

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia

Monica Andressa Wessner do Nascimento

**CANAIS DE CÁLCIO E DE POTÁSSIO DEPENDENTES DA VOLTAGEM COMO
ALVOS DE RESPOSTAS RÁPIDAS AO RETINOL E À TESTOSTERONA EM
TESTÍCULO DE RATOS IMATUROS**

Porto Alegre

2018

Monica Andressa Wessner do Nascimento

**CANAIS DE CÁLCIO E DE POTÁSSIO DEPENDENTES DA VOLTAGEM COMO
ALVOS DE RESPOSTAS RÁPIDAS AO RETINOL E À TESTOSTERONA EM
TESTÍCULO DE RATOS IMATUROS**

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

Orientadora: Prof. Dra. Eloísa da Silveira Loss

Co-Orientadora: Prof. Dra. Fátima Regina
Mena Barreto Silva

Porto Alegre

2018

À Deus pela honra e o milagre da vida.
Aos meus pais e esposo pelo apoio e
carinho que tiveram comigo durante este
período.

As professoras Dra. Eloísa da Silveira Loss e Dra. Fátima Mena Barreto Silva por me conceder momentos valiosos de aprendizado e estimular meu crescimento.

AGRADECIMENTOS

À Renata Gonçalves pela ajuda constante e amizade inestimável durante todo o processo.

Às colegas Danusa Menegaz, Luciana Abreu da Rosa e Fernanda C. Cavalari pela amizade e empenho em me ajudar nos experimentos e paciência em ensiná-los.

Às colegas e amigos do laboratório de endocrinologia experimental, Rajla Bressan Simonetti e Jéssica Caroline Dias da Silva pela ajuda nos experimentos e pelos momentos de descontração.

Ao Laboratório de Hormônios & Transdução de Sinais/Departamento de Bioquímica/CCB/UFSC pela oportunidade em desenvolver a parte experimental durante um ano de atividades práticas laboratoriais.

Às colegas do laboratório de Hormônios & Transdução de Sinais, Vanessa S. de Oliveira, Betina F. Dambrós, Hemily Batista, Paola M. Sulis, Marisa J. S. Frederico e Allisson J. G. Castro pelo carinho e amizade em que fui recebida.

Aos colegas e professores do curso de Pós-Graduação, em especial ao Alan Bahr, Cistiane Borré e Thais Fernandes pela companhia, apoio e amizade durante estes anos.

Ao Departamento de Fisiologia da UFRGS e ao Departamento de Bioquímica da UFSC pela oportunidade de realizar este trabalho.

Aos meus pais, irmãos e sobrinhos e meu marido pelo estímulo e compreensão que recebi durante esta caminhada.

Ao CNPq, CAPES e FINEP-CT-INFRA 150-2009 pelo apoio financeiro.

RESUMO

A regulação do processo de maturação e manutenção do metabolismo das células de Sertoli é fundamental para a promoção adequada da fertilidade masculina. Além dos hormônios andrógenos, com a testosterona (T), os retinóides possuem papel fundamental na regulação e manutenção da espermatogênese. Sabe-se que além dos efeitos individuais, os retinóides interagem com outros hormônios, modulando suas ações. Este trabalho teve como objetivos estudar as possíveis interações nas vias de sinalização do retinol e da T em rápidas respostas mediadas pela membrana plasmática, verificando a influência destes hormônios sobre o influxo de cálcio, analisando a influência dos canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L (CCDV-L) e dos canais de potássio dependentes de voltagem (K_v) em testículos de ratos imaturos de 10 dias de idade. Também foi objetivo deste trabalho analisar a resposta eletrofisiológica destes hormônios em cultura primária de células de Sertoli. Na técnica de influxo de cálcio foi realizada curva de dose-resposta, onde os tecidos foram tratados com retinol ou testosterona, por 2 minutos, nas concentrações 10^{-12} , 10^{-9} e 10^{-6} M e 10^{-9} e 10^{-6} M, respectivamente. Após definido a concentração para os demais experimentos, foi analisado a interação entre estes dois hormônios. Em seguida foi verificada a influência dos canais CCDV-L e K_v , através da utilização dos bloqueadores nifedipina e cloreto de tetraetilamônio (TEA), respectivamente. Também foi realizada a técnica de eletrofisiologia *Patch Clamp* em *whole cell* onde foi analisada a atividade das correntes de potássio através da ação não clássica destes hormônios.

Concluimos que o retinol estimula o influxo de cálcio em testículos de ratos imaturos. Este efeito estimulatório ocorre através dos CCDV-L e em parte através dos canais K_v . A T também estimula o influxo de cálcio em testículos de ratos imaturos. Este efeito estimulatório ocorre através dos canais K_v e em parte através dos CCDV-L. Além disso, o retinol e a T estimulam as correntes do íon potássio através da abertura dos canais de K_v das células de Sertoli imaturas de cultura primária. O retinol e a T interagem entre si, agindo de forma sinérgica, estimulando ainda mais o influxo de cálcio quando aplicados simultaneamente, demonstrando que sua ação é

desencadeada pela abertura de diferentes tipos de canais iônicos.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
1.1. Aparelho Reprodutor Masculino.....	14
1.1.1. Testículo	14
1.1.1.1. Células de Sertoli	15
1.2. Regulação hormonal das células de Sertoli	17
1.2.1 Retinol	18
1.2.2 Testosterona.....	21
1.3. Canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem.....	24
1.4. Canais de K⁺.....	25
OBJETIVOS	27
1.5. OBJETIVOS GERAIS.....	27
1.6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
1.7. ANIMAIS.....	28
1.8. MATERIAIS	28
1.8.1 Soluções utilizadas	28
1.8.1.1 Cultura primária de células de Sertoli	28
1.8.1.2 Influxo de cálcio.....	28
1.8.1.3 Eletrofisiologia <i>Patch Clamp</i>	30
1.8.2 Substâncias utilizadas	30
1.9. MÉTODOS.....	32
1.9.1 Influxo de ⁴⁵ Ca ²⁺ em testículos	32
1.9.2 Isolamento de células de Sertoli.....	33
1.9.3 Eletrofisiologia em Patch Clamp e Whole Cell.....	34
ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
RESULTADOS.....	38
1.10. Influxo de ⁴⁵Ca²⁺ em testículos	38
1.10.1 Estudo do envolvimento dos canais de cálcio dependentes da voltagem do tipo L na ação estimulatória do retinol e testosterona no influxo de cálcio	39
1.10.2 Estudo do envolvimento dos canais de potássio dependentes da voltagem	47

na ação do retinol e testosterona no influxo de cálcio	41
1.11. Eletrofisiologia <i>Patch Clamp Whole Cell</i> em canais de K_{ev}	43
1.11.1 Retinol possui efeito estimulatório nos canais de K_v	43
1.11.1. Testosterona possui efeito estimulatório nos canais de K_v	46
DISCUSSÃO	50
CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS.....	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação do testículo e túbulos seminíferos..	15
Figura 2: Representação da célula de Sertoli e a espermatogênese..	16
Figura 3: Mecanismo de ação não clássico da testosterona em células de Sertoli	23
Figura 4: Estrutura molecular do retinol.	31
Figura 5: Estrutura molecular da testosterona.	31
Figura 6: Desenho experimental para a técnica de influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$.	32
Figura 7: Desenho experimental para a técnica de influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ com a utilização de bloqueadores.....	33
Figura 8: Cultura primária de células de Sertoli analisada em microscópio invertido com aumento de 20X.....	34
Figura 9: Células de Sertoli com a membrana rompida, formando o selo “Whole cell”.	35
Figura 10: Diagrama da configuração de registro de Patch Clamp e Whole Cell.	36
Figura 11: Desenho experimental da técnica de eletrofisiologia Patch Clamp. .	37
Figura 12: Efeitos do retinol e testosterona no influxo de cálcio em testículos de ratos de 10 dias.....	38
Figura 13: Efeito simultâneo do retinol + testosterona no influxo de cálcio em testículos de ratos de 10 dias.....	39
Figura 14: Envolvimento dos canais de cálcio dependentes da voltagem do tipo L (CCDV-L) no efeito do retinol no influxo de cálcio em testículos de ratos de 10 dias.	40
Figura 15: Envolvimento dos canais de cálcio dependentes da voltagem do tipo L (CCDV-L) no efeito estimulatório da testosterona no influxo de cálcio em testículos de ratos de 10 dias.....	41
Figura 16: Envolvimento dos canais de potássio dependentes de voltagem no efeito do retinol no influxo de cálcio em testículos de ratos de 10 dias.	42
Figura 17: Envolvimento dos canais de potássio dependentes de voltagem no efeito da testosterona no influxo de cálcio em testículos de ratos de 10 dias	9

.....	43
Figura 18: Representação do efeito do retinol no canal de K_v	44
Figura 19: Envolvimento dos canais K_v no estímulo do retinol nas correntes elétricas nas células de Sertoli.....	45
Figura 20: Efeito do retinol nas correntes do íon K^+ em 80mV.....	46
Figura 21: Representação do efeito da testosterona no canal de K_v em células de Sertoli.....	47
Figura 22: Envolvimento dos canais K_v no estímulo da testosterona nas correntes elétricas nas células de Sertoli.....	48
Figura 23: Efeito da T nas correntes do íon K^+ em 80mV	49

TABELAS

Tabela 1: Composição e concentração dos reagentes da solução tampão Krebs Ringer-bicarbonato (KRb).....	29
Tabela 2: Composição e concentração dos reagentes utilizados na técnica de eletrofisiologia Patch Clamp.	30

LISTA DE ABREVIATURAS

ABP - Proteína carreadora de andrógenos

AR - Ácido retinóico

BTH - Barreira hematotesticular

Ca²⁺ - íon cálcio

(Ca²⁺)_i - Cálcio intracelular

CCDV - Canais de Ca²⁺ dependentes da voltagem

CCDV-L - Canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L

CEUA - Comitê de ética do uso de animais

CRABP - Proteína celular de ligação de ácido retinóico

CRBP - Proteína celular de ligação de retinol

DAG - 1,2-diacilglicerol

ERS - Elementos de resposta aos esteroides

FSH - Hormônio folículo estimulante

GnRH - Hormônio liberador de gonadotrofina

GPCRs - Receptores acoplados à proteína G

I - Correntes

IP3 - Inositol-1,4,5-trifosfato

K⁺ - íon potássio

K⁺ATP - Canais de potássio dependentes de ATP

K_v - Canais de potássio sensíveis a voltagem

KRb - Tampão Krebs Ringer-bicarbonato

LH - Hormônio luteinizante

LRAT - Lecitina-retinol aciltransferase

mV - Milivolts

pA - picoampére

PIP2 - Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato

PKC - Proteína cinase C

PLR4 - Proteína de ligação de retinol-4

RA_i - Receptor intracelular de andrógenos

RAR - Receptor de ácido retinóico

RXR - Receptor X de retinóides

T - Testosterona

TEA - Cloreto de tetraetilamônio

TGF α - Fator de transformação de crescimento alfa

TGF β - Fator de transformação de crescimento beta

TTR - Transtirretina

V - Voltagem

INTRODUÇÃO

1.1. Aparelho Reprodutor Masculino

O sistema reprodutor masculino é composto por um par de testículos, glândulas acessórias, sendo elas vesículas seminais, próstata e glândulas bulbouretrais e pelo pênis. Nos testículos ocorre a espermatogênese e a produção de hormônios sexuais esteróides; cada testículo possui um sistema de ductos (epidídimo, canal deferente, uretra). Nestes ductos ocorre a maturação, circulação e liberação de espermatozóides (FAWCETT, 1993).

1.1.1. Testículo

O testículo é um órgão complexo formado por tecido endócrino-responsivo (SKINNER; GRISWOLD, 1982) que possui duas funções essenciais para a reprodução masculina: a produção de gametas (espermatogênese e espermiogênese) e a produção de hormônios esteroides e proteicos (GOODMAN, 2009). Os testículos requerem interações célula-célula para a manutenção e controle do crescimento e diferenciação celular e têm suas funções controladas pelas gonadotrofinas e outros fatores sintetizados localmente, como esteróides, fatores de crescimento e citocinas (BOURGUIBA et al., 2003; CARREAU; HESS, 2010; SAEZ, 1994).

Os testículos podem ser divididos funcional e anatomicamente em tecido intersticial e túbulos seminíferos. Como pode ser observado na Figura 1, o tecido intersticial está localizado entre os túbulos seminíferos e é constituído por tecido conjuntivo frouxo, vasos sanguíneos e linfáticos, fibras nervosas e células de Leydig, que são responsáveis pela síntese de testosterona (O'DONNELL et al., 2006; REY, 1999). Os túbulos seminíferos são considerados a unidade funcional do testículo e são responsáveis pela produção dos gametas. São constituídos por células de Sertoli e pelas células germinativas, que por meiose se diferenciam em espermatozoides (FAWCETT, 1993). As células de Sertoli possuem importante papel no

desenvolvimento funcional do testículo, sendo assim consideradas o principal componente estrutural do tecido (RATO et al., 2012). O epitélio dos túbulos seminíferos possui também células peritubulares que ficam em contato com as células de Sertoli (BELLVÉ et al., 1977; KRAWETZ; DE ROOIJ; HEDGER, 2009).

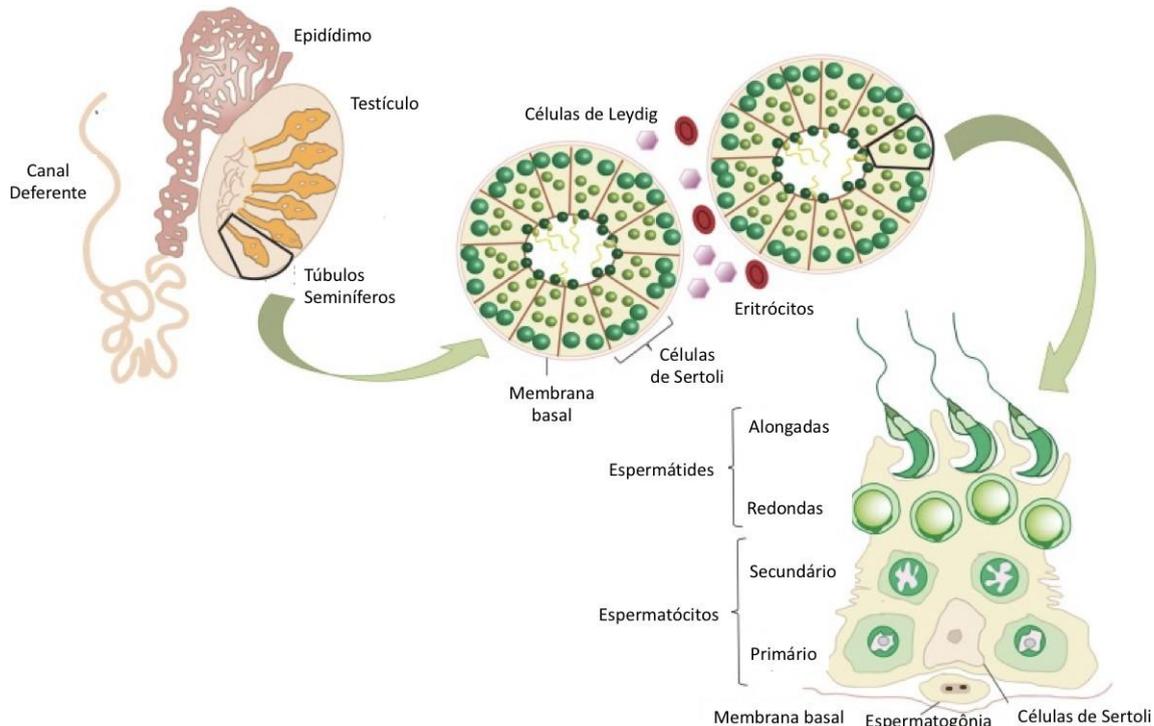


Figura 1: Representação do testículo e túbulos seminíferos. Ao centro destaque para a divisão entre o espaço intersticial, onde se encontram as células de Leydig e os túbulos seminíferos, representados em corte transversal, mostrando as células de Sertoli (verde claro) e germinativas (verde escuro). À direita, representação das células de Sertoli e o processo de espermatogênese. Adaptado de Redgrove e McLauchlin(2014).

