLEARES PARA ÁCIDO RETINÓICO:	19
1.12 - ESFINGOMIELINA	21
1.13 - ESFINGOMIELINA E MEMBRANAS CELULARES:.....	23
1.14 - ESFINGOMIELINA E TRANSDUÇÃO DE SINAL:.....	24
1.15 - ESFINGOMIELINASES.....	25
1.16- OBJETIVOS.....	28
2 - MATERIAL E MÉTODOS	29
2.1-MATERIAL :.....	29
2.2-SOLUÇÕES SALINAS UTILIZADAS:	30
2.3-MÉTODOS:.....	31
2.3.1-ISOLAMENTO DE CÉLULAS DE SERTOLI	31
2.3.2-CULTURA DE CÉLULAS DE SERTOLI	34
2.3.3-CHOQUE HIPOSMÓTICO - ELIMINAÇÃO DAS CÉLULAS GERMINATIVAS :	34
2.3.4-MARCAÇÃO DAS CULTURAS COM [METIL- ¹⁴ C] COLINA	35
2.3.5-TRATAMENTO DAS CÉLULAS DE SERTOLI COM RETINOL	35
2.3.6- EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE LÍPIDIOS	36
2.3.7- CROMATOGRAFIA (TLC) DOS COMPOSTOS MARCADOS COM COLINA	36
2.3.8-ENSAIO PARA ESFINGOMIELINASE:	37
2.3.9- ISOLAMENTO DAS CÉLULAS MIÓIDES PERITUBULARES E GERMINATIVAS	38
2.3.10- TRATAMENTO DAS CÉLULAS COM ESFINGOMIELINASE EXÓGENA.	39
2.3.11 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	40
2.3.12 - ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
3 - RESULTADOS:	41
3.1- ANÁLISE DO EFEITO DO TRATAMENTO COM RETINOL SOBRE O METABOLISMO DOS COLINA - FOSFOLÍPIDIOS DE CÉLULAS DE SERTOLI:.....	42
3.1.1- ANÁLISE DA INCORPORAÇÃO DE [METIL- ¹⁴ C] COLINA EM FOSFOLÍPIDIOS DE CÉLULAS DE SERTOLI:.....	42
3.1.2- ANÁLISE DO EFEITO DO TEMPO DE TRATAMENTO COM RETINOL SOBRE O METABOLISMO DOS COLINA FOSFOLÍPIDIOS EM CÉLULAS DE SERTOLI:	43
3.1.3- ANÁLISE DO EFEITO DO TRATAMENTO COM DIFERENTES DOSES DE RETINOL SOBRE O METABOLISMO DOS COLINA-FOSFOLÍPIDIOS EM CÉLULAS DE SERTOLI:.....	45

3.1.4: ANÁLISE DO EFEITO DO TRATAMENTO PROLONGADO (20 H) COM 5 mM DE RETINOL SOBRE O METABOLISMO DOS COLINA-FOSFOLÍDIOS EM CÉLULAS DE SERTOLI:	46
3.2- CARACTERIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DE ESFINGOMIELINASE DE CÉLULAS DE SERTOLI E ANÁLISE DO EFEITO DO RETINOL:.....	48
3.2.1 EFEITO DA VARIAÇÃO DO PH SOBRE A ATIVIDADE DE ESFINGOMIELINASE:	49
3.2.2- EFEITO DOS ÍONS SOBRE A ATIVIDADE DE ESFINGOMIELINASE:.....	50
3.2.3- ANÁLISE DA ATIVIDADE DE SMASE NA FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM CÉLULAS DE MIÓIDES PERITUBULARES E GERMINATIVAS	51
3.2.4 EFEITO DO RETINOL SOBRE A ATIVIDADE DE ESFINGOMIELINASE:	52
3.3- TRATAMENTO DAS CÉLULAS COM ESFINGOMIELINASE BACTERIANA:	53
<u>3-DISSCUSSÃO.....</u>	54
<u>5- CONCLUSÕES</u>	65
<u>6- BIBLIOGRAFIA.....</u>	66

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1.1: Secção transversal de um túbulo seminífero	02
FIGURA 1.2: Mecanismo proposto para síntese de ácido retinóico (RA) e armazenamento de retinóides	19
FIGURA 1.3: Hidrólise da esfingomiéline em ceramida mediada pela esfingomiélinase	23
FIGURA 2.1: Processo de obtenção de células de Sertoli	33
TABELA 3.1: Incorporação de [metil- ¹⁴ C] colina em lipídios de células de Sertoli	42
FIGURA 3.1: Efeito da variação do tempo de tratamento com 5 µM de retinol sobre metabolismo dos colina-fosfolipídios de células de Sertoli	43
TABELA 3.2: Efeito da variação do tempo de tratamento com 10 µM de retinol sobre metabolismo dos colina-fosfolipídios de células de Sertoli	44
FIGURA 3.3: Efeito do tratamento com diferentes doses de retinol sobre metabolismo dos colina-fosfolipídios em células de Sertoli	45
FIGURA 3.3 e FIGURA 3.4: Efeito de 20 h de tratamento com retinol sobre o metabolismo dos colina fosfolipídios de células de Sertoli	47
TABELA 3.3: Efeito de 20 h incubação com ou sem 5 µM de retinol sobre o metabolismo dos colina-fosfolipídios em culturas de células de Sertoli	48
FIGURA 3.5: Efeito da variação do pH sobre a atividade de esfingomiélinase em homogeneizados totais de células de Sertoli	49
Tabela 3.4: Efeito dos íons sobre a atividade de esfingomiélinase	50

TABELA 3.5: Efeito dos íons Mn^{+2} e Co^{+2} na atividade microsomal de esfingomielinase obtida de células Mióides Peritubulares e Germinativas	51
TABELA 3.6: Efeito do tratamento com retinol (5 ou 10 μM) sobre as diferentes frações subcelulares	52
TABELA 3.7: Efeito da variação do tempo de incubação com retinol na atividade microsomal de esfingomielinase	53
FIGURA 3.6: Efeito do tratamento com esfingomielinase bacteriana sobre os colina-fosfolipídios de células de Sertoli	54

ABREVIATURAS

AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclico
ABP	Proteína Ligadora de Andrógenos
BSA	Soro Albumina Bovina
CMF-PBS	Solução Salina Fosfato Tamponada sem Cálcio e sem Magnésio
CRBP	Proteína Celular Ligadora de Retinol
CRABP	Proteína Celular Ligadora de Ácido Retinóico
DMEM	Meio de Cultura de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido Desorribonucléico
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetra-acético
EGTA	Ácido 1,2 - Bis - 2 - aminoetoxietano - N - N - N - N - tetra acético
EP	Erro Padrão da Média
FSH	Hormônio Foliculo Estimulante
HBSS	Solução Salina Fosfato Tamponada de Hanks
IGF	Fator de Crescimento Semelhante a Insulina
LH	Hormônio Luteinizante
LPC	Lisofosfatidilcolina
NGF	Fator de Crescimento de Células Nervosas
PBS	Solução Salina Fosfato Tamponada
PC	Fosfatidilcolina
PmodS	Proteína Moduladora da Célula de Sertoli
RA	Ácido Retinóico

RAR	Receptor Nuclear para Ácido Retinóico
RBP	Proteína Plasmática Ligadora de Retinol
RXR	Receptor X para Retinóides
SFB	Soro Fetal Bovino
SM	Esfingomielina
SMase	Esfingomielinase
TLC	Cromatografia de Camada Delgada
TGF	Fator de Crescimento de Transformação Celular
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TTR	Transtirretina
VAD	Animais Deficiente de Vitamina A
VLCFA	Ácido Graxo Polinsaturado de Cadeia Muito Longa

RESUMO

As células de Sertoli são células do epitélio seminífero que proporcionam um suporte fisiológico e estrutural para a diferenciação das células germinativas.

A vitamina A é essencial para reprodução dos mamíferos. Sabe-se que em ratos deficientes em vitamina A (VAD), as células germinativas cessam seu desenvolvimento no início da meiose, ocorrendo a liberação das células imaturas. A espermatogênese é restaurada por retinol (vitamina A) (Cavazzini, et al., 1996). As células de Sertoli são responsáveis por distribuir os retinóides apropriados para as células germinativas do compartimento adluminal (Kim et al., 1993).

A esfingomielina (SM), é um esfingolípido que se destaca como um dos principais fosfolípidios de membrana é hidrolisada por esfingomielinases em fosforilcolina e ceramida (Testi, R., 1996). A ceramida é um conhecido segundo mensageiro intracelular.

Após a marcação metabólica com [^{14}C] colina, determinamos no extrato lipídico a presença de 4 bandas radioativas, identificadas como LPC, PC, e duas bandas de SM (SM1 e SM2).

Neste trabalho analisamos o efeito do tratamento com retinol sobre o metabolismo dos colina-fosfolípidios de células de Sertoli em cultura. As culturas foram marcadas metabolicamente com [^{14}C - metil] colina e depois incubadas com retinol. O tratamento com a vitamina, não alterou o metabolismo da SM, PC e LPC em nenhuma das doses e tempos utilizados.

Ao analisarmos a distribuição da radioatividade nos lipídios marcados com [^{14}C - metil] colina 20h após o fim do período de incubação com o radioativo verificamos a existência em células de Sertoli da atividade de esfingomielina sintetase.

Os dados desse experimento também mostram que transferência da radioatividade se dá preferencialmente para SM1.

O tratamento com SMase bacteriana mostrou a existência em células de Sertoli de dois *pools* de SM, um localizado na face externa da membrana celular, correspondente a 65% do total e o restante correspondente a SM localizada no interior da célula.

Também determinamos que o tratamento com retinol (5 ou 10 μM por 1 ou 2h), não afeta as atividades SMase neutra citosólica e microsomal de células de Sertoli. O tratamento com 10 μM de retinol por 1h > a atividade basal de SMase - ácida lisossomal.

A fração microsomal de células de Sertoli possui uma atividade de SMase neutra com pH ótimo em 7,5 ativada pelos íons $\text{Mn}^{+2} > \text{Mg}^{+2}$. Também foi determinado que a atividade de SMase com pH ótimo em 6,6 presente na fração microsomal de túbulos seminíferos está localizada nas células peritubulares e/ou nas células germinativas.

1. - INTRODUÇÃO

1.1- ORGANIZAÇÃO DOS TESTÍCULOS:

Os testículos de mamíferos são divididos em dois compartimentos, os túbulos seminíferos e o tecido intersticial vascularizado. Nos túbulos seminíferos estão as células germinativas, as células de Sertoli e as células peritubulares constituintes da membrana basal dos túbulos. No interstício estão as células de Leydig (Figura 1.1).

As duas maiores funções dos testículos são a gametogênese e secreção da testosterona.

A hipófise anterior participa do controle destas funções através da secreção das gonadotrofinas. O hormônio folículo-estimulante (FSH) tem ação direta sobre as células de Sertoli, estimulando-as a produzir, por exemplo: nos mamíferos uma proteína ligadora de andrógenos (ABP). O hormônio luteinizante (LH) atua sobre as células de Leydig, regulando a produção de testosterona (Bardin et al., 1981).

1.2- CÉLULAS DE LEYDIG:

O tecido conjuntivo, que envolve os túbulos seminíferos de vertebrados, diferencia-se na fase de amadurecimento sexual em células de Leydig. Estas células são produtoras de esteróides, tendo caracteristicamente um retículo endoplasmático liso mais desenvolvido.

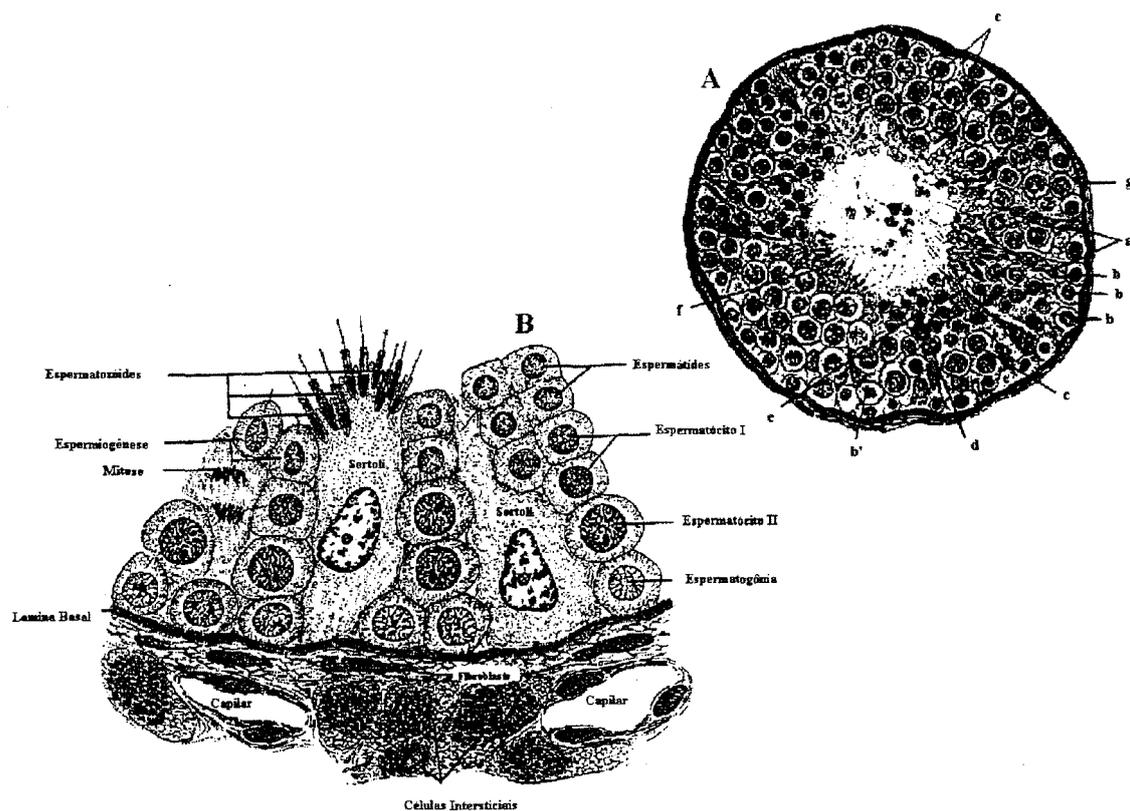


FIGURA 1.1 : A: Secção transversal de um túbulo seminífero.

a: Células de Sertoli; b: Espermatogônia em mitose; c: Espermatócito I; d: Espermatócito II; g: Membrana basal. Reproduzido de Baillière, Tindall and Cox (1948).

B: Esquema representativo de um corte de túbulo seminífero e seus componentes. Reproduzido de Junqueira & Carneiro (1985).

As células de Leydig produzem o hormônio testosterona, que atua no compartimento tubular como estímulo para a diferenciação das células germinativas. Além desta ação local a testosterona que circula no sangue é essencial para manter a função das glândulas acessórias do aparelho reprodutor masculino e para o desenvolvimento e manutenção das características sexuais secundárias.

