

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

Vitória Hayduck Cenci

**SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA INDUZ ESTRESSE
OXIDATIVO E ALTERA CAPTAÇÃO E METABOLISMO DO
GLUTAMATO EM TESTÍCULOS DE RATOS IMATUROS**

Florianópolis
2016

Vitória Hayduck Cenci

**SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA INDUZ ESTRESSE
OXIDATIVO E ALTERA CAPTAÇÃO E METABOLISMO DO
GLUTAMATO EM TESTÍCULOS DE RATOS IMATUROS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica.
Orientador: Prof.^a Dr.^a Ariane Zamoner Pacheco de Souza.

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Cenci, Vitória Hayduck

Sinalização purinérgica induz estresse oxidativo e altera captação e metabolismo do glutamato em testículos de ratos imaturos / Vitória Hayduck Cenci ; orientadora, Ariane Zamoner Pacheco de Souza - Florianópolis, SC, 2016. 153 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Sistema purinérgico. 3. Estresse oxidativo. 4. Testículo. 5. Receptor P2X7. I. Souza, Ariane Zamoner Pacheco de. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

Vitória Hayduck Cenci

**SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA INDUZ ESTRESSE
OXIDATIVO E ALTERA CAPTAÇÃO E METABOLISMO DO
GLUTAMATO EM TESTÍCULOS DE RATOS IMATUROS**

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção de título de “mestre” e aprovado em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

UFSC, de fevereiro de 2016

Prof. Dr. Carlos Peres Silva
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Ariane Zamoner Pacheco de Souza
Orientadora - Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Carlos Peres Silva
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Leila Zanatta
Universidade Estadual de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Tania Silvia Frode
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico esse sonho concretizado aos meus pais Wilmar e Sueli, por, na caminhada da vida, me guiar através do amor e carinho. Vocês são tudo em minha vida!

AGRADECIMENTOS

Agradeço incansavelmente a Deus, por me permitir estar neste plano e por conceder-me força espiritual e coragem para seguir indubitavelmente, sendo a frequência e luz que me guia nesta caminhada.

A todos meus familiares, por permanecerem sempre ao meu lado mesmo com a distância se fazendo presente. Aos meus pais, Wilmar e Sueli, incondicionalmente, por serem a luz do afeto e dedicação do caminho que trilhamos e pelas incontáveis vezes em que se doaram inteiros e abdicaram de seus sonhos para concretizar os meus primeiro. Sou infinitamente agradecida por escolherem junto de mim compartilhar desta jornada terrena. Vocês representam a centelha divina em minha vida.

À minha melhor amiga e irmã Laura, por se manter insubstituívelmente ao meu lado, representando a força e a coragem que muitas vezes me faltaram. À minha tia Sirlei, minha segunda mãe, e minha avó Nadir, minha inspiração, pelo exemplo de determinação e amor pela vida.

Agradeço também minhas eternas amigas, Juliana Vivian, Suélen Mazzardo e Vanessa Cherobin, por me mostrarem que independentemente da distância, estaremos sempre lado a lado. Marco Daltoé e Marina Bottega, obrigada por existirem em meus dias, nossa amizade é tudo pra mim.

As amigas do Laboratório de Bioquímica Experimental e Sinalização Celular – LaBioSignal, por terem me acolhido, não apenas abrindo as portas do laboratório e transmitindo seus conhecimentos, mas por carinhosamente compartilhar dos melhores momentos que essa caminhada me proporcionou. Juliana Domingues, muito obrigada por estar presente em meus dias e tornar cada um deles mais iluminado, te adoro. Patrícia Cesconetto, muito obrigada por cada momento especial que compartilhamos, sua amizade é muito importante pra mim. Daiane Cattani, tenho admiração por sua força e determinação, obrigada pelo carinho que sempre teve comigo. Minhas queridas amigas Nathália Napolini e Carla Heinz, conhecer vocês e ter compartilhado tantos momentos desta jornada juntas foi mais que especial, foi essencial, quero vocês sempre comigo. À Luiza Kasulke, nossa IC, e ao Eduardo Parisotto, pelo carinho, amizade e conhecimento sempre transmitido com muito bom humor. Ao meu amigo Márcio Dutra, muito obrigada

por acalantar meus dias trazendo paz e sorrisos de forma incondicional, minha caminhada não teria sido a mesma sem você.

À minha orientadora, Ariane Zamoner Pacheco de Souza, que, carinhosamente me acolheu e me recebeu de braços abertos. Muito obrigada por todo incentivo, dedicação, paciência, amizade e por ser a luz que me guiou nesta caminhada. Minha admiração e carinho por você vão além da esfera acadêmica.

Aos amigos e colegas do laboratório da professora Rozangela Curi Pedrosa, e à professora Fátima Regina Mena Barreto da Silva pela colaboração no desenvolvimento desta dissertação. Aos Colegas e amigos do laboratório de Hormônios & Transdução de Sinais, em especial, a Renata Gonçalves, por me auxiliar carinhosamente no primeiro experimento que realizei.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica – PPGBQA por ter oportunizado a realização deste trabalho.

A CAPES pela bolsa concedida. Agradeço também às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESC pelo apoio financeiro. Por fim, minha gratidão a todos aqui não mencionados que, de alguma forma, auxiliaram na execução desse projeto.

“Auxilia aos outros com aquilo que possuas de melhor. Os santos e os heróis ainda não residem na Terra. Somos espíritos humanos, mistos de luz e sombra, amor e egoísmo, inteligência e ignorância.” (Emmanuel).

RESUMO

Muitas das respostas fisiológicas mediadas por purinas dependem de uma integração contínua entre diferentes vias de sinalização. No sistema reprodutor masculino, além da regulação hormonal, evidências sugerem uma participação importante na modulação da função testicular por nucleotídeos de adenina extracelulares, não apenas pela presença de purinoceptores nestas células, como também pela liberação de purinas no meio extracelular, mediada por células testiculares. O objetivo deste estudo foi demonstrar que o trifosfato de adenosina extracelular (ATPe) exerce efeitos modulatórios na fase imatura testicular, promovendo aumento do influxo de cálcio (Ca^{2+}), estresse oxidativo, modulação da atividade da gama-glutamil transferase (γ -GT) associado à alteração na disponibilidade de glutamato para as células testiculares. Foi desenvolvido um estudo *in vitro* em porções testiculares de ratos de 15 dias de idade foram expostos ao ATP em uma concentração de 1mM durante 30 minutos. *Coomassie brilliant blue G*, Suramina e 2MeSATP foram utilizados como antagonistas P2X e P2Y e o BzATP como agonista seletivo P2X₇, inibidores das vias de sinalização da via ERK1/2, PKA e PI3K (PD98059, H89 e Wortmanina, respectivamente), bem como bloqueador de canal de Ca^{2+} dependente de voltagem do tipo-L (nifedipina) e quelante de Ca^{2+} intracelular e extracelular (BAPTA-AM e EGTA), e ainda o envolvimento de aminoácidos neutros (MeAIB) foram utilizados para determinar os mecanismos envolvidos na ação do ATP sobre células testiculares. Também foram determinados marcadores bioquímicos (atividade das aminotransferases) e de dano oxidativo, assim como alterações no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ e captação de [^{14}C]-glutamato em testículo de ratos imaturos. O ATP em concentrações elevadas leva ao acúmulo de Ca^{2+} intracelular e induz estresse oxidativo sem alterar a atividade de enzimas antioxidantes e o conteúdo de GSH. Evidenciou-se também que o ATP interage com receptores de superfície do tipo P2X₇ e ativa rotas de transdução de sinal (ERK1/2 e PI3K). Estes eventos acarretam em diminuição da atividade da γ -GT, estímulo na captação de [^{14}C]-glutamato, aumento da atividade da glutamina sintetase (GS) sem resultar em inviabilidade celular. Considerando-se estes dados, hipotetiza-se que elevadas concentrações de ATP, como ocorre em condições patológicas, em que as células liberam elevadas concentrações dessa purina no meio extracelular, podem estar relacionadas com um mecanismo de indução de estresse

oxidativo em uma tentativa de compensar a condição patológica pré-existente.

Palavras chave: Sistema purinérgico, estresse oxidativo, testículo, receptor P2X₇.

ABSTRACT

Many of the physiologic responses mediated by purines depend on a seamless integration between different signaling pathways. In the male reproductive system, as well as hormonal regulation, evidence suggests an important role in the modulation of testicular function by adenine extracellular nucleotides, not only by the presence of purinoceptors in these cells, but also by the release of purines in the extracellular medium, mediated testicular cells. The aim of this study was demonstrate that the extracellular purine adenosine triphosphate (ATP) has modulatory effects on testicular immature stage, causing increased calcium (Ca^{2+}) influx, oxidative stress, modulation of gamma-glutamyl transferase activity (γ -GT) associated with change in glutamate availability for the testicular cells. Fifteen-day-old rat testis were exposed to ATP at a concentration of 1 mM for 30 minutes. Coomassie Brilliant Blue G, Suramin and 2MeSATP were used as P2X and P2Y antagonists and BzATP as a selective P2X₇ agonist. Moreover, inhibitors of ERK1/2, PKA and PI3K (PD98059, H89 and wortmannin, respectively), L-type voltage-dependent Ca^{2+} channel blocker (nifedipine), Ca^{2+} chelators (BAPTA-AM and EGTA), and α (methylamino)isobutyric acid (MeAIB) were used to determine the mechanisms involved in the action of ATP on testicular cells. Biochemical markers such as aminotransferase activity and oxidative damage, as well as alterations in influx of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ and uptake of [^{14}C]-glutamate in the immature rat testis. Were also determined the ATP in high concentrations leads to accumulation of intracellular Ca^{2+} and induces oxidative stress without changing the activity of antioxidant enzymes and the content of GSH. It is also evident that ATP interacts with P2X₇ subtype of purinoceptors and activates signal transduction pathways (ERK1/2 and PI3K). These events lead to decreased activity of γ -GT, as well as increased [^{14}C]-glutamate uptake and glutamine synthetase (GS) activity without altering cell viability. Taken together, these data suggest that high extracellular ATP concentrations may be associated with an oxidative stress in attempt to compensate a pre-existing pathological condition.

Key words: Purinergic system, oxidative stress, testis, P2X₇ receptor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração do testículo com os túbulos seminíferos circundados pelo tecido intersticial.....	32
Figura 2 - Ilustração esquemática da célula de Sertoli.....	33
Figura 3 - Cascata enzimática na inativação de purinas na superfície da célula.....	43
Figura 4 - Representação esquemática da hipótese de efeito do ATPe em testículos de ratos imaturos.....	67
Figura 5 - Efeito do ATPe sobre a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em testículos de ratos imaturos.....	82
Figura 6 - Envolvimento do P2X ₇ no mecanismo de ação mediado pelo ATPe sobre a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em testículos de ratos imaturos.....	83
Figura 7 - Efeitos do ATPe nos níveis de peroxidação lipídica, (A) carbonilação de proteínas (B) em testículos de ratos imaturos.....	84
Figura 8 - Efeito do ATPe no conteúdo de GSH (A) e na atividade da G6PD (B) em testículos de ratos imaturos.....	85
Figura 9 - Efeito do ATPe na atividade da GPx (A), GST (B), GR (C) e CAT (D) em testículos de ratos imaturos.....	86
Figura 10 - Efeito do ATPe e da Ado na atividade da γ -GT em testículos de ratos imaturos.....	88
Figura 11 - Envolvimento dos receptores de membrana do tipo P2X e P2Y (A e B) no mecanismo de ação do ATPe sobre a atividade da γ -GT em testículo de ratos imaturos.....	89
Figura 12 - Envolvimento do cálcio intracelular e da PI3K e ERK no mecanismo de ação do ATPe sobre a atividade da γ -GT no testículo de ratos imaturos.....	90
Figura 13 - Envolvimento do NCX no mecanismo de ação do ATPe sobre a atividade da γ -GT no testículo de ratos imaturos.....	92
Figura 14 - Envolvimento de antioxidantes no mecanismo de ação do ATPe sobre a atividade da γ -GT no testículo de ratos imaturos.....	93
Figura 15 - Envolvimento do sistema de transporte de aminoácidos “A” no mecanismo de ação do ATPe sobre a atividade da γ -GT no testículo de ratos imaturos.....	94
Figura 16 - Efeitos do ATPe sobre o influxo de [^{14}C]-Glutamato no testículo de ratos imaturos.....	95
Figura 17 - Efeito do ATPe na atividade da Glutamina Sintetase em testículos de ratos imaturos.....	96

Figura 18 - Envolvimento do sistema de transporte de aminoácidos “A” no mecanismo de ação do ATPe sobre o influxo de [¹⁴ C]-glutamato no testículo de ratos imaturos.....	97
Figura 19 - Efeito do ATPe e da Ado sobre a atividade das enzimas AST (A) e ALT (B) no testículo de ratos imaturos.....	99
Figura 20 - Efeito do ATPe e da Ado sobre a atividade da LDH no testículo de ratos imaturos.....	100
Figura 21 - Mecanismo de ação proposto para o ATPe em testículos de ratos imaturos.....	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estrutura do ATP e Ado.....	70
Tabela 2 - Compostos utilizados para estudar o mecanismo de ação do ATPe sobre células testiculares.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Adenilato ciclase
ADA	Ecto-adenosina desaminase
Ado	Adenosina
ADP	Adenosina difosfato
AKT	Proteína quinase B
ALT	Alanina aminotransferase
AMP	Adenosina monofosfato
AMPC	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ARE	Elemento de resposta antioxidante
AscH ⁻	Ascorbato
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Trifosfato de adenosina
ATPe	Trifosfato de adenosina extracelular
CAT	Catalase
CCDV	Canais de cálcio dependentes de voltagem
DAG	Diacilglicerol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EAAT	Transportador de aminoácido excitatório
E-NPPs	Ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterases
E-NTPDases	Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase
ERK1/2	Proteína quinase regulada por sinal extracelular
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERSs	Espécies reativas de enxofre
FSH	Hormônio folículo estimulante
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GABA	Ácido γ -aminobutírico
γ -GT	Gama-glutamil transferase
GIRK	Retificador interno de canais de K ⁺
GLAST	Transportador de glutamato aspartato
GLT-1	Transportador de glutamato-1
GLURs	Receptores de glutamato
GLUTs	Transportadores de glutamato
GPx	Glutaciona peroxidase
GPxs	Glutacionas peroxidases
GR	Glutaciona redutase
GRK-2	Receptor de quinase 2 acoplado a proteína G
GRK-3	Receptor de quinase 3 acoplado a proteína G
GS	Glutamina sintetase

GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
GST	Glutationa-S-transferase
GSTs	Glutationa-S-transferases
IGF-1	Fator de crescimento ligado a insulina I
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-18	Interleucina-18
IP ₃	1,4,5-inositol-trifosfato
JNK	Quinase c-Jun N-terminal
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
LDH	Lactato desidrogenase
LOOH	Hidroperóxidos lipídicos
MAPKs	Proteína serina-treonina quinase ativada por mitógeno
MAP3Ks	MAPKK quinase
MEK	MAPK quinase
MK	Serina/treonina quinase
NAC	N-acetilcisteína
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NF κ B	Fator nuclear kappa- β
NGF	Fator de crescimento do nervo
NO \cdot	Óxido nítrico
NO ₂ \cdot	Radical dióxido de nitrogênio
Nrf2	NF-E2-related factor 2
ORAC	Capacidade antioxidante total do soro
PI	Fosfatidil inositol
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PI3K- γ	Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato γ 3-quinase
PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PI[3]P	Fosfatidilinositol 3-fosfato
PI[3,4,5]P ₃	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PKC	Proteína Quinase C
PLC	Fosfolipase C
PLC- β	Fosfolipase C- β
PLC- β 2	Fosfolipase C- β 2
PLC- β 3	Fosfolipase C- β 3
PNP	Purina nucleosídeo fosforilase
RL	Radicais livres
RNA _m	Ácido Ribonucleico mensageiro
ROO \cdot	Radical peroxila
RTKs	Receptores de tirosina quinases
SNC	Sistema Nervoso Central

SOD	Superóxido dismutase
SOD-CuZn	Superóxido dismutase cobre-zinco
SOD-EC	Superóxido dismutase extracelular
SOD-Mn	Superóxido dismutase manganês
T ₃	Tri-iodotironina
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF α	Fator de necrose tumoral α
Trx	Tiorredoxina
UDP	Difosfato de uracila
UTP	Trifosfato de uracila
VGLUTs	Transportadores vesiculares para glutamato
XO	Xantina oxidase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
2 OBJETIVOS	31
2.1 OBJETIVO GERAL	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	33
3.1 SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO	33
3.1.1 Testículo	33
3.1.2 Túbulos Seminíferos	34
3.2 SISTEMA PURINÉRGICO	39
3.2.1 Classificação dos Purinoceptores	40
3.2.2 Purinoceptores expressos no testículo	41
3.2.3 Trifosfato de adenosina extracelular	42
3.2.4 Adenosina	43
3.2.5 Ectonucleotidasas	44
3.3 ESTRESSE OXIDATIVO	46
3.3.1 Formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio	47
3.3.2 Peroxidação Lipídica	50
3.3.3 Oxidação de Proteínas	51
3.3.4 Sistemas de Defesa Antioxidante	51
3.4 ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS	52
3.4.1 Superóxido Dismutase	53
3.4.2 Catalase	54
3.4.3 Glutaciona Peroxidase	54
3.4.4 Glutaciona Redutase	55
3.4.5 Glutaciona S-transferase	55
3.4.6 Glicose-6-fosfato desidrogenase	56
3.4.7 γ -Glutamil-Transferase	56
3.5 ANTIOXIDANTES NÃO-ENZIMÁTICOS	57
3.5.1 Vitamina C	58
3.5.2 Vitamina E	59
3.5.3 Glutaciona reduzida	60
3.6 ESTRESSE OXIDATIVO E SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO	61
3.7 ESTRESSE OXIDATIVO E SISTEMA PURINÉRGICO	62
3.8 GLUTAMATO	63
3.8.1 Transportadores de Glutamato no testículo	64
3.9 CÁLCIO COMO UMA MOLÉCULA SINALIZADORA	65
3.9.1 Cálcio, ATP e o sistema reprodutor masculino	67
4 HIPÓTESE	71
5 METODOLOGIA	73

5.1 MATERIAIS	73
5.2 MÉTODOS.....	73
5.2.1 Animais.....	73
5.2.2 Tratamento <i>in vitro</i>.....	73
5.3 INFLUXO DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$	77
5.4 CAPTAÇÃO DE [^{14}C]-GLUTAMATO	78
5.5 CONTEÚDO DE GLUTATIONA	78
5.6 ATIVIDADE ENZIMÁTICA	79
5.6.1 γ-Glutamyl-Transferase.....	79
5.6.2 Glutamina Sintetase	79
5.6.3 Glicose-6-fosfato desidrogenase.....	80
5.6.4 Alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase.....	80
5.7 VIABILIDADE CELULAR - ATIVIDADE DA LDH LIBERADA NO MEIO EXTRACELULAR	80
5.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	81
5.8.1 Catalase	81
5.8.2 Glutaciona peroxidase	81
5.8.3 Glutaciona redutase	82
5.8.4 Glutaciona S-transferase	82
5.9 DETERMINAÇÃO DOS MARCADORES DE DANOS OXIDATIVO....	82
5.9.1 Lipoperoxidação tecidual – TBARS.....	82
5.9.2 Proteína Carbonilada	83
5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	83
6 RESULTADOS	85
6.1 INFLUXO DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$	85
6.1.1 Envolvimento dos purinoceptores do subtipo P2X₇ no mecanismo de ação do ATPe no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$	86
6.2 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS ENVOLVIDOS NO ESTRESSE OXIDATIVO.....	87
6.3 MECANISMOS ENVOLVIDOS NA AÇÃO DO ATPe NA MODULAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA γ -GT	92
6.3.1 Influência do transporte de aminoácidos neutros no mecanismo de ação do ATPe	98
6.4 CAPTAÇÃO E METABOLISMO DO GLUTAMATO COMO ALVOS DE AÇÃO DO ATPe EM TESTÍCULOS DE RATOS IMATUROS	99
6.5 EFEITO DO ATPe E DA Ado SOBRE A ATIVIDADE DAS ENZIMAS AST/ALT E LDH	102
7 DISCUSSÃO.....	105
7.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS	120
8 CONCLUSÕES.....	125
9 PERSPECTIVAS	127

10	REFERÊNCIAS.....	129
-----------	-------------------------	------------

1 INTRODUÇÃO

As purinas extracelulares, em especial ATP e a Ado, desencadeiam diversos efeitos sinalizadores mediante interação com receptores de superfície celular específicos para estas moléculas, os denominados purinoceptores. Desde o início da década de 1980, têm se evidenciado a expressão de purinoceptores distintos em células do sistema reprodutor masculino, principalmente nas células de Sertoli e células germinativas (CONTI *et al.*, 1989; MONACO; CONTI, 1986; RIVKEES, 1994; STILES *et al.*, 1986).

Já se tem descrito que as células de Sertoli expressam receptores para a Ado do subtipo A1, além de receptores ionotrópicos (P2X), e metabotrópicos (P2Y), para o ATP extracelular (ATPe). Já em células germinativas, conforme o estágio de maturação meiótica observou-se uma expressão diferencial de distintos subtipos de receptores para Ado e ATPe (MONACO; CONTI, 1986).

Muitas das respostas fisiológicas mediadas por purinas dependem de uma integração contínua entre diferentes vias de sinalização. No sistema reprodutor masculino, além da regulação hormonal, diversas evidências sugerem uma participação importante na modulação da função das células de Sertoli por nucleotídeos de adenina extracelulares, não apenas pela presença de purinoceptores nestas células, como também pela liberação de purinas no meio extracelular, mediada por células testiculares (FILIPPINI *et al.*, 1994; FORESTA *et al.*, 1995; GELAIN *et al.*, 2003; ZAMONER *et al.*, 2006). Nesse contexto, se tem estabelecido que o ATPe pode estar envolvido com uma variedade de ações específicas na sinalização celular, desempenhando um papel importante no desenvolvimento, proliferação e diferenciação em diferentes tecidos (SAINO *et al.*, 2002). Baseado na identificação de alterações biológicas induzidas por estas moléculas em células do sistema reprodutor masculino, diversos autores vêm propondo modelos hipotéticos de comunicação parácrina entre as células de Sertoli e germinativas, sendo esta mediada, principalmente, pela Ado e pelo ATP extracelulares (VEITINGER *et al.*, 2011).

Embora não se tenha completamente compreendida, a regulação da função sinérgica de células de Sertoli pelo hormônio folículo estimulante (FSH) e pela testosterona é apoiada num mecanismo comum – a mobilização de cálcio (Ca^{2+}) citosólico. Na célula de Sertoli, o ATPe desencadeia um aumento transitório rápido na concentração de Ca^{2+}

intracelular, mediante interação com diferentes receptores do tipo P2; entretanto, sua identidade molecular permanece controversa. Este sinal mediado pelo ATPe, acoplado a mobilização de Ca^{2+} neutraliza vários efeitos mediados pelo FSH, bem como altera a produção de estradiol pela célula de Sertoli, a atividade de enzimas e o comportamento secretório da célula (FILIPPINI *et al.*, 1994; GELAIN *et al.*, 2005; MERONI *et al.*, 1998; ROSSATO *et al.*, 2001). Apesar deste suposto papel na fisiologia testicular, a identificação e a descrição funcional precisa dos subtipos dos purinoceptores, bem como as ações e as vias de sinalização envolvidas neste mecanismo ainda não está elucidada.

Sendo assim, este estudo propõe-se a investigar um potencial efeito pró-oxidante ou antioxidante, mediado pelas purinas extracelulares, compreendendo em especial o ATPe, hipotetizando que este mecanismo esteja acoplado a mobilização de Ca^{2+} intracelular via receptores ionotrópicos específicos, bem como algumas ações mediadas pela Ado sobre o sistema reprodutor de ratos machos imaturos, aos 15 dias de idade, como também as vias de sinalização envolvidas nos efeitos desencadeados pela exposição a purinas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito das purinas extracelulares, ATP e Ado, no metabolismo celular e nos sistemas de defesa antioxidantes bem como nos mecanismos de sinalização celular envolvidos nesses efeitos em células do sistema reprodutor masculino.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito da ATPe na captação [^{14}C]-glutamato e no influxo de de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em testículos de ratos imaturos;
- Na presença do ATPe, determinar as concentrações de glutatona reduzida (GSH), de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), bem como de proteína carbonilada no testículo de ratos imaturos;
- Avaliar as ações do ATPe e da Ado sobre a atividade da gama-glutamil transferase (γ -GT) no testículo de ratos imaturos;
- Estudar o efeito do ATPe sobre a atividade das enzimas antioxidantes (glicose-6-fosfato desidrogenase - G6PD, glutatona redutase - GR, glutatona peroxidase - GPx e catalase - CAT), bem como o potencial pró-oxidante e/ou antioxidante mediado pelo ATPe em testículos de ratos;
- Investigar as consequências do ATPe e da Ado na atividade da glutamina sintetase (GS), da alanina aminotransferase (ALT) e da aspartato aminotransferase (AST), bem como a viabilidade celular pela liberação de LDH (lactato desidrogenase) no meio, em testículo de ratos imaturos;
- Estudar os mecanismos de sinalização celular envolvidos na modulação da atividade γ -GT pelo ATPe no testículo de ratos imaturos.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO

O sistema reprodutor masculino de humanos consiste em um par de testículos, sendo estes órgãos pareados e encapsulados, tendo por função básica promover a produção de espermatozoides e de hormônios esteroides e proteicos, sendo essenciais à função reprodutiva masculina (FAWCETT *et al.*, 1970). Este sistema está constituído em: vias espermáticas (epidídimo, canal deferente, uretra), os quais permitem a maturação, circulação e liberação de espermatozoides; pênis e glândulas anexas (vesículas seminais, próstata e glândulas bulbouretrais), as quais secretam o líquido que transporta os espermatozoides (FAWCETT, 1993).

3.1.1 Testículo

O testículo é um órgão complexo e compartimentalizado, o qual possui duas funções importantes no processo de reprodução: a produção de gametas (espermatogênese e espermiogênese) e a produção de hormônios sexuais esteroides e proteicos. É revestido externamente por uma cápsula conjuntiva (túnica albugínea) que envia septos para o seu interior, dividindo-o em lóbulos. Nestes lóbulos são encontrados dois compartimentos: o compartimento intersticial e os túbulos seminíferos (figura 1) (HESS, 2008; RUSSELL *et al.*, 1990).

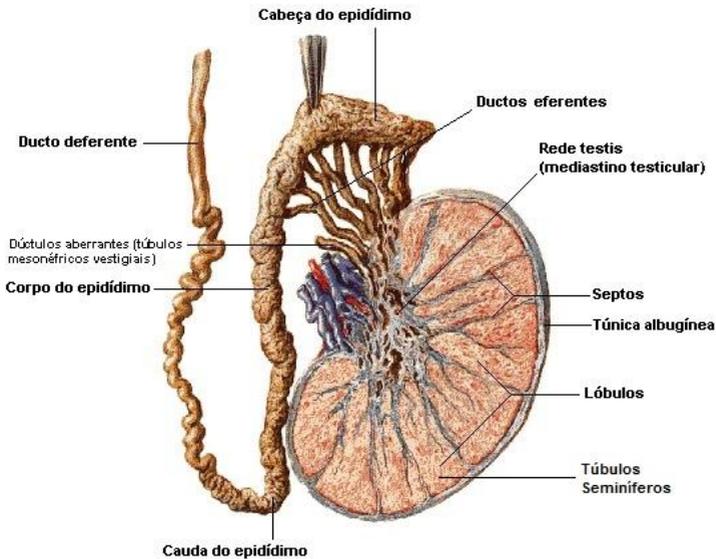
A massa testicular é composta majoritariamente por túbulos seminíferos e contém basicamente, três tipos de células: espermatogônias, espermatócitos e células de Sertoli, e ainda, no espaço intersticial entre estes túbulos, estão presentes as células de Leydig (responsáveis pela produção de testosterona), além de outros tipos celulares (BJELOBABA *et al.*, 2015).

O compartimento intersticial, como citado anteriormente, é constituído de células de Leydig, como também de tecido conjuntivo frouxo, fibroblastos, linfócitos, macrófagos, e vasos sanguíneos e linfáticos. Nos túbulos seminíferos ocorre a produção de gametas, sendo seu epitélio constituído de células de Sertoli rodeadas por células germinativas, as quais se diferenciam por meiose a espermatozoides. O epitélio seminífero é cercado por células peritubulares ou mioides, que

estão em contato com a superfície basal das células de Sertoli (KRAWETZ, 2009; RUSSELL *et al.*, 1990).

O desenvolvimento do testículo é um processo fundamental no desenvolvimento sexual e reprodutivo. Esse processo está sob uma regulação complexa de vários fatores, os quais podem ser caracterizados em reguladores extrínsecos e intrínsecos. Quando referente a reguladores extrínsecos incluem-se hormônios e fatores parácrinos, enquanto que os reguladores intrínsecos estão relacionados a fatores genéticos (DONG *et al.*, 2015).

Figura 1 – Ilustração do testículo com os túbulos seminíferos circundados pelo tecido intersticial.



Fonte: Adaptado de Netter, 2000.

3.1.2 Túbulos Seminíferos

Os túbulos seminíferos representam a unidade funcional do testículo. No epitélio seminífero, as células de Sertoli são intimamente associadas com ≥ 30 células germinativas em todas as fases do ciclo da espermatogênese de ratos (MRUK *et al.*, 2004). Interações entre as células de Sertoli e germinativas de forma sincronizada e bidirecional ao nível molecular e bioquímico são essenciais para a espermatogênese e a

reprodução (CHENG *et al.*, 2002; GRISWOLD *et al.*, 1976; VEITINGER *et al.*, 2011).

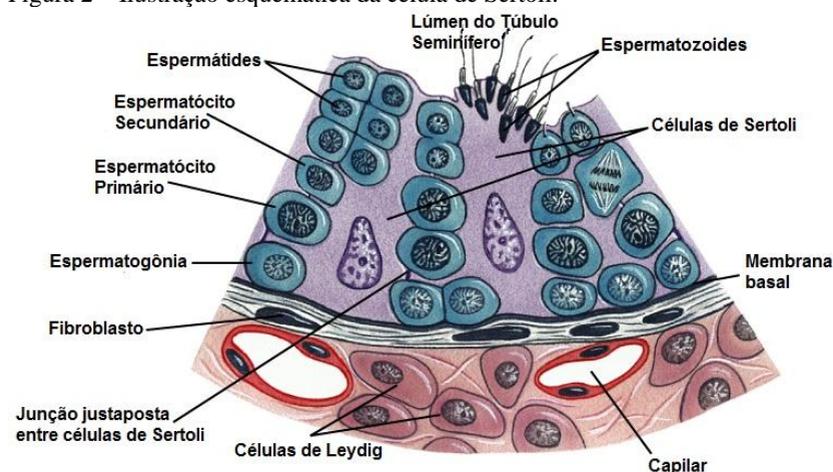
O epitélio seminífero do testículo é um dos tecidos mais complexos. As interações entre diferentes células deste tecido são processos muito dinâmicos e extremamente ricos. A posição única das células de Sertoli lhes permite receber, integrar, e emitir os sinais necessários para a espermatogênese a partir do compartimento extratubular. Portanto, as células germinativas, as células de Sertoli, as células peritubulares e as células de Leydig tem uma elaborada rede de comunicação célula-célula que ocorre através de hormônios e, fatores parácrinos e autócrinos (LOSS *et al.*, 2011).

As células de Sertoli e as células germinativas são absolutamente interdependentes. Os diferentes entroncamentos que interligam essas células são considerados os mais sofisticados do corpo humano (GELAIN *et al.*, 2003).

3.1.2.1 Células de Sertoli

As células de Sertoli (figura 2) são células somáticas que apoiam-se sobre a membrana basal do túbulo seminífero e atingem a superfície do epitélio. São basicamente prismáticas ou piramidais, com cerca de 70µm de altura (FAWCETT *et al.*, 1994).

Figura 2 – Ilustração esquemática da célula de Sertoli.



Fonte: Adaptado de Junqueira e Carneiro, 2003.

As células de Sertoli controlam o ambiente onde ocorre a espermatogênese. Essas células possuem sítios de ligação para hormônios e outras substâncias importantes no processo espermatogênico. Os sítios de ligação nestas células incluem hormônios e outras substâncias, com destaque para o FSH (GRISWOLD *et al.*, 1995), a testosterona (MULDER *et al.*, 1976), a tri-iodotironina (T₃) (PALMERO *et al.*, 1995), retinol (ESKILD *et al.*, 1991) e a 1 α , 25-diidroxi-vitamina D₃ (MAJUMDAR *et al.*, 1994), substâncias estas que exercem efeitos modulatórios importantes no processo espermatogênico.

A interação destas moléculas com seus respectivos receptores presentes na superfície das células de Sertoli podem desencadear diversas situações no processo espermatogênico, dentre as quais pode-se identificar: a secreção, proliferação, diferenciação e atividade enzimática. Dentre as enzimas reguladas por hormônios nas células de Sertoli está a γ -GT; uma enzima associada à membrana que age como sistema de transporte de aminoácidos através da membrana plasmática (TATE *et al.*, 1981).

A maturação das células de Sertoli é um processo complexo, estando sob a influência de muitos hormônios e vitaminas, envolvendo alterações tanto morfológicas como bioquímicas (MAGUERESSE e JÉGOU, 1988). As células de Sertoli de ratos proliferam apenas durante a fase pré-natal e a vida pós-natal precoce (até 10 dias de idade), sob estimulação do FSH (ORTH, 1984). Quando os ratos apresentam cerca de 15 a 21 dias de idade, as células de Sertoli deixam de se dividir, e junções entre as células de Sertoli vizinhas se desenvolvem, criando, assim, a barreira hemato-testicular (ORTH, 1982). O início da espermatogênese em ratos ocorre entre 10 e 15 dias de vida enquanto que a primeira onda da espermatogênese é concluída em 35 dias. Mesmo que com 35 dias de idade os ratos não possam se reproduzir, as células somáticas, nesta fase de desenvolvimento, exibem perfis bioquímicos semelhantes a “células adultas” (CLERMONT e PEREY, 1957; SKINNER, 1987; VITALE-CALPE *et al.*, 1973).

Sabe-se que as células de Sertoli se ligam às da linhagem germinativa através de especializações juncionais características. As junções entre células de Sertoli adjacentes formam uma barreira, como caracterizado anteriormente, a barreira hemato-testicular, que divide funcionalmente o epitélio seminífero em dois compartimentos: o basal e o adluminal (RUSSELL *et al.*, 1990).

As células de Sertoli, através de suas junções justapostas especializadas, formam uma barreira seletiva entre o sangue e o lúmen dos túbulos seminíferos, separando as células germinativas pré-meióticas, meióticas e pós-meióticas do sistema imunológico. Durante a espermatogênese, células germinativas são suportadas pelas células de Sertoli, que têm sua atividade secretora precisamente regulada por células germinativas e peritubulares mioides, através da comunicação cruzada de moléculas sinalizadoras (JÉGOU e SHARPE, 1993; JUTTE *et al.*, 1981).

A coordenação da função e do desenvolvimento dos testículos requer uma variedade de interações célula-célula entre as populações de células somáticas e germinativas. As células germinativas são dependentes das células de Sertoli para manter suas necessidades metabólicas e nutricionais (MAGUERESSE e JÉGOU, 1988; SKINNER, 1987).