1.1.1.1. Células de Sertoli

As células de Sertoli, Figura 2, são células grandes, de formato colunar, que se estendem da lâmina basal do túbulo seminífero até o lúmen do mesmo. Além de produzirem hormônios como a inibina e o estradiol, também fornecem fatores necessários para o metabolismo das células germinativas, como lactato, transferrina e proteína ligadora de andrógeno. As células de Sertoli também são responsáveis pela produção de diversos fatores de crescimento (fator de célula tronco, fatores de transformação de crescimento alfa e beta (TGF α e TGF β), fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I))(SKINNER, M. K.; GRISWOLD, 2005). Sua localização

permite receber, integrar e emitir para/ou do compartimento extratubular todos os sinais requeridos para o processo espermatogênico. Também possuem ação fagocitária de células germinativas em degeneração e corpos residuais, liberam espermátides na espermição, produzem proteínas que regulam e/ou respondem à liberação de hormônios hipofisários e que influenciam a atividade mitótica das espermatogônias (SOFIKITIS et al., 2008)

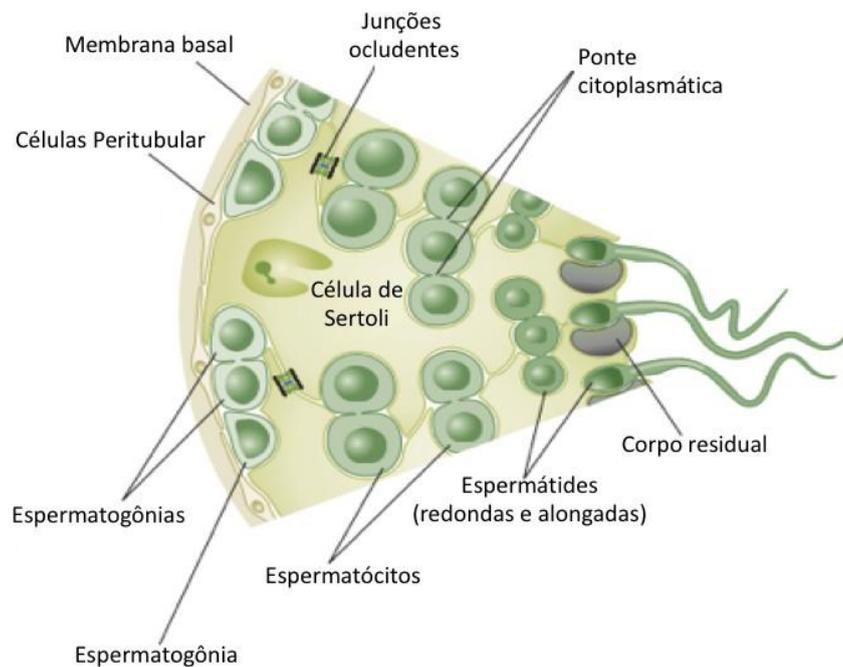


Figura 2: Representação da célula de Sertoli e a espermatogênese. Adaptado de Krawetz; De Rooij; Hedger(2009).

A fase proliferativa das células de Sertoli se inicia antes do nascimento e prossegue até aproximadamente a terceira semana pós-natal, em ratos, quando passam de células fetais a células adultas, em um processo chamado de maturação (SHARPE et al., 2003). Ao final deste processo a célula perde o potencial de proliferação ao mesmo tempo em que ocorre a ativação de várias funções necessárias para a manutenção e suporte da espermatogênese, além disso, ocorre o início das divisões meióticas das células germinativas que dará origem aos espermatozoides e também ocorre formação da barreira hematotesticular (BHT), que é formada por junções ocludentes entre as células de Sertoli maduras adjacentes, próximo à lâmina basal. A BHT age como uma barreira física, imunológica e fisiológica, controlando o

fluxo de moléculas, nutrientes, células do sistema imune e citocinas entre os compartimentos basal e luminal do túbulo seminífero (PETERSEN; SÖDER, 2006; RATO et al., 2012).

A regulação das células de Sertoli ocorre por diversos fatores, sendo eles fatores hormonais e parácrinos. Entre eles, atuam nas Sertoli o hormônio folículo estimulante (FSH), testosterona, hormônios tireoidianos, prolactina, retinol, vitamina D, estrogênio, fatores de crescimento, como o IGF-1, inibina B, insulina e citocinas inflamatórias (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α e IL-6) (ESCOTT et al., 2014; ESKILD et al., 1991; SANBORN et al., 1977; SILVA; LEITE; WASSERMANN, 2002; SKINNER; GRISWOLD, 1982). Vários destes hormônios agem regulando funções celulares como secreção, proliferação, diferenciação e atividade enzimática (ESCOTT; DA ROSA; LOSS, 2014; PETERSEN; SÖDER, 2006; SHARPE et al., 2003).

Entender a regulação do processo de maturação e do metabolismo das células de Sertoli é fundamental para a promoção adequada da fertilidade masculina, uma vez que cada célula de Sertoli possui a capacidade de fornecer suporte a um número limitado de células germinativas (PETERSEN; SÖDER, 2006; SHARPE et al., 2003; SILVA; LEITE; WASSERMANN, 2002). É fundamental que o animal se mantenha imaturo pelo tempo necessário para que as células de Sertoli proliferem adequadamente e amadureçam, sendo capazes de, então, fornecer suporte adequado à espermatogênese (SIMONETTI, 2017).

1.2. Regulação hormonal das células de Sertoli

A regulação hormonal das células de Sertoli ocorre através de uma interação complexa dos sinais endócrinos e parácrinos, sendo regulado principalmente pelo eixo hipotálamo-hipófise-testículo, onde o hipotálamo produz o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) que age na hipófise estimulando a liberação dos hormônios FSH e luteinizante (LH) (COUNIS et al., 2005), agindo diretamente ou indiretamente sobre as células de Sertoli atuando na modulação do processo espermatogênico.

A regulação endócrina ocorre através da interação de diversos hormônios, sendo o FSH o hormônio que exerce maior ação regulatória nas células de Sertoli, pois nos testículos, o receptor responsivo ao FSH é expresso somente neste tipo celular

(BOITANI et al., 1995; PETERSEN et al., 2001). O FSH estimula a atividade da aromatase bem como a produção de inibina, lactato e receptores de andrógenos (BICSAK et al., 1987; MITA; PRICE; HALL, 1982; SKINNER; SCHLITZ; TANANIS ANTHONY, 1989; VERHOEVEN; CAILLEAU, 1988). No animal imaturo o FSH tem papel fundamental na proliferação das células de Sertoli (SHARPE et al., 2003), enquanto que no animal adulto este hormônio é fundamental para a sustentação do processo de espermatogênese sendo necessário para a maturação das células germinativas (SHARPE et al., 2003). As células de Sertoli também sofrem ações regulatórias de outros hormônios, como a prolactina, hormônio do crescimento e os hormônios tireoidianos (MENEGAZ et al., 2006; PETERSEN; SÖDER, 2006; ZANATTA et al., 2013a, 2013b).

Por outro lado a regulação parácrina se dá em grande parte através da estimulação do hormônio hipofisário LH que se liga aos receptores de membrana nas células de Leydig estimulando a produção de T que, por mecanismos parácrinos, modula ações nas células de Sertoli (WALKER; CHENG, 2005) modulando também a maturação das células germinativas. O retinol também atua nas células de Sertoli modulando o processo da espermatogênese bem como o processo de maturação e proliferação destas células (GHYSELINCK et al., 2006; LIVERA, 2002).

Visto que grande parte dos hormônios interagem entre si, é necessário entender quais os mecanismos utilizados nesta interferência de resposta. Sabe-se que o retinol modula a resposta do FSH, bem como a expressão de receptores de andrógenos e secreção basal de testosterona (APPLING; CHYTIL, 1981; GALDIERI; CAPORALE; ADAMO, 1986; GALDIERI; NISTICO, 1994). Apoiado nessas observações, faz-se necessário entender as interações dos hormônios quando atuam em conjunto, buscando entender esse processo complexo de modulação da proliferação, maturação e metabolismo das células de Sertoli, para então entender a modulação da espermatogênese.

1.2.1 Retinol

Os retinóides são substâncias derivadas de vitamina A, que possuem papel fundamental na visão e no crescimento e diferenciação de vários tipos celulares. Além

disso, são importantes no processo de embriogênese, espermatogênese e na regulação da função testicular (GHYSELINCK et al., 2006; LIVERA, 2002; RIANCHO et al., 2016). Já é sabido que a hipervitaminose A causa lesões testiculares e desordens espermatogênicas (LAMANO CARVALHO et al., 1978). Por outro lado, a deficiência de vitamina A induz ao término precoce da espermatogênese (SKINNER, 1991; WOLBACH; HOWE, 1925), provocando a degeneração das células germinativas meióticas (MORALES; GRISWOLD, 1987; THOMPSON; HOWELL; PITT, 1964) e diminuindo a secreção basal de testosterona em ratos adultos (APPLING; CHYTIL, 1981).

O retinol circula no sangue ligado à proteína de ligação de retinol-4 (PLR4) que, por sua vez, se associa com a proteína transtirretina (TTR) para formar o complexo retinol-PLR4-TTR (NOY, 2016) para então promover captação do retinol nas células-alvo e gerar a resposta biológica. Além deste complexo proteico, a ação dos retinóides nas células-alvo depende da presença de uma via metabólica para retinóides, da presença da proteína celular de ligação de retinol (CRBP) ou proteína celular de ligação de ácido retinóico (CRABP) no citoplasma e da presença de receptores nucleares para estas substâncias (Revisado por AL TANOURY; PISKUNOV; ROCHETTE-EGLY, 2013; LOSS, 1997).

Os retinóides possuem duas classes de receptores nucleares: o receptor de ácido retinóico (RAR) e o receptor X de retinóides (RXR) e cada classe possui três subunidades: α , β e γ , codificados por diferentes genes (GHYSELINCK et al., 2006). Durante o período pós-natal de desenvolvimento, os RAR são encontrados em células específicas do epitélio seminífero: RAR- α nas células de Sertoli, RAR- β nas espermatídes redondas e RAR- γ nas espermatogônias A. Deficiência no RAR- α causa apoptose das células germinativas e disfunções do epitélio seminífero (VERNET et al., 2006). Deleção do RAR- β e γ não causa defeito primário nos testículos. Nas células de Sertoli de camundongos adultos, os retinóides agem através de receptores nucleares RAR- α e RXR- β , os quais regulam funções diretamente nas células de Sertoli, por exemplo, a produção de transferrina (PELLEGRINI et al., 2008; VERNET et al., 2006).

O ácido retinóico (AR), forma metabolicamente ativa dos retinóides, não

consegue atravessar a BHT (CAVAZZINI; GALDIERI; OTTONELLO, 1996; KURLANDSKY et al., 1995), por isso apresenta um mecanismo complexo de captação, envolvendo vários tipos celulares do epitélio seminífero. As células peritubulares apresentam altas quantidades de CRBP que contém sítios de ligação com alta afinidade pelo retinol (BLANER; GALDIERI; GOODMAN, 1987). As células peritubulares também captam o retinol circulatório ligado a outras proteínas de transporte, tais como a CRBP e TTR, e a segrega como um complexo formado com uma nova RBP, que é encaminhado às células de Sertoli (DAVIS; ONG, 1995).

As células de Sertoli são o principal sítio de síntese de AR (CAVAZZINI; GALDIERI; OTTONELLO, 1996), pois possuem as enzimas necessárias para a oxidação do retinol a AR (álcool desidrogenase e retinal desidrogenase) (DELTOUR et al., 1997; ZHAI; SPERKOVA; NAPOLI, 2001). Após a oxidação, o AR é distribuído para as células adjacentes. A produção de AR pelas células de Sertoli aumenta durante o desenvolvimento testicular. As células de Sertoli também possuem locais que permitem estocar retinol, pois estas células expressam lecitina-retinol aciltransferase (LRAT), que promovem a esterificação do retinol (CAVAZZINI; GALDIERI; OTTONELLO, 1996).

Além da resposta clássica, caracterizada por uma resposta nuclear que é mais demorada, podendo levar minutos ou dias, já foram descritos diversos efeitos rápidos, em nível da membrana plasmática, considerados não clássicos para os retinóides, em diversos tipos celulares (AOTO et al., 2008; CARTER et al., 2010; LIAO; HO; LIOU, 2004; LIOU et al., 2005; POON; CHEN, 2008; SARTI et al., 2012, 2013). Em células de Sertoli, foi observado uma oscilação no potencial, uma resposta rápida ao do retinol. Também foi observada que a alteração na concentração extracelular de K^+ aumenta a captação de Ca^{2+} envolvendo parcialmente os canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L (CCDV-L) (WASSERMANN, G. F., LOSS, E. S. AND WECHSLER, 1995).

Sabe-se que os retinóides estão envolvidos em diversas funções nas células de Sertoli, como o aumento da secreção de transferrina (LIVERA, 2002), modulação das vias de sinalização, reduzindo a expressão da proteína cinase C (PKC) e do receptor de andrógenos, e inibindo a produção de AMPc em resposta ao FSH (GALDIERI; CAPORALE; ADAMO, 1986; GALDIERI; NISTICO, 1994). Os retinóides

também aumentam a expressão de diversos fatores de crescimento e o metabolismo geral da célula (GAEMERS et al., 1998b). Apoiado na importância dos retinóides na fertilidade masculina e nas diversas interações com outros hormônios, faz-se necessário esclarecer os mecanismos de ação deste hormônio nas células de Sertoli, e as interações com os principais hormônios atuantes neste tecido para então compreender a função nos processos de proliferação, maturação e metabolismo das células de Sertoli e para a manutenção da espermatogênese.

1.2.2 Testosterona

Os andrógenos são os hormônios responsáveis pelas características do fenótipo masculino. Possuem papel importante durante a embriogênese, desenvolvimento e manutenção da função reprodutora, da espermatogênese e do padrão de comportamento sexual (PATRÃO; SILVA; AVELLAR, 2009). A testosterona (T) é o principal andrógeno produzido pelas células de Leydig, estimulado pelas gonadotrofinas do eixo hipotálamo-hipófise (LEE et al., 1975; TAPANAINEN et al., 1984). Após sintetizada, a T se difunde na circulação ligada à proteína carreadora de andrógenos (ABP), e atinge os tecidos-alvo se ligando aos receptores (WALKER, 2010). Em nível celular, a T pode ser transformada em diidrotestosterona (DHT), o metabólito mais potente, através da enzima 5 α -redutase (KETELSLEGERS et al., 1978) ou em estradiol, através da enzima aromatase, esta última está presente em maior concentração nas células de Sertoli imaturas e sua atividade decai com a idade (SCHTEINGART et al., 1995).

A T age através da ligação ao receptor intracelular de andrógenos (RAi), um receptor membro da superfamília de receptores nucleares. Quando a T se liga ao receptor, promove a dimerização, então, o complexo hormônio-receptor é deslocado para o núcleo onde se liga aos elementos de resposta aos esteroides (ERS), onde promove a transcrição de vários genes (BRINKMANN; TRAPMAN, 2000; GANONG, 2010).

Entre os efeitos da T no receptor intracelular está a redução da proliferação das células de Sertoli *in vitro*, levando ao término precoce da fase de maturação

destas células (BUZZARD; WREFORD; MORRISON, 2003). Além disso, suprime a secreção hipofisária de FSH, principal estimulador da proliferação das células de Sertoli (SUMMERVILLE; SCHWARTZ, 1981). Acredita-se que o RAI atue modificando/controlando a sinalização da T (SMITH; WALKER, 2014). Assim, a ausência de RAI nas células de Sertoli no início do período neonatal parece proteger as células da maturação precoce (REY et al., 2009). Em estudos realizados com animais geneticamente modificados, que não expressam RAI em todos os tecidos (ARKO) ou somente na células de Sertoli (SCARKO), observou-se que a ausência de RAI afeta a maturação da célula de Sertoli, resultando em um atraso e alteração na formação da BHT, alteração na expressão de genes relacionados à adesão celular e no desenvolvimento do citoesqueleto das células de Sertoli, além de falha na manutenção/progressão da espermatogênese (O'SHAUGHNESSY, 2014).

Além da resposta clássica descrita acima, sabe-se que a T apresenta resposta não clássica, uma resposta rápida em nível de membrana plasmática, independente de RAI geralmente relacionada com receptores acoplados à proteína G (GPCRs) que agem ativando diversas vias de sinalização. As células de Sertoli imaturas não expressam RAI, porém foi observado que a aplicação tópica de T em concentrações fisiológicas desencadeia uma despolarização do potencial de membrana destas células (CAVALARI et al., 2012; DE CASTRO et al., 2013). A T também promove um aumento no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no tecido testicular de ratos de 4 dias (ROSA, 2014), de 15 dias (DE CASTRO et al., 2013; VON LEDEBUR et al., 2002) e em células de Sertoli isoladas (GORCZYNSKA; HANDELSMAN, 1995; ROMMERTS et al., 2000).

Estudos anteriores demonstraram que o influxo de cálcio promovido pela ação não clássica da T ocorre a partir da ligação dos andrógenos à um receptor desconhecido e a consequente ativação da fosfolipase C, que hidrolisa o fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) em inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) e 1,2-diacilglicerol (DAG). A redução dos níveis de PIP2 na membrana promove o fechamento dos canais de potássio dependentes de ATP (K^+_{ATP}), causando um aumento na resistência e despolarização do potencial de membrana, com a consequente abertura de canais CCDV-L aumentando assim o influxo de cálcio, conforme demonstrado na Figura 3. (DE CASTRO et al., 2013; LOSS et al., 2004;

VON LEDEBUR et al., 2002).