A produção de testosterona pelas células de Leydig depende do hormônio luteinizante (LH) secretado pela adenohipófise.

As células de Leydig também influenciam a função das células de Sertoli através da secreção de peptídeos e proteínas como, por exemplo: activina/inibina, propiomielocortina, proencefalina (Bardin, et al.1993).

1.3- CÉLULAS MIÓIDES PERITUBULARES

Nos túbulos seminíferos, abaixo da lâmina basal encontra-se a lâmina própria que apresenta um envoltório caracterizado pela presença de células mióides, contráteis, unidas entre si por junções do tipo ocludentes (*tight junctions*). Quando não ocorrem estas junções ficam pequenos espaços descontínuos entre as células mióides. Estes pequenos espaços permitem que o líquido intersticial e substâncias nele dissolvidas alcancem e

atravessem a lâmina basal, desta forma, chegando às células de Sertoli e espermatogônias.

As células mióides, que recebem este nome por apresentarem características ultraestruturais de músculo liso, são responsáveis pela contração rítmica que se observa em túbulos seminíferos de roedores. Os mecanismos que controlam esta contração são ainda desconhecidos.

Estudos recentes “in vitro” tem demonstrado que estas células secretam componentes de matriz extracelular (fibronectina, colageno tipo I e IV, proteoglicanos) e fatores de crescimento (PModS, TGF- β , IGF-I, activina-A). Algumas destas substâncias são conhecidas pelo efeito que exercem nas funções das células de Sertoli.

Além disso, tem sido reportado que as células mióides, têm receptores para andrógenos e que estes receptores estão envolvidos no metabolismo do retinol. Considerando tudo isto, é evidente que as células mióides peritubulares não são somente responsáveis por proporcionar a integridade estrutural do túbulo seminífero, mas também tomam parte na regulação da espermatogênese e nas funções testiculares (Maekawa M. et al., 1996).

1.4- CÉLULAS GERMINATIVAS

Os túbulos seminíferos estão revestidos por um epitélio estratificado que contém as células espermatogênicas (germinativas) e as células de sustentação (células de Sertoli).

As células germinativas podem ser de vários tipos morfológicamente diferenciáveis: espermatogônias, espermatócitos primários e secundários, espermatídes e espermatozóides. Estas células representam estágios e fases sucessivas no processo contínuo de diferenciação chamado espermatogênese (Garcia et al., 1991).

1.5- ESPERMATOGÊNESE

O desenvolvimento das células germinativas masculinas inicia com a espermatogônia ainda não diferenciada. A espermatogênese pode ser dividida em três fases. Na primeira fase, espermatogônias não diferenciadas darão origem a espermatogônias diferenciadas e a uma nova geração de espermatogônias indiferenciadas. As espermatogônias já diferenciadas darão origem aos espermatócitos.

Na segunda fase, os espermatócitos sofrem divisões meióticas formando células haplóides que são as espermatídes. Na terceira fase, denominada espermiogênese, as espermatídes diferenciam-se em espermatozóides que são liberados na luz do túbulo seminífero (Toebosch, 1990).

Células germinativas em diferentes estágios de diferenciação podem ser observadas em todo epitélio seminífero. As células nas fases iniciais de sua diferenciação se encontram perto da base do túbulo enquanto as células mais diferenciadas se situam-se próximas a luz do túbulo (Garcia et al., 1991).

1.6- BARREIRA HEMATO - TESTICULAR

Após as espermatogônias e os espermatócitos pré-leptoteno e leptoteno, as superfícies laterais das células de Sertoli se aproximam de tal maneira entre si, que se conectam profundamente por especializações de membrana do tipo ocludente (*tight junctions*). Estabelecendo-se assim, uma barreira hemato-testicular altamente eficiente. A existência desta barreira cria, nos túbulos, dois compartimentos : o basal e o adluminal (Okanlawon et al. 1996).

Em ratos a camada de células mióides peritubulares representa um componente significativo da barreira hemato - testicular. Forma-se, nesses animais, uma interação entre as células peritubulares e as células de Sertoli mediada pela matriz extracelular (Skinner,1991). Esta interação forma um espécie de pré-filtro que precede a barreira propriamente dita (Dym, 1994).

As células germinativas, que já entraram em processo meiótico (espermatócitos maduros e espermátides) não têm acesso livre ao líquido

intersticial, dependendo das células de Sertoli para este acesso, pois estão posicionadas sempre depois das espermatogônias em direção a luz do túbulo, no compartimento adluminal (Okanlawon et al. 1996).

A especificidade das barreiras sangue-tecido, tem sido relacionada com a presença da proteína β -trace. Esta proteína parece ser importante nos processos de transporte através de barreiras sangue-tecido, na sua maturação e manutenção. Hoffmann , et al. (1996) determinaram a presença desta proteína na barreira hemato-testicular.

Romanenko, et al. (1996) mostraram que alterações na estrutura de diferentes componentes da barreira hemato-testicular podem levar ao desenvolvimento de infertilidade .

A relação entre atividades de proteases e anti-proteases e o processo de formação da barreira hemato - testicular foi demonstrada por Okanlawon et al. (1996). Os autores trataram culturas de células de Sertoli com uma droga com atividade de anti-protease, a cloroquina, e outra que atua como estimuladora da atividade lisossomal, o cloreto de amônio, estas drogas aumentaram a resistência trans-epitelial das culturas, estes resultados sugerem um aumento no processo de formação da barreira.

1.7- CÉLULAS DE SERTOLI

As células de Sertoli se encontram nas paredes dos túbulos seminíferos, com suas bases apoiadas na lâmina basal e seus ápices livres para luz tubular, são colunares altas. A parte basal destas células é estreita, as faces laterais apresentam muitos processos nos quais acomodam-se os espermatócitos e espermatídes. A parte apical tem muitas projeções, englobando as espermatídes tardias e os espermatozóides já aptos para se lançarem no lúmen do túbulo seminífero. O núcleo apresenta uma forma irregular, está localizado na parte basal. O nucleoplasma é relativamente homogêneo exceto pela presença de um nucléolo central rodeado por duas massas de heterocromatina centromérica. Na parte basal das células de Sertoli encontra-se abundante retículo endoplasmático, também estão presentes gotas de lipídios, microfilamentos, grãos de glicogênio, muitas mitocôndrias alongadas e um evidente complexo de Golgi. O complexo de Golgi é grande, mas não está associado a grânulos de secreção. A estrutura do núcleo e do complexo de Golgi é consistente com a síntese e rápida secreção de proteínas sem estoque intermediário em grânulos de secreção (Garcia et al., 1991).

As células de Sertoli estão intimamente associadas com a progênie de espermatócitos em fase de diferenciação, regulando a espermatogênese, nutrindo e sustentando as células germinativas.

As células de Sertoli também são responsáveis pela elaboração do fluido presente nos túbulos seminíferos, do mesmo modo sintetizam e secretam várias proteínas específicas, entre elas a proteína ligadora de andrógenos (ABP), esta proteína tem grande afinidade pela testosterona e age retendo esteróides nos túbulos seminíferos, a ABP é responsável pelo transporte de testosterona (Garcia et al., 1991). Outra proteína que se faz importante é a transferrina testicular uma proteína que parece transportar ferro até as células germinais. A proteína correspondente, transportadora de ferro no sangue, a transferrina sérica se une a receptores específicos presentes nas células de Sertoli sendo captado, no citoplasma, o ferro é transferido para a proteína testicular que o transporta até as células germinativas em desenvolvimento no compartimento adluminal do epitélio seminífero (Bardin et al., 1993).

Os produtos secretados pelas células de Sertoli criam um ambiente propício para o desenvolvimento das células germinativas e promovem sistemas de sinais entre os vários tipos de células testiculares. Esses produtos secretórios mantêm a homeostase no túbulo seminífero que é essencial para a manutenção da célula germinativa (Skinner, 1987). O hormônio foliculo estimulante (FSH) juntamente com outras substâncias atuam de forma endócrina, parácrina ou autócrina regulando a função da célula de Sertoli.

O FSH liga-se a receptores específicos na membrana da célula de Sertoli (Fakunding et al., 1976 ; Fritz et al., 1976). A presença dos receptores nestas células varia com a idade do animal, nos períodos fetal e pré - púbere o FSH é essencial para proliferação da célula de Sertoli (Orth, 1984).

A fagocitose também é uma função bem conhecida das células de Sertoli, elas fagocitam os restos citoplasmáticos das espermátides, gerados durante a espermiogênese e células germinativas que iniciam sua diferenciação e se degeneram.

Junções do tipo nexus (*gap junctions*) foram observadas entre as células de Sertoli, permitindo a passagem de íons e pequenas moléculas de uma célula para outra, estabelecendo comunicações entre as células vizinhas, provavelmente, aí esteja a explicação para o sincronismo durante a espermatogênese (Garcia et al., 1991).

1.8- CÉLULAS DE SERTOLI EM CULTURA

A cultura primária de células de Sertoli tem sido usada em estudos referentes a efeitos de hormônios como o FSH, insulina, IGF-I e andrógenos sobre a produção e liberação de vários produtos.

O método de isolamento das células de Sertoli envolve, o tratamento do tecido testicular com enzimas, como: tripsina e colagenase. Os agregados celulares resultantes, contêm aproximadamente 70% de células de Sertoli (Tung et al., 1984). Após a incubação em plástico com meio quimicamente definido por 3 ou mais dias, esta percentagem aumenta para 90%, porque as células germinativas contaminantes não sobrevivem junto as células de Sertoli. Adicionando soro ao meio de cultura, as células peritubulares contaminantes proliferam e podem tornar-se um tipo celular dominante nas culturas (Tung et al., 1984).

Oonk et al. (1985) propuseram que um duplo tratamento com colagenase seguido por agitação mecânica e centrifugações resulta em uma cultura com pelo menos 94% de células de Sertoli. Outros autores, como Tung e Fritz (1984) utilizaram para obtenção de culturas, com cerca de 98% de pureza, tratamentos enzimáticos com tripsina, DNase, colagenase e hialuronidase, sempre seguidos de agitação mecânica e centrifugações. A presença de células peritubulares como contaminantes, mesmo em baixa quantidade, pode modificar a resposta das células de Sertoli em cultura. Sabe-se, por exemplo que a secreção de ABP e transferrina pelas células de Sertoli é maior em presença de células peritubulares (Hutson e Stocco, 1981; Skinner e Fritz, 1985).

A função das células de Sertoli *in vitro* pode ser influenciada também por contaminação com células germinativas; Galdieri et al., (1984) mostraram que o efeito do FSH na indução da secreção de ABP era devido a contato direto entre as células de Sertoli e as células germinativas.

As células germinativas são sensíveis à mudança de osmolaridade, quando se aplica um choque hiposmótico às culturas, remove-se seletivamente as células germinativas (Galdieri et al., 1981).

Co-culturas de células de Sertoli com uma quantidade conhecida de células peritubulares e/ou células germinativas podem ser usadas para investigar os efeitos diretos destes tipos celulares nas células de Sertoli, e os efeitos indiretos dos hormônios via células peritubulares.

Grima et al (1997) mostram que quando células de Sertoli são semeadas em alta densidade (1×10^6 células / cm^2) ou com células germinativas na razão de 1:2, pode-se observar a formação de *tight junctions* nas culturas.

1.9- RETINOL

Os efeitos da vitamina A no crescimento, desenvolvimento e manutenção dos tecidos epiteliais são mediados pelos seus metabólitos. Os retinóides controlam a expressão gênica através de receptores nucleares para o ácido retinóico, pertencentes a uma família de receptores para os hormônios esteróides. O complexo ativado ácido retinóico-receptor interage com a cromatina para estimular a síntese de proteínas que mediam uma série de funções fisiológicas.

Vitamina A é essencial para reprodução dos mamíferos. Sabe-se que em ratos com uma dieta deficiente de vitamina A (VAD), as células germinativas cessam seu desenvolvimento no início da meiose, ocorrendo a liberação das células imaturas. A espermatogênese é restaurada por retinol (vitamina A), mas não por uma dieta suplementada com ácido retinóico. No entanto, a injeção intraperitoneal de altas doses de ácido retinóico, induz a re-iniciação do processo espermatogênico em ratos VAD (Cavazzini et al., 1996).

Também já foi demonstrado que o excesso de vitamina A causa alterações nos testículos. Lamano Carvalho et al.(1978) demonstraram, em ratos adultos, que a hipervitaminose A causa diminuição na massa testicular, lesões no epitélio seminífero e redução dos volumes do tecido intersticial e

dos núcleos das células de Leydig. Estas alterações levam a uma alteração no ritmo da espermatogênese.

Misro et al. (1997) mostraram que altas doses de retinol, mesmo que administradas por um curto período, são deletérias para o desenvolvimento das células germinativas em ratos imaturos. O excesso de vitamina A impede a progressão da espermatogênese, que é interrompida no estágio de espermátides redondas.

As altas doses de ácido retinóico (RA) que são requeridas para restabelecer a espermatogênese, podem, pelo menos em parte, refletir a reduzida capacidade deste retinóide em atravessar a barreira hemato-testicular. Desta forma, esta barreira limita o livre acesso dos retinóides para o epitélio seminífero. As células somáticas que circundam os túbulos seminíferos, células de Sertoli e mióides peritubulares, captam o retinol, que no plasma está ligado à proteína plasmática ligadora de retinol (RBP). Ambos tipos celulares contêm receptores nucleares para ácido retinóico (RARs) e relativamente altos níveis de proteína celular ligadora de retinol tipo I (CRBP-I), enquanto a proteína citosólica ligadora de ácido retinóico tipo I (CRABP-I) foi somente detectada em células de Sertoli (Cavazzini et al., 1996). As células de Sertoli são responsáveis por distribuir os retinóides apropriados para as células germinativas do compartimento adluminal (Kim. et al., 1993).

As células de Sertoli em cultura captam retinol do complexo transportador plasmático e rapidamente o convertem em retinil - ésteres (Shingleton et al.1989^a). A concentração de retinil-ésteres em culturas de células de Sertoli está na mesma ordem de grandeza da encontrada nos hepatócitos, sendo significativamente maior que em outras células testiculares (Bishop e Griswold, 1987).

A expressão de CRBP, bem como de outros produtos secretados pelas células de Sertoli são positivamente reguladas por retinóides, e muitos destes efeitos são mediados pela ativação dos receptores nucleares de ácido retinóico.

De Luca, em 1977 verificando o papel da vitamina A nas reações de glicosilação em membranas de mamíferos, propôs a formação de retinil-fosfato-manose e de retinil-fosfato-galactose que seriam intermediárias no processo de glicosilação. Sugeriu também que pelo menos no fígado, a transferência de manose a partir de retinil-fosfato-manose era feita diretamente para a proteína e não para intermediários lipídicos, como no caso do dolícil-fosfato-manose.

Culturas de células de Sertoli de ratos de 10 a 20 dias respondem ao tratamento combinado com FSH, insulina, testosterona e retinol com um aumento na secreção de transferrina (Skinner and Griswold, 1982). Os resultados desse trabalho sugerem que a insulina tem influência na resposta

das células de Sertoli a cada um dos outros hormônios e ao retinol. Esses autores também mostraram que o ácido retinóico estimula a secreção de transferrina mais efetivamente que o retinol.

