

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia**

**DIVERSIDADE NA SINALIZAÇÃO DE FSH NA FASE PROLIFERATIVA  
DE CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS IMATUROS:**

**ESTÍMULO DO MECANISMO ENVOLVENDO A VIA  
GI-G $\beta\gamma$ /PI3K/AKT-PKB NA AÇÃO DE FSH SOBRE A CAPTAÇÃO DE  
 $^{45}\text{CA}^{2+}$  E SOBRE O TRANSPORTE DE [ $^{14}\text{C}$ ]MEAIB, INDEPENDENTE  
DE AMPC E IGF-I.**

**ANA PAULA JACOBUS**

ORIENTADOR: PROF. DR. GUILLERMO FEDERICO WASSERMANN

C0-ORIENTADORA: PROF.<sup>A</sup> DR.<sup>A</sup>. ELOÍSA DA SILVEIRA LOSS

Porto Alegre, Maio de 2009.

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia**

**DIVERSIDADE NA SINALIZAÇÃO DE FSH NA FASE PROLIFERATIVA  
DE CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS IMATUROS:**

**ESTÍMULO DO MECANISMO ENVOLVENDO A VIA  
GI-G $\beta\gamma$ /PI3K/AKT-PKB NA AÇÃO DE FSH SOBRE A CAPTAÇÃO DE  
 $^{45}\text{CA}^{2+}$  E SOBRE O TRANSPORTE DE [14C]MEAIB, INDEPENDENTE  
DE AMPC E IGF-I.**

**ANA PAULA JACOBUS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia,  
da Universidade Federal do Rio Grande do Sul,  
como requisito parcial à obtenção do Grau de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Guillermo Federico Wassermann  
Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Eloísa Da Silveira Loss

Porto Alegre, Maio de 2009.

Catálogo na Publicação  
I. UFRGS/ICBS/BIBLIOTECA SETORIAL

J17d Jacobus, Ana Paula

Diversidade na sinalização de FSH na fase proliferativa de células de Sertoli de ratos imaturos: estímulo do mecanismo envolvendo a via GI-Gbeta gama/P13K/Akt-PKB na ação de FSH sobre a captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  e sobre o transporte de  $^{14}\text{C}$ MeAIB, independente de AMPc e IGF-I / Ana Paula Jacobus. – 2009.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia. Porto Alegre, BR-RS, 2009.

Orientação: Prof. Guillermo Federico Wassermann

Co-orientação: Prof<sup>ª</sup>. Eloísa da Silveira Loss

1. Hormônio folículo estimulante 2. Células de Sertoli 3. Gonadotropina  
4. Receptores dos fatores de crescimento 5. Canais de cálcio I. Wassermann,  
Guillermo Federico, orient. II. Loss, Eloísa da Silveira, co-orient. III. Título.

CDU 611.018 (043)

*“Teorias nada mais são que verdades parciais e temporárias que necessitamos,  
como etapas, na investigação ao progresso...  
O essencial princípio da experimentação está, portanto, na dúvida, aquela dúvida filosófica  
que permite ao espírito liberdade e iniciativa...”*

*Claude Bernard, 1865*

*A Alex e Maria Fernanda,  
por dividirem todos os momentos comigo.*

*À Professora Eloísa pela sua amizade,  
incentivo, generosidade e dedicação  
em todos os momentos  
do nosso convívio*

*Ao Professor Guillermo Wassermann por seus ensinamentos de vida;*

*por mostra-me que ciência se faz com dedicação e humildade,*

*tendo como objetivo a busca da verdade.*



## **AGRADECIMENTOS**

A Alexandre Luz de Castro, Bianca Fracasso, Lauren de Souza Oliveira, Fernanda Cavalari, Débora Olmedo Rodrigues e Gustavo Escott, por me ajudarem na produção deste trabalho com amizade, companheirismo, dedicação e por partilharem cada dia comigo;

À Chris Krebs Danilevicz pelo incentivo e apoio em momentos difíceis;

Ao professor Marcelo Grillo por todo o apoio e amizade durante este tempo de convívio;

À Elsa Pires, à Alice Ferreira Machado e à Rita Alves Pereira pela atenção e carinho oferecido.

Aos Meus Pais Estela e Fleurivan pelo grande exemplo de vida, de luta e trabalho, pelo carinho que me oferecem e pela ajuda que sempre me dispensaram;

À minha irmã Daniela pela amizade e pelos momentos partilhados;

Ao Centro Universitário Metodista IPA pelo apoio a mim dispensado para elaboração desta Tese;

À amiga Caroline Dani por todas as trocas de idéias e ajudas.

Às seguintes instituições pelo apoio financeiro: CNPq, CAPES e PROPESQ-UFRGS.

## SUMÁRIO

Agradecimentos.....	8
<b>LISTA DE ABREVIATURAS:</b> .....	<b>13</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>15</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>19</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>21</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>22</b>
<b>1.1. Sistema Reprodutor Masculino: Testículos</b> .....	<b>22</b>
1.1.1. Túbulos seminíferos .....	23
1.1.2. Desenvolvimento Embrionário das Gônadas masculinas.....	26
<b>1.1.2.1. Desenvolvimento das Células de Sertoli</b> .....	<b>28</b>
<b>1.2. Espermatogênese</b> .....	<b>32</b>
1.2.1. Controle Hormonal da Espermatogênese .....	36
<b>1.3. Células de Sertoli</b> .....	<b>38</b>
1.3.1. Morfologia.....	38
1.3.2. Desenvolvimento Puberal.....	41
<b>1.4. Controle hormonal da Célula de Sertoli</b> .....	<b>43</b>
1.4.1. Controle Neuroendócrino .....	43
1.4.1.1. Controle Pulsátil .....	44
1.4.1.2. Síntese de Hormônios Gonadotróficos.....	47
1.4.2. Controle Parácrino .....	48
1.4.2.1. Regulação Funcional .....	48
1.4.2.2. Relação do FSH com outros Hormônios.....	52
1.4.2.2.1. Sistema Autócrino de IGF-I.....	52
1.4.2.2.2. Sistema EGF.....	55
<b>1.5. Hormônio Folículo Estimulante (FSH)</b> .....	<b>58</b>
1.5.1. Estrutura .....	58
<b>1.6. Receptores Acoplados à Proteína G (GPCR)</b> .....	<b>62</b>
1.6.1. Organização Estrutural dos GPCR.....	62
1.6.2. Classificação dos GPCR.....	64

1.6.1.1.	Subunidades da Proteína G Heterotrimérica .....	66
1.6.1.1.1.	Subunidade $G\alpha$ .....	66
1.6.1.1.2.	Subunidades $G\beta\gamma$ .....	70
1.6.1.2.	Moduladores da Atividade das Proteínas G Heterotriméricas .....	72
1.6.2.	Receptor de FSH (FSHR) .....	73
<b>1.7.</b>	<b>Mecanismo de ação do FSH na Célula de Sertoli .....</b>	<b>76</b>
<b>1.8.</b>	<b>Fosfatidil Inositol-3- Cinase (PI3K) .....</b>	<b>80</b>
1.8.1.	Mecanismo de Sinalização via PI3K .....	82
1.8.2.	Proteínas Cinases Classe IB (PI3K $\gamma$ ) .....	84
1.8.3.	Proteína Cinase B (PKB/Akt) .....	85
1.8.4.	Mecanismo de ativação de PI3K por FSH em células de Sertoli .....	87
<b>1.9.</b>	<b>Canais de Cálcio dependentes de voltagem (CCDV) .....</b>	<b>90</b>
1.9.1.	Classificação dos CCDV .....	92
1.9.1.1.	Classificação Farmacológica .....	92
1.9.1.2.	Classificação de Acordo com o Tipo de Corrente de Cálcio .....	94
1.9.1.3.	Classificação Molecular.....	96
1.9.2.	Subunidades auxiliares dos CCDV .....	97
1.9.2.1.	Subunidade $\beta$ .....	97
1.9.2.2.	Subunidades $\alpha_2\delta$ .....	98
1.9.3.	Canais de Cálcio dependentes de voltagem $Ca_v1$ (Tipo L) .....	99
1.9.3.1.	Modulação dos CCDV por $G\beta\gamma$ /PI3K.....	100
<b>1.10.</b>	<b>Proteínas Transportadoras de Aminoácidos .....</b>	<b>103</b>
1.10.1.	Transporte de aminoácidos estimulados por FSH em células de Sertoli .....	106
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS:.....</b>	<b>108</b>
<b>2.1.</b>	<b>Objetivo Geral .....</b>	<b>108</b>
<b>2.2.</b>	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>108</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>109</b>
<b>3.1.</b>	<b>Materiais .....</b>	<b>109</b>
3.1.1.	Animais .....	109
3.1.2.	Soluções .....	109
3.1.2.1.	Tampão Krebs Ringer Bicarbonato (KRb).....	109
3.1.3.	Substâncias utilizadas .....	111
<b>3.2.</b>	<b>Métodos .....</b>	<b>118</b>
3.2.1.	Eletrofisiologia .....	118

3.2.1.1.	Preparação dos Túbulos Seminíferos .....	118
3.2.1.2.	Preparação do Microeletrodo .....	119
3.2.1.3.	Equipamento e Procedimento Eletrofisiológico .....	121
3.2.1.4.	Cálculo da Intensidade do Pulso Aplicado .....	123
3.2.1.5.	Cálculo da Resistência da Membrana .....	124
3.2.2.	Experimentos de Transporte de aminoácidos e captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ .....	125
3.2.2.1.	Transporte de Aminoácido ( $^{14}\text{C}$ -MeAIB).....	125
3.2.2.2.	Captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ .....	126
3.2.3.	Análise Estatística .....	127
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>128</b>
<b>4.1.</b>	<b>Ação do FSH sobre a captação de <math>^{45}\text{Ca}^{2+}</math> e sobre o transporte de [<math>^{14}\text{C}</math>]MeAIB , em células de Sertoli de ratos imaturos (10-12 dias de idade), experimentos com testículos inteiros. ..</b>	<b>128</b>
<b>4.2.</b>	<b>Ação eletrofisiológica de FSH sobre o Potencial de membrana das células de Sertoli .....</b>	<b>129</b>
<b>4.3.</b>	<b>Bloqueio dos canais de Cálcio dependentes de voltagem do tipo L (<math>\text{Ca}_v1</math>) por Verapamil (100<math>\mu\text{M}</math>) .....</b>	<b>130</b>
<b>4.4.</b>	<b>Ação de Toxina Pertussis (PTX) sobre parâmetros estimulados por FSH em células de Sertoli de ratos imaturos (experimentos em testículos inteiros). .....</b>	<b>131</b>
4.4.1.	Estímulo Do FSH (4mIU/MI) Sobre A Captação De $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , Em Células De Sertoli De Ratos Imaturos, É Inibido Na Presença De Toxina Pertussis (PTX). .....	131
4.4.2.	Estímulo Do FSH (4mU/mL) Sobre O Transporte De [ $^{14}\text{C}$ ] Meaib É Anulado Na Presença De Toxina Pertussis (PTX) 1 $\mu\text{g/mL}$ . .....	132
4.4.3.	Registro Eletrofisiológico Da Ação De PTX 1 $\mu\text{g/mL}$ (3 Horas De Incubação) Sobre O PM De Células De Sertoli De Ratos Imaturos.....	133
<b>4.5.</b>	<b>A ação de FSH induzindo o aumento na captação de <math>^{45}\text{Ca}^{2+}</math> e o transporte de [<math>^{14}\text{C}</math>] MeAIB é inibida pelo inibidor de PI3K, Wortmannin (100nM), em células de Sertoli (em experimentos com testículos inteiros). .....</b>	<b>134</b>
4.5.1.	Registro eletrofisiológico da ação de Wortmannin (100nM) sobre o PM das células de Sertoli de ratos imaturos e modulando a resposta de FSH sobre PM das células de Sertoli de ratos imaturos .....	135
<b>4.6.</b>	<b>Ação de IGF-I sobre marcadores de ação hormonal em testículos inteiros. ....</b>	<b>136</b>
4.6.1.	Ação De IGF-I Sobre A Captação De $^{45}\text{Ca}^{2+}$ Em Células De Sertoli, Em Experimentos Com Testículos Inteiros .....	136
4.6.2.	Ação de IGF-I sobre o transporte de [ $^{14}\text{C}$ ] MeAIB em testículos inteiros.....	137
4.6.3.	Ação Eletrofisiológica De IGF-I Sobre O Potencial De Membrana De Células De Sertoli De Ratos Imaturos .....	138
<b>4.7.</b>	<b>Ação de JB1 sobre de <math>^{45}\text{Ca}^{2+}</math> e o transporte de [<math>^{14}\text{C}</math>] MeAIB modulando a ação de IGF-I e FSH em células de Sertoli .....</b>	<b>139</b>

<b>4.8. Adenilil Ciclase não está envolvida nas ações estimulatórias de FSH sobre a na captação de <math>^{45}\text{Ca}^{2+}</math>.</b> .....	<b>140</b>
<b>4.9. Variações do PM em células de Sertoli no processo de sinalização de FSH.</b> .....	<b>141</b>
4.9.1. Ação Eletrofisiológica De FSH Em Células De Sertoli De Ratos Com 10, 15 e 18 Dias de Idade .....	141
4.9.2. Dessensibilização Na Resposta Eletrofisiológica De FSH Através De Exposição Dos Túbulos Seminíferos A Doses Repetidas Da Gonadotrofina .....	142
<b>5. DISCUSSÃO DE RESULTADOS</b> .....	<b>143</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>155</b>
<b>II. ADDENDUM</b> .....	<b>157</b>
<b>IA. Ação Paradoxal de Bloqueadores de canais de <math>\text{Ca}^{2+}</math> dependentes de voltagem do tipo L.</b> .....	<b>159</b>
<b>IIA. Ação de Bloqueadores da atividade Tirosina Cinase</b> .....	<b>163</b>
<b>IIIA. Ação de Bloqueador de Adenilil Ciclase SQ 22,536 (9(Tetrahydro-2-furanyl)-9H-purina-6-amina).</b> .....	<b>164</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>168</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS:

$\alpha$ : alfa  
 $\beta$ : beta  
 $\gamma$ : gama  
 $\Omega$ : Ohm  
 $\mu\text{M}$ : Micromolar  
 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ : íon cálcio marcado radiotivamente  
A: Ampére  
ABC: Proteínas cassete  
ADP: Adenosina Difosfato  
Ag: Prata  
AgCl: Cloreto de Prata  
AMH: Hormônio Anti Mulleriano  
AMPc: Adenosina monofosfato cíclica  
AngII: angiotensina II  
ATP: Adenosina Trifosfato  
AVP: Vasopressina  
 $\text{Ca}^{2+}$ : íon cálcio  
CCDV: Canais de Cálcio Dependentes de Voltagem  
CNP : peptídeo natriurético do tipo C  
CRH: Hormônio liberador de corticotrofina  
C-terminal: Terminal Carboxila  
DAG: Diacilglicerol  
DMSO: Dimetil sulfóxido  
EGF : fator de crescimento epidermal  
FGF :fator de crescimento de fibroblastos  
FSH: Hormônio Folículo Estimulante  
GDP: Guanosina difosfato  
GnRH: Hormônio Liberador de Gonadotrofinas  
GPCR: Receptor acoplado a proteína G  
GRP : hormônio liberador de gastrina  
GTP: Guanosina Trifosfato  
Hz: Hertz  
I: Corrente  
IGFBP: Proteína liga Dora de fator de crescimento  
IGF-I: fator de crescimento como insulina do tipo I  
IGF-II: fator de crescimento como insulina do tipo II  
IL : interleucinas  
IP<sub>3</sub>: Inositol-3,4,5-Trifosfato  
 $\text{K}^+_{\text{ATP}}$ : Canais de Potássio Dependentes de ATP  
KCl: Cloreto de Potássio  
KRb: Solução de Krebs  
LH: Hormônio Luteinizante  
LHRH: Hormônio Liberador de Hormônio Luteinizante  
 $\text{M}\Omega$ : Megaohms  
M: Molar  
M<sub>1</sub>: Região Transmembrana 1  
M<sub>2</sub>: : Região Transmembrana 2  
MAPK: Mitogen activate protein kinase  
MgADP: Magnésio ligado à Adenosina Difosfato  
mL: Mililitros

mM: Milimolar  
ms: Milissegundos  
mV: Milivolts  
nA: Nanoampére  
NBF: Sítio de Ligação a nucleotídeo  
ng/mL: nanogramas por mililitro  
NGF: fator de crescimento neuronal  
N-terminal: Terminal Amino  
PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas  
PDK1: Cinase de proteína cinase  
PDK2: Cinase de proteína cinase  
pH: Potencial de Hidrogênios  
PI: Fosfatidil Inositol  
PIK<sub>3</sub>: Fosfatidil Inositol-3-quinase  
PIP: Fosfatidil Inositol-4-Fosfato  
PIP<sub>2</sub>: Fosfatidil Inositol-4,5-Bisfosfato  
PIP<sub>3</sub>: Fosfatidil Inositol-3,4,5-Trifosfato  
PKA: Proteína cinase A  
PKB: Proteína cinase B  
PKC: Proteína cinase C  
PLC: Fosfolipase C  
PTEN: Fosforilase de proteína cinase  
SCE: Enriquecido em Células de Sertoli  
TGF $\beta$ , TGF $\alpha$ : fator de crescimento tumoral  
TNF $\alpha$  : fator de necrose tumoral  
TRH : Hormônio liberador de tireotrofina  
V: Volts

## LISTA DE FIGURAS

**FIGURA 1.1:** REPRESENTAÇÃO ARTÍSTICA DO TESTÍCULO DE RATO E HUMANO.

**FIGURA 1.2:** REPRESENTAÇÃO ARTÍSTICA DA LOCALIZAÇÃO DO TÚBULOS SEMINÍFEROS NO TESTÍCULO E DAS CÉLULAS DE SERTOLI NOS TÚBULOS

**FIGURA 1.3:** MICROGRAFIA ELETRÔNICA DE UM CORTE HISTOLÓGICO DE TÚBULO SEMINÍFERO DE RATO ADULTO.

**FIGURA 1.4:** REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO DESENVOLVIMENTO DOS DUCTOS GENITAIS MASCULINOS E FEMININOS

**FIGURA 1.5:** (A) VARIAÇÃO NO NÚMERO DE CÉLULAS DE SERTOLI EM RELAÇÃO À IDADE, EM DIFERENTES ANIMAIS (B) MICROGRAFIAS DEMONSTRANDO TÚBULOS SEMINÍFEROS DE DIFERENTES ANIMAIS , EM DIFERENTES ESTÁGIO DE ESPERMATOGÊNESE.

**FIGURA 1.6:** MICROGRAFIA DE TÚBULOS SEMINÍFEROS NORMAIS DE RATOS DE 5, 20 E ADULTOS.

**FIGURA 1.7:** ESQUEMA GRÁFICO DEMONSTRANDO A CINÉTICA DA AMPLIFICAÇÃO DE CÉLULAS GERMINATIVAS EM ROEDORES E PRIMATAS.

**FIGURA 1.8:** ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO DE ROEDORES (I-XII).

**FIGURA 1.9:** FOTOGRAFIAS DE DESENHOS ESQUEMÁTICOS DE SERTOLI , 1877 (A) E VON EBNER, 1888.

**FIGURA 1.10:** ASSOCIAÇÃO ENTRE CÉLULA DE SERTOLI E CÉLULAS GERMINATIVAS.

**FIGURA 1.11:** MICROAMBIENTE TESTICULAR, EVIDENCIANDO O EPITÉLIO SEMINÍFERO COM CÉLULAS DE SERTOLI E CÉLULAS GERMINATIVAS.

**FIGURA 1.12:** REPRESENTAÇÃO DO RECEPTOR TIROSINA CINASE.

**FIGURA 1.13:** PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO DE FSH EXTRAÍDOS DE HIPÓFISE ANTERIOR.

**FIGURA 1.14:** ESTRUTURA DE GPCR HETEROTRIMÉRICA (A) ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA; (B) ESTRUTURA ESQUEMÁTICA.

**FIGURA 1.15:** CICLO DISSOCIAÇÃO/ASSOCIAÇÃO DAS SUBUNIDADES DE PROTEÍNA G LIGADAS À GTP/GDP.

**FIGURA 1.16:** REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO FSHR.

**FIGURA 1.17:** MODIFICAÇÕES ELETROFISIOLÓGICAS SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA DAS CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS IMATUROS

**FIGURA 1.18:** FOSFORILAÇÃO DE FOSFOINOSITÍDEOS POR PI3K.

**FIGURA 1.19:** SÍNTESE DE FOSFOLIPÍDEOS.

**FIGURA 1.20:** REPRESENTAÇÕES DO  $CA_{v1}$  E SUAS SUBUNIDADES.

**FIGURA 1.21:** LOCAIS DE INTERAÇÃO ENTRE AMINOÁCIDOS E DHP; FAA , FAA+BTZ , DHP+FAA E COM OS TRÊS BLOQUEADORES DHP+FAA+BTZ .

**FIGURA 1.22:** CLASSIFICAÇÃO DOS CANAIS DE CÁLCIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM.



**FIGURA 1.23:** RELAÇÃO ENTRE A SUBUNIDADE  $G\beta\gamma$  DA PROTEÍNA  $G_i$  COM O AUMENTO DA ATIVIDADE DE PI3K E A FOSFORILAÇÃO DE PIP3 EM MIÓCITOS VASCULARES.

**FIGURA 3.1:** REPRESENTAÇÃO CRISTALOGRÁFICA DAS CADEIAS A E B DA MOLÉCULA DE FSH.

**FIGURA 3.2:** ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DE IGF-I HUMANO

**FIGURA 3.3** MOLÉCULA DE FORSCOLINA.

**FIGURA 3.4:** ESTRUTURA TERCIÁRIA DA TOXINA PERTUSSIS.

**FIGURA 3.5:** SUBSTITUIÇÃO NO DOMÍNIO D DA MOLÉCULA DE IGF-I PRODUZ O ANÁLOGO INATIVO JB1

**FIGURA 3.6:** MOLÉCULA DE WORTMANNIN.

**FIGURA 3.7:** MOLÉCULA DE SQ 22,536.

**FIGURA 3.8:** MOLÉCULA DE NIMODIPINA.

**FIGURA 3.9:** MOLÉCULA DE VERAPAMIL

**FIGURA 3.10:** MOLÉCULA DE TYRPHOSTIN AG1024.

**FIGURA 3.11:** CÂMARA DE PERFUSÃO COM TÚBULOS SEMINÍFEROS FIXADOS AO FUNDO.

**FIGURA 4.1:** AÇÃO DE FSH (4MU/ML) SOBRE A CAPTAÇÃO DE  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  (PMOLES DE  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ /G DE TESTÍCULO) EM CÉLULAS DE SERTOLI.

**FIGURA 4.2:** AÇÃO DE FSH (4MU/ML) SOBRE O TRANSPORTE DE  $[^{14}\text{C}]\text{MEAIB}$  (RELAÇÃO TECIDO/MEIO-T/M) EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS IMATUROS (TESTÍCULOS INTEIROS).

**FIGURA 4.3:** FSH 4MU/2 $\mu\text{L}$  RESULTA EM UMA RÁPIDA HIPERPOLARIZAÇÃO (30 SEGUNDOS), SEGUIDA DE UMA DESPOLARIZAÇÃO PROLONGADA (ATÉ 6 MINUTOS).

**FIGURA 4.4:** O ESTÍMULO DA CAPTAÇÃO DE  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  (PMOLES  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ /G DE TESTÍCULO) POR FSH 4MU/ML, EM CÉLULAS DE SERTOLI, FOI INIBIDO POR VERAPAMIL 100 $\mu\text{M}$ , EM EXPERIMENTOS COM TESTÍCULOS INTEIROS DE RATOS IMATUROS.

**FIGURA 4.5:** ESTÍMULO DO FSH (4MU/ML) SOBRE A CAPTAÇÃO DE  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  (PMOLES  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ /G DE TESTÍCULO), FOI BLOQUEADO POR PTX.

**FIGURA 4.6:** ESTÍMULO DO FSH (4MU/ML) SOBRE O TRANSPORTE DE  $[^{14}\text{C}]\text{MEAIB}$  (RELAÇÃO TECIDO/MEIO-T/M), EM CÉLULAS DE SERTOLI (TESTÍCULOS INTEIROS) DE RATOS IMATUROS (10-12 DIAS DE IDADE) É ANULADO NA PRESENÇA DE TOXINA PERTUSSIS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$  (PTX).

**FIGURA 4.7:** (A) REGISTRO ELETROFISIOLÓGICO DA RESPOSTA DE FSH SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA DAS CÉLULAS DE SERTOLI APÓS 3 HORAS DE INCUBAÇÃO EM KRB-RINGER COM GLICOSE 3MM E (B) APÓS TRATAMENTO COM PTX (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). PTX BLOQUEOU A DESPOLARIZAÇÃO PRODUZIDA POR FSH EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS IMATUROS (15 DIAS DE IDADE).

**FIGURA 4.8:** (A) O ESTÍMULO DE FSH SOBRE A CAPTAÇÃO DE  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  (PMOLES  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ /G DE TESTÍCULO) FOI INIBIDO POR WORTMANNIN (100NM), EM TESTÍCULOS INTEIROS. (B) INIBIÇÃO DO ESTÍMULO DE FSH SOBRE O TRANSPORTE DE  $[^{14}\text{C}]\text{MEAIB}$  (RELAÇÃO TECIDO/MEIO-T/M) POR WORTMANNIN (100NM), EM TESTÍCULOS INTEIROS.

**FIGURA 4.9:** (A) WORTMANNIN (100NM), APLICADO TOPICAMENTE 2 MINUTOS ANTES DA APLICAÇÃO TÓPICA DE FSH (4MU), INIBIU A RESPOSTA ELETROFISIOLÓGICA DE FSH SOBRE O PM DAS CÉLULAS

DE SERTOLI DE RATOS IMATUROS (15 DIAS). **(B)** AÇÃO DE WORTMANNIN (100NM) SOBRE O PM DE CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS IMATUROS.

**FIGURA 4.10:** AÇÃO DE IGF-I SOBRE A CAPTAÇÃO DE  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  (PMOLES DE  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ /G DE TESTÍCULO) EM TESTÍCULOS INTEIROS.

**FIGURA 4.11:** AÇÃO DE IGF-I SOBRE A CAPTAÇÃO DE [ $^{14}\text{C}$ ] MEAIB COM 5, 10, 25,50, 100NG/ML.

**FIGURA 4.12:** AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DE IGF-I (25NG/ML) SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA DAS CÉLULAS DE SERTOLI.

**FIGURA 4.13:** AÇÃO DE JB1 SOBRE A CAPTAÇÃO DE  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  (PMOLES DE  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ /G DE TESTÍCULO) ESTIMULADA POR FSH E IGF-I.

**FIGURA 4.14:** AÇÃO DE FORSCOLINA (0,1 $\mu\text{M}$ ) SOBRE A CAPTAÇÃO DE  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  EM TESTÍCULOS INTEIROS.

**FIGURA 4.15:** REGISTRO ELETROFISIOLÓGICO DA AÇÃO DE FORSCOLINA SOBRE O PM DAS CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS IMATUROS.

**FIGURA 4.16:** RESPOSTA ELETROFISIOLÓGICA DE FSH SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA (PM) DE CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS COM DIFERENTES IDADES.

**FIGURA 4.17:** REGISTRO ELETROFISIOLÓGICO DEMONSTRANDO A DESSENSIBILIZAÇÃO ESTIMULADA PELA APLICAÇÃO DE FSH EM INTERVALOS DE TEMPOS DETERMINADOS.

**FIGURA 5.1:** GRÁFICOS COMPARATIVOS DA AÇÃO DE FSH E AMPC SOBRE A CAPTAÇÃO DE [ $^{14}\text{C}$ ]MEAIB (A) E SÍNTESE PROTÉICA EM RATOS IMATUROS(B). FSH ESTIMULA A CAPTAÇÃO DE [ $^{14}\text{C}$ ]MEAIB INDEPENDENTE DA AÇÃO DE AMPC.

**FIGURA 5.2:** PAPEL DA PROTEÍNA G MEDIANDO FUNÇÕES ATRAVÉS DE RECEPTORES ADRENÉRGICOS E MUSCARÍNICOS COM A PRESENÇA DE SUBUNIDADES DIVERSAS DE PROTEÍNA G (Gi E Gs). GERANDO MÚLTIPLAS AÇÕES A PARTIR DA LIGAÇÃO DO AGONISTA.

**FIGURA 5.3:** **(A)** AUMENTO DA FASE DESPOLARIZANTE DA RESPOSTA ELETROFISIOLÓGICA DE FSH , NA PRESENÇA DE MEAIB. (WASSERMANN *ET AL*, 1992A); **(B)** PERFIL DA AÇÃO DE FSH SOBRE O TRANSPORTE DE [ $^{14}\text{C}$ ]MEAIB EM DIFERENTES IDADES.

**FIGURA 6.1:** ESQUEMA HIPOTÉTICO DA SINALIZAÇÃO DO FSH E IGF-I NAS CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS IMATUROS, INDICANDO OS LOCAIS DE BLOQUEIOS FARMACOLÓGICOS, BEM COMO OS BLOQUEADORES UTILIZADOS PARA MODULAR AS AÇÕES DE FSH E IGF-I EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS IMATUROS.

**FIGURA IA:** AÇÃO DA NIMODIPINA (1 $\mu\text{M}$ ) SOBRE O TRANSPORTE DE [ $^{14}\text{C}$ ]MEAIB (RELAÇÃO TECIDO/MEIO-T/M) ESTIMULADO POR FSH (4MU/ML).

**FIGURA IIA:** AÇÃO DA NIMODIPINA (100 $\mu\text{M}$  E 5 $\mu\text{M}$ ) SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA DA CÉLULA DE SERTOLI E MODULANDO A RESPOSTA DE FSH (4MU/2 $\mu\text{L}$ ).

**FIGURA IIIA:** AÇÃO DE THYRPHOSTIN AG1024 SOBRE A AÇÃO DE FSH (4MU/ML NO TRANSPORTE DE [ $^{14}\text{C}$ ]MEAIB (RELAÇÃO TECIDO/MEIO-T/M).

**FIGURA IVA:** AÇÃO DE SQ 22536 (100 $\mu\text{M}$ ) SOBRE O TRANSPORTE DE [ $^{14}\text{C}$ ]MEAIB E SOBRE A CAPTAÇÃO DE  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE FSH (4MU/ML).

**TABELA 3.1** COMPOSIÇÃO SALINA E CONCENTRAÇÕES PRESENTES NAS SOLUÇÕES ESTOQUE DE KRB E NA SOLUÇÃO FINAL.

**TABELA 5.1:** FÓRMULAS ESTRUTURAIS DE GENISTEÍNA, TYRPHOSTIN AG1024 E TYRPHOSTIN AG1478.

## RESUMO

O hormônio folículo estimulante (FSH) desempenha um papel central no desenvolvimento da célula de Sertoli até a puberdade, e na sinalização desta célula em relação à série espermatogênica, após a puberdade. Na fase proliferativa, FSH atua estimulando a captação de  $\text{Ca}^{2+}$  e o transporte de aminoácidos neutros nas células de Sertoli, além de ativar a via adenilil ciclase-AMPC. Neste período, que em ratos compreende do 5º dia ao 25º após o nascimento, FSH atua aumentando o número e o tamanho das células de Sertoli, sendo esta ação fundamental para que se processe uma espermatogênese normal no indivíduo adulto. A sinalização estimulada por FSH nestas células varia com idade, reduzindo seu estímulo sobre o transporte de Aminoácidos neutros (via sistema A) no período pós-púbere. Adicionalmente, FSH estimula uma resposta eletrofisiológica bifásica, representada por uma hiperpolarização rápida, seguida de uma despolarização prolongada. O objetivo desta tese foi analisar o envolvimento de vias sinalizadas pela gonadotrofina na fase pré-puberal da célula de Sertoli de ratos. Para tanto, foram utilizadas as técnicas de captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , de transporte de  $^{14}\text{C}$ ]MeAIB e de registro eletrofisiológico intracelular, para a verificação da ação do FSH através de proteína Gs e proteína Gi, bem como de suas vias subseqüentes. Foi observado que FSH estimula a captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  e o transporte de  $^{14}\text{C}$ ]MeAIB via proteína Gi, ação esta independente do aumento de AMPC, pois foram bloqueadas por Toxina Pertussis (PTX) e não foram mimetizadas por forskolina. Da mesma forma, a despolarização estimulada por FSH foi inibida por PTX. Subseqüente a ativação de Gi, PI3K é estimulada por FSH, em células de Sertoli imaturas. Esta via foi bloqueada por wortmannin, o que inibiu a ação de FSH nos parâmetros analisados. Também foi estudada a ação de IGF-I sobre a captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , sobre o transporte de  $^{14}\text{C}$ ]MeAIB e foi observada sua resposta eletrofisiológica. Verificou-se ação de IGF-I nos transportes de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  e  $^{14}\text{C}$ ]MeAIB de maneira significativa, e observou-se uma despolarização como resposta eletrofisiológica à sua aplicação tópica, em células de Sertoli de ratos imaturos. Sabe-se que FSH e IGF-I agem de maneira sinérgica no desenvolvimento das células de Sertoli, e que FSH estimula a síntese e a secreção de IGF-I, nestas células durante o período pré-púbere. Então foi verificada se a ação de FSH ocorre via IGF-I ou através de mecanismos paralelos. Para esta verificação utilizou-se o bloqueador de receptor de IGF-I, JB1, o qual bloqueia o acesso do fator de crescimento ao seu receptor tirosina cinase. Como resultado foi observado que o bloqueador JB1, inibe as ações estimuladas por IGF-I, entretanto sem alterar a resposta de FSH sobre os parâmetros

analisados. E com o intuito de verificar o envolvimento de  $Ca_{v1}$  (canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L), foi utilizado verapamil, o qual bloqueou a ação de FSH sobre a captação de  $^{45}Ca^{2+}$ . A partir destes resultados, é possível sugerir que FSH estimula a captação de  $^{45}Ca^{2+}$ , o transporte de [ $^{14}C$ ]MeAIB, bem como apresenta uma resposta eletrofisiológica vinculada a via GPCR/Gi/G $\beta\gamma$ /PI3K/Akt-PKB/ $Ca_{v1}$ , em células de Sertoli de ratos imaturos durante sua fase proliferativa.

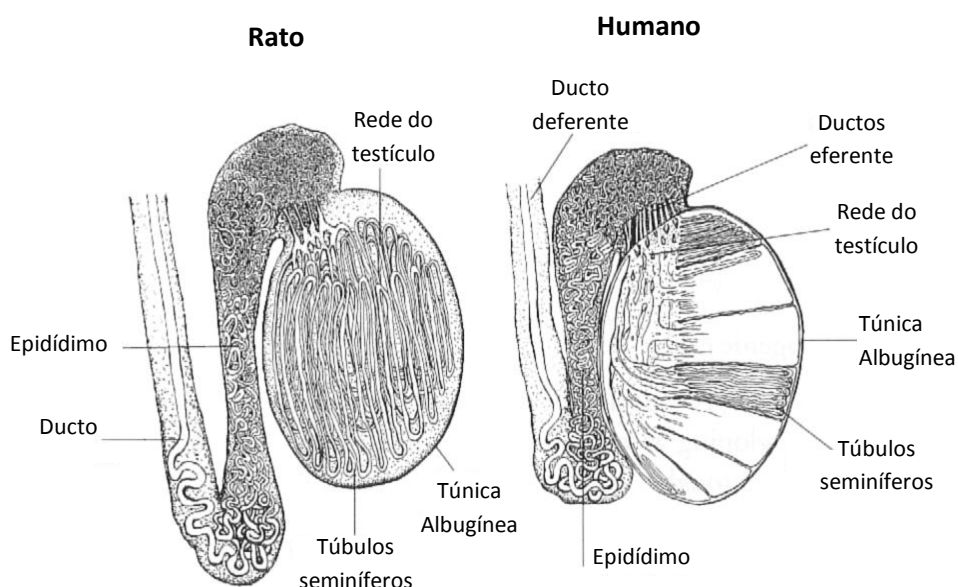
## ABSTRACT

FSH plays a central role on Sertoli cell proliferation in development during puberty, and after this period is related to spermatogenic progression. FSH increase Sertoli cells number and size from the 5<sup>o</sup> to 15<sup>o</sup> day after birth, in the same period the FSH strongly stimulates neutral amino acid transport, also, FSH plays a biphasic electrophysiology response characterized by a rapid hyperpolarization following to a prolonged depolarizing. The aim of this work was study the pathways stimulated by FSH in Sertoli cells of rats during the pre pubertal phase. As markers we use  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake, [ $^{14}\text{C}$ ]MeAIB transport and the membrane potential (MP) to verify the action of FSH on Gi and Gs protein pathways. It was observed that FSH enhanced  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake through Gi protein pathway, independently of cAMP, this action was blocked by PTX (250ng/mL) independent of adenil ciclase action. Also  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake, [ $^{14}\text{C}$ ]MeAIB transport and MP response were blocked by wortmannin (100nM). The action IGF-1 in these parameters was also analyzed, the growth factor stimulates  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake and [ $^{14}\text{C}$ ]MeAIB transport and induce a prolonged depolarization on the MP. The use of an inactive analog of the IGF-1(JB1 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) blocked the IGF-1 action but not the effects of FSH. The utilization of Verapamil (100  $\mu\text{M}$ ) blocker of the  $\text{Ca}_{v1}$  (L type VDCC) inhibited the stimulation of FSH on  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake and [ $^{14}\text{C}$ ]MeAIB transport. These results suggest that the FSH action during proliferative stage of Sertoli cells on  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake, [ $^{14}\text{C}$ ]MeAIB transport and MP modification related to the GPCR/Gi/G $\beta\gamma$ /PI3K/Akt-PKB/ $\text{Ca}_{v1}$  pathway.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO: TESTÍCULOS

Os testículos são órgãos pareados, ovóides, encapsulados por uma forte membrana fibrosa chamada túnica *vaginallis* (túnica albugínea). Desenvolvem-se dentro da cavidade abdominal e, no homem, migram um pouco antes do nascimento do seu local de origem para o escroto. O mesênquima testicular pode ser grosseiramente dividido em dois compartimentos principais: o espaço intersticial e os túbulos seminíferos. O espaço intersticial contém células de Leydig, macrófagos, vasos sanguíneos e fluido linfático. A parede externa dos túbulos seminíferos é formada por células mióides peritubulares e células endoteliais. A lâmina basal (ou membrana basal) cobre a parede externa do túbulo. Sobre a membrana basal situam-se células germinativas tronco (espermatogônias) e as células de Sertoli. Extensões citoplasmáticas das células de Sertoli formam uma matriz estrutural altamente organizada dentro da qual a espermatogônia se desenvolve em espermatozóide maduro (SKINNER, 1991).



**FIGURA 1.1:** Representação artística do testículo de rato e humano. O testículo de ambos, rato e humano, consiste de uma túnica albugínea fibrosa, que encapsula um grande número de túbulos seminíferos. O testículo humano é dividido em lóbulos, por numerosas partições fibrosas dentro do testículo. Estas partições estão ausentes no testículo de rato. (VAN ROIJEN, 1999).

### 1.1.1. TÚBULOS SEMINÍFEROS

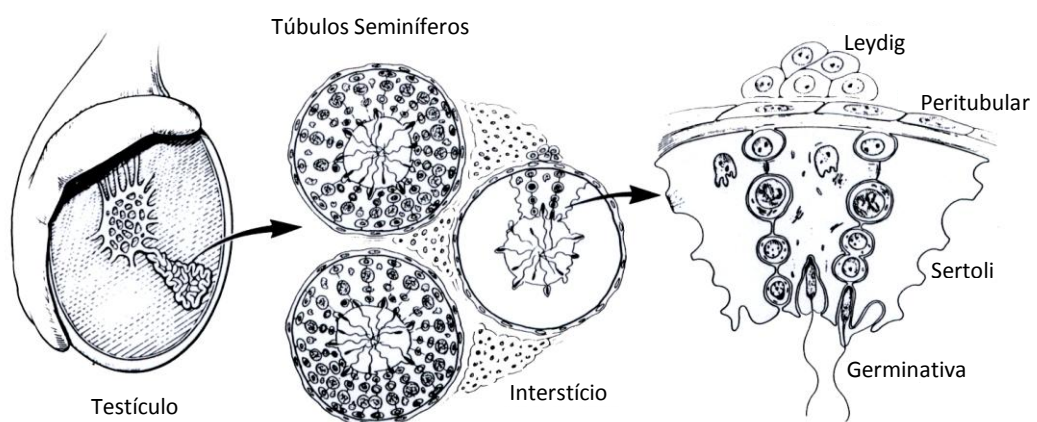
Os túbulos seminíferos foram descritos por Regaud em 1901, como sendo circunscritos por uma camada poligonal de células achatadas. No primeiro estudo publicado, utilizando microscopia eletrônica, neste tecido, Clermont (1958) achou uma camada de células contráteis entre duas lamelas de carboidratos, rica em material amorfo associado a fibrilas de colágeno. Em 1969 foi introduzido o termo “célula mióide” para enfatizar a ultraestrutura similar entre as células peritubulares contráteis e as células de musculatura lisa. As células mióides peritubulares (miofibroblastos) estão em contato com a lâmina basal do epitélio seminífero próximo das espermatogônias e das células de Sertoli. Estas células produzem contrações que contribuem para o movimento das células germinativas diferenciadas e de fluido através do lúmen durante a espermatogênese, bem como, estão



envolvidas na sinalização parácrina dos túbulos (JOHNSON, 2008, SKINNER AND FRITZ, 1986; HETTLE, 1988; MAEKAWA, 1996; BRESSLER e ROSS, 1972).

Além destas estruturas, encontram-se nos túbulos, células endoteliais e sinusóides peritubulares linfáticos. O epitélio germinativo do testículo adulto é composto por uma população fixa de células de suporte (células de Sertoli), população de células germinativas primordiais (espermatozóides) localizadas sobre a lâmina basal e uma população móvel de células germinativas em diferentes graus de diferenciação. Já no animal imaturo há somente células de Sertoli em desenvolvimento e espermatozóides ou gonócitos, dependendo da idade.

São encontrados três tipos de junções celulares nos testículos: junções ocludentes, junções de ancoramento e as junções comunicantes (tipo GAP), geralmente as junções ocludentes (*tight junctions*) ocupam a porção mais apical da célula, seguida das junções de ancoramento, e em paralelo, estão localizados os desmossomas formadores das junções comunicantes. Juntas, estas estruturas formam um complexo juncional disperso pelo epitélio seminífero ancorado à matriz extracelular (CHENG E MRUK, 2002). Também há variação na quantidade e no tipo de junção presente dependente da idade de maturação do testículo.



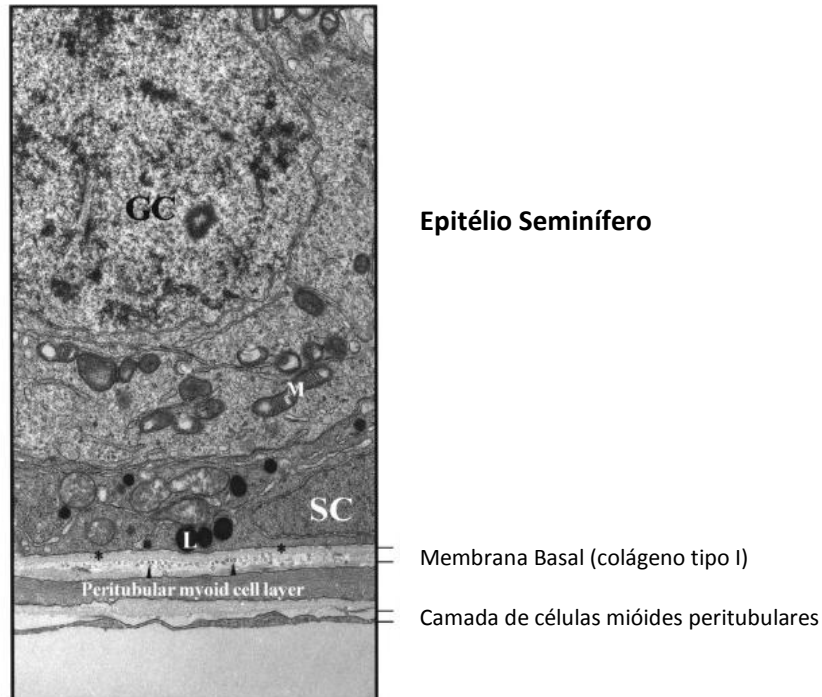
**FIGURA 1.2:** Representação artística da localização do túbulos seminíferos no testículo e das células de Sertoli nos túbulos (Adaptado de Skinner, 1991).

Cortes histológicos dos túbulos seminíferos mostram espermatogônias localizadas na porção basal do epitélio seminífero, espermatócitos na porção medial, espermatídeos próximo do ápice deste epitélio, demonstrando a progressão do desenvolvimento relacionada à maturação das células germinativas (FIG 1.2). Quando as espermatídeos são liberadas ou *espermiadas*, progridem a espermatozóides, (JOHNSON *et al*, 2008).

As células de Sertoli provêm suporte estrutural aos túbulos seminíferos, além de apresentar um importante papel no controle de processos bioquímicos das células germinativas (RUSSEL, 1993). O que define este suporte é a formação da barreira “hematotesticular” ou “barreira de células de Sertoli” composta por complexos de junções ocludentes entre células de Sertoli adjacentes. (DYM E FAWCETT, 1970; RUSSEL E PETERSON, 1985, JEGOU, 1993).

Os túbulos são separados após a puberdade, em dois compartimentos constituídos a partir da formação das junções apertadas entre as células de Sertoli, gerando a barreira hematotesticular (FAWCETT *et al*, 1970). Esta organização celular proporciona um ambiente adluminal isolado do meio extratubular, impermeável às moléculas hidrofílicas maiores, onde a comunicação entre as células de Sertoli e as células germinativas ocorre de forma parácrina, a qual varia conforme o estágio de maturação das gônadas, proporcionando uma diversa relação hormonal e nutricional entre as células intratubulares.

No compartimento basal residem apenas as espermatogônias e espermatídeos em fase de pré-leptóteno. As células que já entraram na prófase da meiose, começam a atravessar a barreira para alcançar o compartimento adluminal (RUSSELL, 1993). Centralmente dentro do túbulo localiza-se o lúmen tubular, o qual é preenchido com fluido seminífero tubular e espermatozóides. Todos os túbulos unem-se na *rete testis*, de onde o conteúdo tubular é direcionado para dentro dos ductos eferentes e para o epidídimo (JEGOU, 1993).



**FIGURA 1.3:** Micrografia eletrônica de um corte histológico de túbulo seminífero de rato adulto. (SC) Célula de Sertoli; (GC) Células germinativas; (L) Espermatogônias (adaptado de Cheng e Mruk, 2002).

A presença da barreira hematotesticular estabelece, também, um ambiente imunologicamente protegido, garantindo a progressão espermatogênica. A perda deste complexo juncional resulta na incapacidade de manter a espermatogênese (WONG E CHENG, 2005). A relação entre as células de Sertoli e as células germinativas é organizada e altamente específica, dependendo da fase de desenvolvimento, definindo desta forma, o ciclo do epitélio seminífero. Cada célula de Sertoli associa-se com 30 a 50 células germinativas em cada estágio do ciclo espermatogênico (JOHNSTON *et al*, 2004).

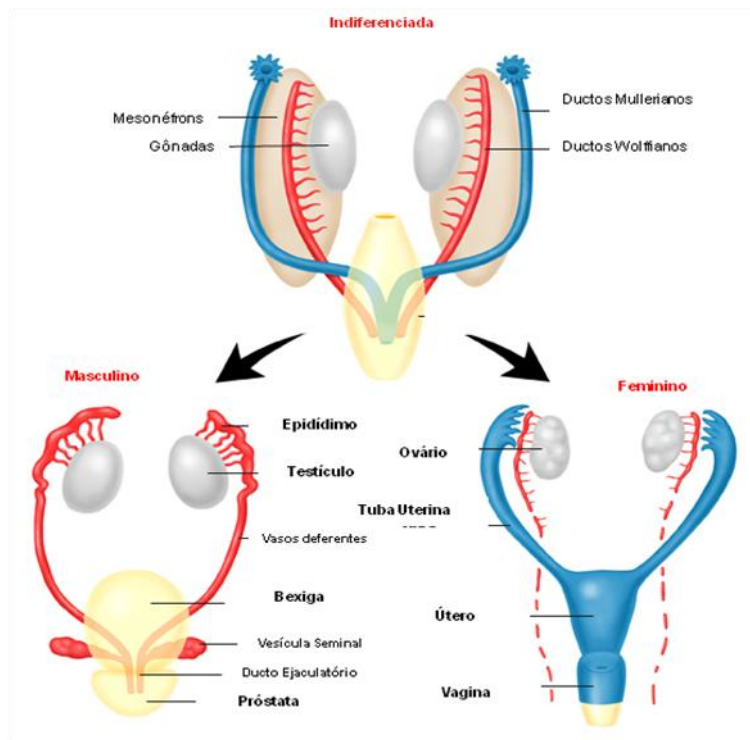
### 1.1.2. DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DAS GÔNADAS MASCULINAS

O desenvolvimento gonadal dos mamíferos envolve uma complexa interrelação entre os diversos tipos celulares que compõe esta estrutura. Durante o início do desenvolvimento embrionário em mamíferos, não há sexo fenotípico aparente. Embriões machos e fêmeas têm

um conjunto duplo de ductos genitais rudimentares, e gônadas indiferenciadas que podem desenvolver-se em testículos ou ovários. A formação dos testículos inicialmente não é dependente de gonadotrofinas ou hormônios esteróides, e sim das atividades de células pré-Sertoli e de células mióides peritubulares (BRESSLER E ROSS, 1972; SIMORANGKIR, 2003). No entanto, na série de eventos que se seguem à determinação e diferenciação dos testículos, a testosterona produzida pelas células de Leydig e o hormônio anti-Mülleriano produzido pelas células de Sertoli são de importância crítica no desenvolvimento das características masculinas primárias (e mais tarde secundárias), incluindo o papel protagonista da testosterona na iniciação da espermatogênese na puberdade e manutenção da espermatogênese no adulto (SHARPE *et al*, 2003).

As células de Sertoli têm um papel central no desenvolvimento funcional do testículo, bem como na expressão do fenótipo masculino. São as primeiras células a se diferenciarem, ainda na gônada primordial, tornando o epitélio seminífero apto a estruturar-se; atua prevenindo meiose das células germinativas e estimulando a diferenciação e função das células de Leydig (MACKAY, 2000). As células de Sertoli aumentam a regressão dos ductos mullerianos, através da secreção do hormônio anti-Mulleriano (AMH) (MACKAY, 2000; JOSSO *et al* ., 2006). O AMH é produzido pelas células de Sertoli do início da vida fetal até a puberdade. Na puberdade sua síntese é diminuída, possivelmente por ação sinérgica da testosterona intratesticular e das células germinativas meióticas (REY, 2000).

Após a puberdade, as células de Sertoli passam a suportar a espermatogênese, como será descrito adiante.



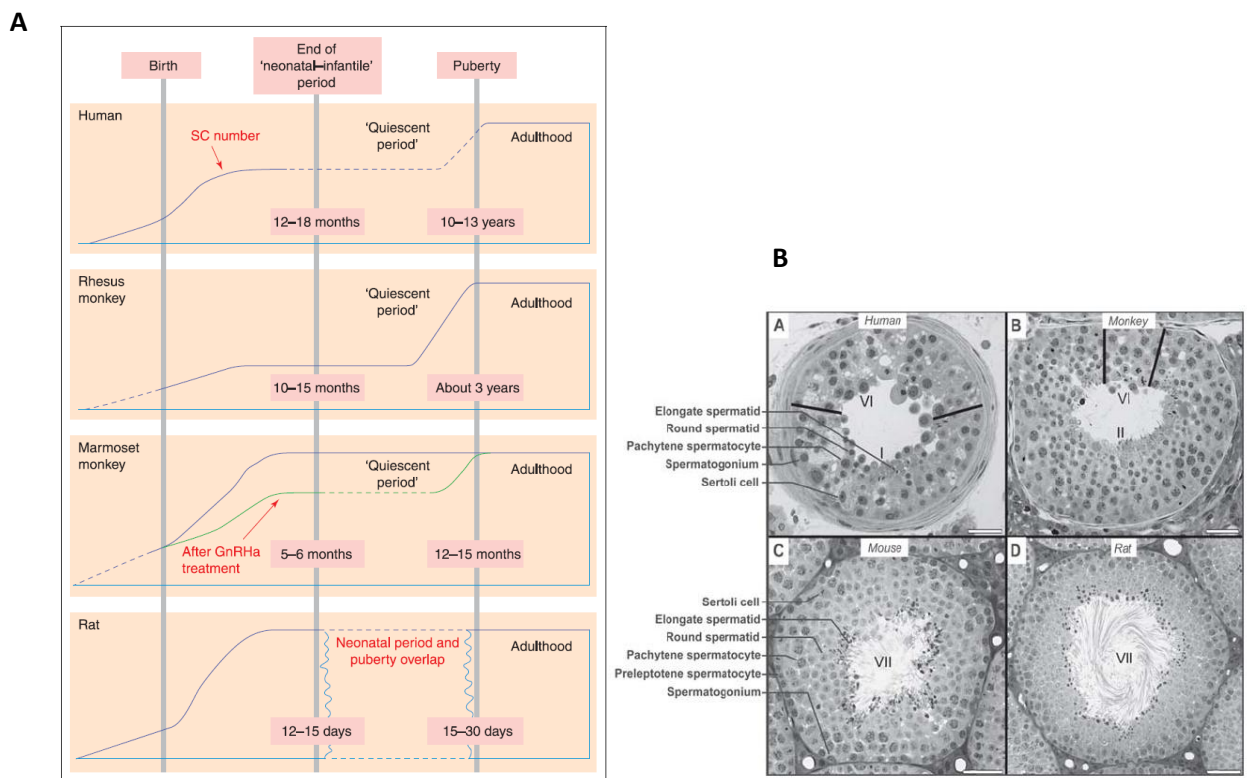
**FIGURA 1.4:** Representação esquemática do desenvolvimento dos ductos genitais masculinos e femininos. (adaptado de van ROIJEN, 1999).

### 1.1.2.1. *Desenvolvimento das Células de Sertoli*

Células de Sertoli proliferam-se, em roedores, entre o período fetal e neonatal até entre os 15-20 dias após o nascimento (BAKER E O'SHAUGHNESSY, 2001; VERGOUWEN *et al*, 1993; JOHNSTON, 2004).