Além disso, várias características estruturais e funcionais mudam durante o desenvolvimento do testículo. Em testículos imaturos, por exemplo, as células de Sertoli estão proliferando e crescendo. A progressão da maturação é regulada por vários hormônios e fatores de crescimento, mas essa regulação se dá principalmente pelo FSH (LOSS *et al.*, 2011).

As células de Sertoli desempenham papel fundamental na regulação da espermatogênese. Estas células desempenham várias funções tais quais: nutrição e suporte físico (sustentação) para as células germinativas em desenvolvimento, secreção de fluido testicular, manutenção da integridade do epitélio seminífero, secreção de fatores de crescimento e proteínas, como a transferrina e a ceruloplasmina, algumas proteases e inibidores de proteases e, ainda, glicoproteínas inibitórias. Atuam também de forma parácrina com as células adjacentes, tendo participação na espermiacção liberando as espermátides no lúmen tubular e, ainda, na fagocitose de células germinativas em degeneração (LOSS *et al.*, 2011; RUSSELL *et al.*, 1990).

3.1.2.2 Sinalização purinérgica e o sistema reprodutor masculino

Os mecanismos de sinalização envolvidos na comunicação parácrina entre os diferentes tipos celulares constituintes dos testículos (em especial células de Sertoli, células mioides peritubulares e as células da linhagem germinativa) são tão complexos quanto é intensa a troca de

informações entre estes tipos celulares. De fato, a produção de gametas - gametogênese - é, sob estrito ponto de vista evolutivo, o processo mais importante durante o efêmero período de vida de qualquer organismo. Devido a isso, pode-se observar tantas peculiaridades na fisiologia e bioquímica das células testiculares, quando comparado com processos similares em outros órgãos e sistemas. Nesse contexto, destaca-se que são vários os fatores envolvidos nesta regulação, e acredita-se que a comunicação parácrina entre as células testiculares é a mais complexa existente em todo o organismo (JÉGOU e SHARPE, 1993).

Conti e colaboradores (1986) foram o primeiro grupo de pesquisa a demonstrar que os receptores de Ado presentes em células de Sertoli eram capazes de inibir o aumento de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) mediado pela estimulação pelo FSH. Sabendo-se que o FSH regula ativamente desde a diferenciação até processos relacionados à espermatogênese nestas células, este dado sugeria um sistema de *cross-talking* entre os receptores de Ado e um dos hormônios mais importantes na fisiologia testicular.

Trabalhos posteriores evidenciaram melhor a natureza e a função dos receptores de Ado em células de Sertoli, como também identificaram receptores do tipo P2 nestas células, os quais estão associados a funções específicas da célula de Sertoli, como a secreção de estradiol, transferrina e modulação das concentrações de Ca^{2+} intracelular, bem como de respostas ao FSH, o que evidencia que o ATPe, em células de Sertoli, atua por diferentes vias, sendo uma delas regulada pela ativação de receptores P2Y₂, e a outra por receptores P2X, de diferentes subtipos. Ressalta-se que o purinoceptor do tipo P2X₇ está expresso em células de Sertoli em todos os estágios do ciclo do epitélio seminífero (FILIPPINI *et al.*, 1994; FORESTA *et al.*, 1995; MERONI *et al.*, 1998).

No sistema reprodutor masculino, além da regulação hormonal, diversas evidências suportam uma participação importante na modulação da função das células de Sertoli por nucleotídeos de adenina extracelulares devido à presença de purinoceptores nestas células. As células de Sertoli expressam purinoceptores do tipo A1 e do tipo P2, os quais modulam o *turnover* de fosfatidil inositol (PI) e a mobilização de Ca^{2+} intracelular. A ativação destes receptores induz efeitos biológicos relacionados com a capacidade de resposta ao FSH bem como alteração na atividade da γ -GT (CONTI *et al.*, 1989; MONACO; CONTI, 1986; RIVKEES, 1994; STILES *et al.*, 1986).

3.2 SISTEMA PURINÉRGICO

Purinas extracelulares (ATP, ADP e Ado) são importantes moléculas sinalizadoras que medeiam efeitos sobre vários processos biológicos via ativação de receptores específicos de superfície celular (BURNSTOCK, 2012).

Os nucleotídeos extracelulares modulam uma multiplicidade de funções nos tecidos, incluindo o desenvolvimento, a manutenção do fluxo sanguíneo, secreção, inflamação e reações imunes. Essencialmente, todas as células de mamíferos são capazes de liberar ou interagir com estes mediadores, carregando consigo receptores específicos que possibilitem estes efeitos (ROBSON *et al.*, 2006).

A situação relativa à sinalização dos nucleotídeos de adenina extracelulares pode ser adequadamente contrastada com a especificidade única de hormônios peptídicos ou fatores vasoativos via receptores definidos. A especificidade dos eventos de sinalização purinérgicos é ditada por três componentes moduladores essenciais (ROBSON *et al.*, 2006):

1. A derivação ou fonte dos nucleotídeos extracelulares;
2. A expressão dos receptores específicos para esses transmissores moleculares (e para os derivados de nucleosídeos e nucleotídeos);
3. E, ectonucleotidases selecionadas que ditam as respostas celulares via degradação dos nucleotídeos extracelulares até seus respectivos nucleosídeos.

Ralevic e Burnstock (1998) postularam que a comunicação celular mediada por nucleosídeos e/ou nucleotídeos pode ocorrer pela interação com receptores localizados na membrana plasmática, e/ou pelo transporte dessas moléculas para o citoplasma, através de transportadores específicos (somente os nucleosídeos).

Atualmente, sabe-se que nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares exercem ações biológicas significativas, incluindo efeitos proliferativos em diversos tipos celulares, através da interação com receptores de superfície celular específico para estas moléculas. Nos mamíferos, o ATPe e a Ado são capazes de modificar a capacidade de resposta do FSH em células de Sertoli (LOIR, 1999).

3.2.1 Classificação dos Purinoceptores

Os purinoceptores são classificados em dois tipos, P1 que responde a Ado (subdivididos em A1, A2A, A2B e A3), e P2 que respondem ao ATPe (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998; JENSEN *et al.*, 2012). Os receptores P2 ainda possuem dois subtipos definidos, os quais compreendem o P2X (canal iônico) e P2Y (acoplados a proteína G) (BURNSTOCK, 2012).

Receptores do tipo P2X são ativados pelo ATPe e essa interação garante uma sinalização rápida. Existem sete subunidades de receptores do tipo P2X descritas e clonadas, os quais compreendem do P2X₁ até P2X₇ e estes se encontram sob forma trimérica, e, frequentemente, podem aparecer sob forma heterotrimérica, os quais, mediante interação com ATPe, são permeáveis aos íons Na⁺, K⁺ e Ca²⁺. O influxo de Na⁺ conduz à despolarização da membrana enquanto que o influxo de Ca²⁺ pode, além disso, provocar uma variedade de eventos intracelulares, em parte, através da ativação de proteínas serina-treonina cinases ativadas por mitógeno (MAPKs), proteína cinase C (PKC), e calmodulina. Entre os receptores do tipo P2X, o P2X₇ multifuncional desempenha um papel especial e tornou-se um alvo terapêutico para várias doenças. Ele carrega uma série de características estruturais e funcionais únicas. Sua exigência de altas concentrações de ATPe inclina-o para mediar situações fisiológicas ou patológicas, dentre elas, destaca-se o estresse celular ou inflamação, as quais são acompanhadas pela liberação maciça de nucleotídeos, enquanto que sob condições fisiológicas, esse receptor é minimamente ativado (ZIMMERMANN, 2015).

Os sete receptores do tipo P2Y podem ser classificados em dois subgrupos. P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ e P2Y₆ ativam a proteína Gq e fosfolipase Cβ (PLC-β), gerando dois segundos mensageiros: o 1,4,5-inositol-trifosfato (IP₃), que aumenta os níveis de Ca²⁺ intracelular via liberação dos estoques intracelulares e o diacilglicerol (DAG) que ativa a PKC. P2Y₁₂, P2Y₁₃, e P2Y₁₄ ativam a proteína Gi, inibindo a adenilato ciclase (AC) e, conseqüentemente, reduzindo os níveis intracelulares de AMPc. Referente ao receptor do tipo P2Y₁₁ (ausente em roedores), sua ativação aumenta tanto os níveis de Ca²⁺ intracelular como os níveis de AMPc, pela ativação de ambas as proteínas Gq e Gs (ERB *et al.*, 2012).

Vias de sinalização intracelular adicionais foram descritas para receptores do tipo P2Y, incluindo o envolvimento da subunidade Gβγ, resultando na ativação de um grupo diverso de efetores, incluindo

fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato γ 3-quinase (PI3K- γ), fosfolipase C- β 2 e - β 3 (PLC- β 2 e β 3), retificador interno de canais de K^+ (GIRK), receptor de cinase 2 e 3 acoplado a proteína G (GRK-2 e GRK-3), Rho cinase e MAPKs (VON KÜGELGEN *et al.*, 2011; ZIMMERMANN, 2015).

O difosfato de adenosina (ADP) é o ligante preferido dos receptores P2Y₁ (em roedores também se inclui o ATPe), P2Y₁₂ e P2Y₁₃. Ambos, trifosfato de uracila (UTP) e ATPe são agonistas do receptor P2Y₂, enquanto que o receptor P2Y₄ só é ativado por UTP. O difosfato de uracila (UDP) é o agonista do receptor P2Y₆ enquanto que o ATPe ativa o receptor P2Y₁₁. Vale frisar que as afinidades agonistas variam consideravelmente entre os subtipos de receptores, que vão desde concentrações na ordem de nanomolar para alguns receptores P2Y a micromolar (receptores P2X) e até mesmo centenas de micromolar no caso dos receptores do tipo P2X₇ (ZIMMERMANN, 2015).

Diferentes subtipos de purinoceptores foram descritos em células de Sertoli e em células germinativas, e sua ativação induz importantes mudanças funcionais nestas células. Em células de Leydig, a ativação de receptores purinérgicos parece ser responsável pela secreção de testosterona (BILBAO *et al.*, 2012). Estudos indicam que a ativação do receptor do tipo P2X₇ promove uma sequência distinta de eventos. Estudos eletrofisiológicos demonstraram que a abertura de um canal iônico seletivo para pequenos cátions (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) ocorre dentro dos primeiros milésimos de segundo de estimulação pelo ATPe. Depois de alguns segundos, a permeabilidade para cátions orgânicos maiores aumenta progressivamente, com dilatação máxima do canal do íon após alguns minutos. No entanto, os mecanismos moleculares subjacentes a este processo ainda não estão completamente elucidados (SEELAND *et al.*, 2015).

Estudos demonstram que a ativação do receptor P2X₇, pode iniciar uma série de respostas celulares as quais incluem despolarização, seguida de ativação de fosfolipase C (PLC), aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} , o qual estimula a atividade da Caspase-1, a liberação de citocinas, e ainda a ativação da MAPK (DONNELLY-ROBERTS *et al.*, 2009).

3.2.2 Purinoceptores expressos no testículo

Receptores purinérgicos tem sido descritos em células do sistema reprodutor masculino, em especial células de Sertoli e células germinativas. Células de Sertoli expressam receptores para Ado do

subtipo A₁ e A₃, além de receptores ionotrópicos (P2X), e de metabotrópicos (P2Y), para ATPe. Já em células germinativas, conforme o estágio de maturação meiótica, são observados distintos subtipos de receptores para Ado e ATPe (BILBAO *et al.*, 2012; CASALI *et al.*, 2003; KO *et al.*, 2003).

Já se tem estabelecido que as funções desencadeadas pelas purinas no ovário sejam predominantemente reguladas por receptores do tipo P2Y, em contraste com o domínio de receptores P2X no controle de funções testiculares (BJELOBABA *et al.*, 2015).

Os subtipos de receptores P2X₂, P2X₃ e P2X₅ foram identificados em vários tipos de células germinativas, enquanto que as células de Sertoli expressam receptores do tipo P2X₂, P2X₃ e de P2X₇ (GLASS *et al.*, 2001), bem como o receptor mobilizador de Ca²⁺: P2Y₂. Receptores P2X₂ funcionais também foram identificados em células de Leydig de ratos utilizando medições de correntes de células completas e agonistas e antagonistas específicos. Experimentos de *Western blot* revelaram que, além de receptores P2X₂, as células de Leydig de ratos expressam receptores P2X₄, P2X₆ e P2X₇ e a sua funcionalidade é confirmada por medições eletrofisiológicas (ANTONIO *et al.*, 2009).

Alguns estudos demonstram que é convidativo especular que a regulação do desenvolvimento via expressão transitória do receptor do tipo P2X₂ poderia fornecer uma base funcional específica para comunicação purinérgica dentro do epitélio seminífero. Em outros sistemas, a sinalização purinérgica no desenvolvimento embrionário e pós-natal é um conceito emergente (ABBRACCHIO *et al.*, 2009) e a expressão transiente de purinoceptores parece regular a proliferação e diferenciação celular (VEITINGER *et al.*, 2011).

3.2.3 Trifosfato de adenosina extracelular

O ATPe, bem como outros nucleotídeos e nucleosídeos, é encontrado em todos os sistemas orgânicos de mamíferos, desencadeando efeitos tanto por mecanismos intracelulares como por extracelulares. O ATP intracelular é conhecido principalmente por conduzir processos que requerem gasto de energia, como o transporte ativo, a motilidade celular e a biossíntese, enquanto que o ATPe é considerado uma importante molécula de sinalização (YEGUTKIN, 2008).

O ATP desempenha um papel central no metabolismo celular. As concentrações intracelulares de ATP se mantêm em torno de 1 a 10

mmol/L (BEIS e NEWSHOLME, 1975), enquanto que as concentrações de ATPe são reguladas por ATPases (BURNSTOCK, 2006), e são tipicamente muito baixas em condições fisiológicas. Há, no entanto, as condições em que as concentrações de ATP locais atingem concentrações elevadas (VOLONTE *et al.*, 2003; BURNSTOCK, 2006; SEELAND *et al.*, 2014).

O ATP pode estimular a sua própria liberação por um mecanismo autócrino e, além disso, atuar sobre células vizinhas através da propagação do estado de ativação celular (ZIMMERMANN, 2015). As células de Sertoli liberam ATP endógeno através de um mecanismo ainda não elucidado (GELAIN *et al.*, 2003). No entanto, o compartimento basal do epitélio seminífero e células de Leydig expressam canais panexina, o que pode estar relacionado com a liberação de ATP (TURMEL *et al.*, 2011).

A ativação de receptores para ATPe nas células de Sertoli pode causar despolarização celular dependente do influxo de Na^+ , com consequente abertura de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (FORESTA *et al.*, 1995; GELAIN *et al.*, 2003). Além disso, o ATPe desempenha um importante papel regulatório nos processos de diferenciação, transdução de sinal em resposta a estímulos externos e interações célula-célula (BURNSTOCK, 1981; GORDON, 1986; FILIPPINI *et al.*, 1990).

Anormalidades na sinalização purinérgica podem estar envolvidas na fisiopatologia da disfunção erétil associada com a diabetes e o aumento da próstata. Estudos já demonstraram que o tratamento de espermatozoides com ATPe ocasionou uma melhora na taxa de fertilidade *in vitro* para disfunção erétil bem como fertilização *in vitro* (BURNSTOCK, 2013).

3.2.4 Adenosina

A Ado, secretada no meio extracelular ou gerada a partir da hidrólise de ATPe em células de Sertoli, pode agir em receptores A1, demonstrados como essenciais para aquisição da capacidade fertilizante (MINELLI *et al.*, 2004). Estes receptores são acoplados a proteína G inibitória (MONACO; CONTI, 1986; MONACO *et al.*, 1988) e participam na modulação da atividade secretória das células de Sertoli (CONTI *et al.*, 1988).

Galardo e colaboradores (2010) demonstraram que a Ado pode ativar MAPK e deste modo, regular a estabilidade do complexo

juncional em células de Sertoli. Os autores especulam que a Ado é um sinal - possivelmente emitido pelas células germinativas - que é interpretado pelas células de Sertoli, desencadeando a ativação da proteína cinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK). A ativação de AMPK irá promover simultaneamente a oferta de lactato para as células germinativas e cooperar na manutenção da integridade do complexo juncional, contribuindo assim para a preservação de um microambiente ideal para garantir o sucesso da espermatogênese.

Além disso, o FSH e os hormônios da tireoide estimulam a hidrólise de ATPe e ADPe em células de Sertoli (CASALI *et al.*, 2003; ZAMONER *et al.*, 2006) e, portanto, podem resultar em aumento nos níveis extracelulares de adenosina.

Baseados na observação das mudanças biológicas induzidas por estas moléculas nas células do sistema reprodutor masculino, diversos autores propõem modelos hipotéticos de comunicação parácrina, entre as células de Sertoli e germinativas, mediados pela Ado ou ATPe. Foi demonstrado que as células constituintes dos túbulos seminíferos – células de Sertoli, germinativas e peritubulares – são capazes de liberar espontaneamente purinas para o meio extracelular (GELAIN *et al.*, 2003, 2005).

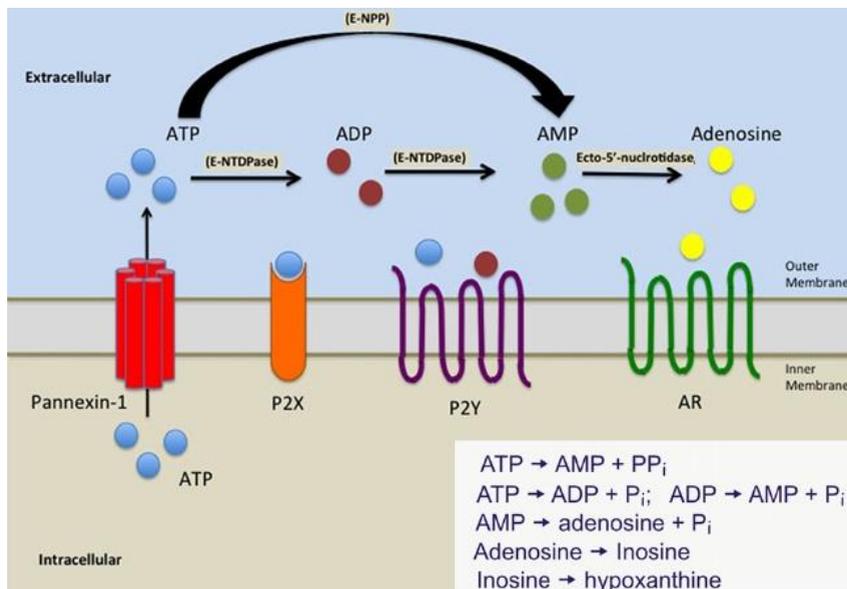
3.2.5 Ectonucleotidases

Os eventos de sinalização induzidos pelos nucleotídeos de adenina extracelulares são controlados pela ação das ectonucleotidases, incluindo os membros das famílias das ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterases (E-NPPs) e as ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDases), assim como da ecto-5'-nucleotidase. Estas ecto-enzimas constituem uma cascata enzimática altamente organizada, responsável pela regulação das vias de sinalização mediadas pelos nucleotídeos e nucleosídeos, controlando desta forma, a razão, a quantidade e o tempo de degradação dos nucleotídeos e finalmente a formação dos nucleosídeos (figura 3) (ZIMMERMANN, 2000; BIGONNESSE *et al.*, 2004, ZAMONER *et al.*, 2006).

Basicamente, as ectonucleotidases são caracterizadas como ectoenzimas capazes de hidrolisar nucleotídeos extracelulares em seus respectivos nucleosídeos. A cadeia ou cascata das ectonucleotidases é iniciada pelas E-NTPDases e pode ser terminada pela ecto-5'-nucleotidase com a hidrólise de nucleosídeos monofosfato. Juntas, a ecto-5'-nucleotidase e a ecto-adenosina desaminase (ADA), outra

ectoenzima envolvida nas vias de salvação das purinas e responsável pela conversão da adenosina em inosina, regula estreitamente as concentrações locais, plasmáticas e extracelulares de Ado (ROBSON *et al.*, 2006).

Figura 3 – Cascata enzimática na inativação de purinas na superfície da célula.



A via de hidrólise dos nucleotídeos compreende pelo menos três ectoenzimas, a E-NPP, a E-NTDPase e ecto-5'-nucleotidase. A Ado resultante pode ainda ser desaminada em inosina e depois em hipoxantina através de reações sequenciais via ADA e purina nucleosídeo fosforilase (PNP).

Fonte: Adaptado de Velasquez e Eugenin, 2014.

A atividade das ectonucleotidasas foi descrita previamente em células de Sertoli em cultura (CASALI *et al.*, 2001; ZAMONER *et al.*, 2006) e pode estar envolvida na regulação das concentrações extracelulares dos nucleotídeos e nucleosídeos de adenina e, conseqüentemente, modulando seus efeitos locais (FILIPPINI *et al.*, 1994; CASALI *et al.*, 2001; KO *et al.*, 2003).

Em células de Sertoli de ratos imaturos, ATP e ADP são hidrolisados por E-NTDPase-1, enquanto que a ecto-5'-nucleotidase e a ADA finalizam a sinalização purinérgica, com a hidrólise de adenosina

monofosfato (AMP) em adenosina, seguida da desaminação da adenosina, respectivamente (CASALI *et al.*, 2003).

Estudos demonstraram um aumento significativo na atividade das ectonucleotidases nas células de Sertoli durante a maturação sexual, o que sugere que a sinalização purinérgica pode ser importante para a reprodução do sexo masculino (CASALI *et al.*, 2003). Macrófagos intersticiais nos testículos também expressam E-NTPDase-1 (MARTIN-SATUE *et al.*, 2009), o que poderia contribuir para a cessação da ação agonista de ATPe.

3.3 ESTRESSE OXIDATIVO

Células vivas em condições aeróbias enfrentam constantemente um paradoxo em relação ao oxigênio (O₂): o O₂ é essencial para vida, entretanto, seus metabólitos, tais como espécies reativas de oxigênio (EROs) podem modificar funções celulares, pondo em risco a sobrevivência da célula. Nesse contexto, as EROs devem se manter em pequena quantidade, necessárias apenas para manutenção da função celular normal (AGARWAL *et al.*, 2003; SHARMA *et al.*, 1996; SIKKA, 2001).

EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) são conhecidos por desempenhar um papel duplo em sistemas biológicos, uma vez que podem ser prejudiciais ou benéficas para os sistemas vivos. Os efeitos benéficos de EROs envolvem funções fisiológicas em respostas celulares a danos, como por exemplo na defesa contra agentes infecciosos e em sistemas de sinalização celular. Um exemplo vantajoso de EROs em baixas concentrações, é a indução de uma resposta mitogênica. Em contraste, quando em altas concentrações, EROs podem ser mediadores importantes de danos nas estruturas celulares, incluindo lipídeos e membranas, proteínas e ácidos nucleicos. Os efeitos nocivos de EROs/ERNs são equilibrados pela ação antioxidante de antioxidantes não enzimáticos e enzimas antioxidantes (VALKO *et al.*, 2006).

O termo estresse oxidativo refere-se a uma situação em que há um grave desequilíbrio entre a produção de EROs (produção excessiva) acompanhado de uma deficiência dos mecanismos de defesa antioxidante. Quando relacionado à função reprodutiva, propõe-se que o estresse oxidativo precipita uma gama de patologias. Estudos têm indicado que níveis elevados de EROs são detectados em amostras de espermatozoides de 25% a 40% de homens inférteis (PADRON, *et al.* 1997). A geração de EROs tornou-se uma preocupação real devido seus

potenciais efeitos tóxicos quando em níveis elevados, afetando dessa forma a qualidade da função espermática (AGARWAL *et al.*, 2003; SIKKA, 1996).

3.3.1 Formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

Os radicais livres (RL) podem ser definidos como moléculas ou fragmentos moleculares que contenham um ou mais elétrons desemparelhados. A presença de elétrons desemparelhados normalmente confere um grau considerável de reatividade sob um radical livre. As EROs representam a classe mais importante de tais espécies geradas nos sistemas vivos (VALKO *et al.*, 2006).

Os RL podem ser considerados altamente instáveis e ativos quando em reações químicas com outras moléculas. Eles derivam de três elementos: oxigênio, nitrogênio e enxofre, permitindo caracterizá-los, dessa forma, em: EROs, ERNs e espécies reativas de enxofre (ERSs). Dentre as EROs podemos incluir o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroperoxila (HO_2^{\cdot}), o radical hidroxila ($\cdot OH$), e outras espécies, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete (1O_2) e o ácido hipocloroso ($HOCl$). Nas ERNs estão incluídos além do peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$), o óxido nítrico (NO^{\cdot}) e o radical dióxido de nitrogênio (NO_2^{\cdot}). As ERNs derivam da reação entre NO e $O_2^{\cdot-}$, com conseqüente formação de $ONOO^{\cdot}$. Quando referente à ERSs, estas, são facilmente formadas por reações de tióis com EROs (CAROCHO *et al.*, 2013).

Nesse contexto, tem-se por definição, que EROs é um termo coletivo que incluem não apenas radicais de oxigênio, mas também algumas moléculas não-radicaais, em que estão inclusos o H_2O_2 , o $HOCl$, o 1O_2 e o ozônio (O_3). (HALLIWELL *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2001). O termo “reativo” quando referente a EROs é relativo. Por exemplo, o $O_2^{\cdot-}$ e o H_2O_2 são altamente seletivos em suas reações com moléculas biológicas, deixando a maior parte delas sem alterações, enquanto que o $\cdot OH$ ataca tudo ao seu redor (HALLIWELL *et al.*, 2007).

RL podem ser produzidos a partir de substâncias endógenas e exógenas. Fontes exógenas incluem: radiação por luz UV, por raios-X e raios gama. Referente a fontes endógenas potenciais podemos citar a mitocôndria, o metabolismo do citocromo P450, peroxissomos e, ativação de células, como neutrófilos e macrófagos, em processos inflamatórios (VALKO *et al.*, 2006).

Os RL estão relacionados com uma variedade de doenças, incluindo câncer, doenças hepáticas, aterosclerose e envelhecimento. Na maioria das vezes esta relação se dá pela propriedade que os RL têm de reagir com ácidos graxos poli-insaturados, servindo também, como iniciadores do processo de peroxidação lipídica. Contudo, estes podem participar também de processos fisiológicos como a geração de eicosanóides, fagocitose e diversas vias de transdução de sinais (LIMA *et al.*, 2001).

3.3.1.1 Radical Ânion Superóxido

O $O_2^{\cdot-}$ possui um elétron desemparelhado e é o principal precursor do H_2O_2 , ou seja, é o primeiro EROs a se formar pela redução univalente do oxigênio molecular (FORMAN *et al.*, 2014; HALLIWELL *et al.*, 2007). Há estudos que demonstram que o $O_2^{\cdot-}$, não é um agente oxidante muito reativo. Em condições fisiológicas, sua formação ocorre espontaneamente em quase todas as células aeróbicas, especialmente na mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons. As mitocôndrias geram, aproximadamente, 2-3nmol de superóxido/min por mg de proteína, o que indica que a mitocôndria seja a fonte fisiológica mais importante deste radical nos organismos vivos (VALKO *et al.*, 2006).

O $O_2^{\cdot-}$ é eliminado pela enzima superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação de duas moléculas de $O_2^{\cdot-}$ em O_2 e H_2O_2 . O H_2O_2 , quando não eliminado do organismo pelas enzimas catalase (CAT) e peroxidases, pode gerar o $\cdot OH$ (BARREIROS *et al.*, 2006). O $O_2^{\cdot-}$ é originado da adição de um elétron no orbital π anti-ligante do O_2 , que não atravessa membranas, exceto por alguns canais específicos, ou quando apresentado em sua forma protonada (GUARATINI *et al.*, 2007). Sua atuação como oxidante direto é irrelevante, porém, esse radical possui habilidade em gerar radicais secundários, os quais são extremamente tóxicos, como o radical OH^{\cdot} , ou ainda reagir com o NO^{\cdot} e gerar $ONOO^{\cdot}$. Embora exista a possibilidade de que o $O_2^{\cdot-}$ reaja com alguns alvos fora das células, em que muito $O_2^{\cdot-}$ é gerado pelas fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida oxidases (NADPH oxidase) e onde a SOD extracelular (SOD-EC) pode estar ausente. É também possível que o $O_2^{\cdot-}$ pode sinalizar através de interações com ferro-enxofre presentes em proteínas (BARREIROS *et al.*, 2006; FORMAN *et al.*, 2014).

3.3.1.2 Radical Hidroxila

Se há uma molécula que é um incompatível na participação como um segundo mensageiro, esta molécula é o radical $\cdot\text{OH}$. Esta espécie é extremamente reativa, sendo capaz de remover um elétron de praticamente qualquer composto biológico com uma constante de velocidade se aproximando do limite de difusão. Esta falta de especificidade elimina o papel do radical $\cdot\text{OH}$ na sinalização (FORMAN *et al.*, 2014).

O radical $\cdot\text{OH}$ também pode causar alterações estruturais nas cadeias de ácido desoxirribonucleico (DNA) por modificações nas bases nitrogenadas e pela oxidação da desoxirribose, o que quase resulta na ruptura da cadeia de DNA (BARREIROS *et al.*, 2006). Este radical forma-se a partir de $\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , através das reações de Haber-Weiss e Fenton, as quais são catalisadas por íons Fe^{++} ou Cu^+ (SÁNCHEZ, 2012). O radical $\cdot\text{OH}$ também pode iniciar a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados presentes em membranas celulares (lipoperoxidação) e ao oxidar grupos sulfidrilas (-SH) a pontes dissulfetos (S-S), pode inativar proteínas e enzimas (HALLIWELL *et al.*, 2007; SÁNCHEZ, 2012; VALKO *et al.*, 2006).

3.3.1.3 Peróxido de Hidrogênio

O H_2O_2 é tóxico para as células em diversas concentrações numa gama de 10 a 100 μM , podendo levar a senescência ou apoptose. Quando em concentrações mais baixas, pode promover a proliferação de certos tipos de células, e quando em concentrações mais elevadas pode suprimir a apoptose e promover a morte de células necróticas (HALLIWELL *et al.*, 2007).

H_2O_2 não é um radical livre, isso se dá pelo fato de não conter um elétron desemparelhado. Entretanto, ele pode atravessar as membranas e pode oxidar lentamente uma série de compostos. O H_2O_2 pode ser formado *in vivo* pela dismutação espontânea do $\text{O}_2^{\cdot-}$, e também pela SOD e por muitas enzimas oxidase. Quando em concentrações mais elevadas pode atacar diversos sistemas de produção de energia celular, como por exemplo, está envolvido na inativação de uma enzima da via glicolítica: a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, tendo também como alvo direto cetoácidos como o piruvato e o α -cetoglutarato e ainda grupos heme. Pode ainda formar o radical $\cdot\text{OH}$, na presença de íons de

metais de transição, como ferro e cobre (ARUOMA, 1998; GUARATINI *et al.*, 2007; VALKO *et al.*, 2006).

Felizmente, dada sua ampla presença *in vivo*, o H_2O_2 é apenas um fraco agente oxidante e redutor e, geralmente fraco em aspectos de reatividade. De fato, isso provavelmente caracteriza o H_2O_2 como uma molécula com papel na transdução de sinal. Por exemplo, não ocorre oxidação quando DNA, lipídeos ou algumas proteínas são incubados com H_2O_2 , mesmo em concentrações milimolares, sendo capaz de inativar algumas enzimas diretamente, como as caspases envolvidas na apoptose (HALLIWELL *et al.*, 2007).

As mitocôndrias geram quantidades significativas de H_2O_2 . Sob condições fisiológicas, a produção de H_2O_2 está estimada em torno de 2% da absorção total de O_2 pelo organismo (VALKO *et al.*, 2006). Fisiologicamente, o H_2O_2 pode ser removido pelas enzimas glutathione peroxidase (GPx) e CAT (SÁNCHEZ, 2012).

3.3.2 Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica é amplamente definida como "deterioração oxidativa de ácidos graxos poli-insaturados", constituindo reações em cadeia nos ácidos graxos que estão presentes nas membranas celulares (AGARWAL *et al.*, 2003). As reações de peroxidação lipídica podem resultar em alteração da permeabilidade, fluidez e integridade das membranas (BOWLES *et al.*, 1991; GOODE *et al.*, 1995).

A cascata da peroxidação lipídica ocorre em três etapas fundamentais: iniciação, propagação e terminação. O radical $\cdot OH$ é um potente iniciador. A maioria dos ácidos graxos poli-insaturados presentes na membrana plasmática possuem ligações duplas não conjugadas, sendo estas separadas por grupos metileno. A presença de uma ligação dupla adjacente a um grupo metileno caracteriza ligações fracas entre carbono e hidrogênio do metileno, e, por conseguinte, o hidrogênio é mais susceptível a remoção. Uma vez que a abstração ocorra, o radical produzido é estabilizado pelo rearranjo das ligações duplas, que formam um radical dieno conjugado (duas duplas ligações intercaladas por uma ligação simples) que pode, então, ser oxidado (AGARWAL *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2001).

Dessa forma, os lipídeos, os quais contêm muitas ligações duplas interrompidas por metileno, são particularmente susceptíveis à peroxidação. Os dienos conjugados reagem rapidamente com o O_2 podendo formar um radical peroxila ($ROO\cdot$), que remove átomos de

hidrogênio de outras moléculas lipídicas para formar hidroperóxidos lipídicos (LOOH). Os LOOH são estáveis sob condições fisiológicas, até que entrem em contato com metais de transição, tais como sais de ferro ou de cobre. Estes metais ou seus complexos podem gerar radicais ROO^{\bullet} e alcóxila, os quais, em seguida, continuam a reação em cadeia dentro da membrana propagando o dano por toda a célula (AGARWAL *et al.*, 2003).

3.3.3 Oxidação de Proteínas

O dano oxidativo a proteínas pode ocorrer no estresse oxidativo, tendo sua importância caracterizada na impossibilidade do funcionamento de receptores, anticorpos, transdução de sinal e o transporte de proteínas e enzimas (FORMAN *et al.*, 2014; HALLIWELL *et al.*, 2007).

O radical OH^{\bullet} pode reagir com a cadeia lateral de aminoácidos e proteínas, atacando preferencialmente cisteína, fenilalanina, histidina, metionina e triptofano, e, ainda, mas em menores proporções, a arginina e a asparagina. Os ataques aos aminoácidos que compõem as proteínas podem resultar em danos, caracterizados como clivagens de ligações com ou sem geração de fragmentos, e ligações cruzadas (BARREIROS *et al.*, 2006; SÁNCHEZ, 2012).

Danos em proteínas podem resultar em danos secundários em outras biomoléculas, como por exemplo, desencadeando o aumento das concentrações de Ca^{2+} e a ativação de nucleases. Danos a enzimas de reparo de DNA resultam em propensão do dano oxidativo ao DNA, bem como aumentam a frequência de mutação, enquanto que danos nas DNA polimerases podem diminuir sua fidelidade na replicação do DNA. Proteínas oxidadas podem ser reconhecidas como “estranhas” pelo sistema imune, tornando-se alvo da formação de auto-anticorpos e possivelmente de autoimunidade, como no caso da artrite reumatoide (HALLIWELL *et al.*, 2007).