Guma, 1992 sugeriu a vitamina A, na forma de retinol ou ác. retinóico, possa atuar sobre a glicosilação de proteínas em células de Sertoli, via ligação com seu receptor nuclear. A autora demonstrou que o retinol estimula a atividade do dolícil-fosfato-manose - sintase em culturas de células de Sertoli.

1.10- METABOLISMO DA VITAMINA A

A vitamina A existe na dieta na forma de retinil - ésteres ou de β -carotenos. Os ésteres são hidrolisados por esterases específicas e o retinol absorvido pelas células da mucosa intestinal. O β -caroteno é primeiramente absorvido e então enzimaticamente clivado em 2 moléculas de retinal que são reduzidas a retinol. Após a absorção intestinal, o retinol é esterificado com um ácido graxo de cadeia longa (geralmente o ácido palmítico) e transportado como retinil - éster nas quilomicras, pela linfa até a circulação sanguínea, de onde é captado e armazenado pelo fígado (Lotan, 1980).

A mobilização e o transporte da vitamina A, a partir dos estoques hepáticos requer hidrólise dos ésteres de retinila e conjugação do retinol livre com a proteína plasmática carregadora de retinol (RBP), produzida

pelo fígado. A RBP-retinol, normalmente associada com uma pré-albumina chamada transtiretina (TTR), é liberada para a circulação, transportando o retinol até os tecidos alvo (Griswold, et al., 1989).

O ácido retinóico é encontrado em pequenas quantidades na dieta, é transportado no sangue associado à albumina. Por isso, é plausível assumir que análogos sintéticos sejam também transportados associados à albumina. Ao contrário do retinol, o RA é rapidamente metabolizado e excretado (Lotan, 1980).

Os mecanismos bioquímicos responsáveis pela captação do retinol nos tecidos alvos ainda não são bem compreendidos, havendo duas hipóteses diferentes que tentam explicar essa etapa do metabolismo da vitamina A. Uma das hipóteses é a da captação mediada por receptores de superfície celular para RPBs, enquanto a outra suporta a idéia de que a captação do retinol ocorre por difusão passiva (Ross, 1993b).

A captação do retinol mediado por receptores de RBP tem sido descrito para vários tecidos.

Soprano e Blaner (1994), por outro lado, discutem que o complexo retinol-RBP-TTR chega na membrana plasmática da célula, se dissociando e liberando retinol, que difunde-se pela bi - camada lipídica. Uma vez dentro da bi - camada, há um rápido estabelecimento de equilíbrio de retinol entre o interior e o exterior da bi - camada lipídica (“flip-flop”).

As investigações de Creek et al. 1993 com queratinócitos comprovam essa segunda hipótese. Eles adicionaram [³H]retinol ligado a RBP no meio de cultura, observando que ocorria uma lenta captação deste. Quando adicionaram retinol sem RBP, verificaram que ocorria uma rápida captação, concluindo então que o retinol não depende da RBP para ser captado, mas que ela controla a sua liberação para as células. Shingleton et al., 1989 relataram que culturas de células de Sertoli captam retinol através do reconhecimento do complexo retinol-RBP pela superfície celular, com subsequente internalização do retinol.

O conteúdo de RA dos testículos é independente dos níveis de retinóides do plasma. A produção de RA endógeno assume particular relevância pelo seu possível papel na manutenção dos processos dependentes de vitamina A nos túbulos seminíferos (Cavazzini et al., 1996).

O processo de conversão do retinol à ácido retinóico, envolve primeiramente a oxidação do retinol a retinal e subsequente a oxidação do retinal à ácido retinóico. Através dos anos, algumas enzimas envolvidas no metabolismo do retinol e retinal foram identificadas, purificadas e caracterizadas, estas enzimas utilizam os retinóides como substrato e regulam os níveis de ácido retinóico. A álcool desidrogenase e a desidrogenase/reductase de cadeia curta catalisam a conversão de retinol para retinal, uma reação reversível. Após, entram em ação a aldeído

desidrogenase e a citocromo P450, catalisando a oxidação de retinal à ácido retinóico, esta reação é irreversível (Figura 1.2) (Duester, 1996).

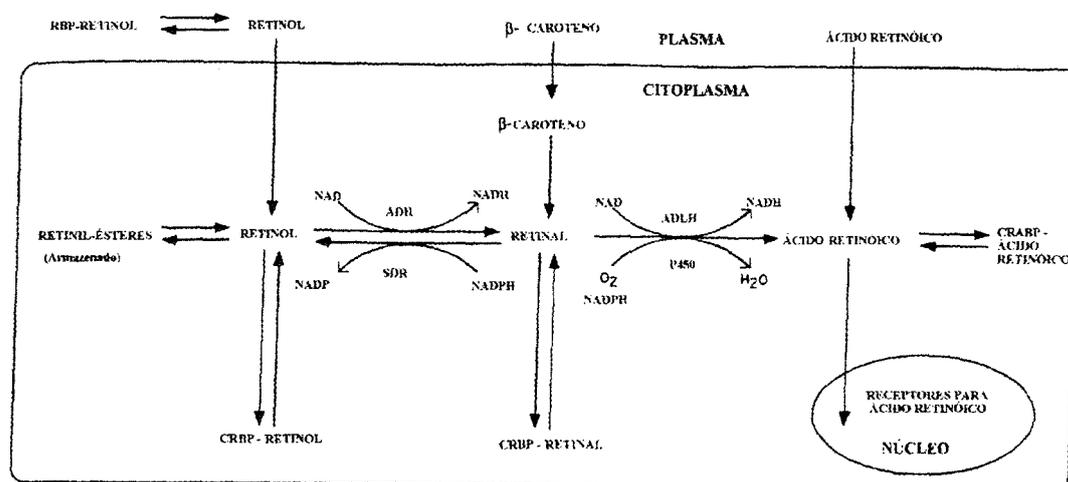


FIGURA 1.2: Mecanismo proposto para síntese de ácido retinóico (RA) e armazenamento de retinóides. RBP: proteína plasmática ligadora de retinol; CRBP: proteína celular ligadora de retinol; CRABP: proteína celular ligadora de ácido retinóico; ADH: álcool desidrogenase; SDR: desidrogenase/redutase de cadeia curta; ALDH: aldeído desidrogenase; P450: citocromo P450; Reproduzido de Duester (1996).

1.11- RECEPTORES NUCLEARES PARA ÁCIDO RETINÓICO

Duas famílias de receptores para retinóides foram identificadas: RAR (receptor para ácido retinóico) e RXR (receptor X para retinóides),

geralmente aparecem como heterodímeros RAR/RXR os quais se ligam em sequências regulatórias de gênes específicos, regulando a transcrição.

Células de Sertoli expressam CRBP, RAR- α , RAR- β e RXR- α , as células germinativas expressam a CRABP e RAR- α .

Sabe-se que a síntese de RAR- α é induzida por retinol ou ácido retinóico em células de Sertoli, enquanto a de RAR- β não. Isto sugere que o mecanismo de ação de retinóides pode ser diferente durante o desenvolvimento embriogênico, isto é, quanto mais diferenciado o tecido maior serão os níveis de retinóides. Muitos estudos sugerem que o mecanismo de ação do retinol em testículos pode não ser um mecanismo simples, mas um mecanismo múltiplo devido a estrutura e organização funcional dos testículos (Duester, 1996).

Além dos bem conhecidos efeitos mediados pelos receptores nucleares, já existem trabalhos sugerindo que os retinóides também atuam nas células por mecanismos que não envolvem estes receptores.

Djakoure et al (1996) sugerem que em células de adenoma humano os retinóides (RA) teriam um efeito não transcripcional aumentando os níveis de AMPc. Este efeito , levaria a uma rápida liberação do hormônio de crescimento.

Loss et al. (1997) mostraram que o tratamento com retinol provocava a estimulação do transporte de aminoácidos em testículos de ratos imaturos

e da captação de Ca^{+2} em células de Sertoli. Os autores demonstraram que o retinol induz uma resposta oscilatória no potencial de membrana das células de Sertoli, e sugerem que esta mudança eletrofisiológica esteja relacionada com sua ação estimulatória sobre o transporte de aminoácidos e captação de Ca^{+2} .

1.12- ESFINGOMIELINA

Em 1874, Thudichium isolou e caracterizou de tecido nervoso uma substância solúvel em éter, que foi denominada esfingomielina (SM). Por ter sido inicialmente isolada de tecido nervoso, sugeriu-se que seria um lipídio envolvido na função cerebral. Posteriormente a presença de SM em vários outros tecidos mostrou sua importância biológica universal (Koval & Pagano, 1991).

A esfingomielina, classificada como um esfingolipídio, destaca-se como um dos principais fosfolipídios de membrana, perfazendo aproximadamente de 5-20% dos fosfolipídios celulares. Encontra-se principalmente na parte externa das membranas celulares, é hidrolisada por esfingomielinases em fosforilcolina e ceramida. A fosforilcolina é liberada em meio aquoso enquanto a ceramida se difunde dentro das membranas, agindo como um mensageiro intracelular. A esfingomielina é sintetizada a partir de ceramida e um grupo fosforilcolina que pode ser derivado de

fosfatidilcolina (ação da ceramida: fosfatidilcolina fosforilcolintransferase) ou de CDP-colina (ação da CDP-colina: ceramida fosforilcolintransferase) (Figura 1.3).

Robinson et al.(1992) demonstraram que em testículos e espermatozóides de mamíferos existem esfingomielinas contendo ácidos graxos polinsaturados de cadeia muito longa (VLCFA-SM). Estes lipídios parecem ser exclusivos de testículos, os autores postulam seu papel no processo reprodutivo. Estes fosfolipídios parecem ser cruciais na manutenção da integridade da membrana do espermatozóide, facilitando sua sobrevivência no trato reprodutivo feminino. Pode-se também especular que as VLCFA-SM e/ou seus produtos de degradação (VLCFA e/ou ceramida) possam ser metabolicamente ativos e envolvidos na regulação das funções reprodutivas.

A VLCFA-SM foi encontrada exclusivamente em túbulos seminíferos de ratos adultos, sugerindo que a VLCFA-SM dos espermatozóides origine-se das células germinativas e/ou das células de Sertoli (Robinson et al., 1992).

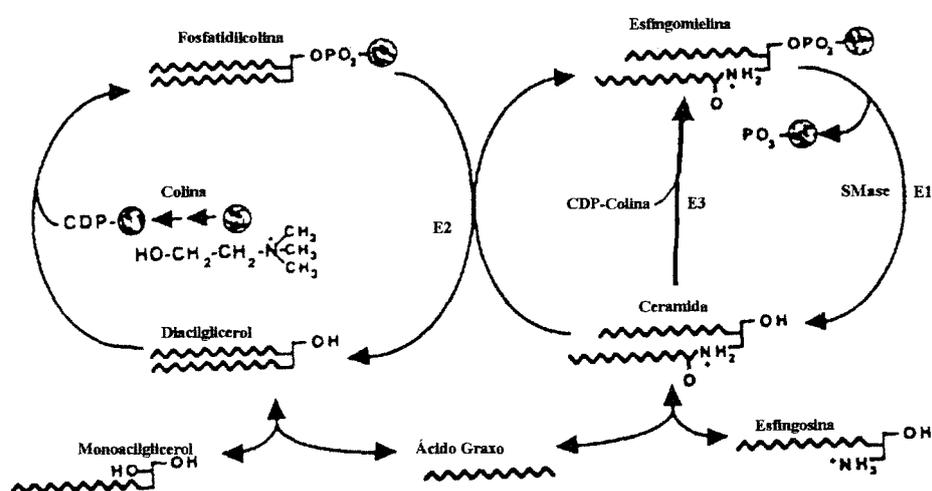


FIGURA 1.3: Rotas do metabolismo da esfingomielina. Esfingomielina é composta do grupo fosforilcolina, um ácido graxo de cadeia longa saturada ou insaturada e uma base esfingóide predominantemente esfingosina. A ação da esfingomielinase (E1) é o único mecanismo conhecido de hidrólise da esfingomielina em células de mamíferos. A síntese de esfingomielina pode se dar pela ação da ceramida: fosfatidilcolina fosforilcolinatransferase (E2) ou pela ação da CDP-colina: ceramida fosforilcolinatransferase (E3). Adaptado de Zeisel, 1993.

1.13- ESFINGOMIELINA E MEMBRANAS CELULARES

Estudos mostram que o conteúdo de esfingomielina parece estar relacionado com as propriedades mecânicas das membranas. Em eritrócitos, o aumento da razão esfingomielina/fosfatidilcolina parece estar associado com um aumento na microviscosidade da membrana, determinada por estudos de polarização. A estabilidade dos eritrócitos em condições iso-osmóticas se eleva com o aumento da quantidade de esfingomielina, embora

a resistência a choques osmóticos seja menor. A permeabilidade das membranas de eritrócitos de várias espécies de mamíferos também está correlacionada com o conteúdo de esfingomielina. Em geral, a permeabilidade para moléculas para as quais não existe um sistema específico de transporte é que aumenta com o conteúdo de esfingomielina (Barnholz & Thompson, 1980).

1.14- ESFINGOMIELINA E TRANSDUÇÃO DE SINAL

A acumulação transitória de ceramida, obtida da degradação da esfingomielina, foi reconhecida nos eventos de sinalização ligado aos diferentes receptores da superfície celular, incluindo os receptores para interferon- γ , TNF- α (fator de necrose tumoral), interleucina-1 β , CD95 (Faz/Apo-1), NGF (fator de crescimento de células nervosas), receptor P75^{ntr} e CD28 (Hannun, 1996).

Okazaki, et al.(1989) mostraram através de seus estudos a indução da hidrólise de esfingomielina (SM) pela vitamina D₃ em células HL-60 e conseqüentemente a produção de ceramida e fosforilcolina. Os níveis de SM, ceramida e fosforilcolina retornam a linha basal em 4h, sugerindo a ressíntese da SM, desta forma completando o ciclo da SM. Estudos em células HL-60 mostram que 1,25 dihidroxivitamina D₃ causa a ativação de uma esfingomielinase independente de Mg⁺² (neutra), (Hannun, 1996).

Além disso, a hidrólise da esfingomielina está associada com respostas celulares ao stress, provocado pela remoção de nutrientes ou irradiação.

O acúmulo de ceramida leva a uma reprogramação celular, em alguns casos utilizando-se os análogos permeáveis da ceramida (C2-C6), observa-se a indução de apoptose, senescência celular, diferenciação terminal ou ainda o bloqueio do crescimento celular em diversos tipos celulares (Hannun, 1996).