A conversão de célula de Sertoli imatura para a adulta ocorre durante a puberdade, chamada de maturação ou diferenciação e é caracterizada por várias etapas. O termo diferenciação é aplicado, pois as células de Sertoli acabam de se diferenciar próximo a idade adulta, embora seja um termo utilizado para eventos ocorrido na vida fetal, nas células de Sertoli é chamada de *diferenciação funcional* (JEGOU, 1992; SHARPE, 1994; MCLAREN, 1998). A maturação envolve perda da capacidade proliferativa, formação de junções apertadas ou ocludentes (*tight junctions*) entre as células de Sertoli formando a barreira hematotesticular

e aumento de funções que não estão presentes nas células de Sertoli imaturas (SHARPE *et al*, 2003). Há diferenças entre as espécies no momento em que esta conversão ocorre. Em roedores, a proliferação das células de Sertoli ocorre entre a vida fetal e neonatal e em primatas parece ser mais predominante no período pré puberal (FIG1.5). Vários estudos indicam que a atividade proliferativa das células de Sertoli ocorre em dois períodos durante a vida, na fase fetal/neonatal e durante a fase peripuberal de maneira temporal diferente, de acordo com a espécie (PLANT E MARSHALL, 2001).

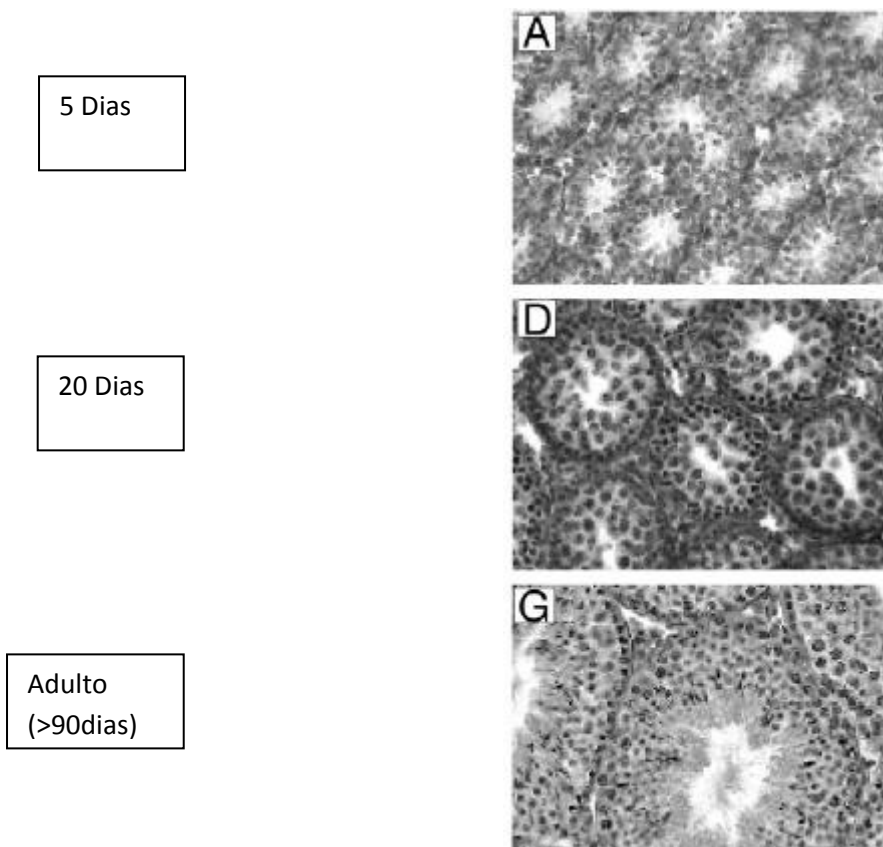


**FIGURA 1.5:** (A) Variação no número de células de Sertoli em relação à idade, em diferentes animais (SHARPE *et al*, 2003); (B) Micrografias demonstrando túbulos seminíferos de diferentes animais, em diferentes estágios de espermatogênese (HESS E FRANÇA, 2007).

Próximo ao início da puberdade, as células de Sertoli sofrem grandes modificações em sua morfologia e em sua função, mudando seu *status* de imaturo (proliferativo), para maduro (não proliferativo). Células de Sertoli organizam-se de forma adjacente, e, após a formação das junções apertadas, é criado um compartimento adluminal (intratubular) que propicia as etapas meióticas e pós-meióticas da espermatogênese. Este compartimento formado propicia a nutrição e suporte físico adequado à progressão espermatogênica, fornecendo acesso direto às células germinativas de vários fatores necessários ao seu desenvolvimento (JEGOU, 1992; MCLAREN *et al*, 1998; SHARPE, 1994). Com exceção da produção de AMH, vários autores indicam que uma mudança na expressão gênica, em células de Sertoli em desenvolvimento, ocorre entre o 5º e 10º dias após o nascimento. Nesta fase há um significativo aumento no número de células de Sertoli nos túbulos seminíferos (LINDSEY E WILKINSON, 1996). Durante este período inicia-se a proliferação espermatogonial e sua meiose (MCCARREY, 1993), células de Leydig adultas iniciam sua diferenciação (NEF *et al*, 2000; BAKER *et al*, 1999) e ocorre a formação da barreira hematotesticular (CYR *et al*, 1999), sendo este eventos relacionados a mudanças funcionais das células de Sertoli. Também é observado até o 5º dia após o nascimento, o aumento dos níveis circulantes de FSH (MICHAEL *et al*, 1980, JEAN-FAUCHER *et al*, 1983).

Ocorre uma variação importante na concentração plasmática de FSH nos períodos relacionados à gestação, após o nascimento até o término da puberdade. Durante os últimos dias gestacionais (entre os dias 17-21 fetais) a concentração de FSH aumenta próximo de duas vezes para em torno de 250ng/mL até o nascimento aumentando para 400ng/mL no 5º dia de vida do rato. Ocorrem picos transientes de FSH no plasma, com valores de 800ng/mL no dia 35 e depois ocorre um platô em 400ng/mL em ratos com 50 dias de idade (CHOWDHURY E STEINBERGER, 1976, KETELSLEGERS *et al*, 1978). Também ocorrem variações no número de receptores para FSH em células de Sertoli. Estas mudanças na população de

receptores para FSH traduzem a proliferação que ocorre entre os dias 2 e 15 após o nascimento em células de Sertoli de ratos (ORTH, 1984; MEACHEM *et al*, 1996). O número de receptores FSHR permanece constante entre os dias 2 e 21 (1500–1900 receptores/célula), aumentando mais duas vezes aos 40 dias e novamente aos 60 dias após o nascimento (BORTOLUSSI *et al*, 1990).



**FIGURA 1.6:** Micrografia de túbulos seminíferos normais de ratos de 5, 20 e adultos. (adaptado de JOHNSTON *et al*, 2004).



## 1.2. ESPERMATOGÊNESE

Espermatogênese é um processo biológico de transformação gradual de células germinativas a espermatozóides, ocorre em um período de tempo determinado para cada espécie, sendo limitado ao ambiente dos túbulos seminíferos. Este processo envolve proliferação celular, gerada através de repetidas divisões mitóticas, duplicação cromossômica, produção de espermátides e diferenciação destas espermátides a espermatozóides. Este processo é uma evolução epitelial que ocorre de maneira sincronizada no tempo produzindo um ciclo, o qual inicia com a entrada da espermatogônia tipo A em mitose e termina com a liberação das espermátides. A espermatogênese ocorre em ciclos repetidos no epitélio seminífero, caracterizada por específicas associações celulares estabelecidas em pontos específicos no tempo. Quando estas associações geram distintas alterações morfológicas, são identificados diferentes estágios no ciclo. O Ciclo espermatogênico do epitélio seminífero foi definido por LeBlond e Clermont (1952) (EHMCKE ,2006; L. JOHNSON,2008; AMANN, 2008; DYM E RAJ, 1977; RUSSELL E GRISWOLD, 1993) (FIG1.8). A progressão cinética da espermatogênese pode ser definida como “onda espermatogênica”, sendo que este processo ocorre de forma sequencial em um determinado período de tempo, definido de forma diferente para cada espécie (PEREY *et al*, 1961).

A espermatogênese é composta por quatro distintas fases onde ocorrem mudanças moleculares é acontece de forma diversa dependendo da espécie estudada (CHENG E MRUK, 2002; AMANN, 2008; MCLACHLAN, 2002).

1. A proliferação e diferenciação espermatogonial.

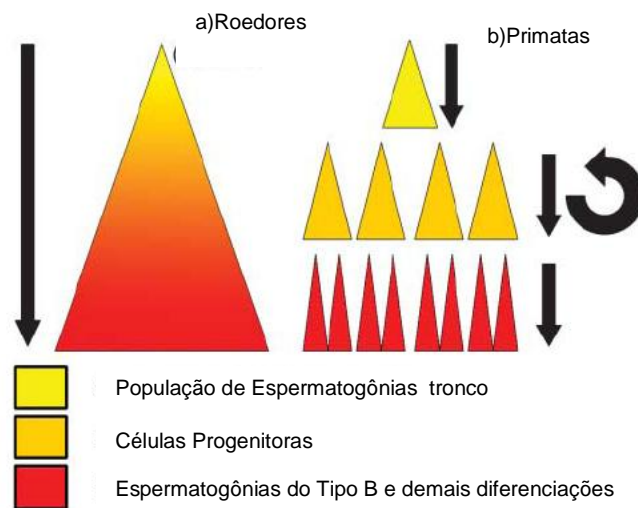
2. Meiose dos espermatócitos, incluindo a última síntese de DNA nos espermatócitos pré-leptóteno e duas divisões meióticas formando espermátides.
3. Espermiogênese ou transformação de espermátides esféricas em espermátides maduras.
4. Espermiacção ou liberação através do rompimento do ancoramento das espermátides maduras às células de Sertoli. Este gameta masculino é liberado no lúmen tubular.

Estes processos são interdependentes, entretanto cada um tem distintas demandas por moléculas regulatórias, provenientes de forma parácrina, das células de Sertoli, das células mióides peritubulares e das células de Leydig, bem como da rede vascular adjacente. Em humanos, o intervalo entre o início do processo meiótico da espermatogônia do tipo  $A_{\text{clara}}$  e a espermiacção compreende 74 dias (HELLER E CLERMONT, 1964).

Clermont e LeBlond (1959) propuseram a classificação mais utilizada das células germinativas, dividindo as espermatogônias em duas classes distintas de espermatogônias do tipo A, presente em primatas e espermatogônias do Tipo B (CLERMONT E LEBLOND 1959, CLERMONT 1969). As espermatogônias do tipo  $A_{\text{escura}}$  ( $A_d$ ) são definidas como “células tronco de reserva”. Estas células coram-se com hematoxilina, ficando escuras, e apresentam também outras características morfofuncionais, como baixa atividade proliferativa durante uma espermatogênese normal. Entretanto, as células  $A_d$  têm sua proliferação ativada durante a expansão da linhagem germinativa na puberdade (SIMORANGKIR *et al*, 2005) e após depleção das espermatogônias no epitélio germinativo, devido à exposição à radiação e substâncias tóxicas (VAN ALPHEN *et al*, 1988).

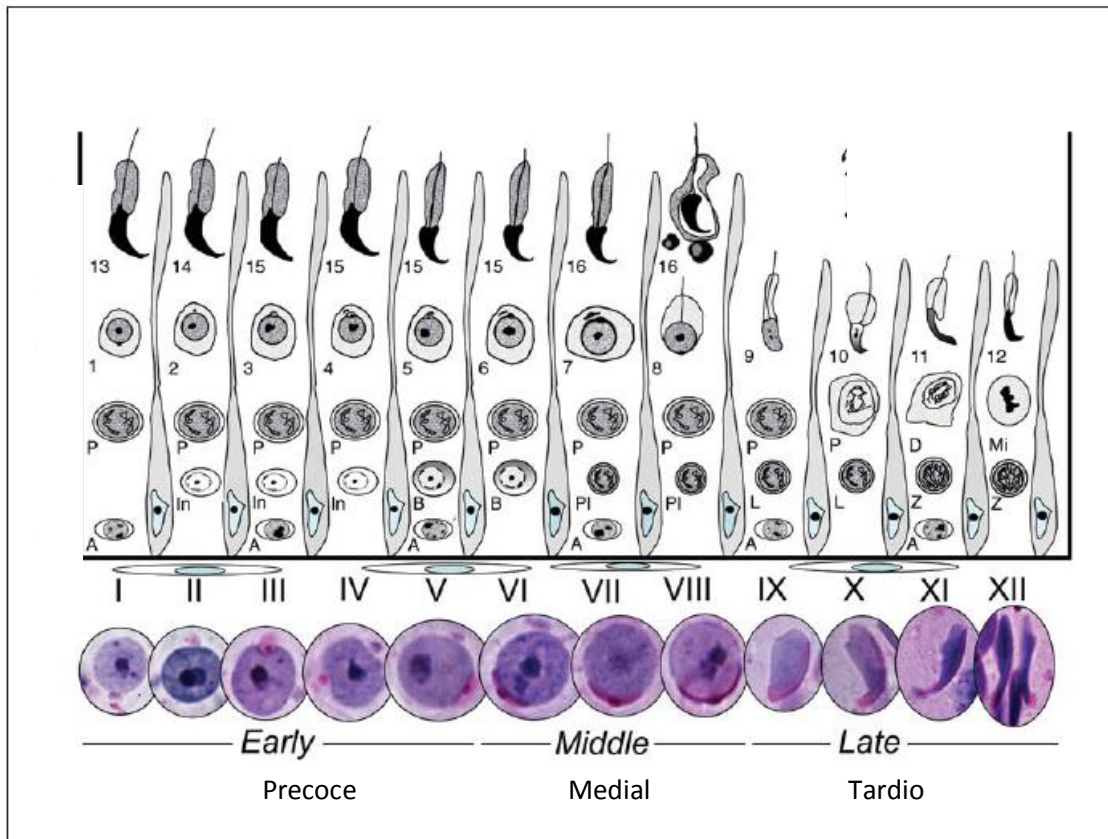
Por outro lado as espermatogônias do tipo  $A_{\text{clara}}$  ( $A_p, A_1-A_4$ ) (CLERMONT, 1972) ou  $A_s$  (especial) (HUCKINS, 1971; OAKBERG, 1971; DE ROOIJ e LOK, 1987;

SHUTTLESWORTH *et al*, 2000), têm uma coloração nuclear menos densa e apresentam um contínuo processo proliferativo durante cada ciclo espermatogênico. Clermont e seus colaboradores as chamaram de células-tronco renováveis ou auto-renováveis (EHMCKE E SCHLATT, 2006). Estas células germinativas formam, inicialmente, pares conhecidos como espermatogônias  $A_{\text{pareadas}}$  ( $A_p$ ), que ligadas por conexões intercelulares estruturam as espermatogônias  $A_{\text{alinhadas}}$  destinadas a se diferenciarem (FIG 1.7) (DE ROOIJ E RUSSELL, 2000).



**FIGURA 1.7:** Esquema gráfico demonstrando a cinética da amplificação de células germinativas em roedores e primatas (adaptado de EHMCKE E SCHLATT, 2006).

Em roedores, as células troco espermatogoniais são uma população pequena que raramente divide-se, estando organizadas como células únicas. Em roedores, as espermatogônias são divididas em 4 subtipos de espermatogônias do tipo A (A<sub>1</sub>-A<sub>4</sub>) e uma espermatogônia intermediária tipo B (MEISTRICH E VAN BEEK, 1993; CLERMONT, 1972). Nestes animais as espermatogônias entram no ciclo do epitélio seminífero como espermatogônias A1(A<sub>clara</sub>) ocorrendo um progresso espermatogênico extremamente sincrônico em 12 etapas (sendo 11 mitoses e 1 meiose) altamente amplificadas gerando em torno de 8000 espermátides, a partir de um par de espermatogônias A<sub>pareadas</sub> (EHMCKE E SCHLATT, 2006). As diferenças na espermatogênese, entre roedores e primatas, residem no grau de amplificação da proliferação na direção das espermátides (FIG 1.8). Em estudos com macacos *rhesus* (SIMORANGKIR *et al*, 2005) , uma célula progenitora (A<sub>clara</sub>) , através de 5 passos mitóticos e a meiose, podem gerar 128 espermátides , enquanto em humanos, através de 2 passos mitóticos e a meiose, derivam 16 espermátides (ROOSEN-RUNGE e BARLOW, 1953, SCHULZE, 1979).



**FIGU**

**RA 1.8:** Estágios de desenvolvimento do epitélio seminífero de roedores (I-XII). Camadas mostram desenho das associações celulares com as células de Sertoli em cada estágio. Fotografias dos núcleos das espermatídias precoces, mediais e tardias coradas com hematoxilina e reação ácida de Schiff (HESS E DE FRANÇA, 2007).

### 1.2.1. CONTROLE HORMONAL DA ESPERMATOGÊNESE

No epitélio seminífero, a associação entre células de Sertoli e células germinativas é definida para cada uma das fases de desenvolvimento estando sob controle hormonal através de mecanismos endócrinos clássicos, coordenados pelo eixo hipotálamo-hipófise testículo (descrito adiante), bem como por mecanismos intrínsecos mediados por hormônios, fatores de crescimento, citocinas (autacóides), moléculas sinalizadoras intracelulares e por neurotransmissores (DE KRETZER E KERR, 1994; SHARPE, 1994). Em ambos os mecanismos, a célula de Sertoli desempenha um papel central (GRISWOLD, 1998). Foi

descrito em capítulo anterior, que a célula de Sertoli, durante a puberdade, isola o ambiente tubular, concentrando o transporte intercelular de vários fatores para as células germinativas (DYM E FAWCETT, 1970). Esta organização tecidual proporciona um ambiente controlado favorável ao desenvolvimento da série espermatogênica, que é mediado primariamente pela secreção de LH, FSH e testosterona de maneira diferente, nos diferentes estágios de desenvolvimento. Este controle hormonal envolve comunicação intercelular, intracelular e com o ambiente intra e extratubular, bem como sob o controle neuroendócrino hipotalâmico-hipofisiário.

Já foram descritas mais de 50 moléculas, muitas ainda não estudadas na sua plenitude. Muitas destas substâncias, ainda, têm efeitos pleiotrópicos, gerando ações que influenciam de maneira significativa o contexto gonadal (GNESSI *et al*, 1997). Vários estudos experimentais revelaram que a célula de Sertoli produz e secreta diversas proteínas, bem como estão descritos muitos mecanismos pelos quais estas ações ocorrem (GRISWOLD,1998; GNESSI,1997, LOSS *et al*, 2007).

As glicoproteínas secretadas pelas células de Sertoli podem ser classificadas baseadas em suas características bioquímicas, como proteínas transportadoras (ex: transferrina e ceruloplasmina), proteases e inibidores de proteases, glicoproteínas formadoras da membrana basal e glicoproteínas regulatórias (GRISWOLD, 1998). Estas glicoproteínas atuam como fatores de crescimento ou fatores parácrinos como substância inibidora Mulleriana (AMH), ligante *c kit* e inibina, além de secretar peptídeos bioativos como pró-dinorfinas, nutrientes ou metabólitos intermediários.

## 1.3. CÉLULAS DE SERTOLI

### 1.3.1. MORFOLOGIA

Células de Sertoli são células somáticas do testículo e foram originariamente descritas por Enrico Sertoli, em 1865 (SERTOLI, 1865), ele observou que estas células possivelmente tinham uma relação funcional com as células germinativas por serem “células ramificadas” (*branched cells*) relatando da sua observação:

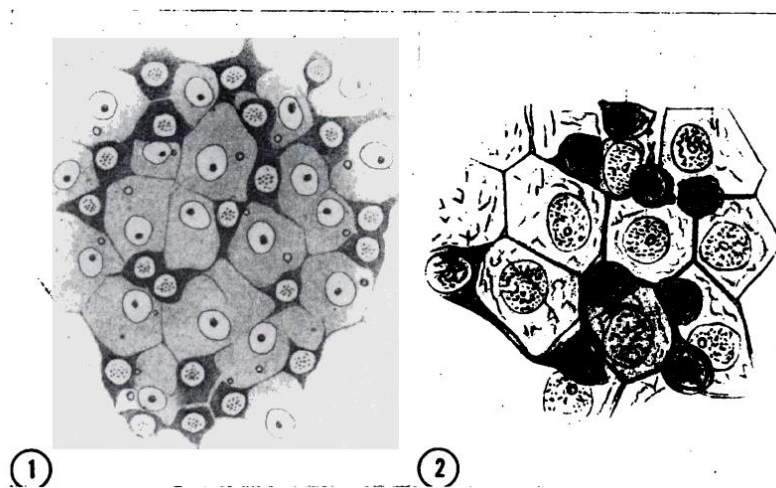
*“..Eu não acredito que as células ramificadas sejam destinadas à produção dos espermatozóides entretanto não é possível negar categoricamente, mas eu penso que a função das células ramificadas está ligada a formação dos espermatozóides.”*

*Enrico Sertoli, 1865*

*Traduzido por B.P.Setchell (1993)*

Estas células estendem-se da base do epitélio seminífero ao seu ápice e interagem diretamente com as células germinativas, sendo fundamentais para o suporte da espermatogênese e para a migração destas células (MRUK E CHENG, 2004), como foi descrito anteriormente. Desde que Enrico Sertoli descreveu estas células, no século 19, seu estudo é dificultado devido às constantes mudanças em sua relação tridimensional com as células germinativas, durante os diversos estágios do ciclo epitelial, bem como devido aos diferentes modelos experimentais (MRUK E CHENG, 2004). São células com uma estrutura

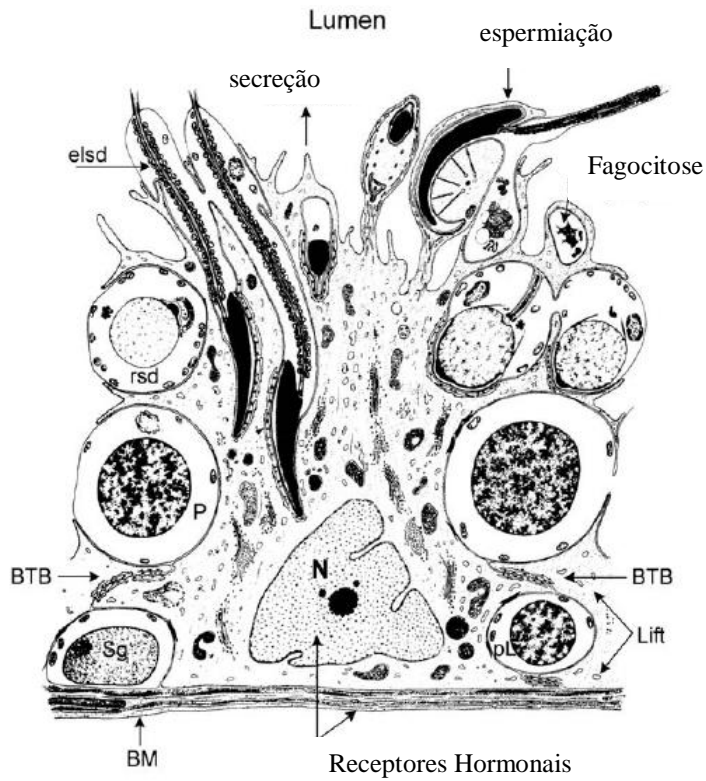
colunar e ocupam aproximadamente 17 a19% do epitélio seminífero de ratos adultos (WONG E RUSSELL, 1983, RUSSELL *et al*, 1990).



**FIGURA 1.9:** Fotografias de desenhos esquemáticos de Sertoli , 1877 (A) e Von Ebner, 1888. As células escuras são as espermatogônias e aparecem interconectadas por pontes intercelulares com as células mais claras que são as células de Sertoli. (adaptado de DYM E FAWCETT, 1971).

As células de Sertoli podem ser classificadas, segundo sua morfologia em duas categorias, Tipo A e Tipo B (MRUK E CHENG, 2004). Nas células do Tipo A, espermátides maduras estão alojadas em cristas citoplasmáticas próximo ao lúmen, prontas para a liberação, enquanto nas células do tipo B estas cristas são poucos visíveis ou mesmo ausentes. No transcorrer dos estágios do ciclo espermatogênico, a célula de Sertoli pode modificar-se passando de uma forma para outra, adaptando-se as mudanças celulares que ocorrem durante o desenvolvimento e movimento das células germinativas. Desta forma, modificações drásticas ocorrem nos estágios II, VII, VIII, IX-XI e XIII-XIV (MRUK E CHENG, 2004).





**FIGURA 1.10:** Associação entre célula de Sertoli e células germinativas. (BTB) barreira hematotesticular; (BM) membrana basal; (Sg) espermatogônia; (PL)espermatócitos em pré-leptóteno; (P) espermatócitos em paquíteno; (rsd) espermátides arredondadas; (elsd) espermátides alongadas; (N) núcleo da célula de Sertoli (adaptado de CLERMONT, 1993).

### 1.3.2. DESENVOLVIMENTO PUBERAL

Durante os primeiros estágios da organogênese testicular, as células de Sertoli são as primeiras a se diferenciarem na gônada primordial. As células de Sertoli associam-se às células germinativas formando o túbulo seminífero. Em ratos, esta ação ocorre entre 13,5 e 14,5 dias pós-concepção. Após a formação do tecido testicular, o número de células de Sertoli aumenta rapidamente. Alguns estudos indicam que, em ratos, bem como em outros roedores, a replicação das células de Sertoli pode estar confinada ao período perinatal, cessando após a primeira meiose das espermatogônias, o que ocorre nos primeiros estágios da puberdade (ORTH, 1982). Entretanto outros autores demonstraram que a população de células de Sertoli *in vivo* aumenta durante o período perinatal (antes e após o nascimento). Em ratos, o fim do período neonatal coincide com o período puberal (SHARPE *et al*, 2003). Estas células se proliferam após o nascimento, mas cessam sua divisão em torno dos 15 dias em ratos (SCHLATT *et al*, 1999). Em humanos, o número de células de Sertoli é maior no período pós-natal que no fetal, mas permanece estável do nascimento até aproximadamente 10 anos de idade (CORTES *et al*, 1987; FABBRI *et al*, 1995; SRIVASTAVA *et al*, 1995; BREYER *et al*, 1996).

Desta forma são propostos dois padrões temporais para a proliferação das células de Sertoli, localizando a mitose destas células dentro do período pré puberal (infância e adolescência) ou alternativamente, restrita à infância (BREYER *et al*, 1996). Entretanto ambos os padrões descritos para primatas diferem do desenvolvimento seminífero de ratos, onde a divisão das células de Sertoli completa-se antes da puberdade. A puberdade em ratos machos inicia-se entre 25 e 30 dias de idade (GNESSI *et al*, 1997) e a proliferação das células de Sertoli completa-se entre 14-21 dias de idade (BERRY *et al*, 1992), sendo que este

aumento está associado a uma elevação na concentração de gonadotrofinas onde o FSH (hormônio folículo estimulante) tem papel fundamental (PÉREZ-SÁNCHEZ E WASSERMANN, 1981; IRUSTA E WASSERMANN, 1974; SRIVASTAVA *et al*, 1995).

## 1.4. CONTROLE HORMONAL DA CÉLULA DE SERTOLI

### 1.4.1. CONTROLE NEUROENDÓCRINO

A função testicular pode ser simplificada e dividida em duas principais atividades: a produção de testosterona pelas células de Leydig (esteroidogênese) e a produção de espermatozoides pelos túbulos seminíferos (espermatogênese). Estas funções são reguladas fundamentalmente por dois hormônios, LH (hormônio luteinizante) e FSH (hormônio folículo estimulante), sendo estas gonadotrofinas produzidas pela hipófise e secretadas na corrente sanguínea, agindo, respectivamente, nas células de Leydig e nas células de Sertoli.

O controle da síntese e da secreção das gonadotrofinas é feito pelo Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH ou LHRH), regulando a função reprodutiva. GnRH é um decapeptídeo que pode ser encontrado com diferentes formas moleculares, sendo que, duas isoformas deste hormônio foram encontradas em mamíferos, GnRH I e GnRH II. Dois distintos genes codificam estes hormônios, e suas expressões em cérebros de primatas e em outros animais é distinta. Sabe-se que GnRH I está vinculado ao controle da secreção dos hormônios gonadotróficos e à modulação da função gonadal, e GnRH II parece estar relacionado ao comportamento sexual. Entretanto este último peptídeo tem seu gene silenciado em humanos (COUNIS *et al*, 2005, MILLAR, 2005).

GnRH I age nos gonadotrofos através de um mecanismo associado à proteína  $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ , a qual ativa  $PLC\beta$  (fosfolipase  $C\beta$ ), resultando na formação de DAG (diacilglicerol) e  $IP_3$  (Inositol-3-fosfato), ocorrendo desta forma, mobilização de

Ca<sup>2+</sup> intracelular e abertura de CCDV (canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L), causando influxo de Ca<sup>2+</sup> através destes canais (STOJILKOVIC *et al*, 1994).

GnRH também pode induzir a via MAPK (proteína cinase associada à mitógenos) através de PKC (proteína cinase associada à Ca<sup>2+</sup>), estimulando a expressão dos genes que codificam as subunidades da gonadotrofinas (SUNDARESAN *et al*, 1996; CECCATTELLI *et al*, 1993; COUNIS *et al*, 2005).

#### 1.4.1.1. Controle Pulsátil

Muitos dos sistemas endócrinos são controlados por ritmos, que podem ser intrínsecos ou ainda influenciados pelo ambiente (BERGENDAHL *et al*, 1996). A liberação episódica ou pulsátil de GnRH I parece ser uma adaptação funcional e genética, regulada por mecanismos intracelulares de dessensibilização na célula receptora. A liberação pulsátil de GnRH I ocorre em consequência de uma descarga sincronizada em neurônios dispersos contendo GnRH I através de uma sinalização neuronal geradora ou oscilatória (VELDHUIS *et al*, 1990) a qual é referida como pulso de GnRH I. O padrão de pulsatilidade varia de acordo com as variações ocorridas durante a vida reprodutiva, sendo regulada através de retroalimentação de sinais provenientes das gônadas (YEN *et al*, 1972; SANTEN E BARDIN, 1973; BACKSTROM *et al*, 1982; REAME *et al*, 1984; CROWLEY *et al*, 1985; HALE *et al*, 1988; WU *et al*, 1990; MARSHALL *et al*, 1993)

A regulação fisiológica do eixo reprodutivo geralmente ocorre através da modulação da frequência e da amplitude do pulso de GnRH I secretado pelo hipotálamo. Esta regulação é importante, pois estimula a liberação pulsátil dos hormônios gonadotrópicos, evitando desta forma a dessensibilização dos receptores de LH e FSH em suas células alvo. Entretanto esta pulsatilidade regula situações fisiológicas e sinaliza variações fisiológicas no eixo reprodutivo como na puberdade, em transições sazonais no status reprodutivo e após gonadectomia. O

GnRH I também medeia respostas inibitórias na secreção das gonadotrofinas, como em situações de exercícios prolongados e de restrição alimentar (LEVINE *et al*, 2003).

O controle da liberação destes hormônios é feito pelo hipotálamo, por células localizadas na área anterior e medial do hipotálamo e na área pré-óptica, em primatas, sendo também encontradas na porção basal média e no núcleo arqueado. As terminações nervosas secretoras, que promovem a secreção pulsátil de GnRH I (ou LHRH) (hormônio liberador de gonadotrofinas ou hormônio liberador de hormônio luteinizante), projetam-se para a vasculatura portal, atingindo a circulação porta-hipotalâmica-hipofisiária na porção lateral da eminência média, entrando em contato com os gonadotrofos na hipófise, que são as células produtoras e secretoras de LH e FSH (OJEDA *et al*, 2006).

A frequência e a amplitude dos pulsos de GnRH I são importantes na secreção diferencial de LH e FSH. A secreção pulsátil de LH e de FSH é mantida com um pulso de GnRH I por hora. Elevando o número de pulsos de GnRH I por hora, inicia-se um aumento nos pulsos de LH e conseqüentemente, eleva-se a concentração sanguínea de LH (REICHLIN, 1992). Em contraste, quando a frequência de pulsos de GnRH diminui a uma vez a cada 3 horas, a secreção de FSH é preferencialmente estimulada (REICHLIN, 1992).

O mais simples modelo, que explica como é gerada a pulsatilidade nos neurônios hipotalâmicos produtores de GnRH I, traz a idéia de células marcapasso ocorrendo em um ou mais neurônios que controlam o ritmo de secreção envolvendo os demais neurônio através de compartilhamento da atividade elétrica

Entretanto não estão descritas evidências eletrofisiológicas ou microanatômicas suficientes sobre os mecanismos de geração desta atividade ou de sincronização neste sistema (FERRIS *et al*, 2006).

Juntamente à estimulação hipotalâmica, as secreções de LH e FSH também são reguladas através de retroalimentação por esteróides, como testosterona e estradiol, e

peptídeos gonadais, como a inibina e a ativina, estes últimos, secretados pela célula de Sertoli sob ação do FSH. Ainda está descrito que a folistatina tem um papel importante, secretada pelas células hipofisiárias, ela modula a ligação da ativina aos seus receptores neste local (PHILLIPS e DE KRETZER, 1998).

Tanto a testosterona, quanto a inibina exercem um controle sobre a hipófise e no hipotálamo, formando uma alça de retroalimentação negativa, enquanto que a ativina, tem um efeito de retroalimentação positiva sobre a secreção de FSH. Desta forma, estabelece-se um complexo sistema de comunicação neuroendócrino o qual regula, em machos, o comportamento sexual e a produção de espermatozóides. Mudanças durante as fases de desenvolvimento também são originadas por modificações no controle pulsátil da liberação de GnRH I. Na fase puberal aumenta a liberação diurna na secreção das gonadotrofinas em humanos e ratos (OJEDA *et al*, 2006).

Entretanto, as gônadas estão sujeitas a regulações independentes do eixo hipotálamo-hipófise-testículos desempenhadas por de GnRH I e pelas gonadotrofinas; através da ação de inúmeras outras substâncias como neurohormônios e neuroesteróides como Hormônio liberador de hormônio de crescimento (GHRH), Hormônio liberador de corticotrofina (CRH), Ocitocina, Vasopressina (AVP), Hormônio liberador de tireotrofina (TRH), Somatostatina, Opióides, substância P, neuropeptídeo Y; fatores de crescimento entre os quais, fator de crescimento como insulina tipo I e II (IGF I, IGF II), proteína ligadora de fator de crescimento (IGFBP), fator de crescimento tumoral (TGF $\beta$ , TGF $\alpha$ ), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento neuronal (NGF), hormônio liberador de gastrina (GRP); citocinas como interleucinas (IL), fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ), peptídeos vasoativos, endotelinas, angiotensina II, peptídeo natriurético do tipo C (CNP) (GNESSI *et al*, 1997, EVANS, 2002).

Além de neurotransmissores, produzidos localmente, como as catecolaminas. (MAYERHOFER *et al*, 1999).

#### 1.4.1.2. *Síntese de Hormônios Gonadotróficos*

A síntese das subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ LH e  $\beta$ FSH ocorrem nos gonadotrofos hipofisiários, podendo ser produzidos nas mesmas células, ou seja, sendo estas capazes de produzir um ou ambos os hormônios. Após a clivagem do precursor, ocorre a N-glicosilação co-translacionalmente, no retículo endoplasmático, onde ficam armazenados como heterodímeros imaturos. A complementação funcional do FSH ocorre durante a migração para o complexo de Golgi, resultando em uma progressiva maturação da glicosilação e conformação dentro dos grânulos secretórios (TOUGARD *et al*, 1994; COUNIS *et al*, 2005). Esta síntese, seguida de glicosilações pós-translacionais ou traducionais gera diferentes isoformas, com objetivos funcionais diferenciados, as quais serão descritos adiante.

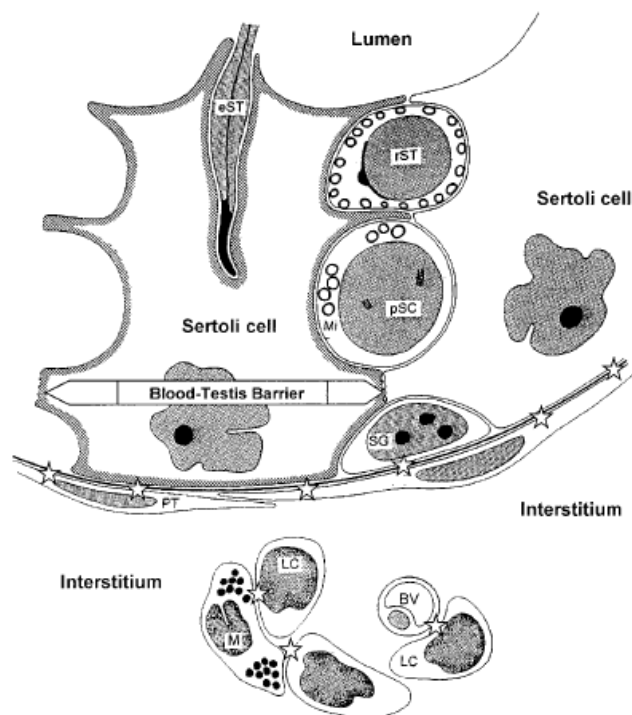


## 1.4.2. CONTROLE PARÁCRINO

### 1.4.2.1. *Regulação Funcional*

No transcorrer do desenvolvimento, ocorre a formação da barreira hematotesticular (puberdade), através da produção de junções ocludentes, junções comunicantes (tipo *gap*) e junções de ancoramento, constituindo um espaço intraluminal protegido imunologicamente (CHENG E MRUK, 2002).

Esta divisão estrutura dois compartimentos funcionais que se comunicam através de uma sinalização parácrina. Entretanto as substâncias não se difundem livremente, a posição estratégica da célula de Sertoli (basal a apical no túbulo) proporciona a coordenação desta sinalização entre ambos os compartimentos (TARULLI *et al*, 2008). A organização bi-compartimental determina a divisão das funções gonadais, sendo assim, os túbulos seminíferos caracterizam-se pela espermatogênese e as células do interstício ou Células de Leydig, pela esteroidogênese. Esta estruturação é conservada evolutivamente, indicando que a combinação gametas–andrógenos-gonadotrofinas oferecem vantagens evolucionárias, sendo esta comunicação parácrina determinante neste processo (EHMCKE E SCHLATT, 2006).



**FIGURA 1.11:** Microambiente testicular, evidenciando o epitélio seminífero com Células de Sertoli e células germinativas, a barreira hematotesticular e células intersticiais de Leydig, no interstício:(LC) células de Leydig; (M) macrófagos; (BV) vasos sanguíneos; no compartimento adluminal: (pSC) espermatócitos primários; (rST) espermátides arredondadas ; (eST) espermátides alongadas; (Mi) mitocôndrias. (adaptado de SCHLATT, 1997).

Adicionalmente a estas evidências, é importante lembrar que este desenvolvimento peripuberal resulta da associação entre as ações do FSH e do LH, este último atuando nas células de Leydig estimulando a produção de testosterona após a puberdade. (GNESSI *et al*, 1997). A testosterona age de forma parácrina nas células de Sertoli, sendo descrito que também exerce ação, na célula de Sertoli, no período pré puberal em primatas (PLANT E MARSHALL, 2001) e em testículos de ratos *ex vivo* (VONLEDEBUR *et al*, 2002; WASSERMANN E LOSS, 2004; LOSS *et al*, 2004). Tanto células de Sertoli de primatas, quanto de ratos expressam receptores para o andrógeno nesta fase (WALCZAK-JEDRZEJOWSKA *et al*, 2007). Adicionalmente, estudos indicam que a testosterona age na hipófise estimulando secreção de FSH em roedores tratados com antagonistas de GnRH (PITTELOUD *et al*, 2008).

Além da ação de FSH e da testosterona (secretada pela ação do LH nas células de Leydig), outras moléculas tem como alvo a célula de Sertoli, sendo importantes para a modulação da espermatogênese como triiodotironina (T3), retinol e 1,25-dihidroxi vitamina D3 (SILVA *et al*, 2002).

A proliferação das células de Sertoli durante o desenvolvimento é crítica para o estabelecimento da população final das células, o número de células de Sertoli garante uma espermatogênese quantitativamente normal (JOHNSTON *et al*, 2004). O número de espermátides em adultos depende, diretamente, do número de células de Sertoli produzidas no período de desenvolvimento (ANGELOPOULOU *et al*, 2008). Alguns autores demonstraram que a ausência de FSH reduz o número de células de Sertoli, mas não torna o macho infértil (TAPANAINEN *et al*, 1997; TROISPOUX, 1998; THEMEN e HUHTANIEMI, 2000; GROMOLL E SIMONI, 2005).

Na literatura, são citados diversos estudos, em uma variedade de espécies e modelos experimentais diferentes, gerando muitas vezes resultados conflitantes. Em ratos em idade puberal, o avanço do desenvolvimento das células espermatogênicas ocorre em resposta à sinalização produzida por FSH, sendo que o número de receptores para FSH aumenta nesta fase, entretanto, paradoxalmente, há uma redução na concentração de AMPc (STEINBERGER *et al*, 1978). Similares variações têm sido descritas em diferentes estágios do ciclo espermatogênico, onde o FSH estimula a produção de AMPc nos estágios XIII e V e diminui nos estágios VII e XI, autores descrevem como um mecanismo oscilatório (PARVINEN *et al*, 1980; HUHTANIEMI *et al*, 1989; MALI *et al*, 1989). Outros dados descritos indicam que FSH liga-se ao seu receptor, com diferente afinidade, dependendo do estágio do ciclo, com alta afinidade em (XIII-XIV-I), afinidade intermediária (II- V e VIII-XII) e com baixa afinidade nos estágios (VI e VII).

Estudos utilizando homogenatos testiculares de ratos (CATT *et al*, 1972; WARREN *et al*, 1984) e membranas de túbulos seminíferos purificadas (ABOU-ISSA E REICHERT, 1976) demonstraram a presença de dois tipos de associação do FSH, com alta capacidade e baixa afinidade e outra com baixa capacidade e alta afinidade, entretanto somente um tipo de receptor com alta afinidade foi encontrado. Em estudos de Kangasniemi e colaboradores (1990) foi observado que o estímulo à produção de AMPc ocorre nas fases II-V, em condições basais e são estimuladas por FSH (PARVINEN *et al*, 1980; MALI *et al*, 1989; PURVIS *et al*, 1984). Por outro lado, estão descritos mecanismos inibitórios envolvendo proteína Gi, que quando estimulada reduz a formação de AMPc nos estágios VII e VIII do ciclo espermatogênico (HUHTANIEMI *et al*, 1989).

Dados recentes indicam que a ação do FSH na célula de Sertoli é pleiotrópica e difere de acordo com a fase de desenvolvimento. Sua ação, desta forma, pode ser protagonizada por agentes diferentes do que o AMPc, ou derivado da sinalização diferente da evocada pela adenilil ciclase, o que iria de encontro com o descrito para mecanismos acoplados à proteína G em outros tecidos e para outras moléculas sinalizadoras similares como substâncias adrenérgicas e Angiotensina II (XIAO, 2001, VECCHIONE, 2005; LOSS *et al*, 2007).

Outras ações também são descritas para a interação do FSH com a célula de Sertoli, entre elas o estímulo à síntese protéica e glicoprotéica, captação de cálcio e outros parâmetros metabólicos, como a conversão de glicose em lactato (CARREAU *et al*, 1994; ORTH, 1982; SASAKI *et al*, 1982; JONES E BERNDTSON, 1986), nem todas estas ações estão associadas à variação de AMPc nas fases pré e pós puberal (LOSS *et al*, 2007; ULLOA-AGUIRRE *et al*, 2007).

#### 1.4.2.2. *Relação do FSH com outros Hormônios*

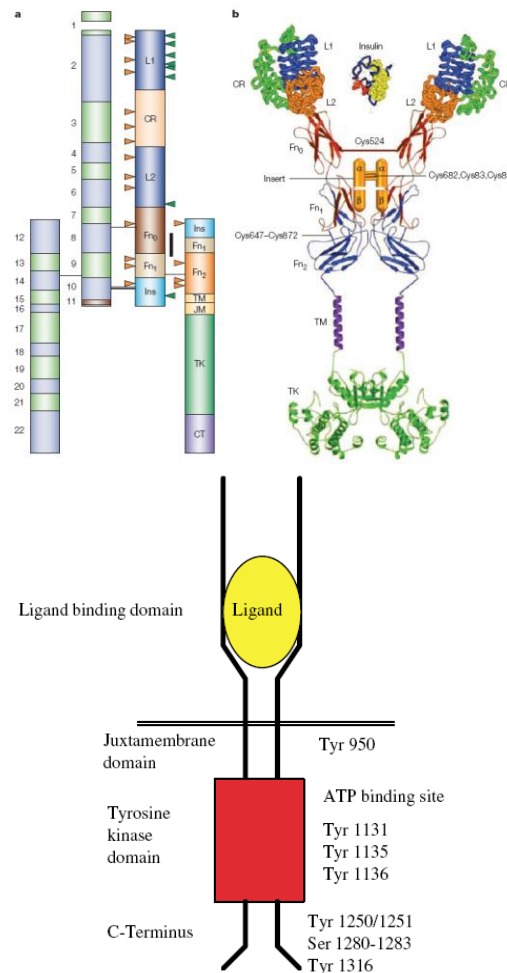
Os mecanismos que regulam os processos de proliferação, diferenciação e apoptose, nos túbulos seminíferos, são estreitamente regulados pelos hormônios hipofisários, principalmente por LH e FSH. Estes mecanismos são sinergicamente modulados por uma rede de fatores originados das diferentes células somáticas presentes nos testículos e nas células germinativas. Muitos destes fatores são produzidos localmente (através de sinalizações parácrinas ou autócrinas) ou atuam neste tecido através de mecanismos endócrinos.

##### **1.4.2.2.1. Sistema Autócrino de IGF-I**

As células de Sertoli têm um sistema autócrino completo do IGF-I (GNESSI *et al*, 1997; OONK e GROOTEGOED, 1988; RITZEN, 1983; TRES *et al*, 1986; BORLAND *et al*, 1984; PERRARD-SAPORI, 1987). Estudos imunohistoquímicos demonstraram a presença de IGF-I (secretado pelas células de Sertoli) e do receptor de IGF-I (IGF-IR) em células de Sertoli. Também foi observado que estas células produzem proteínas ligadoras de IGF (IGFBP), principalmente IGFBP3, o que inibe os efeitos do IGF-I exógeno ao sistema tubular (CAILLEAU *et al*, RAPPAPORT E SMITH, 1990; SMITH, 1990). FSH estimula a produção de IGF-I nestas células, enquanto que este hormônio hipofisário inibe a secreção de IGFBP3 em ratos imaturos (CHATELAIN *et al*, 1991; CLOSSET *et al*, 1989). Estes dados corroboram a hipótese de que as células de Sertoli têm os componentes necessários para a síntese e transdução do sinal de IGF-I, bem como para modulação de sua ação. Além disto, este sistema pode ser modulado pelo FSH.

IGF-I é uma citocina presente em numerosos tipos celulares, podendo agir de forma parácrina e autócrina em muitos tecidos (COHICK E CLEMMONS, 1993; HUMBEL, 1990).

Este fator de crescimento também está presente no tecido gonadal masculino, há evidências da presença do receptor para IGF-I (tipo tirosina cinase) (FIG 1.12) nas células somáticas e germinativas (FROMENT *et al*, 2007). A síntese de IGF-I pode ocorrer em células de Leydig, células de Sertoli, células mióides peritubulares e células germinativas (TRES *et al*, 1986; VANNELLI *et al*, 1988; CAILLEAU *et al*, 1990, FROMENT, 2007).



**FIGURA 1.12:** Representação do Receptor Tirosina Cinase (adaptado de DE MEYTS E WHITTAKER, 2002 E SURMACZ, 2003).

Muitos pesquisadores têm reportado que o padrão de imunoreatividade para o IGF-I, em testículos de ratos, difere de acordo com a fase de desenvolvimento. Hansson e colaboradores. (1989) demonstraram que todas as células testiculares apresentam imunoreatividade ao IGF-I logo após o nascimento, embora esta reatividade decresça

rapidamente no primeiro mês após o nascimento em células de Sertoli e células de Leydig. Eles também relataram que as células espermatogênicas exibem um rápido aumento na imunoreatividade a IGF-I na puberdade (~21 dias) e em ratos adultos esta marcação fica restrita aos espermatozoides.

A ação de IGF-I ocorre através da interação com seu receptor IGF-IR (Fig 1.11), um receptor tipo tirosina cinase. Esta associação leva a autofosforilação do receptor nas tirosinas 1131, 1135 e 1136, tirosinas justamebranares e serinas no terminal carboxila. O mecanismo recruta intermediários específicos, entre os quais Shc (Src-homology/Collagen), proteínas 14-3-3 e IRS-I (substrato receptor de insulina tipo I) (BASERGA, 1997, POLLAK *et al*, 2004). Entre os mecanismos estimulados pelo intermediário IRS-I estão a via PI3K (com subunidade regulatória p110 tipo  $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\delta$ )/AKT(PKB) e a via MAPK (ERK1/2) (RIEDEMANN E MACAULAY, 2006).

Muitos estudos têm demonstrado que FSH e IGF-I colaboram na regulação da atividade da célula de Sertoli *in vitro* (KHAN *et al*, 2002). Os efeitos de FSH e IGF-I, quando somados, em células de Sertoli em cultura parecem ser aditivos, embora também haja relatos de que em algumas situações estes dois hormônios possam ter efeitos antagônicos (RAPPAPORT E SMITH, 1996). Khan e colaboradores (2002) reportaram que a estimulação das fosforilações de Akt (PKB) e de ERK 1/2 por IGF-I e FSH foi aumentada quando ambos os hormônios estavam presentes concomitantemente. Também demonstraram, de maneira coerente, que a deleção do gene que codifica IGF-IR, reduz a fosforilação de Akt (PKB) na presença de IGF-I, entretanto quando a ativação da via PI3K/Akt(PKB) ocorre por ação do FSH, esta não é alterada pela deleção do IGF-IR (KHAN *et al*, 2002).

Meroni e colaboradores (2004) relataram que a interação da ação entre FSH e IGF-I em células de Sertoli é dependente da idade, sendo mais evidenciada em ratos com 8 dias de idade do que em ratos com 20 dias de idade. Também demonstraram que tanto FSH quanto

IGF-I são capazes de estimular a via PI3K/Akt(PKB), entretanto isto ocorre através de vias diferentes, pois IGF-I atua via receptor tirosina cinase e FSH associa-se a um GPCR, o qual estimula a via através de PI3K (p110 $\gamma$ ). Sugerindo que, possivelmente, as vias estimuladas pelos dois hormônios ocorram através de isoformas diferentes de PI3K e Akt(PKB), nos parâmetros estudados pelos autores (estimulação da produção de transferrina e lactato).

Foi demonstrado por Oonk e Grootegoed (1988) que o FSH não se liga ao receptor de IGF-1 de forma específica, sendo a ação do IGF-I mais evidente até os 21 dias de idade do animal, reduzindo seu efeito posteriormente. Estes autores observaram que a insulina atua com mais intensidade após esta idade, assumindo as ações sobre os receptores tirosina cinase. Também foi demonstrado que, em células de Sertoli de animais modificadas geneticamente, sem o receptor para IGF-I (*null* IGF-I receptor), continuam respondendo com atividade proliferativa ao FSH (CREPIEUX *et al*, 2001).

Todas as evidências experimentais permitem propor que há interação entre os dois hormônios através da sinergia de suas ações, muitas vezes somando seus efeitos globais na célula de Sertoli, entretanto o FSH que estimula a síntese e liberação de IGF-I, através de um mecanismo autócrino bem descrito, também atua de forma independente estimulando vias independentes da ação de IGF-I e ainda independente da via estimulada através da via proteína Gas/Adenilil Ciclase/AMPC/PKA.

#### **1.4.2.2.2. Sistema EGF**

Outro fator de crescimento relacionado à célula de Sertoli é o EGF (fator de crescimento epidermal). Estudos demonstram que esta citocina estimula a proliferação e a



diferenciação em vários tipos celulares (ABÉ *et al*, 2008). Em camundongos adultos, a redução na concentração de EGF sérico, está vinculada à redução da fertilidade, sem que ocorra diminuição de testosterona ou FSH. Também foi correlacionada à redução de 50% de espermatozóides no epidídimo, sendo revertida através da administração de EGF diária (TSUTSUMI *et al*, 1986). Em testículos de mamíferos, o EGF promove proliferação espermatogonial e modulação da esteroidogênese, espermiogênese e proliferação de células de Leydig e células de Sertoli, através de mecanismos autócrinos e parácrinos (YAN *et al*, 1998; UGURALP *et al*, 2004).

EGF e outros membros da família de peptídeos como EGF, agem através de receptores EGF (ErbB) que são receptores tirosina cinase. Eles classificam-se em quatro tipos: ErbB1, também chamado de EGFR (ULLRICH *et al*, 1984), ErbB2(COUSSENS *et al*, 1985), ErbB3 (KRAUS *et al*, 1989) e ErbB4 (PLOWMAN *et al*, 1993). Foi reportado que estes receptores estão envolvidos na regulação da proliferação e da diferenciação em muitos tecidos (PRIGENT E LEMOINE, 1992). Os receptores de EGF são conhecidos por formar homodímeros ou heterodímeros, com sinalização através da via MAPK (proteína cinase ativando mitose) e/ou PI3K (HATAKEYAMA *et al*, 2003; SCHULZE *et al*, 2005). Em testículos de mamíferos, todos os membros dos receptores de EGF foram identificados em diferentes tipos celulares, como células germinativas e células de Sertoli, e em todos os estágios de desenvolvimento, sugerindo uma ação potencial do EGF durante a espermatogênese e desenvolvimento testicular pós-natal (HANEJI *et al*, 1991).

Relatos na literatura demonstram que o EGF pode modular as ações do FSH sobre o desenvolvimento e a proliferação nas células de Sertoli, potencializando a ação sobre a produção de lactato e transferrina em células de Sertoli imaturas, e diminuindo o efeito deste hormônio hipofisiário sobre a atividade da enzima aromatase (MALLEA *et al*, 1986; MALLEA *et al*, 1987). Funcionalmente, a redução da atividade da aromatase indica o término

do período proliferativo e início da diferenciação funcional das células de Sertoli (SHARPE *et al.*, 2003). A sinalização intracelular envolvendo as ações inibitórias do EGF nas células de Sertoli permanece desconhecida.

McDonald e colaboradores (2006) demonstraram que as ações estimulatórias do FSH sobre a expressão de RNA mensageiro da aromatase e sobre a produção de estradiol são dependentes da sinalização elicitada pela via PI3K/AKT1(PKB) em células de Sertoli. Os mesmos autores relatam que foi observado que o EGF inibe a expressão da aromatase e de seu RNA mensageiro estimulado por FSH, e que este efeito inibitório depende da ativação da via ERK-MAPK.

## 1.5. HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH)

O Hormônio Folículo Estimulante (FSH) desempenha um papel central no controle das funções da célula de Sertoli. FSH determina o número das células de Sertoli que estarão presentes em machos adultos através de sua ação sobre o controle da proliferação destas células no estágio pré-puberal (SHARPE *et al*, 2003; ORTH, 1982; TROPOUIX *et al*, 1998). Em ratos, a mitose das células de Sertoli decresce em torno de 15 dias de idade do animal, tendo o FSH o controle na diferenciação destas células, o que é fundamental para o desenvolvimento qualitativo e quantitativo de uma espermatogênese normal no adulto (GRISWOLD, 2003).