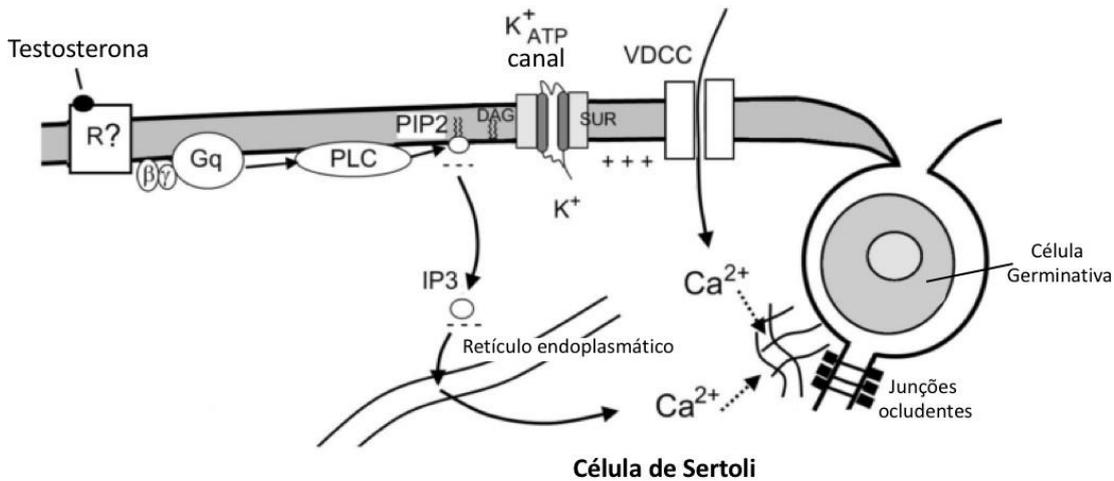


Figura 3: Mecanismo de ação não clássica da testosterona em células de Sertoli. Adaptado de Loss; Jacobus; Wassermann(2011).

Inicialmente, acreditava-se que os hormônios esteroides atuavam via mecanismo de ação não clássica como uma via complementar aos mecanismos clássicos, aumentando a diversidade e aprimorando os efeitos destes hormônios na célula de Sertoli (SILVA; LEITE; WASSERMANN, 2002). Entretanto, estudos recentes indicam que a sinalização da via não clássica pode estar envolvida na regulação da via clássica, uma vez que a ativação de enzimas cinases pode resultar na regulação da transcrição gênica. Assim, a via clássica e a via não clássica atuam em conjunto para coordenar a regulação gênica, contribuindo para a manutenção da espermatogênese e da fertilidade (LIAO et al., 2013; SMITH; WALKER, 2014; WALKER, 2010).

Considerando que o número de células de Sertoli definido na fase imatura/proliferativa é fundamental para a espermatogênese, entender os mecanismos de regulação da fase proliferativa, bem como entender a resposta não clássica destes hormônios e a interação entre ambas as vias, faz-se necessário para compreender todos os eventos que ocorrem neste período. Visto que as células de Sertoli possuem importância na secreção de suprimentos para as células germinativas, entender os processos de secreção e o envolvimento dos principais canais também se faz necessário.

1.3. Canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem

Os canais dependentes de voltagem são poros formados por proteínas transmembrana que mudam de conformação quando ocorre uma oscilação no potencial de membrana da célula. Os neurônios e células musculares são conhecidos como células excitáveis, porém muitos outros tipos celulares mostram pequenas oscilações no potencial de repouso, como ocorre nas células de Sertoli. Nestas células as concentrações de cálcio intracelular (Ca^{2+})_i são menores em relação ao meio extracelular e a troca do íon ocorre a favor do gradiente eletroquímico. Quando ocorre a despolarização do potencial de membrana, ocorre a abertura dos canais de Ca^{2+} dependentes da voltagem (CCDV) e o íon se move para dentro da célula, promovendo diversas alterações como a secreção de vesículas, a transcrição de genes dependentes de cálcio, a liberação de neurotransmissores entre outros (DOLPHIN, 2016; GUZMAN et al., 2009; HU et al., 2012; MANGONI et al., 2003; PUTZIER et al., 2009; STRIESSNIG; ORTNER; PINGGERA, 2015).

Os CCDV possuem 4 subunidades denominadas $\alpha 1$, $\alpha 2\delta$, β e γ . A subunidade $\alpha 1$ consiste na proteína formadora do poro, esta subunidade é composta por 24 segmentos transmembranas, divididos em 4 domínios homólogos repetidos. Em cada segmentento transmembrana S4, os canais de cálcio dependentes de voltagem apresentam resíduos carregados de lisina e arginina que formam uma espécie de sensor de voltagem. Os CCDV podem ser classificados entre canais de baixa (LVA) e alta voltagem (HVA). Ainda, os canais HVA podem ser de diferentes tipos denominados L, N, P/Q e R. Os canais de cálcio tipo L, L por "*long lasting*", estão presentes em células musculares (HESS; LANSMAN; TSIEN, 1984) e em células endócrinas, como células pancreáticas, entre outras (YANG et al., 2014). Os canais de cálcio tipo N, N por "*non-L*" e *Neuronal*, são expressos predominantemente em neurônios centrais e periféricos (NOWYCKY; FOX; TSIEN, 1985). Os canais de cálcio tipo P/Q são canais de cálcio identificados primeiramente em células de Purkinje (tipo e células granulosas (tipo Q) do cerebelo (CHERKSEY; SUGIMORI; LLINÁS, 1991). E por fim, os canais de cálcio tipo R, possuem uma corrente residual resistente aos bloqueadores e toxinas dos demais canais (tipo L, N e P/Q) (RANDALL; TSIEN, 1995). Apesar da subunidade $\alpha 1$ ditar as principais funções e propriedades destes canais

suas funções e expressão podem ser modificadas pelas proteínas acessórias β e $\alpha 2\delta$ (revisado por DOLPHIN, 2016). As subunidades $\alpha 2\delta$ e β desempenham papel no dobramento do canal e seu posterior transporte para a superfície celular (CATTERALL et al., 2003; DOLPHIN, 2016). A subunidade γ é encontrada principalmente nas células musculares esqueléticas (JAY et al., 1990).

Vários hormônios importantes na fase proliferativa das células de Sertoli e também no processo da espermatogênese utilizam este canal para exercer seus efeitos biológicos. A abertura deste tipo de canal está relacionada com as respostas clássicas e não clássicas. Entre as respostas por mecanismos não clássicos sabe-se que a T, 1,25 diidroxivitaminas D₃, os hormônios tireoideanos e o retinol (BUZZARD; WREFORD; MORRISON, 2003; LIVERA, 2002; ROSSO et al., 2012; SILVA; LEITE; WASSERMANN, 2002; WASSERMANN, G. F., LOSS, E. S. AND WECHSLER, 1995; ZANATTA et al., 2013a, 2013b) aumentam o influxo de cálcio através da abertura dos CCDV. O aumento da $(Ca^{2+})_i$ está relacionado com a capacidade secretória destas células e a ativação de segundos mensageiros como a PKC (ROSSO et al., 2012).

1.4. Canais de K⁺

Os canais de potássio são canais iônicos presentes nas membranas celulares que são seletivos exclusivamente ao íon potássio, dentre vários subtipos destes canais, destacaremos os canais de potássio sensíveis a voltagem (K_v). Após alteração no potencial de repouso da célula, estes tipos de canais são ativados e, em seguida, inativados, produzindo uma resposta transitória, possibilitando a entrada do íon K⁺ para o interior da célula reestabelecendo seu potencial de repouso. Os K_v possuem papel importante na formação e manutenção de potenciais de membrana em repouso, excitabilidade celular, resposta celular elétrica, formação e duração de potenciais de ação, transmissão sináptica, divisão celular, diferenciação e controle da função celular (GONZÁLEZ et al., 2012; HAYABUCHI, 2017)

A família dos canais K_v possuem seis domínios transmembranas (S1-S6), que são codificados por 36 genes. Em vertebrados, a subunidade alfa da família K_v retificadora tardia é composta por 12 membros de acordo com a similaridade de sequência de aminoácidos, a subfamília $K_v1.x$ (Shaker), é a maior subfamília

estrutural, sendo codificado por oito genes diferentes. Os canais de K^+ dependentes da voltagem são caracterizados por conter um domínio sensível à voltagem (S1-S4), o domínio S4 contém aminoácidos de carga positiva que constituem os elementos sensíveis à voltagem. A classe de seis domínios transmembrana também inclui a família KCNQ (Kv7.x, Kv10.x, Kv11.x), e a subfamília (Kv12.2) (GONZÁLEZ et al., 2012). Para serem funcionais, estes canais necessitam estar organizados na forma de tetrâmeros, o poro de condução iônica é formado por 4 domínios organizados simetricamente, sendo a primeira sequencia dos seguimentos hidrofóbicos (DOYLE et al., 1998; HEGINBOTHAM; MACKINNON, 1992; MACKINNON, 1991).

Os canais K_v já foram descritos em vários tipos celulares e principalmente no sistema reprodutor masculino (DUNNE; PETERSEN, 1991). Em células de Sertoli, os canais de K^+ estão envolvidos na resposta de diversos hormônios importantes na fase proliferativa e na manutenção da espermatogênese, como na resposta ao FSH, T, 1,25 diidroxivitamina D_3 e hormônios tireoideanos (LOSS et al., 2004; MENEGAZ et al., 2006, 2010; ZAMONER; PESSOA-PUREUR; SILVA, 2011). A resposta fisiológica ideal que determina o processo de maturação das células de Sertoli e o potencial para garantir suprimentos para uma espermatogênese de qualidade não ocorre através da resposta a um único estímulo hormonal mas sim através da interação de diversos estímulos que alteram diversos canais. Entender estas interações se faz necessário para compreender o organismo como um todo e então conseguir mensurar a importância de cada hormônio e medidas terapêuticas, quando necessário.

Como descrito anteriormente, o retinol e a T exercem efeitos regulatórios na maturação e manutenção da espermatogênese, agindo sobre as células de Sertoli. Sendo assim, este trabalho teve como foco analisar os mecanismos envolvidos nestas respostas, avaliando o envolvimento dos canais de Ca^{2+} e de K^+ nestas respostas, bem como avaliando a ação dos hormônios quando agem de forma simultânea.

OBJETIVOS

1.5. OBJETIVOS GERAIS

Estudar o envolvimento dos canais de cálcio e de potássio dependentes da voltagem nas respostas rápidas do retinol e testosterona em testículos de ratos imaturos.

1.6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar o efeito do retinol e da testosterona em diferentes doses e a efeito destes dois hormônios no influxo de cálcio em testículos de ratos imaturos.
- Estudar o envolvimento dos canais de potássio dependentes de voltagem nas ações da T e do retinol, através da utilização do bloqueador cloreto de tetraetilamônio (TEA), no influxo de cálcio em testículos de ratos imaturos.
- Estudar o envolvimento dos canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L, através da utilização do antagonista nifedipina, no influxo de cálcio estimulado pela T e pelo retinol em testículos de ratos imaturos.
- Estudar a ação do retinol e da T nas a corrente de K^+ dependente de voltagem, utilizando a técnica de eletrofisiologia *patch clamp* em células de Sertoli imaturas.

MATERIAIS E MÉTODOS

1.7. ANIMAIS

Ratos Wistar machos de 10 dias de idade foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas, junto com a mãe, sob um ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas das 6 às 18 horas), em sala climatizada com temperatura controlada. Todos os animais foram monitorados e mantidos em concordância com as recomendações do Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA), sendo todos os procedimentos aprovados pelo CEUA/UFSC segundo o protocolo PP00862.

1.8. MATERIAIS

1.8.1 Soluções utilizadas

1.8.1.1 Cultura primária de células de Sertoli

Para realizar a cultura de células de Sertoli foi utilizado o meio comercial Ham's F12/DMEM (1:1) suplementado com soro sintético 2% (Serum Replacement 3, da Sigma-Aldrich), bicarbonato de sódio 2,2 g/L e antibióticos (penicilina 50.000 UI/L, estreptomicina 50 mg/L, kanamicina 50 mg/L) e fungicida (anfotericina B 0,25 mg/L) em atmosfera úmida, contendo 5% de CO₂ e 95% de O₂, a 34 °C.

1.8.1.2 Influxo de cálcio

Para ensaios de influxo de cálcio foi realizada pré-incubação do tecido com solução tampão Krebs Ringer-bicarbonato (KRb) e incubação com solução de KRb contendo 0.1 µCi/mL de ⁴⁵Ca²⁺. O KRb foi preparado a partir de solução estoque, conforme a Tabela 1. Para o preparo da solução de uso, foram misturadas partes iguais de cada solução estoque, exceto a glicose que era pesada e diluída em água ultra pura até completar o volume desejado, no momento da preparação da solução tampão. Após a mistura de todos os sais, a solução era colocada em contato com o carbogênio por aproximadamente 15 minutos até ter o pH ajustado em 7,4. A solução era mantida sob refrigeração até o momento do uso.

Tabela 1: Composição e concentração dos reagentes da solução tampão Krebs Ringer-bicarbonato (KRb).

Reagente	Concentração	
	Solução estoque	Solução Final
NaCl	3,680 M	122 mM
KH ₂ PO ₄	0,030 M	3 mM
KCl	0,120 M	1,2 mM
MgSO ₄	0,020 M	1,3 mM
NaHCO ₃	0,650 M	0,4 mM
CaCl ₂	0,065 M	25 mM
Glicose	-----	5 mM

A testosterona e o TEA eram pesados em balanças analíticas e diluídos no dia do experimento na concentração desejada. A T, primeiramente era diluída em solução estoque, a diluição era realizada em álcool etílico absoluto e após era diluída novamente, na solução de uso, em tampão KRb. A solução estoque de testosterona era utilizada por até três dias após diluição. O antagonista TEA, era diluído diretamente em solução de KRb, na concentração de uso 20 mM. Era utilizado uma diluição nova a cada experimento. O retinol e a nifedipina foram pesados e armazenados em solução estoque, ambos foram diluídos em álcool etílico absoluto. No dia do experimento, ambos eram diluídos em KRb na concentração desejada e mantidos sob abrigo da luz.

Ao término do experimento, foi adicionado solução de cloreto de lantânio (LaCl₃) (NaCl 127,5 mM, LaCl₃ 10 mM, MgSO₄, 1,2 mM, Hepes 10 mM, KCl 4,6 mM e Glicose 11 mM) para cessar o fluxo de cálcio. A solução também foi armazenada em solução estoque e diluída em partes iguais no dia do experimento. Após realizado a diluição e ajuste do pH em 7,38, a solução era mantida sob refrigeração. Após o tratamento, os tecidos foram homogeneizado em NaOH 0,5 M.

1.8.1.3 Eletrofisiologia *Patch Clamp*

Para os ensaios de eletrofisiologia *Patch Clamp*, as células foram perfundidas com solução tampão, conforme descrito na Tabela 2, mimetizando o meio extracelular. Os hormônios retinol e T foram diluídos em solução estoque contendo álcool etílico absoluto e após diluídos em solução de uso utilizando o mesmo tampão. O TEA foi pesado e diluído diretamente nesta mesma solução. Os hormônios e o bloqueador foram perfundidos pela célula no momento do tratamento. As pipetas foram preenchidas com solução tampão, conforme Tabela 2, mimetizando o meio intracelular.

Tabela 2: Composição e concentração dos reagentes utilizados na técnica de eletrofisiologia *Patch Clamp*.

	Concentração	
	Solução extracelular	Solução intracelular
NaCl	135 mM	-----
KCl	5 mM	120 mM
MgCl ₂	1 mM	1 mM
CaCl ₂	1 mM	1 mM
Hepes	10 mM	10 mM
Glicose	3 mM	-----
EGTA	-----	10 mM
ATP	-----	3 mM

1.8.2 Substâncias utilizadas

Retinol: Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Axeroftol, Vitamina A alcool, Vitamina A, Vitamina A1, all-trans-3,7-Dimetil-9-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexeno-1-il)-

2,4,6,8-nonatetraen-1-ol, PM 286,45.

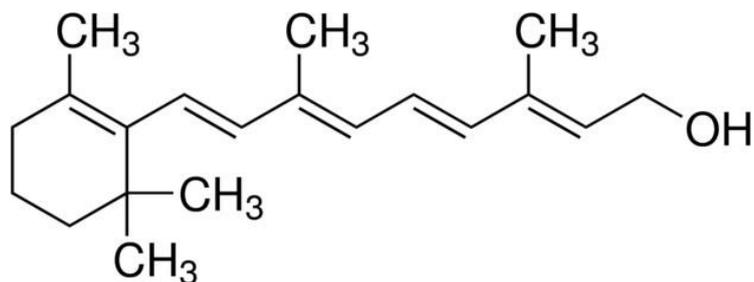


Figura 4: Estrutura molecular do retinol.

Testosterona: Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). 17 α -Hidroxi-3-oxo-4- androstena, 17 α -Hidroxi-4-androsten-3-ona, 4-Androstena-17 α -ol-3-ona, trans- Testosterona, PM 288,42.

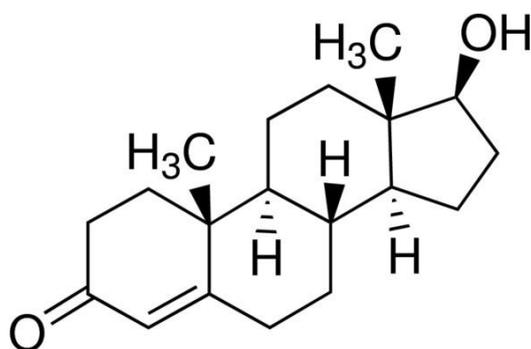


Figura 5: Estrutura molecular da testosterona.

Nifedipina: Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). 1,4-Diidro-2,6-dimetil-4-(2-nitrofenil)-3,5- ácido piridinedicarboxilica ester dimetil. PM 346,33. Bloqueador de CCDV-L.

Cloreto de tetraetilamonio (TEA): Alfa Aesar (Tewksbury, MA, USA). Cloreto TEA, TEAC, PM 165,71. Bloqueador de canais K_v.