1.15- ESFINGOMIELINASES

Já foram identificados vários tipos de atividades de esfingomielinase, (E.C.3.1.4.12) enzima responsável pela degradação da esfingomielina: a) uma enzima lisossomal com pH ótimo em cerca de 5,0 que é amplamente distribuídas nos tecidos; b) uma enzima neutra associada à membrana, estimulada por Mg^{+2} que foi encontrada predominantemente no cérebro e nos rins; c) uma enzima citosólica com pH ótimo neutro, que não apresenta dependência por cátions divalentes; d) uma enzima ácida estimulada por Zn^{+2} que foi descrita somente em soro fetal bovino e em pequena quantidade em soro de recém nascidos humanos. Schissel et al., (1996) descreveram uma atividade de esfingomielinase que é secretada por macrófagos, por fibroblastos de pele, por células da microglia e por vários outros tipos de

células em cultura, essa enzima é inibida durante a diferenciação de monócitos para macrófagos, e) Alessenko e Chatterge, (1995) encontraram que núcleos de células hepáticas possuem uma atividade de esfingomielinase com pH ótimo em 7,2, f) Vanha-Perttula, (1988) descreveram em plasma seminal bovino uma atividade de esfingomielinase que tem pH ótimo em 6,5 e que é ativada por $\text{Co}^{+2} > \text{Mn}^{+2} > \text{Cd}^{+2} > \text{Ni}^{+2}$.

Testi, (1996) relatou que em células HL-60, um tipo de esfingomielinase neutra dependente de Mg^{+2} é ativada em resposta ao $\text{TNF-}\alpha$, e que o ácido araquidônico causa a acumulação de ceramida e ativação deste tipo de esfingomielinase. Também foi identificada nestas mesmas células uma esfingomielinase neutra independente de Mg^{+2} , localizada no citosol, também é ativada por ácido araquidônico.

A esfingomielinase ácida (pH ótimo 4.5-5.0), a qual requer diacilglicerol para ser ativada, localiza-se nos endossomos e lisossomos. Esta esfingomielinase ácida tem sido proposta como mediadora de algumas atividades do $\text{TNF-}\alpha$ especialmente na regulação do $\text{NF-}\kappa\text{B}$ (fator nuclear κB). Já foi identificado o código genético para esfingomielinase ácida, o mesmo não acontecendo para esfingomielinase neutra, mas sabe-se que são distintos, isto, foi confirmado por estudos genéticos recentes da esfingomielinase ácida em camundongos (Testi R. , 1996).

Nestes estudos deletou-se o gene da esfingomielina ácida e foi observado que ainda existia atividade de esfingomielinase neutra. Devido a complexidade e diversidade dos caminhos metabólicos iniciados pela hidrólise da SM, a resposta a ceramida parece depender do estado de diferenciação e ativação das células, bem como da interferência de outros eventos de sinalização celular. Muitas evidências levam a hipótese de que a localização subcelular da hidrólise da SM e liberação da ceramida deve ser crítica para o resultado final.

De fato, diferentes *pools* de esfingomielina são potencialmente disponíveis para a ação de esfingomielinases durante o ciclo de biogênese e degradação da membrana (Testi R. , 1996).

Em nosso laboratório Raimann (1996) descreveu em túbulos seminíferos de ratos, uma atividade de esfingomielinase ligada à membrana com pH ótimo em 6,6 e ativada por Mn^{+2} .

1.16- OBJETIVOS

Trabalhos anteriores de nosso grupo mostraram que retinol aumentava o turnover de SM em células de Sertoli metabólicamente marcadas com [³²]P-fosfato (Guma et al, 1994). Também foi demonstrado que o tratamento com 10µM de retinol por 30 e 60min diminuía o conteúdo de SM em células de Sertoli (Raimann et al, 1995). Estes resultados levantaram a possibilidade da existência em células de Sertoli do chamado ciclo da esfingomielina e da modulação desta rota de sinalização pelo retinol.

O presente trabalho teve como objetivo geral investigar o papel do retinol sobre o metabolismo dos colina fosfolipídios em células de Sertoli e caracterizar as atividades de esfingomielinase presente nestas células.

Para atingir este objetivo geral, estabeleceu-se as seguintes metas:

- Identificar e quantificar os colina-fosfolipídios.
- Verificar o efeito do tratamento com retinol sobre os colina-fosfolipídios.
- Caracterizar as atividades de esfingomielinase, verificando o pH ótimo e o efeito de íons sobre estas atividades.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- MATERIAL

- Tripsina 1:250 (Difco)
- Inibidor de tripsina tipo I-S (Soybean) (Sigma)
- Colagenase tipo I (Sigma)
- DNase tipo I (Sigma)
- Hialuronidase tipo I-S (Sigma)
- Meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco - DMEM (Sigma)
- Soro albumina bovina (Sigma)
- Soro fetal bovino-SFB (Cultilab)
- Fungizone (Laborclin)
- Gentamicina-Garamicina (Schering-Plough)
- Esfingomielina de cérebro de bovinos (Sigma)
- [¹⁴C-metil] Esfingomielina - 47mCi/mmol (Amersham Life Science)
- [¹⁴C-metil] Colina - 55mCi/mmol (Amersham Life Science)

Todo material (vidraria, pipetas, filtros, etc.) utilizado em culturas de células foi lavado com Extran alcalino (Merck), enxaguando exaustivamente com água da torneira e por imersão em água destilada (sete vezes em água destilada em vidro).

A vidraria (copos, tubos de ensaio, pipetas Pasteur, etc.) e o material cirúrgico foram esterelizados em autoclave a 120°C e 1 atm por 40 minutos e, posteriormente mantidos em estufa seca a 120°C até o momento do uso. Os filtros com membranas de $0,2\mu\text{m}$ foram autoclavados por 20 minutos a 120°C a 1 atm.

As soluções salinas, enzimas e meios utilizados nas culturas foram esterelizados por filtração através de membranas de $0,2\mu\text{m}$. A esterilidade de todas as soluções foi testada por semeadura em caldo de carne para cultura bacteriana pelo menos 24 horas antes de uso.

Os meios de cultura, as soluções salinas e enzimáticas foram preparadas com água obtida em um Milli-Q Plus (Millipore), imediatamente antes de seu preparo.

2.2- SOLUÇÕES SALINAS UTILIZADAS

a) Solução Salina Fosfato Tamponada de Hanks (HBSS):

Utilizada no preparo de colagenase, inibidor de tripsina, para lavagem das células durante a cultura .

NaCl	136,9mM
KCl	5,36mM
Na_2HPO_4	0,27mM
KH_2PO_4	1,10mM
Glicose	6,10mM
MgSO_4	0,65mM
CaCl_2	1,29mM
pH = 7.4	

b) Solução Salina Fosfato Tamponada (PBS)

Utilizada na lavagem das células após as incubações e nas homogeneizações.

NaCl	136,9mM
Na ₂ HPO ₄	0,27mM
KH ₂ PO ₄	1,10mM
pH = 7,4	

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

Utilizada no preparo da solução de tripsina:

NaCl	136,9mM
KCl	5,36mM
Na ₂ HPO ₄	0,28mM
KH ₂ PO ₄	1,10mM
Glicose	6,10mM

O pH da solução de tripsina era acertado em 7,9.

2.3- MÉTODOS

2.3.1-ISOLAMENTO DE CÉLULAS DE SERTOLI

As células de Sertoli foram isoladas de testículos de ratos Wistar (cepa do I.C.B.S-UFRGS) de 18-20 dias de idade, de acordo com o método descrito por Dorrington & Fritz (1975) modificado por Tung & Fritz (1984),

com o objetivo de obter-se culturas de células de Sertoli com alto grau de pureza.

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

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

Ao término desse processo, as células de Sertoli foram ressuspendidas em um volume conhecido de meio de cultura. Uma alíquota deste homogeneizado foi retirada para contagem em hemocítômetro pelo método de exclusão usando Azul de Tripán, para determinar a quantidade de células viáveis.

Uma vez que, as culturas de células de Sertoli utilizadas neste trabalho eram primárias, cada experimento foi realizado com culturas de células provenientes de uma ou mais ninhadas de ratos Wistar. Essa característica pode explicar a variabilidade encontrada nos resultados obtidos. Entretanto, este fato, não interfere na reprodutividade das diferenças experimentais detectadas.

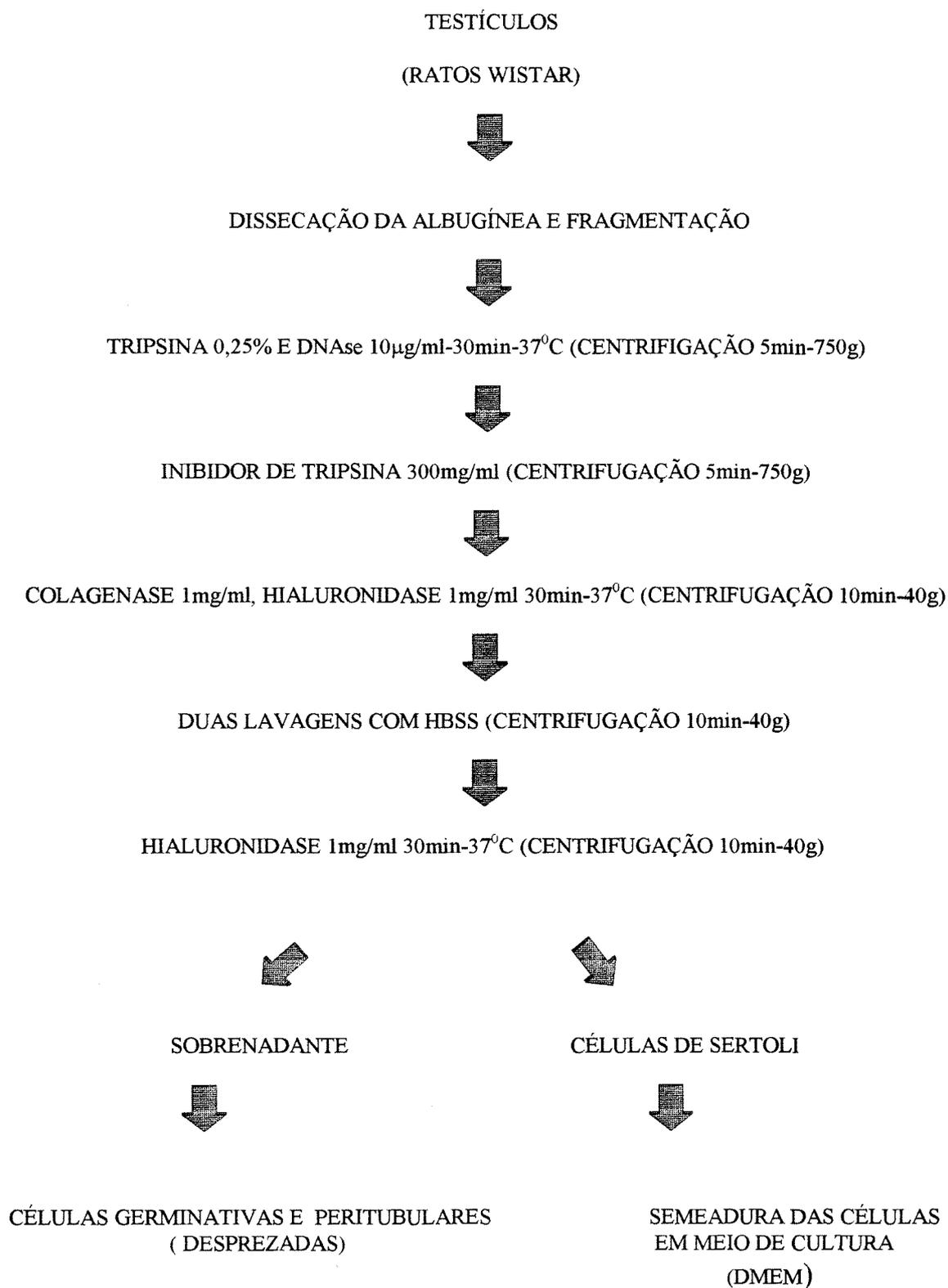


Figura 2.1- Processo de Obtenção de Células de Sertoli: Representação esquemática do método de isolamento de células de Sertoli.

2.3.2- CULTURA DE CÉLULAS DE SERTOLI

Após isolamento, as células de Sertoli de ratos de 18-20 dias de idade, foram semeadas na densidade de $2,3 \times 10^5$ células/cm² e cultivadas por 24h em meio DMEM com 1% de Soro Fetal Bovino (SFB). Após este período, foram lavadas com HBSS e cultivadas em meio DMEM sem SFB à 34°C em atmosfera normal (5% de CO₂, 95% de ar).

2.3.3- CHOQUE HIPOSMÓTICO - ELIMINAÇÃO DAS CÉLULAS GERMINATIVAS

A remoção das células germinativas que poderiam ainda estar associadas as células de Sertoli foi feita por uma modificação proposta por Onk e Grootegoed (1987) do método descrito por Galdieri et al. (1981). Esta técnica baseia-se na maior labilidade das células germinativas ao meio hiposmótico, em relação às células de Sertoli. 48h após a semeadura as células foram colocadas em contato por 2 minutos com meio de cultura diluído 1:9 (v/v) com água. Após este tratamento, as culturas foram lavadas 3 vezes com meio de cultura, e mantidas em meio de cultura sem SFB por pelo menos mais 24h para recuperação das membranas antes do início de qualquer experimento.

2.3.4- MARCAÇÃO DAS CULTURAS COM [METIL-¹⁴C] COLINA

Após 24h do tratamento hipotônico, as células foram incubadas com [metil-¹⁴C] colina (0,2 μ Ci/ml) por 16h ou 24h em meio sem soro. Após as células eram lavadas 3 vezes com HBSS, e colocava-se meio com ou sem retinol por 1h e logo retirava-se este meio, lavando-se as células com solução salina fosfato tamponada (PBS) e raspava-se as células para desenvolver os experimentos.

2.3.5- TRATAMENTO DAS CÉLULAS DE SERTOLI COM RETINOL

No 5º dia de cultura, após 24h com meio radioativo, as células eram lavadas 3 vezes com HBSS e incubadas com retinol pelas doses e tempos descritos em cada experimento. As culturas controle receberam a mesma quantidade do solvente do retinol.

Solução estoque de retinol: A solução estoque de retinol era preparada em etanol absoluto de forma que a concentração final de etanol no meio fosse de 0,1%. Para isso, pesava-se 1 mg de retinol sob abrigo de luminosidade, diluía-se em 250 μ l de etanol absoluto (Merck). A concentração da solução era e determinada por espectometria com absorção em 325nm, utilizando-se um coeficiente de extinção (ϵ) = 52770.

2.3.6- EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE LIPÍDIOS

O meio de cultura, após as células terem sido incubadas por 24h com [metil-¹⁴C] colina, era coletado em tubos de ensaio para se medir a radioatividade.

As células eram lavadas com PBS e raspadas, utilizando um *cell-scrafer*, sonicadas por 2 vezes por 30 s (Sonicador Heat Systems modelo XL). Alíquotas do homogeneizado celular foram retiradas pra dosagem do conteúdo protéico.

Os lipídios foram extraídos, segundo o método de Folch (1957). As fases inferiores foram evaporadas com N₂ e ressuspendidas em clorofórmio/metanol (2:1) para análise cromatográfica. As fases superiores foram liofilizadas e dissolvidas em etanol/água 50% para análise cromatográfica.