### 1.5.1. ESTRUTURA

FSH é um membro da família dos hormônios glicoprotéicos, a qual inclui LH, Gonadotrofina Coriônica e TSH. Estes hormônios glicoprotéicos são heterodímeros ricos em pontes de dissulfetos com associações não covalentes entre as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ . Os diferentes tipos de hormônios desta família têm a subunidade ou cadeia  $\alpha$  comum, diferindo na estrutura da subunidade  $\beta$  (FAN E HENDRICKSON, 2005).

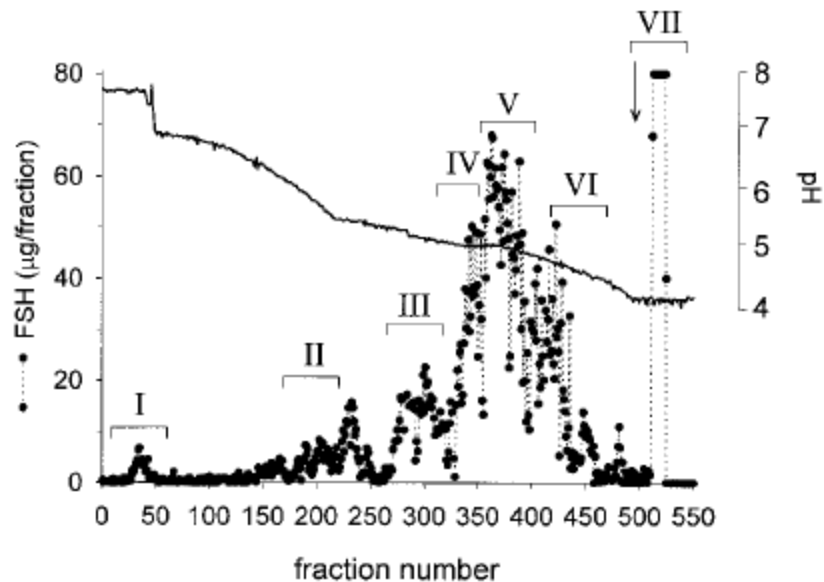
Cada seqüência primária das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  apresenta duas glicosilações. Estas glicosilações ocorrem através de modificações pós-translacionais (traducionais), onde os oligossacarídeos adicionados determinam propriedades funcionais ao hormônio, como a capacidade e a afinidade na ligação ao seu receptor, levando a ativação das vias de sinalização intracelulares (AREY *et al*, 1997).

O amplo espectro de glicosilação, principalmente nos terminais de sialização e sulfatação são características de cada hormônio glicoprotéico (TIMOSSO *et al*, 2000; DAHL E STONE, 1992). Estas variações constituem a base química para a formação de isoformas com uma variabilidade de cargas elétricas diferenciais presentes na configuração estrutural de hormônios glicoprotéicos (TIMOSSO *et al*, 2000; ZAMBRANO *et al*, 1999).

A glicosilação de hormônios glicoprotéicos é importante para a persistência destes na circulação (tempo de meia-vida), seu *clearance* e bioatividade (MOORE *et al*, 2000; OLIVARES *et al*, 2004; BARRIOS-DE-TOMASI *et al*, 2002). Cada subunidade contém dois locais de glicosilação relativos a resíduos de Asparagina, Asn52 e Asn78 na subunidade  $\alpha$ , e na subunidade  $\beta$  nos resíduos Asn7 e Asn24, dados reportados em estudos em hormônios de humanos. Tem sido relatado que a glicosilação da subunidade  $\beta$  influencia na formação das pontes de dissulfeto e na taxa de secreção hormonal (BOUSFIELD *et al*, 2004; BOUSFIELD *et al*, 2007). A deglicosilação na Asn52 da subunidade  $\alpha$  parece modificar a transdução do sinal, apesar de não influenciar na ligação do hormônio ao seu receptor, evidenciando que a sinalização e a capacidade de ligação podem ser moduladas por dois locais de glicosilação diferenciados (FOX *et al*, 2001).

A heterogeneidade das isoformas de FSH deve-se à variação em seus carboidratos associados, perto de 95% das isoformas são variantes ácidas em relação às formas negativamente carregadas, ocasionando diferentes pontos isoelétricos (PI) (THEMMEN E HUHTANIEMI, 2000). Esta variação de cargas deve-se a quantidade de resíduos de ácido siálico presentes, isoformas com um conteúdo menor de ácido siálico tem um valor PI maior. Dados da literatura indicam que uma estrutura mais complexa quanto à glicosilação (mais ácida) tem uma menor bioatividade que as com um ponto isoelétrico maior (mais básica), as quais parecem ter uma bioatividade maior (MOYLE *et al*, 1995; JIANG *et al*, 1995). Ou seja, o estímulo sobre a gônada não depende somente da quantidade de gonadotrofina circulante,

mas talvez mais importantes sejam seus aspectos qualitativos, como a composição relativa das isoformas presentes em diversas situações fisiológicas (THEMMEN E HUHTANIEMI, 2000).



**FIGURA 1.13:** Padrão de distribuição de FSH extraídos de hipófise anterior, através da técnica de *chromatofocusing*. Frações indicadas por numerais romanos (I-VII) relacionam-se às isoformas de FSH concentradas associadas a faixas de pH (retirado de TIMOSSI *et al*, 2000).

Sabe-se que FSH é liberado da hipófise como um *pool* heterogêneo em relação ao tipo de isoformas circulantes (ULLOA-AGUIRRE *et al*, 1999; ULLOA-AGUIRRE *et al*, 1995; STANTON *et al*, 1996). Sabe-se, também, que há uma correlação entre a quantidade de isoformas intrahipofisiárias e circulantes, e que ocorre uma interrelação entre uma isoforma particular com o estado funcional da gônada (ULLOA-AGUIRRE *et al*, 1999; Chappel *et al*, 1983; ULLOA-AGUIRRE *et al*, 1988; ULLOA-AGUIRRE *et al*, 2001; ULLOA-AGUIRRE *et al*, 2003). Em estudos com ovários, em modelos animais e humanos, a produção e secreção de formas menos ácidas de isoformas de FSH aumenta durante a fase pré-ovulatória do ciclo ovariano, bem como no desenvolvimento puberal, indicando a relação entre secreção de

diferentes isoformas e a regulação funcional do tecido gonadal (ULLOA-AGUIRRE E TIMOSSI, 2000; BAENZIGER E GREEN, 1988; CERPA-POLJAK *et al*, 1993; FLACK *et al*, 1994; CHAPPEL E ULLOA-AGUIRRE, 1983).

Ainda por responder, está a questão de como um tipo específico de FSH glicosilado interage com um mesmo receptor e deflagra uma variedade de respostas intracelulares diversas. Na tentativa de elucidação desta questão surgiram algumas hipóteses como o FSH interagindo através de várias formas com seu receptor, provocando sinalizações diferenciadas, ou ainda, diferentes glicofomas do hormônio ligando-se a diferentes receptores acoplados a diferentes vias de sinalização (BABU *et al*, 2000; BABU *et al*, 2001, ULLOA-AGUIRRE *et al*, 2003). Entretanto, ainda não existem evidências suficientes para atestar ou eliminar as alternativas citadas.

Sabendo-se que existem diversas formas de glicosilação do FSH, e também que pode ocorrer uma variabilidade na interação com seu receptor por este motivo, justifica-se pensar que o efeito trófico do FSH consiste em uma mistura de sinais com diferentes afinidades e atividades intrínsecas pleiotrópicas.

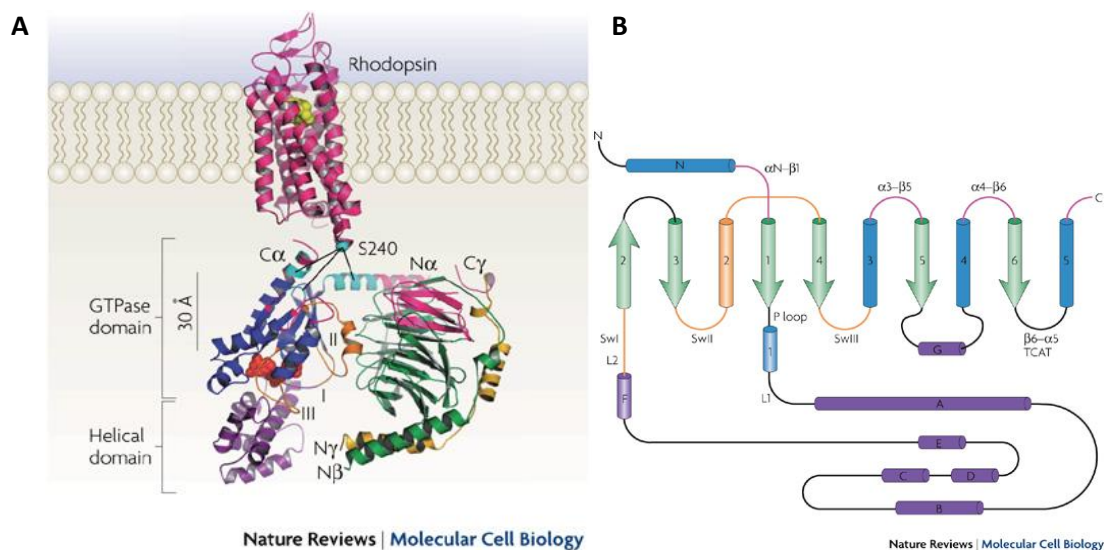
## 1.6. RECEPTORES ACOPLADOS À PROTEÍNA G (GPCR)

### 1.6.1. ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS GPCR

A superfamília dos receptores acoplados à proteína G heterotriméricas (GPCR) é uma das maiores famílias representadas no genoma de mamíferos, estima-se que 1-5% do genoma humano corresponda a este grupo de receptores (MCINTIRE, 2009; PEREZ E KARNIK, 2005; LANDER *et al*, 2001; VENTER *et al*, 2001).

Os GPCR têm uma estrutura central homóloga, com sete  $\alpha$  hélices transmembranas, contendo entre 20-28 aminoácidos hidrofóbicos. Estes domínios transmembrana (TM) estão orientados perpendicularmente à membrana (PALCZEWSKI *et al*, 2000). Entretanto, os GPCR diferem quanto a suas estruturas extra e intracelulares (SHARPE, 1994; SCHLATT *et al*, 1997). O terminal amino (NH<sub>2</sub>) extracelular contém muitos locais de glicosilação, responsáveis pelo reconhecimento do ligante (APPLEBURY E HARGRAVE, 1986), enquanto que no terminal carboxila (COOH) intracelular estão presentes vários locais de fosforilação vinculados à regulação da dessensibilização e internalização do GPCR. Este terminal intracelular está associado às subunidades da proteína G (PIKETTY *et al*, 2006; ULLOA-AGUIRRE *et al*, 2007b). Três alças intracelulares e três alças extracelulares estão ligadas ao domínio transmembrana. A maioria dos GPCR tem conservadas pontes de dissulfeto entre cisteínas da segunda e da terceira alças extracelulares vinculadas à regulação da afinidade dos locais de ligação do receptor (KARNIK E KHORANA, 1990).

Quando o receptor associa-se ao seu ligante, no terminal extracelular, segue-se a ativação do mesmo através de modificações conformacionais, as quais levam à ligação das alças intracelulares e do terminal COOH com a proteína G heterotrimérica, ativando-a. Apesar da diversidade entre os GPCR, este primeiro estágio parece ser uniforme entre as diversas classes do receptor. A ativação do receptor catalisa a troca de GDP por GTP na subunidade  $G\alpha$ , quando ocorre a dissociação da proteína G do receptor. Esta troca diminui a afinidade das subunidades  $G\alpha$ -GTP e  $G\beta\gamma$ , que separadas, amplificam a resposta intracelular, cada qual ativando ou inibindo várias moléculas efetoras como enzimas, canais iônicos entre outros (FORD *et al.*, 1993; PEREZ E KARNIK, 2005; JOHNSTON E SIDEROVSKI, 2007)



**FIGURA 1.14:** Estrutura de GPCR Heterotrimerica (A) Estrutura cristalográfica; (B) Estrutura esquemática (OLDHAM E HAMM, 2008).

Os conhecimentos estruturais sobre os GPCR são baseados, em grande parte em pesquisas de alta resolução do estado inativo da Rodopsina, por ser uma estrutura obtida em grandes quantidades de retina bovina, e por esta estrutura não perder a funcionalidade em condições que outros GPCR desnaturam (KOBILKA, 2007).



Estudos baseados neste sistema mostram evidências que indicam como sendo os segmentos TM3 e TM6 os responsáveis pela ativação da proteína G após a ligação do agonista ao terminal NH<sub>2</sub> (FARAHBAKHSI *et al*, 1995; FARRENS *et al*, 1996; PEREZ E KARNIK, 2005), entretanto ainda não há dados conclusivos de como esta ação se processa.

#### 1.6.2. CLASSIFICAÇÃO DOS GPCR

Há vários sistemas de classificação para os GPCR, relacionados ao tipo de associação dos ligantes, às relações fisiológicas e/ou bioquímicas desencadeadas por estes receptores e ainda em relação à similaridade da sequência de aminoácidos do GPCR. Uma das classificações mais utilizadas é o sistema Kolakowski que classifica as subfamílias de GPCR de A-F, onde as subclasses são designadas por numerais romanos, este sistema classifica tanto GPCR presentes em vertebrados, quanto em invertebrados (ATTWOOD E FINDLAY 1994; KOLAKOWSKI, 1994). Outra classificação baseia-se na similaridade de suas sequências básicas de aminoácidos, dividindo estes receptores em três principais categorias: 1) contendo receptores para rodopsina e  $\beta$ -adrenérgicos; 2) família de receptores tipo secretina e 3) receptores como o para glutamato (WESS, 1998).

Em 2003, Fredriksson e colaboradores propuseram uma classificação baseada na ancestralidade comum dos GPCR, seus resultados demonstraram 5 famílias principais, Glutamato (15 membros), Rodopsina (701 membros), Adesão (24 membros), Frizzled/taste (24 membros) e Secretina (15 membros), designado como sistema GRAFS (FREDRIKSSON *et al*, 2003).

Maudsley e colaboradores (2005) discutem que, por muitos anos, a transdução de sinal a partir dos GPCR foi conceitualizada através do modelo de movimento Browniano, no qual a sinalização protéica é termodinamicamente aleatória, no plano da membrana plasmática, sendo responsável pelo fluxo de informação do receptor para o efetor. Entretanto, processos randômicos têm um custo energético maior e organismos complexos necessitam de ações rápidas e específicas. As evidências experimentais demonstram que GPCR, proteínas G e seus efetores (enzimas, canais iônicos, entre outros) não são distribuídos aleatoriamente, estando co-localizados e organizados em microdomínios lipídicos, para que ocorra uma ação rápida e específica (NEUBIG, 1994; OSTROM *et al.*, 2000). O terminal COOH do GPCR está associado através de âncoras palmitoiladas a estes domínios (MAUDSLEY *et al.*, 2005).

Estes microdomínios compõem regiões na membrana ricas em colesterol, gangliosídeos ou esfingolipídeos, e são referidos como caveolas ou balsas lipídicas (*lipid rafts*) (GALBIATI *et al.*, 2001). Além das balsas lipídicas, outras regiões da membrana também estão agregadas a estas proteínas sinalizadoras, como complexos de adesão focal e regiões revestidas por clatrin (KOBILKA, 2007), sendo locais de integração e especificidade da sinalização de GPCR.

Outro mecanismo associado à capacidade dos GPCR no desencadeamento de respostas tão diferenciadas e amplificadas, está emergindo através dos estudos de diversos grupos de pesquisa. O mecanismo pleiotrópico evocado pode ser resultado de conversas cruzadas (*cross-talk*) entre diferentes pares de GPCR, o que modula a resposta de agonistas ligados a receptores diferentes. Este mecanismo resulta em uma ativação ou inibição cruzada e é chamado de oligomerização ou heterodimerização, podendo ocorrer através de co-expressão ou co-localização (BRIDDON *et al.*, 2008; FRANCO *et al.*, 2008; RIOS *et al.*, 2001; GOMES *et al.*, 2001; JORDAN E DEVI, 1999). Os GPCR podem formar homodímeros, heterodímeros ou multímeros (ANGERS *et al.*, 2002; ANGERS *et al.*, 2001). Esta organização estrutural pode

afetar, além da sinalização intracelular, a dessensibilização do receptor e o tráfego do mesmo até a membrana e a partir dela (ULLOA-AGUIRRE *et al*, 2007).

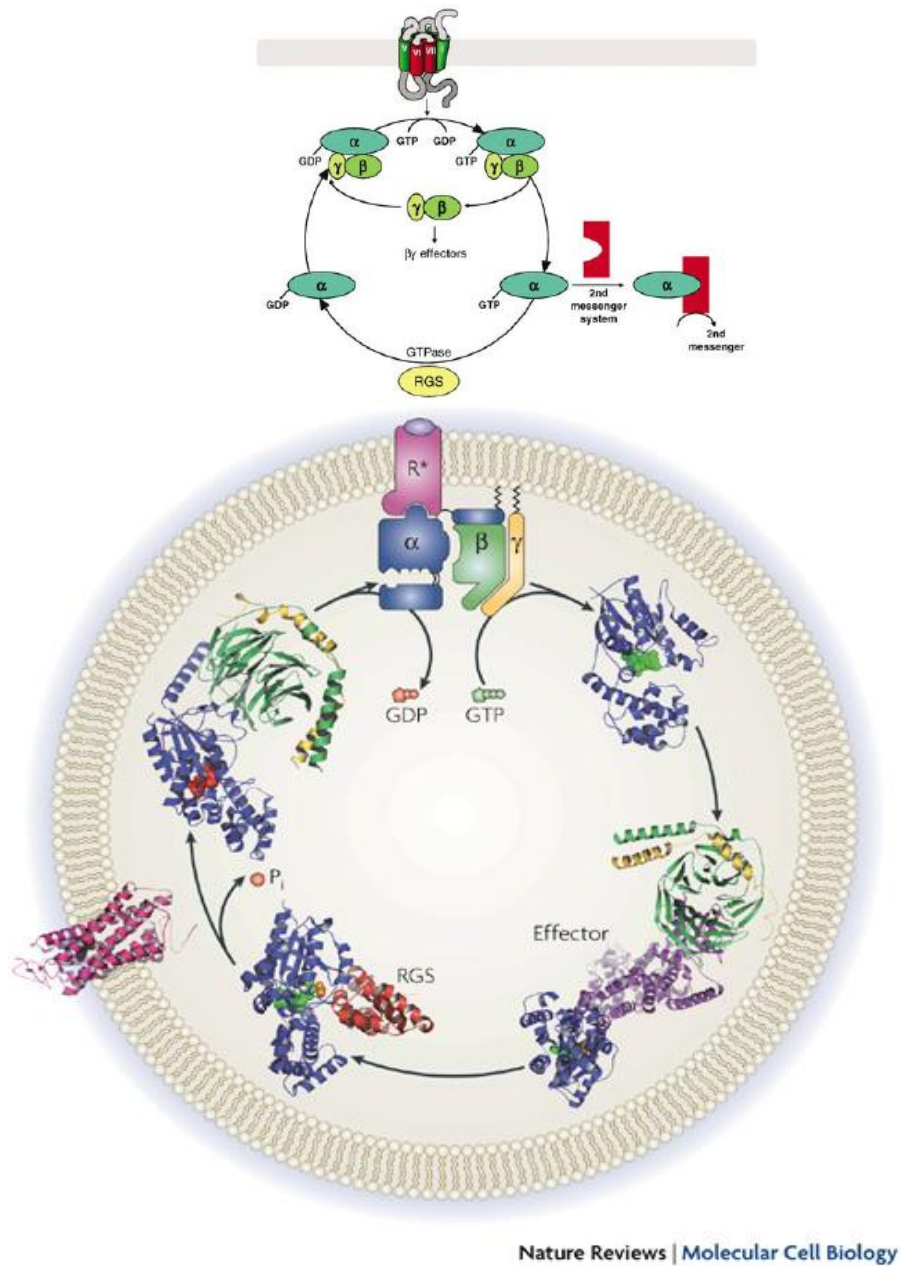
#### 1.6.1.1. Subunidades da Proteína G Heterotrimérica

As proteínas G heterotriméricas são compostas por três subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . Estas subunidades podem produzir diversas combinações, evocando as mais variadas transduções de sinal. Até o momento foram identificadas 5 subfamílias da subunidade  $G\alpha$  sendo relatadas 23 isoformas diferentes desta subunidade [ $G_s$  ( $G_{\alpha s}$  e  $G_{\alpha olf}$ );  $G_i$  ( $G_{\alpha i}$ ,  $G_{\alpha 0}$ ,  $G_{\alpha i}$  e  $G_{\alpha z}$ );  $G_q$  ( $G_{\alpha q}$ ,  $G_{\alpha 11}$ ,  $G_{\alpha 14}$ ,  $G_{\alpha 15/16}$ );  $G_{12}$  ( $G_{\alpha 12}$  e  $G_{\alpha 13}$ );  $G_v$  ( $G_{\alpha v1}$ -  $G_{\alpha v4}$ )]. Foram identificadas 7 isoformas da subunidade  $\beta$  e 12 isoformas a subunidade  $\gamma$  foram identificadas até o momento (MCINTIRE, 2009; OKA, 2009).

Ambas as subunidades  $G\alpha$  e  $G\beta\gamma$  contribuem para ações sinérgicas ou antagônicas, cada qual iniciando eventos através dos mesmos efetores ou mesmo através de sinalizadores não relacionados, o que resulta em uma sinalização dual intracelular, há na literatura inúmeros exemplos em relação a esta simultânea ativação (EXTON, 1996, JONES *et al*, 2004; GU *et al*, 2002; WETTSCHURECK E OFFERMANN, 2005; LAUGWITZ *et al*, 1996; WELLNER-KIENITZ *et al*, 2001; ZHU *et al*, 1994; GUDERMANN *et al*, 1992; XIAO *et al*, 1995). Em alguns casos têm sido relatados simultânea ativação de três ou quatro subunidades não relacionadas ( $G_s$ ,  $G_i/o$ ,  $G_q/11$ , and  $G_{12}$ ) (LAUGWITZ *et al*, 1996).

##### 1.6.1.1.1. Subunidade $G\alpha$

A subunidade  $G\alpha$  apresenta uma atividade GTPase intrínseca após a dissociação produzida pela troca de GDP por GTP nesta subunidade. No mecanismo subsequente ocorre a hidrólise do terminal fosfato de GTP restaurando GDP, o que reassocia o complexo  $G\alpha\beta\gamma$  completando o Ciclo da proteína G heterotrimérica, desativando-a (FIG1.13). Além destes componentes também já foram identificadas proteínas acessórias que aumentam ou diminuem a cinética de associação/dissociação das subunidades, servindo como “andaime” para os processos de sinalização adjacentes, estas proteínas pertencem à família das proteínas reguladoras de sinalização de proteína G (RGS), e serão discutidas adiante no texto (SIDEROVSKI E WILLARD, 2005).



**FIGURA 1.15:** Ciclo dissociação/associação das subunidades de proteína G ligadas à GTP/GDP (MILLIGAN, 2006)

Todas as classes de subunidades  $G\alpha$  têm alvos celulares descritos. O primeiro efector reconhecido foi a adenilil ciclase (AC), descrita por Sutherland e Rall (1957, 1958). Após 20 anos, foi identificado seu efector intracelular, uma proteína ligada à GTP que estimulava AC, a subunidade  $G\alpha$ , descrita por Ross e Gilman (1977). Em seguida foram identificadas subunidades  $G\alpha$  com ações opostas ( $G_{\alpha s}$  e  $G_{\alpha i}$ ) estimulando e inibindo a AC respectivamente

(SMITH E LIMBIRD, 1982; HSIA *et al*, 1984; HILDEBRANDT E BIRNBAUMER, 1983, HILDEBRANDT *et al*, 1983).

Além desta sinalização, também já foi descrito o envolvimento desta subunidade em transdução sensorial (Gagust and Gαolf), mediando fototransdução na visão (Gαt) (ARSHAVSKY *et al*, 2002). Relatos também descrevem a ação da Subunidade Gαq(Gαq, Gα11, Gα14and Gα16) ativando isoenzimas da fosfolipase C (PLC), sendo um dos mecanismos associados à hidrólise de fosfatidil inositol-4,5-bifosfato (PIP2) gerando IP3 e DAG (RHEE, 2001). As subunidades Gα12/13 podem regular proteínas G monoméricas RhoA (BOODEN *et al*, 2002; VOGT *et al*, 2003; MCCUDDEN *et al*, 2005).

As ações regulatórias das subunidades Gα diferem em virtude de efetores intracelulares diferentes e da diversidade de isoformas, tanto da subunidade Gα quanto da enzima Adenilil ciclase. Até o momento já foram descritas 9 isoformas de adenilil ciclase, que acoplam a mecanismos diferenciados e estão relacionadas a tecidos específicos (SUNAHARA E TAUSSIG, 2002). Membros da família de proteínas Gas estimulam a atividade da adenilil ciclase, enquanto os membros da família Gai são conhecidos por inibir a atividade da mesma enzima, entretanto o mecanismo de inibição ocorre de forma não competitiva direta, o que foi determinado estudando a ação do agonista da enzima adenilil ciclase, forskolina, este ativa a enzima sendo esta ação inibida por Gai (KOZASA E GILMAN, 1995; TAUSSIG *et al*, 1994; TAUSSIG *et al*, 1993). Estudos sobre a estrutura da adenilil ciclase, utilizando técnicas de mutagênese, mostraram que o local de ligação da subunidade Gas está no lado oposto ao local de ligação da subunidade Gai (DESSAUER *et al*, 1998). Para entender a regulação desta enzima é importante conhecer sua estrutura secundária e terciária, são descritos dois sítios catalíticos C1 e C2, forskolina e análogos ATP (ATP, APMC e inibidores Gas) ligam-se na interface entre os dois domínios, aumentando ou diminuindo a afinidade das mesmas. A subunidade Gas liga-se no domínio C1, e a subunidade Gai diminui a interação entre os dois

sítios catalíticos, o que reduz a funcionalidade da enzima adenilil ciclase (TANG E GILMAN, 1991). Também é relatado que algumas isoformas de AC também podem ser moduladas por outras moléculas como complexo  $\text{Ca}^{2+}$  Calmodulina, a subunidade  $\text{G}\beta\gamma$  (atuando de forma estimulatória ou inibitória), RGS, modificações pós-translacionais como fosforilações ou a presença de miristoilações (SUNAHARA E TAUSSIG, 2002).

#### 1.6.1.1.2. Subunidades $\text{G}\beta\gamma$

As subunidades  $\text{G}\beta\gamma$  foram identificadas como componentes da proteína G há aproximadamente 30 anos (KATADA *et al*, 1984). Logo após sua identificação, os pesquisadores sugeriram que a presença destas subunidades estaria associada à funcionalidade da subunidade  $\text{G}\alpha$  (BIRNBAUMER, 2007a; BIRNBAUMER, 2007b). Entretanto, apesar das controvérsias geradas, devido às diferenças entre interpretações, por diversos laboratórios, sabe-se que as subunidades  $\text{G}\beta\gamma$  são componentes sinalizadores em igualdade com a subunidade  $\text{G}\alpha$  (BIRNBAUMER, 2007; BIRNBAUMER, 2007b).

A dimerização entre as subunidades  $\beta$  e  $\gamma$  da proteína G heterotrimérica parece ser fundamental para a capacidade de efetivar sua ação (HIGGINS E CASEY, 1994). Em condições fisiológicas, o dímero  $\text{G}\beta\gamma$  não aparece dissociado, sendo a atividade desta subunidade derivada desta associação (MCINTIRE, 2009). A primeira evidência de que a subunidade  $\text{G}\beta\gamma$  teria um papel sinalizador foi descrita em 1987, quando esta subunidade foi purificada a partir de cérebro bovino e, utilizando a técnica eletrofisiológica de *patch clamp*, modulou a abertura de canal de potássio ( $\text{K}^+$ ) cardíaco retificador de influxo associado à proteína G (GIRK), canal este normalmente ativado através de um receptor muscarínico (associado à proteína  $\text{G}_i$ ) através de acetilcolina (LOGOTHETIS *et al*, 1987).

Vários estudos relatam um papel central para as subunidades  $G\beta\gamma$  em muitos compartimentos subcelulares, diretamente regulando processos fundamentais como a transcrição e trânsito de proteínas do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi (SMRCKA, 2008).

O dímero  $G\beta\gamma$ , dissociado de  $G\alpha$ , ativa muitos efetores (CLAPHAM E NEER, 1997; HUANG *et al*, 1999; RAY *et al*, 1995; JONES *et al*, 2004), incluindo os Canais GIRK citados anteriormente, atua sobre a condutância de canais de cálcio do tipo N,P/Q (KAMMERMEIER *et al*, 2000; DELMAS *et al*, 2000; LU *et al*, 2001), regulando cinases e proteínas G monoméricas. Ainda age regulando várias isoformas de adenilil ciclase, e ativando PLC  $\beta$  e PLC $\delta$  (GAO E GILMAN, 1991; TANG E GILMAN, 1991; TAUSSIG *et al*, 1994).

Também é relatada na literatura a ação do dímero  $G\beta\gamma$  ativando duas isoformas de PI3K. A PI3K  $\gamma$ , composta por uma subunidade regulatória (p101) e uma catalítica (p110 $\gamma$ ), onde a subunidade  $G\beta\gamma$  interage com p101, sem necessitar de co-ativador (STEPHENS *et al*, 1994; STOYANOV *et al*, 1995; TANG E DOWNES, 1997). E sobre a PI3K $\beta$  (subunidade p110 catalítica e subunidade p85 regulatória) onde o dímero  $G\beta\gamma$  interage com p85, entretanto em combinação com substrato de receptor tirosina cinase (TANG E DOWNES, 1997; OKADA *et al*, 1996; KUROSU *et al*, 1997).

É relatado, por sua vez, que as subunidades  $G\beta\gamma$  têm uma especificidade particular pela proteína  $G_i$ , pois muitas das ações deflagradas por estas subunidades são inibidas por Toxina Pertussis (PTX), um inibidor da ADP-ribosilação, necessária à conversão de GDP à GTP e conseqüente dissociação das subunidades  $G\alpha$  e  $G\beta\gamma$ . Como exemplo, a ativação de PLC é mediada por mecanismos sensíveis e insensíveis a PTX. A ativação de PLC insensível a PTX, é associada à ação via proteína  $G_q$  (INANOBE *et al*, 1995; KUNKEL E PERALTA, 1995; DOUPNIK *et al*, 1996), esta ativação, quando inibida por PTX, está relacionada à



proteína  $G_i$ , como a hidrólise de PIP2 dependente de GPCR sensível à PTX descrita na ação de testosterona em osteoblastos (LIEBERHERR E GROSSE, 1994). Embora outras ações desencadeadas pela subunidade  $G\beta\gamma$  estejam associadas a outras proteínas G (SMRCKA, 2008; MCCUDDEN *et al*, 2005; MCINTIRE, 2009).

A seletividade da interação com proteína  $G\alpha$  correlata ou com efetores subsequentes pode ser influenciada pela identidade de cada isoforma das subunidades  $\beta\gamma$ . A montagem do dímero  $\beta\gamma$  pode acontecer através de muitas combinações possíveis, lembrando que já foram identificadas 7 isoformas da subunidade  $\beta$  e 12 diferentes isoformas da subunidade  $\gamma$ , em genoma humano e de camundongos, até agora (MCINTIRE, 2009). Estas diferentes subunidades podem formar pares únicos, mas ainda é pouco entendido o significado funcional de combinações individuais de  $G\beta\gamma$  (para revisão SMRCKA, 2008).

#### 1.6.1.2. Moduladores da Atividade das Proteínas G Heterotriméricas

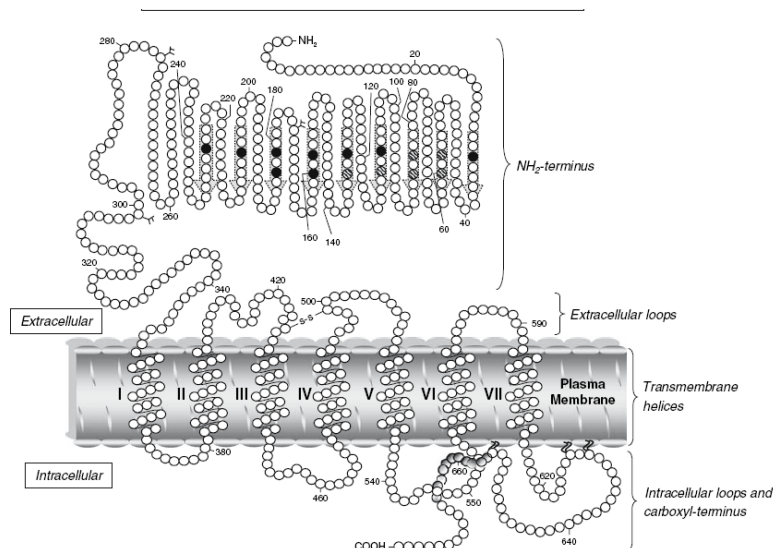
Quando foram aprofundados os estudos sobre este ciclo dinâmico, isolando-se e purificando-se as subunidades *in vitro*, os pesquisadores verificaram que a taxa em que ocorria esta hidrólise era menor do que quando mensurado o processo fisiológico (MCCUDDEN, 2005), levando a identificação de proteínas associadas que agiam acelerando o processo GTPase em muitas subunidades  $G\alpha$ , estas proteínas foram chamadas de GAP (aceleradoras de proteínas G) e pertencem a família de proteínas RGS (reguladoras da sinalização de proteína G), podendo atenuar a resposta ao agonista quando interagir com o receptor, foram descritas também GDI que são inibidoras da dissociação do nucleotídeo de  $G\alpha$  (BRANDT, 1985; HIGASHIJIMA, 1987; SIDEROVSKI E WILLARD, 2005) e ainda as GEF atuando positivamente facilitando a troca  $G\alpha$ -GDP para  $G\alpha$ -GTP e a liberação do dímero

$\beta\gamma$  - (fatores trocadores de nucleotídeo guanosina (BRANDT, 1985; HIGASHIJIMA, 1987; SIDEROVSKI E WILLARD, 2005).

Também modulando a funcionalidade das subunidades associadas ao GPCR está a característica das âncoras de lipídeo associadas a cada subunidade, como por exemplo, prenilações, geranylgeranilações, palmitoilações ou miristoilações, podendo modificar a efetividade ou a capacidade de interação com outras moléculas (HIGGINS E CASEY, 1996; CASEY, 1995). Além de uma série de proteínas capazes de fosforilar locais específicos dos GPCR, também regulando a sinalização através destas estruturas (MCINTIRE, 2009).

#### 1.6.2. RECEPTOR DE FSH (FSHR)

O receptor para FSH, como os receptores para os demais hormônios glicoprotéicos, pertence à superfamília de receptores acoplados à proteína G (GPCR), especificamente da família dos receptores de rodopsina (família A) (ULLOA-AGUIRRE *et al*, 1999). Estes receptores são constituídos por uma cadeia polipeptídica heptahélica. O domínio extracelular é um terminal amino (NH<sub>2</sub>), responsável pela ligação ao hormônio; e o domínio intracelular é um terminal Carboxílico (COOH) que faz o acoplamento com as subunidades da proteína G (ULLOA-AGUIRRE *et al*, 2007), como já descrito para outros GPCR.



**FIGURA 1.16:** Representação esquemática do FSHR (adaptado de ULLOA-AGUIRRE E TIMOSSO, 1998).

A ligação do FSH com seu receptor é rápida, específica e saturável, além de relatos demonstrando que esta ligação também é temperatura dependente. (OONK E GROOTEGOED, 1988, SIMONI *et al*, 2005). Em machos, os locais de ligação para o FSH são encontrados somente no epitélio seminífero, estando presentes em diferentes espécies animais (GAYTAN *et al*, 1994).

Após o isolamento deste receptor, foram verificados dois tipos de associação do FSH com seu receptor, uma com alta afinidade e baixa capacidade, e outra com baixa afinidade e alta capacidade (SIMONI *et al*, 1997). Entretanto ainda é necessária confirmação de vários dados, pois os mesmos parecem conflitantes.

A interação de FSH com FSHR depende, parcialmente, da presença de fosfolípidos, quando são utilizadas preparações de membranas (HUCKINS, 1971; SCHLATT *et al*, 1996; SINGH, 1995). Os GPCR são ancorados nas membranas plasmáticas através de acetilação de lípidos ou lipidação a proteínas, as quais estabilizam a conformação protéica e possivelmente, tenham função na transdução de sinal (ESCRIBÁ *et al*, 2007). Ainda é

relatado que a ligação hormônio-receptor é dependente da integridade das pontes de dissulfeto do FSH (ABOU-ISSA E REICHERT, 1976) e das glicosilações tanto do hormônio quanto do GPCR (ULLOA-AGUIRRE *et al*, 2007).

É característica destes receptores, sofrerem dessensibilização após uma contínua exposição ao FSH, sendo este efeito rápido, dose e tempo dependentes. Este fenômeno é conhecido como *down regulation* (AMSTERDAM *et al*, 2002).

Após a ligação com seu receptor, FSH estimula várias vias de sinalização intracelulares através da dissociação da subunidade  $\alpha$  das subunidades  $\beta\gamma$ , sendo que cada subunidade pode deflagrar vias independentes, através de isoformas de proteínas G diversas. Os mecanismos adjacentes já demonstrados pela literatura para este hormônio serão discutidos posteriormente.

## 1.7. MECANISMO DE AÇÃO DO FSH NA CÉLULA DE SERTOLI

Há uma complexa sinalização determinada pela ação do FSH nas células de Sertoli, após a ligação ao seu receptor. Os receptores para FSH são acoplados à proteína G (GPCR). Está descrito que a associação hormônio-receptor ativa a subunidade G $\alpha$ s elevando a concentração intracelular de AMPc, que ativa, por sua vez, PKA (HANSSON *et al*, 2000). Entretanto este receptor também tem a capacidade de ativar outras rotas de sinalização independentes.

Foi demonstrada a presença da subunidade G $\alpha$ i em células de Sertoli de ratos (MÔNACO E CONTI, 1987, HUHTANIEMI *et al*, 1989) e de hamsters (DAVENPORT E HEINDEL, 1987) isoladas, em cultura, bem como em túbulos seminíferos inteiros (HUHTANIEMI *et al*, 1989). Huhtaniemi e colaboradores (1989) descrevem que em diferentes estágios do ciclo seminífero, em ratos maduros sexualmente, ocorre a diminuição da síntese de AMPc através da ação do FSH (estágios VII-VIII) via G $\alpha$ i, o que não ocorre em outras fases. No mesmo estudo está destacado que a oscilação na síntese de AMPc não ocorre por ausência das subunidades G $\alpha$ s ou G $\alpha$ i, acopladas ao receptor FSHR, mas atua através de outras vias regulatórias não conhecidas na época (1989), entre os quais peptídeos gonadais e isoformas de FSH.

Também já foi publicado que FSH ativa a via MAPK/ERK através do receptor acoplado a Gs e Gi, ocorrendo ativação desta via em células de Sertoli em cultura de ratos com 5 à 11 dias de idade, mas não em células provenientes de ratos com 19 dias de idade (CREPIEUX *et al*, 2001). Aos 12 dias de idade, período no qual se inicia a formação da

barreira hematotesticular, os mesmos autores sugerem que este mecanismo ocorra pela associação da ação de FSH via AMPc e ERK , através de vias diferenciadas.

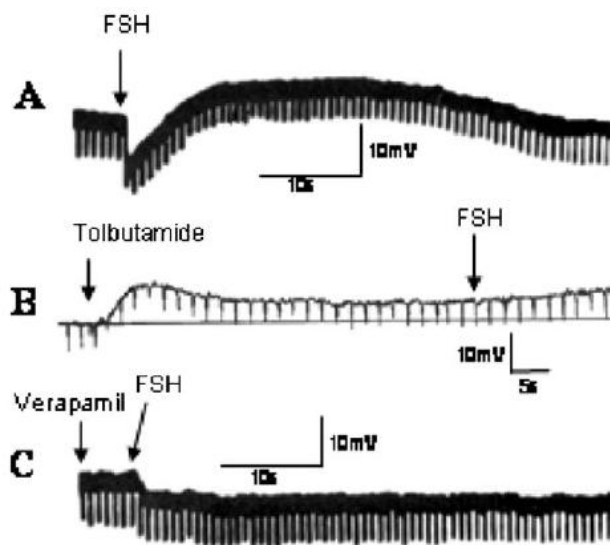
Outros eventos também são atribuídos a ação de FSH como o aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular (GRASSO E REICHERT, 1989, GORCZYNSKA E HANDELSMAN, 1991), a ativação de fosfolipase A2 (JANNINI *et al*, 1994) e a translocação nuclear do fator Kappa B (DELFINO E WALKER, 1998).

Alguns pesquisadores associaram a ação de FSH no FSHR com a via PI3K e Akt/PKB em células de Sertoli e células da granulosa (RICHARDS, 2001; GONZALEZ-ROBAYNA *et al*, 2000) de maneira dependente ou independente de PKA. Sendo descrito que esta via (FSH/PI3K/Akt(PKB) pode ser sinérgica ou não com a ação de IGF-I, em células com 8 e 20 dias, respectivamente (KHAN *et al*, 2002, MERONI *et al*, 2004). Para receptores de Angiotensina II em músculo liso (DO *et al*, 2009) e receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos em células HEK 293 (LUTTRELL *et al*, 1999) esta ação está relacionada à proteína Gi, através da subunidade G $\beta\gamma$ .

Muitos dos efeitos do FSH são rápidos, exemplificado pela captação de  $Ca^{2+}$  através de canais de  $Ca^{2+}$  dependentes de voltagem (CCDV) em células de Sertoli de ratos imaturos (WASSERMANN E LOSS, 1989). A ação eletrofisiológica do FSH na célula de Sertoli de ratos imaturos caracteriza-se por ser bifásica, apresentando uma rápida hiperpolarização (menos de 5 segundos) seguida de uma despolarização prolongada (mais de 6 minutos) (FIG 1.17A). A hiperpolarização foi bloqueada por tolbutamida (inibidor de canal  $K_{ATP}$ ) (FIG 1.17B). Esta hiperpolarização deve-se à ativação da adenilil ciclase, levando à conversão de ATP em AMPc, através da ligação à via *Gas*, acoplada ao receptor de FSH. Este efeito também foi descrito para receptores adrenérgicos, em musculatura lisa vascular, onde a redução de  $[ATP]_i$  causa uma diminuição de sua ação sobre a inibição dos canais de  $K_{ATP}$ ,

aumentando a probabilidade de abertura deste canal, o que causa um efluxo de  $K^+$ , e conseqüente hiperpolarização do potencial de membrana (NAKASHIMA E VANHOUTTE, 1995).

A despolarização observada pela ação do FSH na célula de Sertoli é anulada pela presença de verapamil, bloqueador de CCDV tipo L, sendo esta despolarização dependente da captação de  $Ca^{2+}$  através destes canais (FIG 1.17C). Este efeito estimulatório sobre a captação de  $Ca^{2+}$  também foi bloqueado na presença de EGTA extracelular, quelando cálcio deste meio. Para demonstrar que esta ação é independente da via ativada por AMPc, Forscolina (ativador da adenilil ciclase), 8-Br-AMPc ou dbAMPc não estimularam a captação de cálcio (SHARMA *et al*, 1994). Também foi relatado que em nas células de Sertoli, o transporte de aminoácidos através do sistema A para transporte de aminoácidos neutros dependente de  $Na^+$ , é dependente desta captação de  $Ca^{2+}$ , induzida por FSH (WASSERMANN E LOSS, 1989). Este efeito não foi reproduzido nem por dbAMPc ou toxina colérica, a qual ativa a subunidade *Gas* (IRUSTA E WASSERMANN, 1974, SPRITZER E WASSERMANN, 1985; WASSERMANN *et al*, 1992a).



**FIGURA 1.17:** Modificações eletrofisiológicas sobre o Potencial de Membrana das células de Sertoli de ratos imaturos (adaptada de LOSS *et al*, 2007).

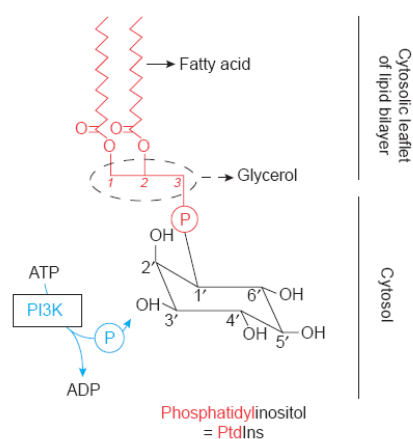
Todas estas ações demonstram uma plasticidade no processo de transdução de sinal do FSH, através da sua interação como seu receptor GPCR, sendo que além da estimulação já bem estabelecida sobre a ativação da adenilil ciclase via *G $\alpha$ s*, ocorrem outras sinalizações independentes em diferentes fases de desenvolvimento desta célula. A diversidade da sinalização deflagrada pelo FSH depende do número de receptores presentes na superfície da membrana, da concentração do hormônio no plasma e das isoformas de FSH secretadas (AREY *et al*, 1997).

Estudos de Arey e colaboradores (1997), em células da granulosa, demonstraram que diferentes isoformas de FSH podem ativar alternativas vias através da interação com GPCR. Estes diferentes padrões do FSH podem atuar aumentando ou diminuindo a concentração de AMPc intracelular. A habilidade do hormônio de se ligar ao receptor também apresentou diferenças, sendo que todas as isoformas testadas tiveram maior afinidade em baixa concentração, na ordem de  $10^{-10}$ . Os mesmos autores verificaram que as isoformas de FSH foram hábeis em interagir tanto com *G $\alpha$ s* como com *G $\alpha$ i*, onde estudaram somente a ação sobre a modulação do AMPc, utilizando toxina colérica e toxina pertussis. Este comportamento já foi relatado para receptores de catecolaminas e de adenosina (MUNSHI *et al*, 1991; KIMURA *et al*, 1995), entretanto nestes receptores, diferentes substâncias interagem de forma “promíscua” com receptores para outras moléculas. No caso do FSH, são as diferentes isoformas que ativam esta resposta multifacetada.



## 1.8. FOSFATIDIL INOSITOL-3- CINASE (PI3K)

Fosfatidilinositol-3-Cinases (PI3K) constituem uma família de enzimas que catalisam a fosforilação, na posição 3 do anel inositol, de um ou mais substratos fosfoinosítídeos (CANTLEY, 2002; HAWKINS *et al*, 2006) (FIG. 1.18). As PI3K são classificadas e divididas conforme sua homologia funcional e estrutural, estando presentes em diversas espécies. Em fungos há somente um gene descrito para PI3K, enquanto que em células de mamíferos, até o momento, já foram relatados oito diferentes genes para a enzima, com uma significativa homologia (ENGELMAN *et al*, 2006). Os produtos fosforilados por PI3K podem ser defosforilados por PTEN (Fosfatase e tensina homólogos deletados no cromossomo 10) (GU *et al*, 1998)



**FIGURA 1.18:** Fosforilação de fosfoinosítídeos por PI3K. (adaptado de VANHAESEBROECK E. ALESSI, 2000).

Há três classes de PI3K (Classes I, II e III), cuja classificação é baseada nas similaridades funcionais e estruturais destas enzimas, e ainda, relacionada com suas especificidades pelo substrato ou por suas vias de ativação (HAWKINS *et al*, 2006).

As PI3K classe I são heterodímeros constituídos por uma subunidade catalítica, com aproximadamente 110kDa, e por uma subunidade regulatória ou adaptadora, a qual pode pertencer a duas famílias distintas, o que determina ainda, uma subdivisão em PI3K classe IA e IB (HAWKINS *et al*, 2006).

As enzimas PI3K classe IA são dímeros, contendo subunidades catalíticas p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  ou p110 $\delta$  e apresentando como subunidades regulatórias p50-55/p85.

A classe IB é representada por dímeros contendo uma subunidade catalítica p110 $\gamma$  e uma subunidade regulatória que pode ser p101 ou p84 (HIRSCH *et al*, 2007). As enzimas desta classe, geralmente, fosforilam fosfatidilinositol-4,5- bifosfato (PIP2) gerando Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) (ENGELMAN *et al*, 2006).

As enzimas PI3K classe II são monômeros, com massa molecular elevada devido ao tamanho dos seus terminais NH<sub>2</sub> e COOH, entretanto, estas enzimas não possuem uma subunidade regulatória. A diferença entre as isoformas desta classe está na composição do terminal NH<sub>2</sub> (FALASCA E MAFFUCCI, 2007) e as mesmas estão envolvidas na produção tanto de PIP3 quanto de PI3P (ENGELMAN *et al*, 2006).

O representante da classe III de PI3K é conhecido como Vps34, primeiro descrito em *Saccharomyces cerevisiae*, mas também está presente em mamíferos. A Vps34 está associada à outra proteína, Vps15 que é sua subunidade regulatória. A enzima Vps34 produz fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P) a partir de Fosfatidilinositol (Pi) (ENGELMAN *et al*, 2006), e está relacionada com autofagia durante privação de nutrientes, regulando a síntese destes, nestas condições. Para tanto, ativa a via do sistema mTOR (alvo mamífero para rapamicina) (BACKER, 2008).

As classes de PI3K também diferem quanto a regulação metabólica celular, estando a classe I relacionada a vias de transdução de sinal, da membrana para o interior celular, as enzimas da classe II envolvidas com tráfego de vesículas (MAFFUCCI *et al* 2003, LINDMO

E STENMARK, 2006) e a classe III relacionada a mudança do perfil nutricional em condições de privação de nutrientes (BACKER, 2008).

Outra importante constatação dos pesquisadores encontra-se na diferença entre o mecanismo de ativação destas enzimas. As enzimas da classe IA são ativadas por receptores tirosina cinase e GTPases da família Rho, enquanto que, as enzimas da classe IB (PI3K $\gamma$ ) são ativadas por proteínas G (subunidade  $\beta\gamma$ ), e ambas podem ser moduladas por Ras p21 (HIRSCH *et al*, 2007).

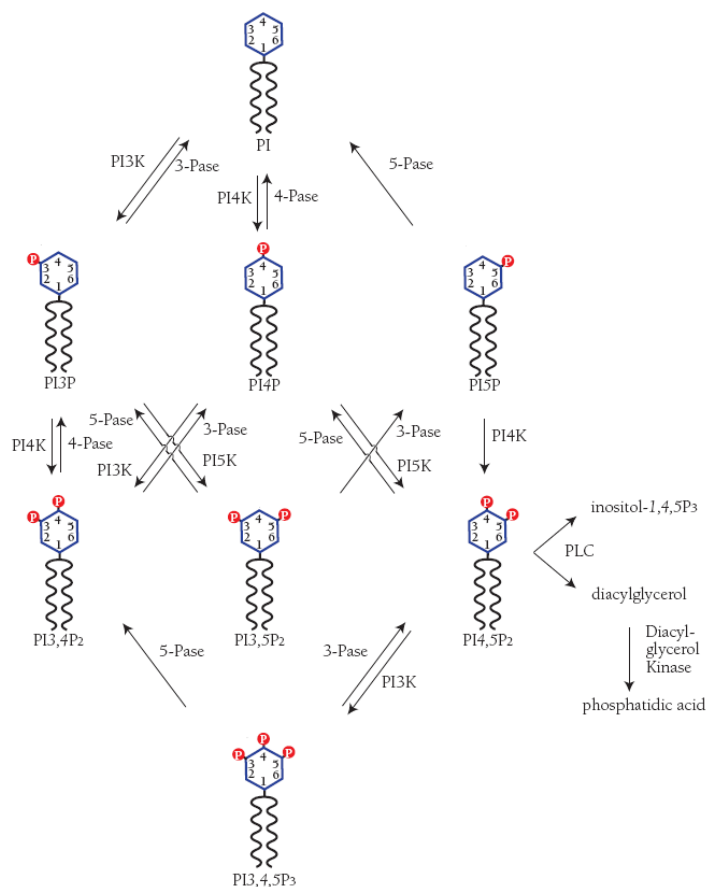
PI3K influenciam muitas ações celulares, estas ações variam de acordo com a célula em questão, resultando em numerosas possibilidades de sinalização intracelular, inclusive para muitos hormônios peptídicos e esteróides (HIRSCH *et al*, 2007).

#### 1.8.1. MECANISMO DE SINALIZAÇÃO VIA PI3K

Os fosfoinosítídeos gerados, através da fosforilação por PI3K, exercem seus efeitos intracelulares pela interação com proteínas que possuem um domínio homólogo à pleckstrina (PH), como PKB/Akt (ITOH *et al*, 2001; KOSHIBA *et al*, 2001; OVERDUIN *et al*, 2001).

Após a estimulação celular, com conseqüente ativação de PI3K, a mesma fosforila PIP2 à PIP3, este fosfoinosítídeo interage com o domínio PH presente na terminal NH2 de PKB/Akt. Esta interação não ativa diretamente a enzima cinase, entretanto expõe um sítio de tirosina e um de serina para que fosfoinosítídeos cinases dependentes de cinases (PDK1 e PDK2/TORC2) os fosforilem, respectivamente (MILBURN *et al*, 2003). Os inibidores de PI3K inespecíficos, wortmaninn e LY294002 reduzem a quantidade de PIP3, formado prevenindo a fosforilação e ativação de PKB/Akt (SALE *et al*, 2008).

Domínios homólogos à pleckstrina (PH) são pequenos módulos protéicos envolvidos no recrutamento de moléculas a membranas celulares, e neste caso relacionado à fosfoinosítídeos específicos (OVERDUIN *et al*, 2001). A maioria das proteínas que possuem domínios PH requer associação à membrana para sua funcionalidade, e este domínio parece ter um papel na localização da sinalização próximo à membrana. Muitos estudos demonstraram que as proteínas que interagem através de domínios PH estão adjacentes ou alocadas na membrana, muitas vezes relacionadas à fosfoinosítídeos (OVERDUIN *et al*, 2001). Estes domínios PH estão presentes em proteínas cinases, GEFs (fatores de troca de GDP), GAPs (proteínas aceleradoras de GTPase), proteínas transportadoras de lipídeos e fosfolipases (COZIER *et al*, 2004).



**FIGURA 1.19:** Síntese de fosfolipídeos (OVERDUIN *et al*, 2001).

### 1.8.2. PROTEÍNAS CINASES CLASSE IB (PI3K $\gamma$ )

A classe p110 $\gamma$ /p101 PI3K $\gamma$  parece ser unicamente ativada por GPCR (subtipo Gi) sendo regulada pela subunidade G $\beta\gamma$  (CIRAULO *et al*, 2008). Esta interação alostérica ocorre entre a subunidade G $\beta\gamma$  e a subunidade p110 $\gamma$  da PI3K $\gamma$ , e dispara a atividade da enzima cinase, mas é facilitada pela presença das subunidades regulatórias (BROCK *et al*, 2003). Entretanto as PI3K da classe IA também podem ser reguladas pelo GPCR, embora a via mais descrita para estas enzimas seja através de receptores Tirosina cinase (MURGA *et al*, 2000).