3.3.4 Sistemas de Defesa Antioxidante

Em 1995, Halliwell e Gutteridge definiram antioxidantes como "qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparada com a de um substrato oxidável, atrasa significativamente ou inibe a oxidação do referido substrato". Mais tarde, os mesmos, definiram antioxidantes como " qualquer substância que atrase, impeça

ou elimine os danos oxidativos de uma molécula alvo" (HALLIWELL *et al.*, 2007).

O sistema antioxidante é formado por substâncias enzimáticas e não-enzimáticas. Dentre os antioxidantes enzimáticos, destacam-se a SOD, a CAT e a GPx. Estas constituem a primeira linha de defesa endógena de neutralização das EROs. Através delas, as células tentam manter baixas as quantidades de $O_2^{\cdot-}$ e de H_2O_2 , evitando assim, a formação do radical $\cdot OH$ (CAROCHO *et al.*, 2013).

Basicamente, o sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos RL ou das espécies reativas não-radicaís. Tais ações podem ser alcançadas por meio de diferentes mecanismos de ação: impedindo a formação dos RL ou espécies não-radicaís (sistemas de prevenção), impedindo a ação desses (sistemas varredores) ou, ainda, favorecendo o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas (sistemas de reparo) (BARBOSA *et al.*, 2010).

A atividade antioxidante pode ser eficaz por meio de várias formas:

- Como inibidores de reações de oxidação de RL;
- Por meio da inibição da formação de LOOH;
- Interrompendo a propagação da reação em cadeia da auto oxidação (antioxidantes de quebra de cadeia);
- Como supressores de 1O_2 ;
- Através de sinergismo com outros antioxidantes;
- Como agentes redutores que convertem hidroperóxidos em compostos estáveis;
- Atuando como quelantes de metais, que convertem metais pró-oxidantes (derivados de ferro e cobre) em produtos estáveis;
- Inibindo enzimas pró-oxidativas (como as lipoxigenases).

(CAROCHO *et al.*, 2013).

Ainda conforme a ação sobre os RL, o antioxidante pode ser denominado de “*scavenger*”, quando ele atua transformando um RL em outro menos reativo, ou “*quencher*”, quando consegue neutralizar completamente o RL através da absorção de toda a energia de excitação (ARAÚJO, 2002).

3.4 ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

O sistema antioxidante enzimático é o primeiro a atuar na eliminação de RL, evitando o acúmulo de H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$. Podemos incluir diversas enzimas antioxidantes, com destaque para a SOD, a CAT e a

GPx. As enzimas glutationa-S-transferase (GST) e a glutationa redutase (GR) agem, respectivamente, detoxificando agentes eletrofílicos (como xenobióticos) e reduzindo o dissulfeto de glutationa oxidada (GSSG) à glutationa reduzida (GSH) (FERNANDES, 2010; HALLIWELL *et al.*, 2007).

3.4.1 Superóxido Dismutase

A SOD contribui para um dos mecanismos antioxidantes mais eficientes, sendo uma enzima que catalisa a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 e O_2 , fornecendo o H_2O_2 como um substrato para a CAT, prevenindo, dessa forma, os danos que poderiam ser causados por esta molécula. Diversos tipos de SOD são descritos na literatura, podendo estar localizadas no citosol, em organelas celulares específicas ou extracelularmente, e cujos sítios ativos podem conter diferentes íons (como cobre, zinco, manganês ou ferro) (CAROCHO *et al.*, 2013; GUARATINI *et al.*, 2007; HALLIWELL *et al.*, 2007).

A decomposição do $O_2^{\cdot-}$ ocorre naturalmente, entretanto, pra que isso ocorra, necessita que ocorra colisão entre duas moléculas de $O_2^{\cdot-}$, já que esta é uma reação de segunda ordem, de forma que há a necessidade de uma concentração maior do $O_2^{\cdot-}$. A presença da enzima SOD favorece essa dismutação tornando a reação de primeira ordem, eliminando a necessidade da colisão entre as moléculas. A SOD permite a eliminação do $O_2^{\cdot-}$ mesmo em baixas concentrações (BARREIROS *et al.*, 2006).

Nos organismos eucariontes existem três tipos de SOD, dependentes de sua localização. A SOD-EC está presente, como o próprio nome sugere, no espaço intersticial dos tecidos e dos fluídos extracelulares e é responsável pela atividade da SOD presente no plasma, linfa e fluído sinovial. A SOD-EC é a única enzima extracelular que detoxifica o $O_2^{\cdot-}$ (SÁNCHEZ, 2012). Além da SOD-EC, há a superóxido dismutase cobre-zinco (SOD-CuZn), presente em quase todas as células eucarióticas, constituindo a primeira linha de defesa antioxidante. A SOD-CuZn está localizada no citosol, podendo ser encontrada também nos lisossomos, núcleo e no espaço entre as membranas mitocondriais interiores e exteriores. Encontrada na mitocôndria, a SOD-Mn, com manganês em seu sítio ativo, e na presença de EROs, tem sua expressão aumentada (HALLIWELL *et al.*, 2007; SÁNCHEZ, 2012).

3.4.2 Catalase

A CAT é uma hemoproteína tetramérica e, assim como a SOD, é responsável por catalisar uma reação de dismutação. Esta enzima converte o H_2O_2 em água e oxigênio molecular e tem uma das maiores taxas de rotatividade conhecidas pelo homem, permitindo que apenas uma molécula de CAT possa converter seis bilhões de moléculas de H_2O_2 em um minuto (CAROCHO *et al.*, 2013).

Cada uma das quatro subunidades da CAT está fortemente ligada a uma molécula de NADPH, o qual aumenta a eficiência da enzima, bem como a protege, prevenindo e revertendo a formação de uma forma inativa desta enzima, denominada como composto II (HALLIWELL *et al.*, 2007).

Nos mamíferos, a CAT está presente em todos os órgãos, estando especialmente concentrada no fígado. A CAT está localizada nos peroxissomas, que contêm várias enzimas que podem resultar na formação de H_2O_2 , tais como as flavoproteínas desidrogenases, envolvidas na β -oxidação de ácidos graxos. Na mitocôndria, essas flavoproteínas doam elétrons para a cadeia transportadora de elétrons, mas nos peroxissomas elas reagem com O_2 (HALLIWELL *et al.*, 2007).

3.4.3 Glutationa Peroxidase

As glutations peroxidases (GPxs) são amplamente distribuídas em tecidos animais. A atividade dessas enzimas representa um dos meios de controle das concentrações de H_2O_2 e LOOH, constituindo um dos sistemas antioxidantes mais importantes da célula (ROVER JUNIOR *et al.*, 2001). Essas enzimas são, comumente, dependentes de selênio, apresentando um resíduo de cisteína contendo o selênio covalentemente ligado ao restante da enzima e, dessa forma, o selênio foi caracterizado, em 1973, como sendo um componente essencial para a atividade enzimática. Entretanto, uma das suas cinco isoformas é independente de selênio (HALLIWELL *et al.*, 2007; SÁNCHEZ, 2012).

Todas as GPxs catalisam a redução do H_2O_2 usando a GSH como substrato. Significativamente, a GPx compete com CAT para utilizar H_2O_2 como substrato e é a principal forma de proteção contra o estresse oxidativo (VALKO *et al.*, 2006).

Estas enzimas também podem catalisar a redução de outros peróxidos orgânicos para seus correspondentes álcoois, onde o -SH da

GSH atua como doador de elétrons e é oxidado a GSSG (HALLIWELL *et al.*, 2007; ROVER JUNIOR *et al.*, 2001).

3.4.4 Glutathione Redutase

A GR não age diretamente na remoção de RL, mas atua em conjunto com a GPx, tendo sua ação caracterizada pela redução da GSSG às custas de NADPH, regenerando a GSH e mantendo assim o equilíbrio redox intracelular. A GR tem uma distribuição celular muito similar a GPx (SÁNCHEZ, 2012).

3.4.5 Glutathione S-transferase

As glutathione transferases (GSTs), também conhecidas como glutathione-S-transferases, compreendem uma família de enzimas multifuncionais que catalisam o ataque nucleofílico da forma reduzida da glutathione a compostos que apresentam um carbono, um nitrogênio ou um átomo de enxofre eletrofílico (xenobióticos e compostos endógenos), tornando os produtos da reação menos tóxicos e mais solúveis em água, facilitando sua excreção. As GSTs geralmente se encontram no meio biológico como homo ou heterodímeros (podendo existir outros complexos), apresentando dois sítios ativos por dímero cujas atividades são independentes uma da outra (HUBER *et al.*, 2008).

Os xenobióticos, à semelhança do que acontece com as substâncias endógenas, são conjugados com diversas substâncias. Entre as reações importantes, tem-se a sulfatação, a acetilação, a metilação, além de conjugações com a GSH e com aminoácidos. A conjugação de agentes tóxicos com o tripeptídeo GSH é catalisada, na sua fase inicial, pela GST que atua na fase II da biotransformação, prevenindo danos à membrana celular e outras macromoléculas (TORRES *et al.*, 2006).

A atuação das GSTs é uma importante estratégia de defesa da célula contra xenobióticos. Uma vez formados, os conjugados da GSH com xenobióticos podem ser reconhecidos por transportadores específicos e conduzidos para o meio intercelular. No meio intercelular estes conjugados são clivados pela ação da enzima γ -GT e dipeptidases presentes na porção externa da membrana celular. O glutamato e a glicina livres podem ser reabsorvidos pela célula e utilizados na síntese *de novo* de GSH (HUBER *et al.*, 2008).

3.4.6 Glicose-6-fosfato desidrogenase

A regulação e a manutenção do equilíbrio redox dependem de vários fatores, dentre os quais podemos incluir o fornecimento contínuo de NADPH. Tanto a tioredoxina (Trx) como o sistema redox dependente de GSH dependem principalmente desse fornecimento de elétrons pelo NADPH. Nesse contexto, vale destacar que o fornecimento de NADPH celular é principalmente acreditado por ser fornecido através da G6PD na via das pentoses fosfato (DAMMEYER *et al.*, 2010). Basicamente, a G6PD regenera o NADPH criando um ambiente reduzido. Essa enzima não neutraliza RL diretamente, mas tem papéis secundários para os outros antioxidantes endógenos (CAROCHO *et al.*, 2013).

É interessante notar, que a deficiência de G6PD é o defeito enzimático mais comum nos seres humanos e relaciona-se com o aumento do estresse oxidativo, com a anemia hemolítica e potencialmente também com a resistência à malária. Embora a expressão G6PD é geralmente considerada como sendo de grande importância para todos os principais sistemas redox celular, sua expressão varia muito entre diferentes tipos de células (DAMMEYER *et al.*, 2010).

3.4.7 γ -Glutamyl-Transferase

A γ -GT é uma proteína glicosilada, parcialmente incorporada na superfície externa da membrana plasmática, que catalisa a transferência da porção de γ -glutamil da glutathione, ou conjugados de glutathione, para aceptores tais como aminoácidos e dipeptídeos (FORMAN *et al.*, 2009; MAREŠ *et al.*, 2005). Portanto, ela participa na reciclagem de aminoácidos da glutathione e conjugados de glutathione secretados para o meio extracelular. Esses aminoácidos são reintroduzidos para o meio intracelular participando da síntese *de novo* de GSH. Sua ação possibilita a captação de cisteína, elemento limitante para a síntese de GSH. A γ -GT também é responsável pela degradação da glutathione, tornando-a disponível como fonte de cisteína para síntese proteica (TATEISHI *et al.*, 1977).

Pouco se sabe sobre o papel da γ -GT na reprodução. Kumar e colaboradores (2000) analisaram alguns aspectos relacionados à reprodução em camundongos deficientes de γ -GT. Os resultados mostraram que os machos mutantes tiveram redução no tamanho da

vesícula seminal e testículo, supressão no soro de fator de crescimento ligado a insulina I (IGF-1), redução do FSH, e eram inférteis. Entretanto, após a administração de N-acetilcisteína (NAC) na água de beber, estes animais tiveram o tamanho dos testículos e vesícula seminal restaurados para valores comparáveis aos camundongos tipo selvagem; além disso, tornaram-se férteis produzindo descendentes quando cruzados com camundongos do tipo selvagem. Estes resultados podem sugerir que os níveis adequados de GSH intracelular e cisteína, que são regulados pela γ -GT, são essenciais para a função reprodutiva normal.

A γ -GT é amplamente distribuída nos tecidos de mamíferos. No sistema reprodutor masculino de muitas espécies a γ -GT é amplamente expressa nos testículos, vesícula seminal e epidídimo (PALLADINO *et al.*, 1994). Algumas evidências sugerem que a atividade desta enzima pode ser relevante para a fisiologia testicular e reprodução (MERONI *et al.*, 1997). Encontra-se presente também nos túbulos seminíferos, localizada nas células de Sertoli (TINDALL *et al.*, 1985).

A γ -GT pode ser considerada um marcador testicular da atividade das células de Sertoli em ratos (SCHTEINGART *et al.*, 1988), e também considerada um marcador da diferenciação destas células, já que a atividade da γ -GT em células de Sertoli de ratos aumenta consideravelmente entre os 15 e 35 dias de idade (período em que as células de Sertoli se diferenciam em células adultas) e continua constante dali em diante até os 100 dias de idade (LU *et al.*, 1977; MERONI *et al.*, 2000).

3.5 ANTIOXIDANTES NÃO-ENZIMÁTICOS

Os antioxidantes não-enzimáticos, ou de baixa massa molar, também contribuem com a manutenção do equilíbrio redox celular. Nesta classe, podemos incluir um vasto número de compostos, sintetizados *in vivo* ou obtidos exogenamente, que previnem danos oxidativos por interações diretas ou indiretas com EROs/ERNs (GUARATINI *et al.*, 2007).

Apesar da sua eficiência notável, o sistema antioxidante endógeno não é suficiente, e os seres humanos dependem de vários tipos de antioxidantes que estão presentes na dieta a fim de manter baixas concentrações de RL (CAROCHO *et al.*, 2013).

A avaliação do potencial antioxidante *in vivo* dos compostos não-enzimáticos depende de algumas variáveis, entre elas: absorção e biodisponibilidade em condições fisiológicas; concentração plasmática

ideal para desempenhar sua atividade antioxidante; tipos de RL gerados no processo oxidativo; em qual compartimento celular foram gerados e como foram gerados. A ação de determinado antioxidante pode, portanto, variar de acordo com o compartimento celular ou tecido no qual atua (BARBOSA *et al.*, 2010).

Dentre as substâncias endógenas pode-se incluir alguns hormônios, como estradiol e estrogênio que apresentam atividade antioxidante semelhante à vitamina E, devido, provavelmente, à sua porção fenólica, comum a ambas as moléculas, bem como ainda a melatonina, reguladora do relógio biológico nos mamíferos, que também apresenta atividade antioxidante, provavelmente devido à desidrogenação do grupamento -NH, além de induzir a síntese de antioxidantes enzimáticos *in vivo*, como a GPx (GUARATINI *et al.*, 2007).

Referente às substâncias exógenas, pode-se incluir vitaminas, minerais e compostos fenólicos. O ácido ascórbico, ou vitamina C, o α -tocoferol e o β -caroteno, são precursores das vitaminas A e E, respectivamente, com ação potencialmente antioxidante. Outros carotenoides sem atividade de vitamina A, como licopeno, luteína e zeaxantina, também o são. Entre os minerais destacam-se o zinco, cobre, selênio e magnésio (BARBOSA *et al.*, 2010).

3.5.1 Vitamina C

O ácido ascórbico inclui dois compostos com atividade antioxidante: o ácido L-ascórbico e o ácido L-desidroascórbico que são ambos absorvidos através do trato gastrointestinal e podem ser trocados enzimaticamente *in vivo*. O ácido ascórbico é eficaz na eliminação do $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , o $\cdot OH$, 1O_2 e NO^{\cdot} e é considerado o mais potente antioxidante hidrossolúvel presente nos mamíferos (CAROCHO *et al.*, 2013).

A vitamina C é, por excelência, um antioxidante em potencial, possui ação de “*scavenger*”, bem como regeneradora da vitamina E, tendo maior ação no plasma sanguíneo. No entanto, a presença de metais de transição como o ferro possibilita sua ação oxidante, tornando-a capaz de produzir espécies radicais ($\cdot OH$) e não-radicaais (H_2O_2) (BARBOSA *et al.*, 2010).

Duarte e colaboradores (2007) realizaram um estudo com cultura de células, em que demonstraram que estas, quando incubadas na presença de H_2O_2 , sofreram danos em resposta à ação oxidativa dessa espécie. A vitamina C, na presença de ferro, aumentou a expressão dos

danos referidos. Os autores sugerem o envolvimento da vitamina C na regulação do metabolismo de ferro, aumentando sua absorção e tornando-o mais apto a desempenhar sua ação catalítica sobre as reações de Fenton, resultando na conversão do H_2O_2 em radicais $\cdot OH$, potencialmente mais reativos. Também ressaltaram que, concomitantemente, ocorre a modulação da expressão de dois genes relacionados aos receptores de transferrina e ferritina.

A vitamina C apresenta intensa atividade antioxidante contra RL gerados em meio hidrofílico. No entanto, tal vitamina pode não ser capaz de inibir os RL que propagam as reações de peroxidação lipídica em meios lipofílicos (BARBOSA *et al.*, 2010). Segundo Huang e colaboradores (2002), a vitamina C mostrou-se capaz de aumentar a capacidade antioxidante total do soro (*serum oxygen radical absorbance capacity* - ORAC), o que não ocorreu com a vitamina E. Os autores ressaltam que esse resultado reflete o fato de a vitamina C, ao contrário da E, desempenhar melhor atividade antioxidante em meios hidrofílicos.

3.5.2 Vitamina E

A vitamina E é composta por oito isoformas, caracterizada em quatro tocoferóis (α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol e δ -tocoferol) e quatro tocotrienóis (α -tocotrienol, β -tocotrienol, γ -tocotrienol e δ -tocotrienol). O α -tocoferol compreende a isoforma mais potente e abundante nos sistemas biológicos (CAROCHO *et al.*, 2013; SÁNCHEZ, 2012).

O α -tocoferol é o que exhibe maior atividade biológica e representa aproximadamente 90% de todos os tocoferóis presentes nos tecidos dos mamíferos (SÁNCHEZ, 2012). O grupo cromanol, o qual, apresenta um grupo hidroxila ($-OH$), é o que confere a atividade antioxidante aos tocoferóis. A vitamina E cessa a peroxidação lipídica, doando seu hidrogênio fenólico aos $ROO\cdot$ formando um radical tocoferoxil que, apesar de também ser um radical, não é reativo e impede a continuidade da reação em cadeia oxidativa, como demonstrado abaixo (CAROCHO *et al.*, 2013).

“Vitamina E” é um termo nutricional, usado inicialmente para se referir a um fator solúvel em lipídeos, descoberto em 1922, como sendo essencial na dieta de ratos normais a fim de permitir a reprodução. A substância ativa foi isolada em 1936. Mais tarde, outros trabalhos demonstraram que a vitamina E é essencial na dieta de outros animais, demonstrando que a carência dessa vitamina pode desencadear uma

variedade de sintomas e condições, os quais podem incluir a esterilidade em ratos machos (HALLIWELL *et al.*, 2007).

A vitamina E, por ser lipossolúvel, confere proteção e manutenção da integridade das estruturas de lipídeos, contemplando principalmente as membranas. As vitaminas E e C exibem um comportamento sinérgico, o qual permite a regeneração da vitamina E através de vitamina C do radical tocoferoxil para uma forma intermediária, por conseguinte, restabelecendo o seu potencial antioxidante. A vitamina E ainda pode ser regenerada pelo ubiquinol (CAROCHO *et al.*, 2013).

Segundo Halliwell e colaboradores (2007), dependendo dos compostos presentes na reação, a vitamina E pode exercer efeito anti ou pró-oxidativo. Os tocoferóis podem reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} e Cu^{2+} a Cu^{+} , que por sua vez, exercem efeito pró-oxidativo. Além disso, o radical tocoferol, oriundo da redução do radical ROO^{\bullet} , pode abstrair hidrogênio dos ácidos graxos poli-insaturados, atuando então como um fraco promotor de lipoperoxidação. Estes fenômenos já foram observados em alguns sistemas *in vitro*.

3.5.3 Glutaciona reduzida

A glutaciona é um tripeptídeo endógeno a qual pode proteger as células contra RL, quer por doação de um átomo de hidrogênio ou um elétron. É também muito importante para a regeneração de outros antioxidantes como o ácido ascórbico (CAROCHO *et al.*, 2013). Existe no organismo sob as formas reduzida e oxidada, atuando direta ou indiretamente em diversos processos biológicos importantes, incluindo desde a síntese de proteínas, até metabolismo e proteção celular. Em particular, problemas na síntese e metabolismo da glutaciona estão associados a algumas doenças, nas quais as concentrações de glutaciona e das enzimas que atuam no seu metabolismo podem ser bastante significativos no diagnóstico de alguns tipos de câncer, bem como em outras doenças relacionadas ao estresse oxidativo (ROVER JUNIOR *et al.*, 2001).

A GSH possui papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o estresse oxidativo. Este tripeptídeo é encontrado intracelularmente em altas concentrações, essencialmente em todos os organismos aeróbicos. A ligação γ -peptídica pouco usual, bem como, a presença da porção γ -glutamil e do grupo α -carboxilato livre, conferem a esta molécula prevenção contra hidrólise pelas peptidases celulares que degradam outros peptídeos pequenos. A

GSH é o mais abundante tiol celular de baixa massa molecular e a sua concentração é em torno de 2 mM e mais de 10 mM em eritrócitos humanos e hepatócitos, respectivamente (HUBER *et al.*, 2008).

Muitas das reações da GSH envolvem o grupo -SH, altamente polarizável, tornando-o um bom nucleófilo para reações com compostos químicos eletrofílicos. Esta habilidade de doar elétrons a outros compostos também faz da glutatona um bom redutor. A combinação de sua abundância nos organismos aeróbicos e das propriedades químicas do grupo -SH suporta a proposta de que a GSH surgiu na evolução bioquímica como uma proteção contra EROs e compostos eletrofílicos gerados por processos oxidativos (HALLIWELL *et al.*, 2007; HUBER *et al.*, 2008).

3.6 ESTRESSE OXIDATIVO E SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO

No contexto da reprodução humana, a produção excessiva de EROs pode sobrecarregar estratégias de defesa antioxidante do espermatozoide e do plasma seminal, desencadeando estresse oxidativo (de LAMIRANDE *et al.*, 1997). Quando os antioxidantes naturais do esperma não podem impedir a produção exógena de EROs da própria célula ocorre lesão celular, causando danos aos espermatozoides que podem estar relacionados à infertilidade masculina (BANSAL *et al.*, 2010).

Pesquisas demonstraram que espermatozoides humanos morfológicamente anormais têm uma maior capacidade de geração de EROs e uma redução na capacidade antioxidante (SÁNCHEZ, 2012). O estresse psicológico produz uma redução na capacidade do sêmen por um mecanismo relacionado com a deterioração da unidade central de gonadotrofina. No entanto, estudos prospectivos têm vinculado o período de estresse psicológico com uma redução na qualidade do esperma mediado por um aumento na geração de EROs do plasma seminal e uma redução na proteção antioxidante (ESKIOCAK *et al.*, 2007).

Todos os componentes celulares são alvos potenciais na condição de estresse oxidativo. A extensão dos danos induzidos nessas circunstâncias não depende apenas da natureza e da quantidade de EROs envolvidas, mas também do momento e da duração da exposição à EROs e ainda de fatores extracelulares, tais como temperatura, pressão de O₂, bem como da composição do meio que envolve a célula (por

exemplo, íons, proteínas e sequestrantes de EROs) (AGARWAL *et al.*, 2003). Alterações nas enzimas antioxidantes e redução nas concentrações de GSH têm sido correlacionadas com a sub-fertilidade ou infertilidade (WANG *et al.*, 2003). O plasma seminal de homens férteis tem maior capacidade total antioxidante do que o plasma seminal de homens inférteis (LEWIS *et al.*, 1995).

Inhof e colaboradores (2011) realizaram um estudo em que homens inférteis foram tratados durante três meses com uma combinação de L-carnitina, L-arginina, zinco, Vitamina E, glutathiona, selênio, coenzima Q10 e ácido fólico. Os resultados demonstraram um aumento significativo do volume ejaculatório, concentração de espermatozoides, motilidade (progressiva e total) e da percentagem de morfologia normal, em comparação ao grupo controle. Isso pode sugerir, já que foram utilizados antioxidantes por um período considerável de tempo, em como uma condição de estresse oxidativo pode influenciar na fertilidade masculina. Nesse contexto, justifica-se que o uso de terapias com antioxidantes por meio de suplementação pode representar uma melhora no potencial da fertilidade masculina bem como a qualidade do sêmen (AHMAD *et al.*, 2010).

3.7 ESTRESSE OXIDATIVO E SISTEMA PURINÉRGICO

Já se tem conhecimento que RL podem ser tóxicos; entretanto, podem também funcionar como moléculas sinalizadoras (D'AUTRÉAUX *et al.*, 2007). Estudos em uma linhagem de células de macrófagos de ratos demonstrou que a ativação de receptores do tipo P2X₇ contribuiu para a produção de EROs com consequente ativação de p38 MAPK e da cinase c-Jun N-terminal (JNK). O estudo sugere que, através da produção de EROs, o P2X₇ desempenha um papel crítico na atividade inflamatória e antimicrobiana dos macrófagos (PFEIFFER *et al.*, 2007).

Da mesma forma, macrófagos peritoneais de ratos foram encontrados por responder ao ATPe seguida da produção de EROs, envolvendo presumivelmente receptores P2X₇ (ZHU *et al.*, 2014). Além disso, a estimulação de uma linhagem celular de macrófagos alveolares de ratos com ATPe (possivelmente através de P2X₇) e outros nucleotídeos extracelulares levou à produção transiente de concentrações elevadas de EROs. Mediante isso, observou-se a ativação da via da fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) bem como subsequente ativação da proteína cinase B (AKT) e da proteína cinase regulada por

sinal extracelular (ERK1/2). Curiosamente, a formação de EROs dependente da ativação da PI3K foi envolvida na ativação da caspase-1 e o processamento da secreção de interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina-18 (IL-18), sugerindo que as EROs podem ser mediadores importantes induzidos por receptores P2X₇ com liberação de citocinas pró-inflamatórias (CRUZ *et al.*, 2007).

3.8 GLUTAMATO

Nos últimos 40 anos tem se discutido o papel e a homeostase do glutamato no testículo. Todavia, muito ainda precisa ser determinado a fim de elucidar quais os mecanismos pelos quais o glutamato, que é abundante no testículo e fluidos testiculares, pode ser compartimentalizado no testículo de mamíferos (MUSHAHWAR *et al.*, 1973).

O glutamato é o principal aminoácido livre no testículo, epidídimo e no sêmen da maioria dos mamíferos (HINTON, 1990). No sêmen, o glutamato é encontrado principalmente no plasma seminal ao invés do espermatozoide, e não atravessa a barreira hemato-testicular (LEE *et al.*, 2011). Dentro do próprio testículo, existem evidências limitadas de qual o real papel do glutamato, embora já se tenha demonstrado que tanto o glutamato, como seu análogo (D-aspartato), são capazes de modificar a atividade estereoidogênica. No plasma do epidídimo, uma variedade de moléculas, incluindo o glutamato, parece ser essencial na conversão de gametas em células competentes e funcionais. Por conseguinte, transportadores de glutamato são necessários para que este aminoácido possa se dirigir para o lúmen do epidídimo (WAGENFELD *et al.*, 2002).

Basicamente, há dois parâmetros-chave que influenciam na homeostase do glutamato em um tecido, os quais são: (i) a presença de uma barreira que restringe o fluxo de glutamato do sangue; e (ii) transportadores nas membranas plasmáticas de células que removem glutamato a partir do espaço extracelular. Nesse contexto, identifica-se certa homologia entre o testículo e o cérebro de mamíferos, ao passo de que a barreira hemato-testicular é homóloga, mas, estruturalmente distinta da barreira hemato-encefálica (DANBOLT, 2001; LEE *et al.*, 2011).

A barreira hemato-testicular é predominantemente formada por junções apertadas entre as células de Sertoli, no entanto, as células de Leydig no meio intersticial demonstram uma considerável homologia

antigênica com os astrócitos, o que também pode influenciar nas propriedades da barreira. A barreira hemato-encefálica é induzida por astrócitos e é constituída de junções entre células endoteliais. Os astrócitos são os principais reguladores do glutamato extracelular no cérebro devido à expressão de transportadores de glutamato, o que permite o associar a célula de Leydig, isso se deve ao fato de que a célula de Leydig apresenta, em maior proporção que outras células testiculares, a expressão de transportadores para glutamato e ainda algumas características similares aos astrócitos e outras células (DANBOLT, 2001; WILLIAMS *et al.*, 2005).

3.8.1 Transportadores de Glutamato no testículo

Os transportadores para glutamato (GLTs) têm sido classificados em subtipos diferentes, incluindo o transportador de glutamato aspartato (GLAST), o transportador de aminoácido excitatório 1 (EAAT1), o transportador de glutamato-1 (GLT-1), bem como os transportadores de aminoácidos excitatórios 3, 4 e 5 (EAAT3, EAAT4 e EAAT5) (DANBOLT, 2001).

A literatura relacionada à expressão de transportadores para glutamato no testículo é limitada; entretanto, alguns estudos evidenciaram a presença desses transportadores neste tecido. Takarada e colaboradores (2004), demonstraram a presença de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) para os transportadores de glutamato GLAST, GLT1, EAAT4 e EAAT5 no testículo. Entretanto, as evidências referentes a estes transportadores são controversas. Técnicas de imunocitoquímica demonstraram a presença da proteína GLAST em células de Leydig, por outro lado, a mesma não foi detectada no *Western blot*, uma disparidade atribuída, provavelmente, a diferenças de sensibilidades metodológicas. Por outro lado, tanto imunomarcagem como *Western blot* evidenciaram a presença de GLT1; todavia, em uma massa molar mais baixo do que o tamanho previsto para o comprimento completo de GLT1, enquanto que o EAAT4 não foi detectável (TAKARADA *et al.*, 2004).

Hu e colaboradores (2004), relataram a presença de RNAm para GLT1 e EAAT1 no testículo, e que uma parte do transporte do glutamato nos testículos pode ser inibida pelo diidrokainato, que é um inibidor seletivo GLT1, sugerindo a possibilidade de receptores funcionais no testículo. Técnicas de imunohistoquímica, também demonstraram a presença da proteína GLT1 no esperma de ratos e

humanos. Coletivamente, estes dados sugerem uma distribuição mais ampla dos transportadores de glutamato no testículo além de uma expressão similar ao astrócito quando referente às células de Leydig, com a ressalva de que muitas das proteínas detectadas podem não ser versões típicas dos transportadores de glutamato normalmente encontrados em astrócitos no cérebro (HU *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2011).

O glutamato endógeno já foi demonstrado em um grande número de células nos testículos. Exceções notáveis incluíram as células de Leydig que acumulam D-aspartato e expressam GLAST1a mas contêm pouco glutamato detectável. Isto pode ser atribuído ao fenótipo semelhante ao astrócito destas células, uma vez que expressam níveis elevados de GS, uma enzima que metaboliza rapidamente qualquer glutamato disponível em glutamina (HOLASH *et al.*, 1993; VAN STRAATEN *et al.*, 2006).

Acredita-se que células que expressam a enzima glutamato desidrogenase e a glutamato sintase, tais como as células de Sertoli, podem conter quantidades detectáveis de glutamato (SPANAKI *et al.*, 2010). Entretanto, Lee e colaboradores (2011) observaram a falta de glutamato nas células de Sertoli, o que sugere que o glutamato ou é rapidamente metabolizado em outros compostos, ou, plausivelmente (já que a glutamato desidrogenase é reversível), pode ocorrer à condução do catabolismo de glutamato de volta para α -cetoglutarato.

Várias funções têm sido propostas para o glutamato além das ações putativas como um 'neurotransmissor' e como um osmólito. Estas funções incluem a produção de ácido γ -aminobutírico (GABA) e glutationa (γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina). Dado que o GABA parece ser sintetizado tanto pelo esperma como pelas células de Leydig, isto seria compatível com a opinião de que GLAST1a e GLAST1b podem fornecer algum glutamato para este processo de síntese em células de Leydig. Da mesma forma, concentrações elevadas de glutationa bem como a maquinaria sintética para produzi-la estão presentes nos testículos, particularmente em células, tais como espermatogônias, espermátócitos e células de Sertoli (CASTELLO 'N, 2003; GEIGERSEDER *et al.*, 2003; PERSSON *et al.*, 1990).

3.9 CÁLCIO COMO UMA MOLÉCULA SINALIZADORA

Normalmente, as concentrações intracelulares de Ca^{2+} livre são baixas, cerca de 0,1 μM ou menos. As concentrações de Ca^{2+} total na

célula são muito maiores, mas a maioria deste é sequestrado pela mitocôndria e o retículo endoplasmático, ou ainda, ficam ligados a proteínas citoplasmáticas. Aumentos transitórios de Ca^{2+} livre regulam muitos processos fisiológicos, incluindo a proliferação celular e a liberação de neurotransmissores. Moléculas de sinalização extracelulares interagem com receptores de superfície celular e conduzem a liberação de Ca^{2+} a partir do retículo endoplasmático por estimulação da síntese de um mensageiro intracelular: o IP_3 . Este composto permite a saída de Ca^{2+} para o citosol. No entanto, aumentos descontrolados nas concentrações de Ca^{2+} intracelular "livre" podem desencadear dano e morte celular (HALLIWELL *et al.*, 2007).

O conteúdo dos sinais mediados por Ca^{2+} pode ser determinado pela localização, frequência, período e amplitude dos picos de Ca^{2+} . Assim, a sequência temporal dos sinais do Ca^{2+} tem uma função regulatória em muitos processos fisiológicos. Em linfócitos B, por exemplo, a amplitude da oscilação de Ca^{2+} pode ser observada. Estes criam sinais de Ca^{2+} de alta e baixa amplitude, iniciados pelo mesmo sinal extracelular, que é a ligação do antígeno com o receptor da célula B (KRAUSS, 2003).

Como a concentração de Ca^{2+} no citosol deve ser baixa, existem mecanismos que mantêm este gradiente em concentrações normais. Isso pode se dar pela saída do íon de forma ativa por meio de bombas de Ca^{2+} presentes na membrana plasmática, no retículo endoplasmático e na mitocôndria. Existem pelo menos dois mecanismos distintos que bombeiam o cálcio para fora da célula (KHANNA *et al.*, 1988).

O primeiro deles é a bomba de Ca^{2+} -ATPase em que o Ca^{2+} é transportado contra um gradiente de concentração, ou seja, envolve consumo de energia com gasto de ATP. Esse mecanismo é regulado por proteínas Ca^{2+} -calmodulinas, proteínas ligantes ao Ca^{2+} e o sistema de troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, o qual utiliza um gradiente de Na^+ através da membrana, que é mantido pela atividade da bomba de Na^+ , para dirigir o efluxo de Ca^{2+} (CARAFOLI *et al.*, 1996; PETERSEN *et al.*, 1994).