2.3.7- CROMATOGRAFIA (TLC) DOS COMPOSTOS MARCADOS COM COLINA

A fase inferior lipídica foi analisada por TLC em placas sw sílica gel 60 em um sistema, contendo clorofórmio, acetona, metanol, ácido acético e água (50:20:10:15:5, v/v).

Para identificar a fosforilcolina, a fase aquosa foi liofilizada e analisada por TLC em placas de sílica gel 60 em um sistema contendo metanol, 0,5% NaCl e amônia com um volume de (100:100:2 v/v).

As bandas radioativas foram detectadas por autoradiografia usando-se um filme Kodak X-Omat - AR. As manchas radioativas foram raspadas e a radioatividade determinada por cintilação líquida.

Os lipídios-padrões foram visualizados por exposição em vapores de iodo.

2.3.8- ENSAIO PARA ESFINGOMIELINASE

As células eram lavadas 2 vezes com PBS, raspadas e homogeneizadas em 9 vezes o volume da mistura sacarose 0,25M / EDTA 1mM, pH 7,0. O homogeneizado era centrifugado por 10 min a 800xg e o sobrenadante decantado, centrifugado por 20 min a 20000xg. O sedimento ressuspenso em sacarose 0,25M / EDTA 1mM, constituía a fração lisossomal (Barnholz, 1966)..

O sobrenadante resultante era centrifugado por 1h à 100000xg para obtenção das frações citosólicas e microssomal, usadas para o estudo da esfingomielinase neutra.

A atividade da esfingomielinase era medida usando [metil-¹⁴C] esfingomielina como substrato. A mistura, com um volume total de 100µl ,

continha 48nmol de esfingomielina (20000 cpm), 100 μ M do tampão apropriado, íons metálicos (MgCl₂, MnCl₂, CoCl₂, CaCl₂ na concentração de 1mM), Triton X-100 0,2% e o material enzimático. Após incubação a 37°C por 30min, a reação era interrompida por adição de 1,5ml de clorofórmio-metanol (2:1).

Em seguida, adicionava-se 0,2 ml de água aos tubos e agitava-se em vortex. A fase superior (400 μ l) era removida e a radioatividade contada por cintilação líquida, representando a fosforilcolina liberada por ação da enzima (Vanha-Pertulla, 1988).

Em alguns experimentos, a atividade de SMase foi determinada no homogeneizado total (curva de pH) ou na fração do microsomal de células mióides peritubulares e germinativas.

TAMPÕES UTILIZADOS :

pH	Composição	Concentração
3.0-7.0	Acetato-HCl	100 μ M
6.0-8.0	Imidazol-HCl	100 μ M
7.0-9.5	Tris-HCl	100 μ M

2.3.9- ISOLAMENTO DAS CÉLULAS MIÓIDES PERITUBULARES E GERMINATIVAS

As células mióides peritubulares e germinativas foram isoladas durante o processo de isolamento das células de Sertoli. Foram separados, os sobrenadantes dos tratamentos com colagenase e hialuronidase, que são

enriquecidos com esses tipos celulares. Estes sobrenadantes foram centrifugados por 15 min à 3500 rpm e o *pellet* celular foi homogeneizada.

A preparação do material enzimático (fração microssomal) foi feita conforme descrito no item 2.3.8.

2.3.10- TRATAMENTO DAS CÉLULAS COM ESFINGOMIELINASE EXÓGENA

Culturas de células de Sertoli marcadas com [^{14}C - metil] colina como descrito no item (2.3.4), foram lavadas 2 vezes com meio de cultura suplementado com 0,2% de BSA e 100 $\mu\text{g/ml}$ de cloreto de colina (meio 1).

As culturas foram então incubadas com 100mU de esfingomielinase *B.cereus* (Sigma Chemical Co.) em 1,5ml de meio por 30 min à 37°C (Kallen et al., 1994). Após, o meio foi removido e os lipídios extraídos das células como já descrito. O meio de incubação com SMase, contendo o produto da ação da SMase (fosforilcolina radioativa) e a fase inferior da partição lipídica, contendo a esfingomielina que não foi degradada foram usados para quantificação SM presente na membrana celular. Como controles usou-se células incubadas com o meio 1 em ausência de esfingomielinase pelo mesmo tempo.

2.3.11 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

A concentração de proteínas nos homogenados celulares, foi medida de acordo com Lowry et al., (1951), usando-se soro de albumina bovina (BSA) como padrão.

2.3.12 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística dos resultados, conforme as situações que se apresentaram, foram utilizados: comparações das médias pelo teste “t” de Student ou a análise de variância, seguida do teste de comparações múltiplas de Duncan .

3 - RESULTADOS:

Para estudar o efeito do retinol sobre o metabolismo dos colina - fosfolipídios em células de Sertoli foram realizados experimentos em que as culturas de células foram primeiro marcadas metabólicamente com [metil-¹⁴C] colina e para depois serem tratadas com retinol.

Inicialmente analisamos, em células controle, a distribuição da radioatividade em colina - fosfolipídios após incubação por diferentes tempos com [metil-¹⁴C] colina. A seguir, analisamos o efeito do tempo de tratamento e da dose de retinol sobre o metabolismo dos lipídios metabólicamente marcados.

Em uma segunda fase, caracterizamos as atividades de esfingomielinase presentes em células de Sertoli e verificamos se o tratamento com retinol modificava alguma das atividades caracterizadas.

Também determinamos a existência de dois *pools* de SM em células de Sertoli através do tratamento das culturas com SMase bacteriana.

3.1- ANÁLISE DO EFEITO DO TRATAMENTO COM RETINOL SOBRE O METABOLISMO DOS COLINA - FOSFOLIPÍDIOS DE CÉLULAS DE SERTOLI

3.1.1- Análise da incorporação de [metil-¹⁴C] colina em fosfolipídios de células de Sertoli

Observando a Tabela 3.1 verificamos a incorporação de colina em 4 bandas lipídicas, identificadas como: lisofosfatidilcolina (LPC), duas bandas de esfingomiéline (SM1 e SM2) e fosfatidilcolina (PC). Verifica-se que de 16h para 24h de incubação com o precursor radioativo houve uma diminuição na incorporação em LPC que corresponde ao percentual de aumento encontrado em PC.

TABELA 3.1: Incorporação de [metil-¹⁴C] colina em lipídios de células de Sertoli: No quarto dia de cultura as células foram incubadas por 16 ou 24 h com 0,2 μ Ci / ml de [metil-¹⁴C] colina. Após, o meio foi retirado, as células foram lavadas e os lipídios extraídos e analisados como descrito em Material e Métodos. Os resultados representam a média \pm EP de triplicatas de dois experimentos independentes e foram expressos como percentagem da incorporação total em lipídios. LPC = lisofosfatidilcolina; SM(B1) e SM(B2) = esfingomiélineas; PC = fosfatidilcolina.

Lipídio	16 h (%)	24 h (%)
LPC	3,67 \pm 0,36	1,65 \pm 0,1
SM (B1)	3,35 \pm 0,22	3,70 \pm 0,39
SM (B2)	3,07 \pm 0,21	2,55 \pm 0,03
PC	89,92 \pm 0,62	92,10 \pm 1,0

3.1.2- Análise do efeito do tempo de tratamento com retinol sobre o metabolismo dos colina fosfolipídios em células de Sertoli

Após 24 h de marcação com precursor radioativo, o meio radioativo foi retirado e as células foram lavadas e incubadas em ausência ou presença de 5 μ M de retinol pelos tempos descritos na Figura 3.1. Onde, não foram observadas diferenças significativas entre as células controle e as tratadas.

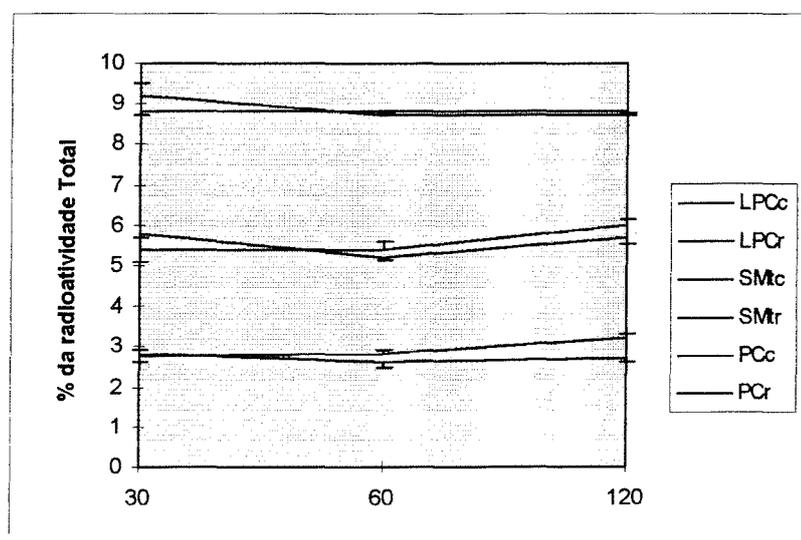


FIGURA 3.1: Efeito da variação do tempo de tratamento com 5 μ M de retinol sobre metabolismo dos colina-fosfolipídios de células de Sertoli:

Após o período de marcação metabólica o meio radioativo foi retirado, as células lavadas e deixadas por 2 h em meio DMEM sem SFB em ausência de radioativo, para que fosse alcançado o equilíbrio dos *pools* internos de radioatividade. Após este período iniciou-se o tratamento com 5 μ M de retinol por 30, 60 ou 120 min. As células controle foram incubadas pelos mesmos tempo com meio contendo a mesma quantidade de etanol (solvente do retinol) das células tratadas. Ao fim do tempo de tratamento, os lipídios foram extraídos e analisados com descrito em Material e Métodos. LPC, lisofosfatidilcolina; SM, esfingomielina total; PC, fosfatidilcolina. As letras c e r representam os lipídios extraídos de células controle e tratadas com retinol respectivamente. O percentual de PC foi multiplicado por 10^{-1} .

Os resultados são representativos de ensaios em quadruplicatas. Foram expressos como porcentagem da radioatividade total incorporada em lipídios. As médias foram comparadas por análise de variância e pelo teste de múltiplas comparações de Duncan.

Também analisamos por TLC as fases superiores da partição lipídica que contêm o produto de degradação da SM e a colina radioativa livre. Caracterizamos presença de [^{14}C]colina e [^{14}C]fosforilcolina. Coerentemente com os resultados das análises da frações lipídicas não encontramos variações significativas na quantidade de fosforilcolina em nenhum dos experimentos que realizamos para analisar o efeito do retinol.

A Tabela 3.2 mostra o efeito do tempo de incubação com $10\ \mu\text{M}$ sobre o metabolismo dos colina - fosfolipídios de células de Sertoli. O experimento foi realizado como descrito na Figura 3.1 alterando-se apenas a dose de retinol. Não observou-se diferenças na radioatividade incorporada em células tratadas com retinol ($10\ \mu\text{M}$) nos tempos de 30 e 60 min.

TABELA 3.2: Efeito da variação do tempo de tratamento com $10\ \mu\text{M}$ de retinol sobre metabolismo dos colina-fosfolipídios de células de Sertoli: Os resultados são representativos de ensaios em quadruplicatas. Foram expressos como percentagem da radioatividade total incorporada em lipídios. As médias foram comparadas por análise de variância e pelo teste de múltiplas comparações de Duncan.

Lípidios	30 min	60 min
LPCc	1,83+0,23	2,17+0,24
LPCr	1,91+0,20	3,03+0,05
SMc	7,09+0,92	5,10+0,30
SMr	6,90+0,45	5,60+0,20
PCc	89,20+2,71	92,83+0,43
PCr	91,30+0,56	91,35+0,18

3.1.3- Análise do efeito do tratamento com diferentes doses de retinol sobre o metabolismo dos colina-fosfolipídios em células de Sertoli

A Figura 3.2 mostra o efeito da variação da dose de retinol sobre a distribuição da radioatividade em colina-fosfolipídios de células de Sertoli. O experimento foi realizado com descrito no item 3.1.1 mantendo-se constante o tempo de incubação em 60 min e variando-se a dose de retinol. Nenhuma das doses de retinol (1 μM , 2 μM , 5 μM e 10 μM) testadas alteraram o metabolismo dos colina-fosfolipídios.

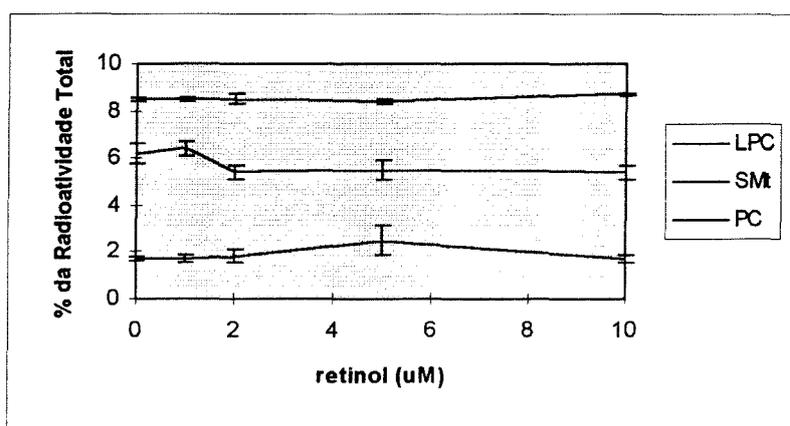


FIGURA 3.2: Efeito do tratamento com diferentes doses de retinol sobre o metabolismo dos colina-fosfolipídios em células de Sertoli

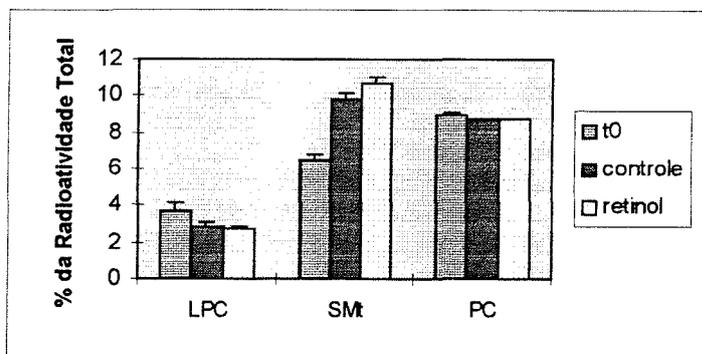
Após o período de marcação metabólica o meio radioativo foi retirado e as células lavadas e deixadas por 2 h em meio DMEM sem SFB em ausência de radioativo, para que fosse alcançado o equilíbrio dos *pools* internos de radioatividade. Após este período iniciou-se o tratamento com zero, 1, 2, 5 ou 10 μM de retinol por 60 min. Zero (0), representa a radioatividade incorporada nos lipídios de células controle. Ao fim do tempo de tratamento, os lipídios foram extraídos e analisados com descrito em Material e Métodos. LPC, lisofosfatidilcolina; SMt, esfingomielina total; PC, fosfatidilcolina. O percentual de PC foi multiplicado por 10^{-1} .