PI3K $\gamma$ , além de sua atividade enzimática, também apresenta outras atividades associadas como controle da ativação de fosfodiesterase 3B podendo reduzir a concentração de AMPc (PATRUCCO *et al*, 2004, HIRSCH *et al*, 2006).

A atividade da enzima PI3K $\gamma$  pode ser inibida através da utilização de bloqueadores como wortmaninn e LY294002, os quais diminuem a sinalização de receptores como para Angiotensina II (AT<sub>1</sub>) via PKB/Akt (TAKAHASHI *et al*, 1999), por exemplo. Também é relatado que PI3K $\gamma$  está envolvida na modulação do controle vascular sinalizado por angiotensina II em miócitos da veia porta hepática (LE BLANC *et al*, 2004), ação esta, que potencializa a abertura de canais de Ca<sup>2+</sup> do tipo L, aumentando a entrada de Ca<sup>2+</sup>, via proteína Gi (G $\beta\gamma$ ). Embora neste tecido encontrem-se expressas PI3K $\gamma$  e PI3K $\alpha$ , foi demonstrado por diversos autores que a captação de Ca<sup>2+</sup>, via canal de cálcio dependente de voltagem do tipo L, ocorre através da ação do GPCR via PI3K $\gamma$  (MACREZ *et al*, 2001, QUIGNARD *et al*, 2001). Mecanismo similar foi relatado em cardiomiócitos por Naga Prasad (2000), onde angiotensina II atuou via PI3K $\gamma$  estimulando crescimento celular. Também foi demonstrado *in vivo* que a perda da expressão de PI3K $\gamma$  em camundongos, preveniu a hipertensão causada por Angiotensina II (VECCHIONE *et al*, 2005).

Alguns estudos, em diferentes tecidos, indicam ações estimulatórias ou inibitórias sobre a captação de  $\text{Ca}^{2+}$ , utilizando o mecanismo  $\text{G}\beta\gamma/\text{PI3K}\gamma$  (IKEDA E DUNLAP, 1999; DE WAARD *et al*, 1997; TEDFORD E ZAMPONI *et al*, 1997, MACREZ *et al*, 1997, VIARD *et al*, 1999; VIARD *et al* 2001, ZHONG *et al*, 1999, DOLPHIN, 1998).

Descontroles na concentração de fosfoinosítídeos, gerados pelas isoformas de PI3K da classe I, estão envolvidos em vários mecanismos patogênicos como câncer, inflamação crônica, alergias, doenças metabólicas, diabetes e doenças cardiovasculares. Vários laboratórios farmacêuticos têm dispensado especial atenção no desenvolvimento de bloqueadores específicos para as isoformas de PI3K  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  e suas proteínas associadas, na tentativa de isolar seus efeitos, produzindo medicamentos para as diversas patologias citadas acima. Alguns destes bloqueadores já estão em fase I de pesquisa clínica (tumores sólidos) e para supressão de dano após infarto do miocárdio (fase I e II de pesquisa clínica) (para revisão MARONE *et al*, 2008).

### 1.8.3. PROTEÍNA CINASE B (PKB/AKT)

PKB/Akt é uma cinase serina/treonina, da família das cinases AGC, que fosforila várias outras proteínas regulatórias subseqüentes, colaborando na sobrevivência celular, proliferação e mediando respostas metabólicas (TOKER, 2002), também atuando na diferenciação e migração celulares (YUN, 2009).

Até o momento foram identificados 3 membros da família PKB/Akt (PKB $\alpha$ /Akt1; PKB $\beta$ /Akt2 e PKB $\gamma$ /AKT3) codificados por três genes diferentes (YUN, 2009). Todos os membros desta família contêm um domínio homólogo à PH no terminal NH<sub>2</sub> seguido de uma pequena região de ligação, uma região central catalítica (serina/treonina) e uma pequena região COOH terminal regulatória (domínio rico em prolina).

As isoformas de PKB/Akt apresentam no domínio PH, uma estrutura que acomoda o grupamento fosfato do PIP3, resultando na translocação da proteína cinase do citoplasma para a membrana. Nesta migração ocorre uma modificação em sua estrutura quaternária, expondo resíduos de treonina, aptos a serem fosforilados por PDK1 (RODRÍGUEZ-ESCUADERO *et al*, 2009).

Cada isoforma de PKB/Akt é fosforilada em um resíduo específico de treonina, no domínio catalítico (PKB $\alpha$ /Akt1: T308; PKB $\beta$ /Akt2:T309; PKB $\gamma$ /Akt3:T305) o que leva a ativação parcial da enzima . Também é requerida uma segunda fosforilação no domínio hidrofóbico, para a atividade total da enzima, em um resíduo de serina que também varia de acordo com a isoforma (PKB $\alpha$ /Akt1:Ser473, PKB $\beta$ /Akt2:Ser474, and PKB $\gamma$ /Akt3Ser472 ), esta segunda fosforilação é realizada por uma PDK2, que foi recentemente identificada como TORC2 (SARBASSOV *et al*, 2005).

Não há ainda uma definição sobre a relação de isoformas específicas de PI3K e as três isoformas de PKB/Akt, já descritas em mamíferos, bem como ainda está pouco esclarecida, a diferenciação entre as isoformas através de ferramentas farmacológicas. Cada isoforma de PKB/Akt é expressa predominante em alguns tecidos; PKB $\alpha$ /Akt1 aparece em quase todos os tecidos testados, PKB $\beta$ /Akt2 está principalmente expresso em tecidos que respondem à insulina; e PKB $\gamma$ /Akt3 prevalece em cérebro e testículos (RODRÍGUEZ-ESCUADERO *et al*, 2009).

Relaciona-se também isoformas específicas com alguns mecanismos como, PKB $\gamma$ /Akt3 aparece implicada no desenvolvimento neuronal (TSCHOOP *et al*, 2005), PKB $\alpha$ /Akt1 relacionada a crescimento e longevidade (CHEN *et al*, 2001, CHO *et al*, 2001), e PKB $\beta$ /Akt2 como reguladora da homeostase da glicose *in vivo*, onde se sugere que na

ausência desta cinase ocorra diabetes tipo II em camundongos (Cho et al. 2001b) e em Humanos (GEORGE *et al*, 2004).

#### 1.8.4. MECANISMO DE ATIVAÇÃO DE PI3K POR FSH EM CÉLULAS DE SERTOLI

Há muitas evidências que indicam que FSH atua na célula de Sertoli de maneira independente da ativação da proteína Gs e do aumento de AMPc e PKA (RICHARDS *et al*, 2001; GONZALEZ-ROBAYNA *et al*, 2000; ULLOA-AGUIRRE *et al*, 2007). Sabe-se que FSH estimula a formação de IP3 (QUIRK E REICHERT, 1988) e que formas glicosiladas modificadas de FSH inibem as ações estimuladas por PKA (AREY *et al*, 1997), sugerindo uma potencial associação do FSHR com outras proteínas G.

Em células de Sertoli, FSH aumenta a concentração de PKB/Akt fosforilada por PI3K, sendo esta ação independente de IGF-1. O estímulo de FSH via PI3K relatado é inibido por wortmaninn e LY294002, inibidores da proteína cinase (MERONI *et al*, 2004).

Muitas hipóteses foram aventadas para explicar esta “nova” rota de sinalização para o FSH nas células de Sertoli. Foi descrito por Babu e colaboradores (1999) que o FSHR exibiria um *splicing* alternativo exibindo uma estrutura de receptor como fator de crescimento, clonados e identificados em testículos. Vários autores, na tentativa de relacionar esta via diferenciada à Adenilil ciclase/AMPc, especularam que este fenômeno estaria relacionado ao aumento de AMPc, produzindo uma pós-ativação via G $\alpha$ s, independente de PKA e dependente de PI3K (GONZALEZ-ROBAYNA *et al*, 2000). Richards e colaboradores (2001) propuseram que esta ação estaria relacionada a proteínas G monoméricas associadas ao GPCR.



Observa-se o aumento de AMPc e PKB/Akt através do estímulo de FSH, mas não há ainda mecanismo descrito de qual a relação entre AMPc e PI3K nestas células, os dados existentes só corroboram a relação entre FSH e PI3K isoladamente em células de Sertoli e célula da granulosa de ovários (MERONI *et al*, 2004). Em outro estudo, este grupo de pesquisadores descreveu que o estímulo de FSH sobre a produção de lactato e transferrina é parcialmente bloqueada em células de Sertoli pré-incubadas com wortmaninn (MERONI *et al*, 2002), relacionando ao mesmo mecanismo que Gonzalez-Robayna e colaboradores descreveram (2000), citado acima. Outro relato sobre a ação de FSH aumentando a ação de PI3K foi feito por Khan e colaboradores (2002), onde a habilidade do FSH em estimular a via do fosfoinosítídeo cinase estaria relacionada ao estímulo de FSH na síntese e secreção de IGF e na redução da secreção de IGFBP3, o que já foi descartado por outros pesquisadores (MERONI *et al*, 2004).

Em células da granulosa, em ovários, foi investigada a ação de FSH e TGF $\beta$  nas vias que estimulam AMPc e PI3K, os autores descrevem que FSH aumentou a ação de PI3K e a fosforilação de PKB/Akt (serina 473), mTOR (serina 2481) e S6K (T389), e ainda a transcrição dos fatores FoxO1 e FoxO3a, ações que foram bloqueadas por wortmaninn, mas não por inibidores de PKA (PKAI). Relataram, também, que a inibição provocada pelos PKAI, na ação de FSH induzindo a fosforilação de CREB (via AMPc) foi anulada por wortmaninn, indicando uma delicada relação entre as vias intracelulares nestas células, e este mecanismo também pode ocorrer em muitos outros tecidos (CHEN *et al*, 2007).

A via de sinalização PI3K/PKB(Akt) é estimulada por FSH (via GPCR) e IGF-1 (via receptor tirosina cinase-RTK), entretanto, como já descrito neste trabalho, há várias isoformas de PI3K e PKB que podem estar associadas aos dois hormônios de forma diferenciada, uma vez que GPCR estão associados a PI3K $\gamma$  e RTK, associados a PI3K $\alpha$  e PI3K $\beta$  (CHO *et al*, 2001).

Ainda é importante observar que estas ações realizadas por FSH variam conforme o estágio de desenvolvimento das gônadas. O estímulo de FSH na via MAPK/ERK pode ser inibitório ou estimulatório, dependendo do estado de maturação das células de Sertoli (CREPIEUX *et al*, 2001). O efeito de FSH na captação de  $\text{Ca}^{2+}$  e no transporte de aminoácidos neutros, nestas células, também varia de acordo com a idade, sendo estimulado só no período pré-púbere (IRUSTA E WASSERMANN, 1974; PEREZ-SANCHEZ E WASSERMANN, 1981; WASSERMANN *et al*, 1992a; DAHIA E RAO, 2006).

Na literatura há uma gama de artigos descrevendo que os receptores acoplados à proteína G podem sinalizar através de mais de uma proteína G associada, e que esta variação pode estar relacionada como estágio de desenvolvimento celular ou com o metabolismo celular. Logo, para este mecanismo de estímulo do FSH na ação de  $\text{PI3K}\gamma$ , pode-se sugerir o envolvimento da proteína  $G_i$ , interagindo com isoformas diferentes de FSH (diferentes glicosilações e ponto isoeletrico básico) (AREY *et al*, 1997). Este mecanismo ocorre através de subunidade  $G\beta\gamma$  associada ao GPCR, mecanismo já descrito para muitos outros tecidos, sobretudo como na sinalização de Angiotensina II em tecido vascular (VECCHIONE *et al*, 2005) e receptores  $\beta$ -adrenérgicos em tecido cardíaco (XIAO *et al*, 1995, VIARD *et al*, 2001) e em tecido vascular (MACREZ *et al*, 1997).

## 1.9. CANAIS DE CÁLCIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM (CCDV)

Canais de cálcio dependentes de voltagem (CCDV) estão presentes em diversos processos fisiológicos e patológicos, em muitos tipos celulares. Estes canais são estruturas que medeiam o influxo de cálcio em resposta à despolarização da membrana e regulam processos intracelulares como contração, secreção, neurotransmissão e expressão gênica nas mais diferentes células (CATERALL *et al*, 2005). A atividade dos CCDV é essencial para acoplar sinalização elétrica com eventos fisiológicos celulares.

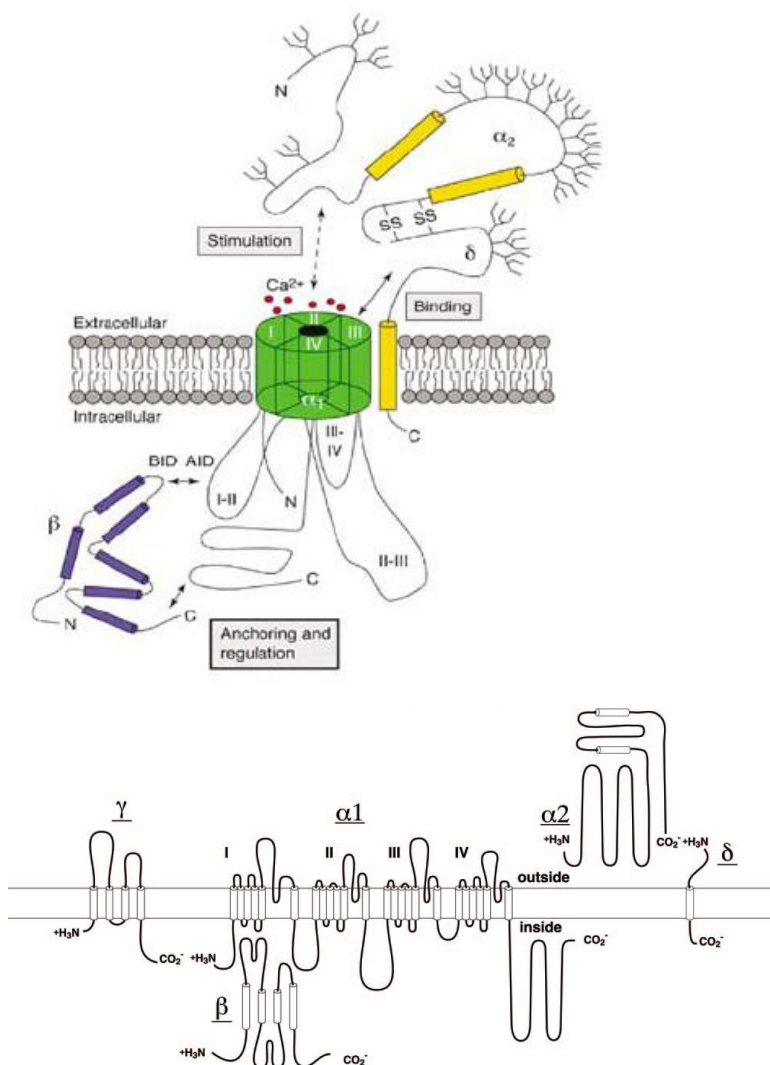
O primeiro relato da existência destes canais foi realizado por Paul Fatt e Bernard Katz (1953) onde, em músculos de crustáceo, após a inibição das correntes de Na<sup>+</sup>, o músculo ainda apresentava potenciais de ação. Após esta observação, outros pesquisadores identificaram outros subtipos de canais em células excitáveis (FATT E GINSBORG, 1958), e os canais dependentes de voltagem foram classificados de diferentes modos (CATERALL *et al*, 2005).

Os CCDV pertencem à superfamília de canais iônicos protéicos transmembrana, na qual estão incluídos os canais de potássio e sódio dependentes de voltagem (YU E CATERALL, 2004). Na década de 1980, a estrutura protéica dos CCDV foi purificada e foram identificadas as diversas subunidades que compõe o canal (BORSOTTO *et al*. 1985; FLOCKERZI *et al*, 1986; SIEBER *et al*, 1987; TAKAHASHI *et al*, 1987; VAGHY *et al*, 1987; LEUNG *et al*, 1988).

A principal subunidade dos CCDV é chamada de subunidade  $\alpha 1$ , e as subunidades auxiliares são conhecidas como  $\beta$ ,  $\alpha 2$ ,  $\delta$  e  $\gamma$ . Sendo identificados, até agora, 10 genes para a

subunidade  $\alpha 1$ , 4 genes para a subunidade  $\beta$ , 4 genes para o complexo  $\alpha 2\delta$  e 8 genes para a subunidade  $\gamma$  (HOFFMANN *et al*, 1999) (FIG 1.20).

A subunidade  $\alpha 1$  é a maior delas, e nela estão incluídos os sensores de voltagem, o poro de condução iônica e o componente de portão do canal. Além dos locais de regulação do canal, por drogas e toxinas. As subunidades auxiliares modulam as propriedades do complexo canal, gerando a diversidade eletrofisiológica e farmacológica, em associação com a subunidade  $\alpha 1$  (HOFMANN *et al*, 1999).



**FIGURA 1.20:** Representações do  $Ca_{v1}$  e suas subunidades (adaptado de DOLPHIN, 2006 e CATERALL *et al*, 2005).

### 1.9.1. CLASSIFICAÇÃO DOS CCDV

#### 1.9.1.1. *Classificação Farmacológica*

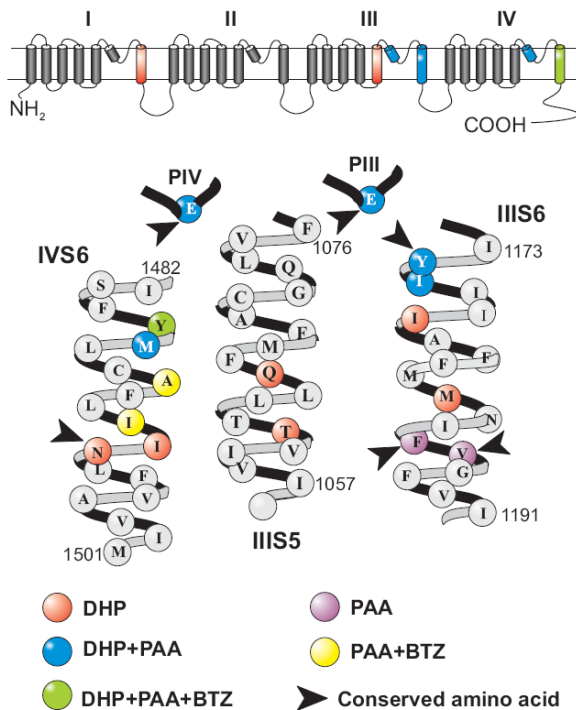
Em virtude da existência de múltiplos subtipos deste canal iônico, foram utilizadas, a princípio, ferramentas farmacológicas para sua identificação. O primeiro antagonista, descrito por Albrecht Fleckenstein na década de 1960 (FLECKENSTEIN, 1983), foi uma fenilalquilamina (FAA), Verapamil. Fleckenstein criou o termo “antagonista de cálcio” para qualquer droga que bloqueasse o acoplamento excitação-contração da mesma forma que a remoção de cálcio extracelular (FLECKENSTEIN, 1983). O mesmo pesquisador também identificou a nifedipina como antagonista de cálcio, sendo esta a primeira molécula da classe 1,4-dihidropiridinas (DHP). Além destas classes também são descritos como antagonistas de CCDV as Benzotiazepinas (BTZ).

Estas diversas classes são utilizadas, na clínica, como drogas antihipertensivas e antianginosas (DOLPHIN, 1998) e apresentam diferentes afinidades pelos diversos subtipos de CCDV (para revisão ver CATERALL *et al*, 2005). A subunidade  $\alpha_1$  dos CCDV é o local de ligação dos fármacos citados (DHP, FAA e BTZ), entretanto estas drogas agem de forma não competitiva no mesmo, ou seja atuam em locais diferentes. Também é relatado que agonistas dos CCDV, como o BayK 8644, agem em outros sítios na mesma subunidade, interferindo na ação dos antagonistas de maneira alostérica (ZAHRADNÍKOVÁ *et al*, 2007).

As FAA são bloqueadores agem no poro do canal situado no lado intracelular, os autores fazem uma analogia deste mecanismo com a ação de anestésicos locais em canais de sódio dependentes de voltagem (HOCKERMAN *et al*, 1997; HOFMANN *et al*, 1999), bloqueando por oclusão o poro de permeação iônica do canal (HOCKERMAN *et al*, 1997,

LIPKIND E FOZZARD, 2003). As FAA diminuem o bloqueio do canal pelas DPH de maneira alostérica (GLOSSMANN E STRIESSNIG, 1990).

As DHP, tanto agonistas como antagonistas, agem de forma alostérica levando o canal à maior probabilidade de abertura ou fechamento do poro, respectivamente, o local de ligação destes fármacos situa-se no segmento S6 (domínios III e IV) e segmento S5 (domínio III) (FIG 1.21). As DHP e FAA têm seus sítios de ligação muito próximos, inclusive partilhando alguns aminoácidos comuns. As BTZ, como o diltiazem, ligam-se a um terceiro local em sítios extracelulares ligados a seqüência de aminoácidos entre, o segmento S5 e S6 (domínio IV), descrito em  $Ca_{v1.1}$  (WATANABE *et al*, 1993). Corroborando este dado, Kurokawa e colaboradores (1997) relataram que uma BTZ (1,5-BTZ DTZ417) bloqueou o canal tipo L em tecido cardíaco aplicado no meio extracelular.



**FIGURA 1.21:** Locais de interação entre aminoácidos e DHP( vermelho); FAA (lilás), FAA+BTZ (amarelo), DHP+FAA (azul) e com os três bloqueadores DHP+FAA+BTZ (verde) (BIEL *et al*. 1990).

### 1.9.1.2. Classificação de Acordo com o Tipo de Corrente de Cálcio

Além desta diferenciação farmacológica, também foram observados dois componentes nas correntes de cálcio, através destes canais (CARBONE E LUX, 1984; FEDULOVA *et al*, 1985). Carbone e Lux (1984) utilizaram os termos “ativados por baixa voltagem” (LVA) e “ativados por alta voltagem” (HVA) para descrever estes componentes. Utilizando ferramentas farmacológicas adicionais, foram classificados subtipos a partir deste conceito, onde certos canais HVA lentos foram chamados de canais Tipo L, sendo sensíveis a dihidropiridinas (bloqueio/ativação) (HESS *et al*, 1984). Hess e colaboradores descreveram também um agonista destes canais Tipo L, BayK 8644. Entretanto em neurônios, alguns canais HVA, não são bloqueados por DHP e não apresentam o comportamento cinético de ativação e inativação dos canais Tipo L.

Entre estes canais foram observados outros subtipos de CCDV como os canais tipos N (para canais não L e Neurônios), bloqueados por  $\omega$ -conotoxinas (GVIA, MVIIA e CVID) isoladas de vários venenos de molusco marinhos, entre eles o *Conus geographus* (NOWYCKY *et al*, 1985; OLIVERA *et al*, 1984; MINTZ *et al*, 1991; FENG *et al*, 2003). Estes canais estão localizados preferencialmente no sistema nervoso, atuando na transmissão sináptica. Um exemplo de atuação destes canais ocorre no mecanismo de ação da morfina que através de seu receptor  $\mu$  inibe a corrente em canais de cálcio tipo N ( $Ca_{v2.2}$ ) (ALTIER E ZAMPONI, 2004).

Outro canal, este como inativação muito lenta, foi identificado nas células de Purkinje do cerebelo, sendo insensível tanto à DHP quanto à  $\omega$ -conotoxina. Este canal foi nomeado canal tipo P (Purkinje), sendo sensível a  $\omega$ -agatoxina IVA (fração do veneno da aranha *Agelenopsis aperta* (HILLMAN *et al*, 1991; CHERKSEY *et al*, 1991; MINTZ *et al*, 1992).

Adicionalmente foi identificado um canal sensível a  $\omega$ -agatoxina, mas com um componente de inativação mais rápido e com baixa afinidade pela toxina, chamado originalmente de canal tipo Q (RANDALL E TSIEN, 1995), entretanto devido às suas características moleculares semelhantes com a estrutura do canal tipo P, provavelmente oriundas de *splincing* alternativos, os mesmos aparecem combinados, considera-se então o canal P/Q (BOURINET *et al*, 1999). Outros canais com correntes de cálcio insensíveis à DHP e as toxinas citadas acima são chamados de canais tipo R (residuais) (RANDALL E TSIEN, 1995). Estes canais são bloqueados por SNX-482, uma toxina sintética derivada de veneno da aranha tarântula, estando estes canais presentes em dendritos (CATTERALL *et al*, 2005).

Canais LVA são caracterizados por apresentarem potenciais limiars em torno de -60mV, valor de potencial no qual os canais abrem e são inativados rapidamente, entretanto com uma pequena condutância ao cálcio. Em virtude destas características cinéticas foram chamados de canais Tipo T (transientes) (LACINOVA, 2005). Estes canais são bloqueados por cátions como  $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ , mibefradil.

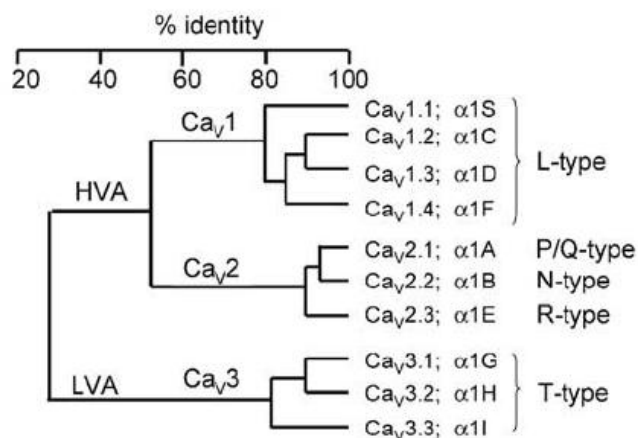
Bloqueadores de outros CCDV também podem atuar como o verapamil bloqueando o canal  $Ca_{v3.2}$  (WILLIAMS *et al*, 1999). Muitos fármacos têm como alvo subtipos específicos destes canais como os anticonvulsivantes fenitoína, etossuximida (LACINOVA, 2005); anestésicos com propofol, pentobarbital, tiopental e penobarbital (TODOROVIC *et al*, 2000), a toxina tetrodotoxina (TTX) (LACINOVA, 2005); ácido araquidônico e amilorida inibindo os canais  $Ca_{v3.1}$  (ZHANG *et al*, 2000, TALAVERA *et al*, 2004; WILLIAMS *et al*, 1999; LACINOVA, 2005). Bem como fármacos antipsicóticos inibindo as três isoformas descritas de  $Ca_{v3}$ (Pimozida, Haloperidol, Flunarizina) (SANTI *et al*, 2002; OSIPENKO *et al*, 2003) e anandamida (CHEMIN *et al*, 2001).



### 1.9.1.3. Classificação Molecular

Para unificar a nomenclatura dos CCDV, foi proposta uma classificação baseada na estrutura da subunidade  $\alpha_1$ , onde  $\alpha_{1S}$  refere-se a isoforma descrita em músculos esqueléticos e as isoformas  $\alpha_{1A}$  e  $\alpha_{1E}$  (BIRNBAUMER *et al*, 1994). Em 2000, foi adotada uma nomenclatura baseada na classificação utilizada para canais de potássio (CHANDY E GUTMAN, 1993, ERTEL *et al*, 2000). Nesta classificação, que é sistemática, utiliza-se o símbolo químico do Cálcio (Ca) para definir o íon, a designação de dependência de voltagem ( $Ca_v$ ), e um sistema numérico relacionado ao gene da subfamília da subunidade  $\alpha_1$  (1 à 3 até o momento).

Na subfamília  $Ca_{v1}$  estão incluídos os canais tipo L contendo as subunidades  $\alpha_{1S}$ ,  $\alpha_{1C}$ ,  $\alpha_{1D}$ ,  $\alpha_{1F}$  ( $Ca_{v1.1}$ - $Ca_{v1.4}$  respectivamente). A subfamília  $Ca_{v2}$  ( $Ca_{v2.1}$ - $Ca_{v2.3}$ ) inclui canais que contém as subunidades  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  e  $\alpha_{1E}$  mediando as correntes de cálcio através dos canais Tipo P/Q ( $Ca_{v2.1}$ ), N ( $Ca_{v2.2}$ ) e R ( $Ca_{v2.3}$ ). E na subfamília  $Ca_{v3}$  ( $Ca_{v3.1}$ - $Ca_{v3.3}$ ) incluídos canais com as subunidades  $\alpha_{1G}$ ,  $\alpha_{1H}$  e  $\alpha_{1I}$ , os quais medeiam correntes de cálcio através de canais tipo T (ERTEL *et al*, 2000) (FIG1.22).



**FIGURA 1.22:** Classificação dos Canais de Cálcio dependentes de voltagem (CATTERAL *et al*, 2005).

## 1.9.2. SUBUNIDADES AUXILIARES DOS CCDV

### 1.9.2.1. Subunidade $\beta$

As subunidades  $Ca_{v\beta}$  têm efeitos diretos sobre as propriedades dos HVA ( $Ca_{v1}$  e  $Ca_{v2}$ ), incluindo tráfego do complexo canal para a membrana plasmática e modificações cinéticas e relacionadas às propriedades dependentes de voltagem (DOLPHIN, 2003). Já foram clonadas quatro subunidades ( $\beta_1$ - $\beta_4$ ) em diversos tecidos e com diferentes funções (DRESVIANNIKOV *et al*, 2009).

Enquanto a subunidade  $\alpha_1$  dos  $Ca_v$  contém as propriedades que caracterizam os determinantes de dependência de voltagem e inativação, a associação com diferentes isoformas de subunidades  $\beta$  influencia, principalmente, na cinética de inativação do canal.

As subunidades  $Ca_{v\beta}$  contêm dois domínios conservados ligados ao terminal N, ao terminal C e centralmente localizado na porção intracelular. Estudos indicam que esta subunidade contém domínios com características homólogas a Src-3 (SH3) ligados ao domínio como guanilato cinase (GK) (HANLON *et al*, 1999, DRESVIANNIKOV *et al*, 2009).

Todos os quatro tipos de subunidades  $\beta$ , já descritas, são ativadas por potenciais mais negativos, colaborando para a abertura do canal e na sua velocidade de fechamento (inativação). Em geral a presença das subunidades  $\beta_1$ ,  $\beta_3$  e  $\beta_4$  hiperpolarizam a dependência de voltagem da inativação, tornando os canais inativos em potenciais mais negativos, o que aumenta a cinética de inativação. Enquanto que a subunidade  $\beta_2a$  despolariza a dependência de voltagem da inativação, tornando os potenciais mais positivos e reduzindo a cinética de inativação (LACINOVÁ, 2005).

### 1.9.2.2. Subunidades $\alpha_2\delta$

Quatro genes para as subunidades  $\alpha_2\delta$  ( $\alpha_2\delta_1$ - $\alpha_2\delta_4$ ) já foram clonados, distribuídos em músculos esqueléticos, neurônios e tecido cardíaco (ARIKKATH E CAMPBELL, 2003; CANTI *et al*, 2003; KLUGBAUER *et al*, 2003). Estão associadas a canais CCDV tipo L, N e P/Q, e ao tipo T, nestes últimos acelerando a inativação do canal (GAO *et al*, 2000; HOBOM *et al*, 2000). Há poucos dados conclusivos sobre a função desta subunidade, entretanto é descrito que ela parece modular a interação com bloqueadores dos CCDV (MOULD *et al*, 2004; DRESVIANNIKOV *et al*, 2009).

### 1.9.2.3. Subunidade $\gamma$

As subunidades  $\gamma$  são proteínas integrais de membrana. A subunidade original, primeiro identificada ( $\gamma_1$ ) consiste de 222 aminoácidos e foi purificada de músculo esquelético de coelhos (BOSSE *et al*, 1990; JAY *et al*, 1990). Após identificou-se outra isoforma desta subunidade em cérebros ( $\gamma_2$ ) com apenas 25% da indentidade de  $\gamma_1$  (LETTS *et al*, 1998). E isoformas adicionais foram sendo identificadas ( $\gamma_3$ - $\gamma_5$ ), tendo hoje 5 representantes (KLUGBAUER *et al*, 2000). Algumas das isoformas foram relacionadas à subunidades já existentes ( $\gamma_6, \gamma_7, \gamma_8$  à  $\gamma_1, \gamma_5, \gamma_4$ , respectivamente) (BURGESS *et al*, 2001).

Entretanto ainda não está definido o papel desta subunidade na funcionalidade dos CCDV (DRESVIANNIKOV *et al*, 2009).

### 1.9.3. CANAIS DE CÁLCIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM $Ca_{v1}$ (TIPO L)

Originalmente caracterizados por sua sensibilidade à DHP e por apresentarem uma condutância prolongada (*long lasting*) após a abertura do canal (NOWYCKY *et al*, 1985), compondo esta classe estão quatro diferentes canais ( $Ca_{v1.1}$ -  $Ca_{v1.4}$ ) (ERTEL *et al*, 2000).

Os canais de cálcio dependentes de voltagem tipo L ( $Ca_{v1.n}$ ) tem uma estrutura homóloga aos demais CCDV, entretanto a composição de suas subunidades varia de acordo com o tecido e, conseqüentemente, varia sua função. Por exemplo,  $Ca_{v1.2}$  pode ser coexpresso com várias subunidades  $\beta$  e  $\alpha_2\delta$ , e estudos de coexpressão heteróloga demonstraram que as 4 subunidades  $\beta$  já forma encontradas em associação com o CCDV, com diferentes voltagens de inativação e afinidades pelos antagonistas (LACINOVÁ, 2005).

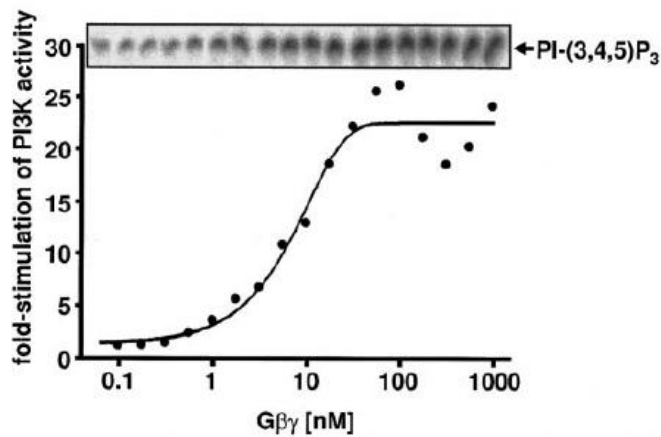
Como outros CCDV, canais  $Ca_{v1}$  tem uma subunidade  $\alpha_1$  que determina as propriedades fisiológicas e farmacológicas destes canais (CATTERALL, 2000). Esta subunidade associa-se às subunidades auxiliares, as quais facilitam a localização do canal na membrana plasmática e influenciam na ativação e inativação em relação à dependência de voltagem (BIRNBAUMER *et al*, 1998; CATTERALL, 2000, RICHARDS *et al*, 2004).

Além da diversidade da composição das subunidades (SAFA, 2001; LIPSCOMBE *et al*, 2002; TANG *et al*, 2004, SHEN *et al*, 2006), outros fatores podem influenciar e modular a atividade do canal, como a presença de determinados fosfolipídeos e modificações pós-translacionais (KAMP E HELL, 2000; PITT, 2007). A atividade dos  $Ca_{v1}$  também podem ser modificadas por hormônios, neurotransmissores e mediadores acoplados à GPCR (MACREZ *et al*, 1997; DE WAARD *et al*, 1997; VIARD *et al*, 1999), sendo que há relatos de que ambas as subunidades provenientes da ativação do GPCR ( $G\alpha$  e  $G\beta\gamma$ ), através de diferentes efetores, podem exercer esta modulação de  $Ca_{v1}$  (CALLAGHAN, 2006).

### 1.9.3.1. Modulação dos CCDV por $G\beta\gamma$ /PI3K

Muitos estudos têm indicado que a subunidade  $G\beta\gamma$  da proteína G é a responsável pela modulação da atividade de CCDV (DRESVIANNIKOV *et al*, 2009; TEDFORD E ZAMPONI, 2006); e tem sido proposto que  $G\beta\gamma$  age de forma direta competindo com a subunidade  $\beta$  pela ligação na região de interação no domínio  $\alpha$  (AID) (na subunidade  $\alpha_1$ ) para canais tipo  $Ca_{v1}$  e  $Ca_{v2}$  (PRAGNELL *et al*, 1994). Entretanto, muitos efetores ativados por  $G\beta\gamma$  foram identificados nos últimos anos, incluindo o estímulo sobre PI3K classe I (CLAPHAM E NEER, 1997; VANHAESEBROECK *et al*, 1997 VIARD *et al*, 1999) e PKC (KAMP E HELL, 2000).

Dados experimentais demonstraram, em miócitos vasculares, que a infusão intracelular de  $PI3K\gamma$ , enzimaticamente ativa, aumentou tanto a formação de PIP3 a partir de  $PIP2(\gamma_3-\gamma_5)$ , quanto a entrada de cargas positivas ( $Ba^{2+}$ ), da mesma maneira que a subunidade  $G\beta\gamma$ . Os mesmos autores demonstraram em estudos de *patch clamp*, que na presença da subunidade  $G\beta\gamma$  houve um aumento da produção de PIP3, relacionado ao aumento da atividade de  $PI3K\gamma$ , sendo este estímulo dependente da dose (FIG 1.23). Também foi demonstrado que wortmannin (inibidor de PI3K) inibiu a ação da subunidade  $G\beta\gamma$ , citada acima, onde a síntese de PIP3, nesta preparação, foi restaurada com baixas doses de  $PI3K\gamma$  na ausência do bloqueador (VIARD *et al*, 1999).



**FIGURA 1.23:** Relação entre a subunidade  $G\beta\gamma$  da proteína  $G_i$  com o aumento da atividade de PI3K e a fosforilação de PIP3 em miócitos vasculares (adaptado de VIARD *et al*, 1999).

Também é descrito na literatura que a condutância através de CCDV tipo L ( $Ca_{v1}$ ) pode ser estimulada por PKC em músculo liso (CHIEN *et al*, 1995). Em tecido vascular, a aplicação intracelular de subunidades  $G\beta\gamma$  purificadas ativou  $Ca_{v1}$ , tanto via PKC (através da aplicação de seu ativador PMA), quanto de maneira independente de PKC, através da estimulação de  $PI3K\gamma$ . A ação independente de PKC, via  $G\beta\gamma/PI3K\gamma$ , não foi mediada por AMPc, pois H89 (inibidor de cinases dependentes de AMPc) não bloqueou o estímulo via  $PI3K\gamma$  na corrente de  $Ba^{2+}$  (íon utilizado para estudar condutância através de  $Ca_{v1}$ ) (VIARD *et al*, 1999).

Bommakanti e colaboradores (2000) relataram, em estudos utilizando cultura de linhagens de células de mamíferos HEK-293 e COS-7 transfectadas com receptores  $\beta_2$  adrenérgicos, que a ação agonista sobre o receptor induziu a fosforilação da PKB/Akt na serina 473 da cinase, verificada através de *imunobloting*, sendo este efeito bloqueado por LY294002 (bloqueador de PI3K inespecífico). Também foi demonstrado que isoproterenol (agonista adrenérgico) não teve seu efeito sobre a atividade de PI3K mimetizado pela ação da subunidade  $G_{\alpha s}$  (através de forskolina,  $G_{\alpha s}$  ou estímulo da GTPase). Entretanto, o estímulo

sobre PI3K $\gamma$  foi bloqueado por propranolol (bloqueador de receptor  $\beta$ -adrenérgico), sugerindo que esta ação seja mediada pela subunidade G $\beta\gamma$ .

Outros autores relacionaram o receptor  $\beta$ 2-adrenérgico ao Ca $_v1$  através da dissociação da subunidade G $\beta\gamma$  ativando PI3K $\gamma$ /PKB(Akt), modulando a condutância nestes canais (VECCHIONE *et al*, 2005; MACREZ *et al*, 1997; LE BLANC *et al*, 2004, CATALUCCI *et al*, 2009). Embora o mecanismo de ação de PKB/Akt no canal ainda não esteja definido (CATALUCCI *et al*, 2009).

## 1.10. PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE AMINOÁCIDOS

Os primeiros estudos sistemáticos sobre os sistemas de transporte de aminoácidos, através de membranas plasmáticas, foram realizados em células de Ehrlich (ascites) por Christensen e colaboradores, entre as décadas de 1950 e 1960 (CHRISTENSEN *et al*, 1973; CHRISTENSEN, 1979). Trabalhos adicionais foram realizados por diversos pesquisadores para caracterizar o transporte de aminoácidos nos mais diversos tipos celulares, da mesma forma que nas células de Sertoli (IRUSTA E WASSERMANN, 1974; PEREZ-SANCHÉS E WASSERMANN, 1981; WASSERMANN E LOSS, 1989; WASSERMANN *et al*, 1992a).

Entre os diversos sistemas de proteínas transportadoras de aminoácidos, algumas propriedades gerais foram estabelecidas como a alta estereo seletividade, onde aminoácidos levógiros (L-aminoácidos) são mais rapidamente transportados do que os aminoácidos que desviam a luz polarizada para a direita. Da mesma forma, foi determinado que os sistemas de transporte de aminoácidos tem uma baixa especificidade, quando comparados com a maioria das enzimas, ou seja, em uma mesma célula há diferentes tipos de transportadores e cada um pode transportar vários aminoácidos diferentes, entretanto com características químicas e estruturais comuns entre eles (McGIVAN E PASTOR-ANGLADA, 1994). Além disto, estes transportadores dividem-se em duas categorias gerais: transporte do tipo uniporte de aminoácidos e o transporte simporte acoplado à  $\text{Na}^+$ . Neste simporte, o gradiente de  $\text{Na}^+$  determina o transporte de aminoácidos através da membrana (HYDE *et al*, 2003).

A configuração da estrutura química, bem como a característica iônica do aminoácido, são fatores que determinam o tipo de transportador desta molécula, através da membrana.

Há quatro principais sistemas de transporte de aminoácidos neutros (*zwitteriônicos*-com carga residual igual a 0 (zero) em células mamíferas (HYDE *et al*, 2003). O Sistema



ASC, que preferencialmente transporta alanina, serina e cisteína, mas pode reconhecer outros aminoácidos alifáticos, é dependente de cotransporte com  $\text{Na}^+$  (KILBERG E HAUSSINGER, 1992). O Sistema L reconhece e transporta aminoácidos de cadeias ramificadas e aminoácidos aromáticos (MCGIVAN, 1992), sendo independente de  $\text{Na}^+$ , além disto, ambos os sistemas citados podem atuar como trocadores de aminoácidos.

O sistema A, o qual transporta aminoácidos neutros de forma dependente de  $\text{Na}^+$ , particularmente alanina, serina e glutamina (REIMER *et al*, 2000) é muito similar ao sistema N, entretanto este medeia a captação de glutamina, histidina e asparagina (KILBERG *et al*, 1980) e também é um trocador de próton, íon que atua no cotransporte com  $\text{Na}^+$ (CHAUDHRY *et al*, 2000).

Os sistemas A e N têm suas atividades exercidas por estruturas pertencentes à família de proteínas transportadoras relacionadas ao gene SLC38. Há descritas três diferentes isoformas para os transportadores do sistema A (SNAT1, 2 e 4; conhecidas anteriormente como ATA1-3 ou SAT1-3, respectivamente) (BAIRD *et al*, 2006) e duas isoformas do sistema N (SNAT 3,5 conhecidas anteriormente como SN1 e SN2, respectivamente) (BAIRD *et al*, 2006). O sistema A apresenta uma estequiometria de 1:1 em relação ao cotransporte com  $\text{Na}^+$ , sendo a isoforma SNAT2 a mais prevalente, mediando respostas aos estímulos endócrinos e nutricionais (HYDE *et al*, 2007).

Os sistemas A e N têm algumas características particulares, como serem inibidos em pH baixos (BAIRD *et al*, 2006); além de reconhecerem aminoácidos N-metilados, como o aminoácido metil amino isobutírico (MeAIB), análogo não metabolizável da alanina, utilizado para o estudo destes sistemas (CHRISTENSEN *et al*, 1965; IRUSTA E WASSERMANN, 1974; REIMER *et al*, 2006).

Vários hormônios são hábeis na regulação do sistema A de transporte, como o FSH nas células de Sertoli, modificando a velocidade na captação dos aminoácidos neutros através

do transportador, e gerando alterações na expressão gênica através desta sinalização hormonal (WASSERMANN *et al*, 1992a). Na análise da cinética de captação de [<sup>14</sup>C]MeAIB estimulada por FSH, nas células de Sertoli, observou-se que a ação hormonal causou um aumento no  $V_{máx}$ , indicando uma maior atividade no transportador (SILVA *et al*, 2002). Este efeito do FSH iniciou em 120 segundos, sendo máximo em torno de 15 minutos, dados que sugerem a existência prévia dos transportadores na membrana plasmática (SILVA E WASSERMANN, 1999). O aumento da velocidade de transporte dos aminoácidos estimulado por FSH, nas células de Sertoli, ocorreu em resposta à variação bifásica do potencial de membrana na presença do hormônio, estando principalmente relacionado à despolarização, subsequente a rápida hiperpolarização inicial (WASSERMANN *et al*, 1992b).

O sistema A também participa dos processos de regulações adaptativas, proliferação celular e choque hipertônico, sugerindo-se que tenha um papel importante na homeostase celular (HYDE *et al*, 2007).

Aminoácidos básicos e ácidos são transportados em sistemas distintos dos aminoácidos neutros. Certos aminoácidos catiônicos, como L-arginina e L-ornitina são importantes para a função testicular. As poliaminas: putrescina, espermidina e espermina estimulam o crescimento gonadal, sendo geradas a partir da ornitina, e desempenham um importante papel na síntese de DNA durante a espermatogênese (IVANOV *et al*, 2000; PARVINEN, 1993).

Os principais transportadores de aminoácidos catiônicos são  $y^+$ ,  $y^+L$  e  $b^{0+}$  e  $B^{0+}$ , os quais diferem entre si através de suas especificidades e afinidades pelos substratos e pela dependência no cotransporte com  $Na^+$  (CÉREC *et al*, 2007). Os transportes de aminoácidos aniônicos e outros ânions orgânicos são realizados pelo sistema OAT (transportador de ânions orgânicos) (SRIMAROENG *et al*, 2008).

### 1.10.1. TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS ESTIMULADOS POR FSH EM CÉLULAS DE SERTOLI

O transporte de aminoácidos neutros ( $[^{14}\text{C}]\text{MeAIB}$  e  $[^{14}\text{C}]\text{AIB}$ ), através do sistema A, é estimulado por FSH em células de Sertoli de ratos com 10,15 e 20 dias de idade, não sendo observado em células de Sertoli de ratos com 5 ou 25 dias (IRUSTA E WASSERMANN, 1974; PEREZ-SANCHEZ E WASSERMANN, 1981). Esta gonadotrofina não foi efetiva no estímulo deste transporte quando o meio de incubação estava isento de  $\text{Na}^+$ , além de não estimular a captação de  $[^{14}\text{C}]\text{Cicloleucina}$  nas células de Sertoli de ratos de 12 dias de idade. Estes dados permitiram aos autores concluir que FSH estimula o transporte de aminoácidos através do sistema A, de forma dependente de  $\text{Na}^+$ , que é característica deste sistema, entretanto FSH não atua através do sistema L nem no ASC (DA CRUZ-CURTE E WASSERMANN, 1985).

Além destas ações, também é relatado na literatura que baixas concentrações de  $\text{Na}^+$  no meio de incubação reduz a captação de aminoácidos pelos testículos, reduzindo a resposta do FSH nesta ação. Embora a síntese de proteínas e a ação do FSH sobre este mecanismo não estar alterada. Da mesma forma, os autores relataram que a administração subcutânea de Testosterona, em ratos de 15 dias de idade, aumentou a síntese de proteínas, sem modificar a captação de aminoácidos. A mesma resposta foi demonstrada, através da adição no meio de incubação, de DbAMPc (1mM) e glicose (14mM) em testículos de ratos imaturos (SPRITZER E WASSERMANN, 1985).

Estudos *in vitro* corroboraram estes dados, demonstrando que a Testosterona também não estimula a captação de aminoácidos neutros em célula de Sertoli (VON LEDEBUR *et al*, 2002), entretanto o esteróide aumentou a captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , em técnicas que utilizaram células isoladas e testículos inteiros (LOSS *et al*, 2004).

Estes dados demonstram que a captação de aminoácido pelas células de Sertoli de ratos imaturos e a síntese protéica, estimuladas nestas células, parecem ocorrer através de mecanismos independentes, reguladas por fatores diferentes. Entretanto este ponto ainda precisa ser elucidado.

O efeito estimulatório de FSH sobre a captação de aminoácidos é anulado quando ocorre o bloqueio de CCDV por verapamil,  $\text{Co}^{2+}$  ou  $\text{Ni}^{2+}$  (WASSERMANN *et al*, 1992a, WASSERMANN E LOSS, 1989). Os mesmos pesquisadores demonstraram, através da técnica eletrofisiológica de registro intracelular, que o FSH estimula nas células de Sertoli, uma rápida hiperpolarização, seguida de uma despolarização prolongada, sendo esta última resposta aumentada quando adicionado ao meio MeAIB. Tanto a ação despolarizante, quanto o aumento desta pelo aminoácido, foram anuladas na presença de verapamil (WASSERMANN *et al*, 1992b). Estes resultados relacionam a captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  com o transporte de aminoácidos, através do sistema A, estimulados pelo FSH em células de Sertoli.

Ação semelhante é relatada na captação de [ $^3\text{H}$ ]Taurina em linhagens de células de osteoblastos, onde o aumento de cálcio no meio extracelular estimula 1,7 vezes a captação deste aminoácido. A captação de taurina é bloqueada na presença de bloqueadores de CCDV do tipo L ( $\text{Ca}_{v1}$ ) (KANG, 2009).

Entretanto a ligação entre a captação de cálcio, através dos  $\text{Ca}_{v1}$ , e o estímulo do transporte de aminoácido via sistema A ainda permanece desconhecida.

## **2. OBJETIVOS:**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Analisar os eventos pós-receptores envolvendo as ações do FSH e do IGF-I nas células de Sertoli de ratos imaturos.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Verificar as vias de transdução de sinal desencadeadas pela ligação do FSH em receptores de membrana da célula de Sertoli de ratos imaturos
- Verificar a ação do FSH nas diferentes subunidades acopladas ao GPCR, *Gas* e *Gai*, para avaliar a influência deste hormônio glicoprotéico nas vias de sinalização evocadas após a ligação ao receptor GPCR.
- Verificar a bifurcação da ação do FSH atuando na via AC/AMPC/PKA e na captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , via  $\text{Ca}_{v1}$  (CCDC tipo L) e no transporte de MeAIB através dos sistema A como mecanismos independentes, utilizando para tanto bloqueadores e ativadores da adenilil ciclase e de canais de cálcio dependentes de voltagem;
- Verificar a relação da via evocada por FSH e PI3K e sua relação com a captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  e transporte de MeAIB.
- Analisar a relação entre as vias sinalizadas por FSH e IGF-I, nestas células verificando a sinergia das ações autócrinas, parácrinas e endócrinas destes hormônios.
- Verificar a influência de IGF-I sobre a captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , no transporte de [ $^{14}\text{C}$ ]MeAIB e sua resposta eletrofisiológica em células de Sertoli de ratos imaturos e em testículos inteiros.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. MATERIAIS**

##### **3.1.1. ANIMAIS**

Foram utilizados ratos Wistar machos imaturos com idade entre 9-15 dias de idade. Provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde – UFRGS. Os ratos ficavam com as mães até o momento do experimento. As mães eram mantidas com no máximo 8 filhotes em gaiolas individuais onde recebiam ração Purina, Nutripal (Porto Alegre -RS) e água “*ad libitum*”, com iluminação controlada em ciclos de 12 horas e a temperatura controlada a aproximadamente 24°C.

##### **3.1.2. SOLUÇÕES**

###### **3.1.2.1. Tampão Krebs Ringer Bicarbonato (KRb)**

Foi utilizada uma solução tampão Krebs-Ringer bicarbonato (KRb) como meio de incubação, em todos os experimentos, preparado imediatamente antes da realização dos experimentos. Todos os reagentes eram de pureza ‘pró-análise’ (P.A) da *E. Merck* (Darmstadt, Alemanha). O preparo da solução foi feito a partir de soluções estoques conforme tabela 3.1.

**TABELA 3.1** Composição salina e concentrações presentes nas soluções estoque de KRb e na solução final.

	Concentração das Soluções Estoque		Concentração Final na Solução KRb (mM)
	(g/L)	(M)	
<b>NaCl</b> CLORETO DE SÓDIO	180,00		146
<b>KCl</b> CLORETO DE POTÁSSIO	9,20	0,123	4,7
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b> FOSFATO DE POTÁSSIO MONOBÁSICO	4,22	0,031	1,2
<b>NaHCO<sub>3</sub></b> BICARBONATO DE SÓDIO	54,60	0,65	25
<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b> SULFATO DE MAGNÉSIO	7,64	0,031	1,2
<b>CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</b> CLORETO DE CÁLCIO	9,60	0,065	2,5
<b>C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub></b> Glicose	25,00	0,14	5,5

Para o preparo do KRb, foram adicionados volumes iguais de cada solução estoque, acrescentando-se por último o sulfato de magnésio e o cloreto de cálcio, nesta ordem. A solução era então completada até seu volume final com água destilada, para obterem-se as concentrações finais descritas na tabela 3.1. A solução era gaseificada com carbogênio (O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>, 95:5, v/v), até que se atingisse o pH de 7,4, monitorado em pHmetro. A solução assim obtida era mantida em gelo durante a preparação do experimento.