Isótopo radioativo de cálcio (⁴⁵Ca²⁺): PerkinElmer NEN® (Waltham, MA, USA). A meia vida do ⁴⁵Ca²⁺ é de 163 dias e o decaimento foi calculado a partir de tabela fornecida pelo fabricante, em função da data de fabricação. A atividade específica é de 1 mCi/mg em cada amostra foi adicionado 0,1 μ Ci/mL.

Líquido de cintilação: Optiphase Hisafe 3- PerkinElmer Inc., USA. Utilizado para a

contagem da radioatividade das amostras.

1.9. MÉTODOS

1.9.1 Influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em testículos

Para o ensaio de influxo de cálcio, os ratos foram eutanasiados por decapitação e os testículos foram dissecados da cavidade abdominal. Após remoção da túnica albugínea os testículos foram divididos em duas partes iguais. Para estudar os efeitos dos hormônios no influxo de Ca^{2+} , bem como decidir a melhor dose, o experimento foi realizado conforme desenho experimental da Figura 8 de acordo com Zamoner et al, 2007, os testículos foram pré-incubadas com solução tampão KRb por 15 min em atmosfera carbogênica ($\text{O}_2:\text{CO}_2$, 95:5 v/v), a 34°C . Após, os testículos foram incubados com tampão KRb contendo $0,1 \mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ por 60 minutos. O tratamento foi realizado acrescentando os hormônios retinol e testosterona por 2 minutos. Posteriormente as células foram lavadas com tampão LaCl_3 para cessar o fluxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (BATRA, SJÖGREN, 1983) e posteriormente homogeneizadas em solução de NaOH 0,5 M.

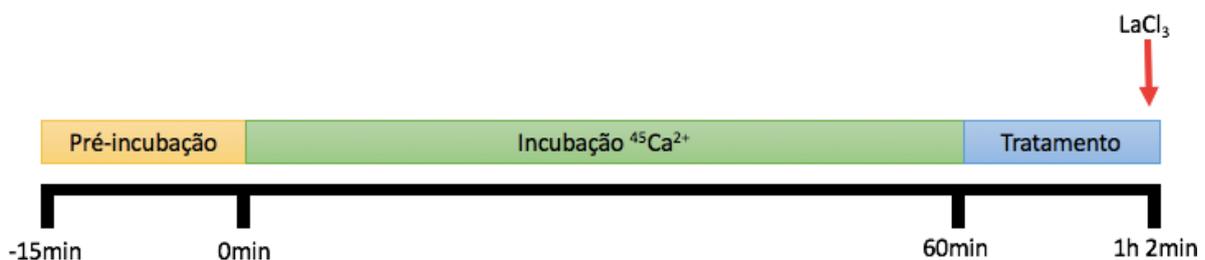


Figura 6: Desenho experimental para a técnica de influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Estudo do efeito dos hormônio retinol, T e R+T no influxo de cálcio em testículos de ratos imaturos.

Para estudar o envolvimento dos canais de Ca^{2+} e K^+ , o experimento foi realizado de acordo com a Figura 9, os testículos foram pré-incubados com solução KRb por 15 min em atmosfera carbogênica ($\text{O}_2:\text{CO}_2$, 95:5 v/v), a 34°C . Após, os testículos foram incubados com tampão KRb contendo $0,1 \mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ por 60 minutos. Os bloqueadores dos canais de interesse foram adicionados 15 minutos antes de realizar o tratamento com os hormônios. O tratamento foi realizado 15 minutos após aplicação dos bloqueadores, após acrescentado os hormônios retinol e testosterona, foi cronometrado 2 minutos. Após o término do tratamento as células

foram lavadas com tampão LaCl_3 e homogeneizadas em solução de NaOH 0,5 M.

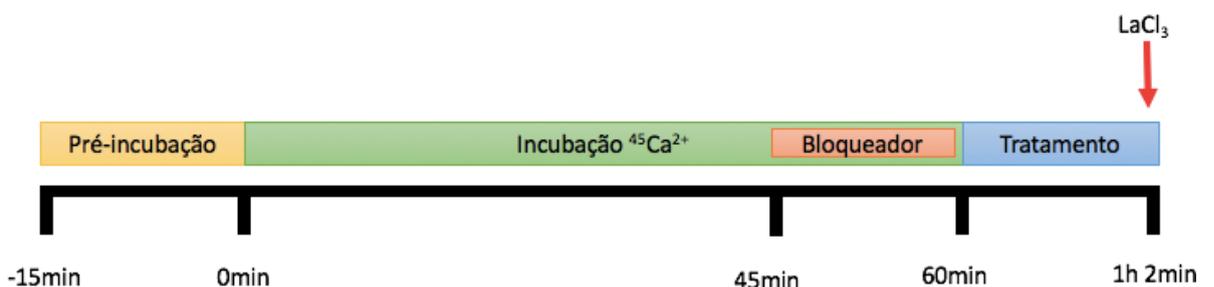


Figura 7: Desenho experimental para a técnica de influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Estudo do envolvimento dos canais da Ca^{2+} e Kv na ação dos hormônios retinol, T e R+T no influxo de cálcio em testículos de ratos imaturos.

A determinação da radioatividade foi realizada em espectrômetro de cintilação líquida, foram acrescidos alíquotas de 50 μL das amostras em líquido de cintilação. Foi realizado dosagem de proteínas pelo método de Lowry et al. 1951 através de uma alíquota de 10 μL das amostras. Os resultados foram expressos em pmol de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ / μg de proteína ou em % do controle.

1.9.2 Isolamento de células de Sertoli

As células de Sertoli foram isoladas de testículos de ratos de 10 dias pós natal através de uma digestão enzimática sequencial de acordo com o método de Dorrington; Roller; Fritz, (1975). Para os estudos de eletrofisiologia, as células de Sertoli obtidas no final do processo foram semeadas em lamínulas de vidro na densidade de 650.000 células/ cm^2 e cultivadas em meio Ham's F12/DMEM (1:1) suplementado com 2% de soro sintético (Serum Replacement 3, da Sigma-Aldrich), bicarbonato de sódio 2,2 g/L e antibióticos (penicilina 50.000 UI/L, estreptomicina 50 mg/L, kanamicina 50 mg/L) e fungicida (anfotericina B 0,25 mg/L) em atmosfera úmida, contendo 5% de CO_2 e 95% de O_2 , a 34°C . As células germinativas remanescentes, foram desconsideradas do experimento através da análise visual utilizando o microscópio invertido, conforme demonstrado na figura 8. Os experimentos de eletrofisiologia foram realizados entre o segundo e quarto dia de cultura.



Figura 8: Cultura primária de células de Sertoli analisada em microscópio invertido com aumento de 20X. Em **(a)** se observam células de Sertoli, que apresentam prolongamentos e tendem a se conectar com as células adjacentes. Em **(b)** células germinativas, que apresentam formato arredondado. Imagem do autor.

1.9.3 Eletrofisiologia em Patch Clamp e Whole Cell

Para realizar os ensaios de eletrofisiologia *Patch Clamp Whole Cell* as lamínulas de vidro contendo as células foram removidas da placa de cultura e colocadas em câmara específica para perfusão. A câmara foi acondicionada em microscópio invertido Olympus IX81 (Olympus Corporation, Tokyo, Japão). As células foram mantidas viáveis com a solução tampão que mimetiza o meio extracelular. Os capilares de borosilicato de vidro da Sutter Instrument (Sutter Instrument Company, Novato, USA) tiveram as pontas moldadas para formar o selo na membrana das células, através do estirador de pipetas Flaming/Brown™ Micropipette Puller System

P-1000 (Sutter Instrument Company, Novato, USA) ficando com uma resistência média de 5 M Ω . Os capilares de vidro foram preenchidos com solução tampão que mimetiza o meio intracelular. A ponta moldada do capilar foi encostada na membrana da célula, conforme Figura 9, com a ajuda do micromanipulador Narishige MMO-203 (Narishige Group, Tokyo, Japão) que após teve a membrana rompida, formando o selo *Whole Cell*, conforme demonstrado na figura 10, através de aplicação de pressão negativa.



Figura 9: Ponta do capilar de borosilicato vidro exercendo pressão negativa sobre a membrana da célula de Sertoli (A), formando o selo "*Whole cell*". Na imagem é possível diferenciar as células de Sertoli (B), que apresentam prolongamentos, das células germinativas (C), mais arredondadas. Imagem do autor.



Figura 10: Diagrama da configuração de registro de Patch Clamp e Whole Cell. Fonte: “Plant Physiology and Development, Sixth Edition”.

Os registros elétricos foram obtidos através do amplificador MultiClamp 700B (Axon Instruments Inc., Jakarta Selatan, Indonésia) e digitalizador Digidata 1440A (Molecular Devices Inc., California, USA). Após o sinal ser amplificado e digitalizado, os resultados foram expressos pelo software pCLAMP 10 (Molecular Devices Inc., California, USA).

Após ser rompida a membrana da célula foi aguardado período de estabilização do potencial de repouso conforme a Figura 11. Após o potencial estar estabilizado, as células foram perfundidas com solução tampão, para possibilitar a medição de ruído do sistema de perfusão. As células foram perfundidas com solução tampão por aproximadamente 10 minutos, imediatamente após foram perfundidas com solução contendo o hormônio, também por aproximadamente 10 minutos. Na sequência, foram perfundidas novamente com a solução tampão para retornar aos valores basais. Por fim, as células foram perfundidas com solução contendo o bloqueador, para confirmar a natureza do canal registrado.

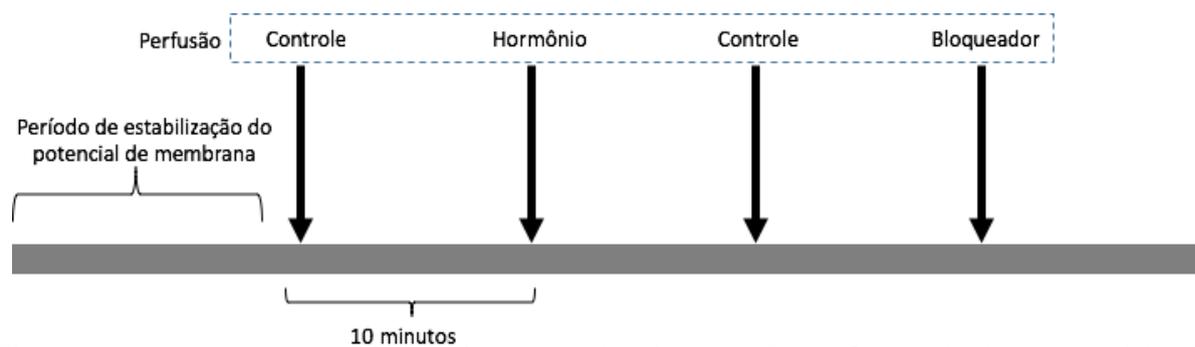


Figura 11: Desenho experimental da técnica de eletrofisiologia Patch Clamp. Avaliação do efeito do retinol e da testosterona nos canais de potássio dependentes da voltagem.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados provenientes do influxo de cálcio foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) por μg de proteína ou em % do controle de determinações realizadas em 3 a 4 experimentos independentes. As comparações estatísticas foram realizadas através do teste ANOVA de medidas repetidas seguidos de pós-teste de Bonferroni. Foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 6. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para um p igual ou menor que 0,05.

Os resultados provenientes dos experimentos em eletrofisiologia *Patch Clamp Whole Cell* foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) por intensidade (I) ou voltagem (V). Foram realizados 3 a 4 experimentos independentes. As comparações estatísticas foram realizadas através do teste ANOVA para medidas repetidas seguidos de pós-teste de Bonferroni. Foram utilizados os softwares GraphPad Prism versão 6, Clampfit 10 e OriginPro 2017. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para um p igual ou menor que 0,05.

RESULTADOS

1.10. Influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em testículos

Para estudar os efeitos dos hormônios retinol e testosterona no influxo de cálcio em testículos de ratos de 10 dias e, definir a dose a ser trabalhada, inicialmente foi realizada curva de dose-resposta. Apoiado em estudos anteriores foi utilizado o tempo de incubação de dois minutos (LOSS, 1997). Como pode ser observado na Figura 12 o retinol estimulou significativamente o influxo de cálcio nas três doses testadas. Na dose de 10^{-6} M o retinol estimulou o influxo de cálcio de modo percentualmente maior do que as doses menores, mostrando um aumento crescente no influxo de cálcio, parecendo atingir um platô na concentração de 10^{-6} M.

Por outro lado a testosterona estimulou o influxo de cálcio somente na concentração 10^{-6} M.

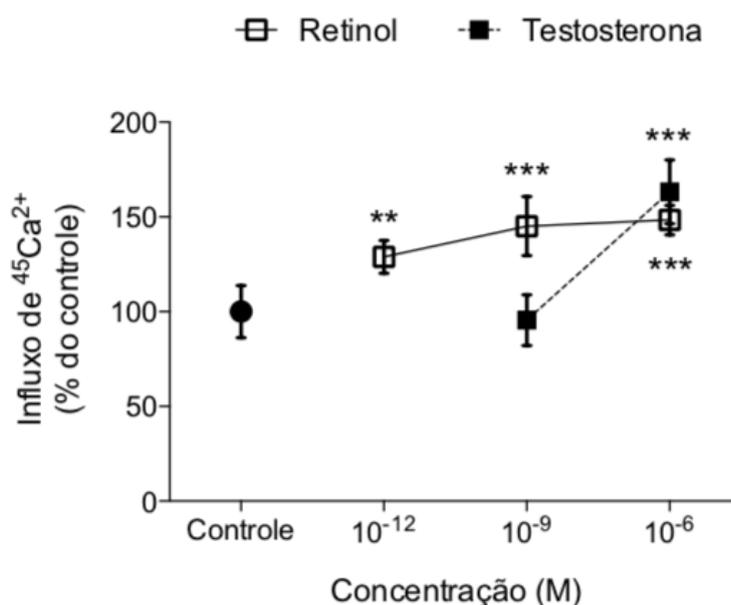


Figura 12: Efeitos do retinol e testosterona no influxo de cálcio em testículos de ratos de 10 dias. Os valores são médias \pm E.P.M de dois experimentos independentes com 5 ratos em cada grupo por experimento. ** $p \leq 0.01$ e *** $p \leq 0.001$, comparado com o grupo controle.

A partir deste ensaio foi definida a concentração dos hormônios a ser trabalhado utilizada no restante dos ensaios, incluindo os ensaios de eletrofisiologia *Patch Clamp Whole Cell*. Ficou definida a dose de 10^{-6} M e o tempo de incubação de dois minutos para ambos os hormônios.

Apoiado nos resultados anteriores, foi verificado que o retinol e T estimularam o influxo de cálcio, foi analisada a interação quando aplicados juntos durante o tratamento. Foi observado um aumento significativo no percentual do estímulo de influxo de cálcio, como pode ser conferido na Figura 13. Quando aplicados os dois hormônios juntos, o aumento no influxo de cálcio foi significativamente maior do que quando comparado com aumento no influxo de cálcio estimulado pelos hormônios separadamente, mostrando que o retinol e T interagem no testículo, podendo ser um mecanismo importante no testículo iniciado na membrana plasmática.

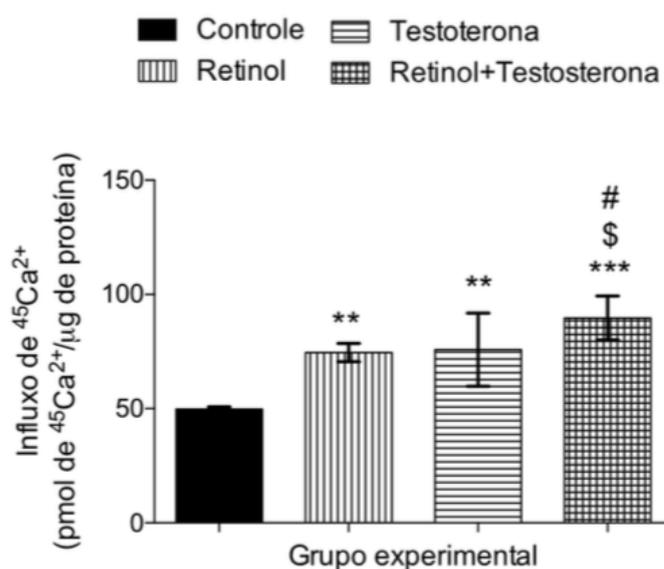


Figura 13: Efeito simultâneo do retinol + testosterona no influxo de cálcio em testículos de ratos de 10 dias. Foram realizados 3 experimentos independentes. Os valores são apresentados em pmol $^{45}\text{Ca}^{2+}/\mu\text{g}$ de proteína \pm E.P.M. Foram utilizados 5 ratos por grupo. ** $p \leq 0.01$ e *** $p \leq 0.001$, comparado com o grupo controle; # $p \leq 0.05$ comparado com o grupo retinol e \$ $p \leq 0.05$ comparado com o grupo testosterona.

Apoiado nestes resultados, foram realizados ensaios utilizando bloqueadores para verificar quais os canais envolvidos no aumento do influxo de cálcio em resposta a aplicação do retinol e da T e também estudar o envolvimento na interação entre as vias de sinalização destes hormônios.