Em contrapartida, uma variedade de canais é capaz de mediar o influxo de Ca^{2+} , os quais podem ser agrupados de acordo com o seu mecanismo de abertura:

- Canais operados por receptores, os quais são modulados pela ligação de agonistas/antagonistas;
- Canais operados por segundos mensageiros como nucleotídeos, DAG, entre outros;

- Canais operados por estoque que se abrem em resposta a diminuição da concentração de Ca^{2+} intracelular, denominado de entrada capacitativa de Ca^{2+} , o qual é mediado pela participação do retículo endoplasmático;
- Canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (CCDV), ativados por despolarização da membrana. Estes canais são classificados em tipo L, T, P, Q e R, os quais diferem entre si no modo de regulação, na cinética de ativação e na inativação via Ca^{2+} e sensibilidade a toxinas específicas;

(ALBERTS *et al.*, 2015; KRAUSS, 2003)

Neurotransmissores, hormônios e fatores de crescimento utilizam a via de sinalização do Ca^{2+} como rota para vários processos celulares, como secreção, síntese de segundos mensageiros, ativação de sistemas enzimáticos, transporte de açúcares e aminoácidos, modificações no citoesqueleto, proliferação celular e reações do metabolismo intermediário celular (ZAMONER *et al.*, 2007).

Há estudos que demonstram que a modulação das concentrações intracelulares de Ca^{2+} parece ser essencial para a reprodução em machos. Trabalhos realizados com bloqueadores de canais de Ca^{2+} demonstraram que a falta deste íon no meio intracelular, desencadeia um estresse oxidativo significativo, com diminuição nas concentrações de GSH, lipoperoxidação da membrana dos espermatozoides, alterações nas enzimas antioxidantes, redução na contagem de espermatozoides no epidídimo e na motilidade dos espermatozoides, alteração no índice de fertilidade com redução no tamanho da ninhada em ratos (MORAKINYO *et al.*, 2009; 2011).

3.9.1 Cálcio, ATP e o sistema reprodutor masculino

Os sinais de Ca^{2+} gerados pela ativação de receptores P2X e P2Y em células de Sertoli de ratos podem ser acoplados a mobilização de Ca^{2+} mitocondrial (BJELOBABA *et al.*, 2015). Em ratos e nas células de Leydig de ratos, o ATPe também aumenta o Ca^{2+} citosólico e a secreção de testosterona, sendo a secreção de testosterona dependente do influxo de Ca^{2+} sustentado pela ativação dos receptores P2Y (FORESTA *et al.*, 1996), indicando o seu papel modulador na produção de andrógenos através da ativação desses receptores.

Nas células de Sertoli, o ATPe aumenta as concentrações de Ca^{2+} citosólico e a secreção de esteroides, provavelmente por meio do influxo de $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ dependente dos receptores do tipo P2X₄ e P2X₇, bem como

mobilização de Ca^{2+} via receptores P2Y_1 e P2Y_2 (FORESTA *et al.*, 1995; KO *et al.*, 2003; ROSSATO *et al.*, 2001). O ATPe também aumenta o potencial de fertilização do esperma *in vitro* (ROSSATO *et al.*, 1999), presumivelmente através da ativação de canais de ATP condutores de Na^+ (FORESTA *et al.*, 1996).

Ko e colaboradores (2003) evidenciaram dados que revelam que os receptores P2X_1 e P2X_3 não ocasionaram um aumento perceptível nas concentrações de Ca^{2+} intracelular em células de Sertoli, via estimulação por um agonista específico, o α - β -metileno ATP. Em vez disso, o Bz-ATP, um agonista altamente potente e específico para os receptores do tipo P2X_7 , estimulou um aumento nas concentrações intracelulares de Ca^{2+} . Embora análises de RNA a partir de células de Sertoli isoladas tenham evidenciado a presença de receptores P2X_7 e P2X_4 , dados farmacológicos sugeriram que o P2X_7 , mas não o P2X_4 , está envolvido na mediação da resposta de Ca^{2+} em células de Sertoli via estimulação através do BzATP.

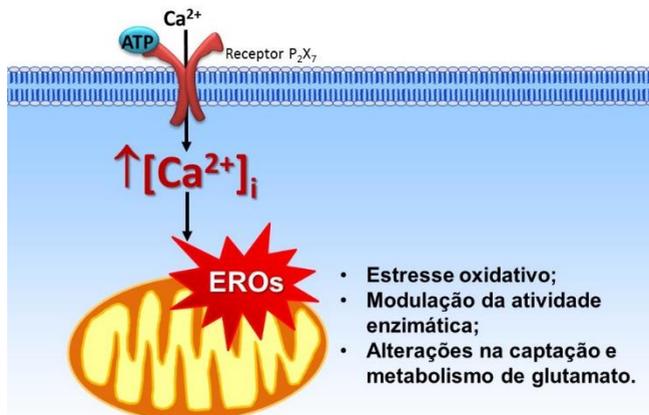
Veitinger e colaboradores (2011) demonstraram que as células de Sertoli são equipadas para responder a sinais de ATPe persistentes ou muito curtos. Além disso, as correntes mediadas pelo receptor P2X_2 desencadeiam uma despolarização de membrana substancial e potencialmente regenerativa (por exemplo, canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem) mostrando uma forte entrada retificada, que são moduladas por prótons e oligoelementos. Tanto zinco, como cobre potencializam as correntes induzidas pelo ATPe via P2X_2 . Curiosamente, as concentrações de zinco testiculares elevados são importantes para a reprodução masculina e a deficiência de zinco leva à disfunção gonadal e diminuição da espermatogênese (BEDWAL; BAHUGUNA, 1994).

A mobilização de Ca^{2+} desencadeada pela interação de purinas com seus respectivos receptores pode, dessa forma, proporcionar uma via eficaz para a manutenção da homeostase nas células de Sertoli no estágio do desenvolvimento. Vale ressaltar a participação da rede mitocondrial presente na célula de Sertoli, identificada como um componente-chave da sinalização mediada pelo Ca^{2+} , caracterizada como sendo um “kit de ferramentas” por Veitinger e colaboradores (2011), isso ocorre pelo fato de que estas mitocôndrias ramificadas e alongadas estendem-se desde a região perinuclear até áreas celulares distais. Essa localização perinuclear predominante foi demonstrada como refletindo uma posição estratégica capaz de impedir a propagação descontrolada de sinais de Ca^{2+} para o núcleo.

4 HIPÓTESE

Considerando a inconsistência e a carência de estudos referentes às ações mediadas pelo ATPe em concentrações milimolares em células testiculares, este estudo pretende demonstrar de que forma o ATPe, em elevadas concentrações, pode desencadear efeitos modulatórios em parâmetros bioquímicos importantes para a função fisiológica normal do testículo. Para tanto, esses mecanismos serão estudados em testículos de ratos imaturos, via interação desta purina com purinoceptores, dentre os quais, acredita-se que o mecanismo se dê via ativação do purinoreceptor P2X₇, devido a utilização de concentrações milimolares do ATPe. A fim de comprovar essa hipótese, foram estudadas as ações rápidas desta purina sobre o testículo de ratos de 15 dias de idade, avaliando-se diferentes parâmetros bioquímicos: influxo de ⁴⁵Ca²⁺, captação de [¹⁴C]-glutamato, atividade da enzima GS, da γ -GT e das aminotransferases (AST e ALT), atividade das enzimas envolvidas no sistema de defesa antioxidante, bem como concentrações de GSH, TBARS e proteína carbonilada, como também a viabilidade celular por meio da atividade da LDH liberada no meio extracelular. A figura 4 apresenta esquematicamente a hipótese deste estudo sugerindo que o ATPe possa induzir estresse oxidativo após a ativação de purinoceptores de superfície do tipo P₂X₇ e consequente influxo de Ca²⁺.

Figura 4. Representação esquemática da hipótese de efeito do ATPe em testículos de ratos imaturos.



Fonte: Do autor

5 METODOLOGIA

5.1 MATERIAIS

As substâncias radioativas, [$^{45}\text{Ca}^{2+}$]- CaCl_2 (sp. act. 321 KBq/mg Ca^{2+}) e [^{14}C]-glutamato (atividade específica 1,85 MBq) foram obtidas da “Du Pont NEN Products” (Boston, EUA), e o líquido de cintilação biodegradável Optiphase Hisafe III foi adquirido da Perkin Elmer (São Paulo, SP, Brasil). O sal dissódico de 5’ trifosfato de adenosina (ATP), a adenosina e os reagentes referentes às análises de biomarcadores de estresse oxidativo, todos os inibidores enzimáticos, antagonistas de receptores, bloqueadores de canais, substâncias antioxidantes, foram adquiridos da marca Sigma (St. Louis, MO, EUA). Os demais reagentes foram de grau analítico (P.A).

5.2 MÉTODOS

5.2.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos com 15 dias de idade obtidos no Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas e submetidos a um ciclo claro/escuro (12/12 horas), em sala climatizada com temperatura controlada, ração e água à vontade. Todos os animais foram monitorados e mantidos conforme as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e protocolo experimental foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC#PP00820).

5.2.2 Tratamento *in vitro*

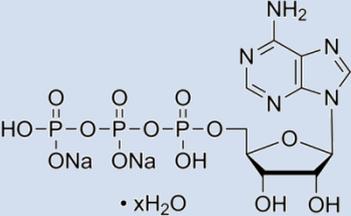
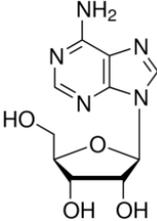
O ATP foi utilizado em modelo experimental de exposição *in vitro* com o intuito de avaliar as ações desta substância sobre células testiculares. Para tanto, foram utilizados ratos Wistar de 15 dias de idade (corresponde ao período pré-púbere do desenvolvimento sexual). No dia do experimento os animais foram eutanasiados por decapitação, os testículos foram removidos, descapsulados e fatiados. As porções

testiculares foram previamente incubadas por 15 min em solução salina balanceada de Hanks (HBSS = CaCl_2 1,29 mM, NaCl 136,9 mM, KCl 5,36 mM, MgSO_4 0,65 mM, Na_2HPO_4) a fim de estabilizar o tecido.

Essa etapa foi seguida de uma incubação de 30 minutos na presença ou ausência de 1mM de ATP. Nos experimentos em que se utilizaram inibidores enzimáticos, antagonistas de receptores, bloqueadores de canais ou substâncias antioxidantes, as fatias foram pré-incubadas novamente por 15 minutos na presença ou ausência de tais substâncias e posteriormente incubadas por 30 minutos na presença ou ausência de ATP. Ao final da incubação o tecido foi rapidamente homogeneizado em tampões específicos, de acordo com a determinação bioquímica a ser realizada.

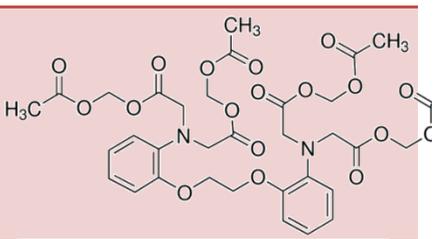
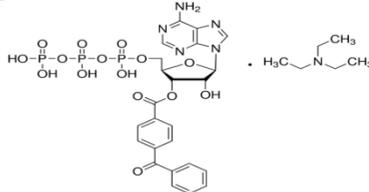
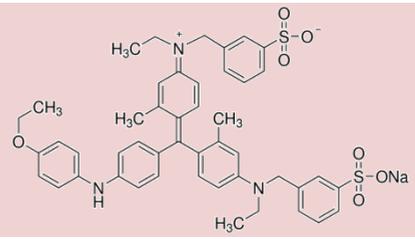
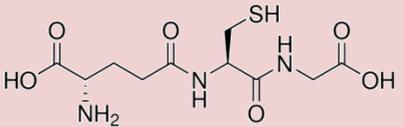
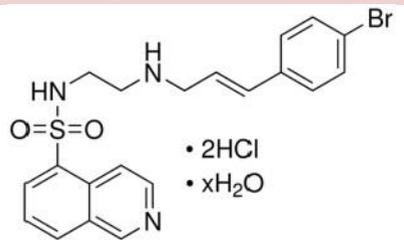
As purinas extracelulares ATP e Ado podem ser visualizadas na tabela 1 enquanto que os bloqueadores de canais e inibidores enzimáticos utilizados podem ser visualizados na tabela 2.

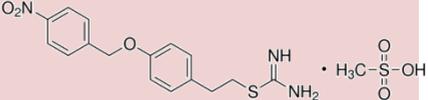
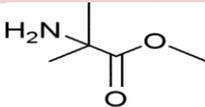
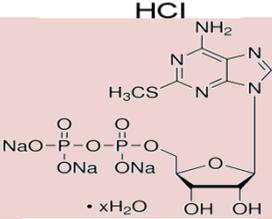
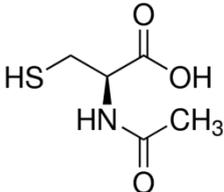
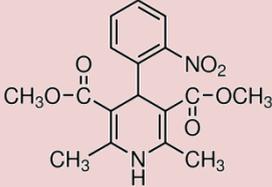
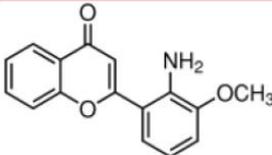
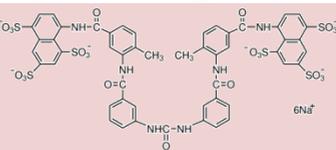
Tabela 1 – Estrutura do ATP e Ado.

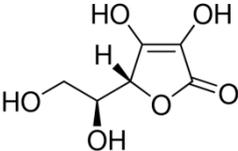
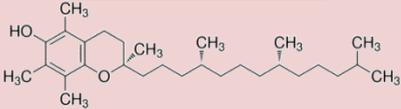
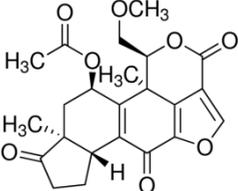
Composto	Estrutura Química
ATP	
Ado	

Fonte: www.sigmaaldrich.com/brazil

Tabela 2 – Compostos utilizados para estudar o mecanismo de ação do ATPe sobre células testiculares.

Composto	Ação Farmacológica	Estrutura química
BAPTA-AM	Quelante de Ca^{2+} intracelular	
BzATP	Agonista seletivo purinérgico P2X mais potente que o ATPe para receptores P2X ₇	
Coomassie brilliant blue G	Antagonista P2X ₇	
EGTA	Agente quelante de Ca^{2+}	-
GSH	Antioxidante	
H-89	Inibidor da PKA	

KB-R7943	Inibidor do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, NCX	
MeAIB	Substrato do sistema A do transporte de aminoácidos	
2MeSADP	Agonista/antagonista P2	
NAC	Antioxidante	
Nifedipine	Bloqueador dos CCDV-L	
PD 98059	Inibidor da MEK1/2, rota ERK 1/2	
Suramina	Antagonista P2X e P2Y	

Vitamina C	Antioxidante	
Vitamina E	Antioxidante	
Wortmanina	Inibidor específico da PI3K	

Fonte: www.sigmaaldrich.com/brazil

5.3 INFLUXO DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$

Porções testiculares de ratos 15 dias de idade foram pré-incubadas por 15 minutos a 34°C , em solução salina balanceada de Hanks (HBSS = CaCl_2 1,29 mM, NaCl 136,9 mM, KCl 5,36 mM, MgSO_4 0,65 mM, Na_2HPO_4). Seguida esta etapa, o meio foi trocado por HBSS fresco com $0,1 \mu\text{Ci/mL } ^{45}\text{Ca}^{2+}$ e o tecido incubado durante 30 minutos na ausência ou presença de 1 mM de ATP. Posteriormente, o $^{45}\text{Ca}^{2+}$ extracelular foi totalmente lavado com uma solução de cloreto de lantânio (NaCl 127,5 mM, KCl 4,6 mM, MgSO_4 1,2 mM, HEPES 10 mM, glicose 11 mM, LaCl_3 10 mM, pH 7,3 a 2°C) (BATRA; SJÖGREN, 1983) interrompendo o fluxo de cálcio na preparação. Após 10 min, a solução de cloreto de lantânio foi removida e 300 μL de NaOH 0,5 M foram adicionados a cada amostra. Alíquotas de 100 μL deste homogeneizado foram colocadas em líquido de cintilação para a determinação da radioatividade, que foi realizada em espectrômetro de cintilação líquida (Modelo LS 6500, Multi-Purpose Scintillation Counter-Beckman Coulter, Boston, USA), e uma alíquota de 5 μL foi usada para a dosagem de proteínas pelo método de Lowry e colaboradores (1951). Os resultados foram expressos como $\text{pmol } ^{45}\text{Ca}^{2+} / \mu\text{g}$ de proteína (ZAMONER *et al.*, 2007).

5.4 CAPTAÇÃO DE [¹⁴C]-GLUTAMATO

A captação de glutamato foi determinada porções testiculares de ratos de 15 dias de idade. Inicialmente o tecido foi pré-incubado por 15 minutos a 34°C, em solução salina balanceada de Hanks (HBSS = CaCl₂ 1,29 mM, NaCl 136,9 mM, KCl 5,36 mM, MgSO₄ 0,65 mM, Na₂HPO₄) a fim de estabilizar o tecido. Esta etapa permitiu o início da captação, sendo o meio trocado com a adição de 0,2 µCi [¹⁴C]-glutamato. As porções testiculares permaneciam por 10 minutos nesse meio de captação na ausência ou presença de 1 mM de ATP. A incubação foi interrompida com a retirada do meio de captação e lavagem por duas vezes com 200 µl de HBSS gelado. Para solubilização das porções testiculares, estas foram adicionadas em 300µL de uma solução de NaOH 0,1 M/SDS 0,01%. Após a completa solubilização, foi determinado o conteúdo intracelular de glutamato pela avaliação de cintilação líquida. A captação de glutamato foi corrigida para a união não-específica em ensaios realizados na ausência de íons sódio, sendo este sal substituído por cloreto de colina. Uma alíquota de 5 µL foi usada para a dosagem de proteínas pelo método de Lowry e colaboradores (1951). Os resultados foram expressos como nmol [¹⁴C] - glutamato/µg proteína/min.

5.5 CONTEÚDO DE GLUTATIONA

Para determinar o conteúdo de GSH, as fatias de testículos foram pesadas e homogeneizadas em solução de ácido tricloroacético 12%, (TCA 12%) na proporção de 1:10 (p/v). Utilizou-se uma alíquota de 5 µL para a dosagem de proteínas pelo método de Lowry. As determinações foram realizadas com o sobrenadante após a centrifugação do homogeneizado (5000xg durante 5 minutos). Realizaram-se as análises em duplicata, e mantidas em gelo durante todo o ensaio. As concentrações de glutathiona foram determinados segundo o método descrito por Beutler *et al.* (1963), que é baseado na reação da GSH com DTNB (5,5'-Ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) formando um ânion conjugado, TNB (ácido tionitrobenzóico) de cor amarelada, que é mensurável em 412 nm. Para a realização da técnica, uma alíquota de 50 µL da amostra foi acrescentada na cubeta contendo 950 µL de tampão fosfato 0,2 M pH 8,0, seguida da adição de 100 µL de DTNB 2,5 mM. Após cerca de 2 min obtém-se a máxima formação de TNB, que foi

medido por espectrofotometria. Os resultados foram expressos como conteúdo de GSH em $\mu\text{mol.g}^{-1}$.

5.6 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

As porções testiculares foram pré-incubadas por 15 minutos em HBSS, e posteriormente incubadas durante 30 minutos na presença ou ausência de 1 mM de ATP.

5.6.1 γ -Glutamyl-Transferase

Após a incubação das fatias de testículos na presença ou ausência de ATP (1 mM), inibidores de vias de sinalização e/ou bloqueadores de canais, as fatias foram homogeneizadas em 300 μL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5, e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry e colaboradores (1951). A atividade da γ -GT foi determinada usando-se a técnica modificada descrita por Orłowsky e Meister (1963), utilizando L- γ - glutamil-p-nitroanilida como substrato e glicilglicina como molécula aceptora.

Alíquotas do homogeneizado foram incubadas com o substrato enzimático por 150 minutos em banho-maria, e a reação enzimática foi boqueada pela adição de ácido acético. As absorbâncias das amostras foram determinadas num leitor de placas (Tecan Infinite[®] 200 PRO) a 530nm. Os resultados foram expressos como U/L/ μg proteína.

5.6.2 Glutamina Sintetase

A fim de avaliar a atividade da enzima glutamina sintetase, fatias de testículo foram homogeneizadas em 150 μL de tampão de lise (imidazol 20 mM; KCl 150 mM; EDTA 0,1 mM – pH 6,8). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi separado. 50 μL deste sobrenadante foi adicionado em 100 μL de imidazol-HCl 80 mM, pH 7,0 (imidazol-HCl 80 mM, glutamina 30 mM, MnCl_2 3 mM, hidroxilamina-HCl 30mM, arseniato de sódio 20 mM, ADP 4 mM). Após 30 minutos de incubação a 37°C a reação foi parada por adição de 200 μL de uma mistura contendo FeCl_3 3,7mM; Ácido tricloroacético 1,2 M; HCl 10 M e água. O produto da reação, γ -glutamilhdroxamato, foi mensurado a 540 nm utilizando um leitor de ELISA e convertido para a quantidade de produto formado por comparação com uma curva padrão. A atividade enzimática foi expressa

como mM hidroxamato/mg proteína (SHAPIRO; STADTMAN, 1970; COSTA *et al.*, 2012).

5.6.3 Glicose-6-fosfato desidrogenase

Para o ensaio da enzima G6PD, as fatias de testículos foram homogeneizadas em tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 7,4, e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951). Uma alíquota do homogeneizado foi incubada na presença de NADP⁺ levando a oxidação da glicose-6-fosfato a 6-fosfogliconato. O NADPH produzido foi quantificado de modo cinético a 570 nm durante 10 minutos. Os resultados foram calculados pela avaliação do aumento da densidade óptica por minuto (declínio) da amostra contra o "declínio" da atividade enzimática do padrão de G6PD. Os resultados foram expressos como U/ μ g proteína.

5.6.4 Alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase

As fatias foram homogeneizadas em 300 μ L de tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 7,4, e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry e colaboradores (1951), sendo que a atividade das enzimas AST e ALT foram determinadas através da utilização de Kits colorimétricos (Gold Analisa[®]), adaptados a partir das instruções do fabricante. Os resultados foram expressos como U/L/mg de proteína.

Na reação, a AST catalisa a transferência do grupo amina do substrato ácido-L-aspártico para o ácido alfa-cetogutárico com formação de glutamato e oxaloacetato. O oxaloacetato formado reage com a 2-4-dinitrofenilhidrazina, formando a hidrazona. A ALT catalisa a transferência do grupo amina do substrato L-alanina para o ácido alfa-cetogutárico com formação de glutamato e piruvato. O piruvato formado reage com a 2-4-dinitrofenilhidrazina também formando a hidrazona. A partir daí, ambas as reações adquirem coloração máxima pela adição de hidróxido de sódio, e a intensidade da coloração (leitura em 505nm) é proporcional à atividade enzimática da amostra.

5.7 VIABILIDADE CELULAR - ATIVIDADE DA LDH LIBERADA NO MEIO EXTRACELULAR

A atividade da LDH no meio extracelular foi medida através de um método colorimétrico (leitura a 500 nm) utilizando-se um "kit"

comercial (Dolles®). A atividade da LDH foi determinada através da mensuração da oxidação do NADH e os resultados foram expressos como U/L/mg de proteína. A metodologia foi adaptada a partir das instruções do fabricante.

5.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Para a determinação dos níveis dos marcadores de danos oxidativos (TBARS e proteína carbonilada), bem como da atividade das enzimas antioxidantes CAT, GPx, GR e GST, as porções testiculares foram pesadas, pré-incubados em HBSS e posteriormente incubados na presença ou ausência de 1mM de ATP por 30 min. Após a incubação, as fatias foram homogeneizadas em uma solução contendo tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4; 0,1% Triton x100 e NaCl 150 mM, (1:20 p/v). Uma alíquota foi usada para a dosagem de proteínas pelo método de Lowry e colaboradores (1951). As determinações enzimáticas foram realizadas usando-se o sobrenadante após centrifugação do homogeneizado (5.000 x g por 5 min). Todas as análises das enzimas antioxidantes (CAT, GPx, GR e GST) foram determinadas em triplicatas.

5.8.1 Catalase

A atividade da CAT foi determinada segundo o método descrito por Aebi (1984), que é baseado na velocidade de degradação do peróxido de hidrogênio (10mM) em tampão fosfato 50mM pH 7,0. Adicionou-se 2mL desta solução na cubeta, com acréscimo de 20μL da amostra, em seguida realizou-se leitura da queda da absorbância em 240nm durante 30 segundos. Os valores foram expressos em $\text{mmol.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

5.8.2 Glutathiona peroxidase

Para a análise enzimática de GPx o método de Flohé e Gunzler (1984) foi utilizado, no qual a reação é baseada na redução de terc-butilhidroperóxido (t-BuOOH) pela oxidação de GSH e formação de GSSG, catalisada pela GPx, e conseqüente regeneração de GSH através da enzima GR, com oxidação de NADPH em 340 nm. Portanto, a velocidade de oxidação do NADPH é proporcional à atividade de GPx

na amostra. Para a realização da técnica, foi preparado um meio de reação contendo 25 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0), 8,6 mg de NADPH, 10 mL de ácido dietilenotriaminopentacético (DPTA) a 5 mM, 15mL de água destilada, 24 mg de GSH, e 5 U de GR, no momento do ensaio. Em seguida, foram adicionados 10 μ L de t-BuOOH e 10 μ L de amostra em 1 mL de um meio de reação na cubeta. Os valores foram expressos em $\mu\text{mol.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

5.8.3 Glutationa redutase

Determinou-se a atividade da GR pelo método de Calberg e Mannervick (1985), o qual verificou em 340 nm a taxa de oxidação do NADPH devido à formação de GSH, a partir da GSSG, pela ação desta enzima presente na amostra. Um meio de reação contendo tampão fosfato 0,1 M pH 7,0; 8,6 mg de NADPH; 30,6 mg de glutaciona oxidada e DPTA 5mM foi adicionado na cubeta (0,95 mL), e a adição de 50 μ L de amostra deu início a reação que foi monitorada durante 3 minutos, gerando uma curva decrescente. Os valores da atividade desta enzima foram também expressos em $\mu\text{mol.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

5.8.4 Glutationa S-transferase

A atividade da GST foi determinada por espectrofotometria de acordo com Habig e colaboradores (1976). A reação baseia-se na capacidade da GST em conjugar GSH no substrato, formando uma substância mensurável em 340nm, monitorada durante 3 minutos. A amostra foi adicionada a um meio contendo 10 μ L de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 0,1M (CDNB) (substrato), 10 μ L de GSH 0,1M e 970 μ L de tampão fosfato 0,1M pH 7.0, além da cubeta de referência, na qual foram adicionados os mesmos reagentes, com exceção da amostra. Os valores foram expressos em $\mu\text{mol.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

5.9 DETERMINAÇÃO DOS MARCADORES DE DANOS OXIDATIVO

5.9.1 Lipoperoxidação tecidual – TBARS

O malondialdeído (MDA), produto da peroxidação lipídica, reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) formando um pigmento rosa que pode ser medido por espectrofotometria (OHKAWA *et al.*, 1979; BIRD *et al.*,

1984). As concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram medidos em fatias de testículo, homogeneizadas em tampão fosfato 0,02M pH 7,4 (1:20, p:v), seguido por centrifugação a 5.000 x g durante 5 minutos. A uma alíquota de 100µL do sobrenadante foi acrescentado 1mL de TCA 12% e agitado em vórtex. Posteriormente, foi adicionado 900µL de tampão Tris-HCl 0,06M pH 7,4 e 1 mL TBA 0,73%, novamente agitado em vórtex e levado para aquecimento por 1 hora a 100°C. Após este período as amostras foram resfriadas em banho de gelo e centrifugadas a 5000 xg por 5 minutos. A reação colorimétrica das amostras foi medida em espectrofotômetro a 535nm. Os resultados foram expressos como nmol de MDA/g⁻¹ de proteína.

5.9.2 Proteína Carbonilada

O dano oxidativo a proteínas por carbonilação foi determinado no homogeneizado do hipocampo pelo método descrito por Levine e colaboradores (1990). Inicialmente, foram adicionados 100 µL da amostra em 600µL de DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina) 10 mM preparado em solução de HCl 2N, seguido de uma incubação durante 1 hora à temperatura ambiente protegido da luz, com agitação contínua. Após, foi adicionado 600µL de TCA 20%, com agitação e banho de gelo durante 10 min, seguido de centrifugação (5 minutos a 10.000 x g), e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi lavado por três vezes consecutivas (centrifugação por 5 minutos a 10.000 x g), com 800 µL de etanol-acetato de etila (1:1 v/v). Finalmente, o excesso de etanol-acetato de etila foi retirado com auxílio de um cotonete e foram adicionados 900µL de guanidina 6,0 M preparada em solução de KH₂PO₄ 20 Mm, seguido de incubação em banho-maria a 37°C com agitação contínua por 60 min, permitindo a posterior leitura a 360nm. A concentração de proteína carbonilada foi expressa em nmol.mg⁻¹ proteína.

5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.) de determinações feitas em triplicata. As comparações estatísticas foram realizadas através da análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Bonferroni. Também foi utilizado para avaliação de algumas amostras o teste “t” de Student. As diferenças

encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para um “p” igual ou menor que 0,05.

6 RESULTADOS

Neste estudo empregou-se um modelo experimental de tratamento *in vitro*, em que foram incubadas porções testiculares na presença de ATPe e Ado. Foram utilizados ratos imaturos, em fase de desenvolvimento sexual, com 15 dias de idade, a fim de identificar, prioritariamente, qual o papel do ATPe neste período. As porções testiculares dos animais foram incubados durante 30 minutos na presença ou ausência de ATPe em uma concentração de 1mM com o intuito de avaliar algum efeito modulatório desta molécula no desenvolvimento testicular. Para tanto, foram determinados o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, as concentrações de GSH e TBARS, assim como o dano oxidativo às proteínas e a atividade das enzimas GPx, GR, GST, G6PD, CAT e γ -GT, com ênfase a investigação do mecanismo de ação do ATPe sobre a atividade desta última enzima. Ainda, investigou-se a captação de [^{14}C]-glutamato e a viabilidade celular por meio da liberação de LDH citosólica para o meio extracelular, bem como realizou-se a mensuração da atividade das enzimas AST, ALT e GS, com o intuito de se compreender o possível papel do ATPe no metabolismo do aminoácido excitatório glutamato.

O ATP foi utilizado em uma concentração de 1mM, isso se deve ao fato de que já se tem estabelecido na literatura que esta concentração é capaz de estimular receptores do subtipo P2X₇, os quais já foram demonstrados na membrana das células testiculares, especialmente, em células de Sertoli na referida concentração (KO *et al.*, 2003; VEITINGER *et al.*, 2011).

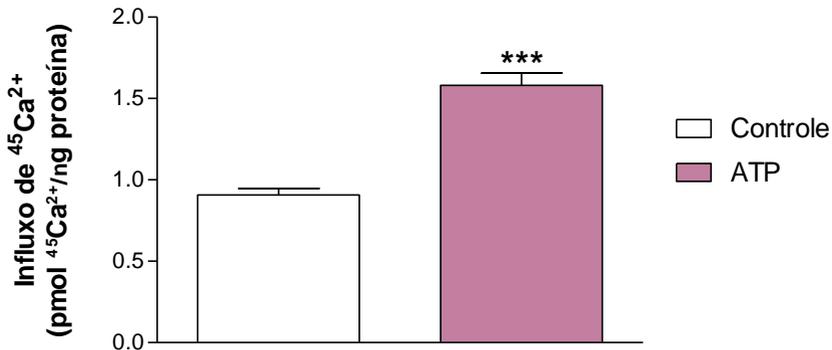
Inicialmente, realizou-se uma curva de tempo-resposta de exposição ao ATPe no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ do ATPe. Os resultados mostraram que os tempos no qual o ATPe apresenta efeitos máximos foram após 1 e 30 minutos (dados não mostrados). Sendo assim, os experimentos subsequentes foram realizados após 1 ou 30 minutos de exposição do tecido ao ATPe na concentração de 1mM.

6.1 INFLUXO DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$

Com o intuito de investigar o possível efeito mediado pelo ATPe no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em células testiculares de ratos imaturos, testículos foram expostos ao ATPe por 1 minuto (figura 5). Os resultados

demonstraram que a exposição ao ATPe por 1 min induz ao aumento no influxo e acúmulo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$.

Figura 5 - Efeito do ATPe no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em testículos de ratos imaturos.



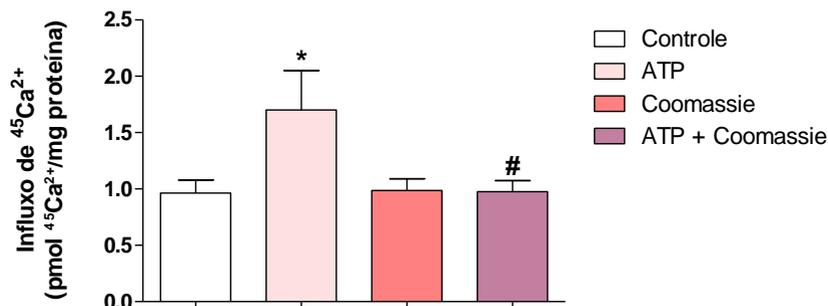
Porções testiculares foram incubados durante 1 minuto na presença ou ausência de ATPe (1mM). Os resultados foram reportados como média \pm E.P.M. de 8 animais e expressos como pmol $^{45}\text{Ca}^{2+}$ /mL/ μg de proteína. Análise estatística: Teste “t” de Student. *** $p < 0,001$, comparado com o controle.

Fonte: do autor

6.1.1 Envolvimento dos purinoceptores do subtipo P2X₇ no mecanismo de ação do ATPe no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$

Com o objetivo de avaliar o envolvimento dos purinoceptores do subtipo P2X₇ no mecanismo de ação do ATPe em células testiculares, utilizou-se um antagonista específico para este receptor, o *Coomassie brilliant blue G* (1 μM) na presença e ausência de ATPe (1mM). Os resultados evidenciaram que o ATPe aumenta o influxo e o acúmulo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ após 1 minuto de incubação, enquanto que na presença do antagonista seletivo para o receptor P2X₇ e de ATPe, esse efeito no aumento de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ é prevenido, o que pode evidenciar o envolvimento deste receptor no aumento das concentrações intracelulares de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ mediado pelo ATPe em células testiculares (figura 6).

Figura 6 – Envolvimento do P2X₇ no mecanismo de ação mediado pelo ATPe na captação de ⁴⁵Ca²⁺ em testículos de ratos imaturos.