### 3.1.3. SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS

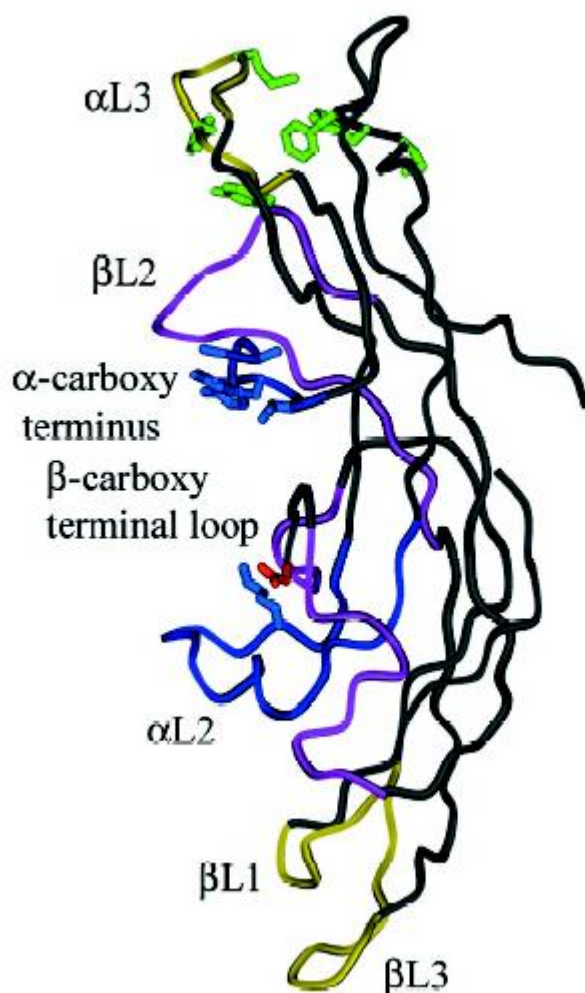
a) **Isótopo radioativo de Cálcio [ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ]**- atividade específica 1mCi/mg, adquirido da Du Pont – NEN Research Products. Em cada amostra foi adicionado 0,2 $\mu\text{Ci/mL}$ . A meia vida é de 163 dias, e o decaimento era calculado a partir de uma tabela fornecida pela Du Pont-NEN Research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

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

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

d) **Hormônio Folículo Estimulante (FSH):** (Sigma-Aldrich, Inc-USA): FSGH retirado de hipófise ovina. Contendo 50 unidades por vial, mensurados através de ensaio Steelman-Pohley tendo como referência padrão NIH-FSH-S1 (ovine sigma). O FSH foi utilizado em uma concentração de 4mIU/mL para cada tubo dos experimentos de captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  e transporte de  $^{14}\text{C}$ -MeAIB, e para os experimentos de eletrofisiologia foi calculado para ter uma concentração final de 4mU/aplicação. FSH foi pesado em balança analítica e diluído em solução de Krebs-Ringer bicarbonato até a concentração desejada

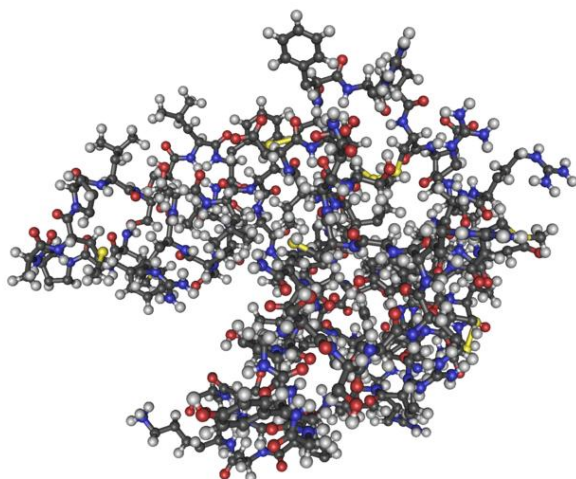




**FIGURA 3.1:** Representação cristalográfica das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  da molécula de FSH. A área lilás representa a porção da cadeia  $\beta$  responsável pela especificidade em relação aos demais hormônios glicopeptídicos e interação com o receptor (adaptado de FOX *et al*, 2001).

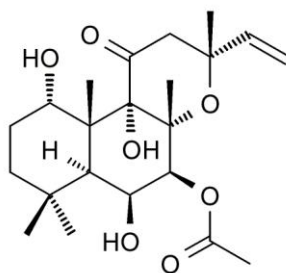
**e) Fator de Crescimento como Insulina Tipo I (IGF-I):** (Sigma-Aldrich, Inc-USA).

IGF-I recombinante, expresso em *Escherichia coli*. IGF-I foi diluído em água ultrapura e estéril produzindo uma solução mãe de 100 $\mu$ g/mL, sendo aliqotado em 20 $\mu$ L por tubo e congelado em freezer -20°C, até seu uso.



**FIGURA 3.2:** Estrutura cristalográfica de IGF-I humano (fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure>).

**f) Forscolina:** PM: 410,5, 7 $\beta$ -Acetoxi-8,13-epoxi-1 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,9 $\alpha$ -trihidroxila-14-en-11-ona (Sigma-Aldrich, Inc-USA): extraído de *Coleus forskohlii*. A forscolina foi pesada em balança analítica e diluída em Dimetil Sulfoxido (DMSO), produzindo solução estoque de 1mM, que posteriormente foi diluída em KRb até as concentrações finais desejadas . A concentração de DMSO não ultrapassou 0,1% na solução final.



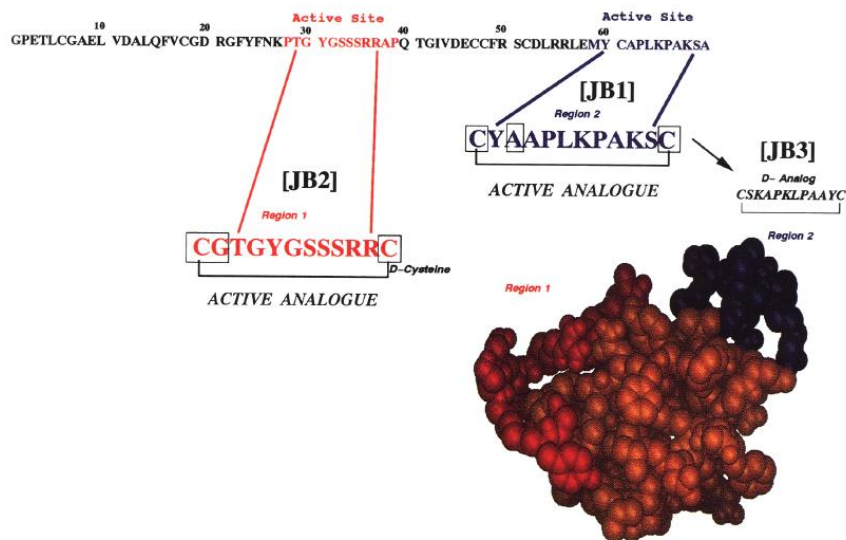
**FIGURA 3.3** Molécula de Forscolina.

**g) Toxina Pertussis de *Bordetella pertussis* (PTX):** (Sigma-Aldrich, Inc-USA). A toxina pertussis foi diluída com 500µL de água estéril, em capela de fluxo laminar. Desta solução mãe alíquotas foram retiradas para os experimentos. Foram utilizadas concentrações de 1µg/mL e 250ng/mL.



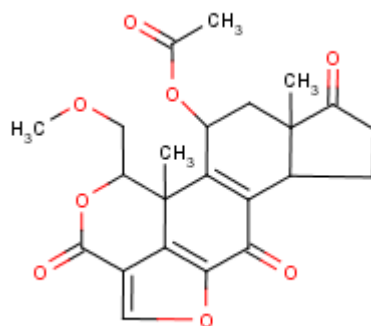
**FIGURA 3.4:** Estrutura terciária da toxina pertussis.

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



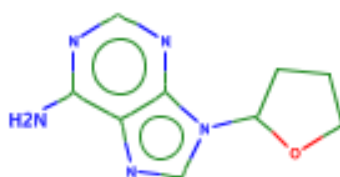
**FIGURA 3.5:** Substituição no domínio D da molécula de IGF-I produz o análogo inativo JB1 (PIETRZKOWSKI *et al*, 1992).

- i) **Wortmannin de *Penicillium funiculosum***: PM 428.43, 11-(Acetiloxi)-1,6b,7,8,9a,10,11,11b-octahidro-1-(metoximetil)-9a,11b-dimetil-3H-furo[4,3,2-de]indeno[4,5,-h]-2-h]-2-benzopirano-3,6,9-triona (Sigma-Aldrich, Inc-USA): Inibidor de PI3K inespecífico. Wortmannin foi pesado em balança analítica em diluído em DMSO em uma concentração de 100µM. Para os experimentos foi utilizada a dose de 100nM onde alíquotas da solução estoque foram rediluída em Krb, DMSO não ultrapassou 0,1% na solução final.



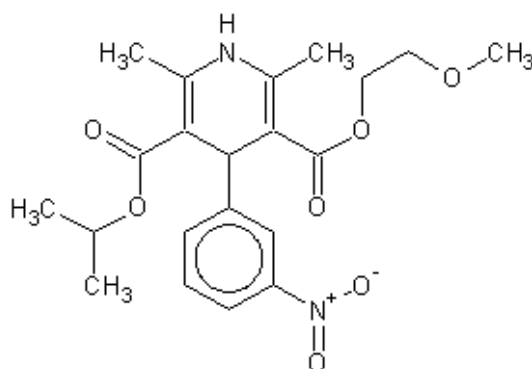
**FIGURA 3.6:** Molécula de Wortmannin.

- j) **SQ 22,536**-(Sigma-Aldrich, Inc-USA): 9-(Tetrahydro-2-furanil)-9H-purin-6-amina. Inibidor de Adenilil ciclase. PM: 205.22 SQ 22536 foi pesado em balança analítica em diluído em Krb produzindo uma solução com 100µM de concentração final no experimento.



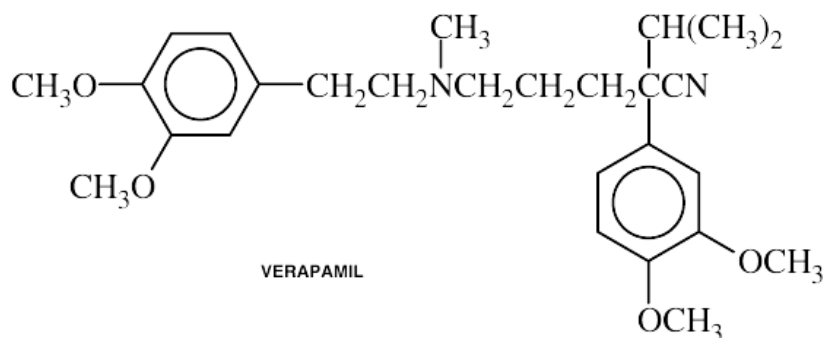
**FIGURA 3.7:** Molécula de SQ 22,536.

**l) Nimodipina** (Sigma-Aldrich, Inc-USA): Isopropil 2-metoxietil 1,4-dihidro-2,6-dimetil-4-(m-nitrophenyl)-3,5-piridinadicarboxilato, 1,4-Dihidro-2,6-dimetil-4-(3-nitrofenil)-3,5-ácido piridinadicarboxílico 2-metoxietil 1-metiletil éster. PM 418.44. Bloqueador de canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L ( $Ca_v1$ ). Solúvel em DMSO, Nimodipina foi utilizada em concentrações de 1, 5 e 100  $\mu\text{M}$ , em experimentos protegidos da luz. Os experimentos foram conduzidos e processados sob lâmpada de sódio. DMSO não ultrapassou 0,1% na solução final.



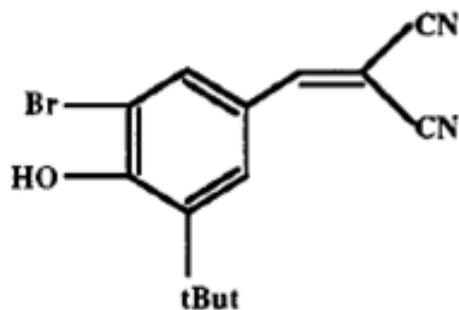
**FIGURA 3.8:** Molécula de Nimodipina.

**m) Verapamil:** PM:491,08, (Valeronitrila, 5-((3,4-Dimetoxifenil)(Metilamino)-2-(3,4-Dimetoxi-fenil)-2-Isopropil). Foi utilizado verapamil comercial injetável, ampola com 2,5mg/mL de cloridrato de verapamil, em solução tamponada. Utilizou-se uma concentração final de 100 $\mu\text{M}$  nos experimentos.



**FIGURA 3.9:** Molécula de Verapamil.

n) **Tyrphostin AG1024**: PM 305,20 ( $C_{14}H_{13}BrN_2O$ ). O bloqueador foi pesado em balança analítica e diluído em DMSO em concentração de 1mM. Para os experimentos foram utilizadas doses de 10, 25 e 50 $\mu$ M, onde alíquotas da solução estoque foram rediluída em KRb, DMSO não ultrapassou 0,1% na solução final.



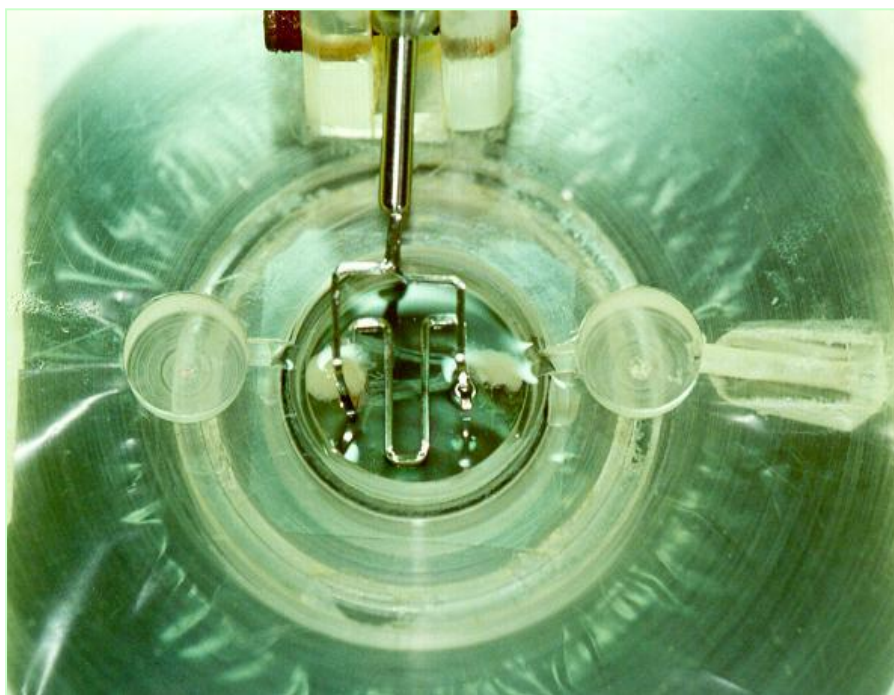
**FIGURA 3.10:** Molécula de Tyrphostin AG1024.

## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. ELETROFISIOLOGIA

#### 3.2.1.1. *Preparação dos Túbulos Seminíferos*

Os ratos foram sacrificados por deslocamento cervical. Os testículos foram imediatamente removidos por incisão abdominal e decapsulados. Um dos testículos, escolhido aleatoriamente, era esticado com duas pinças de maneira a isolar de 4 à 8 túbulos seminíferos, sendo estes presos ao fundo da câmara de perfusão com auxílio de uma grade feita de fio ortodôntico. A câmara, cujo volume era de 1 mL, estava preenchida com KRb glicosado (FIG 3.11).



**FIGURA 3.11:** Câmara de perfusão com túbulos seminíferos fixados ao fundo.

Todo o KRb utilizado nos experimentos de eletrofisiologia foi glicosado e filtrado em papel filtro antes da sua utilização. A preparação foi então levada ao microscópio invertido (*Nikon- Inverted Microscope Diaphot – TMD*) e conectada ao sistema de perfusão do KRb. O KRb foi mantido num banho a 38°C e chegava à câmara de perfusão em 36°C. O pH foi mantido em 7.4 com carbogênio durante todo o experimento. O fluxo foi mantido a 1 mL/min com auxílio de uma bomba peristáltica (*Rainin Instrument Co. Inc. – Dynamax, modelo RP-1*). A preparação ficava 30 minutos estabilizando-se antes do início dos registros. Após este período, uma célula de Sertoli era empalada com uma microeletrodo de vidro, sob controle visual.

### 3.2.1.2. *Preparação do Microeletrodo*

Para o registro intracelular foram utilizados microeletrodos, feitos a partir de uma micropipeta de vidro de borosilicato com diâmetro externo de 1,2mm, com filamento interno, que facilita seu posterior preenchimento (*World Precision Instruments, Inc., USA*). As pontas das micropipetas foram estiradas para possibilitar o empalamento, num estirador de pipetas vertical (*David Kopf Instruments, Tujunga, Califórnia - Vertical Pipette Puller – modelo 700C*). A intensidade do calor e a força do estiramento foram reguladas independentemente, até serem alcançados os parâmetros ideais para viabilizar o empalamento das células de Sertoli. A resistência ideal do microeletrodo para o empalamento de células de Sertoli é de 15 a 25 megaohms (MΩ) (VON LEBEDUR *et al.*, 2002). A fim de obterem-se resultados reprodutíveis na confecção dos microeletrodos, as correntes de ar eram excluídas e a temperatura ambiente era mantida estável em 21 - 22°C.



Uma vez confeccionados, os microeletrodos foram preenchidos com solução KCl 3M e conectados a um “holder” (eletrodo de prata) acoplado a um dispositivo ligado ao eletrômetro, que também foi preenchido com a mesma solução de KCl 3M, e fazendo contato elétrico com o eletrodo. O KCl utilizado era filtrado em papel filtro diariamente. O conjunto era então conectado ao eletrômetro. A movimentação mecânica do eletrodo para aproximação das células e empalamento era feita por um micromanipulador mecânico Kite-R (*World Precision Instruments, Inc., USA*) capaz de movimentos macros e micros nos três eixos.

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

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

### 3.2.1.3. Equipamento e Procedimento Eletrofisiológico

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

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

Ao mesmo tempo em que se media o potencial de repouso da membrana, o eletrômetro passava pulsos de corrente de 0,5 nA na célula. Esta corrente era originada em um estimulador capaz de gerar pulsos retangulares de corrente contínua, (S48 Stimulator - *Grass Instrument Division, W. Warwick, RI, USA*). Este estimulador regulava a frequência (0,5Hz) e a duração (250ms) desses pulsos. O dispositivo acoplado ao eletrômetro, que faz a interface com o “holder”, apresenta uma resistência de  $20 \times 10^6$  ohms, que reduz a corrente destes pulsos que chega às células em níveis compatíveis.

Quando uma célula era empalada, aguardava-se a estabilização de seu potencial de membrana e de sua resistência de membrana até que permanecessem estáveis, por no mínimo 2 minutos, e só então os agentes a serem investigados eram aplicados. Para evitar trabalhar com células germinativas, utilizou-se apenas células cujos potenciais de membrana eram mais negativos que  $-35\text{mV}$ , já que esse potencial de membrana é comumente registrado em células de Sertoli de túbulos seminíferos normais (EUSEBI *et al.*, 1983), e em túbulos seminíferos enriquecidos com células de Sertoli (SCE), através de irradiação *in útero* durante a gestação. Procedimento adotado para eliminar as células germinativas do tecido, restando apenas células de Sertoli (WASSERMAN *et al.*, 1992b). A resistência da membrana foi medida de acordo com Wassermann e colaboradores (1992b).

Os hormônios FSH e IGF-I foram aplicados topicamente no banho com pipeta automática, após a estabilização do potencial de membrana por aproximadamente 2 minutos ou associados ao tratamento com outras drogas. Soluções de antagonistas foram perfundidas nas células por 3 minutos antes da aplicação tópica dos hormônios. No experimento com toxina pertussis (PTX) os testículos foram pré-incubados por 3 horas antes do estiramento dos túbulos e procedimento eletrofisiológico.

#### 3.2.1.4. Cálculo da Intensidade do Pulso Aplicado

Para aplicar pulsos de corrente de 0,5nA, utilizou-se a lei de Ohm, como segue, para calcular a voltagem a ser aplicada pelo estimulador. Essa voltagem passava antes pelo eletrômetro, cuja resistência era de  $20 \times 10^6 \Omega$ .

corrente (A- ampère)

V = voltagem (V- volts)

R= resistência ( $\Omega$ - ohms)

LEI DE OHM:

$$I = V/R \Rightarrow V = I \times R$$

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

$$V = 10 \times 10^{-3} \text{ V}$$

$$V = 10 \text{ mV}$$

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

### 3.2.1.5. Cálculo da Resistência da Membrana

A resistência da membrana (R) foi calculada utilizando-se a lei de Ohm como segue abaixo:

I = corrente (A- ampère)

V = voltagem (V- volts)

R= resistência ( $\Omega$ - ohms)

LEI DE OHM:

$$I=V/R \Rightarrow R=V/I$$

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

A voltagem registrada no osciloscópio relacionado ao valor de resistência corresponde ao traçado vertical, obtido no registro do potencial de membrana da célula, em decorrência do pulso de corrente aplicado. O pulso de corrente aplicado era de 0,5nA.

### 3.2.2. EXPERIMENTOS DE TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS E CAPTAÇÃO DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$

#### 3.2.2.1. *Transporte de Aminoácido ( $^{14}\text{C}$ -MeAIB)*

Após o sacrifício dos animais, os testículos foram imediatamente removidos por incisão abdominal, limpos pesados e decapsulados. As gônadas foram colocadas em tubos controle e experimental, alternadamente esquerda e direita, contendo 1mL de KRb (Krebs Ringer bicarbonato). As mesmas foram pré-incubadas, por 50 minutos, em um incubador metabólico Dubnoff, em temperatura de 34°C em ambiente gaseificado com carbogênio ( $\text{O}_2:\text{CO}_2$ , 95:5, v/v), para a manutenção do pH.

O período de incubação foi de 45 minutos na presença de 3,7 kBq ou 0,2 $\mu\text{Ci}$  de [ $^{14}\text{C}$ ]MeAIB, com ou sem FSH ou IGF-I. Quando utilizado Wortmannin e PTX, estes foram aplicados durante todo o período de pré-incubação e de incubação; JB1 e verapamil foram aplicados 10 minutos antes da incubação e durante esta.

No fim dos experimentos de transporte de aminoácidos, os testículos foram removidos de seu meio de incubação, que é reservado, e o tecido foi armazenado em tubos com 1 ml de água destilada, posteriormente foram congelados e fervidos para alcançar o equilíbrio da água com o conteúdo intracelular do tecido. Alíquotas (0,1 ml) do líquido intracelular e do meio de incubação foram colocadas em 2 ml de líquido Aquasol 2 Optiphase e a leitura foi feita em um espectrômetro de cintilação LKB rack beta modelo 1215 (LKB-Producer AB, Bromma, Suécia) para a contagem da radioatividade do [ $^{14}\text{C}$ ]MeAIB. A eficiência de contagem é de 85-90%. Os resultados foram expressos pela razão tecido/meio: com  $\text{ml}^{-1}$  de tecido por com  $\text{ml}^{-1}$  do meio de incubação.

### 3.2.2.2. *Captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$*

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

O período de incubação foi de 2 minutos a partir da aplicação de KRb com  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  com ou sem FSH, IGF-I ou forskolina. Quando aplicados inibidores de eventos pós-receptor, estes eram adicionados 10 minutos antes da incubação, com exceção de Wortmaninn e PTX, que foram aplicados a partir do início do período de pré-incubação. Para finalizar a incubação foi adicionado à cada tubo, 1 ml de cloreto de lantânio ( $\text{LaCl}_3$ ) (10 mM) à 0°C, interrompendo o fluxo de cálcio na preparação (BATRA E SJOGREN, 1983). O sobrenadante foi preservado, e os testículos foram removidos para tubos com 1 ml de água destilada. O tecido foi congelado e posteriormente fervido para que houvesse extravasamento do meio interno para a água destilada. Alíquotas de 0,1ml foram retiradas de cada tubo (sobrenadante e meio interno) para medida da radioatividade em líquido de Aquasol 2 Optiphase, procedendo-se a leitura em um espectrômetro de cintilação LKB rack beta modelo 1215 (LKB-Producer AB, Bromma, Suécia). A eficiência de contagem é de 85-90%. Os resultados foram expressos pela razão pmoles  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ / g de tecido.

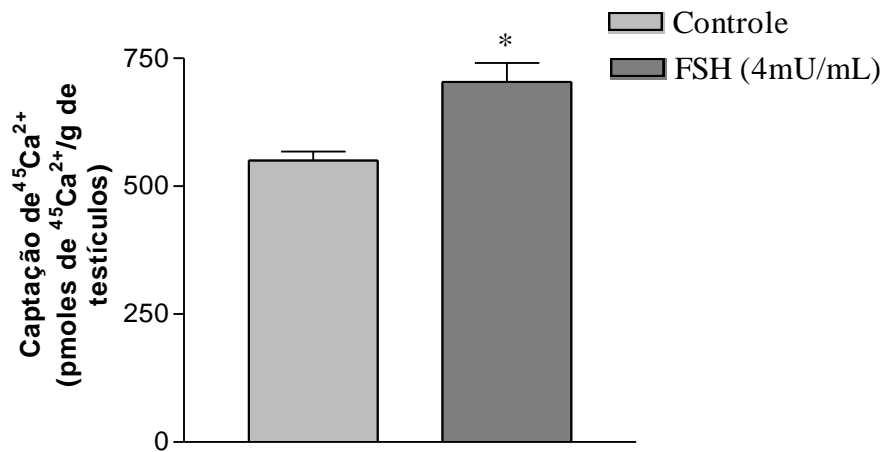
### 3.2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nos experimentos de registro intracelular os tratamentos eram repetidos pelo menos 5 vezes. O número de amostras por grupo era de no mínimo 5 nos experimentos de transporte de aminoácidos e de captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , cálculo amostral realizado com software *Winpepi* versão 9, utilizando um poder amostral de 80% e um intervalo de confiança de 95%. Para a análise estatística foram utilizados o Teste-t de Student para comparação entre dois grupos ou ANOVA de uma ou duas vias, conforme o experimento, seguido do pós-teste de Bonferroni. Foi utilizado o programa *InStat*, versão 3.01,32 bit para Windows 95/NT, da (*GraphPad Software*, San Diego, Califórnia, USA). Os testes específicos utilizados em cada experimento estão citados nos resultados. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0.05$ .

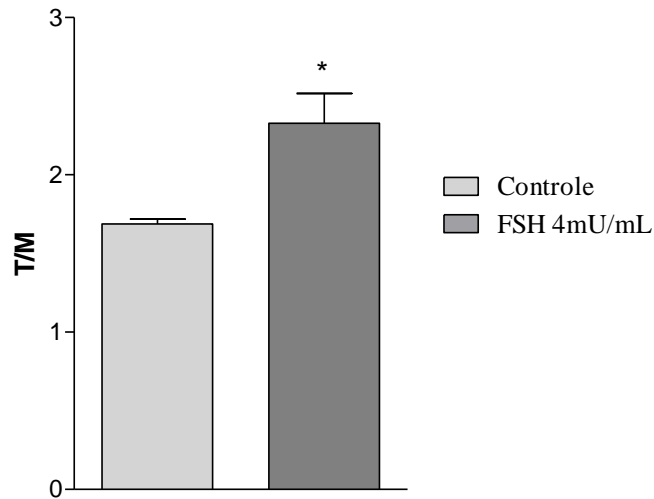


## 4. RESULTADOS

### 4.1. AÇÃO DO FSH SOBRE A CAPTAÇÃO DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$ E SOBRE O TRANSPORTE DE $[^{14}\text{C}]\text{MEAIB}$ , EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS IMATUROS (10-12 DIAS DE IDADE), EXPERIMENTOS COM TESTÍCULOS INTEIROS.

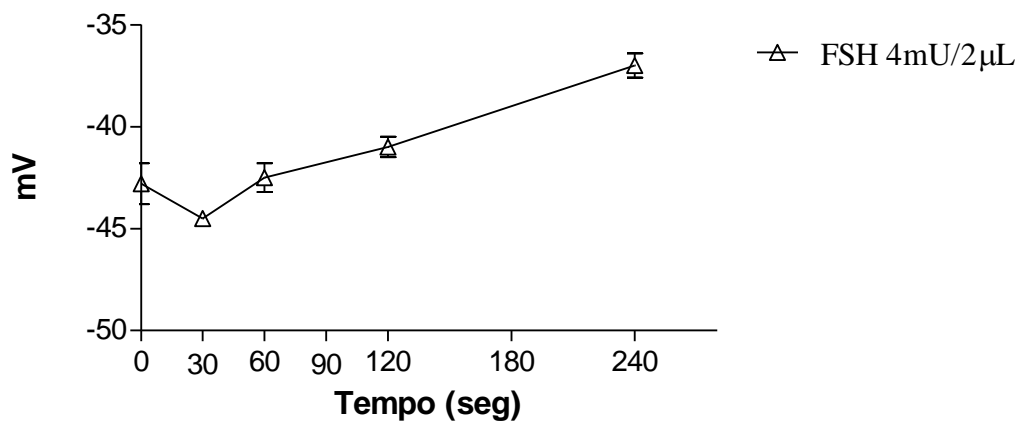


**FIGURA 4.1:** Ação de FSH (4mU/mL) sobre a captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  (pmoles de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ /g de testículo) em células de Sertoli, experimento realizado com testículos inteiros de ratos imaturos (10 dias de idade). (Teste t de *Student* \* $p < 0,05$ ;  $n = 15$ )



**FIGURA 4.2:** Ação de FSH (4mIU/mL) sobre o transporte de  $[^{14}\text{C}]\text{MeAIB}$  (relação tecido/meio-T/M) em células de Sertoli de ratos imaturos (testículos inteiros). (Teste t de Student \* $p < 0,05$ ;  $n = 30$ ) (Wassermann *et al*, 1992b).

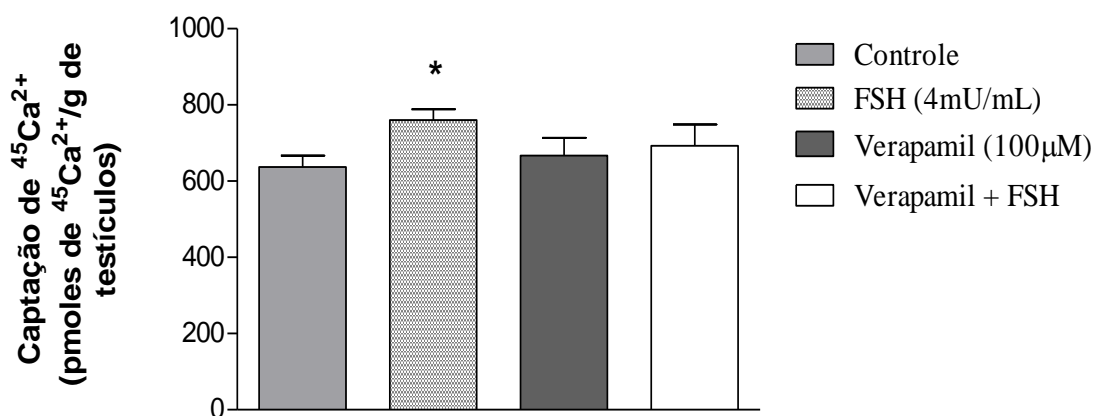
#### 4.2. AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DE FSH SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA DAS CÉLULAS DE SERTOLI



**FIGURA 4.3:** Ação Eletrofisiológica de FSH nas células de Sertoli de ratos imaturos (Wassermann *et al*, 1992b).

### 4.3. BLOQUEIO DOS CANAIS DE CÁLCIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM DO TIPO L ( $Ca_{v1}$ ) POR VERAPAMIL (100 $\mu$ M)

FSH estimula a captação de  $^{45}Ca^{2+}$  em células de Sertoli de ratos imaturos, sendo esta ação mediada por  $Ca_{v1}$ . O bloqueio destes canais por verapamil inibe o estímulo de FSH neste parâmetro, indicando que este subtipo de CCDV está envolvido na ação do FSH nas células de Sertoli imaturas. Verapamil também atua sobre a ação de FSH sobre o transporte de [ $^{14}C$ ]MeAIB (Wassermann *et al*, 1992a) e sobre a resposta eletrofisiológica despolarizante do hormônio (Wassermann *et al*, 1992b).

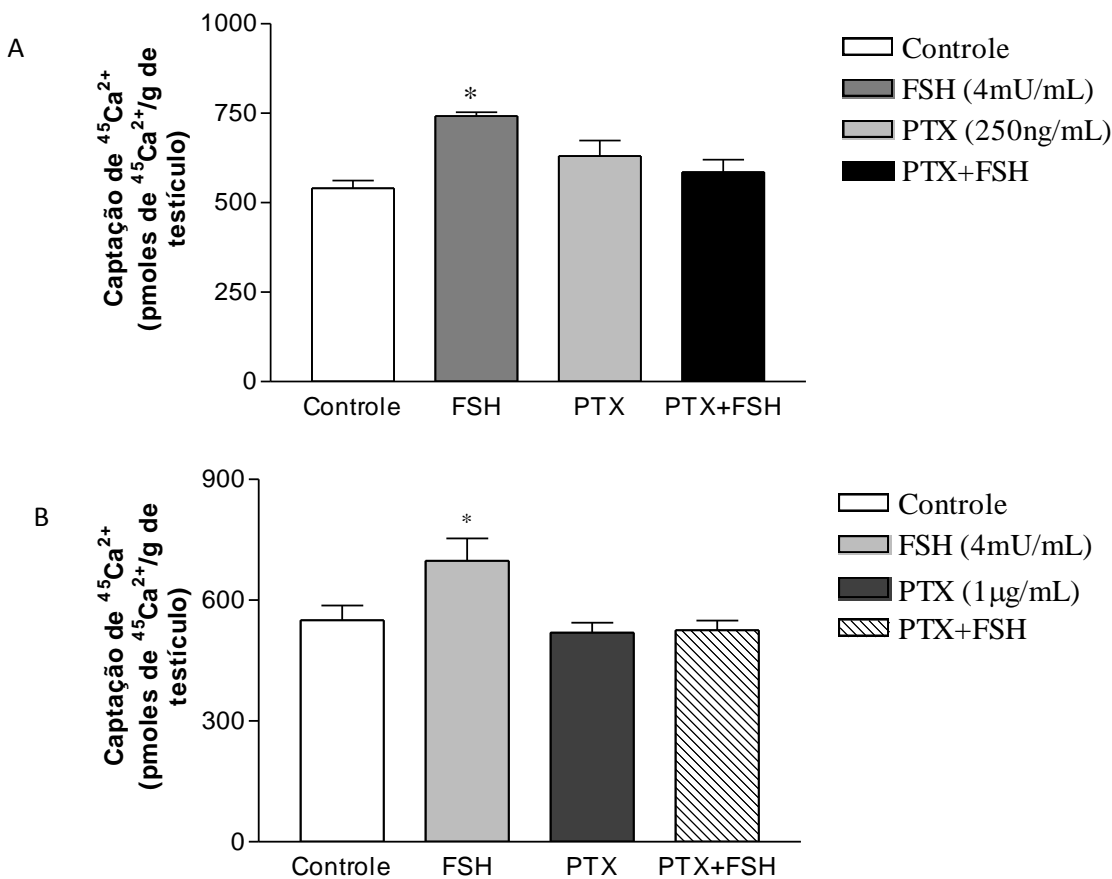


**FIGURA 4.4:** Ação FSH sobre a captação de  $^{45}Ca^{2+}$  (pmoles  $^{45}Ca^{2+}$ /g de testículo) 4mU/mL, em células de Sertoli, com e sem Verapamil 100 $\mu$ M, em experimentos com testículos inteiros de ratos imaturos (ANOVA de uma via \* $p < 0,05$ ;  $n = 10$ )

#### 4.4. AÇÃO DE TOXINA PERTUSSIS (PTX) SOBRE PARÂMETROS ESTIMULADOS POR FSH EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS IMATUROS (EXPERIMENTOS EM TESTÍCULOS INTEIROS).

O efeito estimulatório de FSH sobre a captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  foi anulado pela ação de PTX 250ng/mL (FIG 4.4.1A) e 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$  (FIG 4.4.1B), após 1 hora e 3 horas de incubação, respectivamente. Também ocorreu inibição por PTX (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) sobre o transporte de [ $^{14}\text{C}$ ]MeAIB, estimulado por FSH (FIG 4.4.2). Estes dados demonstram que a rápida ação de FSH nestes parâmetros metabólicos, é mediada por GPCR-Gi através da subunidade  $\text{G}\beta\gamma$ .

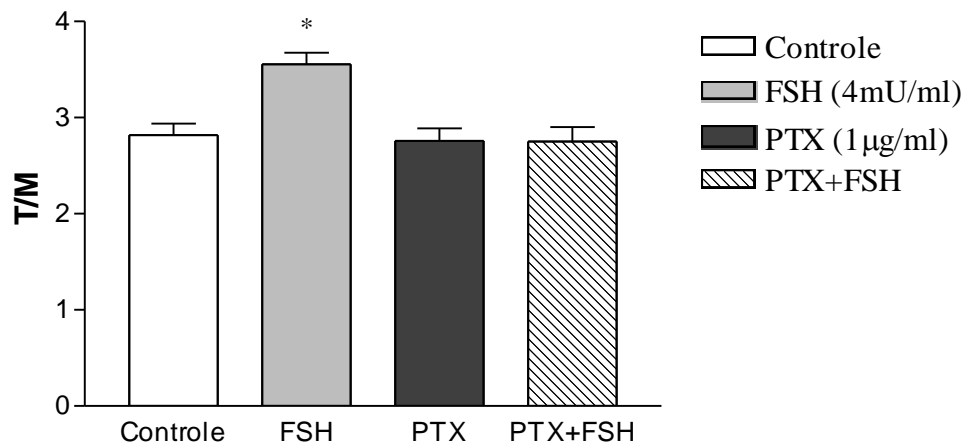
##### 4.4.1. ESTÍMULO DO FSH (4mIU/ML) SOBRE A CAPTAÇÃO DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS IMATUROS, É INIBIDO NA PRESENÇA DE TOXINA PERTUSSIS (PTX).



**FIGURA 4.5:** Estímulo do FSH (4mIU/mL) sobre a captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  (pmoles  $^{45}\text{Ca}^{2+}/\text{g}$  de testículo), com e sem PTX. (A) PTX 250ng/ml, com pré-incubação de 1 hora com o bloqueador, antes da incubação com hormônio (2 min.) (ANOVA de uma via \* $p < 0,05$ ;  $n = 5$ ).

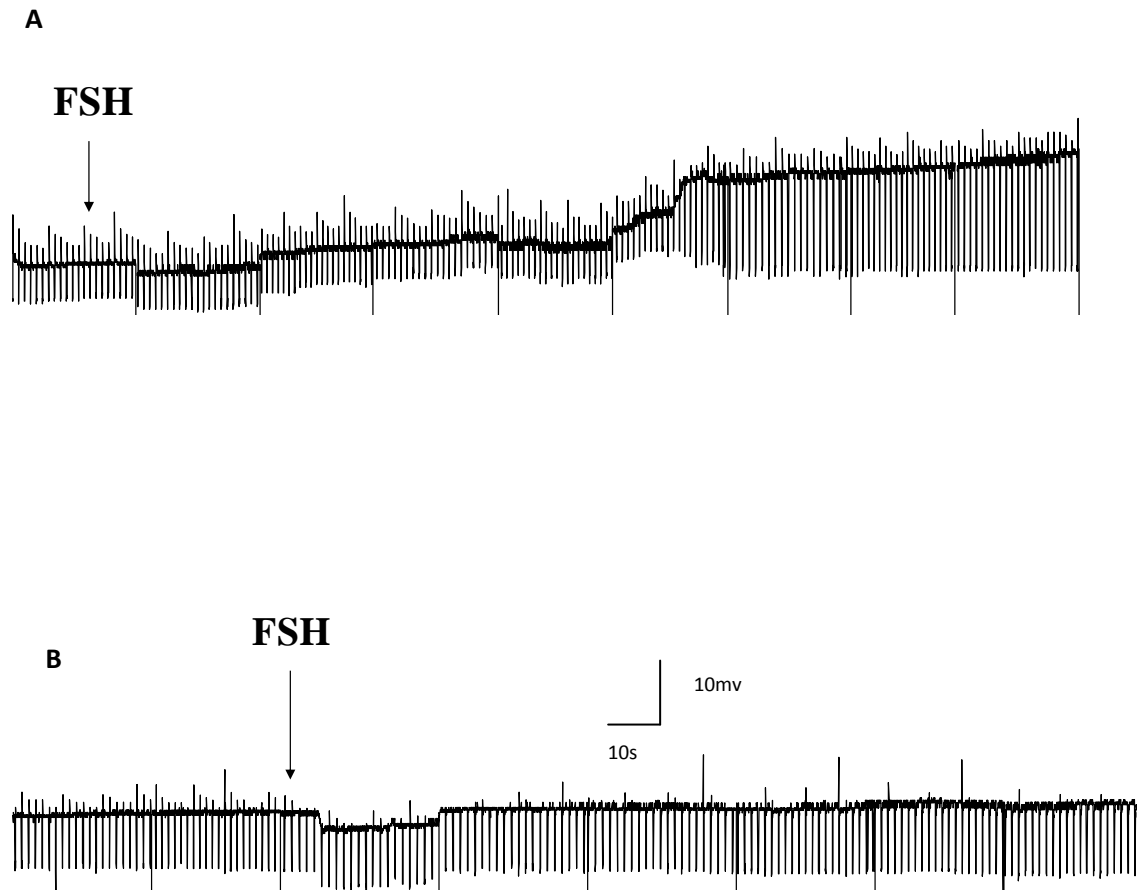
(B) PTX 1 $\mu$ g/mL, com pré-incubação de 3 horas com o bloqueador, antes da incubação com hormônio (2 min.) (ANOVA de uma via \*p<0,05; n=10).

4.4.2. ESTÍMULO DO FSH (4MU/ML) SOBRE O TRANSPORTE DE [<sup>14</sup>C] MEAIB É ANULADO NA PRESENÇA DE TOXINA PERTUSSIS (PTX) 1 $\mu$ G/ML.



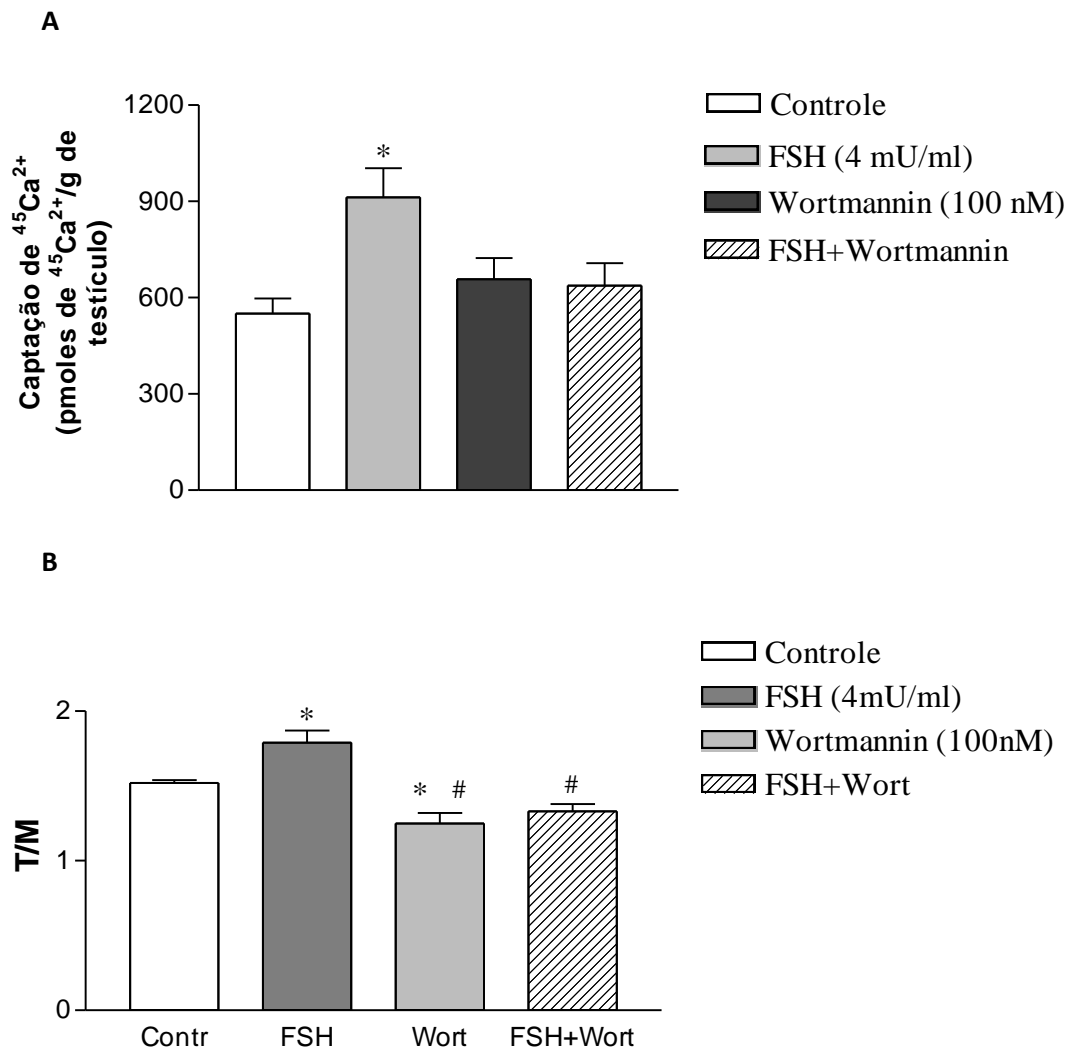
**FIGURA 4.6:** Estímulo do FSH (4mIU/mL) sobre o transporte de [<sup>14</sup>C] MeAIB (relação tecido/meio-T/M), em células de Sertoli (testículos inteiros) de ratos imaturos (10-12 dias de idade) com e sem a presença da Toxina Pertussis 1 $\mu$ g/mL (PTX), adicionada na pré-incubação, com tempo de 3 horas antes da incubação com hormônio. (ANOVA de uma via \*p<0,05; n=10).

4.4.3. REGISTRO ELETROFISIOLÓGICO DA AÇÃO DE PTX 1 $\mu$ G/ML (3 HORAS DE INCUBAÇÃO) SOBRE O PM DE CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS IMATUROS



**FIGURA 4.7:** (A) Registro eletrofisiológico da resposta de FSH sobre o potencial de membrana das células de Sertoli após 3 horas de incubação em Krb-Ringer com Glicose 3mM e (B) Registro eletrofisiológico da resposta de FSH sobre o potencial de membrana das células de Sertoli após 3 horas de incubação em Krb-Ringer com Glicose 3mM e com PTX (1 $\mu$ g/mL).

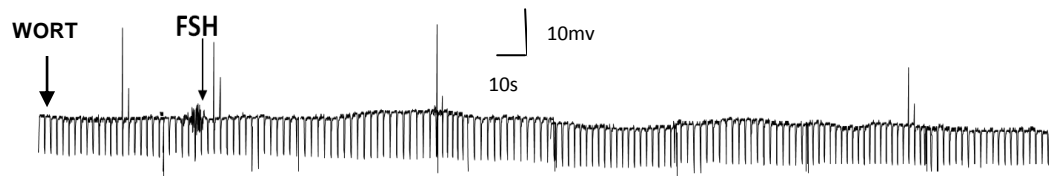
**4.5. A AÇÃO DE FSH INDUZINDO O AUMENTO NA CAPTAÇÃO DE  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  E O TRANSPORTE DE  $^{14}\text{C}$  MEAIB É INIBIDA PELO INIBIDOR DE PI3K, WORTMANNIN (100nM), EM CÉLULAS DE SERTOLI (EM EXPERIMENTOS COM TESTÍCULOS INTEIROS).**



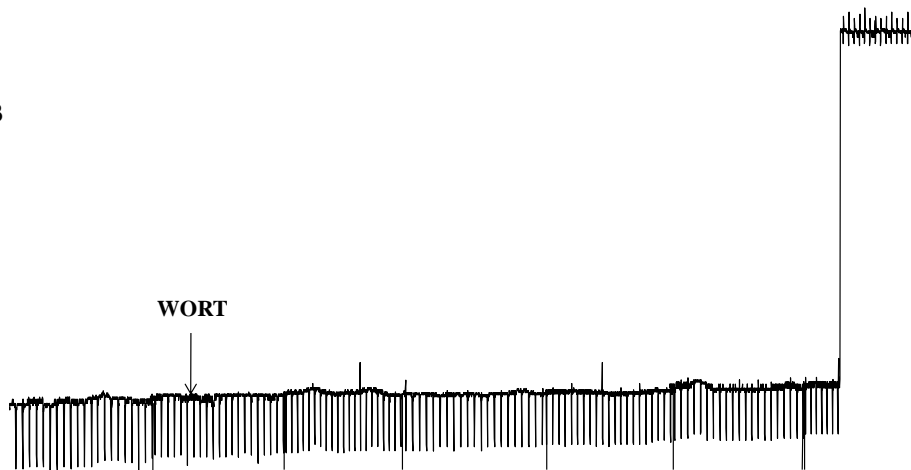
**FIGURA 4.8:** (A) O estímulo de FSH sobre a captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  (pmoles  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ /g de testículo) com e sem a presença de Wortmannin (100nM), em testículos inteiros. (ANOVA de uma via \* $p < 0,05$  em relação ao controle;  $n = 10$ ). (B) Inibição do estímulo de FSH sobre o transporte de  $^{14}\text{C}$ MeAIB (relação tecido/meio-T/M) por Wortmannin (100nM), em testículos inteiros. (ANOVA \* $p < 0,05$  em relação ao controle; # $p < 0,05$  em relação a FSH;  $n = 5$ ).

4.5.1. REGISTRO ELETROFISIOLÓGICO DA AÇÃO DE WORTMANNIN (100nM) SOBRE O PM DAS CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS IMATUROS E MODULANDO A RESPOSTA DE FSH SOBRE PM DAS CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS IMATUROS

A



B



**FIGURA 4.9:** (A) Wortmannin (100nM), aplicado tópicamente 2 minutos antes da aplicação tópica de FSH (4mIU),

A aplicação de wortmannin inibiu a resposta eletrofisiológica de FSH sobre o PM das células de Sertoli de ratos imaturos (15 dias). (B) Ação de Wortmannin (100nM) sobre o PM de células de Sertoli de ratos imaturos .

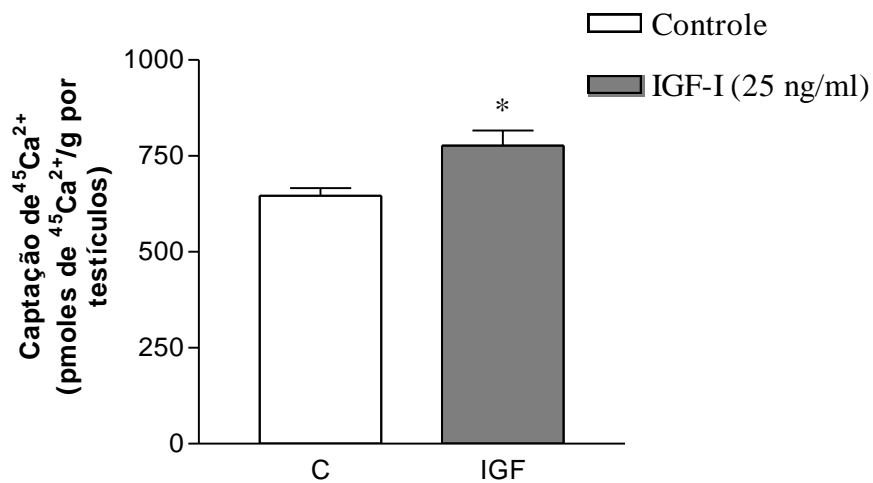
Após a pré-incubação com o inibidor de PI3K, Wortmaninn (100nM), a administração de FSH não causou aumento na captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  nem no transporte de  $[^{14}\text{C}] \text{MeAIB}$ . Estes dados demonstram que a ação de FSH tanto na captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , quanto no transporte de  $[^{14}\text{C}] \text{MeAIB}$ , através do sistema A são mediados por PI3K. A ação



eletrofisiológica de wortmaninn não alterou o potencial de membrana, entretanto inibiu a ação FSH sobre a variação do PM.

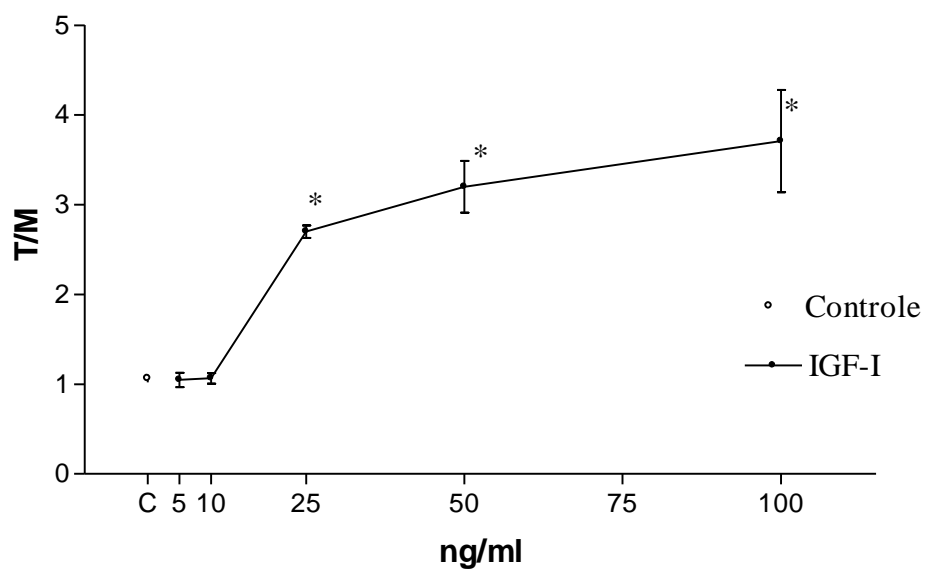
#### 4.6. AÇÃO DE IGF-I SOBRE MARCADORES DE AÇÃO HORMONAL EM TESTÍCULOS INTEIROS.

##### 4.6.1. AÇÃO DE IGF-I SOBRE A CAPTAÇÃO DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$ EM CÉLULAS DE SERTOLI, EM EXPERIMENTOS COM TESTÍCULOS INTEIROS



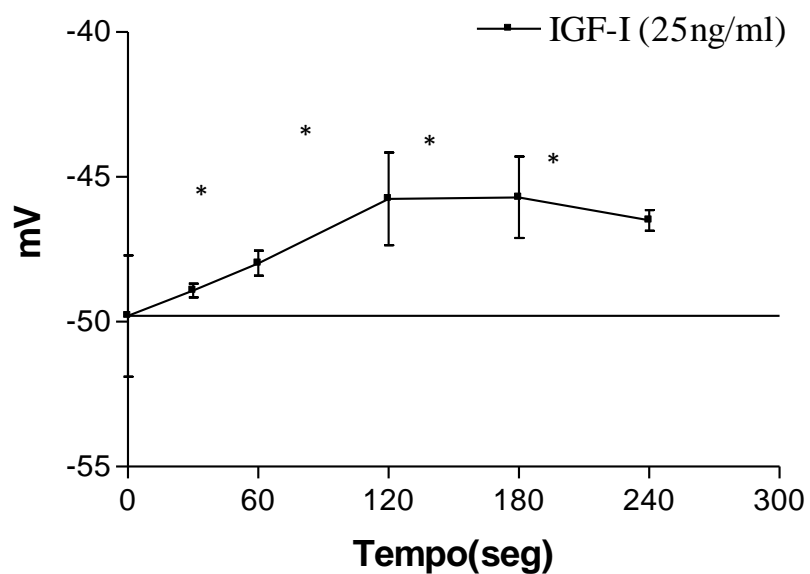
**FIGURA 4.10:** Ação de IGF-I sobre a captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  (pmoles de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ /g de testículo) em testículos inteiros de ratos imaturos (10 dias de idade). (Teste t de Student \* $p < 0,05$  n=10).

#### 4.6.2. AÇÃO DE IGF-I SOBRE O TRANSPORTE DE [<sup>14</sup>C] MEAIB EM TESTÍCULOS INTEIROS



**FIGURA 4.11:** Ação de IGF-I sobre a captação de [<sup>14</sup>C] MeAIB com 5, 10, 25,50, 100ng/mL. (Teste t de *Student* \*p<0,05 em relação ao PM basal; n=10).