1.10.1 Estudo do envolvimento dos canais de cálcio dependentes da voltagem do tipo L na ação estimulatória do retinol e testosterona no influxo de cálcio

Para estudar quais os canais envolvidos no aumento do influxo do cálcio nos testículos de ratos quando tratados com retinol e testosterona foi realizado ensaio utilizando o bloqueador nifedipina, que age bloqueando os CCDV-L, pois esta isoforma dos canais de cálcio é predominante no tecido testicular. A nifedipina foi utilizada em uma concentração de 100 μM (GRISSEMER et al., 1994).

Como pode ser observado na Figura 14, a nifedipina foi capaz de bloquear o influxo de cálcio no grupo tratado com retinol, demonstrando o envolvimento dos CCDV-L na ação estimulatória deste hormônio.

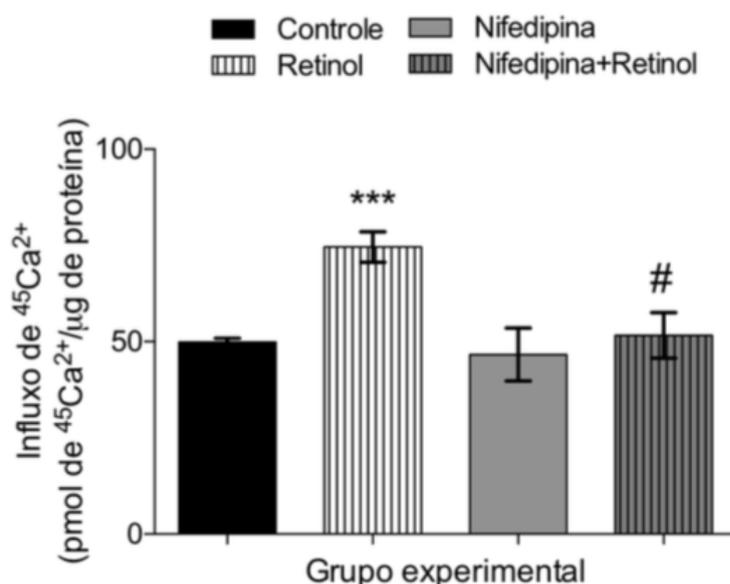


Figura 14: Envolvimento dos canais de cálcio dependentes da voltagem do tipo L (CCDV-L) no efeito do retinol no influxo de cálcio em testículos de ratos de 10 dias. O bloqueador do CCDV-L nifedipina (100 μM) foi adicionado 15 minutos antes do tratamento. O retinol (10^{-6} M) foi incubado por 2 minutos. Foram realizados 3 experimentos independentes. Os valores são apresentados em pmol $^{45}\text{Ca}^{2+}/\mu\text{g}$ de proteína \pm E.P.M, foram utilizados 5 ratos por grupo. *** $p \leq 0.001$ comparado com o grupo controle e # $p \leq 0.001$ comparado com o grupo retinol.

Quando analisado o efeito da nifedipina no influxo de cálcio causado pela T, não foi observado o bloqueio total do estímulo deste hormônio. Porém quando comparado a diferença estatística entre os grupos controle e T e os grupos controle e nifedipina+T observamos que esta última análise teve uma diferença estatística menor em relação a primeira, como pode ser observado na Figura 15. Baseado nisso,

podemos sugerir que a nifedipina promove um bloqueio parcial na ação estimulatória da T.

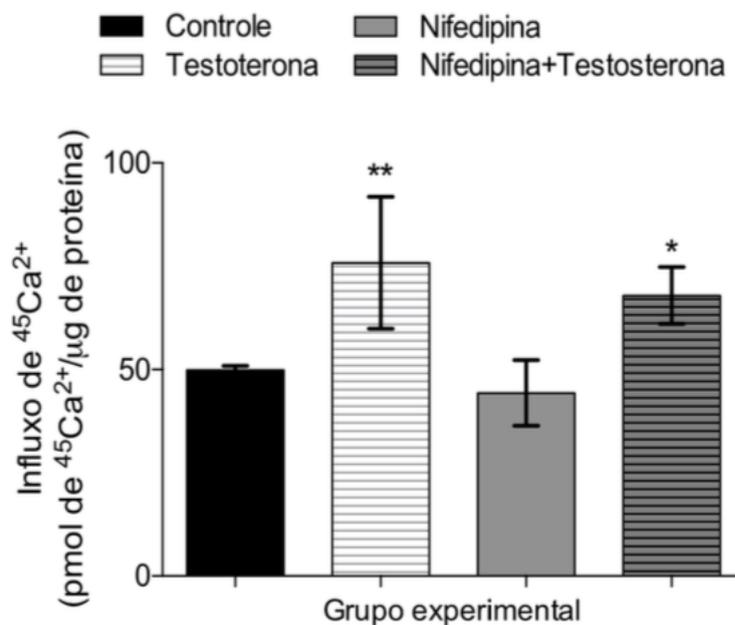


Figura 15: Envolvimento dos canais de cálcio dependentes da voltagem do tipo L (CCDV-L) no efeito estimulatório da testosterona no influxo de cálcio em testículos de ratos de 10 dias. O antagonista do CCDV-L nifedipina foi adicionado 15 minutos antes do tratamento. A testosterona (10^{-6}M) foi incubada por 2 minutos. Foram utilizados 3 experimentos independentes. Os valores são apresentados em pmol $^{45}\text{Ca}^{2+}/\mu\text{g}$ de proteína \pm E.P.M, foram utilizados 5 ratos por grupo. * $p \leq 0.05$ e ** $p \leq 0.01$ comparado com o grupo controle.

Apoiado nestes resultados se fez necessário estudar o papel de outros canais importantes na ação estimulatória do retinol e da T neste tipo celular.

1.10.2 Estudo do envolvimento dos canais de potássio dependentes da voltagem na ação do retinol e testosterona no influxo de cálcio

Para investigar o envolvimento dos canais de potássio dependentes de voltagem (K_v) na ação estimulatória do retinol e da testosterona no influxo de cálcio foi utilizado o bloqueador TEA em uma concentração de 20 mM (LI et al., 1997). O bloqueador foi adicionado ao tecido 15 minutos antes do tratamento, conforme descrito no desenho experimental.

O retinol possui ação estimulatória no influxo de cálcio em testículos de ratos imaturos, como pode ser observado na Figura 16, porém quando utilizado o bloqueador TEA antecedendo o tratamento, foi observado que o grupo retinol+TEA não demonstrou diferença significativa no influxo de cálcio entre o grupo controle e também entre o grupo tratado apenas com o retinol.

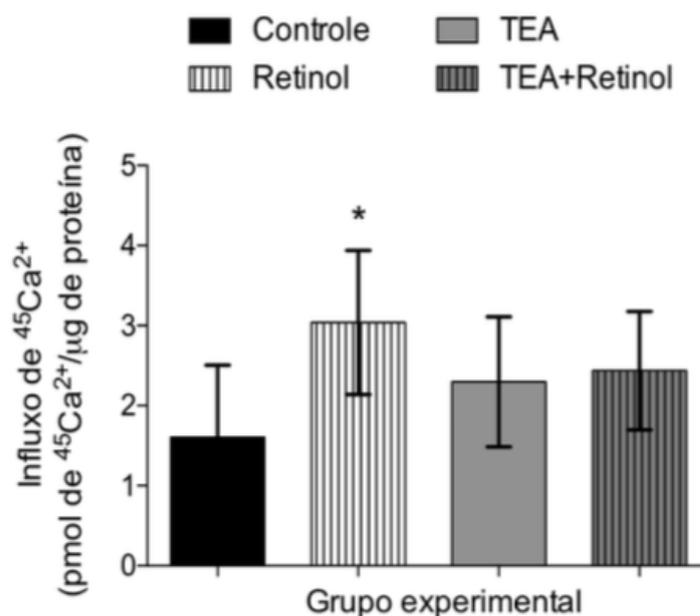


Figura 16: Envolvimento dos canais de potássio dependentes de voltagem no efeito do retinol no influxo de cálcio em testículos de ratos de 10 dias. O inibidor TEA (20 mM) foi adicionado 15 minutos antes do tratamento. A testosterona (10^{-6} M) foi incubada por 2 minutos. Foram realizados 3 experimentos independentes. Os valores são apresentados em pmol de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ /μg de proteína \pm E.P.M, foram utilizados 5 ratos por grupo. * $p \leq 0.05$ comparado com o grupo controle.

Já no grupo tratado com T, durante dois minutos, foi observado que este hormônio estimula o influxo de cálcio no tecido, conforme demonstrado na Figura 17. Quando o tratamento com T foi realizado após aplicação do bloqueador dos canais K_v , TEA, a T teve sua ação completamente interrompida, sendo demonstrado pela diferença estatística no influxo de cálcio estar diminuída quando comparado com o grupo tratado apenas com T. Não houve diferença estatística entre o grupo controle e T+TEA, demonstrando o envolvimento destes canais no mecanismo de ação da T.

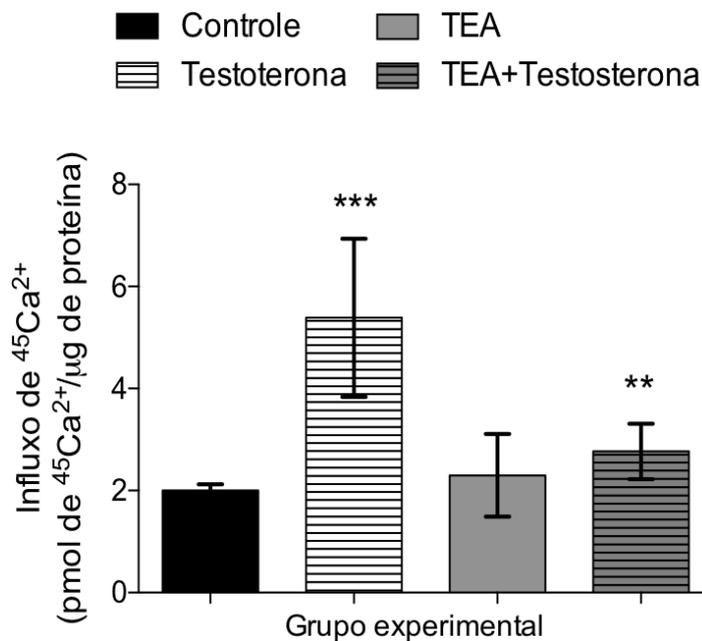


Figura 17: Envolvimento dos canais de potássio dependentes de voltagem no efeito da testosterona no influxo de cálcio em testículos de ratos de 10 dias. O inibidor TEA (20 mM) foi adicionado 15 minutos antes do tratamento. A testosterona (10^{-6} M) foi incubada por 2 minutos. Foram realizados 3 experimentos independentes. Os valores são apresentados em pmol $^{45}\text{Ca}^{2+}/\mu\text{g}$ de proteína \pm E.P.M, foram utilizados 5 ratos por grupo. *** $p \leq 0.001$ comparado com o grupo controle e ** $p \leq 0.01$ comparado com o grupo testosterona.

1.11. Eletrofisiologia *Patch Clamp Whole Cell* em canais de K_{ev}

Foi investigada a influência dos hormônios retinol e testosterona em ensaios através de medidas eletrofisiológicas utilizando a técnica de *Patch Clamp Whole Cell*. Os ensaios foram realizados em cultura primária de células de Sertoli e os registros foram realizados através da análise das correntes do íon potássio. Os canais de potássio possuem papel importante no processo de repolarização celular (GONZÁLEZ et al., 2012; HAYABUCHI, 2017).

1.11.1 Retinol possui efeito estimulatório nos canais de K_v

Após a célula ter a membrana rompida e as correntes de íons estabilizadas (Figura 18-A), o retinol foi perfundido na célula. Foi observado que o retinol estimulou a abertura dos canais de K_v aumentando correntes do íon K^+ , conforme pode ser observado na Figura 18-B. Este estímulo foi observado em menos de 5 minutos,

mostrando o efeito estimulatório que este hormônio possui neste tipo de canal. Ao final da observação do efeito do retinol, as células foram perfundidas com solução tampão até retornar ao potencial de repouso (Figura 18-C). Após retornar ao potencial de repouso, novamente as células foram perfundidas com a solução tampão contendo o bloqueador TEA sendo observado em poucos segundos a inibição das correntes, conforme a Figura 18-D.

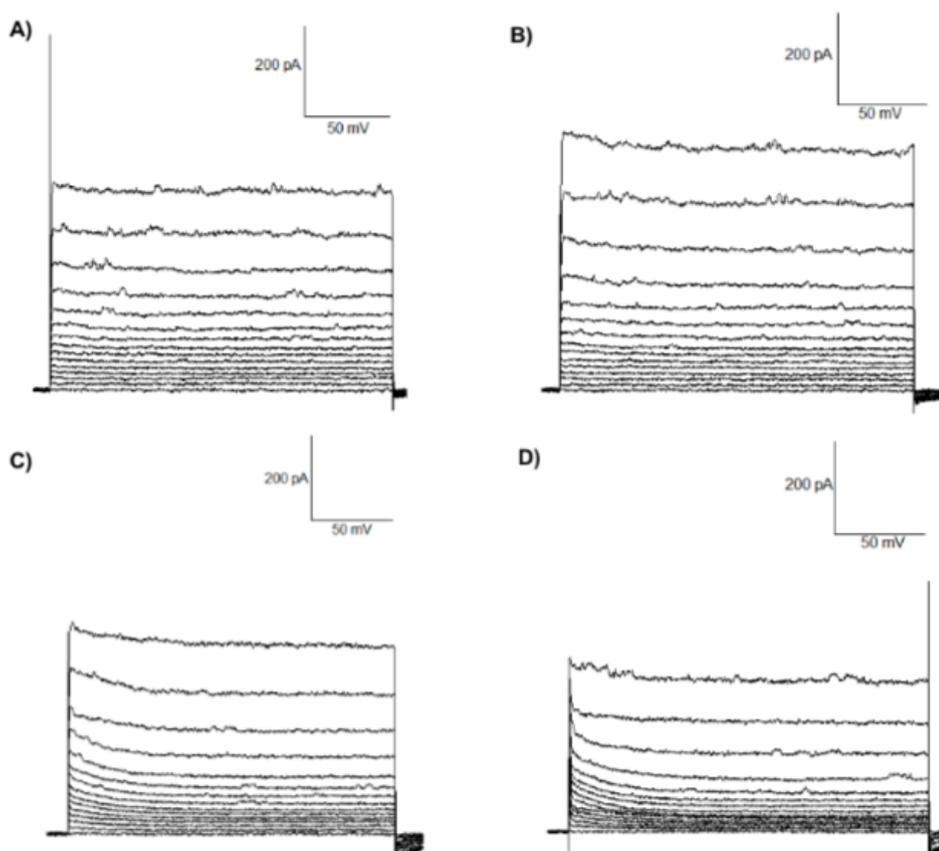


Figura 18: Representação do efeito do retinol no canal de K_v . **A)** observa-se o canal em repouso, sendo utilizado para a definição de controle; **B)** observa-se o canal sob o estímulo do retinol, causando abertura nas correntes do íon K^+ ; **C)** a célula foi perfundida com solução tampão para retornar ao estado de repouso; **D)** a célula após ser perfundida com TEA (20 mM), comprovando tratar-se de um canal de K_v . Os resultados foram expressos em corrente (I) (pA) por voltagem (mV). Os registros foram realizados com corrente de -60 a 80 mV.

Os resultados da estimulação do retinol em várias células foram analisados através do aumento das correntes (I) (pA) sobre a voltagem (mV), levando em consideração o E.P.M. Como pode ser observado na Figura 19, o aumento das

correntes começou em 60mV e se estendeu até 80mV, demonstrando o efeito nesta região do canal. Pode ser observado a diferença da abertura das correntes do canal nas células no momento que as células foram perfundidas com diferentes tratamentos.

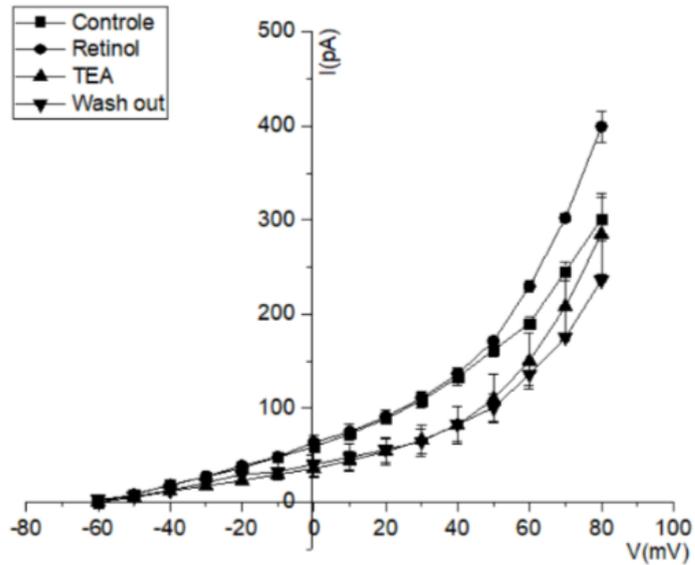


Figura 19: Envolvimento dos canais K_v no estímulo do retinol nas correntes elétricas nas células de Sertoli. Foram realizados de 3 a 5 experimentos independentes. Os resultados foram expressos em corrente (I) (pA) por voltagem (mV) \pm E.P.M.

Considerando apenas os registros obtidos em 80mV, a estimulação das correntes provocadas pelo retinol foi significativa em relação ao grupo controle, conforme observado na Figura 20. Também foi considerado estatisticamente diferente entre o tratamento com retinol e o bloqueador TEA, confirmando se tratar de um canal de K_v .