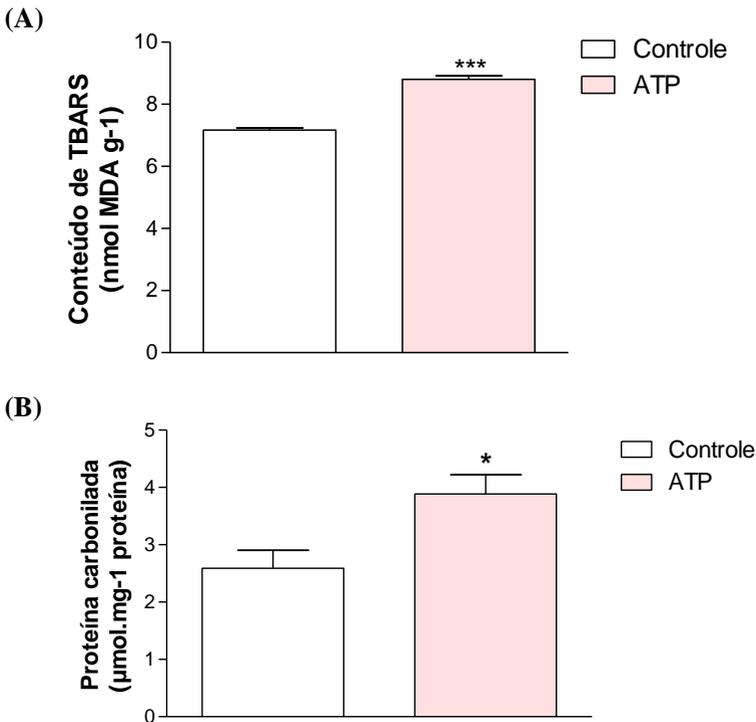
Porções testiculares foram pré-incubados por 15 minutos em HBSS, posteriormente incubados por 30 min na presença de 0,1 µCi/mL de ⁴⁵Ca²⁺, sendo que nos últimos 15 min de incubação foi adicionado ou não 1µM de *Coomassie brilliant blue G* (antagonista P2X₇). Em seguida, os testículos foram incubados na presença ou ausência de 1mM de ATPe por 1 min. Os resultados foram reportados como a média ± E.P.M. de 8 animais e expressos em pmol ⁴⁵Ca²⁺/mg de proteína. Diferenças estatisticamente significativas a partir do controle, foram determinadas através do teste ANOVA de uma via seguida de teste de comparações múltiplas de Bonferroni: **p* <0,05 comparado com o grupo controle; #*p*<0,05 comparado com o grupo ATP.

Fonte: do autor

6.2 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS ENVOLVIDOS NO ESTRESSE OXIDATIVO

Com o objetivo de avaliar um possível mecanismo de indução de estresse oxidativo mediado pelo ATPe em testículos, parâmetros que podem evidenciar o estresse oxidativo, como peroxidação lipídica e oxidação de proteínas foram avaliados. Um aumento significativo nas concentrações de TBARS e proteína carbonilada foram evidenciados nos grupos expostos ao ATPe, quando comparado com o controle (figura 7A e 7B).

Figura 7 - Efeitos do ATPe na peroxidação lipídica (A) e na carbonilação de proteínas (B) em testículos de ratos imaturos.



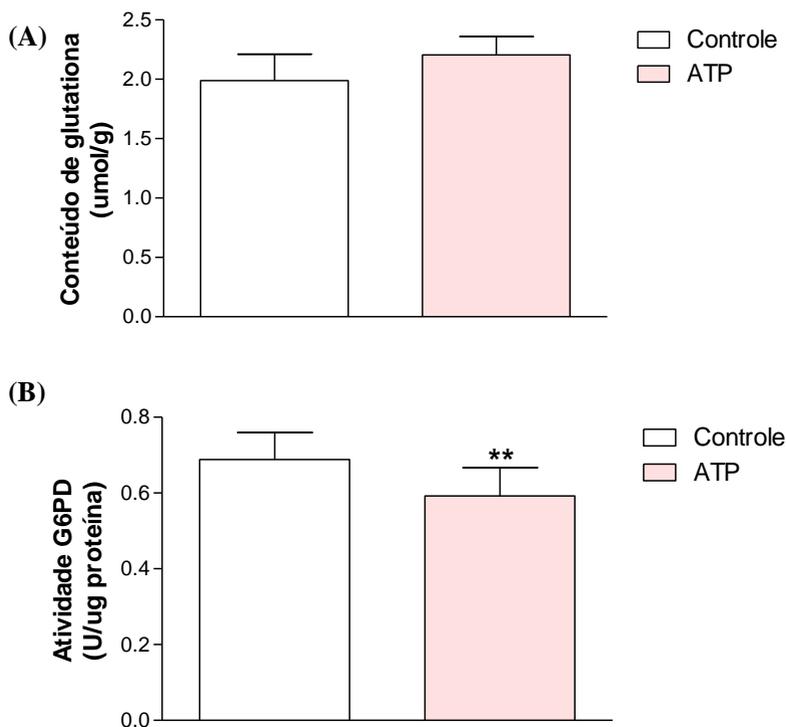
Porções testiculares foram incubados na presença ou ausência de 1mM de ATP por 30 min. Os resultados da mensuração das concentrações de TBARS e proteína carbonilada foram expressos como a média \pm E.P.M. de 8 animais. Análise estatística: teste “t” de Student. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ comparado com o controle.

Fonte: do autor

A participação do ATPe como uma molécula mediadora de eventos oxidativos ainda não está estabelecida; entretanto, esses eventos podem corroborar o aumento das concentrações intracelulares de $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Nesse contexto, os resultados ainda são controversos na literatura, e isso se dá, especialmente, pela carência de estudos com os nucleotídeos de adenina extracelular no tecido reprodutor. Sendo assim, foram avaliados vários parâmetros do metabolismo oxidativo, tais como as defesas

antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas. Avaliou-se o conteúdo de GSH, o qual não se alterou mediante exposição ao ATPe (figura 8A). Por outro lado, quando referente à atividade da G6PD no testículo de ratos imaturos, observou-se que a incubação com ATPe resultou em diminuição na atividade desta enzima (figura 8B).

Figura 8 – Efeito do ATPe no conteúdo de GSH (A) e na atividade da G6PD (B) em testículos de ratos imaturos.

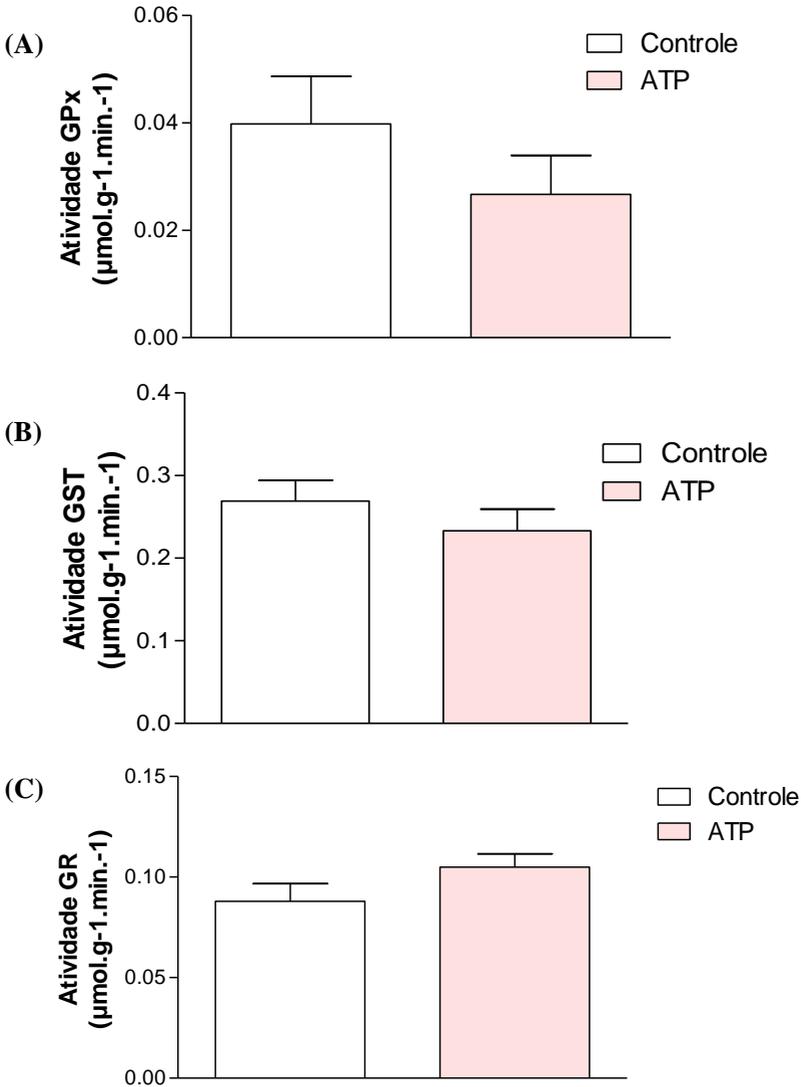


Os resultados foram reportados como a média \pm E.P.M. de 8 animais. Diferenças estatisticamente significativa a partir do controle, foram determinadas através do teste “t” de Student: ** $p < 0,01$, quando comparado ao grupo controle.

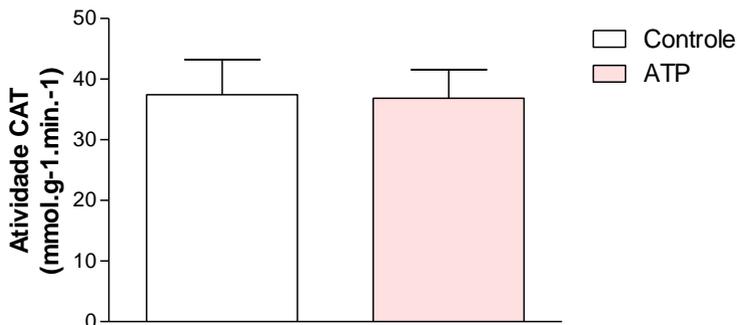
Fonte: do autor

A figura 9 mostra que a exposição ao ATPe não altera a atividade das enzimas GPx, GST, GR e CAT, as quais estão envolvidas nas defesas antioxidantes (figura 9A, B, C e D).

Figura 9 – Efeito do ATPe na atividade da GPx (A), GST (B), GR (C) e CAT (D) em testículos de ratos imaturos.



(D)

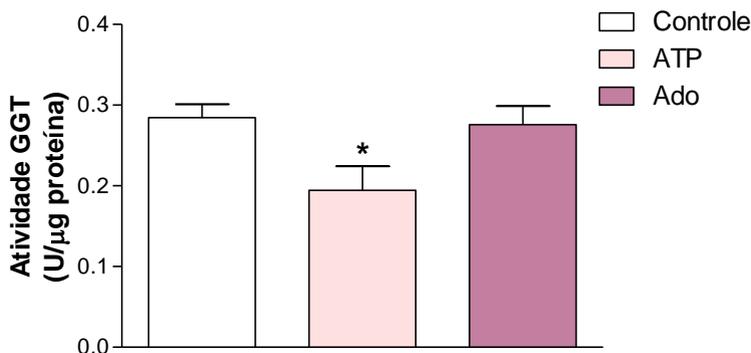


Porções testiculares foram incubados na presença ou ausência de 1mM de ATP por 30 min. Os resultados da mensuração dos níveis de GPx, GST, GR e CAT foram expressos como a média \pm E.P.M. de 8 animais. Análise estatística: teste “t” de Student.

Fonte: do autor

Considerando que a γ -GT é a enzima passo-limitante para o “turnover” da GSH, e que alterações na oxidação de proteínas e peroxidação lipídica podem estar relacionadas com insultos oxidativos, talvez mediados pelo ATPe, investigou-se o efeito deste nucleotídeo na modulação da atividade desta enzima em testículos de ratos imaturos. Considerando-se que a hidrólise do ATP via ação das ectonucleotidases pode levar a formação de Ado, investigou-se a seletividade do ATP na modulação da atividade da γ -GT incubando-se os testículos com ATP ou Ado. Os resultados evidenciaram que o ATPe diminui a atividade da γ -GT, enquanto que a Ado não altera a atividade desta enzima (figura 10), sugerindo o envolvimento de receptores para o nucleotídeo e não para o nucleosídeo na modulação da atividade γ -GT em testículos de ratos.

Figura 10 – Efeito do ATPe e da Ado na atividade da γ -GT em testículos de ratos imaturos.



Porções testiculares foram incubados por 30 minutos na presença ou ausência de 1mM de Ado e/ou de 1mM de ATPe. Os resultados foram reportados como a média \pm E.P.M. de 8 animais. Diferenças estatisticamente significativas a partir do controle, foram determinadas através do teste ANOVA de uma via seguida de teste de comparações múltiplas de Bonferroni: * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle; # $p < 0,05$ comparado com o grupo ATPe.

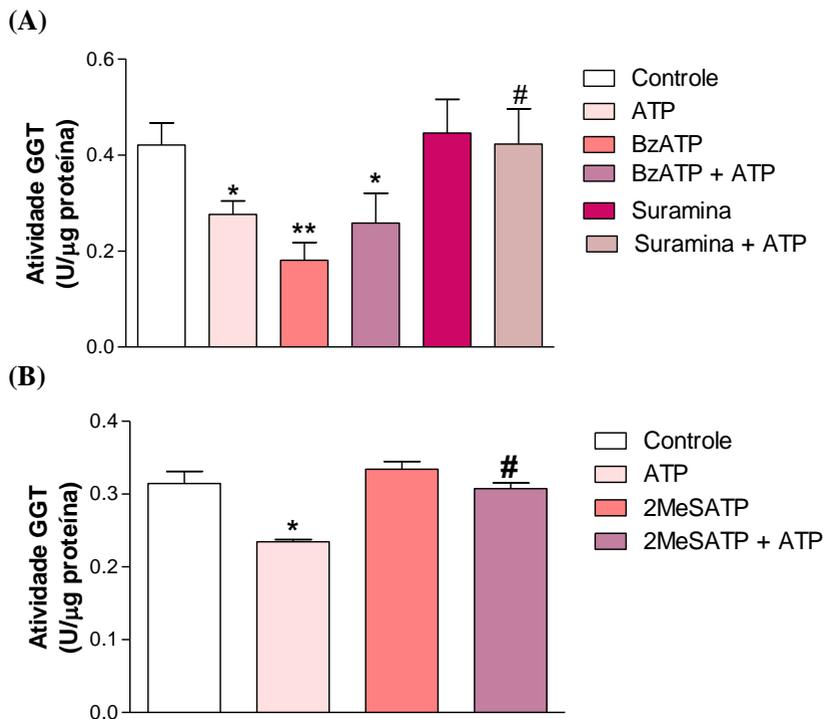
Fonte: do autor

6.3 MECANISMOS ENVOLVIDOS NA AÇÃO DO ATPe NA MODULAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA γ -GT

Dada a importância da γ -GT no estabelecimento da homeostase na célula, investigou-se o mecanismo de ação envolvido na diminuição da atividade da γ -GT mediado pelo ATPe. Para tanto, foram utilizados antioxidantes, quelantes de Ca^{2+} , bloqueadores de canais, agonistas e antagonistas de receptores P2X e P2Y, bem como inibidores de vias de sinalização.

Com o intuito de verificar a participação de receptores do tipo P2X e/ou P2Y no mecanismo de ação do ATPe, testículos de ratos imaturos foram expostos durante a incubação e a pré-incubação aos antagonistas e a um agonista destes receptores (2MeSATP e Suramina, como antagonistas P2X e P2Y, e o BzATP como agonista seletivo P2X e mais potente que o ATPe nos receptores P2X₇) (figura 11A e B).

Figura 11 - Envolvimento dos receptores de membrana do tipo P2X e P2Y (A e B) no mecanismo de ação do ATPe na atividade da γ -GT em testículo de ratos imaturos.



Porções testiculares foram pré-incubadas por 15 minutos na presença ou ausência de BzATP (A) (agonista P2X) 100 μ M; Suramina (A) (antagonista P2X e P2Y) 10 μ M e; 2MeSATP (B) (antagonista P2X e P2Y) 10 μ M; e incubadas 30 minutos com ou sem 1mM de ATPe. Os resultados foram reportados como a média \pm E.P.M. de 8 animais. Diferenças estatisticamente significativas a partir do controle, foram determinadas através do teste ANOVA de uma via seguida de teste de comparações múltiplas de Bonferroni: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle; # $p < 0,05$ comparado com o grupo ATP.

Fonte: do autor

Observou-se que os antagonistas previnem a diminuição da atividade da γ -GT mediada pelo ATPe, indicando que estes receptores podem estar envolvidos no mecanismo pelo qual o ATPe atua. Quando referente ao agonista P2X, observou-se que este sozinho também

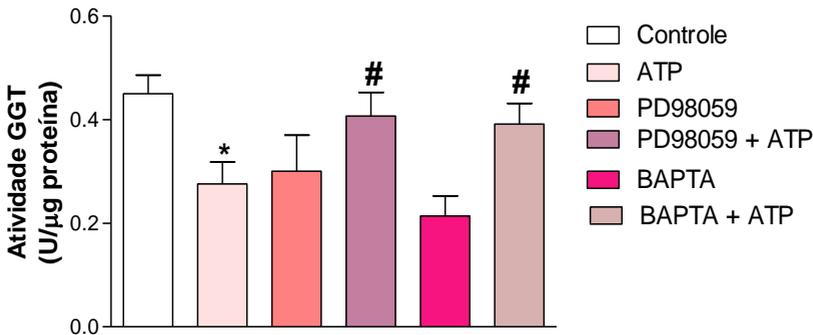
diminui a atividade da γ -GT, e quando na presença do ATPe, a atividade da γ -GT é muito similar ao ATPe sozinho, isso se dá devido ao fato de que ambos, provavelmente, atuam através dos mesmos receptores (P2X₇) (figura 11A e B).

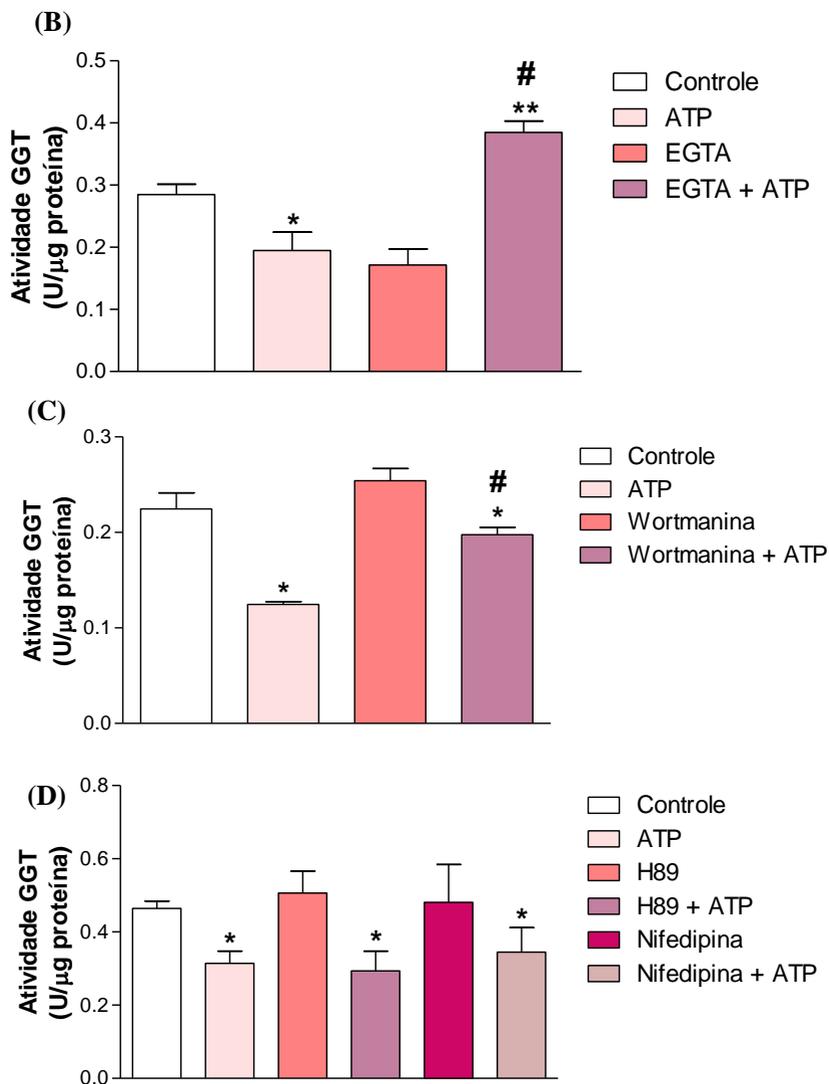
Na tentativa de compreender a relação entre a atividade da γ -GT e as flutuações nas concentrações de cálcio intracelular, utilizou-se um bloqueador de CCDV do tipo L (a nifedipina -10 μ M), enquanto que o BAPTA-AM (50 μ M) e o EGTA (2mM) foram utilizados como agentes quelantes de Ca²⁺ intracelular e extracelular, respectivamente. Os resultados demonstraram que possivelmente o ATPe diminui a atividade da γ -GT via um mecanismo dependente de Ca²⁺, como observado pelo aumento da atividade da γ -GT quando houve a co-incubação com EGTA e BAPTA-AM, mas esse mecanismo não se dá via CCDV do tipo L. Esses resultados evidenciaram uma possível relação entre o cálcio intracelular e o mecanismo de ação do ATPe (figura 12 A, B).

Por outro lado, com o intuito de avaliar possíveis vias de sinalização envolvidas no mecanismo de ação do ATPe, foram utilizados inibidores da PI3K, ERK1/2 e PKA (Wortmanina - 1mM, PD98059 - 10 μ M e, H89 - 10 μ M, respectivamente). Os resultados evidenciaram que o efeito do ATPe é dependente da ativação da PI3K e ERK, mas independente de PKA (figura 12 C e D).

Figura 12 - Envolvimento do cálcio e da PI3K e ERK no mecanismo de ação do ATPe sobre a atividade da γ -GT no testículo de ratos imaturos.

(A)





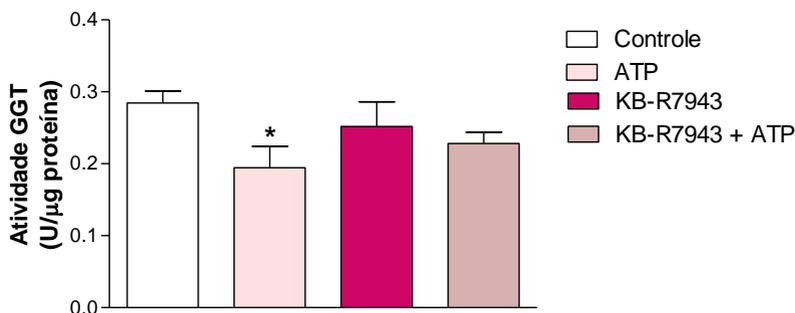
Porções testiculares foram pré-incubadas por 15 minutos na presença ou ausência de PD98059 (A) (inibidor da MEK1/2 ERK1/2) 10 μ M; BAPTA-AM (A) (quelante de cálcio intracelular) 50 μ M; EGTA (B) (quelante de cálcio extracelular) 2mM e; Wortmanina (C) (inibidor da PI3K) 1mM e.; H89 (D) (inibidor da PKA) 10 μ M; Nifedipina (D) (bloqueador de CCDV-L) 10 μ M; e incubadas 30 minutos com ou sem 1mM de ATPe. Os resultados foram reportados como a média \pm E.P.M. de 8 animais. Diferenças estatisticamente

significativas a partir do controle, foram determinadas através do teste ANOVA de uma via seguida de teste de comparações múltiplas de Bonferroni: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle; # $p < 0,05$ comparado com o grupo ATP.

Fonte: do autor

Ainda referente ao Ca^{2+} , utilizou-se um inibidor específico da proteína trocadora de Na^+/Ca^{2+} , NCX (do inglês *sodium calcium exchanger*), a fim de identificar se este trocador poderia estar envolvido no mecanismo de ação do ATPe na modulação da atividade da γ -GT. Sendo assim, o inibidor deste trocador, o KB-R7943 (0,1 μ M), foi utilizado para mensurar a γ -GT. Os resultados evidenciaram que, provavelmente, este trocador pode estar parcialmente envolvido no mecanismo de ação do ATPe na modulação da atividade da γ -GT (figura 13).

Figura 13 - Envolvimento do NCX no mecanismo de ação do ATPe sobre a atividade da γ -GT no testículo de ratos imaturos.

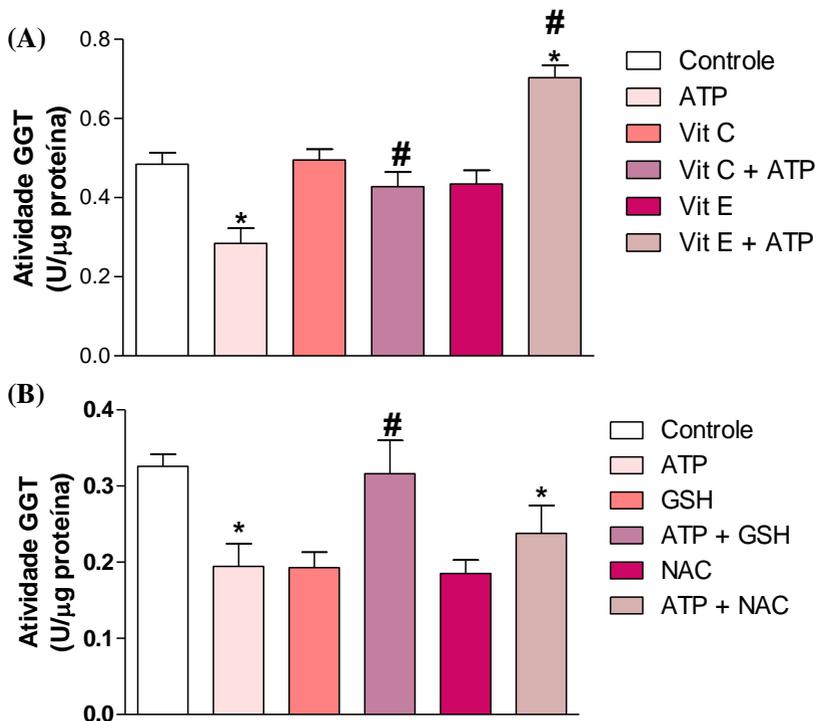


Porções testiculares foram pré-incubadas por 15 minutos na presença ou ausência de KB-R7943 (inibidor do trocador de Na^+/Ca^{2+}) 0,1 μ M; e incubadas 30 minutos com ou sem 1mM de ATPe. Os resultados foram reportados como a média \pm E.P.M. de 8 animais. Diferenças estatisticamente significativas a partir do controle, foram determinadas através do teste ANOVA de uma via seguida de teste de comparações múltiplas de Bonferroni: * $p < 0,05$; Fonte: do autor

A fim de investigar o envolvimento do estresse oxidativo no efeito do ATPe inibindo a atividade da γ -GT, foram utilizados os antioxidantes Trolox® (100 μ M), o ácido ascórbico (100 μ M), a GSH (1mM) e a N-acetilcisteína (NAC) (500 μ M) nos períodos de pré-incubação e incubação. Os resultados evidenciaram que o Trolox®, o ácido

ascórbico e a GSH são capazes de reverter a inibição da atividade da γ -GT mediada pelo ATPe aos níveis normais, enquanto que a NAC não altera a atividade da γ -GT quando co-incubada com o ATPe (figura 14A e B).

Figura 14 - Envolvimento de antioxidantes no mecanismo de ação do ATPe sobre a atividade da γ -GT no testículo de ratos imaturos.



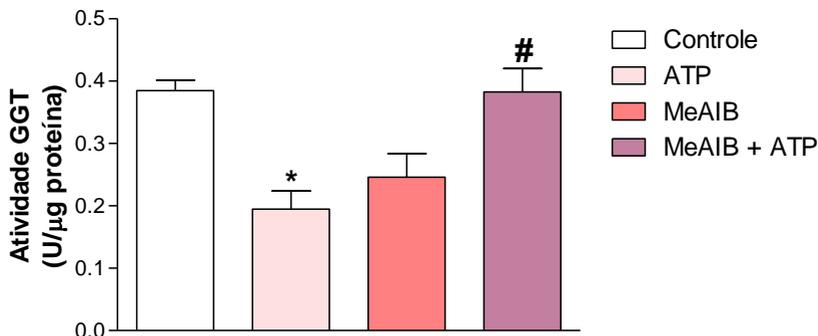
Porções testiculares foram pré-incubadas por 15 minutos na presença ou ausência de Trolox® (A) (antioxidante) 100 μ M; Ácido ascórbico (A) (antioxidante) 100 μ M; GSH (B) (antioxidante) 1mM e; NAC (C) (antioxidante) 500 μ M; e incubadas 30 minutos com ou sem 1mM de ATPe. Os resultados foram reportados como a média \pm E.P.M. de 8 animais. Diferenças estatisticamente significativas a partir do controle, foram determinadas através do teste ANOVA de uma via seguida de teste de comparações múltiplas de Bonferroni: * $p < 0,05$; quando comparado ao grupo controle; # $p < 0,05$ comparado com o grupo ATP.

Fonte: do autor

6.3.1 Influência do transporte de aminoácidos neutros no mecanismo de ação do ATPe

A enzima γ -GT está envolvida no metabolismo da GSH extracelular, proporcionando aminoácidos precursores para a síntese *de novo* de GSH intracelular. Embora a atividade da γ -GT esteja diminuída em testículos imaturos tratados com ATPe, os resultados evidenciaram que não houve alteração nas concentrações de GSH, e devido a isso, avaliou-se poderia haver alguma alteração no sistema de transporte de aminoácidos “A” por meio da utilização de um substrato específico deste sistema para mensurar a atividade da γ -GT, sendo este o cloridrato ácido α -(metil-amino)-isobutírico (MeAIB) (10mM) (figura 15). Neste contexto, os resultados demonstram que a modulação da atividade da γ -GT mediada pelo ATPe pode estar influenciando na disponibilidade de aminoácidos para a síntese *de novo* de GSH.

Figura 15 - Envolvimento do sistema de transporte de aminoácidos “A” no mecanismo de ação do ATPe sobre a atividade da γ -GT no testículo de ratos imaturos.



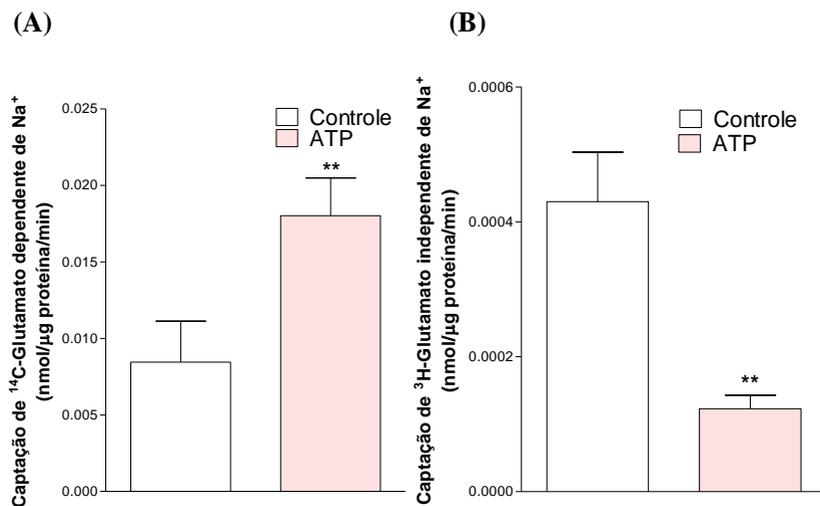
Porções testiculares foram pré-incubadas por 15 minutos na presença ou ausência de MeAIB (substrato do sistema de transporte de aminoácidos “A”) 10mM; e incubadas 30 minutos com ou sem 1mM de ATPe. Os resultados foram reportados como a média \pm E.P.M. de 8 animais. Diferenças estatisticamente significativas a partir do controle, foram determinadas através do teste ANOVA de uma via seguida de teste de comparações múltiplas de Bonferroni: * $p < 0,05$; quando comparado ao grupo controle; # $p < 0,001$ comparado com o grupo ATP.

Fonte: do autor

6.4 CAPTAÇÃO E METABOLISMO DO GLUTAMATO COMO ALVOS DE AÇÃO DO ATPe EM TESTÍCULOS DE RATOS IMATUROS

Com o intuito de investigar o envolvimento do sistema glutamatérgico nos efeitos mediados pelo ATPe em testículos de ratos imaturos, foram realizadas medições de influxo de [14 C]-glutamato e atividade da GS. Os resultados evidenciaram que o ATPe estimula o influxo de [14 C]-glutamato dependente de Na^+ , enquanto o influxo independente de Na^+ foi diminuído por este nucleotídeo (figura 16A e B). Além disso, o ATPe induziu a atividade da GS em testículo de ratos (figura 17).

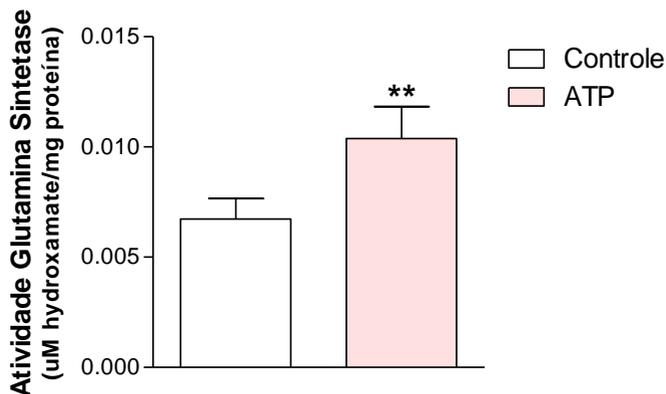
Figura 16 - Efeitos do ATPe sobre o influxo de [14 C]-Glutamato no testículo de ratos imaturos.



A captação foi iniciada com a adição de $0,33 \mu\text{Ci}$ de [14 C]-glutamato ao meio de incubação (10 min) e foi corrigida para a união não-específica em ensaios realizados na ausência de íons sódio, sendo este sal substituído por cloreto de colina. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. Diferenças estatisticamente significativa a partir do controle, foram determinadas através do teste “t” de Student: $**p < 0,01$.

Fonte: do autor

Figura 17 - Efeito do ATPe na atividade da Glutamina Sintetase em testículos de ratos imaturos.

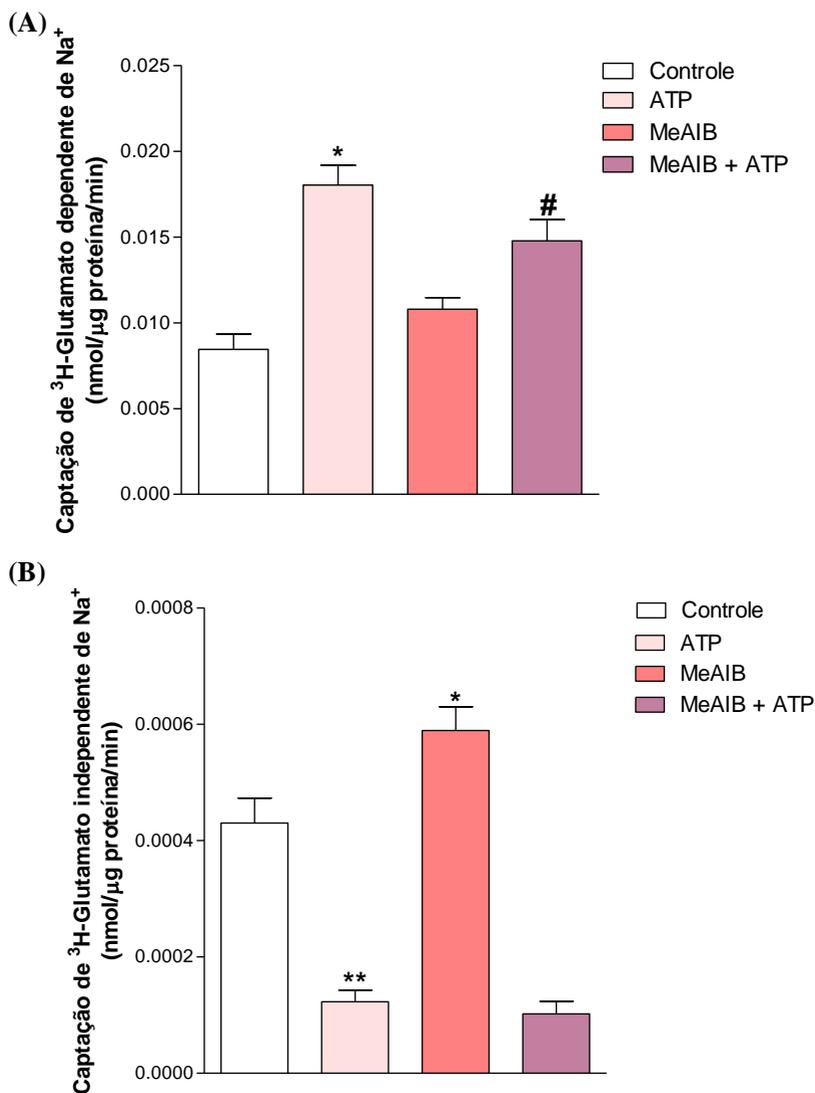


Porções testiculares foram incubadas na presença de 1mM de ATP e a atividade da glutamina sintetase foi mensurada. Os resultados foram reportados como a média \pm E.P.M. de 8 animais. Diferenças estatisticamente significativa a partir do controle, foram determinadas através do teste “t” de Student: ** $p < 0,01$, quando comparado ao grupo controle.