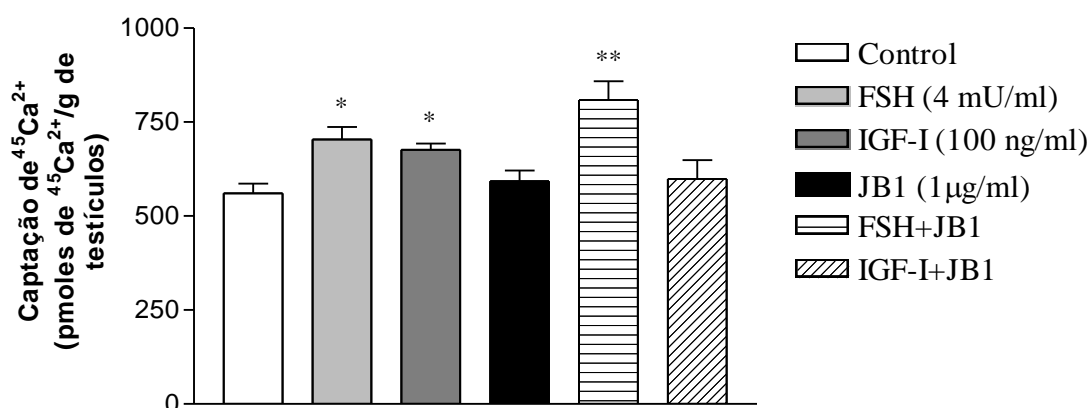
4.6.3. AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DE IGF-I SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA DE CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS IMATUROS



**FIGURA 4.12:** Ação eletrofisiológica de IGF-I (25ng/mL) sobre o potencial de membrana das células de Sertoli. (ANOVA de uma via \* $p < 0,05$ ;  $n = 10$ ).

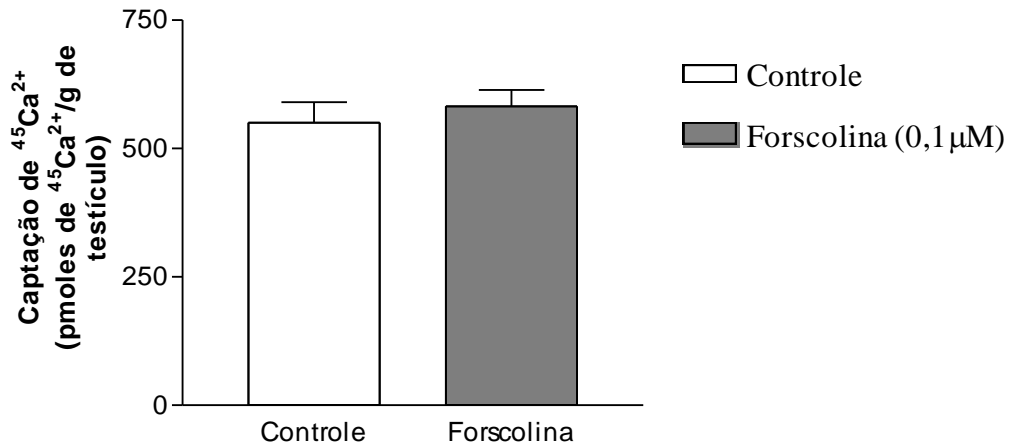
#### 4.7. AÇÃO DE JB1 SOBRE DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$ E O TRANSPORTE DE $[^{14}\text{C}]$ MEAIB MODULANDO A AÇÃO DE IGF-I E FSH EM CÉLULAS DE SERTOLI

A captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  e o transporte de  $[^{14}\text{C}]$  MeAIB estimulado por IGF-I foi inibido por JB1, entretanto o bloqueador de IGF-IR não bloqueou a ação do FSH (FIG.4.7.1) indicando uma dissociação entre a ação do FSH da via autócrina de IGF-I.

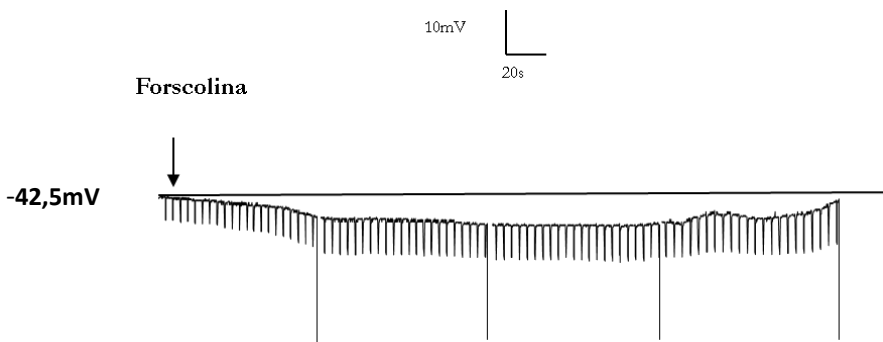


**FIGURA 4.13:** Ação de JB1 sobre a captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  (pmoles de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ /g de testículo) estimulada por FSH e IGF-I.

**4.8. ADENILIL CICLASE NÃO ESTÁ ENVOLVIDA NAS AÇÕES ESTIMULATÓRIAS DE FSH SOBRE A NA CAPTAÇÃO DE  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ .**



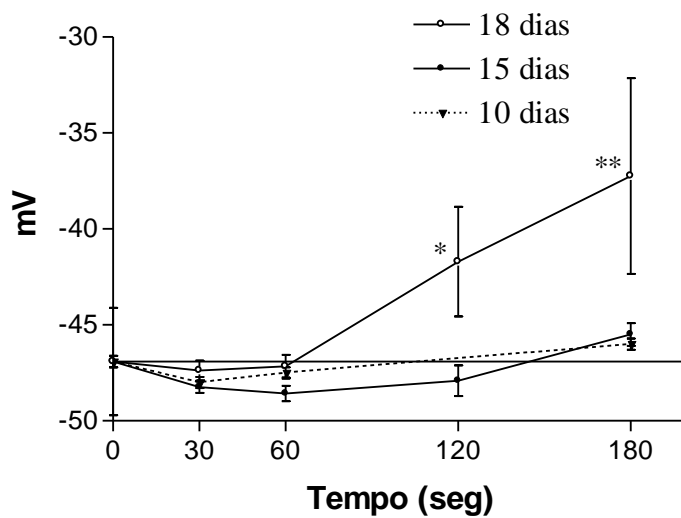
**FIGURA 4.14:** Ação de Forscolina (0,1 $\mu\text{M}$ ) sobre a captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  em testículos inteiros.



**FIGURA 4.15:** Registro eletrofisiológico da ação de Forscolina sobre o PM das células de Sertoli de ratos imaturos (Teste t de *Student*  $p < 0,05$ ;  $n = 4$ ) (JACOBUS *et al*, 2005)

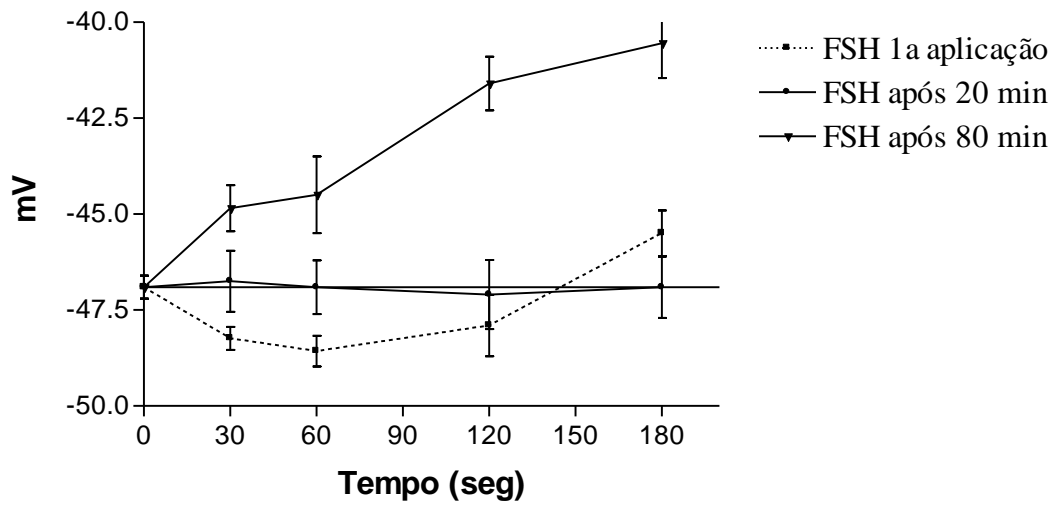
#### 4.9. VARIACÕES DO PM EM CÉLULAS DE SERTOLI NO PROCESSO DE SINALIZAÇÃO DE FSH.

##### 4.9.1. AÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DE FSH EM CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS COM 10, 15 E 18 DIAS DE IDADE



**FIGURA 4.16:** Resposta eletrofisiológica de FSH sobre o potencial de membrana (PM) de células de Sertoli de ratos com diferentes idades. (ANOVA \* $p < 0,05$ ;  $n=5$ ).

4.9.2. DESSENSIBILIZAÇÃO NA RESPOSTA ELETROFISIOLÓGICA DE FSH ATRAVÉS DE EXPOSIÇÃO DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS A DOSES REPETIDAS DA GONADOTROFINA



**FIGURA 4.17:** Registro eletrofisiológico demonstrando a dessensibilização estimulada pela aplicação de FSH em intervalos de tempos determinados;

## 5. DISCUSSÃO DE RESULTADOS

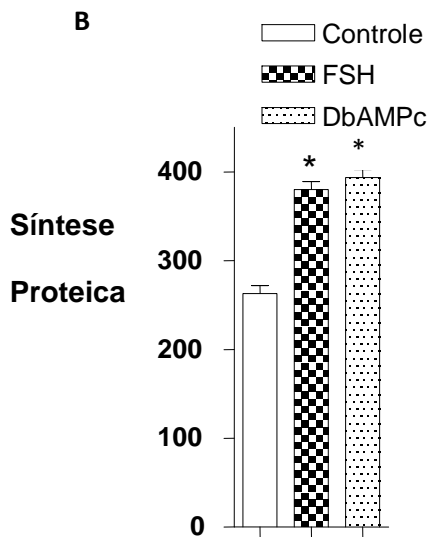
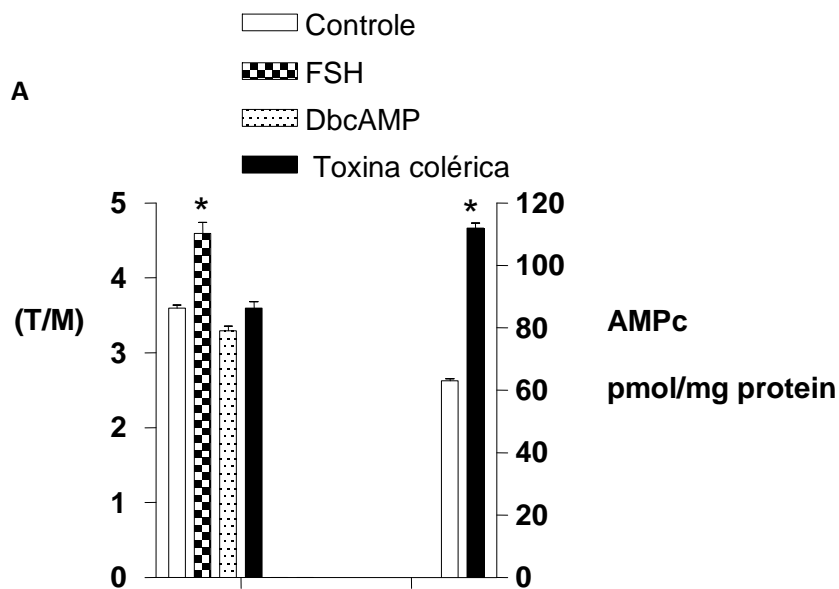
Os resultados obtidos neste trabalho demonstram a modulação dos canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L ( $Ca_{v1}$ ) pelos receptores acoplados à proteína G (GPCR), em células de Sertoli de ratos imaturos.

Uma vez ativado pelo FSH, o GPCR desacopla as subunidades  $G_{\alpha i}$  e  $G\beta\gamma$ , e este dímero estimula, nesta fase de desenvolvimento celular, os  $Ca_{v1}$  através do aumento da atividade de PI3K (VIARD *et al*, 1999). Esta ação do FSH foi inibida por verapamil indicando que o estímulo do hormônio ocorre via CCDV do tipo L ( $Ca_{v1}$ ).

O mecanismo responsável pelo efeito estimulatório de  $G_i$ - $G\beta\gamma$  sobre a atividade dos canais  $Ca_{v1}$  foi analisado neste trabalho. Estudos similares demonstraram que a condutância através de  $Ca_{v1}$  é ativada pela ação de PI3K acoplada ao GPCR em outras células (VIARD *et al*, 1999; VECCHIONE *et al*, 2005). Esta sinalização, iniciada no GPCR, está relacionada às enzimas da classe IB de PI3K ( $PI3K_{\gamma}$ ), ativadas na presença do dímero  $G\beta\gamma$  (VIARD *et al*, 1999).

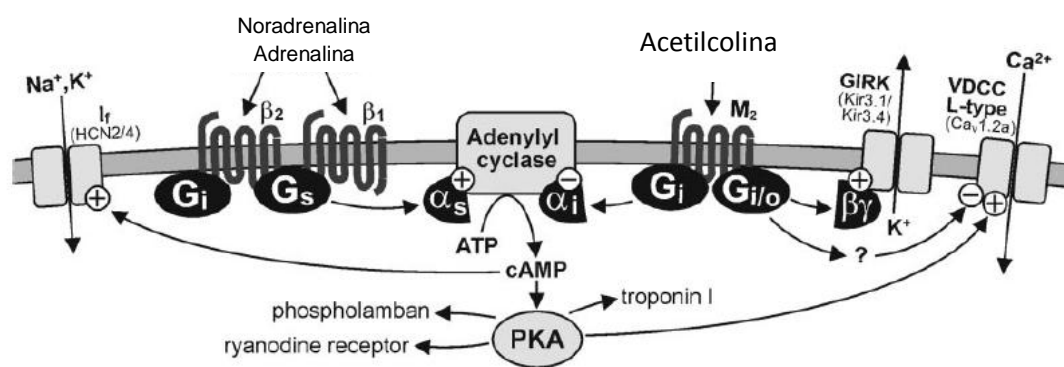
Diante destas evidências, e em razão de observações anteriores, nas quais foi verificado que FSH estimula o transporte de aminoácidos ( $[^{14}C]$ MeAIB) de forma independente da via  $G_{\alpha s}$ -AC-AMP (FIG 5.1) (IRUSTA E WASSERMANN, 1974; PEREZ-SANCHES E WASSERMANN, 1981), além de saber que o transporte de  $[^{14}C]$ MeAIB ocorre de maneira associada à captação de  $^{45}Ca^{2+}$  (WASSERMANN *et al*, 1992a; WASSERMANN *et al*, 1992b), restava determinar qual a via estimulada por FSH nestas ações, nas células de Sertoli de ratos imaturos.





**FIGURA 5.1:** Gráficos comparativos da ação de FSH e AMPc sobre a captação de  $[^{14}\text{C}]\text{MeAIB}$  (A) e Síntese protéica em ratos imaturos(B) (adaptado de IRUSTA E WASSERMANN, 1974 & PEREZ-SANCHES E WASSERMANN, 1981).

Estudos em miócitos cardíacos e vasculares indicaram que os receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos e  $AT_1$ , respectivamente, podem atuar através de diferentes isoformas de proteína G associada ao GPCR, ou seja, um mesmo GPCR pode ter mais de um subtipo de proteína G acoplada, sendo estas iguais ou não (XIAO *et al*, 1995, VECCHIONE *et al*, 2005, WETTSCHURECK E OFFERMANS, 2005) (Fig 5.2).



**FIGURA 5.2:** Papel da proteína G mediando funções através de receptores adrenérgicos e muscarínicos com a presença de subunidades diversas de proteína G ( $G_i$  e  $G_s$ ). Gerando múltiplas ações a partir da ligação do agonista. (Adaptado de WETTSCHURECK E OFFERMANS, 2005).

É descrito por diversos autores, que há evidências da presença da subunidade  $G_{\alpha i}$  em células de Sertoli de ratos (MÔNACO E CONTI, 1987, HUHTANIEMI *et al*, 1989) e de hamsters (DAVENPORT E HEINDEL, 1987) isoladas, em cultura, bem como em túbulos seminíferos inteiros (HUHTANIEMI *et al*, 1989), além da subunidade  $G_{\alpha s}$  já bem descrita (WALKER E CHENG, 2005). Também é descrito que em diferentes estágios do ciclo seminífero, em ratos maduros sexualmente, ocorre a diminuição da síntese de AMPc através

da ação do FSH (estágios VII-VIII) via  $G_{\alpha i}$ , o que não ocorre em outras fases do ciclo espermatogênico.

Além de ser destacado na literatura (HUHTANIEMI *et al*, 1989), que a oscilação na síntese de AMPc não se dá por ausência das subunidades  $G_{\alpha s}$  ou  $G_{\alpha i}$ , acopladas ao receptor FSHR, mas ocorre através de outras vias regulatórias, as quais não eram conhecidas na época do estudo (1989). Entre estes fatores regulatórios, incluem-se peptídeos gonadais que modulam a secreção e a ação de FSH (inibina, ativina e folistatina) e isoformas de FSH com diferentes padrões de glicosilação, as quais possuem pontos isoelétricos diferenciados, levando o hormônio a apresentar ações biológicas distintas (ULLOA-AGUIRRE *et al*, 2007).

Com o objetivo de verificar se a proteína  $G_i$ , acoplada ao FSHR, estimulava a captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  (FIG 4.1) e o transporte de  $[^{14}\text{C}]\text{MeAIB}$  (FIG 4.2) em resposta à ligação de FSH, foi utilizada toxina pertussis, que impede a dissociação das subunidade  $G_{\alpha i}$ - $G\beta\gamma$  bloqueando a ação a partir destas subunidades. Foi observado que FSH 4mU/mL tem seu estímulo sobre a captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  e sobre o transporte de  $[^{14}\text{C}]\text{MeAIB}$  inibido na presença de PTX (250ng/mL e 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (FIG 4.5A, FIG 4.5B, FIG 4.5C). Também foi demonstrado que PTX inibe a despolarização evocada pelo hormônio (FIG 4.7). Resultados que evidenciam a sinalização de FSH através da subunidade  $G\beta\gamma$  nos parâmetros metabólicos citados acima.

Para confirmar a dissociação da captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  e do transporte de  $[^{14}\text{C}]\text{MeAIB}$ , da via  $G_{\alpha s}/\text{AC}/\text{AMPc}$  nas células de Sertoli de ratos imaturos, foi utilizada forskolina (0,1 $\mu\text{M}$ ), um agonista da adenilil ciclase, que não estimulou a captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  e apresentou somente hiperpolarização sobre o potencial de membrana destas células quando registrado quando registrado seu perfil eletrofisiológico (JACOBUS *et al*, 2005), ambos os experimentos foram feitos com a mesma dose de forskolina (FIG. 4.14).

A diversidade da sinalização do FSH depende do número de receptores presentes na superfície da membrana, da concentração do hormônio no plasma e das isoformas de FSH secretadas (AREY *et al*, 1997). Estudos de Arey e colaboradores (1997), em células da granulosa, demonstraram que diferentes isoformas de FSH podem ativar vias alternativas através da interação com GPCR. Estes diferentes padrões do FSH podem atuar aumentando ou diminuindo a concentração de AMPc intracelular, através do estímulo de G $\alpha$ s ou G $\alpha$ i, respectivamente. Nestes estudos foi verificada somente a modulação do AMPc, utilizando toxina colérica e toxina pertussis.

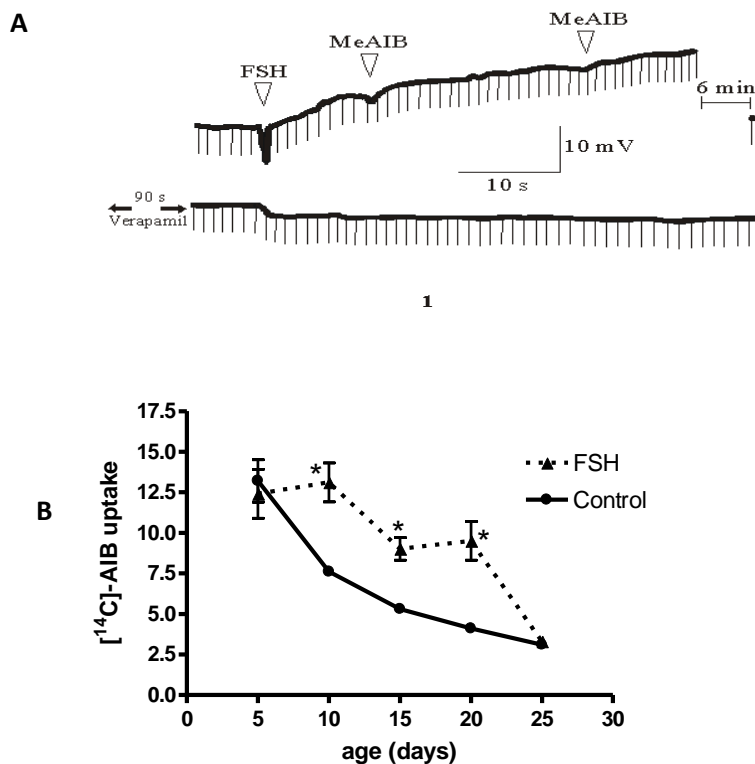
Grasso e Reichert (1989 e 1990) descrevem que FSH não atua no estímulo da captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  através de Gs (utilizando toxina colérica), nem através de Gi (utilizando toxina pertussis), entretanto seus achados são baseados em um protocolo no qual foi investigado o efeito crônico do FSH. Estes autores utilizaram um período de 24 horas de incubação com FSH em cultura de células de Sertoli isoladas, as quais foram testadas após *sete* dias da retirada dos ratos de 15 dias de idade (n=4).

Nós propusemos um protocolo para observar o efeito rápido do FSH em túbulos inteiros, mantendo o microambiente tubular, sendo este protocolo desenhado para mimetizar o efeito da gonadotrofina logo após a interação com seu receptor, lembrando que a exposição crônica de FSH dessensibiliza a resposta ao hormônio, através da internalização de seus receptores (FIG 5.3) (PIKETTY *et al*, 2006; KARA *et al*, 2006).

Em nosso protocolo experimental foi observado o efeito de membrana do FSH (através da modulação de FSHR), onde em poucos segundos a presença do hormônio altera o potencial de membrana e em 2 minutos foi observado que FSH estimula a entrada de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  através de canal de Ca $_{v1}$ , e do transporte de [ $^{14}\text{C}$ ]MeAIB, estes efeitos foram bloqueados por Verapamil, PTX e Wortmannin (Fig 4.4; FIG 4.5; FIG 4.6; FIG 4.8, respectivamente).

A captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , em células de Sertoli de ratos imaturos, também foi relatada por Dahia e Rao (2006), onde estes pesquisadores observaram que em 2 minutos ocorre o máximo da estimulação do FSH neste parâmetro, além de registrar que FSH estimula este mecanismo em ratos imaturos e não em ratos adultos.

Foi demonstrado também que ocorre bloqueio da captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , estimulada por FSH (4mU/mL) na presença de Verapamil (100 $\mu\text{M}$ ) (FIG 4.4). Este dado se relaciona a achados anteriores de nosso laboratório, entre eles, experimentos demonstrando que a fase despolarizante da resposta eletrofisiológica *bifásica*, estimulada por FSH (FIG 4.3), também é bloqueada por Verapamil e é aumentada na presença de MeAIB (WASSERMANN *et al*, 1992b) (FIG 5.3A), bem como o estímulo desta gonadotrofina no transporte de [ $^{14}\text{C}$ ]MeAIB (IRUSTA E WASSERMANN, 1974; PÉREZ-SANCHEZ E WASSERMANN, 1981; CRUZ-CURTE E WASSERMANN, 1985; WASSERMANN *et al*, 1992a). O transporte de [ $^{14}\text{C}$ ]MeAIB, através do sistema A, também foi bloqueado por Verapamil (WASSERMANN *et al*, 1992a) Todos estes dados foram obtidos em experimentos utilizando células de Sertoli de ratos imaturos, visto que ocorre uma diminuição estatisticamente significativa na ação de FSH sobre estes parâmetros, após 21 dias de idade dos animais (IRUSTA E WASSERMANN, 1974; PÉREZ-SANCHEZ E WASSERMANN, 1981; SPRITZERE WASSERMANN, 1985) (FIG 5.3B).



**FIGURA 5.3:** (A) Aumento da fase despolarizante da resposta eletrofisiológica de FSH, na presença de MeAIB. (WASSERMANN *et al*, 1992a); (B) Perfil da ação de FSH sobre o transporte de [<sup>14</sup>C]MeAIB em diferentes idades (PÉREZ-SANCHEZ E WASSERMANN, 1981).

A sinalização através de receptores de membrana com RTK e GPCR leva à ativação de PI3K, que atua fosforilando PIP2 à PIP3. O fosfolipídio formado (PIP3) estimula a migração de PKB/Akt à membrana, onde fosforila seu domínio PH, o que torna esta cinase suscetível à ativação por PDK1 e TORC2 (DONG E LIU, 2005). Uma vez fosforilada em dois domínios distintos, PKB/Akt pode atuar em várias vias, entre elas estimula a abertura de Ca<sub>v1</sub> (BOZULIC E HEMMINGS, 2009).

O bloqueador de PI3K inespecífico, Wortmaninn (100 $\mu$ M), inibiu o estímulo de FSH sobre a captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  e sobre o transporte de [ $^{14}\text{C}$ ] MeAIB, de maneira significativa (FIG 4.8), além de inibir a resposta eletrofisiológica de FSH nestas células (FIG 4.9).

A enzima PI3K é comum a muitas rotas de sinalização pós-receptores, entre elas as rotas iniciadas por GPCR e por receptores tirosina cinase (RTK) (TOKER, 2002; VECCHIONE *et al*, 2005). Contudo, a diferenciação destas ações ocorre através do estímulo de isoformas diferenciadas de PI3K, através de cada um dos receptores. Enquanto os RTK estimulam PI3K $\alpha$  e PI3K $\beta$  (PI3K classe IA), os GPCR estimulam PI3K $\gamma$  (PI3K classe IB) (VECCHIONE, 2005). Ainda não é conhecida a relação entre isoformas de PI3K e isoformas PKB/Akt, em relação à via de ativação (DOEPFNER, 2007; MORELLO *et al*, 2009). Encontram-se diversos relatos destas associações vinculadas a tecidos e situações fisiopatológicas específicas, como em células tumorais (WANG E BASSON, 2007; MORELLO *et al*, 2009). Estes mecanismos estão sendo muito explorados em virtude de que isoformas de PI3K e PKB/Akt podem ser alvo de futuras drogas inibidoras de crescimento celular, pois estas cinases sinalizam através de vias associadas a desenvolvimento e proliferação em diversas células, através de mecanismos fisiológicos ou patológicos (MARONE *et al*, 2008; HIRSCH *et al*, 2009, MORELLO *et al*, 2009).

Da mesma forma, nós demonstramos que IGF-I também estimula a captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  e o transporte de [ $^{14}\text{C}$ ] MeAIB (FIG 4.10 e FIG 4.11), além de provocar uma despolarização no potencial de membrana da célula de Sertoli. Sabe-se que FSH estimula a síntese e a secreção de IGF-I, nestas células, e IGF-I atua de forma autócrina nas células de Sertoli, sendo este processo mais evidente em ratos pré-púberes (MERONI *et al*, 2004, KHAN *et al*, 2002). Desta forma, se estabeleceu uma questão importante: o estímulo de FSH, sobre os parâmetros hormonais citados, ocorre de forma dependente ou independente do estímulo de IGF-I?

Para identificar se o mecanismo de FSH estava vinculado a sua ação sobre a síntese de IGF-I nas células de Sertoli de ratos imaturos, foi utilizado um análogo inativo de IGF-I, JB1 (1µg/mL), o qual obstrui o acesso do fator de crescimento a seu receptor cognato (IGF-IR). Não foram utilizados bloqueadores clássicos de RTK, pois os mesmos inibem a autofosforilação dos resíduos de tirosina do receptor, além de exercer esta ação em sítios de fosforilação de outras proteínas (MURPHY *et al*, 1993, DEUTSCH *et al*, 2004, WEN *et al*, 2001).

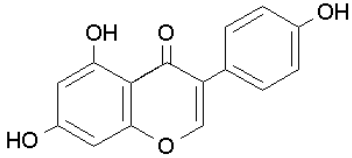
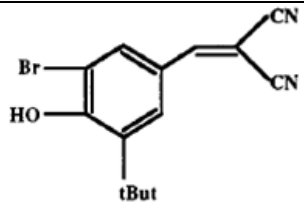
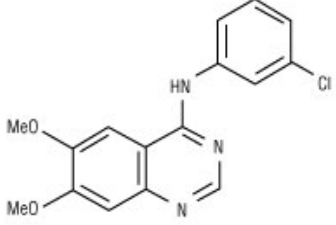
Entre estes bloqueadores clássicos, está a Genisteína (TAB.5.1). Dados da literatura indicam que este bloqueador parece não ser específico em relação ao RTK, pois é relatado em experimentos em plaquetas, que este derivado de isoflavonas, bloqueia a fosforilação induzida por fator ativador plaquetário (PAF) em proteínas com massa molecular entre 35-45kDa, faz uma redução parcial nesta ação em proteínas com massa molecular de 66-90kDa e afetam pouco a fosforilação de proteínas com massa molecular de 90-150kDa (MURPHY *et al*, 1993). Neste contexto, é importante salientar que a massa molecular de PKB/Akt apresenta 56kDa e a massa molecular do receptor IGF-IR situa-se entre 97-105kDa (SOOS *et al*, 1993).

Da mesma forma, Tyrphostin AG1024 (TAB.5.1), o qual foi desenvolvido como bloqueador específico de IGF-IR, tem sido relacionado à fosforilação de outras estruturas que acolhem ações de fosforilação em resíduos de aminoácidos. Dados da literatura demonstram que este bloqueador inibe a fosforilação de PKB/Akt, de forma direta, inibindo sua sinalização subsequente em células humanas de câncer de mama e em células de leucemia mielóide crônica, respectivamente (DEUTSCH *et al*, 2004, WEN *et al*, 2001). Também é relatado que outro bloqueador AG1478, inibidor de receptor tirosina cinase para EGF (EGFR), pode ter ação em outras estruturas, sem alterar a fosforilação do receptor (TANG *et al*, 2002). Neste trabalho, os autores relataram que ação de carbacol, estimulando o receptor muscarínico M3, em células de astrocitoma 1321N1, causa a fosforilação de Akt. Quando



estas células são tratadas com AG1478 a fosforilação de Akt, induzida por carbacol, é inibida, no entanto ao mesmo tempo não é observada a fosforilação de EGFR nesta ação, a qual ocorre via GPCR (TANG *et al*, 2002).

**TABELA 5.1:** Fórmulas estruturais de Genisteína, Tyrphostin AG1024 e Tyrphostin AG1478.

Bloqueador IGF-IR	Fórmula Química
<b>GENISTEÍNA</b>	 <p>The chemical structure of Genisteína is a flavonoid. It consists of a central chromone ring system. The A-ring (left) has hydroxyl groups at the 5 and 7 positions. The C-ring (right) has a hydroxyl group at the 4 position and is connected to a phenyl ring at the 2 position. The phenyl ring has a hydroxyl group at the 4 position.</p>
<b>AG1024</b>	 <p>The chemical structure of AG1024 is a substituted styrene derivative. It features a central carbon-carbon double bond. One carbon is attached to a phenyl ring with a bromine atom at the 3-position, a hydroxyl group at the 4-position, and a tert-butyl group at the 5-position. The other carbon is attached to two cyano groups.</p>
<b>AG1478</b>	 <p>The chemical structure of AG1478 is a pyridopyrimidine derivative. It features a pyridine ring fused to a pyrimidine ring. The pyridine ring has methoxy groups at the 3 and 4 positions. The pyrimidine ring has an NH group at the 2 position, which is attached to a phenyl ring with a chlorine atom at the 3-position.</p>

Em virtude destas dificuldades farmacológicas, optou-se por utilizar um bloqueador análogo de IGF-I (JB1), o qual interage com o sítio de ligação do receptor para o fator de crescimento, impedindo a ligação de IGF-I, sem alterar o status de fosforilação do receptor. (Pietrkowski,1993). Observou-se em nossos experimentos que JB1, na concentração de 1µg/mL, bloqueou o estímulo de IGF-I (100ng/mL) sobre a captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  (FIG 4.13), entretanto não inibiu o estímulo de FSH (4mU/mL) sobre esta sinalização, demonstrando que os efeitos de FSH e IGF-I ocorrem através de vias independentes. Resultado semelhante foi encontrado pelo grupo de Meroni e colaboradores (2004), onde FSH e IGF-I aumentaram os

níveis de PKB, sendo que a utilização de anticorpo monoclonal de IGF-I bloqueou este estímulo, apenas para a via sinalizada por IGF-I, não interferindo na ação de FSH sobre PKB.

Estes dados evidenciam que FSH e IGF utilizam vias independentes que estimulam a captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  em testículos de ratos imaturos (10-12 dias). Os mesmos hormônios demonstram um perfil eletrofisiológico diferente, onde a aplicação de FSH hiperpolariza em segundos o PM, e produz uma subsequente despolarização prolongada (6min) (Wassermann, 1992a) (FIG 4.3), já a aplicação de IGF-I produz uma despolarização, a qual apresenta um período em torno de 6 minutos (FIG 4.12). Há várias décadas, o aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  estimulado por FSH em células de Sertoli, tem sido uma incógnita. Muitos pesquisadores têm dedicado seus estudos com o objetivo de desvelar esta via hormonal. Entretanto, no decorrer do tempo, dificuldades técnicas no manejo desta célula aliadas à evolução do conhecimento sobre a célula de Sertoli, produziram dados controversos e muitas vezes conflitantes na literatura especializada.

Outro ponto importante a ser destacado, reside na consolidação de alguns paradigmas bioquímicos, principalmente no que diz respeito à célula de Sertoli. Os mecanismos bioquímico-fisiológicos evoluem, as técnicas desenvolvidas para desvendá-los também evoluem. Então, com este ponto de vista, as perguntas a serem feitas, através dos protocolos experimentais, devem ser interpretadas a partir dos dados observados, mesmo que estes estejam em dissonância com o descrito na literatura. Observa-se, nos artigos relacionados à célula de Sertoli e à ação do FSH na mesma, tentativas de enquadrar os resultados obtidos dentro de certo padrão. Observando os resultados deste trabalho e a diversidade de combinações possíveis através de inúmeras isoformas de proteína G; PI3K, PKB/Akt, e ainda relacionando aos diferentes padrões de glicosilação de FSH, secretado em diferentes momentos relacionados à variação de idade e/ou perfil hormonal, além das modificações celulares que ocorrem em resposta a diferentes estados nutricionais e metabólicos, tem-se uma

idéia de quão ampla e diversa pode ser esta sinalização, chamada por muitos de sinalização pleiotrópica.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o intuito de contribuir nesta plêiade de informações, propomos que FSH atue de maneiras diferenciadas, de acordo com a variação etária, em células de Sertoli. Em ratos imaturos (10-15 dias), FSH estimula, rapidamente (segundos a minutos), a captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  e o transporte de  $^{14}\text{C}]\text{MeAIB}$ . Estas ações foram bloqueadas por PTX, o que indica a participação da subunidade  $G\beta\gamma$  da proteína  $G_i$  nestas ações do hormônio. Esta hipótese foi corroborada pelo resultado que demonstra que forskolina (que estimula AC através da ativação de  $G_{\alpha s}$ ) não influencia na captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  nesta células imaturas.

Quando as ações estudadas de FSH foram inibidas por Wortmannin, foi demonstrando que a proteína  $G\beta\gamma$  atua via PI3K. Também foi demonstrado que na presença de Verapamil a captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , estimulada por FSH é bloqueada, o que demonstra que o  $\text{Ca}_{v1}$  é o alvo desta sinalização. Da mesma forma, o transporte de  $^{14}\text{C}]\text{MeAIB}$ , que está associado à captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , foi inibido pelas mesmas ferramentas farmacológicas neste e em trabalhos anteriores (Wassermann, 1992a).

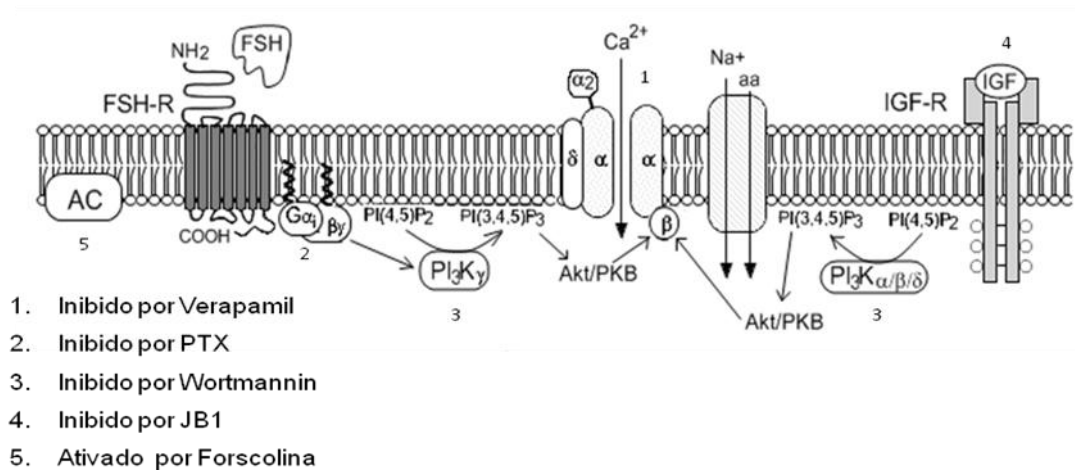
Também é importante ressaltar a complexa relação parácrina do FSH e outras moléculas. Neste trabalho, demonstramos a relação entre FSH e IGF-I agindo de forma cooperativa, nas ações estudadas, ambos estimulam a captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  e o transporte de  $^{14}\text{C}]\text{MeAIB}$ , mas os mecanismos de cada hormônio ocorrem através de vias diferentes e independentes. O que já foi demonstrado por outros autores em parâmetros diferentes do avaliados por nós (MERONI *et al*, 2004, KHAN *et al*, 2002).

Estas ações do FSH e IGF-I diminuem com o avanço da puberdade (VILLALPANDO *et al*, 2008, KHAN *et al*, 2002). IGF-I diminui sua ação, bem como a expressão de seus receptores aparecem reduzidas, após 21 dias (HANSSON *et al*, 1989). Entretanto FSH continua atuando em outros parâmetros após a puberdade, como na síntese de algumas proteínas e fatores importantes ao desenvolvimento da espermatogênese, o que demonstra uma dicotomia entre as funções proliferativas do FSH e suas funções na manutenção da espermatogênese.

Os resultados aqui discutidos permitem visualizar a possibilidade de que o mecanismo envolvido nas ações rápidas de FSH, em célula de Sertoli em ratos durante a fase proliferativa, seja mediado pela via  $Gi/G\beta\gamma/PI3K\gamma/PIP3/PKB-Akt/Cav1$ .

Entender como ocorre esta conversão, na célula de Sertoli, de imatura à madura, tanto na regulação de secreção de isoformas de FSH na hipófise, na interação destas com o FSHR, bem como nos mecanismos intracelulares sinalizados em cada fase de desenvolvimento, são pontos a serem estudados.

Citando Enrico Sertoli , em 1865, “Eu não acredito que as células ramificadas sejam destinadas à produção dos espermatozoides, entretanto não é possível negar categoricamente, mas eu penso que a função das células ramificadas está ligada a formação dos espermatozoides.” (SERTOLI, 1865).



**FIGURA 6.1:** Esquema hipotético da sinalização do FSH e IGF-I nas células de Sertoli de ratos imaturos, indicando os locais de bloqueios farmacológicos, bem como os bloqueadores utilizados para modular as ações de FSH e IGF-I em células de Sertoli de ratos imaturos.

## II. ADDENDUM

No transcorrer do desenvolvimento do trabalho de pesquisa, encontramos resultados que, a primeira vista, não tinham uma explicação aparente, ou em virtude de carências tecnológicas ou em decorrência do *status* científico do assunto do momento.

Muitas estratégias experimentais baseiam-se em modular a atividade de determinadas estruturas relacionadas ao suposto mecanismo a ser estudado. Para tanto se utilizam ferramentas farmacológicas, as quais são agonistas ou antagonistas de receptores, enzimas e canais iônicos. Entretanto, a ativação de mecanismos, vinculados a estas estruturas, são muitas vezes semelhantes. O que nos leva a questão inicial, ou seja, a utilização de ferramentas experimentais, pode em algum grau modular ações diversas das desejadas, produzindo resultados não esperados, dependendo do modelo experimental e do tecido estudado. Em uma exemplificação mais ampla, podemos relacionar estes resultados paralelos, como os efeitos adversos de vários fármacos.

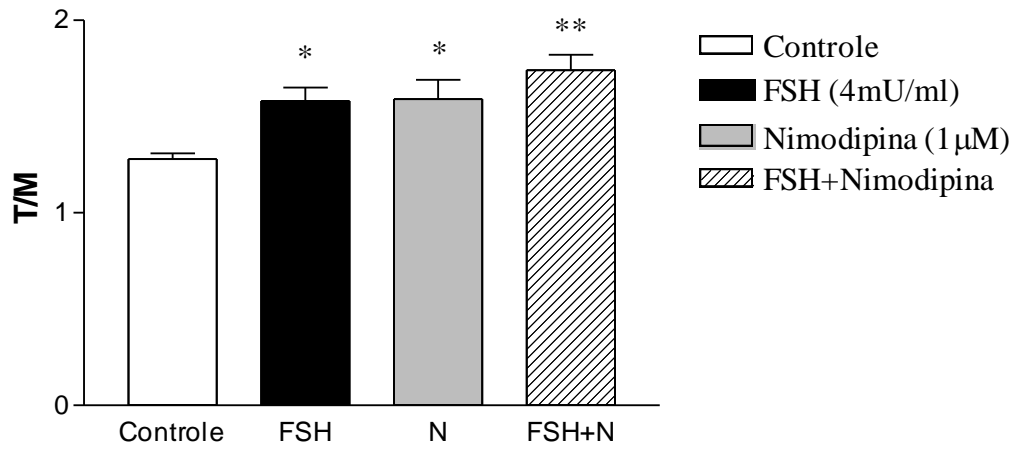
Neste contexto, em razão de ser a pesquisa a busca da verdade, e segundo Claude Bernard (1865) “*Teorias nada mais são que verdades parciais e temporárias que necessitamos, como etapas, na investigação o progresso...O essencial princípio da experimentação está, portanto, na dúvida, aquela dúvida filosófica que permite ao espírito liberdade e iniciativa...*”, observamos alguns resultados, os quais apresentaremos e discutiremos nesta seção.

## **IA. AÇÃO PARADOXAL DE BLOQUEADORES DE CANAIS DE $Ca^{2+}$ DEPENDENTES DE VOLTAGEM DO TIPO L.**

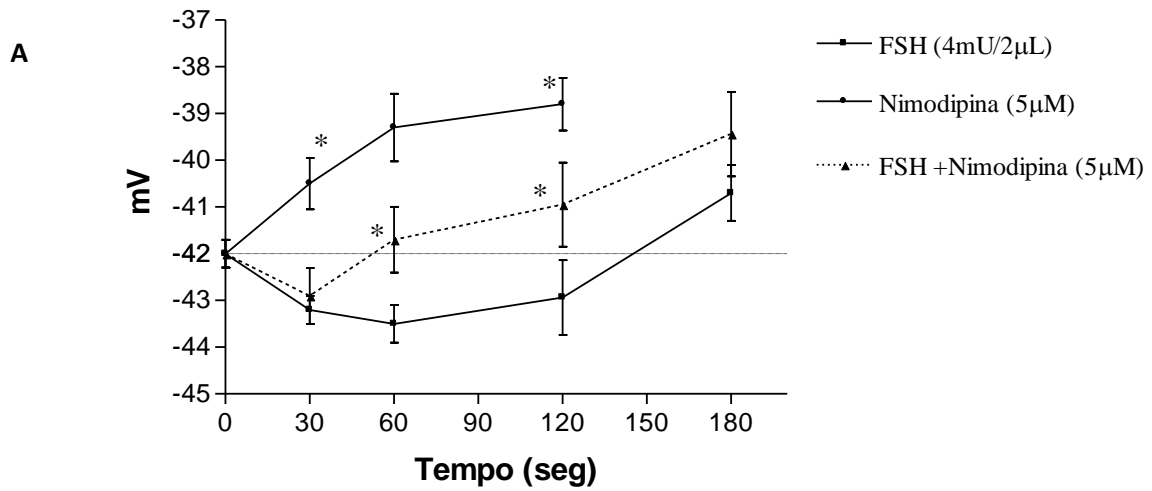
FSH estimula o transporte de aminoácidos [ $^{14}C$ ]MeAIB de forma independente da via *Gas-AC-AMP* (FIG 5.1) (IRUSTA E WASSERMANN, 1974; PEREZ-SANCHES E WASSERMANN, 1981), estando associado à captação de  $^{45}Ca^{2+}$ . Em nosso protocolo experimental foi observado o efeito de membrana do FSH (através da modulação de FSHR), onde em poucos segundos altera o potencial de membrana de maneira bifásica, e é observado, em 2 minutos, o estímulo da entrada de  $^{45}Ca^{2+}$  através de canal de  $Ca_{v1}$ . Ambos os transportes ( $^{45}Ca^{2+}$  e [ $^{14}C$ ]MeAIB) foram bloqueados por PTX, Wortmannin e Verapamil em células de Sertoli imaturas.

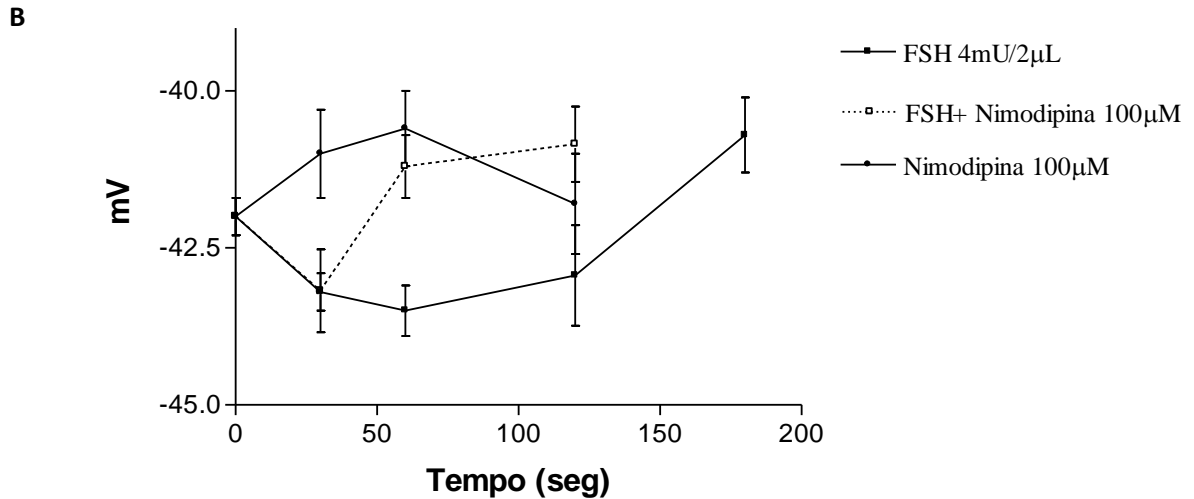
No desenvolvimento do trabalho, foram utilizados outros bloqueadores de canais  $Ca_{v1}$ , como as DHP (nimodipina e nifedipina). Entretanto, o que era observado transcendia a lógica, naquele momento. Estes bloqueadores são utilizados na clínica como antihipertensivos, atuando em canais de cálcio de miócitos cardíacos e vasculares. Nestas células, o bloqueio dos canais leva a um relaxamento pela diminuição de Cálcio intracelular, sendo esta ação dependente da dose. Em células de Sertoli a utilização de DHP, bloqueador de  $Ca_{v1}$ (CCDV do tipo L), aumentou o transporte de [ $^{14}C$ ]MeAIB, da mesma forma que despolariza o PM.





**FIGURA IA:** Ação da Nimodipina (1 $\mu$ M) sobre o transporte de [ $^{14}$ C]MeAIB (relação tecido/meio-T/M) estimulado por FSH (4mU/mL). (ANOVA \*p<0,05; \*\*p<0,01 n=20).





**FIGURA IIA:** Ação da Nimodipina (100µM e 5µM) sobre o potencial de membrana da célula de Sertoli e modulando a resposta de FSH (4mU/2µL). (Teste t de Student \* $p < 0,05$ ;  $n = 10$ ).

Para entender como um bloqueador de  $Ca_{v1}$  apresenta um efeito paradoxal, ou seja, diferente de outros bloqueadores, como o verapamil, para a mesma ação em células de Sertoli (WASSERMANN E LOSS, 1989), buscou-se na literatura relatos de outras ações destas estruturas. Entre os relatos, destaca-se um (SWEENEY E DOLPHIN, 1992) onde é demonstrado que os fármacos (DHP) que modulam a probabilidade de abertura dos CCDV (agonistas e antagonistas) também podem atuar em locais distintos dos citados, gerando ações muitas vezes inesperadas, de acordo com o tecido estudado.

Sweeney e Dolphin (1992) relataram que agonistas e antagonistas podem interferir na ação de GTPase relacionada à proteína Go/i onde, de forma dependente da dose, estas drogas aumentam o  $V_{máx}$  e diminuem o  $K_m$  deste tipo enzimático, em membranas de neurônios de córtex frontal. Segundo os autores, esta ação seria inibida por PTX. A ação de estímulo de GTPase é semelhante tanto para os agonistas com para os antagonistas testados, pois são

muito parecidos estruturalmente, sendo maior em doses maiores, principalmente para o antagonistas.

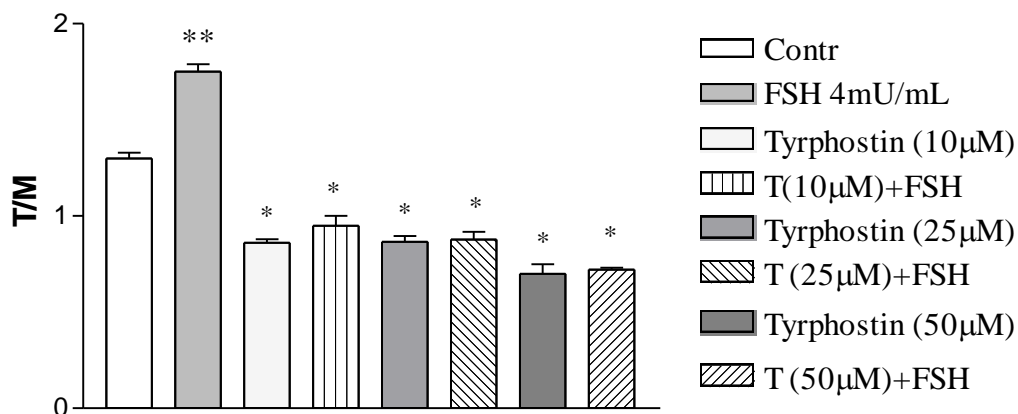
Então, o que podemos estar observando é uma ação de estímulo de GTPase das DHP relacionada à dose utilizada, utilizamos 1, 5 e 100 $\mu$ M. No artigo, os autores relatam que a dose de 0,3 do antagonista utilizado foi o valor onde não houve o estímulo da atividade GTPase.

Também é relatado na literatura que verapamil, uma fenilalquilamina, inibe a fosforilação de PKB/Akt na serina 473, necessária a sinalização desta cinase. Esta ação é induzida por insulina e IGF-1 através de seu receptor cognato (IR, IGF-IR), PI3K $\alpha$  ou  $\beta$ . O mecanismo estudado baseou-se na relação de indução de toxicidade por verapamil em altas doses, ação revertida por insulina através da competição pelo sítio de fosforilação de PKB/Akt (BECHTEL *et al*, 2008).

## IIA. AÇÃO DE BLOQUEADORES DA ATIVIDADE TIROSINA CINASE

Thyrphostin AG1024 (TAB.5.1) foi desenvolvido como bloqueador específico de IGF-IR, tem sido relacionado à fosforilação de outras estruturas que acolhem ações de fosforilação em resíduos de aminoácidos. Alguns pesquisadores demonstraram que este bloqueador inibe a fosforilação de PKB/Akt, de forma direta, inibindo sua sinalização subsequente em células humanas de câncer de mama e em células de leucemia mielóide crônica, respectivamente (DEUTSCH *et al*, 2004, WEN *et al*, 2001). Ação semelhante também foi relatada para outro bloqueador AG1478, inibidor de receptor tirosina cinase para EGF (EGFR), pode ter ação em outras estruturas, sem alterar a fosforilação do receptor (TANG *et al*, 2002). Neste trabalho, os autores relataram que ação de carbacol, estimulando o receptor muscarínico M3, em células de astrocitoma 1321N1, causa a fosforilação de Akt. Quando estas células são tratadas com AG1478 a fosforilação de Akt, induzida por carbacol, é inibida, no entanto ao mesmo tempo não é observada a fosforilação de EGFR nesta ação, a qual ocorre via GPCR (TANG *et al*, 2002).

Observamos que o bloqueador Thyrphostin AG1024 inibiu o transporte de [<sup>14</sup>C]MeAIB estimulado por FSH, ação diferente da observada quando utilizado um bloqueador análogo inativo de IGF-I (JB1) (PIETRZKOWSKI *et al*, 1992; PIETRZKOWSKI *et al*, 1993), o qual não atua inibindo os sítios de fosforilação do receptor. Descrevemos que FSH atua em células de Sertoli de ratos imaturos, através da via Gi/Gβγ/PI3Kγ/PIP3/PKB-Akt/Ca<sub>v1</sub>, então o resultado encontrado com Thyrphostin AG1024 pode ser um indicativo da ação de Akt sobre os Ca<sub>v1</sub>.



**FIGURA IIIA:** Ação de Thyrophostin AG1024 sobre a ação de FSH (4mIU/mL no transporte de  $[^{14}\text{C}]\text{MeAIB}$  (relação tecido/meio-T/M). (ANOVA \* $p < 0,05$  em relação ao controle e \*\* $p < 0,01$  em relação ao controle  $n=10$  por grupo).