Os resultados são representativos de ensaios em quadruplicatas. Foram expressos como porcentagem da radioatividade total incorporada em lipídios. As médias foram comparadas por análise de variância e pelo teste de múltiplas comparações de Duncan.

3.1.4: Análise do efeito do tratamento prolongado (20 h) com 5 μ M de retinol sobre o metabolismo dos colina-fosfolipídios em células de Sertoli:

Com a finalidade de analisar, se tratamentos mais prolongados com retinol, alterariam o metabolismo dos colina-fosfolipídios de células de Sertoli, as culturas foram marcadas com [metil- 14 C] colina por 16 h e depois incubadas em presença ou ausência de 5 μ M de retinol por 20 h. Os tempos de marcação metabólica e tratamento com retinol foram ajustados para que não houvesse alteração no tempo total de cultura. Neste experimento, analisamos as duas bandas de SM separadamente. Os resultados das Figuras 3.3 e 3.4 mostram que não existe ação do retinol sobre o metabolismo dos colina-fosfolipídios, a Figura 3.4 mostra que a transferência de radioatividade de PC se dá principalmente para a SM1. Pela análise da Tabela 3.3 verifica-se que o percentual de decréscimo de radioatividade em PC corresponde ao aumento de incorporação na banda 1 de esfingomielina (SM1).

3.3



3.4

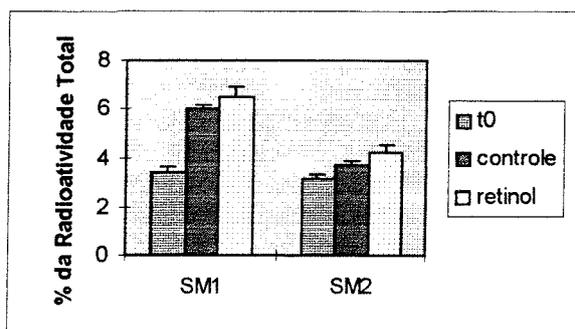


FIGURA 3.3 e FIGURA 3.4: Efeito de 20 h de tratamento com retinol sobre o metabolismo dos colina-fosfolipídios de células de Sertoli:

Após o período de marcação metabólica, o meio radioativo foi retirado e as células lavadas e incubadas por 20 h em presença ou ausência de 5 μM de retinol. t0, representa a radioatividade incorporada nos lipídios de células Sertoli logo após o fim do período de marcação metabólica. Os lipídios foram extraídos e analisados como descrito em materiais e métodos. LPC, lisofosfatidilcolina; SM, esfingomiéline total; PC, fosfatidilcolina; SM1, banda 1 da esfingomiéline; SM2, banda 2 da esfingomiéline. O percentual de PC foi multiplicado por 10^{-1} .

Os resultados são representativos de ensaios em quadruplicatas. Foram expressos como porcentagem da radioatividade total incorporada em lipídios. As médias foram comparadas por análise de variância e pelo teste de múltiplas comparações de Duncan.

	t0	controle	retinol	Δ controle	Δ retinol
LPC	3,7	2,8	2,7	-0,9	-1,0
SM1	3,4	6,0	6,5	2,6	3,1
SM2	3,0	3,8	4,2	0,8	1,2
PC	90,0	87,4	87,2	-2,6	-2,8

TABELA 3.3: Efeito de 20 h incubação com ou sem 5 μ M de retinol sobre o metabolismo dos colina-fosfolipídios em culturas de células de Sertoli:

Após o período de marcação metabólica o meio radioativo foi retirado e as células lavadas e incubadas por 20 h em presença ou ausência de 5 μ M de retinol por 60 min. t0, representa a radioatividade incorporada nos lipídios de células Sertoli logo após o período de marcação metabólica. LPC, lisofosfatidilcolina; SM1, banda 1 da esfingomielina; SM2, banda 2 da esfingomielina PC, fosfatidilcolina.

Δ , significa grupo controle ou retinol menos o t0.

Os resultados são representativos de ensaios em quadruplicatas. Foram expressos como percentagem da radioatividade total incorporada em lipídios. As médias foram comparadas por análise de variância e pelo teste de múltiplas comparações de Duncan.

3.2- CARACTERIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DE ESFINGOMIELINASE DE CÉLULAS DE SERTOLI E ANÁLISE DO EFEITO DO RETINOL

Para analisar a atividade de esfingomielinase, inicialmente determinamos alguns parâmetros cinéticos. Estabelecemos através de curvas de tempo e de proteína que a reação era linear até 1h e até 100 μ g de proteína. Escolhemos para nossos experimentos o tempo de 30 min e a quantidade de 100 μ g de proteína.

3.2.1 Efeito da variação do pH sobre a atividade de esfingomielinase:

Inicialmente analisamos o efeito do pH sobre a atividade de esfingomielinase em células de Sertoli. Para isso, trabalhamos com homogeneizados totais e verificamos a atividade de esfingomielinase em uma faixa de pH entre 3,6-9,5. A Figura 3.5 representa a variação da atividade de esfingomielinase em homogeneizados totais em função do pH. Onde, observa-se uma acentuada atividade de SMase em pH 4,5-6,0.

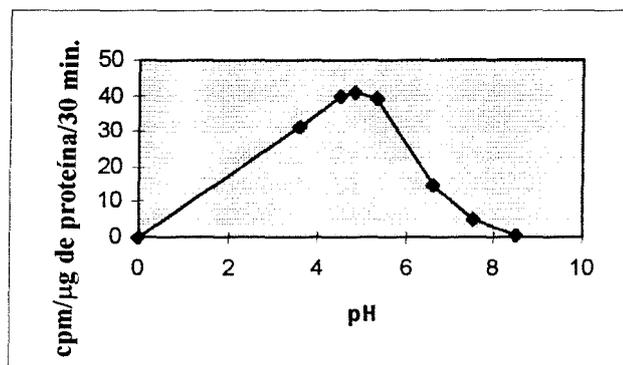


FIGURA 3.5- Efeito da variação do pH sobre a atividade de esfingomielinase em homogeneizados totais de células de Sertoli:

Os experimentos foram realizados conforme descritos em materiais e métodos, variando-se o pH na presença de 100μg de proteína. Os resultados foram expressos em cpm/μg de proteína/30 min. O experimento é representativo de outros dois com resultados similares.

3.2.2- Efeito dos íons sobre a atividade de esfingomielinase:

Como já havia sido descrito anteriormente, em trabalhos realizados em nosso laboratório, uma atividade microssomal de esfingomielinase em túbulos seminíferos com pH ótimo 6,6 e ativada por Mn^{+2} , decidimos analisar se em células de Sertoli existia essa atividade.

Trabalhamos com a fração microssomal nos pH 6,6 e 7,5, analisando a atividade de esfingomielinase na presença dos diferentes íons. Na Tabela 3.4 observou-se que em células de Sertoli havia estimulação da atividade microssomal em pH 7,5 e que era ativada por $Mn^{+2} > Mg^{+2}$ e inibida pelos outros íons testados (tabela 3.4).

Tabela 3.4: Efeito dos íons sobre a atividade de esfingomielinase- Os experimentos foram realizados conforme descritos em materiais e métodos, variando-se o íon presente no sistema de incubação na presença de 100 μ g de proteína. Os resultados expressos em relação ao controle (100%). O experimento é representativo de outros dois com resultados similares. S/N = sem adição de íons

	S/N	Mn^{+2}	Mg^{+2}	Ca^{+2}	Co^{+2}	Zn^{+2}
pH 6,6	100	91	110	125	100	125
pH 7,5	100	240	146	13	75	88

3.2.3- Análise da atividade de SMase na fração enriquecida em células de Mióides Peritubulares e Germinativas

As células peritubulares e germinativas também fazem parte do túbulo seminífero, o isolamento dessas células está descrito na metodologia. Trabalhamos com a fração microssomal em pH 6.6. Este experimento foi realizado com o objetivo de tentar localizar a atividade já descrita em túbulos seminíferos e que não estava presente nas células de Sertoli. A ação do Mn^{+2} mostra que a enzima presente nas células peritubulares e/ou germinativas é diferente da SMase medida em pH 6,6 em células de Sertoli. A ação estimulatória do Co^{+2} caracteriza a diferença com a enzima medida em pH 7,5 em células de Sertoli.

Tabela 3.5: Efeito dos íons Mn^{+2} e Co^{+2} na atividade microssomal de esfingomielinase obtida de células Mióides Peritubulares e Germinativas. Os experimentos foram realizados conforme descritos em materiais e métodos, variando-se o íon presente no sistema de incubação na presença de 100 μ g de proteína. Os resultados expressos em relação ao controle (100%). O experimento é representativo de outros dois com resultados similares. S/N = sem adição de íons

	S/N	Mn^{+2}	Co^{+2}
pH 6,6	100	137	179

3.2.4 Efeito do retinol sobre a atividade de esfingomielinase

Para analisar se o retinol atuava sobre alguma das atividades de esfingomielinase em células de Sertoli, realizamos experimentos em que se variou o tempo de incubação e a dose de tratamento com a vitamina. A análise da tabela 3.6 mostra que o tratamento com diferentes concentrações de retinol por 1h não afetou a atividade neutra de SMase, mas o tratamento com 10 μM de retinol aumentou a atividade lisossomal ácida em cerca de 25%. Na tabela 3.7 observa-se que a atividade neutra microsomal não foi alterada pelo aumento do tempo de tratamento com retinol por 2 h.

TABELA 3.6: Efeito do tratamento com retinol (5 ou 10 μM) sobre as diferentes frações subcelulares: As células de Sertoli foram tratadas com 5 μM ou 10 μM de retinol por 1h, isolou-se as frações lisossomal, microsomal e citosólica, segundo, está descrito no material e métodos. A fração lisossomal que contém a esfingomielinase ácida foi incubada em pH 4,8 e as citosólica e microsomal em pH 7,5, para análise da atividade neutra. Os experimentos foram realizados conforme descritos em materiais e métodos, variando-se a concentração de retinol na presença de 100 μg de proteína. Os resultados foram expressos em cpm/ μg de proteína/30 min. O experimento é representativo de outros dois com resultados similares.

	LISOSSOMAS pH 4.8 cpm/ μg proteína 30 min	MICROSSOMAS pH 7.5 cpm/ μg proteína 30 min	CITOSSOL pH 7.5 cpm/ μg proteína 30 min
CONTROLE	54	3,5	2,8
RETINOL 5 μM	57	3,6	2,0
RETINOL 10 μM	68	3,1	2,6

TABELA 3.7: Efeito da variação do tempo de incubação com retinol na atividade microsomal de esfingomielinase. Os experimentos foram realizados conforme descritos em materiais e métodos, variando-se a o tempo de incubação com 5 μ M de retinol na presença de 100 μ g de proteína. Os resultados foram expressos em cpm/ μ g de proteína/30 min. O experimento é representativo de outros dois com resultados similares.

	CONTROLE cpm/ μ g proteína 30 min	RETINOL 60 min cpm/ μ g proteína 30 min	RETINOL 120 min cpm/ μ g proteína 30 min
MICROSSOMAS pH 7.4	1,2	1,0	1,1

3.3- Tratamento das células com esfingomielinase bacteriana

Após a marcação com [14 C - metil] colina as culturas de células de Sertoli foram tratadas com esfingomielinase bacteriana como descrita em material e métodos. O objetivo foi determinar a existência e quantificar os dois *pools* de esfingomielina, um sensível a esfingomielinase exógena (localizado na superfície celular) e outro resistente à ação da enzima (localizado no interior da célula). A Figura 3.6 mostra não haver diferenças significativas nos colina-fosfolípidios controle e nos tratados com esfingomielinase bacteriana, mas verifica-se dois *pools* distintos de SM.

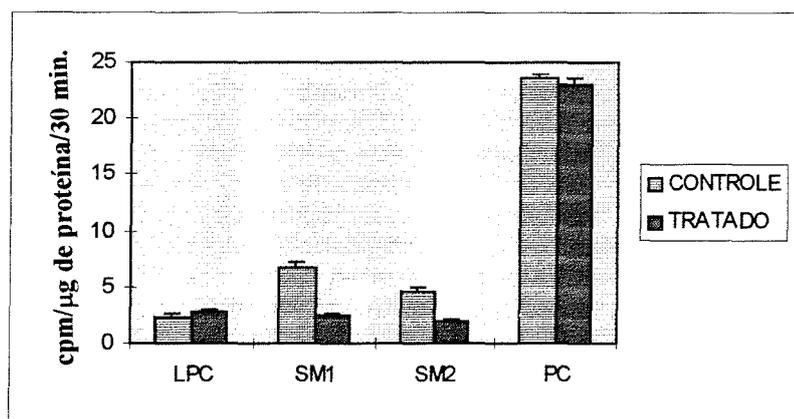


Figura 3.6 - Efeito do tratamento com esfingomielinase bacteriana sobre os colina-fosfolípidios de células de Sertoli: Após, 24h de marcação com [^{14}C metil]colina, o meio foi retirado, as células foram lavadas e incubadas por 1h com ou sem 100mU de esfingomielinase de *B.cereus*. As células que não foram tratadas com SMase exógena representam as células controle. Os lípidios foram extraídos e analisados como descrito em materiais e métodos. LPC, lisofosfatidilcolina; SM1, banda 1 da esfingomielina; SM2, banda 2 da esfingomielina PC, fosfatidilcolina.

Os resultados são representativos de ensaios em quadruplicatas. Foram expressos em cpm/ μg de proteína/30 min. As médias foram comparadas pelo teste “t” de Student.

3- DISCUSSÃO

As células de Sertoli são células do epitélio seminífero, que proporcionam um suporte fisiológico e estrutural para a diferenciação das células germinativas. As células de Sertoli estabelecem ambientes diferentes para selecionar nutrientes para as células germinativas pós e pré-meióticas, separadas pelos complexos juncionais Sertoli-Sertoli, a barreira hemato-testicular (Redenbach, 1995).

Hormônios circulantes estão engajados em iniciar e controlar o processo espermatogênico, no entanto, as junções entre as células de Sertoli impedem que estas substâncias tenham ação direta nas células espermatogênicas. Desta maneira as células de Sertoli desempenham um papel fundamental na regulação do processo espermatogênico. Os estudos de Page et al.(1996) relacionam a ação dos retinóides em células de Sertoli com a “transativação” de genes que codificam fatores de transcrição. Segundo estes autores, a modulação por retinóides de genes como c-Jun e c-Myb seria a primeira etapa de uma cascata indutível de expressão gênica necessária para manutenção da espermatogênese .

Wei, Li-Na et al.(1995) propõe que a vitamina A (retinóides) exerce efeitos pleiotrópicos em animais e estes efeitos são mediados por vários componentes celulares. Sabe-se que muitos das ações biológicas do retinol,

são mediadas por seu metabólito natural, o ácido retinóico, e são exercidas a nível celular por dois tipos de receptores nucleares os RARs e os RXRs, pertencentes a super família de receptores de esteróides / hormônios da tireóide, mas já existem trabalhos que mostram ações não transcripcionais dos retinóides (Djakoure et al. 1996). Wassermann et al.(1995) mostraram que o retinol provoca alterações rápidas a nível de membranas em células de Sertoli.