Fonte: do autor

Com o intuito de investigar um possível envolvimento do sistema de transporte de aminoácidos “A” sobre o influxo de [14 C]-glutamato, utilizou-se MeAIB (um aminoácido neutro) (10mM) como substrato específico deste sistema, já que a entrada de glutamato (aminoácido excitatório) via transportadores específicos se dá por um transporte acoplado ao influxo de Na^+ na célula, mas ocorre via outro tipo de transportador. Observou-se que esse sistema de transporte “A” está envolvido parcialmente no aumento do influxo de [14 C]-glutamato mediado pelo ATPe, isso se observa pela diminuição no influxo quando o MeAIB e o ATPe foram co-incubados (figura 18A). O mesmo não foi observado no meio independente de Na^+ , evidenciando que o Na^+ é necessário para que esse transporte ocorra (figura 18B).

Figura 18 - Envolvimento do sistema de transporte de aminoácidos “A” no mecanismo de ação do ATPe sobre o influxo de [14 C]-glutamato no testículo de ratos imaturos.



Porções testiculares foram pré-incubadas por 15 minutos na presença ou ausência de MeAIB (substrato do sistema de transporte de aminoácidos “A”)

10mM; e incubadas 30 minutos com ou sem 1mM de ATPe. A captação foi iniciada com a adição de 0,33 μCi de [^{14}C]-glutamato ao meio de incubação (10 min) e foi corrigida para a união não-específica em ensaios realizados na ausência de íons sódio, sendo este sal substituído por cloreto de colina. Os resultados foram reportados como a média \pm E.P.M. de 8 animais. Diferenças estatisticamente significativas a partir do controle, foram determinadas através do teste ANOVA de uma via seguida de teste de comparações múltiplas de Bonferroni: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle; # $p < 0,05$ comparado com o grupo ATP.

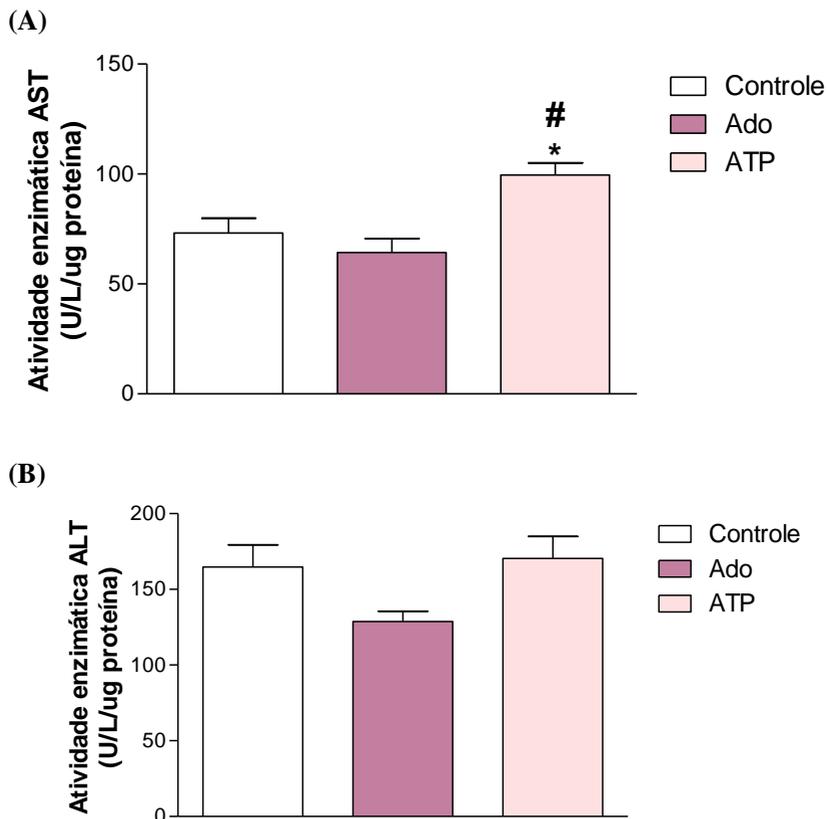
Fonte: do autor

6.5 EFEITO DO ATPe E DA Ado SOBRE A ATIVIDADE DAS ENZIMAS AST/ALT E LDH

As células de Sertoli são essenciais para nutrir e suportar as células germinativas. O metabolismo energético das células de Sertoli envolve, principalmente, a entrada de glicose nestas células, essa etapa compreende a formação de piruvato por meio da glicólise, o qual pode ser transportado para a mitocôndria a fim de formar Acetil-CoA, ou ainda, ser convertido a lactato ou alanina. O lactato é secretado pelas células de Sertoli e captado pelas células germinativas, local em que será utilizado para síntese de ATP (ALVES *et al.*, 2012). Nesse contexto, a modulação da atividade da alanina aminotransferase (ALT), representa um importante papel na disponibilidade de lactato, de forma indireta, ou mesmo a fim de desviar o piruvato para a formação de alanina, e vice-versa. Por outro lado, a aspartato aminotransferase (AST) catalisa a transaminação do aspartato em oxaloacetato, e alterações na sua atividade representam uma modulação na disponibilidade de substratos para o metabolismo energético. Os resultados evidenciaram que o ATPe aumenta significativamente a atividade da AST, enquanto que a Ado não altera a atividade desta enzima. Quando referente à ALT, tanto o ATPe, como a Ado, não são capazes de alterar a atividade desta enzima, entretanto, Ado e ATPe modulam a atividade desta enzima de forma distinta (figura 19A e B).

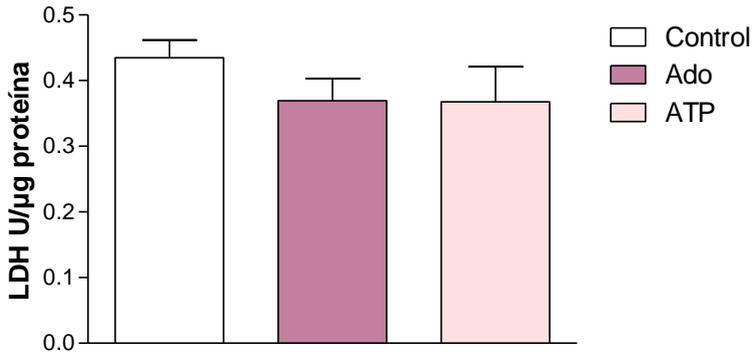
A atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) foi determinada com o intuito de avaliar o papel desta enzima na viabilidade das células testiculares frente à incubação com ATPe e Ado. Vale salientar que a função principal da LDH envolve a conversão de piruvato a lactato. Os resultados mostram que nem o ATPe e nem a Ado alteram a atividade da LDH no testículo de ratos imaturos (figura 20).

Figura 19 - Efeito do ATPe e da Ado sobre a atividade das enzimas AST (A) e ALT (B) no testículo de ratos imaturos.



Porções testiculares foram incubados na presença de 1mM de ATP e/ou 1mM de Ado, e a atividade da AST e ALT foram mensuradas. Os resultados foram reportados como a média \pm E.P.M. de 8 animais. Diferenças estatisticamente significativas a partir do controle, foram determinadas através do teste ANOVA de uma via seguida de teste de comparações múltiplas de Bonferroni: * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle; # $p < 0,05$ comparado com o grupo Ado. Fonte: do autor

Figura 20 - Efeito do ATPe e da Ado sobre a atividade da LDH no testículo de ratos imaturos.



Porções testiculares foram incubadas na presença de 1mM de ATP e 1mM de Ado, e a atividade da LDH foi mensurada. Os resultados foram reportados como a média \pm E.P.M. de 8 animais. Diferenças estatisticamente significativas a partir do controle, foram determinadas através do teste ANOVA de uma via seguida de teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Fonte: do autor

7 DISCUSSÃO

Neste estudo foram investigadas as possíveis ações modulatórias das purinas extracelulares, ATP e Ado, com ênfase nas ações mediadas pelo ATPe nas células testiculares de ratos imaturos de 15 dias de idade, com o intuito de desvendar seus efeitos pró ou antioxidantes, bem como alguns dos mecanismos envolvidos na atividade desta purina. Em suma, foram investigados os efeitos modulatórios mediados pelo ATPe em diversos parâmetros bioquímicos, bem como o mecanismo de ação pelo qual o ATPe exerce esses efeitos. Identificou-se que o ATPe é capaz de induzir estresse oxidativo, e que tais efeitos são mediados, provavelmente, via interação com receptores ionotrópicos do subtipo P2X₇, evento este, acoplado a um aumento no influxo de Ca²⁺, seguido, possivelmente, de mobilização de Ca²⁺ dos estoques intracelulares via ativação de cascatas de proteínas cinases.

Ações mediadas pelo ATPe em células testiculares tem sido descritas no decorrer dos últimos 30 anos, em especial, na célula de Sertoli. Evidências experimentais demonstraram que os nucleotídeos de adenina extracelulares podem modular respostas através de purinoceptores presentes nestas células (CONTI *et al.*, 1989; FILIPPINI *et al.*, 1994; KO *et al.*, 1998; MONACO *et al.*, 1984; MONACO *et al.*, 1988; RIVKEES, 1994). Outros estudos demonstraram que a mobilização de Ca²⁺ induzida pela ativação de purinoceptores, pode afetar o controle endócrino fisiológico das células de Sertoli (GELAIN *et al.*, 2003; ROSSATO *et al.*, 2001). Foresta e colaboradores (1995) postularam que a ação mediada pelo ATPe na célula de Sertoli é acoplada ao influxo seletivo de Na⁺, o que desencadeia uma despolarização da membrana ocasionada pela abertura de CCDV seguida da entrada de Ca²⁺, o que contribui para uma resposta sustentada mediada pelo aumento intracelular de Ca²⁺. Em geral, a comunicação mediada pelo ATPe ganha em funcionalidade e especificidade da heterogeneidade funcional da população de purinoceptores do tipo P2. Até o momento, poucos estudos têm abordado a descrição funcional dos subtipos de purinoceptores funcionais em ratos imaturos (os estudos se dão, geralmente, em ratos adultos), bem como a descrição funcional da sinalização dependente do influxo de Ca²⁺ mediada pelo ATPe.

Nesse contexto, um estudo evidenciou a expressão dos receptores P2X₂, P2X₃ e P2X₅ em células germinativas no decorrer de diferentes

etapas do ciclo do epitélio seminífero. Células de Sertoli, também mostraram expressão do RNAm de receptores do subtipo P2X₂ e P2X₃ durante o ciclo do epitélio seminífero, enquanto que o receptor P2X₇ esteve presente em todas as fases. Sugere-se que a sinalização purinérgica pode desempenhar um papel importante no controle da maturação de subpopulações de células germinativas em diferentes fases do desenvolvimento testicular (BURNSTOCK, 2014).

Por conseguinte, Ko e colaboradores (2003) demonstraram, em células de Sertoli de ratos adultos, que a ativação do receptor do tipo P2X₇ pelo ATPe foi considerada importante a fim de aumentar as concentrações de Ca²⁺ intracelulares nestas células. Estudos também evidenciaram que o receptor P2X₇ é o único dos receptores do subtipo P2X que requer concentrações elevadas de ATPe (milimolar) para sua ativação, o que se correlaciona com a concentração de 1mM de ATPe utilizada no presente estudo, bem como a reversão dos efeitos no aumento do influxo de Ca²⁺, mediado pelo ATPe, quando co-incubado com um antagonista específico deste receptor, indicando que o ATPe provavelmente está mediando suas ações, majoritariamente, via receptores do tipo P2X₇. Além disso, o P2X₇ é sensível ao análogo sintético do ATPe, o BzATP, e, assim, o BzATP é frequentemente utilizado para estudar ações mediadas via estimulação do receptor P2X₇. A estimulação do receptor P2X₇ pelo ATPe, por exemplo, pode estar acoplada a formação de um canal de cátions, o qual medeia o influxo de Ca²⁺ e Na⁺, bem como o efluxo de K⁺ (LENERTZ *et al.*, 2009; SCHNEIDER *et al.*, 2006).

Em 2011, Veitinger e colaboradores, mostraram uma via de sinalização mediada pelo ATPe em células de Sertoli de testículos imaturos, acoplada ao influxo de Ca²⁺, a qual consiste tanto com receptores do tipo P2X, como com receptores do tipo P2Y. Estes resultados suportam o aumento no influxo de Ca²⁺ mediado pelo ATPe observado no presente estudo, bem como a presença do receptor funcional do subtipo P2X₇ em células testiculares.

A mobilização de Ca²⁺ mediada pelas purinas extracelulares pode proporcionar uma via eficaz para o controle da diferenciação e do desenvolvimento das células testiculares, como também, por outro lado, pode desencadear um desequilíbrio na homeostase testicular, via alteração de parâmetros oxidativos nestas células. Essas situações ainda representam uma porta em aberto, e, isso se dá, provavelmente, devido à escassez de estudos nessa área.

Baseado nisso, o presente estudo evidenciou um aumento na oxidação de proteínas, acompanhado de um aumento da peroxidação lipídica, conforme demonstrado pelo aumento das concentrações de TBARS, quando os testículos foram expostos ao ATPe. Isso pode estar relacionado ao fato de que lipídeos são facilmente oxidados e, portanto, são substratos preferidos por RL causando danos via peroxidação lipídica, resultando na degradação de fosfolipídios, injúria à membrana e formação de LOOH (COSTA *et al.*, 2008). Estudos já evidenciam que EROs podem desempenhar um papel chave nas respostas pró-inflamatórias que variam desde sepse até neurodegeneração. A ativação de receptores P2X₇ tem sido vinculada a variações bruscas na oxidação de proteínas em células como a microglia, macrófagos e granulócitos (XU *et al.*, 2015).

Vale ressaltar, que na concentração utilizada nos experimentos deste estudo, o ATPe pode induzir ativação do receptor P2X₇ e desencadear respostas oxidativas na célula, isso pode ser justificado ao fato de que em condições patológicas, níveis elevados de ATPe são liberados pelas células, como um evento sinalizador, mediando interação com receptores P2X₇, o que pode desencadear, para tanto, respostas danosas a célula (SEELAND *et al.*, 2015). Entre as muitas funções críticas de receptores do tipo P2X₇, destaca-se a sua capacidade de controlar várias respostas imunes, como por exemplo, sua ativação conduz à liberação aumentada de múltiplos moduladores imunes, incluindo EROs, as quais medeiam a defesa do hospedeiro contra agentes patogênicos intracelulares, o que pode culminar em uma alteração na membrana da célula, seguido de apoptose (NORTH, 2002). Curiosamente, a interação do ATPe com o P2X₇ também pode modular um lipopolissacarídeo mediado pela ativação de caspase 1, e a estimulação do P2X₇ é conhecida por potencializar a liberação de vários mediadores, sendo estes induzidos por mediadores pró-inflamatórios, incluindo a IL-1 β , o TNF α , e o ON (HU *et al.*, 1998; PFEIFFER *et al.*, 2004).

As concentrações de ATPe, em concentrações milimolares, são muito mais elevadas do que as requeridas para a ativação de outros receptores P2X ou P2Y. Sendo assim, uma exposição prolongada (>1min) com níveis de ATPe acima de 500 μ M permite que o receptor P2X₇ desencadeie a formação de um poro grande, não seletivo, o qual permite que moléculas de até 900Da entrem ou saiam da célula. A estimulação prolongada do receptor P2X₇, bem como a presença desse

poro, pode desencadear vários eventos com consequências importantes para as células, incluindo morte celular (SEELAND *et al.*, 2015).

Em um estudo recente, Lenertz e colaboradores (2011) reportaram que a ativação do receptor P2X₇ pelo ATPe promove a produção de EROs em monócitos humanos e que esta produção é dependente da ativação da via da MEK/ERK e, provavelmente, envolve a fosforilação da NADPH-oxidase. O mesmo já foi identificado em outras células imunes, tais como macrófagos e eosinófilos, mediando a produção de EROs, via ativação do receptor P2X₇. Em adição, proteína-cinases, tais como as várias isoformas da PKC, a PI3K, e a p38 MAPK, bem como a ERK1/2, têm sido implicadas na produção de EROs durante a estimulação purinérgica. Algumas destas enzimas são dependentes de Ca²⁺, e podem traduzir o sinal mediado pelo aumento deste íon, exercendo efeitos modulatórios sobre o complexo NADPH-oxidase, sendo esta, uma enzima limitante na regulação da expressão e atividade da γ -GT através do aumento da produção de EROs (MARTELGALLEGOS *et al.*, 2013).

No entanto, embora exista uma ampla variedade de estudos na literatura relacionando eventos de sinalização celular com a formação de citocinas e EROs, as quais se iniciam após a ativação P2X₇ (HEWINSON *et al.*, 2008; LENERTZ *et al.*, 2011; SEELAND *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2015), pouco se sabe sobre a regulação do receptor e os mecanismos pelos quais sua ativação pode ter impacto sobre processos celulares a longo prazo, tais como a regulação da transcrição de genes. Referente a isso, estudos relataram que a ativação de P2X₇ nem sempre está ligada a apoptose, que é um evento associado frequentemente com a exposição celular a agonistas de P2X₇. Estas observações conduzem à hipótese de que, em determinadas circunstâncias, a estimulação de P2X₇ pode não somente provocar respostas celulares imediatas, tais como a potencialização da formação de citocinas pró-inflamatórias e EROs, mas como também pode ter um efeito importante sobre o comportamento celular a longo prazo através de efeitos sobre a expressão gênica (DENLINGER *et al.*, 1996; MACKENZIE *et al.*, 2005).

Nesse contexto, e considerando que as células de Sertoli desempenham um papel central na regulação e manutenção da espermatogênese e que são responsáveis pela nutrição e sustentação das células germinativas em desenvolvimento, o comprometimento da estrutura destas células pode afetar a fertilidade masculina. Baseado nisso, e considerando que as EROs são produtos do metabolismo normal do O₂, os organismos aeróbios desenvolveram defesas para o controle

dos possíveis danos desencadeados por estas espécies reativas. Essas defesas são constituídas por antioxidantes enzimáticos como a SOD, a CAT e a GPx, e os não enzimáticos, como a GSH e as vitaminas A, C e E. Sendo assim, esses compostos geralmente estão envolvidos com a proteção da célula mediante os efeitos deletérios desencadeados por RL (HALLIWELL *et al.*, 2007).

No caso das enzimas citoprotetoras, estas possuem um tempo de meia-vida relativamente longo e podem catalisar uma grande variedade de reações de detoxificação, estando virtualmente envolvidas na regeneração de pequenas moléculas antioxidantes. A maior parte destas enzimas são controladas por pelos mesmos três componentes da via de transcrição: o elemento de resposta antioxidante (ARE), o *NF-E2-related factor 2* (Nrf2), e o *Kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap1). O Nrf2 é um fator de transcrição da família *Cap 'n' collar* (CNC) e contém um domínio de ligação ao DNA, denominado de zíper de leucina (bZIP), o qual regula a expressão basal e induzida de uma grande variedade de genes antioxidantes tais como: GSTs, GCL, GPx, SOD, CAT, TXN (tioredoxina), HO-1 (heme oxigenase 1), entre outros (ABED *et al.*, 2015).

Basicamente, o Keap1 funciona como um regulador mestre da via Keap1-Nrf2-ARE, controlando o estado estacionário de Nrf2 com base no equilíbrio redox da célula. Em condições basais, o Nrf2 está ligado ao Keap1 e é direcionado para a ubiquitinação e degradação proteossômica. Nesse contexto, o heterodímero Nrf2-Keap1 funciona como um sensor intracelular mediando alterações nas concentrações de EROs. Em condições de estresse oxidativo, resíduos de cisteína do Keap1 tornam-se oxidados, o que leva a uma modificação conformacional do complexo Nrf2-Keap1, interrompendo a ubiquitinação e resultando na estabilização do Nrf2. A fosforilação do Nrf2 por cinases desencadeia a dissociação do Nrf2 do complexo Keap1 e assim o Nrf2 é translocado para o núcleo. Uma vez no núcleo, este liga-se a uma região promotora do DNA, denominada ARE ativando a transcrição de diversos genes antioxidantes (ABED *et al.*, 2015).

Em contraste, não foram observadas alterações estatisticamente significativas no conteúdo de GSH e nem na atividade das enzimas GST, GPx, GR e CAT após a exposição ao ATPe. Nesse contexto, pode-se hipotetizar que as ações mediadas pelo ATPe, via interação com receptores P2X₇, poderiam exercer efeitos modulatórios sobre a expressão gênica, o que, naturalmente, poderia ser observado em exposições prolongadas ao ATPe, resultando talvez, em alterações na

atividade destas enzimas. Quando referente à enzima G6PD, a qual participa da via das pentoses-fosfato, vale frisar que sua atividade normal permite o fornecimento de NADPH (como doador de elétrons) para mediar reações enzimáticas como, por exemplo, a atividade da GR, responsável pela redução da GSSG à sua forma reduzida (GSH), às custas de NADPH. Esse mecanismo garante que a glutatona permaneça na sua forma reduzida na maior parte do tempo, o que é essencial para sua ação redutora sobre outras moléculas biológicas. A diminuição observada na atividade da G6PD no presente estudo conduz a uma diminuída disponibilidade de NADPH, importante para a atividade da GR, por exemplo. Sendo assim, sugere-se que vias alternativas possam estar mediando o fornecimento de NADPH, visto que a atividade da G6PD se encontra diminuída na presença do ATPe.

Estudos pioneiros evidenciaram que a atividade da γ -GT aumenta marcadamente no testículo de ratos a partir do vigésimo dia de idade e não se altera substancialmente após 100 dias de idade (HODGEN *et al.*, 1973; LU *et al.*, 1977). Hodgen e colaboradores (1973) descreveram que a localização histoquímica da γ -GT circunda a borda luminal dos túbulos seminíferos, com coloração mais intensa nas bordas apicais das células de Sertoli. Mais tarde, Lu e colaboradores (1977) confirmaram a presença da γ -GT nas células de Sertoli, em que observaram que a atividade desta enzima nestas células em ratos de 30 dias de idade era 10 vezes maior do que em células germinativas, células peritubulares e células intersticiais. Em 1986, Saborn e colaboradores mensuraram a atividade da γ -GT em células de Sertoli de testículos imaturos e evidenciaram que a atividade desta enzima aumenta marcadamente entre 15 e 20 dias de idade.

Sendo assim, a atividade da γ -GT varia ao longo do ciclo do epitélio seminífero (SCHTEINGART *et al.*, 1988) e é regulada por fatores derivados de células germinativas e também pelo FSH (SCHTEINGART *et al.*, 1989). Essas evidências, analisadas em conjunto, sugerem que a atividade desta enzima pode ser relevante para a fisiologia testicular. O presente estudo demonstrou que o ATPe diminui a atividade da γ -GT, enquanto que a Ado não altera sua atividade. Esses resultados fortalecem o fato de que o ATPe esteja mediando ações modulatórias sobre células testiculares, e não os seus produtos de degradação como a Ado, a qual tem sua formação mediada no meio extracelular pela atividade das ectonucleotidases. Em um estudo pioneiro, Meroni e colaboradores (1997) propuseram que um aumento nas concentrações intracelulares de Ca^{2+} está vinculado a

diminuição na atividade da γ -GT. Sendo assim, e com o intuito de investigar as possíveis rotas de sinalização celular envolvidas no mecanismo pelo qual o ATPe diminui a atividade da γ -GT em testículos de ratos imaturos, foram utilizadas algumas abordagens farmacológicas. Dentre estas abordagens, destaca-se o uso de inibidores enzimáticos, bloqueadores de canais iônicos, agentes quelantes de Ca^{2+} intra e extracelular, agentes antioxidantes, bem como antagonistas e agonistas de receptores, na presença ou ausência do ATPe.

Desta maneira, avaliou-se o papel dos purinoceptores do tipo P2 no mecanismo de ação do ATPe sobre a atividade da γ -GT. Como pode ser observado na figura 11A e B, em que foram utilizados a Suramina e o 2MeSATP como antagonistas de receptores P2X e P2Y, a diminuição na atividade da γ -GT desencadeada pelo ATPe é prevenida na presença destes antagonistas, o que fortalece o envolvimento destes receptores nas ações mediadas pelo ATPe sobre a atividade desta enzima. Quando referente ao BzATP, um agonista seletivo P2X₇, mais potente e mais seletivo para estes receptores do que o próprio ATPe, observou-se que tanto o ATPe, como o BzATP inibem a atividade da γ -GT tanto isolados quanto em associação, reforçando o envolvimento desse subtipo de purinoceptor no mecanismo de ação deste nucleotídeo.

Chaves e colaboradores (2006), evidenciaram em um estudo eletrofisiológico em células de Leydig, que o ATPe induz uma corrente rápida de Ca^{2+} (na ordem de milissegundos), e que esta corrente é bloqueada pela Suramina, demonstrando a ação do ATPe via receptores P2X. Por outro lado, este mesmo estudo evidenciou que na célula de Leydig, o ATPe foi um agonista mais potente do que o BzATP, tornando improvável que os receptores P2X₇ estão na base das correntes relatadas. Esse dado pode estar relacionado com a concentração de 100 μM de ATPe utilizada nos experimentos por este grupo, contrastando e fortalecendo a necessidade de concentrações milimolares necessárias para estimular receptores P2X₇, e fortalecendo que as ações mediadas pelo ATPe no presente estudo estejam ocorrendo especificamente via receptores P2X₇. Por outro lado, Ko e colaboradores, (2003) demonstraram a presença de receptores P2Y₁, P2Y₂ e P2X₇, mas não P2X₄ em células de Sertoli. Analisados em conjunto, estes dados farmacológicos indicam fortemente a presença de receptores ionotrópicos (provavelmente P2X₇) em células de Sertoli de ratos através dos quais o ATPe possa estar mediando seus efeitos.

O papel dos nucleotídeos no metabolismo energético está bem estabelecido; entretanto, sua importância potencial como mensageiros

químicos extracelulares foi reconhecida apenas recentemente (BURNSTOCK, 2014). Eles são agora conhecidos por participar de uma variedade de respostas biológicas. Sendo assim, no presente estudo também evidenciou-se a importância do ATPe como uma molécula mediadora de efeitos sinalizadores. Neste contexto, os resultados mostraram que o efeito do ATPe sobre a atividade da γ -GT é dependente da ativação das vias de sinalização celular da MEK/ERK e da PI3K, os quais podem estar acoplados ao influxo de Ca^{2+} . Corroborando estes dados, Meroni e colaboradores (1997) sugerem a existência de uma via inibitória dependente de Ca^{2+} -calmodulina participando da regulação da atividade basal da γ -GT.

Reforçando o efeito inibitório do Ca^{2+} sobre a atividade da γ -GT em células testiculares, o pré- e co-tratamento do tecido com o quelante de Ca^{2+} intracelular (BAPTA-AM) ou o quelante de Ca^{2+} extracelular (EGTA) com ATPe, preveniu o efeito inibitório deste nucleotídeo na atividade enzimática. Esses dados em conjunto, sugerem que a diminuição das concentrações intracelulares de Ca^{2+} , provocada pelos agentes quelantes de Ca^{2+} , acarreta em menor disponibilidade deste íon para se ligar a calmodulina, que atua de forma inibitória sobre a atividade da γ -GT. Consequentemente, a diminuição do Ca^{2+} intracelular induzida através dessas ferramentas farmacológicas (EGTA e BAPTA-AM), leva a desativação da via inibitória dependente deste íon sobre a atividade da γ -GT. Isto provavelmente ocorreu porque, como demonstrado neste estudo, o ATPe aumenta as concentrações de Ca^{2+} intracelular formando, possivelmente, o complexo Ca^{2+} -calmodulina. Consequentemente, a via inibitória dependente deste complexo é ativada, diminuindo a atividade da γ -GT. Meroni *et al.*, (2002) também mostraram o envolvimento da via PI3K na atividade da γ -GT. Nesse contexto, é importante destacar que outras estratégias farmacológicas precisam ser utilizadas para evidenciar quais as vias estão envolvidas no mecanismo pelo qual o ATPe exerce seus efeitos sobre células testiculares.

Em adição, Lalevé e colaboradores (1999) demonstraram em células de Sertoli imaturas que o ATPe em baixas concentrações, é capaz de induzir um aumento no influxo de Ca^{2+} , e que esse mecanismo se dá via receptores do tipo P2X ou P2Y, seguido de um pico máximo de resposta dependente da mobilização de Ca^{2+} dos estoques intracelulares. O mesmo estudo ainda evidenciou, a fim de verificar se o mecanismo pelo qual o ATPe atua é dependente do influxo de Ca^{2+} , que a utilização do EGTA como um agente quelante de Ca^{2+} extracelular,

resultou na ausência das ações mediadas pelo ATPe, o que ressalta a necessidade da entrada de Ca^{2+} na célula para o efeito do nucleotídeo. Além disso, os autores demonstraram que o influxo de Ca^{2+} mediado por ATPe não envolve os CCDV do tipo-L, corroborando os achados do presente estudo.

Gorczyńska e colaboradores (1991) mensuraram concentrações de Ca^{2+} intracelulares, bem como a atividade da γ -GT em células de Sertoli. Ao utilizarem o EGTA em suas medições de Ca^{2+} , demonstraram que as concentrações de Ca^{2+} intracelulares são sensíveis a concentrações extracelulares deste íon. Em outro segmento, este mesmo grupo cultivou células de Sertoli na ausência de FSH, e demonstrou uma diminuição na atividade da γ -GT na ausência deste hormônio e, ainda, quando estas células foram expostas a concentrações não-fisiológicas de Ca^{2+} (5 mM) ou em concentrações similares ao observado fisiologicamente ($1,1 \pm 2,2$ mM), esse evento de elevadas concentrações de Ca^{2+} culminou em uma diminuição da atividade da γ -GT. Os resultados identificados por este grupo sugeriram que um aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular resulta em uma diminuição da atividade da γ -GT. Em células de Sertoli, tanto CCDV como os independentes de voltagem foram descritos (GRASSO *et al.*, 1989). O bloqueio de CCDV do tipo L pelo verapamil ou nifedipina, resultou em um aumento na atividade da γ -GT. Esses resultados em conjunto reforçam a existência de uma via inibitória dependente de Ca^{2+} -calmodulina que participa da regulação da atividade γ -GT basal.

Recentemente, Martel-Gallegos e colaboradores (2013), apresentaram que a estimulação purinérgica em macrófagos induz influxo de Ca^{2+} via receptores P2X_7 , seguido da ativação subsequente da via da MEK/ERK e fosforilação da NOX2 para finalmente gerar EROs. Este grupo também relatou o envolvimento da ativação da via da PKC e da MEK/ERK na produção de EROs. O grupo supôs que a PKC pode ativar a produção de EROs, quer através de MEK/ERK ou trabalhar independentemente desta via, assim como tem sido mostrado em neutrófilos (SUH *et al.*, 2001). Acoplado a isto, e com base nos experimentos desenvolvidos neste mesmo estudo, em que foram utilizados vários inibidores, foi demonstrado que a ativação da PKC e da MEK/ERK não representa completamente a produção de EROs após a estimulação do receptor P2X_7 . Assim, é plausível que, além de PKC e da MEK/ERK, uma via adicional dependente de Ca^{2+} contribui para a produção de EROs. Esses resultados se correlacionam com o presente estudo, embora desenvolvido em tipos celulares diferentes, pode-se

ênfatisar a necessidade da ativação da via da PI3K mediado pelo ATPe, bem como o papel importante da via da MEK/ERK na indução de estresse oxidativo em células testiculares.

Em células de Sertoli de ratos imaturos observou-se que o FSH estimula a fosforilação da via da MEK/ERK (FIX *et al.*, 2004). Em outras fases celulares, parâmetros celulares similares parecem ocorrer, mas após a puberdade, o FSH não estimula o influxo de Ca^{2+} (DAHIA *et al.*, 2006). Esse dado pode estar vinculado as ações mediadas pelo ATPe em células testiculares, visto que o FSH exerce ações sobre a diferenciação e desenvolvimento testicular, presume-se que o ATPe pode exercer efeitos modulatórios sobre o desenvolvimento testicular, já que atuam modulando a fosforilação da mesma via.

Ainda investigando ações mediadas pelo ATPe sobre a atividade da γ -GT, foram utilizados compostos antioxidantes a fim de verificar o envolvimento do estresse oxidativo na diminuição da atividade da γ -GT mediada pelo ATPe. Observou-se que o Trolox®, o ácido ascórbico e a GSH revertem a diminuição da atividade da γ -GT desencadeada pelo ATPe, o qual estaria atuando como um agente que induz estresse oxidativo. Em adição, um estudo recente demonstrou que o ATPe, liberado pela célula via canais de panexina-1, aumenta a liberação de interleucina 6 (IL-6) através da ativação de receptores do subtipo P2X₇ em modelo de neuropatia diabética, condição patológica associada a elevadas concentrações séricas de ácidos graxos livres. Além disso, os autores mostraram que o resveratrol, um composto natural polifenólico com ações antioxidantes, é capaz de reverter à elevada liberação de IL-6, desencadeada pelos elevados níveis de ácidos graxos livres, ao impedir a ativação do receptor P2X₇, bem como atenuar a resposta desencadeada pelo BzATP. Tomados em conjunto, esses dados sugerem que o resveratrol pode inibir a elevada resposta inflamatória induzida pelas elevadas concentrações de ácidos graxos livres (XU *et al.*, 2015).

Hewinson e colaboradores (2008) desenvolveram um estudo em monócitos humanos, em que foi observada uma indução da formação de IL-1 β mediada pela ativação de receptores do tipo P2X₇ pelo ATPe. O grupo mostrou que na presença de NAC ocorreu diminuição do processamento da IL-1 β sem alterar a secreção desta citocina estimulada por ATPe. Além disso, após um período de incubação de 2 horas com NAC, observou-se reversão da formação de EROs mediada pela ativação do receptor P2X₇ pelo ATPe. Estudos deste mesmo grupo já relacionaram a ativação do receptor P2X₇ com a formação de ONOO⁻. O presente estudo não evidenciou reversão dos efeitos desencadeados pelo

ATPe sobre a atividade da γ -GT quando co-incubados na presença da NAC, o que pode estar relacionado com a concentração de NAC, bem como o tempo de incubação utilizado.