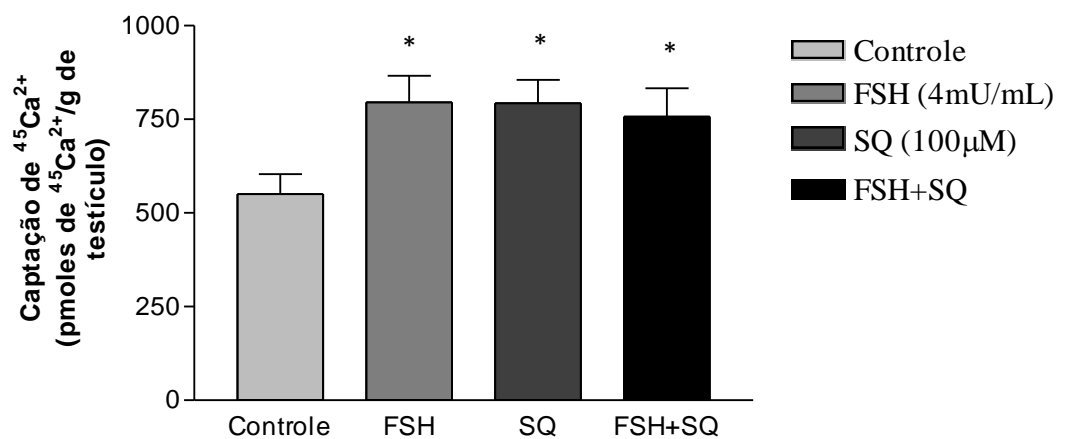
### III. AÇÃO DE BLOQUEADOR DE ADENILIL CICLASE SQ 22,536 (9(TETRAHIDRO-2-FURANIL)-9H-PURINA-6-AMINA).

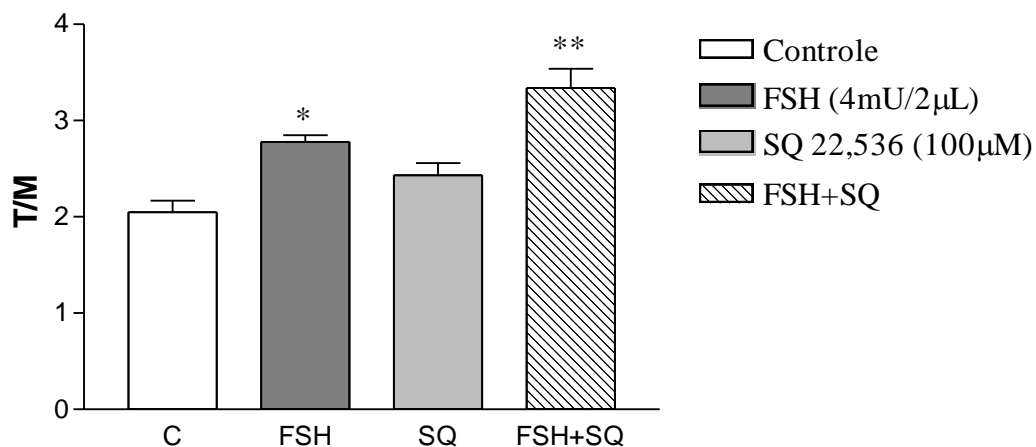
SQ 22536 (9-(Tetrahydro-2-furanil)-9H-purina-6-amina) é um inibidor de Adenilil ciclase capaz de fosforilar a enzima inibindo a interação de seus centros catalíticos C1 e C2. Estudos sobre a estrutura da adenilil ciclase, utilizando técnicas de mutagênese, mostraram que o local de ligação da subunidade Gas está no lado oposto ao local de ligação da subunidade G $\alpha$ i (DESSAUER *et al*, 1998). Para entender a regulação desta enzima é importante conhecer sua estrutura secundária e terciária, são descritos dois sítios catalíticos C1 e C2, sendo que forskolina e análogos ATP (ATP, APMC e inibidores Gas) ligam-se na interface entre os dois domínios, aumentando ou diminuindo a afinidade das mesmas. A subunidade Gas liga-se no domínio C1, e a subunidade G $\alpha$ i diminui a interação entre os dois sítios catalíticos, o que reduz a funcionalidade da enzima adenilil ciclase (TANG E GILMAN, 1991). Também é relatado que algumas isoformas de AC também podem ser moduladas por

outras moléculas como o complexo  $\text{Ca}^{2+}$  Calmodulina, a subunidade  $\text{G}\beta\gamma$  (atuando de forma estimulatória ou inibitória), RGS, modificações pós-translacionais como fosforilações ou a presença de miristoilações (SUNAHARA E TAUSSIG, 2002).

Foi utilizado o bloqueador de adenilil ciclase para ratificar a ação de FSH sobre a captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , já demonstrado pela utilização de forskolina, neste trabalho, e sobre o transporte de  $^{14}\text{C}$ MeAIB, esta última ação já identificada em trabalhos anteriores de Wassermann e colaboradores (IRUSTA E WASSERMANN, 1974; PEREZ-SANCHES E WASSERMANN, 1981).

No entanto, foi observado que o antagonista de adenilil ciclase, SQ 22,536 apresentou um estímulo *per se* sobre a captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , embora esta ação não tenha sido refletida no transporte de  $^{14}\text{C}$ MeAIB (FIG 3A), e o antagonista de AC não tenha bloqueado a ação de FSH sobre estes parâmetros.





**FIGURA IVA:** Ação de SQ 22536 (100µM) sobre o transporte de [<sup>14</sup>C]MeAIB e sobre a captação de <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>, na presença e ausência de FSH (4mIU/mL). (ANOVA \*p<0,05, n=5).

Alguns autores descreveram ação semelhante em outros modelos experimentais, Mitra e Bourreau (2005), observaram que SQ 22536 (9-(Tetrahydro-2-furânil)-9H-purina-6-amina) inibiu o efeito inotrópico positivo de adrenomedulina, potencializando o efeito inotrópico negativo, sendo esta ação sensível à PTX, ou seja via Gi, sugerindo que além de inibir a adenilil ciclase, SQ 22536 possa estimular Gi estimulando, neste modelo a redução de AMPc, através de G<sub>ai</sub>.

Weinryb e Michel (1974) e Haslam e colaboradores (1978), descreveram observações semelhantes, demonstrando que SQ 22536 inibe a agregação plaquetária de maneira não competitiva, reduzindo a ação da adenilil ciclase, sendo esta ação relacionada MgATP. Entretanto, neste período ainda não havia sido descrita a estrutura como Rodopsina, para proteína G, o que ocorreu em no início da década de 1980 (OVCHINNIKOV *et al*, 1982), além de outros subtipos desta estrutura, como a descrição da proteína Gi, a qual reduz a atividade de AC e leva a um decréscimo de AMPc intracelular, o que ocorreu em 1984 por Neer e colaboradores (BIRNBAUMER, 2007b). Fabbri e colaboradores (1991) também

descreveram que SQ 22536 reduz a atividade de AC, ao mesmo tempo em que produz um aumento nas concentrações de GTP, Mg<sup>2+</sup> e Mn<sup>2+</sup>. Esta ação reduziu o efeito de adrenalina, noradrenalina, isoproterenol e fenilefrina sobre AC em hepatócitos de ratos e peixes.

A ação de SQ 22536 é próxima a ação da subunidade G $\alpha$ i na inibição da interação entre os sítios catalíticos de AC, resultando na redução da concentração de AMPc. Entretanto o estímulo de Gi, que resulta na dissociação de G $\alpha$ i e G $\beta\gamma$  de alguma forma pode estar sendo mimetizado pelo antagonista, pois o transporte de [<sup>14</sup>C]MeAIB, que é independente da modulação de AC por FSH, foi estimulado por SQ 22536. Logo, este inibidor pode estar atuando também na dissociação das subunidades de Gi, mas esta é uma especulação que necessita ser explorada.

Todas as ações descritas neste capítulo são curiosidades científicas observadas através da utilização de ferramentas farmacológicas, as quais demonstraram diferentes vias daquelas idealizadas para as estruturas em questão. Estes dados nos chamam a atenção sobre a questão da interpretação dos dados, através de tentativas de aproximação e extrapolação laboratorial, das quais lançamos mão para descrever mecanismos biológicos complexos. Nesta situação simplificada, eliminamos variáveis para conseguirmos um resultado conclusivo, entretanto devemos ter sempre em mente que a razão destas aproximações experimentais reside em descrever processos biológicos que não são de todo desvendados ou conhecidos. Então, qualquer dado, quando repetido dentro do rigor científico adequado, deve ser levado em consideração, mesmo que não satisfaça as expectativas do pesquisador. A partir deste princípio estaremos em contato com a busca da verdade científica.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abé K, Eto K and Abé SI. (2008) Epidermal growth factor mediates spermatogonial proliferation in newt testis. *Reprod. Biol Endocrinol.*, Feb **6**:6:7.

Abou-Issa H, Reichert Jr LE. (1976) Properties of the follitropin-receptor interaction: characterization of the interaction of follitropin with receptors in purified membranes isolated from mature rat testes tubules. *J Biol Chem*; **251**:3326-3337.

Adams DJ, Lewis RJ. (2004) The  $\alpha 2\delta$  auxiliary subunit reduces affinity of  $\omega$ -conotoxins for recombinant N-type (Cav2.2) calcium channels. *J. Biol. Chem.* **279**, 34705-34714.

Altier C, Zamponi GW (2004) Targeting Ca<sub>2v</sub> channels to treat pain: T-type versus N-type. *Trends Pharmacol Sci* **25**:465–470.

Amann RP. (2008) The Cycle of the Seminiferous Epithelium in Humans:A Need to Revisit? *J Androl*, 29 (5); 469–487.

Amsterdam A, Hanoch T, Dantes A, Tajima K, Strauss JF, Seger R. (2002) Mechanisms of gonadotropin desensitization. *Mol Cell Endocrinol.* Feb 22;**187**(1-2):69-74.

Angelopoulou R, Balla M, Lavranos G, Chalikias M, Kitsos C, Baka S, Kittas C. (2008) Sertoli cell proliferation in the fetal and neonatal rat testis: a continuous phenomenon? *Acta Histochem.*;**110**(4):341-7.

Angers S, Salahpour A, Bouvier M. (2001) Biochemical and biophysical demonstration of GPCR oligomerization in mammalian cells. *Life Sci.* Apr 6; **68**(19-20):2243-50.

Angers S, Salahpour A, Bouvier M. (2002) Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*; **42**:409-35.

Applebury ML and Hargrave PA (1986) Molecular biology of the visual pigments. *Vision Res* **26**:1881–1895.

Arey BJ, Stevis PE, Deecher DC, Shen ES, Frail DE, Negro-Vilar A, Lopez FJ. (1997) Induction of promiscuous G protein coupling of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor: a novel mechanism for transducing pleiotropic actions of FSH isoforms. *Mol Endocrinol.* May; **11** (5):517-26.

Arikkath, J. & Campbell, K.P. (2003). Auxiliary Subunits: Essential Components Of The Voltage-Gated Calcium Channel Complex. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **13**, 298–307.

Arshavsky V. Y., Lamb T. D. and Pugh E. N. Jr (2002) G proteins and phototransduction. *Annu. Rev. Physiol.* **64**: 153–187.

Attwood TK, Findlay JB. Fingerprinting G-protein-coupled receptors. *Protein Eng.* (1994) Feb; **7** (2):195-203.

Babu PS, Jiang L, Sairam AM, Touyz RM, Sairam MR. (1999) Structural features and expression of an alternatively spliced growth factor type I receptor for follitropin signaling in the developing ovary. *Mol Cell Biol Res Commun.* Jul; **2** (1):21-7.

Babu PS, Krishnamurthy H, Chedrese PJ, Sairam MR. (2000) Activation of extracellular-regulated kinase pathways in ovarian granulosa cells by the novel growth factor type-1 follicle-stimulating hormone receptor. Role in hormone signaling and cell proliferation. *J Biol Chem* **275**:27615-27626.

Babu PS, Danilovich N, Sairam MR. (2001) Hormone-induced receptor gene splicing: enhanced expression of the growth factor type I follicle-stimulating hormone receptor motif in the developing mouse ovary as a new paradigm in growth regulation. *Endocrinology*; **142**:381-389.

Backer JM. (2008) The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochem J.* Feb 15; **410**(1):1-17.

Backstrom CT, McNeilly AS, Leask RM, et al. (1982) Pulsatile secretion of LH, FSH, prolactin, estradiol and progesterone during the human menstrual cycle. *Clin Endocrinol (Oxford)*; **17**: 29.

Baenziger JU, Green ED. (1988) Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochim Biophys Acta*; **947**:287-306.

Baird FE, Pinilla-Tenas JJ, Ogilvie WL, Ganapathy V, Hundal HS, Taylor PM. (2006) Evidence for allosteric regulation of pH-sensitive System A (SNAT2) and System N (SNAT5) amino acid transporter activity involving a conserved histidine residue. *Biochem J.* Jul 15; **397** (2); 369-75.

Baker PJ, Sha JA, McBride MW, Peng L, Payne AH, O'Shaughnessy PJ (1999) Expression of 3-hydroxysteroid dehydrogenase type I and VI isoforms in the mouse testis during development. *Eur J Biochem*; **260**:911–916.

Baker PJ, O'Shaughnessy PJ (2001) Role of gonadotrophins in regulating numbers of Leydig and Sertoli cells during fetal and postnatal development in mice. *Reproduction* **122**:227–234.

Barrios-De-Tomasi J, Timossi C, Merchant H, Quintanar A, Avalos JM, Andersen CY, Ulloa-Aguirre A. (2002) Assessment of the in vitro and in vivo biological activities of the human follicle-stimulating isohormones. *Mol Cell Endocrinol.* Jan 25; **186** (2):189-98.

Baserga R. (1997) The price of independence. *Exp Cell Res*; **236**:1–3.

Batra S, Sjogren C. (1983) Effect of estrogen treatment on calcium uptake by the rat uterine smooth muscle. *Life Science.* **32**; 315-319.

- Bechtel LK, Haverstick DM, Holstege CP. (2008) Verapamil toxicity dysregulates the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Acad Emerg Med.* Apr;**15**(4):368-74.
- Bergendahl M, Evans WS, Veldhuis JD. (1996) Current concepts on ultradian rhythms of luteinizing hormone secretion in the human *Human Reproduction Update.* **2** (6); 507–518.
- Berry SA, Srivastava CH, Rubin LR, Phipps WR, Pescovitz OH (1992) Growth hormone-releasing hormone-like messenger ribonucleic acid and immunoreactive peptide are present in human testis and placenta. *Endocrinology* **75**:281–284.
- Biel M., Ruth P., Bosse E., Hullin R., Stuhmer W., Flockerzi V., Hofmann F. (1990):Primary structure and functional expression of a high voltage activated calcium channel from rabbit lung. *FEBS Lett.* **269**, 409-412.
- Birnbaumer L, Campbell KP, Catterall WA, Harpold MM, Hofmann F, Horne WA, Mori Y, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, et al. (1994) The naming of voltagegated calcium channels. *Neuron* **13**:05–506.
- Birnbaumer, L., Qin, N., Olcese, R., Tareilus, E., Platano, D., Costantin, J. & Stefani, E. (1998). Structures And Functions Of Calcium Channel B subunits. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **30**, 357–375.
- Birnbaumer L. (2007a ) The discovery of signal transduction by G proteins. A personal account and an overview of the initial findings and contributions that led to our present understanding *Biochim Biophys Acta.* April ; **1768**(4): 756–771.
- Birnbaumer L. (2007b) Expansion of signal transduction by G proteins The second 15 years or so: From 3 to 16  $\alpha$  subunits plus  $\beta\gamma$  dimmers *Biochim Biophys Acta.* April ; **1768**(4): 772–793.
- Bommakanti RA, Vinayak S, Simonds WF. (2000) Dual Regulation Of Akt/Protein Kinase B By Heterotrimeric G Protein Subunits. *J Biol Chem.* **275**;(49) Dez; 38870-38876.
- Booden M. A., Siderovski D. P. and Der C. J. (2002) Leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor promotes G alpha q-coupled activation of RhoA. *Mol. Cell. Biol.* Jun; **22** (12):4053-61.
- Borland K, Mita M, Oppenheimer CL, Blinderman LA, Massague J, Hall PF, Czech MP. (1984) The actions of insulin-like growth factors I and II on cultured Sertoli cells. *Endocrinology* **114**:240-246.
- Borsotto M., Barhanin J., Fosset M., Lazdunski M. (1985): The 1,4-dihydropyridine receptor associated with the skeletal muscle voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel. Purification and subunit composition. *J. Biol. Chem.* **260**, 14255-14263.
- Bortolussi M, Zanchetta R, Belvedere P, Colombo L. (1990) Sertoli and Leydig cell numbers and gonadotropin receptors in rat testis from birth to puberty. *Cell Tissue Res.* Apr; **260**(1):185-91.

- Bosse E., Regulla S., Biel M., Ruth P., Meyer H. E., Flockerzi V., Hofmann F. (1990): The cDNA and deduced amino acid sequence of the  $\gamma$  subunit of the L-type calcium channel from rabbit skeletal muscle. *FEBS Lett.* **267**, 153-156.
- Bourinet, E., Soong, T.W., Sutton, K., Slaymaker, S., Mathews, E., Monteil, A., Zamponi, G.W., Nargeot, J. & Snutch, T.P. (1999). Splicing Of A1a Subunit Gene Generates Phenotypic Variants Of P- And Q-Type Calcium Channels. *Nat. Neurosci.*, **2**, 407-415.
- Bousfield GR, Butnev VY, Butnev VY, Nguyen VT, Gray CM, Dias JA, MacColl R, Eisele L, Harvey DJ. (2004) Differential effects of alpha subunit Asparagine56 oligosaccharide structure on equine lutropin and follitropin hybrid conformation and receptor-binding activity. *Biochemistry.* Aug 24; **43**(33):10817-33.
- Bousfield GR, Butnev VY, Walton WJ, Nguyen VT, Huneidi J, Singh V, Kolli VS, Harvey DJ, Rance NE. (2007) All-or-none N-glycosylation in primate follicle-stimulating hormone beta-subunits. *Mol Cell Endocrinol.* Jan 2; **260-262**:40-8.
- Bozulis L, Hemmings BA. (2009) PIKKing on PKB: regulation of PKB activity by phosphorylation. *Current Opinion in Cell Biology*, **21**:256-261.
- Brandt DR, Ross EM. (1985) GTPase activity of the stimulatory GTP-binding regulatory protein of adenylate cyclase, Gs. Accumulation and turnover of enzyme-nucleotide intermediates. *J Biol Chem.*; **260**(1):266-72.
- Bressler RS, Ross MH. (1972) Differentiation of peritubular myoid cells of the testis: effects of intratesticular implantation of newborn mouse testes into normal and hypophysectomized adults. *Biol Reprod.* Feb; **6**(1):148-59.
- Breyer PR, Rothrock JK, Beaudry N, Pescovitz OH (1996) A novel peptide from the growth hormone releasing hormone gene stimulates Sertoli cell activity. *Endocrinology* **137**:2159-2162.
- Bridson SJ, Gandía J, Amaral OB, Ferré S, Lluís C, Franco R, Hill SJ, Ciruela F. (2008) Plasma membrane diffusion of G protein-coupled receptor oligomers. *Biochim Biophys Acta.* Dec; **1783**(12):2262-8.
- Brock C, Schaefer M, Reusch HP, Czupalla C, Michalke M, Spicher K, Schultz G, Nürnberg B. (2003) Roles of G beta gamma in membrane recruitment and activation of p110 gamma/p101 phosphoinositide 3-kinase gamma. *J Cell Biol.* Jan 6; **160** (1):89-99.
- Burgess DL, Gefrides LA, Foreman PJ, Noebels JL. (2001): A cluster of three novel Ca<sup>2+</sup> channel  $\gamma$  subunit genes on chromosome 19q13.4: evolution and expression Cache River, p. 1-52.
- Cailleau J, Vermeire S, Verhoeven G. (1990) Independent control of the production of insulin-like growth factor I and its binding protein by cultured testicular cells. *Mol Cell Endocrinol* **69**:79-89.

- Callaghan B, Zhong J, Keef KD. (2006) Signaling pathway underlying stimulation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels in rabbit portal vein myocytes by recombinant G $\beta$  $\gamma$  subunits *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**; H2541-H2546.
- Canti, C., Davies, A. & Dolphin, A.C. (2003). Calcium Channel A2d Subunits: Structure, Functions And Target Site For Drugs. *Curr. Neuropharmacol.*, **1**, 209–217.
- Cantley LC. (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*. May 31; **296** (5573):1655-7.
- Carbone, E., Lux, H.D. (1984). A Low Voltage-Activated Fully Inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. *Nature*, **310**, 501–502.
- Carreau S, Foucault P, Drosdoesky MA. (1994) La cellule de Sertoli: aspects fonctionnels compare's chez le rat, le porc et l'homme. *Annals d'Endocrinologie* . **55**; 203–220.
- Casey PJ. (1995) Protein lipidation in cell signaling. *Science*. Apr 14; **268** (5208):221-5.
- Catalucci D, Zhang DH, DeSantiago J, Aimond F, Barbara G, Chemin J, Bonci D, Picht E, Rusconi F, Dalton ND, Peterson KL, Richard S, Bers DM, Brown JH, Condorelli G. (2009) Akt regulates L-type Ca<sup>2+</sup> channel activity by modulating Cav $\alpha$ 1 protein stability. *J Cell Biol*. Mar 23; **184**(6):923-33.
- Catt Ki, Dufau ML, Tsuruhara J. (1972) Absence of intrinsic biological activity in LH and hCG subunits, *J Clin Endocrinol Metab.*; **34**: 1972-1976.
- Catterall, W.A. (2000). Structure And Regulation Of Voltage-Gated Ca<sup>2+</sup> Channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **16**, 521–555.
- Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J. (2005) International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev*. Dec; **57** (4):411-25.
- Ceccattelli S, Hulting AL, Zhang X, Gustafsson L, Villar M, Hökfelt T. (1993) Nitric oxide synthase in the rat anterior pituitary gland and the role of nitric oxide in regulation of luteinizing hormone secretion. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**: 11292-11296.
- Cérec V, Piquet-Pellorce C, Aly HA, Touzalin AM, Jégou B, Bauché F. (2007) Multiple pathways for cationic amino Acid transport in rat seminiferous tubule cells. *Biol Reprod*. Feb; **76** (2);241-9.
- Cerpa-Poljak A, Bishop LA, Hort YJ, Chin CKH, DeKroon R, Mahler SM, Smith GM, Stuart MC, Schofield PR. (1993) Isoelectric charge of recombinant human follicle-stimulating hormone isoforms determines receptor affinity and in vitro bioactivity. *Endocrinology* **132**:351-356.
- Chandy KG, Gutman GA (1993) Nomenclature for mammalian potassium channel genes. *Trends Pharmacol Sci* **14**:434.

- Chappel SC, Ulloa-Aguirre A. (1983) Coutifaris C. Biosynthesis and secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocr Rev.* **4**;179-211.
- Chatelain P, Naville D, Avallet O, Penhoat A, Jaillard C, Sanchez P, Saez J. (1991) Paracrine and autocrine regulation of insulin-like growth factor I. *Acta Paediatr Scand* **372**(Suppl):92-95.
- Chaudhry FA, Reimer RJ, Krizaj D, Barber D, Storm-Mathisen J, Copenhagen DR, Edwards RH. (1999) Molecular analysis of system N suggests novel physiological roles in nitrogen metabolism and synaptic transmission. *Cell*. Dec 23; **99**(7);769-80.
- Chemin J., Monteil A., Perez-Reyes E., Nargeot J., Lory P. (2001): Direct inhibition of T-type calcium channels by the endogenous cannabinoid anandamide. *EMBO J.* **20**, 7033-7040.
- Chen WS, Xu PZ, Gottlob K, Chen ML, Sokol K, Shiyanova T, Roninson I, Weng W, Suzuki R, Tobe K et al. (2001) Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes and Development.* **15**; 2203-2208.
- Chen YJ, Hsiao PW, Lee MT, Mason JI, Ke FC, Hwang JJ. (2007) Interplay of PI3K and cAMP/PKA signaling, and rapamycin-hypersensitivity in TGFbeta1 enhancement of FSH-stimulated steroidogenesis in rat ovarian granulosa cells. *J Endocrinol.* Feb; **192**(2):405-19.
- Cheng Ye Mruk DD. (2002) Cell Junction Dynamics in the Testis: Sertoli-Germ Cell Interactions and Male Contraceptive Development *Physiol Rev.* **82**;825-874.
- Cherksey BD, Sugimori M, Lliná SR. (1991). Properties Of Calcium Channels Isolated With Spider Toxin, Ftx. *Ann. Ny Acad. Sci.* **635**, 80-89.
- Chien, A. J., Zhao, X. L., Shirokov, R. E., Puri, T. S., Chang, C. F., Sun, D., Rios, E., and Hosey, M. M. (1995) Roles of a membrane-localized b subunit in the formation and targeting of functional L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *J. Biol. Chem.* **270**, 30036-30044.
- Cho H, Thorvaldsen JL, Chu Q, Feng F, Birnbaum MJ. (2001) Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J Biol Chem* **276**; 38349-38352.
- Chowdhury M, Steinberger E. (1976) Differences of the effects of testosterone propionate on the production of LH and FSH. *Acta Endocrinol (Copenh).* Aug; **82** (4):683-90.
- Christensen HN, Oxender DL, Liang M, Vatz KA. (1965) The use of N-methylation to direct route of mediated transport of amino acids. *J Biol Chem.* Sep; **240**(9); 3609-16.
- Christensen HN, de Cespedes C, Handlogten ME, Ronquist G. (1973) Energization of amino acid transport, studied for the Ehrlich ascites tumor cell. *Biochim Biophys Acta.* Dec 28; **300**(4);487-522.
- Christensen HN. (1979) Exploiting amino acid structure to learn about membrane transport. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* **49**;41-101.

Ciraolo E, Iezzi M, Marone R, Marengo S, Curcio C, Costa C, Azzolino O, Gonella C, Rubinetto C, Wu H, Dastrù W, Martin EL, Silengo L, Altruda F, Turco E, Lanzetti L, Musiani P, Rückle T, Rommel C, Backer JM, Forni G, Wymann MP, Hirsch E. (2008) Phosphoinositide 3-kinase p110beta activity: key role in metabolism and mammary gland cancer but not development. *Sci Signal*. Sep 9; **1**(36):ra3.

Clapham D. E. and Neer E. J. (1997) G protein beta gamma subunits. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**: 167-203.

Clermont Y, Leblond Cp. (1959) Differentiation And Renewal Of Spermatogonia In The Monkey, Macacus Rhesus. *Am J Anat*. Mar; **104**;237-73.

Clermont Y. (1969) Two classes of spermatogonial stem cells in the monkey (*Cercopithecus aethiops*). *Am J Anat.*; **126**:57-7.

Clermont Y. (1958) Structure of the epithelium of the seminiferous tubules and the mechanism of regeneration of the spermatogonia in the duck. *Arch Anat Pathol (Paris)*. Jan-Mar; **47** (1):47-66.

Clermont Y. (1972) Kinetics of spermatogenesis in mammals: Seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev*; **52** (1);198-236.

Clermont Y. Introduction to the Sertoli cell. (1993) *In: The Sertoli Cell*, Russel LD, Griswold MD (eds). Cache Press, Clearwater, XXI-XXV.

Closset J, Gothot A, Sente B, Scippo ML, Igout A, Vandebroek M, Dombrowicz D, Hennen G. (1989) Pituitary hormones dependent expression of insulin-like growth factors I and II in the immature hypophysectomized rat testis. *Mol Endocrinol* **3**:1125-1131.

Cohick WS e Clemmons DR. (1993) The insulin-like growth factors. *Ann Rev Phys* **55** 131-153.

Cortes D, Muller J, Skakkebaek NE. (1987) Proliferation of Sertoli cells during development of the human testis assessed by stereological methods. *Int J Androl.* **10**;589-596.

Counis R, Laverrière Jn, Garrel G, Bleux C, Cohen-Tannoudji J, Lerrant Y, Kottler MI, Magre S. (2005) Gonadotropin-Releasing Hormone And The control of gonadotrope function *Reprod. Nutr. Dev.* **45**; 243-254.

Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, Seeburg PH, Libermann TA, Schlessinger J, Francke U, Levinson A, Ullrich A. (1985) Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science*, **230**; 1132-1139.

Cozier GE, Carlton J, Bouyoucef D, Cullen PJ. (2004) Membrane targeting by pleckstrin homology domains. *Curr Top Microbiol Immunol.*; **282**;49-88.

- Crepieux P, Marion S, Martinat N, Fafeur V, Vern YL, Kerboeuf D, Guillou F, Reiter E. (2001) The ERK-dependent signalling is stage-specifically modulated by FSH, during primary Sertoli cell maturation. *Oncogene*, **20**(34):4696-4709.
- Crowley WF, Filicori M, Spratt DI, et al. (1985) The physiology of GnRH secretion in men and women. *Rec Prog Horm Res.* **41**; 473.
- Cyr DG, Hermo L, Egenberger N, Mertineit C, Trasler JM, Laird DW. (1999) Cellular immunolocalization of occludin during embryonic and postnatal development of the mouse testis and epididymis. *Endocrinology.* **140**;3815-3825.
- da Cruz Curte A, Wassermann GF. (1985) Identification of amino acid transport systems stimulated by FSH in rat testes. *J Endocrinol.* Sep;**106**(3); 291-4.
- Dahia CL, Rao AJ. (2006) Regulation of FSH receptor, PKI $\beta$ , IL-6 and calcium mobilization: Possible mediators of differential action of FSH. *Mol Cell Endocrinol.* Mar 9; **247** (1-2); 73-81.
- Dahl KD, Stone MP. (1992) FSH isoforms, radioimmunoassays, bioassays, and their significance. *J Androl.* Jan-Feb; **13**(1):11-22.
- Davenport CW, Heindel JJ. (1987) Tonic inhibition of adenylate cyclase in cultured hamster Sertoli cells. *J Androl.* Sep-Oct;8(5):314-8.
- De Kretser DM, Kerr JB. (1988) The Cytology Of The Testis. In: *The Physiology Of Reproduction*, edited by Knobil E and Neill J. New York: Raven, **1**, p. 837-932.
- De Kretser DM, Kerr JB (1994) The cytology of the testis. In: Knobil E, Neill J (eds.) *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, 1177-1290.
- De Meyts P, Whittaker J, Structural Biology Of Insulin And Igf1 Receptors: Implications For Drug Design (2002). *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**; 769-783.
- De Rooij DG, Lok D. (1987) Regulation of the density of spermatogonia in the seminiferous epithelium of the Chinese hamster: II. Differentiating spermatogonia. *Anat Rec.* Feb; **217** (2):131-6.
- de Rooij DG, Russell LD.(2000) All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J.Andro.*; **21** (6):776-798.
- De Waard M, Liu H, Walker D, Scott VE, Gurnett CA, Campbell KP. (1997) Direct binding of G-protein betagamma complex to voltage-dependent calcium channels *Nature.* Jan 30; **385** (6615):446-50.
- Delfino F & WalkerWH (1998) Stage-specific nuclear expression of NF $\kappa$ \_B in mammalian testis. *Molecular Endocrinology* **12** 1696–1707.



- Delmas P., Abogadie F. C., Buckley N. J. and Brown D. A. (2000) Calcium channel gating and modulation by transmitters depend on cellular compartmentalization. *Nat. Neurosci.***3**: 670–678.
- Dessauer, C.W., Tesmer, J.J., Sprang, S.R., and Gilman, A.G. (1998) Identification of a G $\alpha$  binding site on type V adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* **273**, 25831-25839.
- Deutsch E, Maggiorella L, Wen B, Bonnet ML, Khanfir K, Frascogna V, Turhan AG, Bourhis J. (2004) Tyrosine kinase inhibitor AG1024 exerts antileukaemic effects on STI571-resistant Bcr-Abl expressing cells and decreases AKT phosphorylation. *Br J Cancer.* Nov 1; **91** (9):1735-41.
- Do KH, Kim MS, Kim JH, Rhim BY, Lee WS, Kim CD, Bae SS. (2009) Angiotensin II-induced aortic ring constriction is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase/L-type calcium channel signaling pathway. *Exp Mol Med.* Apr 21.
- Doepfner KT, Boller D, De Laurentiis A, Guerreiro AS, Marinov M, Arcaro A. (2007) Relative to the Phosphatidylinositol 3-kinase / Akt Pathway and their Relevance to Drug Discovery *Recent Patents on DNA & Gene Sequences*, **1**, 9-23.
- Dolphin AC. (1998) Mechanisms of modulation of voltage-dependent calcium channels by G proteins. *J Physiol.* Jan 1; **506** (Pt 1):3-11.
- Dolphin AC. (2003) G Protein Modulation of Voltage-Gated Calcium Channels. *Pharmacol Rev.* **55**:607-627.
- Dolphin AC. (2006) A short history of voltage-gated calcium channels. *British Journal of Pharmacology* **147**, S56-S62.
- Dong LQ, Liu F. (2005) PDK2: the missing piece in the receptor tyrosine kinase signaling pathway puzzle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* Aug; **289**(2):E187-96.
- Doupnik C. A., Dessauer C. W., Slepak V. Z., Gilman A. G., Davidson N. and Lester H. A. (1996) Time resolved kinetics of direct G $\beta$  1  $\gamma$  2 interactions with the carboxyl terminus of Kir3.4 inward rectifier K $^+$  channel subunits. *Neuropharmacology* **35**: 923-931.
- Dresviannikov AV, Page KM, Leroy J, Pratt WS, Dolphin AC. (2009) Determinants of the voltage dependence of G protein modulation within calcium channel  $\beta$  subunits *Pflugers Arch - Eur J Physiol.* **457**;743-756.
- Dym M & Fawcett DW. (1970) The blood–testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol Repr.* **3**; 308-326.
- Dym M, Fawcett D. (1970) The Blood-Testis Barrier in the Rat and the Physiological Compartmentation of the Seminiferous Epithelium. *Biol. Reprod.* **3**;308-326.
- Dym M, Fawcett DW. (1971) Further Observations On The Numbers Of Spermatogonia, Spermatocytes, And Spermatids Connected By Intercellular Bridges In The Mammalian Testis. *Biol Reprod.* **4**, 195-215.

- Dym M, Raj HG. (1977) Response of adult rat Sertoli cells and Leydig cells to depletion of luteinizing hormone and testosterone. *Biol Reprod.* Dec; **17** (5):676-96.
- Ehmcke J, Schlatt S. (2006) A revised model for spermatogonial expansion in man: lessons from non-human primates. *Reproduction.* Nov; **132** (5):673-80.
- Engelman JA., Luo J, Cantley LC. (2006) The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Rev. Genet.* **7**, 606-619.
- Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien RW, Catterall WA. (2000): Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron.* **25**, 533-535.
- Escribá PV, Wedegaertner PB, Goñi FM, Vögler O. (2007) Lipid-protein interactions in GPCR-associated signaling. *Biochim Biophys Acta.* Apr; **1768** (4):836-52.
- Eusebi F, Ziparo E, Fratamico G, Russo MA, Stefanini M. (1983) Intercellular communication in rat seminiferous tubules. *Dev Biol.* Nov; **100**(1):249-55.
- Evans JJ. (2002) Peptides interact in gonadotrophin regulation. *Arch Physiol Biochem.* Apr; **110** (1-2):154-61.
- Exton JH. (1996) Regulation of phosphoinositide phospholipases by hormones, neurotransmitters, and other agonists linked to G proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **36**: 481-509.
- Fabbri A, Ciocca DR, Ciampani T, Wang J, Dufau ML. (1995) Growth hormone-releasing hormone in testicular interstitial and germ cells: potential paracrine modulation of follicle-stimulating hormone action on Sertoli cell function. *Endocrinology.* **136**:2303-2308.
- Fabbri E, Brighenti L, Ottolenghi C. (1991) Inhibition of adenylate cyclase of catfish and rat hepatocyte membranes by 9-(tetrahydro-2-furyl)adenine (SQ 22536). *J Enzyme Inhib.* **5**(2):87-98.
- Falasca M, Maffucci T. (2007) Role of class II phosphoinositide 3-kinase in cell signalling. *Biochem Soc Trans.* Apr; **35** (Pt 2):211-4.
- Fan QR, Hendrickson WA. (2005) Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor. *Nature.* Jan 20; **433** (7023):269-77.
- Farahbakhsh ZT, Ridge KD, Khorana HG, Hubbell WL. (1995) Mapping light-dependent structural changes in the cytoplasmic loop connecting helices C and D in rhodopsin: a site-directed spin labeling study. *Biochemistry.* Jul 11; **34** (27):8812-9.
- Farrens DL, Altenbach C, Yang K, Hubbell WL, Khorana HG. (1996) Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin. *Science.* Nov 1; **274**(5288):768-70.

- Fatt P, Katz B. (1953) The electrical properties of crustacean muscle fibres. *J Physiol.* Apr 28; **120** (1-2):171-204.
- Fatt P., Ginsborg BL. (1958). The Ionic Requirements For The Production Of action potentials in crustacean muscle fibres. *J. Physiol.* **142**, 516-543.
- Fawcett DW, Leak LV, Heidger PM Jr.( 1970) Electron microscopic observations on the structural components of the blood-testis barrier. *J Reprod Fertil Suppl.*; **10**:105-22.
- Fedulova, S.A., Kostyuk, P.G. & Veselovsky, N.S. (1985). Two Types Of calcium channels in the somatic membrane of newborn rat dorsal root ganglion neurones. *J. Physiol. (London)*, **359**, 431-446.
- Feng ZP, Doering CJ, Winkfein RJ, Beedle AM, Spafford JD, and Zamponi GW (2003) Determinants of inhibition of transiently expressed voltage-gated calcium channels by  $\omega$ -conotoxins GVIA and MVIIA. *J Biol Chem.* **278**; 20171-20178.
- Ferris HA; Shupnik MA. (2006) Mechanisms For Pulsatile Regulation Of The Gonadotropin Subunit Genes By GnRH. *Biol Reprod.* **74**, 993-998.
- Flack MR, Bennet AP, Froehlich J, Anasti JN, Nisula B. (1994) Increased biological activity due to basic isoforms in recombinant human follicle-stimulating hormone produced in a human cell line. *J Clin Endocrinol Metab.* **79**; 756-760.
- Fleckenstein, A. (1983). History Of Calcium Antagonists. *Circ. Res.* **52**, I3-16.
- Flockerzi V, Oeken HJ, Hofmann F. (1986) Purification of a functional receptor for calcium-channel blockers from rabbit skeletal-muscle microsomes. *Eur J Biochem.* Nov 17; **161** (1):217-24.
- Ford CE, Skiba NP, Bae H, Daaka Y, Reuveny E, Shekter LR, Rosal R, Weng G, Yang CS, Iyengar R, Miller RJ, Jan LY, Lefkowitz RJ, Hamm HE. (1998) Molecular basis for interactions of G protein betagamma subunits with effectors. *Science*; **280**; 1271-1274.
- Fox KM, Dias JA, Van Roey P. (2001) Three-dimensional structure of human follicle-stimulating hormone. *Mol Endocrinol.* Mar; **15** (3):378-89.
- Franco R, Casadó V, Cortés A, Mallol J, Ciruela F, Ferré S, Lluís C, Canela EI. (2008) G-protein-coupled receptor heteromers: function and ligand pharmacology. *Br J Pharmacol.* Mar; **153** Suppl 1:S90-8.
- Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, and Schiöth HB. (2003) The G protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* **63**; 1256-1272.
- Froment P, Vigier M, Negre D, Fontaine I, Beghelli J, Cosset FL, Holzenberger M, Durand P. (2007) Inactivation of the IGF-I receptor gene in primary Sertoli cells highlights the autocrine effects of IGF-I. *J. Endocrinology.* **194**; 557-568.

- Galbiati F, Razani B, Lisanti MP. (2001) Emerging themes in lipid rafts and caveolae. *Cell*. **106**; 403-411.
- Gao B. N. and Gilman A. G. (1991) Cloning and expression of a widely distributed (type IV) adenylyl cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**; 10178-10182.
- Gaytan F, Bellido C, Morales C, Reymundo C, Aguilar E, van Rooijen N. (1994) Effects of macrophage depletion at different times after treatment with ethane dimethane sulfonate (EDS) on the regeneration of Leydig cells in the adult rat. *J. Androl.* **15** 558-564.
- George S, Rochford JJ, Wolfrum C, Gray SL, Schinner S, Wilson JC, Soos MA, Murgatroyd PR, Williams RM, Acerini CL et al. (2004) A family with severe insulin resistance and diabetes due to a mutation in AKT2. *Science* **304**;1325-1328.
- Glossmann H., Striessnig J. (1990): Molecular properties of calcium channels. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **114**, 1-105.
- Gnessi L, Fabbri A, Spera G. (1997) Gonadal Peptides As Mediators Of Development and Functional Control of the Testis: An Integrated System. *Endocr Rev.* Aug; **18** (4):541-609
- Gomes I, Jordan BA, Gupta A, Rios C, Trapaidze N, Devi LA. (2001) G protein coupled receptor dimerization: implications in modulating receptor function. *J Mol Med.* Jun; **79** (5-6); 226-42
- Gonzalez-Robayna IJ, Falender AE, Ochsner S, Firestone GL, Richards JS (2000) Follicle-stimulating hormone (FSH) stimulates phosphorylation and activation of protein kinase B (PKB/Akt) and serum and glucocorticoid-induced kinase (Sgk): evidence for Akinase-independent signaling by FSH in granulosa cells. *Mol Endocrinol.* **14**;1283-1300.
- Gorczyńska E, Handelsman DJ. (1991) The role of calcium in follicle-stimulating hormone signal transduction in Sertoli cells. *J Biol Chem.* Dec 15; **266** (35):23739-44.
- Grasso P, Reichert LE Jr. (1989) Follicle-stimulating hormone receptor-mediated uptake of  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  by proteoliposomes and cultured rat sertoli cells: evidence for involvement of voltage-activated and voltage-independent calcium channels. *Endocrinology.* Dec; **125**(6);3029-36.
- Grasso P, Reichert Jr LE (1990) Follicle-stimulating hormone receptor-mediated uptake of  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  by cultured rat Sertoli cells does not require activation of cholera toxin- or pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide binding proteins or adenylate cyclase. *Endocrinology* **127**; 949-956.
- Griswold MD. (1993) .Protein secretion by Sertoli cells: general considerations. *In The Sertoli Cell.* Russell LD, Griswold MD, (eds). pp 195-200. Cache River Press, Clearwater, FL
- Griswold MD. (1998) The Central Role Of Sertoli Cells *In: Spermatogenesis Seminars In Cell & Developmental Biology*, Vol **9**;: Pp 411-416
- Gromoll J, Simoni M. (2005) Genetic complexity of FSH receptor function. *Trends Endocrinol Metab.* Oct; **16**(8):368-73.

- Gu J, Tamura M, Yamada KM. (1998) Tumor suppressor PTEN inhibits integrin- and growth factor-mediated mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling pathways. *J Cell Biol.* Nov 30; **143**(5):1375-83.
- Gu JL, Muller S, Mancino V, Offermanns S, Simon MI. (2002) Interaction of G alpha(12) with G alpha(13) and G alpha(q) signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci USA.* **99**: 9352–9357.
- Gudermann, T., Birnbaumer, M. and Birnbaumer, L. (1992) Evidence for dual coupling of the murine luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phosphoinositide breakdown and Ca<sup>2+</sup> mobilization. Studies with the cloned murine luteinizing hormone receptor expressed in L cells. *J. Biol. Chem.* **267**, 4479–4488
- Hakovirta H, Keiski A, Toppari J, Halmekyto M, Alhonen L, Janne J, Parvinen M. (1993) Polyamines and regulation of spermatogenesis: selective stimulation of late spermatogonia in transgenic mice overexpressing the human ornithine decarboxylase gene. *Mol Endocrinol.* **7**; 1430-1436.
- Hale PM, Khoury S, Foster CM, et al. (1988) Increased LH pulse frequency during sleep in early to mid-pubertal boys: effects of testosterone infusion. *J Clin Endocrinol Metab*; **66**: 785.
- Haneji T, Koide SS, Tajima Y, Nishimune Y. (1991) Differential effects of epidermal growth factor on the differentiation of type A spermatogonia in adult mouse cryptorchid testes in vitro. *J Endocrinol*, **128**:383-388.
- Hanlon MR, Berrow NS, Dolphin AC, and Wallace BA (1999) Modelling of a voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel  $\beta$  subunit as a basis for understanding its functional properties. *FEBS Lett* . **445**;366-370.
- Hansson HA, Billig H, Isgaard J. (1989) Insulin-like growth factor I in the developing and mature rat testis: immunohistochemical aspects. *Biol Reprod.* Jun; **40**(6):1321-8.
- Hansson V, Skålhegg BS, Taskén K. (2000) Cyclic-AMP-dependent protein kinase (PKA) in testicular cells. Cell specific expression, differential regulation and targeting of subunits of PKA. *J Steroid Biochem Mol Biol.* May; **73** (1-2);81-92.
- Haslam RJ, Davidson MM, Desjardins JV. (1978) Inhibition of adenylate cyclase by adenosine analogues in preparations of broken and intact human platelets. Evidence for the unidirectional control of platelet function by cyclic AMP. *Biochem J.* Oct 15; **176**(1);83-95.
- Hatakeyama M, Kimura S, Naka T, Kawasaki T, Yumoto N, Ichikawa M, Kim JH, Saito K, Saeki M, Shirouzu M, Yokoyama S, Konagaya A. (2003) A computational model on the modulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and Akt pathways in heregulin-induced ErbB signaling. *Biochem J.* **373**:451-463.
- Hawkins PT, Anderson KE, Davidson K, Stephens LR. (2006) Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochem Soc Trans.* Nov; **34**(Pt 5):647-62.

- Heller CG, Clermont Y. (1964) Kinetics of the germinal epithelium in man. *Recent Prog Horm Res.* **20**;545-575.
- Hess RA e de França LR. (2007) Spermatogenesis and Cycle of theSeminiferous Epithelium in: *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*, edited by C.Y. Cheng. Landes Bioscience Cap 2.
- Hess, P., Lansman, J.B. & Tsien, R.W. (1984). Different Modes Of Ca Channel gating behaviour favoured by dihydropyridine Ca agonists and antagonists. *Nature*, 311, 538–544.
- Hettle, J.A., Balekjian, E., Tung, P.S., Fritz, I.B., 1988. Rat testicular peritubular cells in culture secrete an inhibitor of plasminogen activator activity. *Biol. Reprod.* **38**, 359-371.
- Higashijima T, et al. (1987) Effects of Mg<sup>2+</sup> and the beta gamma-subunit complex on the interactions of guanine nucleotides with G proteins. *J Biol Chem.* **262** (2):762-6.
- Higgins JB, Casey PJ. (1994) In vitro processing of recombinant G protein gamma subunits. Requirements for assembly of an active beta gamma complex. *J Biol Chem.* Mar 25; **269**(12):9067-73.
- Hildebrandt J. D. and Birnbaumer L. (1983) Inhibitory regulation of adenylyl cyclase in the absence of stimulatory regulation. Requirements and kinetics of guanine nucleotideinduced inhibition of the cyc- S49 adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* **258**: 13141–13147.
- Hildebrandt JD, Sekura RD, Codina J, Iyengar R,Manclark CR, Birnbaumer L. (1983) Stimulation and inhibition of adenylyl cyclases mediated by distinct regulatory proteins. *Nature* **302**: 706–709.
- Hillman D, Chen S, Aung TT, Cherksey B, Sugimori M, Llina SR. (1991). Localization Of P-Type Calcium Channels In The Central Nervous System. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 7076-7080.
- Hirsch E, Braccini L, Ciraolo E, Morello F, Perino A. (2009) Twice upon a time: PI3K's secret double life exposed.*Trends Biochem Sci.* Apr 17.
- Hirsch E, Costa C, Ciraolo E. (2007) Phosphoinositide 3-kinases as a common platform for multi-hormone signaling. *J. Endocrinol.* Aug; **194**(2):243-56.
- Hirsch E, Lembo G, Montrucchio G, Rommel C, Costa C, Barberis L. (2006) Signaling through PI3Kgamma: a common platform for leukocyte, platelet and cardiovascular stress sensing. *Thromb Haemost.* Jan; **95** (1):29-35.
- Hobom M., Dai S., Marais E., Lacinova L., Hofmann F., Klugbauer N. (2000): Neuronal distribution and functional characterization of the calcium channel  $\alpha 2\delta$ -2 subunit. *Eur. J. Neurosci.* **12**, 1217-1226.
- Hockerman G. H., Johnson B. D., Abbott M. R., Scheuer T., Catterall W. A. (1997) Molecular determinants of high affinity phenylalkylamine block of L-type calcium channels

in transmembrane segment III<sub>S6</sub> and the pore region of the  $\alpha 1$  subunit. *J. Biol. Chem.* **272**, 18759-18765.

Hofmann F., Lacinová L., Klugbauer N. (1999): Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **139**, 33-87.

Hsia J. A., Moss J., Hewlett E. L. and Vaughan M. (1984) ADP-ribosylation of adenylate cyclase by pertussis toxin. Effects on inhibitory agonist binding. *J. Biol. Chem.* **259**:1086-1090.

Huang L., Shanker Y. G., Dubauskaite J., Zheng J. Z., Yan W., Rosenzweig S. et al. (1999) Ggamma13 colocalizes with gustducin in taste receptor cells and mediates IP<sub>3</sub> responses to bitter denatonium. *Nat. Neurosci.* **2**; 1055-1062.

Huckins C. (1971) The spermatogonial stem cell population in adult rats. 3. Evidence for a long-cycling population. *Cell Tissue Kinet.* Jul; **4**(4):335-49.

Huhtaniemi IT, Nikula H, Parvinen M. (1989) Pertussis Toxin enhances follicle-stimulating hormone-stimulated cAMP production in rat seminiferous tubules in a stage dependent manner *Mol. Cell Endocrinol.* **62**; 89-94.

Humbel RE (1990) Insulin-like growth factors I and II. *Eur J. Biochem.* **190**; 445-462.

Hyde R, Cwiklinski EL, MacAulay K, Taylor PM, Hundal HS. (2007) Distinct sensor pathways in the hierarchical control of SNAT2, a putative amino acid transporter, by amino acid availability. *J Biol Chem.* Jul 6; **282**(27):19788-98.

Hyde R, Taylor PM, Hundal HS. (2003) Amino acid transporters: roles in amino acid sensing and signalling in animal cells. *Biochem J.* Jul 1; **373**(Pt 1);1-18.

Ikeda SR, Dunlap K (1999) Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels: role of G protein subunits. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.* **33**:131-142.

Inanobe A., Morishige K. I., Takahashi N., Ito H., Yamada M., Takumi T. et al. (1995) G beta gamma directly binds to the carboxyl terminus of the G protein-gated muscarinic K<sup>+</sup> channel, GIRK1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **212**; 1022-1028.

Irusta O, Wassermann GF. (1974) Factors influencing the uptake of (alpha-14C)aminoisobutyric acid by rat testes. *J Endocrinol.* Mar; **60**(3);463-71.

Itoh T, Koshihara S, Kigawa T, Kikuchi A, Yokoyama S, Takenawa T. (2001) Role of the ENTH domain in phosphatidylinositol-4,5- bisphosphate binding and endocytosis. *Science* **291**, 1047-1051.

Ivanov IP, Rohrwasser A, Terreros DA, Gesteland RF, Atkins JF. (2000) Discovery of a spermatogenesis stage-specific ornithine decarboxylase antizyme: antizyme 3. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **97**; 4808-4813.

- Iyengar R, Birnbaumer L. (1982) Hormone Receptor Modulates the Regulatory Component of Adenylyl Cyclases by Reducing its Requirement for Mg Ion and Enhancing its Extent of Activation by Guanine Nucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA*; **79**:5179-5183.
- Jannini EA, Ulisse S, Cecconi S, Cironi L, Colonna R, D'Armiento M, Santoni A, Cifone MG. (1994) Follicle-stimulating hormone-induced phospholipase A2 activity and eicosanoid generation in rat Sertoli cells. *Biol Reprod*. Jul; **51**(1):140-5.
- Jay S. D., Ellis S. B., McCue A. F., Williams M. E., Vedvick T. S., Harpold M. M., Campbell K. P. (1990): Primary structure of the  $\gamma$  subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science*. **248**, 490-492.
- Jean-Faucher C, el Watik N, Berger M, De Turckheim M, Veysièrè G, Jean C (1983) Ontogeny of the secretory pattern of LH and FSH in male mice during sexual maturation. *Int J Androl*. **6**:575-584.
- Jegou B (1993) The Sertoli-germ cell communication network in mammals. *Int Rev Cytol* **147**; 25-96.
- Jegou, B (1992) The Sertoli cell. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* **6**:273–311.
- Jiang X, Dreano M, Buckler DR, Cheng S, Ythier A, Wu H, Hendrickson WA, el TayarN. (1995) Structural predictions for the ligandbinding region of glycoprotein hormone receptors and the nature of hormone-receptor interactions. *Structure*. **3**;1341-1353.
- Johnson L, Thompson DL Jr, Varner DD. (2008) Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. *Anim Reprod Sci*. Apr; **105**(1-2):23-51.
- Johnston CA, Siderovski DP. (2007) Receptor-mediated activation of heterotrimeric G-proteins: current structural insights. *Mol Pharmacol*. Aug; **72**(2):219-30.
- Johnston H, Baker PJ, Abel M, Charlton HM, Jackson G, Fleming L, Kumar TR, Shaughnessy PJO. (2004) Regulation Of Sertoli Cell Number And Activity By Follicle-Stimulating Hormone And Androgen During postnatal Development In The Mouse. *Endocrinology*. **145**(1);318-329.
- Jones L & Berndtson W. (1986) A quantitative study of Sertoli cell and germ cell populations as related to sexual development and ageing in the stallion. *Biol Reprod*. **35**;138-148.
- Jones M. B., Siderovski D. P. and Hooks S. B. (2004) The Gbg dimer as a novel source of selectivity in G-protein signaling: GGL-ing at convention. *Mol. Interv*. **4**; 200-214.
- Jordan BA, Devi LA. (1999) G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature*. Jun 17; **399** (6737):697-700.
- Josso N, Picard JY, Rey R, di Clemente N. (2006) Testicular anti-Müllerian hormone: history, genetics, regulation and clinical applications. *Pediatr Endocrinol Rev*. Jun; **3**(4):347-58.