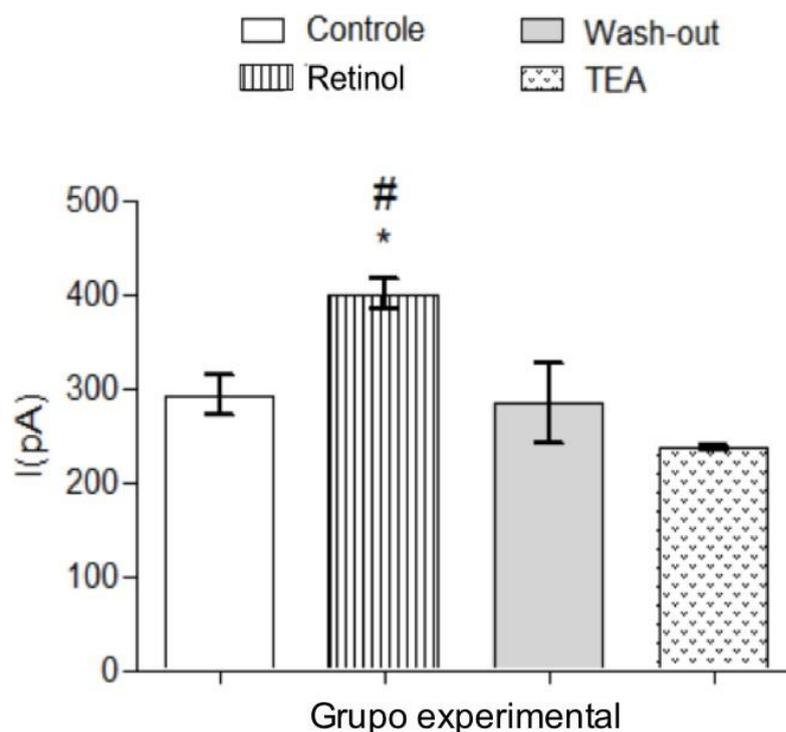


Figura 20: Efeito do retinol nas correntes do íon K^+ em 80mV. Houve diferença significativa entre o grupo retinol e o grupo TEA (20 mM), confirmando que as correntes analisadas eram do íon K^+ . Foram realizados de 3 a 5 experimentos independentes. Os resultados foram expressos em corrente (I) (pA) por voltagem (mV) \pm E.P.M. * $p \leq 0.05$ comparado com o grupo controle e # $p \leq 0.05$ comparado com o grupo TEA.

1.11.1. Testosterona possui efeito estimulatório nos canais de K_v

Também foi observado o efeito da T nas correntes de potássio em cultura primária de células de Sertoli. Após a célula ser empalada, o sistema de perfusão com a solução tampão foi ligado e foi aguardado estabilizar o potencial de repouso da célula. Após estabilizado, este registro foi utilizado como o controle do experimento, conforme pode ser observado na Figura 21-A. A célula, após estabilizada foi perfundida com solução contendo T (Figura 21-B), a T estimulou o aumento das correntes do íon K^+ em menos de 3 minutos. Passados 10 minutos após a perfusão com T, as células foram perfundidas novamente com solução tampão até retornar ao potencial de repouso, como pode ser observado na Figura 21-C. Após a célula retornar ao potencial de repouso, as células foram perfundidas com solução tampão

contendo o bloqueador TEA, sendo possível observar que as correntes de K^+ foram inibidas imediatamente após aplicação (Figura 21-D).

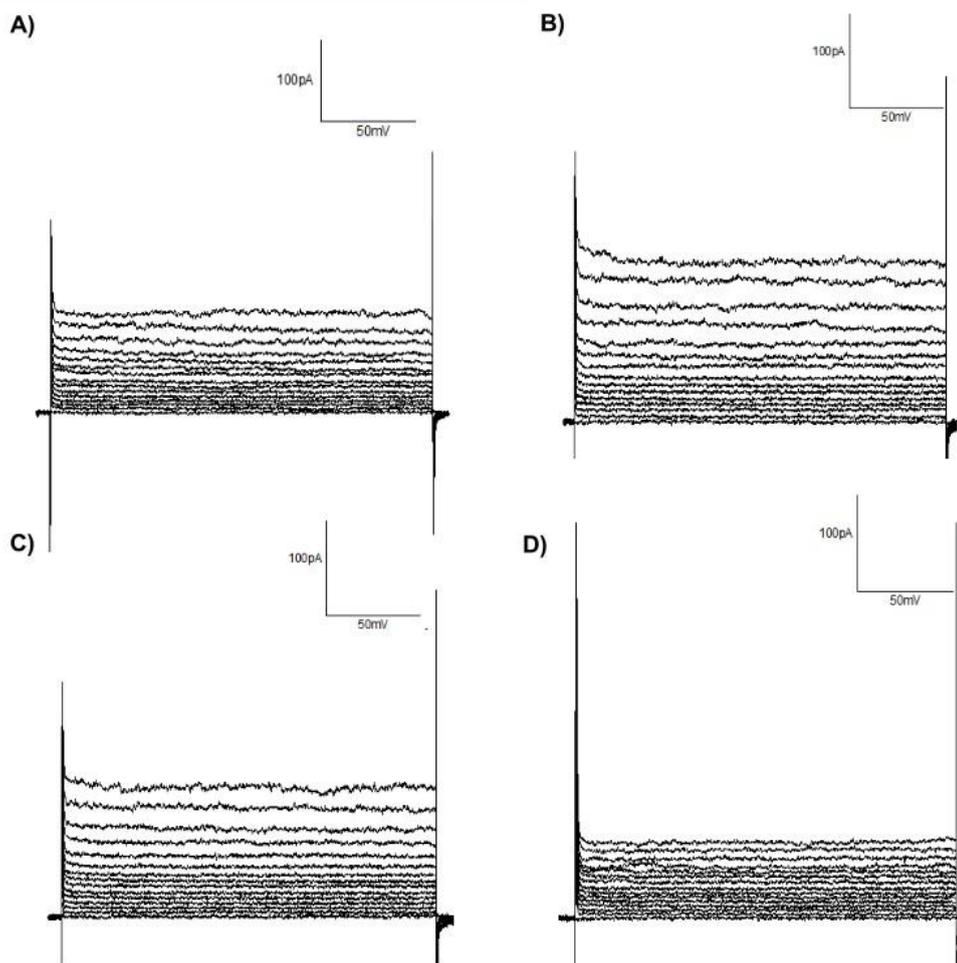


Figura 21: Representação do efeito da testosterona no canal de K_v em células de Sertoli. **A)** observa-se o canal em repouso, sendo utilizado para a definição de controle; **B)** observa-se o canal sob o estímulo da testosterona, causando abertura nas correntes do íon K^+ ; **C)** a célula foi perfundida com solução tampão para retornar potencial de repouso; **D)** a célula após ser perfundida com TEA (20 mM). Os resultados foram expressos em corrente (I) (pA) por voltagem (mV). Os registros foram realizados com corrente de -60 a 80 mV.

Analisando o resultado do aumento das correntes (pA) sobre a voltagem (mV) obtido em 3-5 células e considerando o E.P.M, foi observado que este aumento das correntes teve início em 10mV e se estendeu até 80mV, mostrando que o grupo tratado com T teve um estímulo maior na abertura das correntes do íon K^+ , conforme pode ser observado na Figura 22.

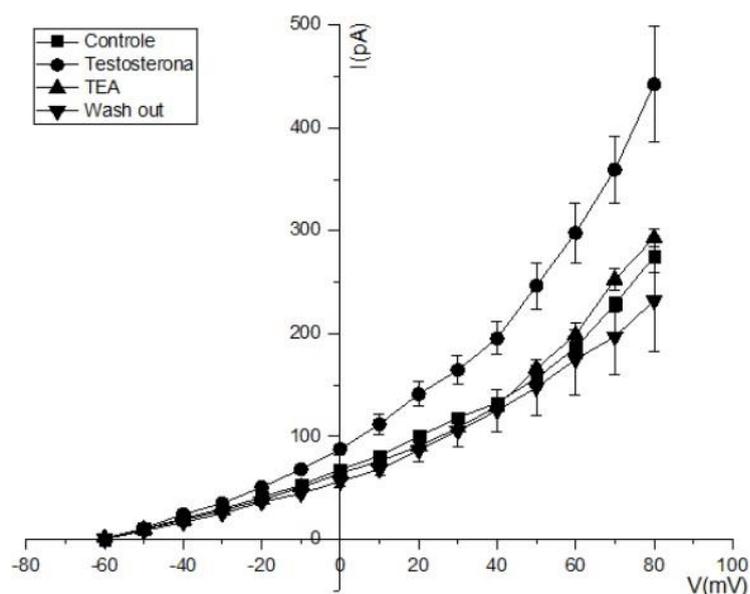


Figura 22: Envolvimento dos canais K_v no estímulo da testosterona nas correntes elétricas nas células de Sertoli. Foram realizados de 3 a 5 experimentos independentes. Os resultados foram expressos em corrente (I) (pA) por voltagem (mV) \pm E.P.M.

Considerando apenas os registros obtidos em 80mV, a estimulação das correntes provocadas pela T foi significativa em relação ao grupo controle, conforme observado na Figura 23. Também foi considerado estatístico a diferença entre os registros do controle e a T confirmando o estímulo observado nas Figuras 21 e 22.

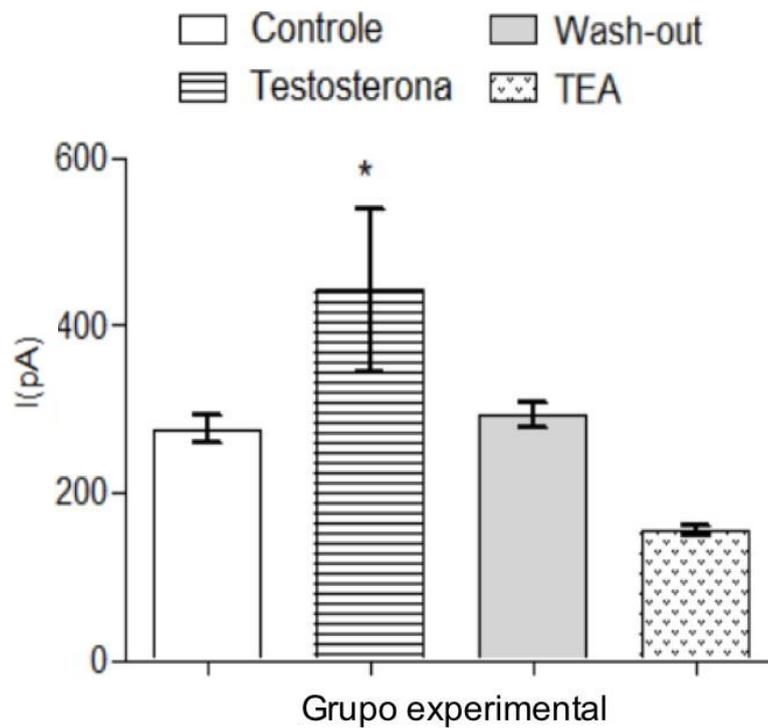


Figura 23: Efeito da T nas correntes do íon K^+ em 80mV. Houve diferença significativa entre o grupo testosterona e o grupo controle, confirmando que as correntes analisadas eram do íon K^+ . Foram realizados de 3 a 5 experimentos independentes. Os resultados foram expressos em corrente (I) (pA) por voltagem (mV) \pm E.P.M. * $p \leq 0.05$ comparado com o grupo controle.

DISCUSSÃO

Os retinóides desempenham papel fundamental em vários sistemas do organismo. O mais conhecido é no sistema visual, mas a importância no crescimento e diferenciação de vários tipos celulares também já está bem descrita. Nos últimos anos, muitos grupos de pesquisas têm se dedicado a estudar os efeitos dos retinóides no sistema reprodutor masculino. Sabe-se que excesso de vitamina A causa lesões testiculares e desordens espermatogênicas (LAMANO CARVALHO et al., 1978) e que a sua deficiência induz ao término precoce da espermatogênese (SKINNER, 1991; WOLBACH; HOWE, 1925), provocando a degeneração das células germinativas meióticas (MORALES; GRISWOLD, 1987; THOMPSON; HOWELL; PITT, 1964) e diminuindo a secreção basal de testosterona em ratos adultos (APPLING; CHYTIL, 1981) e em células de Leydig fetais (LIVERA et al., 2000). A deficiência moderada de vitamina A resulta no aumento da estereoidogênese testicular durante o período fetal e neonatal, mostrando o papel do retinol na função endócrina dos testículos em ratos (LIVERA et al., 2004). Estes achados demonstram que pequenas alterações nas concentrações de retinol interferem no processo de maturação da espermatogênese, mostrando sua importância fisiológica e sugerindo um fino mecanismo de regulação.

Sabe-se que os retinóides possuem papel importante em inúmeras funções das células de Sertoli. São nestas células que ocorre a conversão do retinol em sua forma ativa, o ácido retinóico (AR), pois estas células possuem a maquinaria necessária para esta conversão (CAVAZZINI; GALDIERI; OTTONELLO, 1996). Como o AR é incapaz de atravessar a BHT (CAVAZZINI; GALDIERI; OTTONELLO, 1996; KURLANDSKY et al., 1995), é necessário atravessar a BHT na forma de retinol para então ser convertido a AR. Os retinóides apresentam efeitos clássicos e não clássicos, os efeitos clássicos são mediados através da ligação com alta afinidade entre o AR e os receptores nucleares RAR e RXR (GHYSELINCK et al., 2006), esta resposta, também denominada como genômica, é mais lenta, podendo levar horas à dias e geralmente tem como objetivo final estimular a transcrição gênica e síntese proteica. Os efeitos não clássicos ocorrem através de respostas rápidas a nível de membrana plasmática, onde o retinol atua estimulando segundo mensageiros (AOTO et al., 2008; CARTER et al., 2010; LIAO; HO; LIOU, 2004; LIOU et al., 2005; POON;

CHEN, 2008; SARTI et al., 2012, 2013), podendo ou não estimular a transcrição gênica e síntese proteica. Entre as suas funções, sabe-se que os retinóides atuam modulando as vias de sinalização, reduzindo a expressão da PKC, receptor de andrógeno e a produção da AMPc em resposta ao FSH (GALDIERI; CAPORALE; ADAMO, 1986; GALDIERI; NISTICO, 1994), estimulando a expressão de fatores de transcrição (PAGE; HEITZMAN; CHERNIN, 1996) e aumentando o metabolismo das células de Sertoli (GAEMERS et al., 1998a; KLAMT et al., 2000). Os retinóides também atuam estimulando a secreção de transferrina, ABP, fator de crescimento semelhante à insulina – proteína carreadora 4 (IGFBP-4), inibina alfa e glicoproteínas, e inibindo a secreção do ativador de plasminogênio e dos estrogênios em resposta ao FSH (BARDI et al., 1999; GAEMERS et al., 1998a; GALDIERI; NISTICO, 1994; GUMA; BERNARD, 1994; ROSSELLI; SKINNER, 1992; SIGILLO et al., 1999; ZHUANG et al., 1997) e também estão envolvidos no metabolismo dos lipídeos (BISWAS; DEB, 1965).

No presente estudo foi realizado uma curva de dose-resposta do retinol em relação ao influxo de cálcio em testículos de ratos imaturos, foi observado que o retinol estimula significativamente o aumento do influxo de cálcio nas doses 10^{-12} , 10^{-9} , e 10^{-6} M, estas doses são mais baixas do que outros experimentos realizados pelo nosso grupo de pesquisa, nos quais foi observado aumento significativo no influxo de cálcio em testículos enriquecidos em células de Sertoli por irradiação e em células de Sertoli isoladas, em uma concentração de 20×10^{-6} M (WASSERMANN, G. F., LOSS, E. S. AND WECHSLER, 1995). Naquele mesmo ensaio foi realizado uma curva de tempo-resposta com o retinol, observou-se efeito a partir de 20 segundos. No presente estudo, foi estipulado o melhor tempo de incubação em 2 minutos, o qual foi utilizado para os demais experimentos. Estes dados sugerem que são necessárias baixas doses de retinol para o estímulo de uma resposta não clássica nestas células.

É bastante conhecido que a testosterona exerce diversas ações sobre as células de Sertoli e como os retinóides podem influenciar em sua secreção reduzindo a secreção basal da T (APPLING; CHYTIL, 1981), decidimos analisar os efeitos do retinol e da T quando aplicados simultaneamente em testículos de ratos imaturos.

Neste estudo foi observado a relação dose-resposta da T no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$

em testículos de ratos imaturos de 10 dias de idade. A T foi testada nas concentrações de 10^{-9} e 10^{-6} M em 2 minutos, porém foi observado aumento significativo apenas na concentração 10^{-6} M. Estes achados estão de acordo com resultados obtidos anteriormente por nosso grupo de pesquisa (DE CASTRO et al., 2013; ROSA, 2014), em foi observado aumento significativo no influxo de cálcio em testículos de ratos imaturos tratados com T, na concentração de 10^{-6} por 5 minutos. Também já foi observado aumento significativo nas concentrações de cálcio intracelular em células de Sertoli isoladas quando tratados com T (GORCZYNSKA; HANDELSMAN, 1995; LEITE et al., 1999; ROMMERTS et al., 2000).