Entre os fosfolípidios de células de mamíferos, a esfingomielina (SM), não destaca-se somente como o esfingolípido mais comum, mas também como um marcador seguro da membrana plasmática, onde parece estar localizado na face externa da camada lipídica. Muitas evidências sugerem que a síntese de esfingomielina pela rota convencional que utiliza a enzima CDP-colina: ceramida fosforilcolinatransferase, não é a principal rota na maioria das células, exceto talvez quando são utilizadas ceramidas de cadeia curta.

A SM parece ser sintetizada diretamente da fosfatidilcolina pela transferência de fosforilcolina para ceramida. Além disso, esta reação parece ocorrer na membrana plasmática, embora não seja sabido em qual lado da membrana ocorre. Se ocorrer na superfície externa da membrana plasmática, então a SM poderia ser sintetizada “*in situ*” a partir da ceramida

e fosfatidilcolina presentes na face externa da membrana (Allan and Quinn, 1988).

Os resultados de análises em vários tipos celulares tem levado, em geral, a conclusão de que as diferentes membranas celulares tem composição lipídica própria. As membranas plasmáticas são proporcionalmente enriquecidas em SM, colesterol e fosfatidilserina, enquanto que o retículo endoplasmático em fosfatidilcolina e fosfatidilinositol e a mitocôndria parece ser a única que contém cardiolipina (Allan, 1996).

O objetivo do presente trabalho foi através de experimentos baseados na marcação metabólica com [^{14}C]colina e dosagem da atividade de SMase, complementar e aprofundar os resultados obtidos anteriormente.

Primeiramente, procuramos em nossos experimentos identificar e quantificar os colina-fosfolípidios de células de Sertoli. Como mostrado na tabela 3.1, após a marcação com [^{14}C]colina encontramos 4 bandas radioativas identificadas como: Lisofosfatidilcolina (LPC), duas bandas de esfingomielina (SM1 e SM2), fosfatidilcolina (PC). Cerca de 90% da radioatividade incorporada em lípidios está em PC e o restante se distribui entre SM1 e SM2 e LPC.

Ao analisarmos, em células de Sertoli, a radioatividade incorporada nos diferentes colina-fosfolípidios após 30min, 60min e 120min de

tratamento com 5 μ M de retinol (Fig.3.1), não foram observadas diferenças entre as células tratadas e controle.

Nos resultados presentes na Tabela 3.2, as células de Sertoli foram tratadas com 10 μ M de retinol por 30min e 60 min. Aqui também não observamos diferenças na radioatividade incorporada em células controle e tratadas com retinol.

Em outra série de experimentos, analisamos o efeito da dose de retinol sobre os colina - fosfolipídios de células de Sertoli. As culturas foram tratadas por 1 h com 1 μ M, 2 μ M , 5 μ M ou 10 μ M de retinol. Os resultados foram comparados entre si e com o grupo chamado controle (sem adição de retinol). Nenhuma das doses de retinol testada, alterou o metabolismo da SM ou dos outros colina-fosfolipídios (Figura 3.2)

A seguir células de Sertoli previamente marcadas com [14 C] colina foram tratadas com retinol por 20h. Com este experimento, tentamos verificar se tratamentos por períodos longos com o retinóide, semelhantes aos que atuam estimulando a síntese de glicoproteínas (Guma & Bernard, 1994) alteravam o metabolismo da SM e dos outros colina-fosfolipídios. Os resultados presentes na Figura 3.3 mostram, que também, neste caso, não encontramos diferenças significativas no metabolismo dos colina-fosfolipídios.

Outro dado que se pode extrair da Figura 3.3 é a existência em células de Sertoli da atividade de esfingomiela sintetase, pois nas 20h de incubação em ausência de [¹⁴C]colina, verifica-se a transferência de radioatividade de PC por SM. A análise da tabela 3.3 , confirma que o decréscimo de radioatividade em PC é correspondente ao aumento em SM.

Pela análise das figura 3.4 e da tabela 3.3 verifica-se que a transferência de radioatividade (PC ⇒ SM) se dá principalmente para a SM1.

Uma explicação para este resultado seria a localização diferente dos dois tipos de SM existentes em células de Sertoli. Pelo tratamento de culturas de células de Sertoli com uma esfingomielinase bacteriana, tentamos determinar a localização celular das diferentes SM. Os resultados da figura 3.6 mostram que o tratamento com a enzima bacteriana degradou em igual proporção as SM1 e SM2 (Fig. 3.4).

Os resultados da figura 3.6 também permitem determinar pela exposição de células de Sertoli à SMase bacteriana que cerca de dois terços (2/3) da SM celular, está localizada na superfície dessas células (figura 3.6). Este tipo de tratamento enzimático degrada somente os lipídios presentes na face externa da membrana plasmática (Allan, 1996). A quantidade que restou de SM após o tratamento enzimático deve representar o *pool* intracelular.

Quinn e Allan, (1992) mostram resultados semelhantes em células da linhagem BHK. Linardic et al., (1996) também descreveram a existência de dois pools de SM, um sensível e outro resistente a esfingomielinase bacteriana em células da linhagem HL-60.

A hidrólise da SM pela esfingomielinase (SMase) formando fosforilcolina e ceramida, tem sido objeto de muitos estudos, não só pelo papel da SM na estrutura das membranas celulares mas também pela importância da ceramida como segundo mensageiro em rotas que levam a diferenciação celular, a inibição da proliferação e a apoptose (Coroneos et al., 1995).

A ativação de esfingomielinases e conseqüente geração de ceramida pode ter importante função em rotas de controle do metabolismo. Vários estudos mostram que citocinas e outros agentes, tais como: $TNF\alpha$, interleucina 1β , NGF, $1\alpha,25$ diidroxivitamina D_3 , interferon γ e radiação ionizante elevam os níveis celulares de ceramida (Okazaki et al.,1994; Zhang et al.,1997).

A SMase tem sido caracterizada, isolada e purificada de vários tecidos em inúmeros trabalhos. Vanha-Perttula, (1988) descreveu a SMase do plasma seminal de humanos, bovinos e porcinos. Callaham et al,(1981)

descreveram propriedades hidrofóbicas da SMase. Pentchev et al.,(1977) isolaram e caracterizaram a SMase de tecido placentário humano.

Diferentes atividades de esfingomielinase foram identificados *in vitro* por seus pHs específicos, por catalisarem a hidrólise da SM em diferentes compartimentos subcelulares e por sua dependência ou não por cátions divalentes.

O homogeneizado total de células de Sertoli hidrolisa SM em uma faixa de pH que vai de 4,0 até cerca de 8,0 (Figura 3.5). A atividade ácida de SMase é sem dúvida a mais importante em termos quantitativos, representando cerca de 90% do total da atividade em células de Sertoli.

O efeito de vários cátions, já descritos como modificadores da atividade de SMase, foi investigado em células de Sertoli: na fração lisossomal (pH 4,8), na fração microsomal (pH 6,6 e 7,5) e na fração citosólica (pH 7,5).

A partir dos dados de Raimann (1996) os quais mostram a existência, em túbulos seminíferos de ratos imaturos, de uma atividade microsomal de SMase, com pH ótimo em 6,6, ativada por Mn^{+2} e Co^{+2} , resolvemos determinar se a atividade de esfingomielinase descrita por Raimann estava nas células de Sertoli ou nas outras células constituintes dos túbulos seminíferos (germinativas e mióides peritubulares). Os resultados das Tabelas 3.4 e 3.5 mostram que a enzima descrita nos túbulos

seminíferos, está localizada nas células germinativas e/ou nas mióides peritubulares.

Em microsomas de células de Sertoli, mostramos a existência de uma SMase neutra, com ótimo em pH 7,5, ativada por $Mn^{+2} > Mg^{+2}$ e inibida por $Ca^{+2} > Co^{+2} > Zn^{+2}$ (Tabela 3.4). As atividades de SMase ácida lisossomal e neutra citosólica não foram modificadas pelos cátions testados (resultados não mostrados).

Em outra série de experimentos analisamos o efeito do tratamento de culturas de células de Sertoli com retinol sobre a atividade de SMase. A Tabela 3.6 mostra os resultados do tratamento com diferentes doses de retinol (5 e 10 μM). O tratamento com 5 e 10 μM de retinol por 1 h não afetou as atividades neutras de SMase (citosólicas e microsomais). A atividade neutra microsomal também não foi alterada pelo aumento do tempo de tratamento para 2 h (tabela 3.7).

A análise da tabela 3.6 mostra que o tratamento com 10 μM de retinol por 1 h aumentou a atividade lisossomal ácida em cerca de 25%. A ativação da hidrólise TNF-induzida da SM por uma SMase localizada no comportamento endolisossomal tem sido proposta por vários autores (Shutze et al.,1992; Wiegmann et al.,1994; Cifone et al.,1994; Andrieu et al.,1996). A ativação da SMase-ácida lisossomal de células de Sertoli pelo retinol,

pode servir de ponto de partida para uma análise de possíveis efeitos não transcripcionais da vitamina nessas células.

A importância da investigação da regulação do metabolismo lipídico em resposta a agentes extracelulares pode ser justificada pela identificação de um novo *pool* de enzimas regulatórias, envolvidas nos processos de transdução de sinal. Muitas lipases incluindo esfingomielinases, fosfolipases C, D e A₂ tem sido alvo de atenção pelo seu papel na geração de mediadores lipídicos como a ceramida, o diacilglicerol, o ácido fosfatídico e o ácido aracdônico.

O fato de não termos conseguido repetir em células metabolicamente marcadas com [¹⁴C] colina os resultados obtidos com marcação com [³²P] fosfato pode ser devido a possibilidade desses dois precursores possuírem diferentes velocidades de *turnover* e a atividade de esfingomielinase sintase mostrada na figura 3.3.

Os resultados aqui apresentados não são conclusivos sobre a modulação do ciclo da esfingomielina por retinol em células de Sertoli. Mas mostram a existência de dois *pools* distintos de esfingomielina com diferentes localizações celulares. Ainda pode-se concluir, que os dois tipos de SM presentes em células de Sertoli tem cinéticas de síntese ou *turnover* diferentes. As células que respondem a indutores do ciclo da esfingomielina, normalmente tem um *pool* específico de esfingomielina (representando de

20 a 40% SM total) que é mobilizado em resposta ao agente indutor. A existência de dois *pools* de SM em células de Sertoli nos permite levantar a possibilidade de investigar no futuro a ação de outros indutores do ciclo da esfingomiéline em células de Sertoli.

5- CONCLUSÕES

- 1) *Turnover* da SM não foi afetado pelo retinol em nenhum dos tempos e doses estudados.
- 2) O tratamento com retinol também não afetou as atividades de SMase neutra citosólica e microssomal de células de Sertoli.
- 3) O tratamento com retinol 10 μM por 1h parece ativar a SMase ácida lisossomal de células de Sertoli.
- 4) Determinamos em células de Sertoli a existência de uma SMase neutra (pH 7,5) microssomal ativada por $\text{Mn}^{+2} > \text{Mg}^{+2}$ e inibida por Ca^{+2} e Co^{+2} .
- 5) Determinamos que a atividade de SMase microssomal com pH ótimo 6,6 dependente de Co^{+2} e Mn^{+2} presente em túbulos seminíferos está localizada nas células mióides peritubulares e/ou nas células germinativas.
- 6) Determinamos a existência em células de Sertoli da atividade de SM sintetase. Mostramos que a transferência de fosforilcolina de PC \Rightarrow SM se dá preferencialmente para a SM1.
- 7) Através do tratamento com SMase bacteriana, determinamos a existência de dois *pools* de SM. Uma SMase sensível localizada na face externa da membrana plasmática e outra resistente ao tratamento com a enzima localizada no interior da célula.

6- BIBLIOGRAFIA

- ALESSENKO, A and CHATTERGE, S. Neutral sphingomyelinase: Localization in rat liver nuclei and involvement in regeneration/proliferation. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 143: 169-174, 1995.
- ALLAN, D. and QUINN, P. Resynthesis of sphingomyelin from plasma-membrane phosphatidylcholine in BHK cells treated with *Staphylococcus aureus* sphingomyelinase. *Biochem. J.* 254 : 765-771, 1988.
- ALLAN, D. Mapping the lipid distribution in the membrane of BHK cells (Mini Review). *Molecular Membrane Biology*, 13 : 31-84, 1996.
- ANDRIU, N.; SALVAYRE, R. and LEVADE, T. Comparative study of the metabolic pools of sphingomyelin and phosphatidylcholine sensitive to tumor necrosis factor. *Eur. J. Biochem.*, 236: 738-745, 1996.
- BAILLIÈRE; TINDALL and COX. The Male Reproductive System. *Textbook of Histology*. pg.553, 1948.
- BARDIN, W. and PAULSEN, A. The Testes. *Textbook of Endocrinology* edited by Williams, R., 6^a ed.- Saunders Company, chapter 6, 293-312, 1981.
- BARDIN, C.W.; GUNSALUS, G.L. & CHENG, Y.C. The cell biology of the Sertoli cell. *In cell and Molecular Biology of The Testis*. Ed. Claude Desjardins, Larry, L. Ewing, Oxford University press, ch. 9: 189-231, 1993.
- BARNHOLZ, Y.; ROITMAN, A and GATT, S. Enzymatic Hydrolysis of Sphingolipids. *The Journal of Biological Chemistry*, 241 (16): 3731-3737, 1966.
- BARNHOLZ, Y. ; THOMPSON, T.E. Sphingomyelins in bilayers and biological membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 604 : 129-158, 1980.
- BISHOP, P.D. e GRISWOLD, M.D. Uptake and metabolism of retinol in cultured Sertoli cells. *Evidence for a kinetic model. Biochemistry*, Washington, D.C. USA, 26: 7511-7518, 1987.