Em células intestinais humanas foi demonstrado que o ATPe não só era capaz de induzir a produção de EROs, mas também que esta resposta era inibida pelo pré-tratamento com antioxidantes, tais como ácido ascórbico e NAC, bem como por meio da utilização de um antagonista P2X₇. Visto que o ATPe era capaz de induzir apoptose e a liberação de EROs, verificou-se que a utilização de antioxidantes e antagonistas de P2X₇ inibiram a apoptose mediada pelo ATPe. Estes resultados os conduziram a sugerir que a ativação do receptor P2X₇ induz apoptose em células epiteliais do intestino e que esta via pode, pelo menos em parte, ser mediada pela produção de EROs (SOUZA *et al.*, 2012).

O sistema A é amplamente expresso em células de mamíferos, no qual medeia o influxo de Na⁺ celular, acoplado a absorção de pequenos aminoácidos alifáticos, como a alanina, serina e glutamina, sendo particularmente bons substratos. Distingue-se de outros transportadores de aminoácidos neutros, como os sistemas L, ASC e N, pelo fato de reconhecer N-metilaminoácidos, tais como o MeAIB. Em adição, o sistema A é o maior sistema de aminoácidos sujeito a regulação por condições do meio, estímulos proliferativos, alterações no desenvolvimento e sinais hormonais. Essa regulação é pensada por ser direcionada pelo sistema A em virtude de que seus substratos desempenham papéis fundamentais no fluxo global de aminoácidos entre os tecidos e no fornecimento de energia para o metabolismo de aminoácidos (HYDE *et al.*, 2002; YAO *et al.*, 2000).

Apoiado nessas evidências avaliou-se se poderia haver alguma alteração no sistema de transporte de aminoácidos “A” por meio da utilização de um substrato específico deste sistema para mensurar a atividade da γ -GT. Observou-se que a modulação da atividade da γ -GT mediada pelo ATPe pode estar influenciando na disponibilidade de aminoácidos para a síntese *de novo* de GSH, mantendo suas concentrações em condições fisiológicas. Nesse contexto, hipotetizamos que o sistema A é importante para o fornecimento de aminoácidos neutros na célula, e possivelmente para a síntese *de novo* de GSH, visto que a atividade da G6PD está diminuída na presença do ATPe e o suprimento de NADPH se dá, majoritariamente, mediante fornecimento desta molécula pela via das pentoses fosfatos o que permite a atividade da GR normal, pode-se presumir que o que mantém os níveis de GSH

normais, e dada a importância da γ -GT nesse mecanismo, seja a entrada de aminoácidos neutros via sistema A de transporte.

Jacobus e colaboradores (2010) demonstraram em células de Sertoli de ratos imaturos que um fator de crescimento é capaz de estimular um aumento no transporte de [14 C]-MeAIB, sendo este mecanismo processado através de um aumento nos níveis de Ca^{2+} , e que isso se dá dependente da ativação da PI3K. Tem se observado que a captação de aminoácidos é inibida em testículos quando pré-incubados ou incubados com bloqueadores de Ca^{2+} tais como verapamil, cobalto ou níquel, o que sugere um envolvimento de Ca^{2+} extracelular (WASSERMANN *et al.*, 1992). Volpato e colaboradores (2004) demonstraram que o acúmulo de aminoácido basal foi ligeiramente diminuído quando o Ca^{2+} extracelular foi quelado, entretanto, ainda não há evidências suficientes de que o Ca^{2+} intracelular está diretamente envolvido com este evento na célula de Sertoli.

Vinculado a isso, considerou-se relevante investigar os níveis de glutamato no testículo de ratos imaturos, visto que o glutamato é o principal aminoácido presente neste tecido, bem como associar seu influxo ao sistema de transporte de aminoácidos A. Nossos resultados evidenciaram um aumento no influxo de [14 C]-glutamato e que esse mecanismo é dependente de Na^+ e parcialmente dependente deste transportador, já que ao co-incubar o ATPe e o MeAIB observou-se uma reversão parcial do influxo de [14 C]-glutamato mediado pelo ATPe. Nessa linha, o real papel do glutamato, bem como a evidência da presença de seus transportadores e receptores em células testiculares ainda não está bem estabelecida. Nesse contexto, estudos importantes evidenciaram a presença de RNAm e suas proteínas correspondentes para transportadores de glutamato do tipo GLAST e GLT-1, com elevadas concentrações em locais específicos do testículo (LEE *et al.*, 2011; TAKARADA *et al.*, 2004). Preparações testiculares também exibiram a capacidade de acumular glutamato de uma forma dependente de Na^+ . Além disso, evidenciaram a expressão do RNAm para os transportadores EAAC1, EAAT4 e EAAT5 no testículo de ratos, sendo a primeira demonstração direta da expressão do RNAm para todos os subtipos de GLUT clonados até a data referida. Os resultados atuais demonstram que o GLAST, GLT-1 e EAAT5 exibiram perfis de localização diferentes no testículo de ratos, como pode ser observado no SNC, argumentando em favor da ideia de que cada subtipo GLUT poderia desempenhar um papel peculiar aos subtipos individuais destes transportadores nos mecanismos associados com a manutenção da

integração e função de diferentes células localizadas no testículo (TAKARADA *et al.*, 2004)

Indícios recentes têm evidenciado um papel importante do glutamato mediando sinais extracelulares no sistema autócrino e/ou parácrino, em adição a um papel de neurotransmissor excitatório de aminoácidos no SNC (SKERRY *et al.*, 2001). Em analogia com a neurotransmissão nas sinapses glutamatérgicas centrais, a expressão de GLUTs parece ser essencial para mediar sinais de glutamato, isso se dá através de redução da concentração extracelular deste aminoácido. Por outro lado, os mecanismos subjacentes, bem como a possível transdução de sinal mediada pelo glutamato no testículo ainda não é conhecida. No SNC, GLUTs também são necessários para a atenuação das propriedades neurotóxicas do glutamato como uma excitotoxina endógena. Entretanto, se o glutamato é tóxico para células testiculares, como pode ser visto em neurônios, isso ainda não está elucidado (TAKARADA *et al.*, 2004).

Nessa linha, um estudo determinou a presença do principal neurotransmissor do SNC, o GABA, no epidídimo, na vesícula seminal e testículo de ratos adultos, bem como exercendo efeitos diretos na esteroidogênese e na viabilidade e mobilidade do esperma, devido à presença de receptores e transportadores para o GABA no tecido testicular. Como se sabe, o SNC e o sistema reprodutor masculino possuem barreiras sanguíneas (barreira hemato-encefálica e barreira hemato-testicular) e necessitam de concentrações adequadas de glicose sanguínea. Esse fenômeno é notório e interessante, mas vinculado a isso, esse mecanismo ainda permanece pouco claro. Hu e colaboradores (2004) demonstraram que o influxo de [¹⁴C]-glutamato é dependente de Na⁺, uma das características essenciais requeridas por transportadores de glutamato e ainda sugerem a existência de outros transportadores para este aminoácido além do GLT1. A existência de glutamato no testículo pode atuar como um precursor para o GABA, e desde que a enzima ácido glutâmico descarboxilase, uma enzima chave na síntese de GABA, foi expressa no testículo de diferentes espécies, postulou-se que a existência de glutamato e de receptores e transportadores no testículo que respondam a este aminoácido podem desempenhar funções fisiológicas importantes (PERSSON *et al.*, 1990).

Estudos evidenciaram que o glutamato endógeno foi detectado em um grande número de células nos testículos. Exceções notáveis incluem as células de Leydig, as quais acumulam o D-aspartato e expressam GLAST1, entretanto contêm pouco glutamato detectável. Isto pode ser

atribuído ao fenótipo glia semelhante destas células, uma vez que expressam níveis elevados de GS, uma enzima que metaboliza rapidamente qualquer glutamato disponível em glutamina (HOLASH *et al.*, 1993; VAN STRAATEN *et al.*, 2006). Baseado nisso, acredita-se que essa disparidade é imputável a atrasos na fixação do testículo, uma vez que tais atrasos na fixação normalmente causam um aumento nos níveis de glutamato em tecidos que expressam a GS (POW *et al.*, 1994). Pode-se esperar que outras células que expressam a enzima glutamato desidrogenase, necessária para a síntese de glutamato, tais como as células de Sertoli, podem conter elevadas concentrações detectáveis de glutamato (SPANAKI *et al.*, 2010). Lee e colaboradores (2011) observaram uma evidente falta de glutamato em células de Sertoli, o que é prontamente justificável devido ao fato de que o glutamato ou é rapidamente metabolizado em outros compostos, ou, plausivelmente (já que a glutamato desidrogenase é reversível), pode estar sendo conduzido ao catabolismo de glutamato com a consequente formação de α -cetoglutarato.

Várias funções têm sido propostas para o papel do glutamato, além das ações putativas como um “neurotransmissor” e como um osmólito. Estas funções incluem a produção de GABA e GSH. Dado que o GABA parece ser sintetizado tanto no esperma, como em células de Leydig, as quais, nesse contexto, são semelhantes à glia, seria compatível que a presença de GLAST1 seria importante a fim de fornecer glutamato para o processo de síntese de GABA em células de Leydig, enquanto vários transportadores de glutamato podem contribuir para disposição deste substrato no esperma (GEIGERSEDER *et al.*, 2003). Da mesma forma, níveis elevados de GSH, bem como a maquinaria sintética para produzi-la, estão presentes nos testículos, particularmente em células como as de Sertoli e as espermatogônias. Sendo assim, o presente estudo evidenciou um aumento no influxo de [14 C]-Glutamato, dependente de Na^+ , acompanhado de um aumento na atividade da GS mediado pelo ATPe, o que corrobora com os estudos desenvolvidos até o momento, fornecendo instrumentos para se compreender qual o real papel do glutamato no testículo, e como ele se correlaciona metabolicamente com as células presentes no sistema reprodutor masculino.

A GS, juntamente com a glutaminase, são as enzimas responsáveis pela síntese de glutamina a partir de glutamato. Esse mecanismo se dá mediante a catálise de conversão de glutamato em glutamina e da utilização da amônia como fonte de nitrogênio seguido do consumo de ATP. Sendo assim, a GS é a enzima chave para a síntese da glutamina e

para a regulação do metabolismo celular do nitrogênio. A GS é uma aminotransferase amplamente distribuída entre os organismos vivos, sendo sua atividade fundamental para a manutenção da vida de microrganismos e de animais. Os fatores que regulam a atividade da GS são diversos, tais como glicocorticoides, hormônios tireoidianos, hormônio do crescimento e insulina, dentre as quais, pode-se atribuir diferentes funções às ações mediadas pela modulação da atividade da GS. Nossos estudos evidenciaram que o ATPe induz um aumento na atividade da enzima GS em comparação ao grupo controle.

Nos testículos, a GS está presente em uma concentração elevada nas células de Leydig. Com base na presença adicional da proteína S-100 e a proteína ácida fibrilar da glia, as células de Leydig são atribuídas como possuindo uma função do tipo astrócitos, a qual pode ser responsável pela barreira hemato-testicular nos capilares (HOLASH *et al.*, 1993). A hibridação *in situ* revelou que além das células de Leydig, o RNAm da GS também está presente nas espermatídes durante a fase final de maturação (HENNY, *et al.*, 2006; LIE-VENEMA *et al.*, 1997).

Em 2011, Li e colaboradores, induziram estresse oxidativo, por meio de um agente desregulador endócrino: o dietilestilbestrol, em testículos de ratos imaturos com o objetivo de avaliar parâmetros importantes para a fisiologia testicular, dentre os quais podemos destacar a atividade da GS. Por conseguinte, o grupo verificou um aumento na atividade da GS no grupo tratado com o dietilestilbestrol. Esse dado está vinculado com o envolvimento da GS na síntese do principal combustível metabólico, bem como, envolvida na síntese de nucleotídeos. Já foi evidenciado, que durante o estresse oxidativo, os glicocorticóides induzem a atividade da GS em diferentes órgãos de ratos, incluindo os testículos, o que sugere que esta indução é uma resposta protetora contra a citotoxicidade resultante da amônia em excesso produzida por degradação de aminoácidos através de conversão da amônia em glutamina. A glutamina é um aminoácido não essencial, mas é muito utilizado como um combustível metabólico importante, bem como um precursor para a síntese de nucleotídeos em fibroblastos, linfócitos e macrófagos (ABCOUWER *et al.*, 1995). Foi identificado que nos estágios avançados do processo degenerativo, a síntese de proteínas envolvidas no estresse oxidativo não se altera (LI *et al.*, 2011). Esses dados corroboram com os resultados encontrados no presente estudo.

Sendo assim, com o intuito de compreender, pelo menos em parte, o efeito do ATPe e da Ado sobre o metabolismo energético, foram estudadas as ações destas purinas sobre a atividade das aminotransferases, AST e ALT. O presente estudo demonstrou que o ATPe altera a atividade da AST sem alterar a atividade da ALT, enquanto que a Ado não altera a atividade dessas aminotransferases. Estas enzimas são responsáveis pela conversão de aminoácidos como a alanina e o aspartato aos seus α -cetoácidos correspondentes (piruvato e oxaloacetato, respectivamente). Estes aminoácidos, assim como glutamina, leucina e valina são importantes para o metabolismo energético das células de Sertoli. Além disso, as células de Sertoli secretam o lactato, que irá suprir as necessidades energéticas das células germinativas (ALVES *et al.*, 2012). Neste contexto, a estimulação na atividade da AST pelo ATPe pode levar a alterações metabólicas importantes para o epitélio seminífero. Em virtude de o ATPe ter aumentado a atividade da AST, um possível déficit energético pode não estar relacionado com um desequilíbrio nos parâmetros oxidativos. Em outro segmento, quando referente à atividade da LDH, não se identificou alteração nem na exposição à Ado e nem ao ATPe, evidenciando que mesmo que o ATPe induza estresse oxidativo, não resulta em inviabilidade celular.

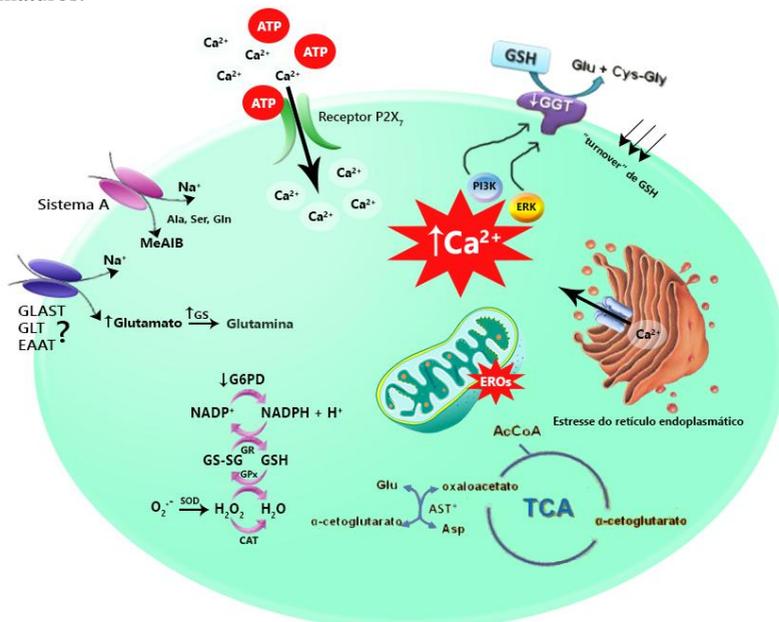
7.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Quando analisados em conjunto, os resultados obtidos neste estudo sugerem que o ATPe exerce ações modulatórias sobre o testículo de ratos imaturos, induzindo estresse oxidativo, aumento nos níveis intracelulares de Ca^{2+} levando a ruptura da homeostase do Ca^{2+} , e esse mecanismo se dá via interação com receptores do tipo P2X_7 , desencadeando a ativação de cascatas de sinalização celular envolvendo a via da PI3K e da MEK-ERK1/2, resultando na diminuição da atividade da γ -GT, aumento do influxo de [^{14}C]-glutamato acompanhado do aumento da atividade da GS, sem desencadear morte de células testiculares. A figura 21 representa, esquematicamente, o mecanismo de ação proposto para o ATPe em células testiculares em desenvolvimento.

Considerando as importantes funções modulatórias das purinas extracelulares sobre a proliferação e diferenciação de células testiculares, novos estudos se fazem necessários com o objetivo de elucidar o possível papel fisiológico, bem como o mecanismo de toxicidade mediado pelo ATPe em células testiculares, a fim de fornecer

suporte para o desenvolvimento de novas abordagens farmacológicas, e entendimento da sua correlação com as células testiculares.

Figura 21 - Mecanismo de ação proposto para o ATPe em testículos de ratos imaturos.



O ATPe leva ao acúmulo de Ca^{2+} intracelular e induz estresse oxidativo via oxidação de proteínas e aumento da peroxidação lipídica. Esse mecanismo se dá via interação com purinoceptores do tipo P2X₇ e através de mecanismos dependentes de efluxo de Ca^{2+} do retículo endoplasmático e da ativação de vias de sinalização da PI3K e MEK/ERK os quais resultam em uma modulação negativa sobre a atividade da γ -GT, e também da G6PD, sendo que a diminuição desta última limita os níveis de NADPH, importante doador de elétrons para biossínteses redutoras, tais como para a redução da GSSG em GSH. Além disso, o mecanismo mediado pelo ATPe está acoplado a um aumento no influxo de [¹⁴C]-Glutamato, aumento da atividade da GS.

Fonte: do autor

8 CONCLUSÕES

- ✓ O ATPe em concentrações não fisiológicas medeia ações mediante interação com purinoceptores do tipo P2X₇ e sua ativação se dá acoplado a um aumento do influxo de Ca²⁺ em células testiculares de ratos imaturos. Esse mecanismo resulta em estresse oxidativo, evidenciado pelo aumento da peroxidação lipídica e da oxidação de proteínas;
- ✓ Os mecanismos envolvidos no influxo de Ca²⁺ induzidos pelo ATPe são independentes de CCDV-L e dependentes da entrada deste íon, bem como de seu efluxo do retículo endoplasmático;
- ✓ O aumento na atividade da γ -GT induzido pelo ATPe são dependentes da ativação das vias de sinalização da PI3K e da ERK1/2;
- ✓ Os antioxidantes vitamina C, Trolox[®] e GSH (quando co-incubados com o ATPe) previnem a diminuição da atividade da γ -GT desencadeada pelo aumento do influxo de Ca²⁺ via interação do ATPe com seu respectivo receptor;
- ✓ O ATPe não afetou os sistemas de defesa antioxidante enzimáticos, com exceção da diminuição observada na atividade da G6PD, sugerindo-se que vias alternativas possam estar mediando o fornecimento de NADPH para a manutenção do conteúdo de GSH;
- ✓ Flutuações no influxo de Ca²⁺ participam de alguma forma no mecanismo de indução na atividade da γ -GT;
- ✓ O trocador NCX não está envolvido com o mecanismo pelo qual o ATPe modula a atividade da γ -GT;
- ✓ O sistema A de transporte de aminoácidos neutros, como a alanina, serina e glutamina, está envolvido com o mecanismo pelo qual o ATPe diminui a atividade da γ -GT, resultando, possivelmente, no bloqueio de sistema de transporte;
- ✓ O ATPe aumenta o influxo de [¹⁴C]-glutamato acompanhado de um aumento na atividade da GS e, conseqüentemente, aumenta a disponibilidade de glutamina no testículo. O sistema de transporte de aminoácidos A está parcialmente envolvido com o aumento do influxo de [¹⁴C]-glutamato mediado pelo ATPe;
- ✓ O ATPe altera a atividade da AST sem alterar a atividade da ALT e sem desencadear inviabilidade celular.

9 PERSPECTIVAS

Dando continuidade ao presente estudo, pretende-se elucidar as alterações fisiológicas mediadas pelo ATPe sobre o testículo de ratos imaturos, investigando-se os seguintes parâmetros:

- ✓ Verificar a expressão da proteína Nrf2 em testículos e em células de Sertoli de ratos imaturos, com o intuito de confirmar o envolvimento desta via na resposta ao estresse oxidativo mediado pelo ATPe;
- ✓ Estudar a influência do ATPe sobre a expressão e atividade das enzimas envolvidas na síntese e metabolismo da glutatona: gama-glutamilcisteína sintetase, glutatona sintetase e γ -GT;
- ✓ Estudar possíveis vias de sinalização alternativas que, além das determinadas no presente estudo, possam estar sendo moduladas pelo ATPe;
- ✓ Mensurar a atividade de enzimas do ciclo de Krebs e da via glicolítica em células testiculares de ratos imaturos, com o intuito de comprovar alterações no metabolismo energético, bem como elucidar seu papel na fisiologia testicular;
- ✓ Avaliar possíveis efeitos modulatórios do ATPe em células testiculares no hipotireoidismo, com a ressalva de que os hormônios tireoidianos participam de diversas funções testiculares;
- ✓ Evidenciar se concentrações menores de ATPe são capazes de induzir estresse oxidativo em testículos imaturos e em células de Sertoli;
- ✓ Identificar a expressão de transportadores glutamatérgicos do tipo GLAST e GLT-1 em células de Sertoli no desenvolvimento.

10 REFERÊNCIAS

- ABBRACCHIO M.P.; BURNSTOCK, G. ; VERKHRATSKY, A.; ZIMMERMANN, H. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. **Trends Neurosci.**, v.32, n.-, p.19–29, 2009.
- ABCOUWER, S.F.; BODE, B.P.; SOUBA, W.W. Glucocorticoids regulate rat glutamine synthetase expression in a tissue-specific manner. **J Surg Res.**, v.59, n.-, p.59-65, 1995.
- ABED, D.A.; GOLDSTEIN, M.; ALBANYAN H.; JIN, H.; HU, L. Discovery of direct inhibitors of Keap1-Nrf2 protein-protein interaction as potential therapeutic and preventive agents. **Acta Pharm Sin B.**, v.4, n.-, p.285-299, 2015.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.**, v. 204, p. 234–254, 1984.
- AGARWAL, A.; SALEH, R.A.; BEDAIWY, M.A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and sterility**, v. 79, n. 4, 2003.
- AHMAD M. K.; MAHDI, A.A.; SHUKLA, K.K.; ISLAM, N.; RAJENDER, S.; MADHUKAR, D.; SHANKHWAR, S.N.; AHMAD, S. Withania somnifera improves semen quality by regulating reproductive hormone levels and oxidative stress in seminal plasma of infertile males. **Fertil. Steril.**, v. 94, n. -, p. 989 – 996, 2010.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**, 6.ed, New York - NY, Garland Science, 2015.
- ALVES, M.G.; RATO, L.; CARVALHO, R.A.; MOREIRA, P.I.; SOCORRO, S.; OLIVEIRA, P.F. Hormonal control of Sertoli cell metabolism regulates spermatogenesis. **Cell Mol Life Sci.**, v.20, n.-, p.-, 2012.

ANTONIO, L.S.; COSTA, R.R.; GOMES, M.D.; VARANDA, W.A. Mouse Leydig cells express multiple P2X receptor subunits. **Purinergic Signal**, v.5, n.-, p.277–287, 2009.

ARAÚJO, A. S. R. **Influência do hipotireoidismo no Dano oxidativo e nas Defesas Antioxidantes**. Porto Alegre: Dissertação de mestrado. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002.

ARUOMA, O. I. Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants in Human Health and Disease. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 2, p. 199-212, 1998.

BANSAL A. K.; BILASPURI, G.S. Impacts of oxidative stress and antioxidants of semen functions. **Vet Med Int.**, v. -, n.-, p. 1-7, 2010.

BARBOSA, K.B.F.C. COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23 n.4, p. 629-643, 2010.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n.1, p. 113-123, 2006.

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

BEDWAL R.S.; BAHUGUNA A. Zinc, copper and selenium in reproduction. **Experientia**, v.50, n.-, p.626–640, 1994.

BEIS I.; NEWSHOLME E.A. The contents of adenine nucleotides, phosphagens and some glycolytic intermediates in resting muscles from vertebrates and invertebrates. **Biochem J** v.152, n.-, p.23–32, 1975.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 61, p. 882-90, 1963.

BIGONNESSE, F.; LÉVESQUE, S.A.; KUKULSKI, F.; LECKA, J.; ROBSON, S.C.; FERNANDES, M.J.; SÉVIGNY, J. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. **Biochemistry**, v.43, n.18, p.5511-5519, 2004.

BILBAO, P.S.; KATZ, S.; BOLAND, R. Interaction of purinergic receptors with GPCRs, ion channels, tyrosine kinase and steroid hormone receptors orchestrates cell function. **Purinergic Signaling**, v.8, n.1, p.91-103, 2012.

BIRD, R.P.; DRAPER, A.H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. **Methods Enzymol**, v. 90, n. 1, p. 105–10, 1984.

BJELOBABA, I.; JANJIC, M.M.; STOJILKOVIC, S.S. Purinergic signaling pathways in endocrine system. **Auton neurosci.**, v.191, n.-, p.102-116, 2015.

BOWLES, D.K.; TORGAN, C.E.; EBNER, S. Effect of acute, submaximal exercise on exercise on skeletal muscle vitamin E. **Free Radic Res Commun.**, v.14, p.139-143, 1991.

BURNSTOCK, G. Review lecture: Neurotransmitters and trophic factors in the autonomic nervous system. **J Physiol.**, v.313, n.-, p.1-35, 1981.

BURNSTOCK, G. Historical review: ATP as a neurotransmitter. **Trends Pharmacol Sci** v.27, n.-, p.166–176, 2006.

BURNSTOCK, G. Purinergic signaling in the lower urinary tract. **Acta Physiol (Oxf)**, v.207, n.1, p.40-52, 2012.

BURNSTOCK, G. Purinergic signaling: pathophysiology and therapeutic potential. **The Keio Journal of Medicine**, v.62, n.3, p.63-67, 2013.

BURNSTOCK, G. ATP-gated P2X receptors in health and disease. **Front cell Neurosci.**, v.8, n.-, p.1-2, 2014.

CARAFOLI, E.; GARCIA-MARTIN, E.; GUERINI, D. The plasma membrane calcium pump: recent developments and future perspectives. **Experientia**, v. 52, n.12, p.1091-100. 1996.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I.C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, n.-, p. 15-25, 2013.

CARPENTER, C.L.; DUCKWORTH, B.C.; AUGER, K.R.; COHEN, B.; SCHAFFHAUSEN, B.S.; CANTLEY, L.C. Purification and characterization of phosphoinositide 3-kinase from rat liver. **J Biol Chem.**, v.265, n.-, p.19704-19711, 1990.

CASALI, E.A.; DA SILVA, T.R.; GELAIN, D.P.; KAISER, G.R.; BATTASTINI, A.M.; SARKIS, J.J.; BERNARD, E.A. Ectonucleotidase activities in Sertoli cells from immature rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 34, n. 10, p. 1247-1256, 2001.

CASALI, E.A.; DE SOUZA, L.F.; GELAIN, D.P.; KAISER, G.R.; BATTASTINI, A.M.; SARKIS, J.J. Changes in ectonucleotidase activities in rat Sertoli cells during sexual maturation. **Mol. Cell. Biochem.**, v.247, n.-, p.111-119, 2003.

CASTELLO N, E.A. Glutathione and gamma-glutamyl cycle enzymes in rat testis during sexual maturation. **Arch Androl.**, v.33, n.-, p.179-185, 2003.

CHAVES, L. A. P.; PONTELLI E.P.; VARANDA, W.A. P2X receptors in mouse Leydig cells. **American Journal Physiology**, v.290, n.4, p.1009-1017, 2006.

CHENG, C.Y. ; MRUK, D.D. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. **Physiol Rev** v.82, n.-, p.825-874, 2002.

CLERMONT, Y.; PEREY, B. Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. **Am J Anat.**, v.100, n.-, p.241-267, 1957.

- CONTI, M.; BOITANI C.; DEMANNO, D.; MIGLIACCIO, S.; MONACO, L.; SZYMECZEK, C. Characterization and function of adenosine receptors in the testis. **Ann NY Acad Sci.**, v.564, n.-, p.39-47, 1989.
- CONTI, M.; CULLER, M.D.; NEGRO-VILAR, A. Adenosine receptor-dependent modulation of inhibin secretion in cultured immature rat Sertoli cells. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.59, n.-, p.255–259, 1988.
- CONTI, M.; MONACO, L.; GEREMIA, R.; STEFANINI, M. Effect of phosphodiesterase inhibitors on Sertoli cell refractoriness : reversal of the impaired androgen aromatization. **Endocrinology**, v.118, n.3, p.901-908, 1986.
- COSTA, M.J.; MONTEIRO, D.A.; OLIVEIRA-NETO, A.L.; RANTIN, F.T.; KALININ, A.L. Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original. **Ecotoxicology**, v. 17, p. 153-163, 2008.
- COSTA, A.P.; TRAMONTINA, A.C.; BIASIBETTI, R.; BATASSINI, C.; LOPES, M. W.; WARTCHOW, K.M.; BERNARDI, C. TORTORELLI, L.S.; LEAL, R.B.; GONÇALVES, C.A. Neuroglial 110 alterations in rats submitted to the okadaic acid-induced model of dementia. **Behav. Brain Res.**, v. 226, p. 420-427, 2012,
- CRUZ, C.M.; RINNA, A.; FORMAN, H.J.; VENTURA, A.L.; PERSECHINI, P.M.; OJCIUS, D.M. ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. **J Biol Chem** v.282, n.5, p.2871–2879, 2007.
- DAHIA, C.L.; RAO, A.J. Regulation of FSH receptor, PKIbeta, IL-6 and calcium mobilization: possible mediators of differential action of FSH. **Mol Cell Endocrinology**, v.247, n.-,p.73-81, 2006.
- DAMMEYER, P.; ARNÉR, E.S. Human protein Atlas of redox system – What can be learnt? **Biochimica et Biophysica Acta**, v. -, n. -, p. 11-25, 2010.

DANBOLT, N.C. Glutamate uptake. **Prog Neurobiol.**, v.65, n.-, p.1–105, 2001.

DARLING, N.J.; COOK, S.J. The role of MAPK signaling pathways in the response to endoplasmic reticulum stress. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1843, n.-, p.2150-2163, 2014.

D'AUTRÉAUX, B.; TOLEDANO, M.B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.8, n.10, p.813–824, 2007.

DE LAMIRANDE E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODOMA, H.; GAGNON, C. Reactive oxygen species (ROS) and sperm physiology. **Rev Reprod.**, v.2, n.-, p.48-54, 1997.

DENLINGER, L.C.; FISETTE, P.L.; GARIS, K.A. Regulation of inducible nitric oxide synthase expression by macrophage purinoreceptors and calcium. **J Biol Chem.**, v.271, n.-, p.337-342, 1996.

DONG, W.L.; TAN, F.Q.; YANG W.X. Wnt signaling in testis development: Unnecessary or essential? **Gene**, v.565, p.155-165, 2015.

DONNELLY-ROBERTS, D.L.; NAMOVIC, M.T.; HAN, P.; JARVIS, M.F. Mammalian P2X7 receptor pharmacology: comparison of recombinant mouse, rat and human P2X7 receptors. **Br J Pharmacol** v.157, n.-, p.1203–1214, 2009.

DROZDZ, R.; PARMENTIER, C.; HACHAD, H.; LEROY, P.; SIEST, G.; WELLMAN, M. Gamma-glutamyltransferase dependent generation of reactive oxygen species from a glutathione/transferrin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 25, n. 7, p. 786–792, 1998.

DUARTE T. L.; JONES, G.D. Vitamin C modulation of H₂O₂-induced damage and iron homeostasis in human cells. **Free Radic Biol Med.**, v. 43, n.8, p. 1165-75, 2007.

DUBYAK, G.R.; EL-MOATASSIM, C. Signal transduction via P₂-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. **American Journal of Physiology**, v.265, n.3, p.577-606, 1993.

ERB L.; WEISMAN, G.A. Coupling of P2Y receptors to G proteins and other signaling pathways. **Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal** v.1, n.6, p.789–803, 2012.

ESKILD, W.; REE, A.H.; LEVY, F.O.; JAHNSEN, T.; HANSSON, V. Cellular localization of mRNAs for retinoic acid receptor-alpha, cellular retinol-binding protein, and cellular retinoic acid-binding protein in rat testis: evidence form germ cell-specific mRNAs. **Biol Reprod.**, v.44, n.1, p.53-61, 1991.

ESKIOCAK, S.; FALASCA, M.; MAFFUCCI, T. Role of as class II phosphoinositide 3-kinase in cell signalling. **Biochem Soc Trans.**, v. 35, n.2, p. 211-214, 2007.

FAUST D., C.; SCHIMITT, C.; OESCH, F.; OESCH-BARTLOMOWICZ, B.; SCHRECK, I.; WEISS, C.; DIETRICH, C. Differential p38-dependent signalling in response to cellular stress and mitogenic stimulation in fibroblasts. **Cell Commun. Signal.**, v.10, n.-, p.6, 2012.

FAWCETT, D.W. Sistema Reprodutor Masculino. Em: Tratado de Histologia. 11 ed. México: Interamericana-McGraw-Hill, cap. 31, p. 802-857, 1993.

FAWCETT, D.W. In: **A Textbook of histology**, 12. ed. Chaoman & Hall, New York, p. 770-772. 1994.

FAWCETT, D.W.; LEAK, L.V.; HEIDGER, P.M.J. Electron microscopic observations on the structural components of the blood-testis barrier. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**. v. 10, p. 105-122, 1970.

FERNANDES, R.O. **Hipertrofia cardíaca induzida pelo hipertireoidismo experimental: papel do estado redox sobre proteínas envolvidas em vias de sinalização intracelular para crescimento, sobrevivência e morte celular.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

FILIPPINI, A.; RICCIOLI A.; DE CESARIS, P.; PANICCIA, R.; TETI, A.; STEFANINI, M.; CONTI, M.; ZIPARO, E. Activation of inositol

phospholipid turnover and calcium signaling in rat Sertoli cells by P2-purinergic receptors: modulation of follicle-stimulating hormone responses. **Endocrinology**, v.134, n.-, p.1537–1545, 1994.

FILIPPINI, A.; TAFFS, R.E.; AQUI, T.; SITKOVSKY, M.V. Ecto-ATPase activity in cytolytic T-lymphocytes. Protection from the cytolytic effects of extracellular ATP. **J Biol Chem.**, v.265, n.1, p.334-340, 1990.

FIX, C.; JORDAN, C.; CANO, P.; WALKER, W.H. Testosterone activates mitogen activated protein kinase and the cAMP response element binding protein transcription factor in Sertoli cells. **Proc Natl Acad Sci.**, v.101, n.-, p.10919-10924, 2004.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W.A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol.**, v. 105, n.1, p. 114–121, 1984.

FORESTA, C.; ROSSATO M.; BORDON, P.; DI VIRGILIO, F. Extracellular ATP activates different signalling pathways in rat Sertoli cells. **Biochem. J.**, v.311, n.1, p.269–274, 1995.

FORESTA, C. ROSSATO M.; NOGARA, A.; GOTTARDELLO, F.; BORDON, P.; DI VIRGILIO, F. Role of P2-purinergic receptors in rat Leydig cell steroidogenesis. **Biochem. J.**, v.320, n.2, p.499–504, 1996.