Quando observamos a interação entre o retinol e a T no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no tecido testicular, foi observado que o grupo tratado com os dois hormônios simultaneamente apresentou um aumento no influxo de cálcio significativamente maior do que nos grupos tratados com os hormônios separados, sugerindo que estes hormônios podem utilizar mecanismos diferentes para exercer seus efeitos, agindo sinergicamente.

A fim de identificar os principais canais envolvidos nestes efeitos, foi realizado ensaio de influxo de cálcio utilizando bloqueadores dos canais de cálcio e dos canais de potássio, ambos dependentes da voltagem. Para analisar a influência dos CCDV-L nos efeitos do retinol e da T, foi utilizado o bloqueador nifedipina. A nifedipina foi capaz de bloquear o influxo de cálcio desencadeado pelo retinol, demonstrando o envolvimento deste canal na ação estimulatória deste hormônio. Estes resultados vão de encontro aos estudos anteriores do nosso laboratório, em foi observado que o verapamil, outro bloqueador dos CCDV-L, também bloqueou o efeito do retinol (WASSERMANN, G. F., LOSS, E. S. AND WECHSLER, 1995). Porém, quando o tratamento com nifedipina foi realizado com a T, foi observado que este bloqueador não bloqueou totalmente o influxo de cálcio. Estas observações também estão de acordo com resultados anteriores do nosso grupo de pesquisa em que foi observado que o verapamil também bloqueou parcialmente o efeito da T (LOSS et al., 2004). Os resultados obtidos através destas análises confirmam a hipótese de que estes hormônios atuam por mecanismos diferentes, por isso apresentam uma maior ação estimulatória no influxo de cálcio quando aplicados simultaneamente.

Sabe-se que o efeito não clássico estimulatório da T no influxo de cálcio ocorre

a partir da ligação à um receptor desconhecido e à consequente ativação da fosfolipase C, que hidrolisa o PIP2 em IP3 e DAG. A redução dos níveis de PIP2 na membrana promove o fechamento dos K^+_{ATP} , causando um aumento na resistência e despolarização do potencial de membrana, com a consequente abertura de CCDV-L aumentando assim o influxo de cálcio (DE CASTRO et al., 2013; LOSS et al., 2004; VON LEDEBUR et al., 2002).

Tanto o retinol quanto a T promovem rápidas modificações no potencial de membrana das células de Sertoli. Já foi descrito pelo nosso grupo que a T promove uma despolarização do potencial de membrana em células de Sertoli (DE CASTRO et al., 2013; LEITE et al., 1999; LOSS et al., 2004) e que esta despolarização é reduzida, mas não anulada, na presença de verapamil (LOSS et al., 2004), sugerindo o envolvimento dos CCDV-L, além de outros tipos de canais nesta resposta. Nosso grupo de pesquisa também já relatou, através da técnica de eletrofisiologia intracelular, que o retinol promove oscilações no potencial de membrana, iniciando com uma pequena despolarização seguida de uma hiperpolarização. Este processo se repete até retornar ao potencial de repouso (LOSS, 1997). Embora não tenha sido analisado a ação dos bloqueadores dos CCDV-L nestas oscilações, vimos neste trabalho que o influxo de Ca^{2+} foi completamente bloqueado pela nifedipina, sugerindo que estes canais estão envolvidos na resposta não clássica ao retinol.

Como estes hormônios alteram o potencial de membrana das células de Sertoli (DE CASTRO et al., 2013; LEITE et al., 1999; LOSS, 1997; LOSS et al., 2004; VON LEDEBUR et al., 2002), tem-se a possibilidade de estarem alterando as correntes dos canais de K^+ dependentes da voltagem. Isso foi investigado primeiramente utilizando o bloqueador destes canais, TEA, em foi observado que o TEA bloqueia parcialmente o influxo de cálcio estimulado pelo retinol. Em contrapartida, foi observado que o TEA bloqueia completamente a ação estimulatória da T no influxo de cálcio. Até o presente estudo, não havia sido investigado a ação dos canais de K^+ nos efeitos de retinol e da T em células de Sertoli e baseado nos resultados obtidos, foi realizado experimentos eletrofisiológicos que podem esclarecer os mecanismos de ação não clássicos destes hormônios.

Nas análises de medidas eletrofisiológicas utilizando a técnica de *Patch Clamp*

em *Whole Cell*, foi investigado a influência do retinol e da testosterona através da análise do íon K^+ em cultura primária de células de Sertoli. Foi observado que, após perfusão com o retinol, foi desencadeada a abertura dos canais de K_v aumentando correntes do íon K^+ , este estímulo foi observado em menos de 5 minutos, mostrando o efeito estimulatório que estes hormônios possuem neste tipo de canal. Ao perfundir esta mesma célula com o bloqueador TEA foi observado a inibição das correntes em poucos segundos, confirmando os resultados obtidos na técnica de influxo de cálcio, em que a T e o retinol também tiveram seus efeitos inibidos pela ação deste bloqueador.

Quando observado o efeito da T nas correntes de potássio em cultura primária de células de Sertoli, observou-se que a T estimulou o aumento das correntes do íon K^+ em menos de 3 minutos e teve as correntes de K^+ inibidas imediatamente após aplicação do bloqueador TEA, evidenciando a atuação deste canal na sua resposta. Estes achados confirmam os resultados observados na técnica de influxo de cálcio, onde o TEA bloqueou totalmente a ação estimulatória da T sobre o influxo de cálcio.

O presente estudo mostrou de maneira clara que o retinol e a T, quando aplicado juntos sobre o tecido testicular, possuem a capacidade de agir sinergicamente, estimulando ainda mais o influxo do íon Ca^{2+} , sugerindo que, embora ambos os hormônios possuem ação estimulatória sobre este influxo, esta ação ocorre pela abertura de diferentes canais. Verificando a ação de cada hormônio, de maneira separada na técnica de influxo de Ca^{2+} identificamos que o retinol estimula a abertura dos CCDV-L e parcialmente os canais K_v ; e a T estimula a abertura dos canais K_v e parcialmente os CCDV-L. Sugerimos que outros canais, como os canais de Cl^- e de K_{ATP} , também possam estar envolvidos nestas respostas. O foco deste trabalho foi tentar reproduzir o efeito destes hormônios da maneira mais fisiológica possível do que acontece normalmente nos animais, por este motivo, os ensaios com a técnica de influxo de cálcio foram realizados em testículos inteiros, ressaltando a interação entre os vários tipos celulares presentes nos túbulos seminíferos. Além disso, foi avaliado a resposta com dois hormônios atuando ao mesmo tempo, tentando desta forma, de maneira controlada, avaliar todas as variáveis.

Para definir o envolvimento das células de Sertoli nos efeitos observados na

técnica de influxo de Ca^{2+} , foi realizado os experimentos de eletrofisiologia em cultura primária de células de Sertoli imaturas. As células de Sertoli são protagonistas no processo de maturação e manutenção da espermatogênese. Sabemos que os resultados observados nos ensaios realizados em tecido inteiro podem ser diferentes dos resultados obtidos através da cultura de células primárias, pois além das inúmeras digestões enzimáticas que as células sofrem no processo de purificação, elas perdem as interações com os outros tipos celulares. O mesmo se aplica aos resultados obtidos em um tecido quando comparado com os outros sistemas ou com o organismo inteiro.

Este trabalho teve como objetivo verificar a ação do retinol e da T exclusivamente na via não clássica, evidenciando as respostas rápidas em nível de membrana plasmática. Hoje, já sabemos que a via clássica e não clássica são estimuladas simultaneamente, ordenando a regulação gênica, contribuindo para a manutenção da espermatogênese e da fertilidade (CAVALARI et al., 2018; LIAO et al., 2013; SMITH; WALKER, 2014; WALKER, 2010). Ainda são necessários mais estudos para compreender de maneira mais clara os mecanismos ativados e modulados através da ação de diferentes estímulos, sejam elas hormônios ou outros tipos celulares.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos é possível concluir que:

- O retinol exerce efeito estimulatório no influxo de cálcio em testículos de ratos imaturos. Este efeito estimulatório ocorre através dos canais de cálcio dependentes de voltagem e em parte através dos canais de potássio dependentes de voltagem. Além disto, o retinol estimula as correntes do íon potássio através da abertura dos canais de K_v das células de Sertoli imaturas de cultura primária.
- A T também exerce efeito estimulatório no influxo de cálcio em testículos de ratos imaturos. Este efeito estimulatório ocorre através dos canais de potássio dependentes de voltagem e em parte através dos dos canais de cálcio dependentes de voltagem. Além disto, a T estimula as correntes do íon potássio através da abertura dos canais de K_v das células de Sertoli imaturas de cultura primária.
- O retinol e a T interagem entre si, agindo de forma sinérgica, estimulando ainda mais o influxo de cálcio, demonstrando que sua ação é desencadeada pela abertura de diferentes tipos de canais iônicos.

REFERÊNCIAS

AL TANOURY, Z.; PISKUNOV, A.; ROCHETTE-EGLY, C. Vitamin A and retinoid signaling: genomic and nongenomic effects. **Journal of lipid research**, v. 54, n. 7, p. 1761–75, jul. 2013.

AOTO, J. et al. Synaptic Signaling by All-Trans Retinoic Acid in Homeostatic Synaptic Plasticity. **Neuron**, v. 60, n. 2, p. 308–320, 23 out. 2008.

APPLING, D. R.; CHYTIL, F. Evidence of a Role for Retinoic Acid (Vitamin A-Acid) in the Maintenance of Testosterone Production in Male Rats*. **Endocrinology**, v. 108, n. 6, p. 2120–2123, jun. 1981.

BARDI, G. et al. Thyroid hormone and retinoic acid induce the synthesis of insulin-like growth factor-binding protein-4 in prepubertal pig sertoli cells. **European journal of endocrinology**, v. 141, n. 6, p. 637–43, dez. 1999.

BATRA, S; SJÖGREN, C. Effect os estrogen treatment on calcium uptake by the rat uterine smooth muscle. **Life Science**, v. 32, n. 4, p. 315-319, jan. 1983.

BELLVÉ, A. R. et al. Dissociation of the mouse testis and characterization of isolated spermatogenic cells. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 25, n. 7, p. 480–494, 5 jul. 1977.

BICSAK, T. A. et al. Hormonal regulation of inhibin production by cultured Sertoli cells. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 49, n. 2–3, p. 211–7, fev. 1987.

BISWAS, N. M.; DEB, C. Testicular degeneration in rats during hypervitaminosis A. **Endokrinologie**, v. 49, n. 1, p. 64–9, dez. 1965.

BLANER, W. S.; GALDIERI, M.; GOODMAN, D. S. Distribution and levels of cellular retinol- and cellular retinoic acid-binding protein in various types of rat testis cells. **Biology of reproduction**, v. 36, n. 1, p. 130–7, fev. 1987.

BOITANI, C. et al. Activin stimulates Sertoli cell proliferation in a defined period of rat

testis development. **Endocrinology**, v. 136, n. 12, p. 5438–5444, 1 dez. 1995.

BOURGUIBA, S. et al. Regulation of aromatase gene expression in Leydig cells and germ cells. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 86, n. 3–5, p. 335–43, set. 2003.

BRINKMANN, A. O.; TRAPMAN, J. Genetic analysis of androgen receptors in development and disease. **Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)**, v. 47, p. 317–41, 2000.

BUZZARD, J. J.; WREFORD, N. G.; MORRISON, J. R. Thyroid Hormone, Retinoic Acid, and Testosterone Suppress Proliferation and Induce Markers of Differentiation in Cultured Rat Sertoli Cells. **Endocrinology**, v. 144, n. 9, p. 3722–3731, set. 2003.

CARREAU, S.; HESS, R. A. Oestrogens and spermatogenesis. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 365, n. 1546, p. 1517–1535, 27 maio 2010.

CARTER, C. J. et al. Developmental expression of a molluscan RXR and evidence for its novel, nongenomic role in growth cone guidance. **Developmental Biology**, v. 343, n. 1–2, p. 124–137, 1 jul. 2010.

CATTERALL, W. A. et al. International Union of Pharmacology. XL. Compendium of Voltage-Gated Ion Channels: Calcium Channels. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 4, p. 579–581, 1 dez. 2003.

CAVALARI, F. C. et al. Non-classic androgen actions in Sertoli cell membrane in whole seminiferous tubules: Effects of nandrolone decanoate and catechin. **Steroids**, v. 77, n. 1–2, p. 118–125, jan. 2012.

CAVALARI, F. C. et al. Epitestosterone- and testosterone-replacement in immature castrated rats changes main testicular developmental characteristics. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 461, p. 112–121, 5 fev. 2018.

CAVAZZINI, D.; GALDIERI, M.; OTTONELLO, S. Retinoic acid synthesis in the

somatic cells of rat seminiferous tubules. **Biochimica et Biophysica Acta** **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1313, p. 139–145, 1996.

CHERKSEY, B. D.; SUGIMORI, M.; LLINÁS, R. R. Properties of calcium channels isolated with spider toxin, FTX. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 635, p. 80–9, 1991.

COUNIS, R. et al. Gonadotropin-releasing hormone and the control of gonadotrope function. **Reprod. Nutr. Dev**, v. 45, p. 243–254, 2005.

DAVIS, J. T.; ONG, D. E. Retinol processing by the peritubular cell from rat testis. **Biology of reproduction**, v. 52, n. 2, p. 356–64, fev. 1995.

DE CASTRO, A. et al. Epitestosterone and Testosterone have Similar Nonclassical Actions on Membrane of Sertoli Cells in Whole Seminiferous Tubules. **Hormone and Metabolic Research**, v. 45, n. 1, p. 15–21, 6 set. 2013.

DELTOUR, L. et al. Localization of Class I and Class IV Alcohol Dehydrogenases in Mouse Testis and Epididymis: Potential Retinol Dehydrogenases for Endogenous Retinoic Acid Synthesis'. **BIOLOGY OF REPRODUCTION**, v. 56, p. 102–109, 1997.

DOLPHIN, A. C. Voltage-gated calcium channels and their auxiliary subunits: physiology and pathophysiology and pharmacology. **The Journal of Physiology**, v. 594, n. 19, p. 5369–5390, 1 out. 2016.

DORRINGTON, J. H.; ROLLER, N. F.; FRITZ, I. B. Effects of follicle-stimulating hormone on cultures of Sertoli cell preparations. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 3, n. 1, p. 57–70, jul. 1975.

DOYLE, D. A. et al. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. **Science (New York, N.Y.)**, v. 280, n. 5360, p. 69–77, 3 abr. 1998.

DUNNE, M. J.; PETERSEN, O. H. Potassium selective ion channels in insulin-secreting cells: physiology, pharmacology and their role in stimulus-secretion coupling. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1071, n. 1, p. 67–82, 7 mar. 1991.

ESCOTT, G. M. et al. Insulin and IGF-I actions on IGF-I receptor in seminiferous tubules from immature rats. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1838, n. 5, p. 1332–1337, maio 2014.

ESCOTT, G. M.; DA ROSA, L. A.; LOSS, E. DA S. Mechanisms of hormonal regulation of sertoli cell development and proliferation: a key process for spermatogenesis. **Current molecular pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 96–108, 2014.

ESKILD, W. et al. Cellular localization of mRNAs for retinoic acid receptor-alpha, cellular retinol-binding protein, and cellular retinoic acid-binding protein in rat testis: evidence for germ cell-specific mRNAs. **Biology of reproduction**, v. 44, n. 1, p. 53–61, jan. 1991.

FAWCETT, D. W. Sistema Reprodutor Masculino. In: **Tratado de Histologia**. 11. ed. México: Interamericana-McGraw-Hill, 1993. p. 802–857.

GAEMERS, I. C. et al. Isolation and characterization of all-trans-retinoic acid-responsive genes in the rat testis. **Molecular Reproduction and Development**, v. 50, n. 1, p. 1–6, maio 1998a.

GAEMERS, I. C. et al. The Effect of 9- *cis* -Retinoic Acid on Proliferation and Differentiation of A Spermatogonia and Retinoid Receptor Gene Expression in the Vitamin A-Deficient Mouse Testis ¹. **Endocrinology**, v. 139, n. 10, p. 4269–4276, out. 1998b.

GALDIERI, M.; CAPORALE, C.; ADAMO, S. Calcium-, phospholipid-dependent protein kinase activity of cultured rat Sertoli cells and its modifications by vitamin A. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 48, n. 2–3, p. 213–20, dez. 1986.

GALDIERI, M.; NISTICO, L. Retinoids Regulate Gonadotropin Action in Cultured Rat Sertoli Cells'. **BIOLOGY OF REPRODUCTION**, v. 50, p. 171–177, 1994.

GANONG, W. F. **GANONG, FISIOLÓGIA MÉDICA**. 23. ed. México: McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, 2010.

GHYSELINCK, N. B. et al. Retinoids and spermatogenesis: Lessons from mutant mice lacking the plasma retinol binding protein. **Developmental Dynamics**, v. 235, n. 6, p. 1608–1622, jun. 2006.

GONZÁLEZ, C. et al. K⁺ channels: Function-structural overview. **Comprehensive Physiology**, v. 2, n. 3, p. 2087–2149, 2012.

GOODMAN, H. M. **Basic medical endocrinology**. [s.l.] Elsevier, 2009.

GORCZYNSKA, E.; HANDELSMAN, D. J. Androgens rapidly increase the cytosolic calcium concentration in Sertoli cells. **Endocrinology**, v. 136, n. 5, p. 2052–2059, maio 1995.