- CALLAHAN, J.W.; GERRIE, J.; JONES, C.S. and SHANKARAN, P. Studies on the hydrophobic properties of sphingomyelinase. *Biochemical Journal*, 193: 272-283, 1981.
- CAVAZZINI, D.; GALDIERI, M. ; OTTONELLO, S. Retinoic acid synthesis in cells of rat seminiferous tubules - *Biochimica et Biophysica Acta*, 1313 : 139-145, 1996.
- CIFONE, M.G.; De MARIA, R.; RONCHIOLI, P.; RIPRO, M.R.; AZUMA, M.; LANJER, L.L.; SANTONI, A . Apoptotic signaling through CD95 (Faz/Apo-1) activates acidic sphingomyelinase. *J. Exp. Med.*, 180: 1547-1552, 1994.
- CORONEOS, E.; MARTINEZ, M.; SIOBHAN, M. and KESTER, M. Differential regulation of esfingomielinase and ceramidase activities by growth factors and citokines implications for cellular proliferation and differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, 270 (40) : 23305-23309, 1995.
- CREEK, K.E.; MORRÉ, D.J.; SYLVERMAN-JONES, C.S.; SHIDOJI, Y. e De Luca, L.M. Mannosyl carrier functions of retinyl phosphate and dolichyl phosphate in rat liver endoplasmic reticulum. *Biochemical Journal*, 210: 541-547, 1983.
- CREEK, K.E.; HILAIRE, P.S.; HODAM, J. A comparison of the uptake, metabolism and biologic effects of retinol delivered to human keratinocytes either free or bound to serum retinol-binding protein. In: Symposium retinoids: Cellular metabolism and activation. *Journal of Nutrition*, 123 : 356-361, 1993.
- De LUCA, L.M. The direct involvement of vitamin A in glycosil transfer reactions of mammalian membranes. *Vitamin and Hormones*, 35: 01-57, 1977.
- DJAKOURE, C.; GUIBOURDENCHE, J.; PORQUET, D.; PAGES, P.; PEILLON, F.; LI, J.Y.; EVAINBRION, D. Vitamin A and Retinoic acid stimulate within minutes camp release and growth hormone secretion in human pituitary cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 81(8) : 3123-3126, 1996.

- DORRINGTON, J. and FRITZ, M. Cellular localization of 5-reductase and 3-hidroxy-steroid dehydrogenase in the seminiferous tubules of the rat testes. *Endocrinology*, 96 : 379-889, 1975.
- DUESTER, G. Involvement of Alcohol Dehydrogenase, Short-Chain Dehydrogenase / Redutase, Aldehyde Dehydrogenase and Cytochrome P450 in the Retinoic Acid Synthesis. *American Chemical Society*, 35: 12221-12227, 1996.
- DYM, M. Basement membrane regulation of Sertoli cell. *Endocrine Reviews*, 15 (1): 102-115, 1994.
- FAKUNDING, J.L.; TINDALL, D.J.; DEDMAN, J.R. Biochemical actions of follicle stimulating hormone in the Sertoli cell of the rat testis. *Endocrinology*, 98: 392-402, 1976.
- FOLCH, J.; LEES, M. and SLOONE-STANLEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animals tissue. *The Journal of Biological Chemistry*, 226 : 497-509, 1957.
- FRITZ, I.B.; ROMMERTS, F.G.; DEDMAN, J.R. Regulation by FSH and dibutyryl ciclic AMP of the formation of androgen-binding protein in Sertoli cell-enriched cultures. *Journal of Reproduction and Fertility*. 49: 17-24, 1976.
- GALDIERI, M. ; ZIPARO, E. ; PALOMBI, F. ; RUSSO, M. A. and STEFANINI, M. Pure Sertoli Cells Cultures: A new model for the study of somatic-germ cell interactions. *Journal of Andrology*, 2: 249-254, 1981.
- GALDIERI, M. ; MONACO, L. and STEFANINI, M. Secretion of androgen binding protein by Sertoli cells is influenced by contact with germ cells. *Journal of Andrology*, 5 : 409-415, 1984.
- GALDIERI, M. and NISTICO, L. Retinoids regulate gonadotropin action rat Sertoli cells. *Biology of Reproduction*, 50: 171-177, 1994.
- GARCIA, S.M.L.; JECKEL, E. & GARCIA, C. Embriologia, *Artes Médicas*, 19-29, 1991.

- GRIMA, J.; ZHU, LI-JI and CHENG, C.Y.; Testin is tightly associated with testicular cell membrane upon its secretion by Sertoli cells whose steady-state mRNA level in the testis correlates with the turnover and integrity of inter-testicular cell junctions. *The Journal of Biological Chemistry*, 272 :6499-6509, 1997.
- GRISWOLD, M.D.; BISHOP, P.D.; KIM, K.; PING, R.; SIITERI, J.E. and MORALES, C. Function of vitamin A in normal and synchronized seminiferous tubules. *Annals of New York Academy of Sciences*. 564: 154-170, 1989.
- GUMA, F.T.C.R.; Ação do retinol na biossíntese de N-glicoproteínas em culturas de células de Sertoli. *Tese de doutorado*, apresentada no departamento de bioquímica - UFRGS sob orientação Prof^a. Elena Bernard, pgs.53; 135,1992.
- GUMA, F.C.R.; RAIMANN, P.E.; PAIVA, A.N.; MEDINA, R. S. & BERNARD, E. A . Sphingomyelin Turnover Induced by Retinol in Sertoli Cells Cultures. *XXIII^a - Reunião Anual - SBBq*. H-18: p.93, 1994.
- GUMA, F.C.R. and BERNARD, E. A . Effects of retinol on glycoprotein synthesis by Sertoli cells in culture : dolichyl phosphomannose synthase activation. *International Journal of Endocrinology*. 17: 50-55, 1994.
- HANNUN, Y.A. Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science*, 274 : 1855-1859, 1996.
- HOFFMANN, A. ; BACHNER, D. ; BETAT, N. ; LAUBER, J. ; GROSS, G. Developmental expression of murine beta-trace in embryos and adult animals suggests a function in maturation and maintenance of blood-tissue barriers. *Dev Dyn* 207(3) : 332-343, 1996.
- HUTSON, J.C., and STOCCO, D.M. Peritubular cell influence on the efficiency of androgen - binding protein secretion by Sertoli cells in culture. *Endocrinology*, 108 : 1362-1368, 1981.
- JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO, J. Aparelho Reprodutor Masculino. *Histologia Básica*. pg.429, 1985.
- KALLEN, K.J.; ALLAN, D.; WHATMORE, J.; QUINN, P. Synthesis of surface sphingomyelin in the plasma membrane recycling pathway of BHK cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1191: 52-58, 1994.

- KIM, K.H. ; WANG, Z.Q. Action of vitamin A on the testis : Role of the Sertoli cell. *The Sertoli cell*, Russel, L.D. and Griswold, M.D. ed. Cache River Press, 1993.
- KOLESNICK, R. and GOLDE, D. The Sphingomyelin Pathway in Tumor Necrosis Factor and Interleukin-1 Signaling. *Cell*. 77: 325-328, 1994.
- KOVAL, M. and PAGANO, R. Intracellular transport and metabolism of sphingomyelin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1082: 113-125, 1991.
- LAMANO CARVALHO, T.L.; LOPES, R.A ; AZOUBEL, R.; FERREIRA, A L. Morphometric study of the reversibility of testicle alterations in rats submitted to hypervitaminosis A *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 48(4) :316-324, 1978.
- LINARDIC, C.M.; JAYADEV, S. and HANNUN,A Activation of the Sphingomyelin Cycle by Brefeldin A: Effects of Brefeldin A on Differentiation and Implications for a Role for Ceramide in regulation of Protein Trafficking. *Cell Growth & Differentiation*. 7: 165-774, 1996.
- LOSS,E.S. Efeitos do retinol sobre a captação de ⁴⁵Ca e o transporte de aminoácidos e sua relação com o potencial de membrana em células de Sertoli de testículos de ratos imaturos. *Tese de Doutorado* apresentada ao curso de pós-graduação em fisiologia da UFRGS, 1997.
- LOTAN, R. Effects of vitamin A and its analogs (retinoids) on normal and neoplastic cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, Netherlands, 605 : 33-91, 1980.
- LOWRY, O H.; ROSEBROUGH, A L. & RANDALL R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193 : 265-275, 1951.
- MAEKAWA, M. ; KAMIMURA, K. ; NAGANO, T. Peritubular myoid cells in the testis : their structure and function. *Arch Histol Cytol* 59(1) : 01-13, 1996.

- MISRO, M.M.; JENA, S.; PAUL, P.K. Effect of vitamin A excess on germ cell development in prepubertal rat testis. *Indian J. Exp. Biol.* 35(6) : 576-580, 1997.
- ORTH, J. & CHISTENSEN, A.K. Localization of ¹²⁵I-labeled FSH in the testes of hypophysectomized rats by autoradiography at the light and electron microscope levels. *Endocrinology* 101: 262-278, 1984.
- OKANLAWON, A.; DYM, M. Effect of chloroquine on the formation of tight junctions in cultured immature rat Sertoli cells. *J.Andro.* 17(3) : 249-255, 1996.
- OKAZAKI, T.; BELL, R.M. and HANNUN, Y.A Sphingomyelin turnover induced by vitamin D₃ in HL-60 cells. *The Journal of Biological Chemistry.* 264(32) : 19076-19080, 1989.
- OONK, R.B. ; GROOTEGOED, J.A. and VAN DER MOLEN, H.J. Comparison of the effects of insulin and follitropin on glucose metabolism by Sertoli cells from immature rats. 1985. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 42: 39-48,
- OONK, R.B. and GROOTEGOED, J.A. Identification of insulin receptors on rat Sertoli cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 49: 51-62, 1987.
- PAGE, K.C.; HEITZMAN, D. A; CHERNIN, M. I., Stimulation of c-jun and c-myb in rat Sertoli cells following exposure to retinoids. *Biochem.Biophys. Res. Common*, 222 (2): 595-600, 1996.
- PENTCHEV, P.G.; BRADY, R. O; GAL, A E. and HIBBERT, S.R. The isolation and characterization of sphingomyelinase from human placental tissue. *Biochemica et Biophysica Acta*, 488: 312-321, 1977 .
- QUINN, P. and ALLAN, D. Two separate pools of sphingomyelin in BHK cells. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1124: 95-100, 1992.
- RAIMANN, P. E.; CASALI, E.; BERNARD, E. A & GUMA, F.C.R. Retinol treatment induces a decrease in sphingomyelin levels in Sertoli cells cultures. *XXIV^a - Reunião Anual - SBBq.* H14: p.117, 1995.

- RAIMANN, P.E. Estudo das atividades de esfingomielinase de túbulos seminíferos de ratos imaturos. *Dissertação de Bacharelado*, orientada pela Prof^a Dra. Fátima T.C.R. Guma, apresentada ao curso de ciências biológicas-bioquímica-UFRGS, 1996.
- REDENBACH, D.M.; HALL, E.S.; BOEKELHEIDE, K. Distribution of Sertoli cell microtubules, microtubule-dependent motors, and the Golgi apparatus before and after tight junction formation in developing rat testis. *Microsc. Res. Tech.* 32(6): 504-519, 1995.
- ROBINSON, B.S.; JOHNSON, O W. and POULOS, A Novel molecular species of sphingomyelin containing 2-hydroxylated polyenoic very-longchain fatty acids in mammalian testes and spermatozoa. *The Journal of Biological Chemistry*, 267 (3): 1746-1751, 1992
- ROMANENKO, A.M.; MALYSHKIN, I.N. Ultrastructural changes in the hemato-testicular barrier in the pathogenesis of infertility. *Lik Sprava*, 7-9: 131-137, 1996.
- ROSS, A C. Overview of retinoid metabolism In: Symposium. Retinoids: Cellular metabolism and activation. *Journal of Nutrition*, 123: 346-350, 1993b.
- SCHISSEL, S.; SCHUMAN, E.; WILLIAMS, K. TABAS, I. Zn^{2+} Stimulated sphingomyelinase is secreted by many cell types and is a product of the acid sphingomyelinase gene. *Journal Biological Chemistry*. 271 (31): 18431-18436, 1996.
- SCHUTZE, S.; POTTHOFF, K.; MACHLEIDT, T.; BERKOVIC, C.D.; WIEGMANN, K. & KRÖNKE, M., TNF activates NF - κ B by phosphatidylcholine - specific phospholipase c-induced "acidic" sphingomyelin breakdown. *Cell*. 71: 765 - 776, 1992.
- SHINGLETON, J.L.; SKINNER, M.K. and ONG, D.E. Characteristics of retinol accumulation from serum retinol-binding protein by cultured Sertoli cells. *Biochemistry*, 28: 9641-9647, 1989a.
- SKINNER, M.K. and GRISWOLD, M.D. Secretion of testicular transferrin by cultured Sertoli cells is regulated by hormones and retinoids. *Biology of Reproduction*. 27: 211-221, 1982.

- SKINNER, M.K.; TUNG, P.S. and FRITZ, I.B. Cooperativity between Sertoli cells and testicular peritubular cells in the production and deposition of extracellular matrix components. *The Journal of Cell Biology*, 100: 194-1947, 1985.
- SKINNER, M.K. Cell-cell interactions in the testis. *Annual New York Academi of Science*, 513: 158, 1987.
- SKINNER, M.K. Cell-cell interactions in the testis. *Endocrine Reviews*. 12 (1): 45-77, 1991.
- SOPRANO, BLANER, W. Plasma retinol-binding protein. In: Sporn, M.B.; Roberts, A B.; Goodman, D.S. (Ed) *The retinoids-biology, chemistry and medicine*. 2^a ed. cap.6, 257, 1994.
- TESTI, R Sphingomyelin breakdown and cell fate. *Elsevier Science*, 468-471, 1996.
- TOEBOSCH, J.M.W. Model systems to study biochemical functions of rat Sertoli cells, Institute Biochemie II (*Chemische Endocrinologie*) van de Faculteit der Geneeskunde, Erasmus Universiteit Rotterdam, 1990.
- THUDICHIUM, J.L.W. A treatise on the chemical constitution of the brain. *Republished in 1962 by Archon Books, Hamden*. pg. 01-262, 1874.
- TUNG, P.S. & FRITZ, I.B. Extracellular matrix promotes rat Sertoli cell histoltype expression in vitro. *Biology of Reproduction*, 30: 213-227, 1984.
- TUNG, P.S.; SKINNER, M.K. & FRITZ, I.B. Fibronectin synthesis is a marker for peritubular cell contaminants in Sertoli cell- enriched cultures. *Biology of Reproduction*, 30: 199-211, 1984.
- VANHA-PERTULLA, T. Sphingomyelinase in human, bovine and porcine seminal plasma. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 2: 263-267, 1988.
- WASSERMANN, G. F.; LOSS, E. S.; and WECHSLER, S. W. Retinol stimulates $^{45}\text{Ca}^{+2}$ uptake in Sertoli cells through a verapamil-sensitive voltage-dependent-channel. *Med. Sci. Res.* 23: 633-634, 1995.

- WEI, LI-NA; LEE, CHIN-HAO; CHANG, LIMING, Retinoic acid induction of mouse cellular retinoic acid-binding protein gene expression is enhanced by sphinganine. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 111: 207-211, 1995.
- WIEGMANN, K.; SCHUTZE, S.; MACHLEIDT, T.; WITTE, D. and KRÖNKE, M. Functional Dichotomy of Neutral and Acidic Sphingomyelin in Tumor Necrosis Factor Signaling. *Cell*. 78: 1005-1015, 1994.
- ZEISEL, S.H. Choline phospholipids: signal transduction and carcinogenesis. *The FASEB Journal*. 7: 551-557, 1993.
- ZHANG, P. ; LIU, B.; JENKING, G.; HANNUN, Y. A and OBEID, L. M. Expression of Neutral Sphingomyelinase Identifies a Distinct Pool of Sphingomyelin Involved in Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 272 (15): 9609 - 9612, 1997.