FORMAN, H. J.; URSINI, F.; MAIORINO, M. An overview of mechanisms of redox signaling. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 73, p. 2-9, 2014.

FORMAN, H. J.; ZHANG, H.; RINNA, A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. **Mol Aspects Med**, v. 30, p. 1-12, 2009.

GALARDO, M.N.; RIERA, M.F.; PELLIZZARI, E.H.; SOBARZO, C.; SCARCELLI, R.; DENDUCHIS, B.; LUSTIG, L.; CIGORRAGA, S.B.; MERONI, S.B.; Adenosine regulates Sertoli cell function by activating AMPK. **Mol Cell Endocrinol.**, v.330, n.2, p.49-58, 2010.

- GEIGERSEDER, C.; DOEPNER, R.; THALHAMMER, A.; FRUNGIERI, M.B.; GAMEL-DIDELON, K. Evidence for a GABAergic system in rodent and human testis local GABA production and GABA receptors. **Neuroendocrinology**, v.77, n.-, p.314-323, 2003.
- GELAIN, D.P.; CASALI, E.A.; DE OLIVEIRA, R.B.; DE SOUZA, L.F.; BARRETO, F.; DAL-PIZZOL, F.; MOREIRA, J.C. Effects of follicle-stimulating hormone and vitamin A upon purinergic secretion by rat Sertoli cells. **Mol Cell Biochem.**, v.278, n.1, p.185-194, 2005.
- GELAIN, D.P.; DE SOUZA, L.F.; BERNARD, E.A. Extracellular purines from cells of seminiferous tubules. **Mol. Cell. Biochem.**, v.245, n.-, p.1-9, 2003.
- GLASS, R.; BARDINI, M.; ROBSON, T.; BURNSTOCK, G. Expression of nucleotide P2X receptor subtypes during spermatogenesis in the adult rat testis. **Cells Tissues Organs** v.169, n.-, p.377-387, 2001.
- GONZALES, J.; MUNOZ, M.E.; MARTIN, M.I.; COLLADO, P.S.; FERMOSE, J.; ESTELLER, A. Influence of acute ethanol administration on hepatic glutathione metabolism in the rat. **Alcohol.**, v. 5, p. 103-106, 1988.
- GOODE, H.F.; COWLEY, H.C. & WALER, B.E. Decrease antioxidant status and peroxidation in patient with septic shock and secondary organ dysfunction. **Crit Care Med.**, v. 23, p. 646-651, 1995.
- GORCZYNSKA, E.; HANDELSMAN, D.J. The role of calcium in FSH signal transduction in Sertoli cells. **Journal of Biological Chemistry**, v.266, n.-, p.23739-23744, 1991.
- GORDON, E.L.; PEARSON, J.D.; SLAKEY, L.L.; The hydrolysis of extracellular adenine nucleotides by cultured endothelial cells from pig aorta. Feed-forward inhibition of adenosine production at the cell surface. **J Biol Chem.**, v.261, n.33, p.15496-15507, 1986.
- GRASSO, P.; REICHERT, L.E. FSH 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**, v.127, n.-, p.949-956, 1989.

GRISWOLD, M.D.; HECKERT, L.; LINDER, C. The molecular biology of the FSH receptor. **J Steroid Biochem Mol Biol.**, v.53, n.1, p.215-218, 1995.

GRISWOLD, M.D.; MABLY, E.R.; FRITZ, I.B. FSH stimulation of DNA synthesis in Sertoli cells in culture. **Mol Cell Endocrinol.**, v.4, n.3, p . 139-149, 1976

GUARATINI, T.; MEDEIROS, M.H.G.; COLEPICCOLO, P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 206-213, 2007.

HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JAKOBY, W.B. Glutathione S-transferase AA from rat liver. **Arch Biochem Biophys.**, v.175, n.2, p.710-716, 1976.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **Journal of Neurochemistry**, v.97, n.-, p. 1634-1658, 2006.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol.**, v.142, n.2, p.231-55, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, 2007.

HAWKINS, P.T.; ANDERSON K.E.; DAVIDSON K.; STEPHENS L.R. Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. **Biochemical Society Transactions**, v.34, n.-, p. 647- 662, 2006.

HENNY, W.M.; HE, Y.; VAN DUIST, M.M.; LABRUYÈRE W.T.; VERMEULEN, J.L.; VAN DIJK, P.J.; RUIJTER, J.M.; LAMERS, W.H.; HAKVOORT, T.B. Cellular concentrations of glutamine synthetase in murine organs. **Biochemistry and Cell Biology**, v.84, n.-, p.215-231, 2006.

HESS, R.A.; RENATO DE FRANCA, L. Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. **Molecular Mechanisms in Spermatogenesis**. Austin: Landes Bioscience/Springer Science, cap. 1, p. 1-15, 2008.

HEWINSON, J.; MOORE, S.F.; GLOVER, C.; WATTS, A.G; MACKENZIE, A.B. A key role for redox signaling in rapid P2X7 receptor-induced IL-1 β processing in human monocytes. **The Journal of Immunology**, v.180, n.12, p.8410-8420, 2008.

HINTON, B.T. The testicular and epididymal luminal amino acid microenvironment in the rat. **J Androl.**, v.11, n.-, p.498–505, 1990.

HODGEN, G.D.; SHERINS, R.J. Enzymes as markers of testicular growth and development in the rat. **Endocrinology**, v.93, n.-, p.985-989, 1973.

HOLASH, J.A.; HARIK S.I.; PERRY G.; STEWART P.A. Barrier properties of testis microvessels. **Proc Natl Acad Sci.**, v.90, n.-, p.11069–11073, 1993.

HU, Y.; FISETTE, P.L.; DENLINGER, L.C. Purinergic receptor modulation of lipopolysaccharide signaling and inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages. **J Biol Chem.**, v.273, n.-, p.27170-27175, 1998.

HU, J.H.; YANG, N.; MA, Y.H.; JIANG, J.; ZHANG, J.F.; FEI, J.; GUO, L.H. Identification of glutamate transporters and receptors in mouse testis. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.25, n.3, p.366-371, 2004.

HUANG H.Y. ; APPEL L.J.; CROFT K.D.; MILLER E.R.; MORI T.A. ; PUDDEY I.B. Effects of vitamin C and vitamin E on in vivo lipid peroxidation: results of randomized controlled trial. **Am J Clin Nutr.** v. 76, n.3, p. 549-55, 2002.

HUBER, P. C; ALMEIDA, W.P.; FÁTIMA, A. Glutaciona e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.

HYDE, R.; PEYROLLIER, K.; HUNDAL, H.S. Insulin Promotes the Cell Surface Recruitment of the SAT2/ATA2 System A Amino Acid Transporter from an Endosomal Compartment in Skeletal Muscle Cells. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 16, n. April 19, p. 13628-13634. 2002.

IMHOF M.; LACKNER, M.; LIPOVAC, P.; CHEDRAUI, C. Micronutrient supplementation increases sperm quality in the sub-fertile male. **Europ Urol Rev.**, v.6, n.-, p. 120-123, 2011.

JACOBUS, A P.; LOSS, E.S.; WASSERMANN, G.F. Pertussis toxin nullifies the depolarization of the membrane potential and the stimulation of the rapid phase of 45Ca^{2+} entry through L-type calcium channels that are produced by follicle stimulating hormone in 10- to 12-day-old rat sertoli cells. **Frontiers in Physiology**, v.1, n.138, p.1-11, 2010.

JÉGOU, B.; SHARPE, R.M. Paracrine mechanisms in testicular control. **Molecular Biology of the Male Reproductive System**, v.-, n.-, p.271-310, 1993.

JENSEN, K.; JOHNSON, L.A.; JACOBSON, P.A.; KACHLER, S.; KIRSTEIN, M.N.; LAMBA, J.; KLOTZ, K.N. Cytotoxic purine nucleoside analogues bind to A1, A2A, and A3 adenosine receptors. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, v.385, n.5, p.519-525, 2012.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Basic Histology: Text and Atlas**, 10a ed. Nova Iorque: McGraw-Hill, 2003.

JUTTE, N.H.P.M.; GROOTEGOED, J.A.; ROMMERTS, F.F.G.; VAN DER MOLEN, H.J. Exogenous lactate is essential for metabolic activities in isolated rat spermatocytes and spermatids. **J Reprod Fert.**, v.62, n.-, p.399-405, 1981.

KHANNA, N.C.; TOKUDA, M.; WAISMAN, D.M.. The role of calcium binding protein in signal transduction. In: COOKE, B.A.; KING, R.J.B.; VAN DER MOLEN, H.J. **Hormone and their actions**. Parte II, p. 63, 1988.

KIM, E.K.; CHOI E.J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1802, n.-, p.396-405, 2010.

KO, W.H.; CHAN, H.C.; CHEW, S.B.; WONG, P.Y. Regulated anion secretion in cultured epithelia from Sertoli cells of immature rats. **J. Physiol.**, v.512, n.2, p.471-480, 1998.

KO, W.H.; AU, C.L.; YIP, C.Y. Multiple purinergic receptors lead to intracellular calcium increases in cultured rat Sertoli cells. **Life Sciences**, v.72, n.-, p.1519–1535, 2003.

KRASILKINOV, M. A. Phosphatidylinositol-3 Kinase Dependent pathways: the role in control of cell growth, survival, and malignant transformation. **Biochemistry (Moscow)**, v.65, n.1, p.59-67. 2000.

KRAUSS, G. Intracellular Messenger Substances: “Second Messengers”. In: **Biochemistry of Signal Transduction and Regulation**. 3 ed. Darmstadt: Druckhaus Darmstadt GmbH, 2003.

KRAWETZ, S.A.; DE ROOIJ, D.G.; HEDGER, M.P. Molecular aspects of male fertility. International Workshop on Molecular Andrology. **European Molecular Biology Organization Reports**, v. 10, n.-, p. 1087- 1092, 2009.

KUMAR, T.R.; WISEMAN, A.L.; KALA, G.; KALA, S.V.; MATZUK, M.M.; LIEBERMAN, M.W. Reproductive defects in gamma-glutamyl transpeptidase - deficient mice. **Endocrinology**, v.141, n.-, p.4270-4277, 2000.

LALEVÉE, N.; ROGIER, C.; BECQ, F.; JOFFRE, M. Acute effects of adenosine triphosphates, cyclic 3',5'-adenosine monophosphates, and follicle-stimulating hormone on cytosolic calcium level in cultured immature rat sertoli cells. **Biology of Reproduction**, v.61, n.2, p.343-352, 1999.

LEE, A; ANDERSON A.R.; BARNETT A.C.; CHAN A.; POW D.V. Expression of multiple glutamate transporter splice variants in the rodent testis. **Asian Journal of Andrology**, v.13, n.-, p.254-265, 2011.

LENERTZ, L. Y.; GAVALA, M. L.; HILL, L. M.; BERTICS, P. J. Cell signaling via the P2X7 nucleotide receptor: linkage to ROS production, gene transcription and receptor trafficking. **Purinergic Signaling**, v.5, n.-, p.175-187, 2009.

LENERTZ, L. Y.; GAVALA, M. L.; ZHU, Y.; BERTICS, P. J. Transcriptional control mechanisms associated with the nucleotide receptor P2X7, a critical regulator of immunologic, osteogenic, and neurologic functions. **Immunol Res.**, v.50, n.1, p.22-38, 2011.

LEWIS, S.E.; BOYLE P.M.; MCKINNEY K.A.; YOUNG I.S.; THOMPSON W. Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. **Fertil Steril.**, v.64, n.4, p.868-70, 1995.

LI, M.W.M.; MRUK D.D.; CHENG C.Y. Mitogen-activated protein kinases in male reproductive function. **Trends in Molecular Medicine**, v.15 n.4, p. 159-168, 2011.

LIE-VENEMA, H.; DE BOER, P.A.; MOORMAN, A.F.; LAMERS, W.H. Role of the 5' enhancer of the glutamine synthetase gene in its organ-specific expression. **Biochem. J.**, v.323, n.-, p.611-619, 1997.

LIMA, E. S.; SAES P.; ABDALLA P.; ABDALLA D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LIU, P.; CHENG H.; ROBERTS T.M.; ZHAO J.J. Targeting the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway in cancer. **Nat Rev Drug Discov.**, v.8, n.8, p.627-644, 2009.

LOIR, M. Spermatogonia of rainbow trout: III. In vitro study of the proliferative response to extracellular ATP and adenosine. **Mol. Reprod. Dev.**, v.53, n.-, p.443-450, 1999.

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

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-267, 1951.

LU C.; STEINBERGER, A. Gamma-glutamyl transpeptidase activity in the developing rat testis. Enzyme localization in isolated cell types. **Biol Reprod.**, v.17, n.-, p.84-88, 1977.

MACKENZIE, A.B.; YOUNG, M.T.; ADINOLFI, E. Pseudoapoptosis induced by brief activation of ATP-gated P2X7 receptors. **J Biol Chem.**, v.280, n.-, p.33968-33976, 2005.

MAGUERESSE, B.J.; JÉGOU, B. In vitro effects of germ cells on the secretory activity of Sertoli cells recovered from rats of different ages. **Endocrinology**, v.122, n.-, p.1672-1680, 1988.

MAJUMDAR, S.S.; BARTKE, A.; STUMPF, W.E. Vitamin D modulates the effects of follicle-stimulating hormone on Sertoli cell function and testicular growth in Siberian hamsters. **Life Sciences**, v.55, n.19, p.1479-1486, 1994.

MARES, V.; MALÍK, R.; LISÁ, V.; SEDO, A. Up-regulation of gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) activity in growth perturbed C6 astrocytes. **Molecular Brain Research**, v.136, p.75-80, 2005.

MARTEL-GALLEGOS, G.; CASAS-PRUNEDA G.; ORTEGA-ORTEGA, F; SANCHEZ-ARMASS, S.; OLIVARES-REYES, J.A.; DIEBOLD, B.; PÉREZ-CORNEJO, P.; ARREOLA, J. Oxidative stress induced by P2X7 receptor stimulation in murine macrophages is mediated by c-Src/Pyk2 and ERK1/2. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1830, n.-, p.4650-4659, 2013.

MARTIN-SATUE, M.; LAVOIE E.G.; PELLETIER J.; FAUSTHER M.; CSIZMADIA E.; GUCKELBERGER O.; ROBSON S.C. ; SÉVIGNY J. Localization of plasma membrane bound NTPDases in the murine reproductive tract. **Histochem. Cell Biol.**, v.131, n.-, p.615-628, 2009.

MATTOS, G.E. **Vias de sinalização e efeito biológico da corticotropina (ACTH), do peptídeo NH2-terminal da pró-**

opiomelanocortina (N-POMC) e do fator de crescimento de fibroblastos (FGF2) em culturas primárias de células da suprarenal de ratos. Tese de doutorado, USP, São Paulo, 2011.

MERONI, S.; CÁNEPA, D.; PELLIZZARI, E.; SCHTEINGART, H.; CIGORRAGA, S. Regulation of γ -glutamyl transpeptidase activity by Ca^{2+} and protein kinase C-dependent pathways in Sertoli Cells. **International Journal of Andrology**, v.20, n.-, p.189-194, 1997.

MERONI, S.; CÁNEPA, D.; PELLIZZARI, E.; SCHTEINGART, H.; CIGORRAGA, S. Effects of purinergic agonists on aromatase and gamma-glutamyl transpeptidase activities and on transferrin secretion in cultured Sertoli cells. **J Endocrinol.**, v. 157, n.2, p.275-283, 1998.

MERONI, S.B.; SUBURO A.M.; CIGORRAGA S.B. Interleukin-1 β Regulates Nitric Oxide Production and γ -Glutamyl Transpeptidase Activity in Sertoli Cells. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 855-861, 2000.

MERONI, S.B.; RIERA, M.F.; PELLIZZARI, E.H.; CIGORRAGA, S.B. Regulation of rat Sertoli cell function by FSH: possible role of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. **J Endocrinology**, v.174, n.2, p. 195–204, 2002.

MILBURN, C. C.; DEAK M.; KELLY S.M.; PRICE N.C.; ALESSI D.R.; VAN AALTEN D.M. Binding of phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate to the pleckstrin homology domain of protein kinase B induces a conformation change. **Biochem J. Nov.**, v.375, n.3, p.531-538, 2003.

MINELLI, A.; LIGUORI, L.; BELLAZZA, I.; MANNUCCI, R.; JOHANSSON, B.; FREDHOLM, B.B. Involvement of A1 adenosine receptors in the acquisition of fertilizing capacity. **J. Androl.**, v.25, n.2, p.286-292, 2004.

MONACO, L.; CONTI, M. Localization of adenosine receptors in rat testicular cells. **Biol Reprod.**, v.35, n.-, p.258-266, 1986.

MONACO, L.; DEMANNO, D.A.; MARTIN, M.W.; CONTI M. Adenosine inhibition of the hormonal response in the Sertoli cell is

reversed by Pertussis toxin. **Endocrinology**, v.122, n.-, p.2692–2698, 1988.

MONACO, L.; TOSCANO. M.V.; CONTI, M. Purine modulation of the hormonal response of the rat Sertoli cell in culture. **Endocrinology**, v.115, n.4, p.1616-1624, 1984.

MORAKINYO, A.O.; TEÓFILO J.M.; ANSELMO FRANCI J.A.; BRENTGANI L.G.; LAMANO-CARVALHO T.L. Antireproductive effect of calcium channel blockers on male rats. **Reproductive Medicine and Biology**, v.8, p 97-102, 2009.

MORAKINYO, A.O. IRANLOYE B.O.; DARAMOLA A.O.; ADEGOKE O.A. Antifertility effect of calcium channel blockers on male rats: association with oxidative stress. **Advances in Medical Sciences**, v.56 n.1, p 95-105, 2011.

MRUK, D.D.; CHENG, C.Y. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. **Endocr Rev** v.25, n.-, p.747–806, 2004.

MULDER, E.; PETERS, M.J.; VAN BEURDEN, W.M.; GALDIERI, M.; ROMMERTS, F.F.; JANSZEN, F.H.; VAN DER MOLEN, H.J. Androgen receptors in isolated cell preparations obtained from rat testicular tissue. **J endocrinol.**, v.70, n.2, p.331-342, 1976.

MUSHAHWAR, I.K.; KOEPPE RE. Free amino acids of testes— concentrations of free aminoacids in the testes of several species and the precursors of glutamate and glutamine in rat testes in vivo. **Biochem J.**, v.132, n.-, p.353–9, 1973.

NETTER, Frank H. Atlas de Anatomia Humana. 2ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

NEWTON, A.C., Protein Kinase C: Structure, Function, and Regulation. **The Journal of Biological Chemistry**, v.270, n48, p.28495-28498, 1995.

NORTH, R.A. Molecular physiology of P2X receptors. **Physiol Rev.**, v.82, n.-, p.1013–1067, 2002.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem.**, v.95, n.2, p.351-358, 1979.

ORCY, R. B.; SCHROEDER S.; MARTINS-COSTA S.H.; RAMOS J.G.; SCHECHINGER W.; KLEIN H.; BRUM I.S.; VON EYE CORLETA H.; CAPP E. Signalization of Akt/PKB in the placenta, skeletal muscle and adipose tissue of preeclampsia patients. **Gynecol Obstet Invest.**, v.66, n.-, p.231-236, 2008.

ORTH, J.M. The role of follicle-stimulating hormone in controlling Sertoli cell proliferation in testis of fetal rats. **Endocrinology**, v.115, n.-, p.1248-1255, 1984.

ORTH, J.M. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: A quantitative autoradiographic study. **Anat Rec.**, v.203, n.-, p.485-492, 1982.

PADRON, O.F.; BRACKETT, N.L.; SHARMA, R.K.; LYNNE, C.M.; THOMAS, A.J.J.; AGARWAL, A. Seminal reactive oxygen species, sperm motility and morphology in men with spinal cord injury. **Fertil Steril.**, v.67, n.-, p.1115–20, 1997.

PALLADINO, M.A.; LAPERCHÉ Y.; HINTON B.T. Multiple Forms of Gamma-Glutamyl Transpeptidase Messenger Ribonucleic Acid Are Expressed in the Adult Rat Testis and Epididymis. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 320-328, 1994.

PALMERO, S.; PRATI, M.; BOLLA, F.; FUGASSA, E. Tri-iodothyronine directly affects rat Sertoli cell proliferation and differentiation. **J. Endocrinol.**, v.145, n.2, p.355-362, 1995.

PERSSON, H.; PELTO-HUIKKO, M.; METSIS, M.; SODER, O.; BRENE, S.; SKOG, S.; HOKFELT, T.; RITZÉN, E.M. Expression of the neurotransmitter-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase in male germ cells. **Mol Cell Biol.**, v.10, n.-, p.4701–11, 1990.

PETERSEN, O.H.; PETERSEN, C.C.H.; KASAI, H. Calcium and hormone action. **Annual Review of Physiology**, v. 14, n.-, p. 297-319, 1994.

PFEIFFER, Z.A.; AGA, M.; PRABHU, U. The nucleotide receptor P2X7 mediates actin reorganization and membrane blebbing in RAW 264.7 macrophages via p38 MAP kinase and Rho. **J Leukoc Biol.**, v.75, n.-, p.1173-1182, 2004.

PFEIFFER, Z.A.; GUERRA, A.N.; HILL, L.M.; GAVALA, M.L.; PRABHU, U.; AGA, M.; HALL, D.J.; BERTICS, P.J. Nucleotide receptor signaling in murine macrophages is linked to reactive oxygen species generation. **Free Radic Biol Med** v.42, n.10, p.1506–1516, 2007.

POW, D.V.; CROOK, D.K. Rapid postmortem changes in the cellular localization of amino acid transmitters in the retina as assessed by immunocytochemistry. **Brain Res.**, v.653, n.-, p.199-209, 1994.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacol. Rev.**, v.50, n.3, p.413-492, 1998.

RIVKEES S.A. Localization and characterization of adenosine receptor expression in rat testis. **Endocrinology**, v.135, n.-, p.2307–2313, 1994.

ROBSON, S. C.; SÉVIQNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, v.2, n.-, p.409-430, 2006.

ROSSATO, M.; MERICO, M.; BETTELLA, A.; BORDON, P.; FORESTA, C. Extracellular ATP stimulates estradiol secretion in rat Sertoli cells in vitro: modulation by external sodium. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.178, n.-, p.181–187, 2001.

ROSSATO, M.; LA SALA, G.B.; BALASINI, M.; TARICCO, F.; GALEAZZI, C.; FERLIN, A.; FORESTA, C. Sperm treatment with extracellular ATP increases fertilization rates in in-vitro fertilization for male factor infertility. **Hum Reprod.**, v.14, n.3, p.694-697, 1999.

ROVER JUNIOR, L.; HOEHR, N.F.; VELLASCO, A.P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathione associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p.112-119, 2001.

RUDGE, S.A.; HUGHES, P.J.; BROWN, G.R.; MICHELL, R.H.; KIRK, C.J. Inositol lipid-mediated signalling in response to endothelin and ATP in the mammalian testis. **Mol. Cell. Biochem.**, v.149, n.150, p.161-174, 1995.

RUSSELL, L.D.; ETTLIN, R.A.; SINHA HIKIN, A.P.; CLEGG, E.D. Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. 1. Clearwater, Fla.: Cache River Press, 286p, 1990.

SABORN, B.M.; WAGLE, J.R.; STEINBERGER, A.; GREER-EMMERT D. Maturation and hormonal influences on Sertoli cell function. **Endocrinology**, v.118, n.-, p.1700-1709, 1986.

SAINO, T.; MATSUURA, M., SATOH, Y.I. Comparison of the effect of ATP on intracellular calcium ion dynamics between rat testicular and cerebral arteriole smooth muscle cells. **Cell Calcium**, v.32, n.3, p.153-156, 2002.

SÁNCHEZ, G.M. Ambiente anti-oxidante/pro-oxidante su impacto medico. 1ª ed. Aracne, 2012.

SCHWARTZ, Z.; EHLAND, H.; SYLVIA V.L.; LARSSON D.; HARDIN R.R.; BINGHAM V.; LOPEZ D.; DEAN D.D.; BOYAN B.D. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 and 24R,25-dihydroxyvitamin D3 modulate growth plate chondrocyte physiology via protein kinase C dependent phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase. **Endocrinology**. v. 143, p.2775-2786, 2002.

SCHNEIDER, E.M.; VORLAENDER, K.; MA, X. Role of ATP in trauma-associated cytokine release and apoptosis by P2X7 ion channel stimulation. **Ann N Y Acad Sci.**, v.1090, n.-, p.245-252, 2006.

SCHTEINGART, H.F.; CIGORRAGA, S.; LEON, M.; MOYA, S.; PELLIZZARI, E.; CHEMES, H.; RIVAROLA, M.A. Hormonal and

paracrineregulation of rat Sertoli cell c-Glutamyl Transpeptidase `invitro'. **5th European Workshop on Molecular and Cellular Endocrinology of the Testis**. Brighton, U.K. Abstract G15, 1988.

SCHTEINGART, H.F.; RIVAROLA, M.A.; CIGORRAGA, S.B. Hormonal and paracrine regulation of gamma-glutamyl trans-peptidase in rat Sertoli cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.67, n.-, p.73-80, 1989.

SEELAND, S.; KETTIGER, H.; TREIBER A.; GILLER J.; KISS, A.; SUBE, R.; KRAHENBUHL, S.; HAFNER M.; HUWYLER J. ATP-induced cellular stress and mitochondrial toxicity in cells expressing purinergic P2X7 receptor. **Pharmacology Research & Perspectives**, v.3, n.2, p.1-13, 2015.

SHAPIRO, B.M.; STADTMAN, E.R. The regulation of glutamine synthesis in microorganisms. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 24, p. 501-524, 1970.

SHARMA RK, AGARWAL A. Role of reactive oxygen species in male infertility [review]. **Urology**, v.48, n.-, p.835-850, 1996.

SIKKA, S.C. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. **Front Biosci.**,v.1, n.-, p.78–86 1996.

SIKKA, S. C. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. **Curr Med Chem.**, v.8, n.-, p.851-862, 2001.

SKERRY, T.; GENEVER, P.; TAYLOR, A.; DOBSON, K.; MASON, D.; SUVA, L. Absence of evidence is not evidence of absence. The shortcomings of the GLAST knockout mouse. **J. Bone Miner Res.**, v.16, n.9, p.1729-1730, 2001.

SKINNER, M.K. Cell–cell interactions in the testis. **Ann NY Acad Sci.**, v.513, n.-, p.158–171, 1987.

SOUZA, C. O.; SANTORO, G.F; FIGLIUOLO, V.R; NANINI, H.F.; DE SOUZA, H.S.; CASTELO-BRANCO, M.T.; ABALO A.A.; PAIVA, M.M.; COUTINHO C.M.; COUTINHO-SILVA, R.

Extracellular ATP induces cell death in human intestinal epithelial cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1820, n.-, p.1867-1878, 2012.

SPANAKI, C.; ZAGANAS, I.; KLEOPA, K.A.; PLAITAKIS, A. Human GLUD2 glutamate dehydrogenase is expressed in neural and testicular supporting cells. **J Biol Chem.**, v.285, n.-, p.16748-16756, 2010.

STILES, G.L.; PIERSON, G.; SUNAY, S.; PARSONS, W.J. The rat testicular adenosine A1 receptor-adenylate cyclase system. **Endocrinology**, v.119, n.-, p.1845-1851, 1986.

SUH, B.C.; KIM, J.S.; NAMGUNG, U.; HA, H.; KIM, K.T. P2X7 nucleotide receptor mediation of membrane pore formation and superoxide generation in human promyelocytes and neutrophils. **J. Immunol.**, v.166, n.-, p.6754-6763, 2001.

TAKARADA, T. HINOI E.; BALCAR V.J.; TANIURA H.; YONEDA Y. Possible expression of functional glutamate transporters in the rat testis. **J Endocrinol.**, v.181, n.-, p.233-44, 2004.

TAMAJUSUKU, A. S. K. **Expressão e funcionalidade do receptor P2X7 em linhagem de glioma de camundongo GL261.** Dissertação de mestrado, UFRGS, Rio Grande do Sul, 2010.

TATE, S.S.; MEISTER, A. γ -glutamyl transpeptidase: catalytic, structural and functional aspects. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 39, p. 357-368, 1981.

TATEISHI, N. HIGASHI T.; NARUSE A.; NAKASHIMA K.; SHIOZAKI H. Rat liver glutathione: possible role as a reservoir of cysteine. **J. Nutr.**, v.107, p.51-60, 1977.

TINDALL, D. J.; ROWLEY, D.R.; MURTHY, L.; LIPSHULTZ, L.I.; CHANG, C.H. Structure and biochemistry of Sertoli cells. **International Review of Cytology**, 94, 127-149, 1985.

TORRES, M. C. L.; SOARES, N.F.F.; PEREIRA, J.A.M. Extração, purificação e avaliação da atividade da glutatona S-Transferase de fígado bovino. **Ciênc. agrotec**, v. 30, n. 2, p. 302-307, 2006.

TURMEL, P.; DUFRESNE J.; HERMO L.; SMITH C.E.; PENUELA S.; LAIRD D.W.; CYR D.G. Characterization of pannexin1 and pannexin3 and their regulation by androgens in the male reproductive tract of the adult rat. **Mol. Reprod. Dev.**, v.78, n.-, p.124–138, 2011.

VALKO, RHODES C.J.; MONCOL J.; IZAKOVIC M.; MAZUR M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v.160, n.-, p.1-40, 2006.

VAN STRAATEN, H.W.; HE, Y.; VAN DUIST, M.M.; LABRUYE`RE, W.T.; VERMEULEN, J.L. Cellular concentrations of glutamine synthetase in murine organs. **Biochem Cell Biol.**, v.84, n.-, p.215-231, 2006.

VEITINGER, S.; VEITINGER, T.; CAINARCA, S.; FLUEGGE, D.; ENGELHARDT, C.H.; LOHMER, S.; HATT, H.; CORAZZA, S.; SPEHR, J.; NEUHAUS E.M.; SPEHR, M. Purinergic signaling mobilizes mitochondrial Ca²⁺ in mouse Sertoli cells. **J. Physiol.**, v.589, n.21, p.5033-5055, 2011.

VELASQUEZ S.; EUGENIN, E. A. Role of Pannexin-1 hemichannels and purinergic receptors in the pathogenesis of human diseases. **Frontiers in Physiology**, v.5, n.96, p.1-12, 2014.

VITALE-CALPE, R.; FAWCETT, D.W.; DYM, M. The normal development of the blood–testis barrier and the effects of clomiphene and estrogen treatment. **Anat Rec.**, v.176, n.-, p.331–344, 1973.

VOLONTE C. ; AMADIO S.; CAVALIERE F.; D'AMBROSI N.; VACCA F.; BERNARDI G. Extracellular ATP and neurodegeneration. **Curr Drug Targets CNS Neurol Disord** v.2, n.-, p.403–412, 2003.

VON KÜGELGEN I.; HARDEN, T.K. Molecular pharmacology, physiology, and structure of the P2Y receptors. **Adv Pharmacol** v.61, n.-, p.373–415, 2011.

VOLPATO, K. C.; MENEGAZ, D.; LEITE, D.L.; BARRETO K.P.; DE VILHENA GARCIA, E.; SILVA, F.R. Involvement of K⁺ channels and calcium-dependent pathways in the action of T3 on amino acid

accumulation and membrane potential in Sertoli cells of immature rat testis. **Life Sciences**, v. 74, n.10, p.1277-1288, 2004.

WAGENFELD, A.; YEUNG, C.H.; LEHNERT, W.; NIESCHLAG, E.; COOPER, T.G. Lack of glutamate transporter EAAC1 in the epididymis of infertile c-ros receptor tyrosine-kinase deficient mice. **J Androl.**, v.23, n.-, p.772–82, 2002.

WANG, X.; SHARMA, R.K.; SIKKA, S.C.; THOMAS, A.J.J.; FALCONE, T.; AGARWAL, A. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. **Fertil Steril.**, v. 80, n.3, p.531–535, 2003.

WASSERMANN, G. F.; BLOCH, L.M.; GRILLO, M.L.; SILVA, F.R.; LOSS, E.S.; MCCONNELL, L.L. Biochemical factors involved in the FSH action on amino acid transport in immature rat testes. **Hormone and Metabolic Research**, v.24, n.6, p.276-279, 1992.

WHITMARSH, A.J., The JIP Family of MAPK scaffold proteins. **Biochemical Society Transactions**, v.34, n.5, p.828-832, 2006.

WILLIAMS, S.M.; SULLIVAN, R.K.; SCOTT, H.L.; FINKELSTEIN, D.I.; COLDITZ, P.B.; LINGWOOD, B.E.; DODD, P.R.; POW, D.V. Glial glutamate transporter expression patterns in brains from multiple mammalian species. **Glia.**, v.49, n.-, p.520–41, 2005.

WINTERBOURN, C.C.; METODIEWA, D. The reaction of superoxide with reduced glutathione. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 314, n. 2, p. 284-90, 1994.

XU, H.; XIONG, C.; HE, L.; WU, B.; PENG, L.; CHENG, Y.; JIANG, F.; TAN, L.; TU Y.; YANG, Y.; LIU, C.; GAO, Y.; LI, G.; ZHANG, C.; LIU, S.; XU, C.; WU, H.; LI, G.; LIANG, S. Trans-resveratrol attenuates high fatty acid-induced P2X7 receptor expression and IL-6 release in PC12 cells: possible role of P38 MAPK pathway. **Inflammation**, v.38, n.1, p.327-337, 2015.

YAO, D.; MACHENZIE, B.; MING, H.; VAROQUI, H.; ZHU, H.; HEDIGER, M.A.; ERICKSON, J.D. A novel system A isoform

mediating Na⁺/Neutral amino acid cotransport. **Biological Chemistry**, v.275, n.-, p.22790-22797, 2000.

YEGUTKIN, G.G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica ACTA**, v.1783, n.-, p.673-694, 2008.

ZAMONER, A.; BRUNO, A.N.; CASALI, E.A.; CORBELINI, P.F.; DINIZ, G.P.; BARRETO-CHAVES, M.L.; SILVA, F.R.; SARKIS, J.J.; PESSOA-PUREUR, R. Genomic-independent action of thyroid hormones on NTPDase activities in Sertoli cell cultures from congenital hypothyroid rats. **Life Sciences**, v.80, n.1, p.51-58, 2006.

ZAMONER, A.; ROYER, C.; BARRETO, K.P.; PESSOA-PUREUR, R.; SILVA F.R. Ionic involvement and kinase activity on the mechanism of nongenomic action of thyroid hormones on ⁴⁵Ca²⁺ uptake in cerebral cortex from young rats. **Neurosci Res**, 57: 98–103, 2007.

ZHU, S.; WANG, Y., WANG, X.; LI, J.; HU, F. Emodin inhibits ATPinduced IL-1 β secretion, ROS production and phagocytosis attenuation in rat peritoneal macrophages via antagonizing P2X7 receptor. **Pharm Biol** v.52, n.1, p.51–57, 2014.

ZIMMERMANN, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, v.362, n.5, p.299-309, 2000.

ZIMMERMANN, H. Extracellular ATP and other nucleotides-ubiquitous triggers of intercellular messenger release. **Purinergic Signaling**, v.-, n.-, p.1-33, 2015.