GRISSEMER, S. et al. Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K⁺ channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. **Molecular pharmacology**, v. 45, n. 6, p. 1227–34, jun. 1994.

GUMA, F. C.; BERNARD, E. A. Effects of retinol on glycoprotein synthesis by Sertoli cells in culture: dolichyl phosphomannose synthase activation. **International journal of andrology**, v. 17, n. 1, p. 50–5, fev. 1994.

GUZMAN, J. N. et al. Robust Pacemaking in Substantia Nigra Dopaminergic Neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 35, p. 11011–11019, 2 set. 2009.

HAYABUCHI, Y. The Action of Smooth Muscle Cell Potassium Channels in the Pathology of Pulmonary Arterial Hypertension. **Pediatric Cardiology**, v. 38, n. 1, 2017.

HEGINBOTHAM, L.; MACKINNON, R. The aromatic binding site for tetraethylammonium ion on potassium channels. **Neuron**, v. 8, n. 3, p. 483–91, mar. 1992.

HESS, P.; LANSMAN, J. B.; TSIEN, R. W. Different modes of Ca channel gating⁶¹

behaviour favoured by dihydropyridine Ca agonists and antagonists. **Nature**, v. 311, n. 5986, p. 538–544, 11 out. 1984.

HU, C. et al. Zona glomerulosa cells of the mouse adrenal cortex are intrinsic electrical oscillators. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 6, p. 2046–2053, 1 jun. 2012.

JAY, S. D. et al. Primary structure of the gamma subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. **Science (New York, N.Y.)**, v. 248, n. 4954, p. 490–2, 27 abr. 1990.

KETELSLEGGERS, J.-M. et al. Developmental Changes in Testicular Gonadotropin Receptors: Plasma Gonadotropins and Plasma Testosterone in the Rat. **Endocrinology**, v. 103, n. 1, p. 212–222, jul. 1978.

KLAMT, F. et al. Retinol-induced elevation of ornithine decarboxylase activity in cultured rat Sertoli cells is attenuated by free radical scavenger and by iron chelator. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 208, n. 1–2, p. 71–6, maio 2000.

KRAWETZ, S. A.; DE ROOIJ, D. G.; HEDGER, M. P. Molecular aspects of male fertility. International Workshop on Molecular Andrology. **EMBO reports**, v. 10, n. 10, p. 1087–92, out. 2009.

KURLANDSKY, S. B. et al. Plasma delivery of retinoic acid to tissues in the rat. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 30, p. 17850–7, 28 jul. 1995.

LAMANO CARVALHO, T. L. et al. Morphometric study of the reversibility of testicle alterations in rats submitted to hypervitaminosis A. **International journal for vitamin and nutrition research. Internationale Zeitschrift für Vitamin- und Ernährungsforschung. Journal international de vitaminologie et de nutrition**, v. 48, n. 4, p. 316–24, 1978.

LEE, V. W. et al. Variations in serum FSH, LH and testosterone levels in male rats from birth to sexual maturity. **Journal of reproduction and fertility**, v. 42, n. 1, p. 121–6, jan. 1975.

LEITE, L. et al. Testosterone induces immediate membrane depolarization and stimulates 5Ca^{2+} uptake in Sertoli cells from rats of different maturation stages. **Medicai Science Research**, v. 27, p. 25–28, 1999.

LI, L. H. et al. Protection against methoxyacetic-acid-induced spermatocyte apoptosis with calcium channel blockers in cultured rat seminiferous tubules: possible mechanisms. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 144, n. 1, p. 105–119, 1997.

LIAO, R. S. et al. Androgen receptor-mediated non-genomic regulation of prostate cancer cell proliferation. **Translational andrology and urology**, v. 2, n. 3, p. 187–96, set. 2013.

LIAO, Y.-P.; HO, S.-Y.; LIOU, J.-C. Non-genomic regulation of transmitter release by retinoic acid at developing motoneurons in *Xenopus* cell culture. **Journal of cell science**, v. 117, n. Pt 14, p. 2917–24, 15 jun. 2004.

LIOU, J.-C. et al. A rapid, nongenomic pathway facilitates the synaptic transmission induced by retinoic acid at the developing synapse. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. 20, p. 4721–4730, 15 out. 2005.

LIVERA, G. et al. Multiple effects of retinoids on the development of Sertoli, germ, and Leydig cells of fetal and neonatal rat testis in culture. **Biology of reproduction**, v. 62, n. 5, p. 1303–14, maio 2000.

LIVERA, G. Regulation and perturbation of testicular functions by vitamin A. **Reproduction**, v. 124, n. 2, p. 173–180, 1 ago. 2002.

LIVERA, G. et al. Retinoid-Sensitive Steps in Steroidogenesis in Fetal and Neonatal Rat Testes: In Vitro and In Vivo Studies. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 6, p. 1814–1821, 1 jun. 2004.

LOSS, E. D. S. **Efeitos do retinol sobre a captação de 45Ca^{2+} e o transporte de aminoácidos e sua relação com o potencial de membrana em células de Sertoli de testículos de ratos imaturos.** [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 1997.

LOSS, E. S. et al. Testosterone Modulates K + ATP Channels in Sertoli Cell Membrane via the PLC-PIP 2 Pathway. **Hormone and Metabolic Research**, v. 36, n. 8, p. 519–525, ago. 2004.

LOSS, E. S.; JACOBUS, A. P.; WASSERMANN, G. F. Rapid signaling responses in Sertoli cell membranes induced by follicle stimulating hormone and testosterone: Calcium inflow and electrophysiological changes. **Life Sciences**, v. 89, n. 15–16, p. 577–583, 10 out. 2011.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–75, nov. 1951.

MACKINNON, R. Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. **Nature**, v. 350, n. 6315, p. 232–235, 21 mar. 1991.

MANGONI, M. E. et al. Functional role of L-type Cav1.3 Ca²⁺ channels in cardiac pacemaker activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 9, p. 5543–5548, 29 abr. 2003.

MENEGAZ, D. et al. Rapid responses to thyroxine in the testis: active protein synthesis-independent pathway. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 246, n. 1–2, p. 128–34, 26 fev. 2006.

MENEGAZ, D. et al. 1 α ,25(OH)₂-Vitamin D₃ stimulation of secretion via chloride channel activation in Sertoli cells. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 119, n. 3–5, p. 127–134, abr. 2010.

MITA, M.; PRICE, J. M.; HALL, P. F. Stimulation by Follicle-Stimulating Hormone of Synthesis of Lactate by Sertoli Cells from Rat Testis*. **Endocrinology**, v. 110, n. 5, p. 1535–1541, maio 1982.

MORALES, C.; GRISWOLD, M. D. RETINOL-INDUCED STAGE SYNCHRONIZATION IN SEMINIFEROUS TUBULES OF THE RAT. **Endocrinology**, v. 121, n. 1, p. 432–434, jul. 1987.

NOWYCKY, M. C.; FOX, A. P.; TSIEN, R. W. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. **Nature**, v. 316, n. 6027, p. 440–443, 1 ago. 1985.

NOY, N. Vitamin A in regulation of insulin responsiveness: mini review. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 75, n. 2, p. 212–215, 5 maio 2016.

O'DONNELL, L. et al. CHAPTER 21 – Endocrine Regulation of Spermatogenesis. In: **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. [s.l: s.n.]. p. 1017–1069.

O'SHAUGHNESSY, P. J. Hormonal control of germ cell development and spermatogenesis. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 29, p. 55–65, maio 2014.

PAGE, K. C.; HEITZMAN, D. A.; CHERNIN, M. I. Stimulation of c-jun and c-myc in rat Sertoli cells following exposure to retinoids. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 222, n. 2, p. 595–600, 15 maio 1996.

PATRÃO, M. T. C. C.; SILVA, E. J. R.; AVELLAR, M. C. W. Androgens and the male reproductive tract: an overview of classical roles and current perspectives. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 53, n. 8, p. 934–45, nov. 2009.

PELLEGRINI, M. et al. ATRA and KL promote differentiation toward the meiotic program of male germ cells. **Cell Cycle**, 2008.

PETERSEN, C. et al. Transforming growth factor-alpha stimulates proliferation of rat Sertoli cells. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 181, n. 1–2, p. 221–7, 5 jul. 2001.

PETERSEN, C.; SÖDER, O. The Sertoli Cell – A Hormonal Target and “Super” Nurse for Germ Cells That Determines Testicular Size. **Horm Res**, v. 66, p. 153–161, 2006.

Plant Physiology and Development, Sixth Edition. Disponível em: <<http://6e.plantphys.net/topic06.02.html>>. Acesso em: 4 jan. 2018.

POON, M. M.; CHEN, L. Retinoic acid-gated sequence-specific translational control

by RARalpha. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 51, p. 20303–8, 23 dez. 2008.

PUTZIER, I. et al. Cav1.3 channel voltage dependence, not Ca²⁺ selectivity, drives pacemaker activity and amplifies bursts in nigral dopamine neurons. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 29, n. 49, p. 15414–9, 9 dez. 2009.

RANDALL, A.; TSIEN, R. W. Pharmacological dissection of multiple types of Ca²⁺ channel currents in rat cerebellar granule neurons. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 15, n. 4, p. 2995–3012, abr. 1995.

RATO, L. et al. Metabolic regulation is important for spermatogenesis. **Nature Reviews Urology**, v. 9, n. 6, p. 330–338, 1 maio 2012.

REDGROVE, K. A.; MCLAUGHLIN, E. A. The Role of the Immune Response in Chlamydia trachomatis Infection of the Male Genital Tract: A Double-Edged Sword. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 534, 2014.

REY, R. The prepubertal testis: a quiescent or a silently active organ? **Histology and histopathology**, v. 14, n. 3, p. 991–1000, jul. 1999.

REY, R. A. et al. Ontogeny of the androgen receptor expression in the fetal and postnatal testis: Its relevance on Sertoli cell maturation and the onset of adult spermatogenesis. **Microscopy Research and Technique**, v. 72, n. 11, p. 787–795, nov. 2009.

RIANCHO, J. et al. Retinoids and motor neuron disease: Potential role in amyotrophic lateral sclerosis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 360, p. 115–120, jan. 2016.

ROMMERTS, F. F. et al. Calcium confusion--is the variability in calcium response by Sertoli cells to specific hormones meaningful or simply redundant? **The Journal of endocrinology**, v. 167, n. 1, p. 1–5, out. 2000.

ROSA, L. A. DA. **Efeito não-clássico da testosterona e da epitestosterona em testículos de ratos neonatos.** [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, 2014.

ROSSELLI, M.; SKINNER, M. K. Developmental regulation of Sertoli cell aromatase activity and plasminogen activator production by hormones, retinoids and the testicular paracrine factor, PModS. **Biology of reproduction**, v. 46, n. 4, p. 586–94, abr. 1992.

ROSSO, A. et al. $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamin D3 stimulates rapid plasma membrane calcium influx via MAPK activation in immature rat Sertoli cells. **Biochimie**, v. 94, n. 1, p. 146–154, jan. 2012.

SAEZ, J. M. Leydig Cells: Endocrine, Paracrine, and Autocrine Regulation. **Endocrine Reviews**, v. 15, n. 5, p. 574–626, out. 1994.

SANBORN, B. M. et al. Direct measurement of androgen receptors in cultured Sertoli cells. **Steroids**, v. 29, n. 4, p. 493–502, abr. 1977.

SARTI, F. et al. Conditional RAR α knockout mice reveal acute requirement for retinoic acid and RAR α in homeostatic plasticity. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 5, p. 16, 2012.

SARTI, F. et al. Rapid suppression of inhibitory synaptic transmission by retinoic acid. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 33, n. 28, p. 11440–50, 10 jul. 2013.

SCHTEINGART, H. F. et al. Regulation of Sertoli cell aromatase activity by cell density and prolonged stimulation with FSH, EGF, insulin and IGF-I at different moments of pubertal development. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 52, n. 4, p. 375–381, 1995.

SHARPE, R. M. et al. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 125, n. 6, p. 769–84, jun. 2003.

SIGILLO, F. et al. In vitro regulation of rat Sertoli cell transferrin expression by tumor necrosis factor alpha and retinoic acid. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 148, n. 1–2, p. 163–70, 25 fev. 1999.

SILVA, F. R. M. B.; LEITE, L. D.; WASSERMANN, G. F. Rapid signal transduction in Sertoli cells. **European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies**, v. 147, n. 3, p. 425–33, set. 2002.

SIMONETTI, R. B. **Quelante de zinco TPEN na resposta eletrofisiológica da testosterona e do decanoato de nandrolona em células de Sertoli de ratos imaturos**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, 2017.

SKINNER, M. K.; GRISWOLD, M. D. **Sertoli Cell Biology**. [s.l.] Elsevier Academic Press, 2005.

SKINNER, M. K. Cell-Cell Interactions in the Testis*. **Endocrine Reviews**, v. 12, n. 1, p. 45–77, fev. 1991.

SKINNER, M. K.; GRISWOLD, M. D. Secretion of testicular transferrin by cultured Sertoli cells is regulated by hormones and retinoids. **Biological Reproduction**, v. 27, p. 211–21, 1982.

SKINNER, M. K.; SCHLITZ, S. M.; TANANIS ANTHONY, C. Regulation of Sertoli Cell Differentiated Function: Testicular Transferrin and Androgen-Binding Protein Expression*. **Endocrinology**, v. 124, n. 6, p. 3015–3024, jun. 1989.

SMITH, L. B.; WALKER, W. H. The regulation of spermatogenesis by androgens. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 30, p. 2–13, jun. 2014.

SOFIKITIS, N. et al. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 109, n. 3–5, p. 323–330, abr. 2008.

STRIESSNIG, J.; ORTNER, N. J.; PINGGERA, A. Pharmacology of L-type Calcium Channels: Novel Drugs for Old Targets? **Current molecular pharmacology**, v. 8, n.

2, p. 110–22, 2015.

SUMMERVILLE, J. W.; SCHWARTZ, N. B. Suppression of Serum Gonadotropin Levels by Testosterone and Porcine Follicular Fluid in Castrate Male Rats*. **Endocrinology**, v. 109, n. 5, p. 1442–1447, nov. 1981.

TAPANAINEN, J. et al. Rat testicular endogenous steroids and number of Leydig cells between the fetal period and sexual maturity. **Biology of reproduction**, v. 31, n. 5, p. 1027–35, dez. 1984.

THOMPSON, J. N.; HOWELL, J. M.; PITT, G. A. VITAMIN A AND REPRODUCTION IN RATS. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 159, n. 976, p. 510–35, 18 fev. 1964.

VERHOEVEN, G.; CAILLEAU, J. Follicle-Stimulating Hormone and Androgens Increase the Concentration of the Androgen Receptor in Sertoli Cells*. **Endocrinology**, v. 122, n. 4, p. 1541–1550, abr. 1988.

VERNET, N. et al. Retinoic acid metabolism and signaling pathways in the adult and developing mouse testis. **Endocrinology**, v. 147, n. 1, p. 96–110, jan. 2006.

VON LEDEBUR, E. I. C. F. et al. Rapid Effect of Testosterone on Rat Sertoli Cell Membrane Potential. Relationship with K + ATP Channels. **Hormone and Metabolic Research**, v. 34, n. 10, p. 550–555, out. 2002.

WALKER, W. H. Non-classical actions of testosterone and spermatogenesis. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 365, n. 1546, p. 1557–1569, 27 maio 2010.

WALKER, W. H.; CHENG, J. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 130, n. 1, p. 15–28, 1 jul. 2005.

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. **Medical Science Research**, v. 23, n. 9, p. 633–634, 1995.

WOLBACH, S. B.; HOWE, P. R. TISSUE CHANGES FOLLOWING DEPRIVATION OF FAT-SOLUBLE A VITAMIN. **The Journal of experimental medicine**, v. 42, n. 6, p. 753–77, 30 nov. 1925.

YANG, S.-N. et al. Ionic mechanisms in pancreatic β cell signaling. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 21, p. 4149–4177, 23 nov. 2014.

ZAMONER, A et al. Hyperthyroidism in the developing rat testis is associated with oxidative stress and hyperphosphorylated vimentin accumulation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 267, n. 1-2, p. 116-126, mar. 2007.

ZAMONER, A.; PESSOA-PUREUR, R.; SILVA, F. R. M. B. Membrane-initiated actions of thyroid hormones on the male reproductive system. **Life Sciences**, v. 89, n. 15–16, p. 507–514, 10 out. 2011.

ZANATTA, A. P. et al. Integrin participates in the effect of thyroxine on plasma membrane in immature rat testis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1830, n. 3, p. 2629–2637, mar. 2013a.

ZANATTA, A. P. et al. Rapid Responses to Reverse T3 Hormone in Immature Rat Sertoli Cells: Calcium Uptake and Exocytosis Mediated by Integrin. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e77176, 10 out. 2013b.

ZHAI, Y.; SPERKOVA, Z.; NAPOLI, J. L. Cellular expression of retinal dehydrogenase types 1 and 2: Effects of vitamin A status on testis mRNA. **Journal of Cellular Physiology**, v. 186, n. 2, p. 220–232, fev. 2001.

ZHUANG, Y. H. et al. Spermatogenesis in the vitamin A-deficient rat: possible interplay between retinoic acid receptors, androgen receptor and inhibin alpha-subunit. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 60, n. 1–2, p. 67–76, jan. 1997.