- Kammermeier P. J., Ruiz-Velasco V. and Ikeda S. R. (2000) A voltage-independent calcium current inhibitory pathway activated by muscarinic agonists in rat sympathetic neurons requires both Galpha q/11 and Gbeta gamma. *J. Neurosci.* **20**;5623-5629.
- Kamp TJ, Hell JW. (2000) Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase. *C. Circ. Res.* **87**, 1095-1102.
- Kang YS. (2009) Downregulation of taurine transport by calcium blockers in osteoblast cells. *Adv Exp Med Biol.* **643**;513-21.
- Kangasniemi M, Kaipia A, Mali P, Toppari J, Huhtaniemi I, Parvinen M. (1990) Modulation of basal and FSH-dependent cyclic AMP production in rat seminiferous tubules staged by an improved transillumination technique. *Anat Rec.* May; **227**(1):62-76.
- Karnik SS, Khorana HG. (1990) Assembly of functional rhodopsin requires a disulfide bond between cysteine residues 110 and 187. *J Biol Chem.* Oct 15; **265**(29):17520-4.
- Katada T, Bokoch GM, Northup JK, Ui M, Gilman AG. (1984) The inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. Properties and function of the purified protein. *J Biol Chem.* Mar 25; **259**(6):3568-77.
- Ketelslegers JM, Hetzel WD, Sherins RJ, Catt KJ. (1978) Developmental changes in testicular gonadotropin receptors: plasma gonadotropins and plasma testosterone in the rat. *Endocrinology.* Jul; **103**(1);212-22.
- Khan SA, Ndjountche L, Pratchard L, Spicer LJ, Davis JS. (2002) Follicle-stimulating hormone amplifies insulin-like growth factor I-mediated activation of AKT/protein kinase B signaling in immature rat Sertoli cells. *Endocrinology.* Jun; **143**(6):2259-67.
- Kilberg MS, Handlogten ME, Christensen HN. (1980) Characteristics of an amino acid transport system in rat liver for glutamine, asparagine, histidine, and closely related analogs. *J Biol Chem.* May 10; **255**(9); 4011-9.
- Kimura K, White BH, Sidhu A. (1995) Coupling of human D-1 dopamine receptors to different guanine nucleotide binding proteins: evidence that D-1 dopamine receptors can couple to both Gs and Go. *J Biol Chem.* **270**:14672–14678.
- Klugbauer N, Marais E, Hofmann F. (2003). Calcium Channel Alpha2delta Subunits: Differential Expression, Function, And Drug Binding. *J. Bioenerg. Biomembr.* **35**, 639-647.
- Klugbauer N., Dai S., Specht V., Lacinová L., Marais E., Bohn G., Hofmann F. (2000): A family of  $\gamma$ -like calcium channel subunits. *FEBS Lett.* **470**, 189-197.
- Kobilka BK. (2007) G protein coupled receptor structure and activation. *Biochem Biophys Acta.* Apr;**1768**(4):794-807.
- Kolakowski LF Jr (1994) GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Recept Channels* **2**:1–7.

- Koshiba S, Kigawa T, Kikuchi A, Yokoyama S. (2001) Solution structure of the epsin N-terminal homology (ENTH) domain of human epsin. *J. Struct. Funct. Genomics* **2**, 1–8.
- Kozasa T, Gilman A. (1995) Purification of recombinant G proteins from Sf9 cells by hexahistidine tagging of associated subunits. Characterization of alpha 12 and inhibition of adenylyl cyclase by alpha z. *J. Biol. Chem.* **270**, 1734-1741.
- Kraus MH, Issing W, Miki T, Popescu NC, Aaronson SA. (1989) Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **86**; 9193-9197.
- Kunkel MT, Peralta EG. (1995) Identification of domains conferring G protein regulation on inward rectifier potassium channels. *Cell* **83**: 443-449.
- Kurokawa J., Adachi-Akahane S., Nagao T. (1997) 1,5-benzothiazepine binding domain is located on the extracellular side of the cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channel. *Mol. Pharmacol.* **51**, 262-268.
- Kurosu H, Maehama T, Okada T, Yamamoto T, Hoshino S, Fukui Y, Ui M, Hazeki O, Katada T. (1997) Heterodimeric phosphoinositide 3-kinase consisting of p85 and p110beta is synergistically activated by the betagamma subunits of G proteins and phosphotyrosyl peptide. *J Biol Chem.* Sep 26; **272**(39);24252-6.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, et al. (2001) The International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome [published erratum appears in *Nature* **412**:565, 2001]. *Nature (Lond)* **409**:860–921.
- Laugwitz, K. L., Allgeier, A., Offermanns, S., Spicher, K., Vansande, J., Dumont, J. E. and Schultz, G. (1996) The human thyrotropin receptor: a heptahelical receptor capable of stimulating members of all four G protein families. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 16-120.
- Le Blanc, C, Mironneau, C, Barbot, C, Henaff, M, Bondeva, T, Wetzker, R, Macrez, N. (2004) Regulation of vascular L-type Ca<sup>2+</sup> channels by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *Circ Res*; **95**:300-307.
- Leblond CP, Clermont Y. (1952) Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann NY Acad Sci*; **55**:548-573.
- Letts V. A., Felix R., Biddlecome G. H., Arikath J., Mahaffey C. L., Valenzuela A., Bartlett F. S., Mori Y., Campbell K. P., Frankel W. N. (1998): The mouse stargazer gene encodes a neuronal Ca<sup>2+</sup>-channel  $\gamma$  subunit. *Nat. Genet.* **19**, 340-347.
- Leung AT, Imagawa T, Block B, Franzini-Armstrong C, Campbell KP. (1988) Biochemical and ultrastructural characterization of the 1,4-dihydropyridine receptor from rabbit skeletal muscle. Evidence for a 52,000 Da subunit. *J Biol Chem.* Jan 15; **263**(2):994-1001.

- Levine JE. (2003) Gonadotropin-Releasing Hormone (Gnrh) In: Encyclopedia Of Hormones. Elsevier Science Usa 909-914.
- Lieberherr M, Grosse B. (1994) Androgens increase intracellular calcium concentration and inositol 1,4,5-trisphosphate and diacylglycerol formation via a pertussis toxin-sensitive G-protein. *J Biol Chem.* Mar 11; **269**(10):7217-23.
- Lindmo K, Stenmark H. (2006) Regulation of membrane traffic by phosphoinositide 3-kinases. *J Cell Sci.* Feb 15; **119**(Pt 4):605-14.
- Lindsey JS, Wilkinson MF. (1996) *Pem*: a testosterone-regulated and LH-regulated homeobox gene expressed in mouse sertoli cells and epididymis. *Dev Biol.* **179**:471-48.
- Lipkind GM, Fozzard HA (2003) Molecular modeling of interactions of dihydropyridines and phenylalkylamines with the inner pore of the L-type Ca<sup>2+</sup> channel. *Mol Pharmacol* **63**:499-511.
- Lipscombe D., Pan J. Q. and Gray A. C. (2002) Functional diversity in neuronal voltage-gated calcium channels by alternative splicing of Ca<sub>v</sub> α1. *Mol. Neurobiol.* **26**, 21-44.
- Logothetis DE, Kurachi Y, Galper J, Neer EJ, Clapham DE. (1987) The β<sub>γ</sub> Subunits of GTP-binding Proteins Activate the Muscarinic K<sup>+</sup> Channel in Heart. *Nature*; **325**:321-326.
- Loss ES, Jacobsen M, Costa ZS, Jacobus AP, Borelli F, Wassermann GF. (2004) Testosterone modulates K<sup>(+)</sup>ATP channels in Sertoli cell membrane via the PLC-PIP2 pathway. *Horm Metab Res.* Aug; **36**(8):519-25.
- Loss ES, Jacobus AP, Wassermann GF. (2007) Diverse FSH and testosterone signaling pathways in the Sertoli cell. *Horm Metab Res.* Nov; **39**(11):806-12.
- Lu Q, AtKisson M. S., Jarvis S. E., Feng Z. P., Zamponi G. W. and Dunlap K. (2001) Syntaxin 1A supports voltage-dependent inhibition of alpha1B Ca<sup>2+</sup> channels by Gbetagamma in chick sensory neurons. *J. Neurosci.* **21**: 2949-2957.
- Luttrell LM, Ferguson SS, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della Rocca GJ, Lin F, Kawakatsu H, Owada K, Luttrell DK, Caron MG, Lefkowitz RJ. (1999) Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science.* Jan 29; **283**(5402):655-61.
- Mackay S. (2000) Gonadal development in mammals at the cellular and molecular levels. *Int Rev Cytol.* **200**:47-99.
- Macrez N, Mironneau C, Carricaburu V, Quignard JF, Babich A, Czupalla C, Nürnberg B, Mironneau J. (2001) Phosphoinositide 3-kinase isoforms selectively couple receptors to vascular L-type Ca<sup>(2+)</sup> channels. *Circ Res.* Oct 12; **89**(8):692-9.
- Macrez N, Morel JL, Kalkbrenner F, Viard P, Schultz G, Mironneau J. (1997) A betagamma dimer derived from G13 transduces the angiotensin AT1 receptor signal to stimulation of Ca<sup>2+</sup> channels in rat portal vein myocytes. *J Biol Chem.* Sep 12; **272**(37):23180-5.

- Maekawa M, Kamimura K, Nagano T, (1996) Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Arch.Histol. Cytol.* **59**, 1-13.
- Maffucci T, Razzini G, Ingrosso A, Chen H, Iacobelli S, Sciacchitano S, Quon MJ, Falasca M. (2003) Role of pleckstrin homology domain in regulating membrane targeting and metabolic function of insulin receptor substrate 3. *Mol Endocrinol.* Aug; **17**(8):1568-79.
- Mali P, Kaipia A, Kangasniemi M, Toppari J, Sandberg M, Hecht NB, Parvinen M. (1989) Stage specific expression of nucleoprotein mRNAs during rat and mouse spermiogenesis. *Reprod Fertil Dev.* 1:369-382.
- Mallea LE, Machado AJ, Navaroli F, Rommerts FF. (1986) Epidermal growth factor stimulates lactate production and inhibits aromatization in cultured Sertoli cells from immature rats. *Int J Androl.* **9**:201–208.
- Mallea LE, Machado AJ, Navaroli F, Rommerts FF. (1987) Modulation of stimulatory action of follicle stimulating hormone (FSH) and inhibitory action of epidermal growth factor (EGF) on aromatase activity in Sertoli cells by calcium. *FEBS Lett.* **218**:143–147.
- Marion S, Kara E, Crepieux P, Piketty V, Martinat N, Guillou F, Reiter E. (2006) G protein-coupled receptor kinase 2 and beta-arrestins are recruited to FSH receptor in stimulated rat primary Sertoli cells. *Endocrinology.* Aug; **190**(2); 341-50.
- Marone R, Cmiljanovic V, Giese B, Wymann MP. (2008) Targeting phosphoinositide 3-kinase: moving towards therapy. *Biochim Biophys Acta.* Jan; **1784**(1):159-85.
- Marshall JC, Dalkin AC, Haisenleder DJ, Griffin ML, Kelch RP. (1993) GnRH Pulses-The Regulators Of Human Reproduction. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* **104**:31-46.
- Maudsley S, Martin B, Luttrell LM. (2005) The origins of diversity and specificity in G protein-coupled receptor signaling. *J Pharmacol Exp Ther.* Aug; **314**(2):485-94.
- Mayerhofer A, Frungieri MB, Fritz S, Bulling A, Jessberger B, Vogt HJ. (1999) Evidence for catecholaminergic, neuronlike cells in the adult human testis: changes associated with testicular pathologies. *J. Androl.* May-Jun; **20**(3):341-7.
- McCarrey JR. (1993) Development in the germ cell. In: *Cell and molecular biology of the testis.* Desjardins C, Ewing LL, (eds). Oxford: Oxford University Press; 58-89.
- McCudden CR, Hains MD, Kimple RJ, Siderovski DP, Willard FS. (2005) G-protein signaling: back to the future. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**; 551-577.
- McDonald CA, Millena AC, Reddy S, Finlay S, Vizcarra J, Khan SA, Davis JS. (2006) Follicle-Stimulating Hormone-Induced Aromatase in Immature Rat Sertoli Cells Requires an Active Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway and Is Inhibited via the Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway Molecular. *Endocrinology* **20**(3):608–618.
- McGivan JD, Pastor-Anglada M. (1994) Regulatory and molecular aspects of mammalian amino acid transport. *Biochem J.* Apr 15; **299** ( Pt 2);321-34.

- McGivan, J. D. (1992) in Mammalian Amino Acid Transport (Kilberg, M. S. and Haussinger, D., eds.), pp. 51-64, Plenum Press, New York.
- McIntire WE. (2009) Structural Determinants Involved in the Formation and Activation of G Protein $\beta\gamma$ Dimers. *Neurosignals*. **17**:82-99.
- McLachlan RI, O'donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, De Kretser DM, Pratis K, Robertson DM. (2002) Identification Of Specific Sites Of Hormonal Regulation in Spermatogenesis in Rats, Monkeys, and Man. *Recent Prog Horm Res*. **57**:149-79.
- McLaren A. (1998) Gonad development: assembling the mammalian testis. *Curr Biol*. Feb 26; **8**(5):R175-7.
- Meachem SJ, McLachlan RI, de Kretser DM, Robertson DM, Wreford NG. (1996) Neonatal exposure of rats to recombinant follicle stimulating hormone increases adult Sertoli and spermatogenic cell numbers. *Biol Reprod*. Jan; **54**(1):36-44.
- Meistrich ML, van Beek ME. (1993) Spermatogonial stem cells. *In: Cell and Molecular Biology of the Testis*. Desjardins C, Ewing LL, (eds). New York: Oxford University Press; 266-295.
- Meroni SB, Riera MF, Pellizzari EH, Cigorraga SB. (2002) Regulation of rat Sertoli cell function by FSH: possible role of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Endocrinol*. Aug; **174**(2):195-204.
- Meroni SB, Riera MF, Pellizzari EH, Galardo MN, Cigorraga SB. (2004) FSH activates phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signaling pathway in 20-day-old Sertoli cells independently of IGF-I. *J Endocrinol*. Feb; **180**(2):257-65.
- Michael SD, Kaplan SB, Macmillan BT (1980) Peripheral plasma concentrations of LH, FSH, prolactin and GH from birth to puberty in male and female mice. *J Reprod Fertil*. **59**:217-222.
- Milburn CC, Deak M, Kelly SM, Price NC, Alessi DR, Van Aalten DM. (2003) Binding of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate to the pleckstrin homology domain of protein kinase B induces a conformational change. *Biochem J*. Nov 1; **375**(Pt 3):531-8.
- Millar RP. (2005) GnRHs and GnRH receptors. *Anim. Reprod Sci*. **88**; 5–28.
- Mintz IM, Venema VJ, Swiderek KM, Lee TD, Bean BP, Adams ME. (1992). P-Type Calcium Channels Blocked By The Spider Toxin W-Aga-IVA. *Nature*, **355**, 827-829.
- Mittra S, Bourreau JP. (2006) Gs and Gi coupling of adrenomedullin in adult rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. May; **290**(5); H1842-7.
- Monaco L, Conti M. (1987) Inhibition by phorbol esters and other tumor promoters of the response of the Sertoli cell to FSH: evidence for dual site of action. *Mol Cell Endocrinol*. Feb; **49**(2-3):227-36.

- Moore LG, Chie WN, Hudson NL, McNatty KP (2000) Isoforms and half-life of FSH from sheep with different reproductive States. *J. Endocrinol.* **165**, 185-192
- Morello F, Perino A, Hirsch E. (2009) Phosphoinositide 3-kinase signaling in the vascular system. *Card Res* **82**, 261-271.
- Mould J., Yasuda T., Schroeder C. I., Beedle A. M., Doering C. J., Zamponi G. W., Adams D. J., Lewis R. J. (2004): The  $\alpha 2\delta$  auxiliary subunit reduces affinity of  $\omega$ -conotoxins for recombinant N-type ( $\text{Ca}_{v2.2}$ ) calcium channels. *J. Biol. Chem.* **279**, 34705-34714.
- Moyle WR, Campbell RK, Rao SN, Ayad NG, Bernard MP, Han Y, Wang Y (1995) Model of human chorionic gonadotropin and lutropin receptor interaction that explains signal transduction of the glycoprotein hormones. *J Biol Chem.* **270**; 20020-20031.
- Mruk DD, Cheng CY. (2004) Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocr Rev.* Oct; **25**(5):747-806.
- Munshi R, Pang I-H, Sternweis PC, Linden J (1991) A1 adenosine receptors of bovine brain couple to guanine nucleotide-binding proteins Gi1, Gi2, and Go. *J Biol Chem* **266**; 22285-22289.
- Murga C, Fukuhara S, Gutkind JS. (2000) A novel role for phosphatidylinositol 3-kinase beta in signaling from G protein-coupled receptors to Akt. *J. Biol. Chem.* **275**, 12069- 12073.
- Murphy CT, Kellie S, Westwick J. (1993) Tyrosine-kinase activity in rabbit platelets stimulated with platelet-activating factor. The effect of inhibiting tyrosine kinase with genistein on platelet-signal-molecule elevation and functional responses. *Eur J Biochem.* Sep 1; **216**(2);639-51.
- Nakashima M , Vanhoutte PM. (1995)Isoproterenol causes hyperpolarization through opening of ATP-sensitive potassium channels in vascular smooth muscle of the canine saphenous vein . *J Pharmacol Exp Ther.* **272**; 379-384.
- Neer EJ, Lok JM, Wolf LG. (1984) Purification and Properties of the Inhibitory Guanine Nucleotide Regulatory Unit of Brain Adenylate Cyclase. *J Biol Chem*; **259**:14222-14229.
- Nef S, Shipman T, Parada LF. (2000) A molecular basis for estrogen-induced cryptorchidism. *Dev Biol.* **224**;354-361.
- Neubig RR. (1994) Membrane organization in G-protein mechanisms. *FASEB J.* Sep; **8** (12):939-46.
- Nowycky MC, Fox AP, Tsien RW. (1985). Three Types Of Neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature.* **316**, 440-446.
- Oakberg EF. (1971) Spermatogonial stem-cell renewal in the mouse. *Anat Rec.* Mar; **169** (3);515-31.

- Ojeda SR, Lomniczi A, Mastronardi C, Heger S, Roth C, Parent AS, Matagne V, Mungenast AE. (2006) Minireview: The Neuroendocrine Regulation of Puberty: Is the Time Ripe for a Systems Biology Approach? *Endocrinology* **147**(3);1166-1174.
- Oka Y, Saraiva LR, Kwan YY, Korsching SI. (2009) The fifth class of G $\alpha$  proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 3; **106**(5):1484-9.
- Okada T, Hazeki O, Ui M, Katada T. (1996) Synergistic activation of PtdIns 3-kinase by tyrosine-phosphorylated peptide and beta gamma-subunits of GTP-binding proteins. *Biochem J*. Jul 15; **317** ( Pt 2):475-80.
- Oldham WM, Hamm HE. (2008) Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Jan; **9**(1):60-71.
- Olivares A, Söderlund D, Castro-Fernández C, Zariñán T, Zambrano E, Méndez JP, Ulloa-Aguirre A. (2004) Basal and gonadotropin-releasing hormone-releasable serum follicle-stimulating hormone charge isoform distribution and in vitro biological-to-immunological ratio in male puberty. *Endocrine*. Mar-Apr; **23**(2-3); 189-98.
- Olivera, B.M., Imperial, J.S., Cruz, L.J., Bindokas, V.P., Venema, V.J. & Adams, M.E. (1991). Calcium Channel-Targeted Polypeptide Toxins. *Ann. Ny Acad. Sci.* **635**, 114-122.
- Oonk RB, Grootegoed JA. (1988) Insulin-like growth factor I (IGF-I) receptors on Sertoli cells from immature rats and age-dependent testicular binding of IGF-I and insulin. *Mol Cell Endocrinol.* **55**:33-43.
- Orth J. (1982) Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *Anat Rec.* **203**; 485-492.
- Orth JM (1984) The role of follicle-stimulating hormone in controlling Sertoli cell proliferation in testes of fetal rats. *Endocrinology*. Oct; **115**(4):1248-55.
- Osipenko VN, Naidenov VG, Kostyuk PG, Shuba YM. (2003): Blocking of cloned low-threshold Ca<sup>2+</sup> channels by neuroleptic drugs. *Neurophysiology.* **35**; 7-16.
- Ostrom RS, Post SR, Insel PA. (2000) Stoichiometry and compartmentation in G protein-coupled receptor signaling: implications for therapeutic interventions involving G(s). *J Pharmacol Exp Ther.* **294**; 407-412.
- Ovchinnikov YuA, Alakhov YuB, Bundulis YuP, Bundule MA, Dovgas NV, Kozlov VP, Motuz LP, Vinokurov LM. (1982) The primary structure of elongation factor G from *Escherichia coli*. A complete amino acid sequence. *FEBS Lett.* Mar 8; **139**(1); 130-5.
- Overduin M, Cheever ML, Kutateladze TG. (2001) Signaling with phosphoinositides: better than binary. *Mol Interv.* Aug; **1**(3):150-9.
- Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, and Miyano M. (2000) Crystal structure of rhodopsin: a G protein-coupled receptor. *Science* **289**; 739-745.

- Parvinen M, Marana R, Robertson DM, Hansson V, Ritzen EM. (1980) In: *Testicular Development, Structure and Function*. Steinberg, A. Steinberg, E. (eds) pp 425-432. Raven Press, New York.
- Patrucco E, Notte A, Barberis L, Selvetella G, A. Maffei, M. Brancaccio, S. Marengo, G. Russo, O. Azzolino, S.D. Rybalkin, L. Silengo, F. Altruda, R. Wetzker, M.P. Wymann, G. Lembo, E. Hirsch. (2004) PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects, *Cell*. **118**; 375-387.
- Perey B, Clermont Y, Leblond C. (1961) The wave of the seminiferous epithelium in the rat. *Am J Anat*; **108**; 47-77.
- Perez DM, Karnik SS. (2005) Multiple signaling states of G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Rev*. Jun; **57**(2):147-61.
- Pérez-Sánchez VH, Wassermann GF. (1981) Amino acid transport in rat Sertoli cell enriched testes: studies on the mechanism of action of follicle stimulating hormone. *Braz J Med Biol Res*. Apr; **14**(1); 11-7.
- Perrard-Sapori MH, Chatelain PC, Rogemond N, Saez JM. (1987) Modulation of Leydig cell functions by culture with Sertoli cells or with Sertoli cell conditioned medium: effect of insulin, somatomedin-C and FSH. *Mol Cell Endocrinol*. **50**;193-201.
- Phillips DJ, de Kretser DM. (1998) Follistatin: a multifunctional regulatory protein. *Front. Neuroendocrinol*. Oct; **19**(4):287-322.
- Piketty V, Kara E, Guillou F, Reiter E, Crepieux P. (2006) Follicle-stimulating hormone (FSH) activates extracellular signal-regulated kinase phosphorylation independently of beta-arrestin- and dynamin-mediated FSH receptor internalization. *Reprod Biol Endocrinol*. Jun **20**;4:33.
- Piketty V, Kara E, Guillou F, Reiter E, Crepieux P. (2006) Follicle-stimulating hormone (FSH) activates extracellular signal-regulated kinase phosphorylation independently of beta-arrestin- and dynamin-mediated FSH receptor internalization. *Reprod Biol Endocrinol*. Jun **20**;4:33.
- Pitt GS. (2007) Calmodulin and CaMKII as molecular switches for cardiac ion channels. *Cardiovasc. Res*. **73**, 641–647.
- Pitteloud N, Dwyer AA, DeCruz S, Lee H, Boepple PA, Crowley WF Jr, Hayes FJ. (2008) The relative role of gonadal sex steroids and gonadotropin-releasing hormone pulse frequency in the regulation of follicle-stimulating hormone secretion in men. *J Clin Endocrinol Metab*. Jul; **93**(7):2686-92.
- Plant TM; Marshall GR. (2003) The Functional Significance of FSH in Spermatogenesis and the Control of Its Secretion in Male Primates. *Endocrine Rev*. **22**(6):764-786.



- Plowman GD, Culouscou JM, Whitney GS, Green JM, Carlton GW, Foy L, Neubauer MG, Shoyab M. (1993) Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4a, fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**;1746-1750.
- Pollak MN, Schernhammer ES, Hankinson SE. (2004) Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat Rev Canc*. **4** 505–518.
- Pragnell M, De Waard M, Mori Y, Tanabe T, Snutch TP, Campbell KP (1994) Calcium channel  $\beta$ -subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the  $\alpha_1$ -subunit. *Nature* **368**:67-70.
- Prigent SA, Lemoine NR. (1992) The type 1 (EGFR-related) family of growth factor receptors and their ligands. *Prog Growth Factor Res*, **4**;1-24.
- Purvis K, Parvinen M, Gautvik K, Hansson V. (1984) Stage-dependent differences in FSH binding and cyclic nucleotide secretion and metabolism during the cycle of the rat seminiferous epithelium. In: *Regulation of Target Cell Responsiveness*. McKerns KW, Aakvaag A, Hansson V, (eds). Plenum Publishing Corp.;**1**; 21-35.
- Quignard JF, Mironneau J, Carricaburu V, Fournier B, Babich A, Nurnberg B, Mironneau C, Macrez N. (2001) Phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  mediates angiotensin II-induced stimulation of L-type calcium channels in vascular myocytes. *J Biol Chem*. Aug 31; **276**(35):32545-51.
- Quirk SM, Reichert LE Jr. (1988) Regulation of the phosphoinositide pathway in cultured Sertoli cells from immature rats: effects of follicle-stimulating hormone and fluoride. *Endocrinology*. Jul; **123**(1):230-7.
- Rall TW, Sutherland EW, Berthet J. (1957) The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase IV Effect of epinephrine and glucagon on the reactivation of phosphorylase in liver homogenates. *J. Biol. Chem*. **224**; 463-475.
- Randall A, Tsien RW. (1995). Pharmacological Dissection Of Multiple Types of  $\text{Ca}^{2+}$  channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J. Neurosci.*, **15**, 2995-3012.
- Rappaport MS, Smith EP. (1995) Insulin-like growth factor (IGF) binding protein 3 in the rat testis: follicle-stimulating hormone dependence of mRNA expression and inhibition of IGF-I action on cultured Sertoli cells. *Biol Reprod*. **52**; 419-425.
- Rappaport MS, Smith EP. (1996) Insulin-like growth factor I inhibits aromatization induced by follicle-stimulating hormone in rat sertoli cell culture. *Biol Reprod*. **54**; 446-452.
- Ray K, Kunsch C, Bonner LM, Robishaw JD. (1995) Isolation of cDNA clones encoding eight different human G protein  $\gamma$  subunits, including three novel forms designated the  $\gamma_4$ ,  $\gamma_{10}$ , and  $\gamma_{11}$  subunits. *J. Biol. Chem*. **270**; 21765-21771.

- Reame N, Sauder SE, Kelch RP, et al. (1984) Pulsatile gonadotropin secretion during the human menstrual cycle-evidence for altered frequency of gonadotropin-releasing hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab*; **59**; 328.
- Reichlin S (1992) Neuroendocrinology. In: *Williams textbook of endocrinology*. Wilson JD, Foster DW, (eds), pp 135-219. Philadelphia: Saunders.
- Reimer RJ, Chaudhry FA, Gray AT, Edwards RH. (2000) Amino acid transport system A resembles system N in sequence but differs in mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul 5; **97**(14);7715-20.
- Rey R. (2000) Assessment of seminiferous tubule function (anti-müllerian hormone). *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. Sep;**14**(3):399-408.
- Rhee S. G. (2001) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu. Rev. Biochem.* **70**; 281-312.
- Richards JS. (2001) New signaling pathways for hormones and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate action in endocrine cells. *Mol Endocrinol*. Feb; **15**(2); 209-18.
- Richards MW, Butcher AJ, Dolphin AC. (2004) Ca<sup>2+</sup> channel  $\beta$ -subunits: structural insights AID our understanding. *Trends Pharmacol. Sci.* **25**, 626-632.
- Riedemann J, Macaulay VM (2006) IGF1R signalling and its inhibition. *Endocrine-Related Cancer*. **13** S33-S43.
- Rios CD, Jordan BA, Gomes I, Devi LA.(2001) G-protein-coupled receptor dimerization: modulation of receptor function. *Pharmacol Ther.* Nov-Dec; **92**(2-3);71-87.
- Ritzen EM. (1983) Chemical messengers between Sertoli cells and neighbouring cells. *J Steroid Biochem.* **19**; 499-504.
- Rodríguez-Escudero I, Andrés-Pons A, Pulido R, Molina M, Cid VJ. (2009) Phosphatidylinositol 3-Kinase-dependent Activation of Mammalian Protein Kinase B/Akt in *Saccharomyces cerevisiae*, an in Vivo Model for the Functional Study of Akt Mutations. *J Biol Chem*. May 15; **284**(20):13373-83.
- Roosen-Runge EC, Barlow FD. (1953) Quantitative Studies On Human Spermatogenesis. I. Spermatogonia. *Am J Anat*. Sep; **93**(2) ;143-69.
- Ross EM, Gilman AG. (1977) Resolution of some components of adenylate cyclase necessary for catalytic activity. *J. Biol. Chem.* **252**: 6966-6969.
- Russell LD, Ettlín RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED (1990) Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. Clearwater, FL: Cache River Press.
- Russell LD, Peterson RN (1985) Sertoli cell junctions: morphological and functional correlates. *Int Rev Cytol.* **94**;177-211.

- Russell LD, Ren HP, Sinha Hikim I, Schulze W, Sinha Hikim AP (1990) A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes, and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell. *Am J Anat.* **188**:21-30.
- Russell LD. (1993) Morphological and functional evidence for Sertoli-germ cell relationships. *In: The Sertoli cell.* Griswold MD, Russell LD (eds.). Cache River Press, Clearwater, 365–390
- Russell, L. D., Ettlin, R. A., Hikm, A. P. S., and Clegg, E. D. (1990). "Histological and Histopathological Evaluation of the Testis." Cache River Press, Clearwater, FL
- Safa P, Boulter J, Hales TG. (2001) Functional properties of Cav1.3 (alpha1D) L-type Ca<sup>2+</sup> channel splice variants expressed by rat brain and neuroendocrine GH3 cells. *J. Biol. Chem.* **276**; 38727-38737.
- Sale EM, Sale GF. (2008) Protein kinase B: signalling roles and therapeutic targeting. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**; 113-127 .
- Santen RJ, Bardin CW. (1973) Episodic luteinizing hormone secretion in man. *J Clin Invest*; **52**;2617.
- Santi CM, Cayabyab FS, Sutton KG, McRory JE, Mezeyova J, Hamming KS, Parker D, Stea A, Snutch TP. (2002) Differential inhibition of T-type calcium channels by neuroleptics. *J. Neurosci.* **22**, 396-403.
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* Feb 18; **307**(5712):1098-101.
- Sasaki M, Yamamoto M, Arishima K, Eguchi Y.(2000) Effect of folliclestimulating hormone on Sertoli cell division in cultures of fetal rat testes. *Biol Neon.* **78**; 48-52.
- Schlatt S, de Kretser DM, Loveland KL. (1996) Discriminative analysis of rat Sertoli cell and peritubular cells and their proliferation *in vitro*: evidence for follicle-stimulating hormone-mediated contact inhibition of Sertoli cell mitosis. *Biol Reprod.* **55**; 227-235.
- Schlatt S, Meinhardt A, Nieschlag E. (1997) Paracrine regulation of cellular interactions in the testis: factors in search of a function. *Eur J Endocrinol* **137**; 107-117.
- Schlatt S, Zhengwei Y, Meehan T, de Kretser DM, Loveland KL. (1999) Application of morphometric techniques to postnatal rat testes in organ culture: Insights into testis growth in organ culture. *Cell Tissue Res.* Nov;**298**(2):335-43.
- Schulze C. (1979) Morphological characteristics of the spermatogonial stem cells in man. *Cell Tissue Res.*; **198**;191-199.
- Schulze WX, Deng L, Mann M (2005) Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family. *Mol Syst Biol*, **1**;1-13.

Sertoli E. (1865) e lesistenza di particolari cellule ramificate nei canalicoli seminiferi dell'testicolo umano. *Morgagni*; **7**; 31-40.

Setchell BP. (1993) .Foreword, *In: The Sertoli Cell*. Russell LD, Griswold MD, (eds). Cache River Press, Clearwater, FL.

Sharma OP , Flores JA , Leong DA , Velhuis JD. (1994). Cellular basis for folliclestimulating hormone-stimulation in single rat Sertoli cells: possible dissociation from effects of adenosine 3,5-monophosphate . *Endocrinology*. **134**; 1915-1923.

Sharpe R. (1994) Regulation of spermatogenesis. *In: The Physiology of Reproduction*. Knobil E, Neill J, (eds). 2nd ed. New York: Raven Press,:1363-1434.

Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C, Fisher JS. (2003) Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* **125**, 769-784.

Shen Y, Yu D, Hiel H, Liao P, Yue DT, Fuchs PA. and Soong T. W. (2006) Alternative splicing of the Cav1.3 channel IQ domain, a molecular switch for Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation within auditory hair cells. *J. Neurosci*. **26**, 10690-10699.

Shuttlesworth GA, de Rooij DG, Huhtaniemi I, Reissmann T, Russell LD, Shetty G, Wilson G, Meistrich ML. (2000) Enhancement of A spermatogonial proliferation and differentiation in irradiated rats by gonadotropin-releasing hormone antagonist administration. *Endocrinology*. Jan; **141**(1);37-49.

Siderovski DP, Willard FS. (2005) The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits. *Int J Biol Sci.*; **1**(2):51-66.

Sieber M., Nastainczyk W., Zubor V., Wernet W., Hofmann F. (1987): The 165-kDa peptide of the purified skeletal muscle dihydropyridine receptor contains the known regulatory sites of the calcium channel. *Eur. J. Biochem*. **167**, 117-122.

Silva FRMB & Wassermann GF. (1999) Kinetics of FSH stimulation of methylaminoisobutyric acid uptake in Sertoli cell in culture from testes of 15 day-old rats. *Med Sci Res*; **27**; 627–630.

Silva FRMB, Leite LD , Wassermann GF. (2002)Rapid signal transduction in Sertoli cells *Eur J. Endocrinol*. **147**; 425-433.

Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E. (2005) The Follicle-Stimulating Hormone Receptor: Biochemistry, Molecular Biology, Physiology, and Pathophysiology. *Endocrine Rev*. **18** (6); 739-773.

Simorangkir DR, Marshall GR, Ehmcke J, Schlatt S, Plant TM. (2005) Prepubertal expansion of dark and pale type A spermatogonia in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) results from proliferation during infantile and juvenile development in a relatively gonadotropin independent manner. *Biol Reprod*. Dec; **73**(6);1109-15.

- Simorangkir DR, Marshall GR, Plant TM. (2003) Sertoli Cell Proliferation During Prepubertal Development In The Rhesus Monkey (*Macaca Mulatta*) Is Maximal During Infancy When Gonadotropin Secretion Is Robust. *J Clin Endocrinol Metab.* **88**(10); 4984-4989.
- Singh J, O'Neill C, Handelsman DJ. (1995) Induction of spermatogenesis by androgens in gonadotropin-deficient (hpg) mice. *Endocrinology* **136**; 5311-5321.
- Skinner MK. (1991) Cell-cell interactions in the testis. *Endocrine Rev.* **12** 45-77.
- Skinner MK, Fritz IB. (1986). Identification of a non-mitogenic paracrine factor involved in mesenchymal-epithelial cell interactions between testicular peritubular cells and Sertoli cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **44**; 85-97.
- Smith EP, Dickson BA, Chernauek SD. (1990) Insulin-like growth factor binding protein-3 secretion from cultured rat Sertoli cells: dual regulation by follicle stimulating hormone and insulin-like growth factor-I. *Endocrinology* **127**; 2744-2751.
- Smith SK, Limbird LE. (1982) Evidence that human subunit of the skeletal muscle calcium channel. *FEBS Lett.* **334**; 261-264.
- Smrcka AV. (2008) G protein betagamma subunits: central mediators of G protein-coupled receptor signaling. *Cell Mol Life Sci.* Jul; **65**(14):2191-214.
- Soos MA, Navé BT, Siddle K. (1993) Immunological studies of type I IGF receptors and insulin receptors: characterisation of hybrid and atypical receptor subtypes. *Adv Exp Med Biol.* **343**; 145-57.
- Spritzer PM, Wassermann GF. (1985) Amino acid uptake and protein synthesis in rat testes: stimulation by dissociable factors. *Horm Metab Res.* May; **17**(5);237-40.
- Srimaroeng C, Perry JL, Pritchard JB. (2008) Physiology, structure, and regulation of the cloned organic anion transporters. *Xenobiotica.* Jul; **38** (7-8);889-935.
- Srivastava CH, Monts BS, Rothrock JK, Perdo MJ, Pescovitz OH. (1995) Presence of spermatogenic-specific promoter in the rat growth hormone-releasing hormone gene. *Endocrinology* **136**; 1502-1508.
- Stanton KJ, Burgon PG, Hearn MTW, Robertson DM. (1996) Structural and functional characterization of hFSH and hLH isoforms. *Mol Cell Endocrinol* **125**;133-141.
- Steinberger A, Hintz M & Heindel JJ (1978) Changes in cyclic AMP responses to FSH in isolated rat Sertoli cells during sexual maturation. *Biol Reprod.* **19**; 566-572.
- Stephens LR, Eguinoa A, Erdjument-Bromage H, Lui M, Cooke F, Coadwell J, Smrcka AS, Thelen M, Cadwallader K, Tempst P, Hawkins PT. (1997) The G beta gamma sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. *Cell.* Apr 4; **89**(1); 105-14.

- Stojilkovic S, Reinhardt J, Catt KJ. (1994) Gonadotropin-releasing hormone receptors: structure and signal transduction pathways. *Endocr Rev.* **15**; 462-499.
- Stoyanov, B., Volinia, S., Hanck, T., Rubio, I., Loubtchenkov, M., Malek, D., Stoyanova, S., Vanhaesebroeck, B., Dhand, R., Nurnberg, B., Gierschik, P., Seedorf, K., Hsuan, J. J., Waterfield, M. D., and Wetzker, R. (1995) *Science* **269**, 690-693.
- Sunahara R. K. and Taussig R. (2002) Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling. *Mol. Interv.* **2**: 168-184.
- Sundaresan S, Colin IM, Pestell RG, Jameson JL. (1996) Stimulation of mitogen-activated protein kinase by gonadotropin-releasing hormone: evidence for the involvement of protein kinase C. *Endocrinology*, **137**: 304-311.
- Surmacz E. (2003) Growth factor receptors as therapeutic targets: strategies to inhibit the insulin-like growth factor I receptor *Oncogene* **22**; 6589-6597.
- Sutherland EW, Rall TW. (1958) Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *J. Biol. Chem.* **232**; 1077-1091.
- Sweeney MI, Dolphin AC. (1992) 1,4-Dihydropyridines modulate GTP hydrolysis by Go in neuronal membranes, *Febs Letters.* **310**(1) Sept; 66-70.
- Sweeney MI, Dolphin AC. (1992) 1,4-Dihydropyridines modulate GTP hydrolysis by Go in neuronal membranes. *FEBS Lett.* Sep 21; **310**(1);66-70.
- Takahashi M, Seagar MJ, Jones JF, Reber BF, Catterall WA. (1987) Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug; **84**(15); 5478-82.
- Takahashi T, Taniguchi T, Konishi H, Kikkawa U, Ishikawa Y, Yokoyama M. (1999) Activation of Akt/protein kinase B after stimulation with angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* **276**; H1927-H1934.
- Talavera K., Staes M., Janssens A., Droogmans G., Nilius B. (2004): Mechanism of arachidonic acid modulation of the T-type Ca<sup>2+</sup> channel  $\alpha 1G$ . *J. Gen. Physiol.* **124**, 225-238.
- Tang WJ, Gilman AG. (1991) Type specific regulation of adenylyl cyclase by G protein  $\beta\gamma$  subunits. *Science* **254**; 1500-1503.
- Tang X, Downes CP. (1997) Purification and characterization of Gbetagamma-responsive phosphoinositide 3-kinases from pig platelet cytosol. *J Biol Chem.* May 30; **272**(22);14193-9.
- Tang X, Wang L, Proud CG, Downes CP. (2003) Muscarinic receptor-mediated activation of p70 S6 kinase 1 (S6K1) in 1321N1 astrocytoma cells: permissive role of phosphoinositide 3-kinase. *Biochem J.* Aug 15; **374**(Pt 1):137-43.

- Tang Z. Z., Liang M. C., Lu S., Yu D., Yu C. Y., Yue D. T. and Soong T. W. (2004) Transcript scanning reveals novel and extensive splice variations in human L-type voltage-gated calcium channel, Ca<sub>v</sub>1.2  $\alpha$ 1 subunit. *J. Biol. Chem.* **279**, 44335-44343.
- Tapanainen JS, Aittomaki K, Min J, Vaskivuo T, Huhtaniemi IT (1997) Men homozygous for an inactivating mutation of the folliclestimulating hormone (FSH) receptor gene present variable suppression of spermatogenesis and fertility. *Nat Genet.* **15**; 205-206.
- Tarulli GA, Meachem SJ, Schlatt S, Stanton PG. (2008) Regulation of testicular tight junctions by gonadotrophins in the adult Djungarian hamster in vivo. *Reproduction.* Jun; **135**(6); 867-77.
- Taussig R, Iniguez-Lluhi JA, Gilman AG. (1993) Inhibition of adenylyl cyclase by Gi alpha. *Science* **261**; 218-221.
- Taussig R, Tang WJ, Hepler JR, Gilman AG. (1994) Distinct patterns of bidirectional regulation of mammalian adenylyl cyclases. *J. Biol. Chem.* **269**, 6093-6100.
- Tedford HW, Zamponi GW. (2006) Direct G protein modulation of Ca<sub>v</sub>2 calcium channels. *Pharmacol Rev.* Dec; **58**(4);837-62.
- Themmen APN, Huhtaniemi IT. (2000) Mutations of Gonadotropins and Gonadotropin Receptors: Elucidating the Physiology and Pathophysiology of Pituitary-Gonadal Function. *Endocrine Rev* **21**(5); 551-583.
- Timossi CM, Barrios-de-Tomasi J, González-Suárez R, Arranz MC, Padmanabhan V, Conn PM, Ulloa-Aguirre A. (2000) Differential effects of the charge variants of human follicle-stimulating hormone. *J Endocrinol.* May; **165**(2);193-205.
- Todorovic S. M., Perez-Reyes E., Lingle C. J. (2000): Anticonvulsants but not general anesthetics have differential blocking effects on different T-type current variants. *Mol Pharmacol.* **58**, 98-108.
- Toker A. (2002) Phosphoinositides and signal transduction. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**; 761-779.
- Tougaard C, Tixier-Vidal A. (1994) Lactotropes and gonadotropes. In: *The Physiology of Reproduction.* Knobil E, Neill JD (Eds), Raven Press, New-York, p 1711-1747.
- Tres LL, Smith EP, Van Wyk JJ, Kierszenbaum AL (1986) Immunoreactive sites and accumulation of somatomedin-C in rat Sertoli-spermatogenic cell cocultures. *Exp Cell Res* **162**;33-50.
- Troispoux C, Reiter E, Combarrous Y, Guillou F. (1998) Beta2 adrenergic receptors mediate cAMP, tissue-type plasminogen activator and transferrin production in rat Sertoli cells. *Mol Cell Endocrinol.* Jul 25; **142**(1-2); 75-86.
- Tschopp O, Yang ZZ, Brodbeck D, Dummler BA, Hemmings-Mieszczak M, Watanabe T, Michaelis T, Frahm J, Hemmings BA. (2005) Essential role of protein kinase B gamma (PKB

gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development* **132**:2943-2954.

Tsutsumi O, Kurachi H, Oka T. (1986) A physiological role of epidermal growth factor in male reproductive function. *Science*, **233**:975-977.

Uguralp S, Bay Karabulut A, Mizrak B, Kaymaz F, Kiziltay A, Hasirci N. (2004) The effect of sustained and local administration of epidermal growth factor on improving bilateral testicular tissue after torsion. *Urol Res*, **32**:323-331.

Ulloa-Aguirre A, Espinoza R, Damián-Matsumura P, Larrea F, Flores A, Morales L, Domínguez R. (1988) Studies on the microheterogeneity of anterior pituitary follicle-stimulating hormone in the female rat. Isoelectric focusing pattern throughout the estrous cycle. *Biol Reprod*. **38**:70-78.

Ulloa-Aguirre A, Cravioto A, Damián-Matsumura P, Jiménez M, Zambrano E, Diaz-Sánchez V. (1992) Biological characterization of the naturally occurring analogues of intrapituitary human follicle-stimulating hormone. *Hum Reprod*. **7**:23-30.

Ulloa-Aguirre A, Rees MA Jr, Beitins IA, Padmanabhan V. (1995) Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. *Endocr Rev*. **16**:765-787.

Ulloa-Aguirre A, Timossi C. (1998) Structure-Function Relationship Of Follicle stimulating hormone and its receptor. *Hum Reprod Update*. May-Jun; **4**(3):260-83.

Ulloa-Aguirre A, Stanislaus D, Janovick JA, Conn PM. (1999) Structure-activity relationships of G protein-coupled receptors. *Arch Med Res*. Nov-Dec; **30**(6):420-35.

Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Damián-Matsumura P, Dias JA. (1999) Role of glycosylation in function of follicle-stimulating hormone. *Endocrine* **11**:205-215.

Ulloa-Aguirre A, Maldonado A, Damian-Matsumura P, Timossi C. (2001) Endocrine regulation of gonadotropin glycosylation. *Arch Med Res*. **32**:520-532.

Ulloa-Aguirre A, Timossi C. (2000) Biochemical and functional aspects of gonadotrophin-releasing hormone and gonadotrophins. *Reprod Biomed Online* **1**:48-62.

Ulloa-Aguirre A, Zariñán T, Pasapera AM, Casas-González P, Dias JA. (2007) Multiple facets of follicle-stimulating hormone receptor function. *Endocrine*. Dec; **32**(3):251-63.

Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW, Lee J, Yarden Y, Libermann TA, Schlessinger J, Dawnward J, Mayes ELV, Whittle N, Waterfiela MD, Seeburg PH. (1984) Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature*, **309**:418-425.

Vaghy PL, Striessnig J, Miwa K, Knaus HG, Itagaki K, McKenna E, Glossmann H, Schwartz A. (1987) Identification of a novel 1,4-dihydropyridine- and phenylalkylamine-binding polypeptide in calcium channel preparations. *J Biol Chem*. Oct 15; **262**(29):14337-42.



- van Alphen MM, van de Kant HJ, de Rooij DG. (1988) Repopulation of the seminiferous epithelium of the rhesus monkey after X irradiation. *Radiat Res.* Mar; **113**(3):487-500.
- van Roijen N. (1999) Paracrine control of testis function. *In: Male Reproductive Function.* Christina Wang (ed) Kluwer. 41-65.
- Vanelli BG, Barni T, Orlando C, Natali A, Serio M & Balboni GC. (1988) Insulin-like growth factor (IGF-I) and IGF-I receptor in human testis: an immunohistochemical study. *Fertility and Sterility* **49**; 666-669.
- Vanhaesebroeck, B., Leever, S. J., Panayotou, G., and Waterfield, M. D. (1997) Phosphoinositide 3-kinases: A conserved family of signal transducers. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 267-272.
- Vecchione, C., E. Patrucco, G. Marino, L. Barberis, R. Poulet, A. Aretini, A. Maffei, M. T. Gentile, M. Storto, O. Azzolino, et al. (2005). Protection from angiotensin II-mediated vasculotoxic and hypertensive response in mice lacking PI3K. *J. Exp. Med.* **201**; 1217-1228.
- Veldhuis, J.D., Johnson, M.L. and Seneta, E. (1991) Analysis of the copulsatility of anterior pituitary hormones. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **73**, 569-576.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sulton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304-1351.
- Vergouwen RPPA, Huiskamp R, Bas RJ, Roepers-Gajadien HL, Davids JAG, de Rooij DG. (1993) Postnatal development of testicular populations in mice. *J Reprod Fertil* **99**:479-485
- Viard P, Exner T, Maier U, Mironneau J, Nürnberg B, Macrez N. (1999 ) Gbetagamma dimers stimulate vascular L-type Ca<sup>2+</sup> channels via phosphoinositide 3-kinase. *FASEB J.* Apr; **13**(6); 685-94.
- Viard P, Macrez N, Mironneau C, Mironneau J. (2001) Involvement of both G protein alphas and beta gamma subunits in beta-adrenergic stimulation of vascular L-type Ca(2+) channels. *Br J Pharmacol.* Feb; **132**(3); 669-76.
- Villalpando I, Lira E, Medina G, Garcia-Garcia E, Echeverria O. (2008) Insulin-like growth factor 1 is expressed in mouse developing testis and regulates somatic cell proliferation. *Exp Biol Med* (Maywood). Apr; **233**(4); 419-26.
- Vogt S., Grosse R., Schultz G. and Offermanns S. (2003) Receptor-dependent RhoA activation in G12/G13-deficient cells: genetic evidence for an involvement of Gq/G11. *J. Biol.Chem.* **278**; 28743-28749.
- Von Ledebur EI, Almeida JP, Loss ES, Wassermann GF. (2002) Rapid effect of testosterone on rat Sertoli cell membrane potential. Relationship with K<sup>+</sup>ATP channels. *Horm Metab Res.* Oct; **34** (10); 550-5.

- Walczak-Jedrzejowska R, Sowikowska-Hilczer J, Marchlewska K, Oszukowska E, Kula K. (2007) During Seminiferous Tubule Maturation Testosterone And Synergistic Action Of Fsh With Estradiol Support Germ Cell Survival While Estradiol Alone Has Pro-Apoptotic Effect. *Folia Histochemica Et Cytobiologica*. **45**(1); 59-64.
- Walker WH, Cheng J.(2005) FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction*. **130**; 15-28.
- Wang S, Basson MA. (2008) Identification of functional domains in akt responsible for distinct roles of akt isoforms in pressure-stimulated cancer cell adhesion, *Exp Cell Res*. **314**; 286-296.
- Warren DW, Huhtaniemi IT, Tapanainen J, Dufau ML, Catt KJ. (1984) Ontogeny of gonadotropin receptors in the fetal and neonatal rat testis. *Endocrinology* **114**; 470-476.
- Wassermann GF, Loss ES . (1989) Effect of calcium channel blocker, verapamil, on amino acid uptake stimulated by FSH in rat testes. *Med Sci Res*. **17**; 779-780.
- Wassermann GF, Bloch LM, Grillo ML, Silva FR, Loss ES, McConnell LL. (1992a) Biochemical factors involved in the FSH action on amino acid transport in immature rat testes. *Horm Metab Res*. Jun; **24** (6):276-9.
- Wassermann GF, Monti Bloch L, Grillo ML, Silva FR, Loss ES, McConnell LL. (1992b) Electrophysiological changes of Sertoli cells produced by the acute administration of amino acid and FSH. *Horm Metab Res*. Jul; **24**(7):326-8.
- Wassermann GF, Loss ES. (2004) Testosterone action on the Sertoli cell membrane: a KIR6.x channel related effect. *Curr Pharm Des*. **10**(21); 2649-56.
- Watanabe T., Kalasz H., Yabana H., Kuniyasu A., Mershon J., Itagaki K., Vaghy P. L., Naito K., Nakayama H., Schwartz A. (1993): Azidobutyryl clentiazem a new photoactivatable diltiazem analog, labels benzothiazepine binding sites in the  $\alpha 1$  subunit of the skeletal muscle calcium channel. *FEBS Lett*. **334**, 261-264.
- Watanabe T., Kalasz H., Yabana H., Kuniyasu A., Mershon J., Itagaki K., Vaghy P. Wellner-Kienitz, M. C., Bender, K. and Pott, L. (2001) Overexpression of  $\beta 1$  and  $\beta 2$  adrenergic receptors in rat atrial myocytes. Differential coupling to G protein-gated inward rectifier  $K^+$  channels via  $G_s$  and  $G_i/o$ . *J. Biol. Chem*. **276**; 37347-37354.
- Weinryb I, Michel IM. (1974) Interactions of alpha-methylfluorene-2-acetic acid with adenylate cyclase. *Biochem Pharmacol*. Sep 1; **23**(17); 2411-9.
- Wen B, Deutsch E, Marangoni E, Frasca V, Maggiorella L, Abdulkarim B, Chavaudra N, Bourhis J. (2001) Tyrphostin AG 1024 modulates radiosensitivity in human breast cancer cells. *Br J Cancer*. Dec 14; **85**(12); 2017-21.
- Wess J. (1998) Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity. *Pharmacol Ther*. Dec; **80**(3); 231-64.

- Wettschureck N, Offermanns S. (2005) Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev.* Oct; **85**(4); 1159-204.
- Williams M. E., Washburn M. S., Hans M., Urrutia A., Brust P. F., Prodanovich P., Harpold M. M., Stauderman K. A. (1999): Structure and functional characterization of a novel human low-voltage activated calcium channel. *J. Neurochem.* **72**; 791-799.
- Wong CH, Cheng CY (2005) The blood-testis barrier: its biology, regulation, and physiological role in spermatogenesis. *Curr Top Dev Biol.* **71**; 263-96.
- Wong V, Russell LD. (1983) Three-dimensional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell. I. Methods, basic configuration, and dimensions. *Am J Anat.* **167**;143-161.
- Wu FCW, Butler GE, Kelnar CJH, et al. (1990) Patterns of pulsatile LH secretion before and during the onset of puberty in boys: a study using an immunoradiometric assay. *J Clin Endocrinol Metab.* **70**; 629.
- Xiao RP. (2001) Beta-adrenergic signaling in the heart: dual coupling of the beta2-adrenergic receptor to G(s) and G(i) proteins. *Sci STKE.* Oct **16**;(104):RE15.
- Xiao, R. P., Ji, X. and Lakatta, E. G. (1995) Functional coupling of the beta 2-adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes. *Mol. Pharmacol.* **47**; 322-329.
- Yan YC, Sun YP, Zhang ML. (1998) Testis epidermal growth factor and spermatogenesis. *Arch Androl.* **40**;133-146.
- Yen SSC, Tsai CC, Naftolin F, et al. (1972) Pulsatile patterns of gonadotropin release in subjects with and without ovarian function. *J Clin Endocrinol Metab.* **34**; 671.
- Yu FH and Catterall WA (2004) The VGL-chanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Sci STKE.* **253**:re15.
- Yun SJ, Tucker DF, Kim EK, Kim MS, Do KH, Ha JM, Lee SY, Yun J, Kim CD, Birnbaum MJ, Bae SS. (2009) Differential regulation of Akt/protein kinase B isoforms during cell cycle progression. *FEBS Lett.* Feb 18;**583**(4); 685-90.
- Zahradníková A, Minarovic I, Zahradník I. (2007) Competitive and cooperative effects of Bay K8644 on the L-type calcium channel current inhibition by calcium channel antagonists. *J Pharmacol Exp Ther.* Aug; **322**(2); 638-45.
- Zambrano E, Zariñán T, Olivares A, Barrios-de-Tomasi J, Ulloa-Aguirre A. (1999) Receptor binding activity and in vitro biological activity of the human FSH charge isoforms as disclosed by heterologous and homologous assay systems: implications for the structure-function relationship of the FSH variants. *Endocrine.* Apr;**10** (2); 113-21.
- Zhang Y., Cribbs L. L., Satin J. (2000): Arachidonic acid modulation of  $\alpha 1H$ , a cloned human T-type calcium channel. *Am. J. Physiol.* **278**, H184-193.

Zhong J, Dessauer CW, Keef KD, Hume JR. (1999) Regulation of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in rabbit portal vein by G protein alphas and betagamma subunits. *J Physiol.* May 15; **517** ( Pt 1):109-20.

Zhu, X., Gilbert, S., Birnbaumer, M. and Birnbaumer, L. (1994) Dual signaling potential is common among Gs-coupled receptors and dependent on receptor density. *Mol. Pharmacol.* **46**, 460-469.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)