

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

BÁRBARA OGLIARI MARTINS TAQUES

**MODELO PARA OS CANAIS DE POTÁSSIO PARA RESPOSTAS RÁPIDAS DE
CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS IMATUROS**

CURITIBA

2023

BÁRBARA OGLIARI MARTINS TAQUES

**MODELO PARA OS CANAIS DE POTÁSSIO PARA RESPOSTAS RÁPIDAS DE
CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS IMATUROS**

**Model for Potassium Channels for Rapid Responses of Immature Rat Sertoli
Cells**

Trabalho de conclusão de curso de Tese apresentada como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador: Prof. Dr. Humberto Remigio Gamba.

Coorientador: Prof^a. Dr^a. Daniela Ota Hisayasu Suzuki.

CURITIBA

2023



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Esta licença permite download e compartilhamento do trabalho desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es), sem a possibilidade de alterá-lo ou utilizá-lo para fins comerciais. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



BARBARA OGLIARI MARTINS TAQUES

MODELO PARA OS CANAIS DE POTÁSSIO PARA RESPOSTAS RÁPIDAS DE CÉLULAS DE SERTOLI DE RATOS IMATUROS

Trabalho de pesquisa de doutorado apresentado como requisito para obtenção do título de Doutor Em Ciências da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Engenharia Biomédica.

Data de aprovação: 24 de Novembro de 2023

Dr. Humberto Remigio Gamba, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Daniela Ota Hisayasu Suzuki, Doutorado - Universidade Federal de Santa Catarina (Ufsc)

Dr. Fabio Kurt Schneider, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dr. Fatima Regina Mena Barreto Silva, Doutorado - Universidade Federal de Santa Catarina (Ufsc)

Dr. Mauricio Martins Taques, Doutorado - Instituto Federal Santa Catarina - Ifsc

Dr. Miguel Tobias Bahia, Doutorado - Instituto Federal Santa Catarina - Ifsc

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 29/11/2023.

AGRADECIMENTOS

À Deus, e aos meus pais, Alcides e Maria de Fátima, pelo amor incondicional, educação e orientação aos estudos, para que eu tivesse coragem de chegar na busca por todos os níveis de estudo até aqui.

Ao meu marido Maurício, e meus filhos, Maurício Filho e Renato, por todo apoio, compreensão e paciência, me apoiando e ajudando em todo esse tempo de estudo.

À toda minha família por acreditarem em mim e me apoiarem por toda essa caminhada.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Humberto R. Gamba e Profa. Dra. Daniela O. H. Suzuki, pela confiança, ajuda e dedicação para me orientar nessa caminhada.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade na avaliação deste trabalho.

Ao Instituto Federal de Santa Catarina e Direção geral do Campus Joinville, pelo empenho e disponibilização dos recursos e afastamento com o programa de Doutorado Interno em parceria com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná, para que eu pudesse participar deste doutoramento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica, Departamento de Engenharia Biomédica, da Universidade Federal de Santa Catarina, pela disponibilização do tempo de coorientação da Profa. Dra. Daniela O. H. Suzuki

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, em nome da Profa. Dra. Fátima Regina M. B. da Silva, Dra. Danusa Menegaz, pela confiança neste trabalho, pelo apoio e orientação, obtenção dos dados experimentais utilizados neste trabalho, e uso do Laboratório Nubiocel Lab para aquisição dos dados.

À FINEP/MCTI/CT-INFRA 150-2009/NUBIOCEL e ao CNPq Grants 400109/2014-0, pelo apoio financeiro para obtenção dos dados utilizados no modelo desenvolvido neste doutorado.

RESUMO

As células de Sertoli são essenciais para o sistema reprodutivo masculino, pois fornecem suporte morfológico e nutrientes às células germinativas para garantir a espermatogênese contínua. O objetivo deste trabalho foi prever as propriedades elétricas da membrana plasmática que desencadeiam respostas rápidas nas células de Sertoli, envolvendo mudanças iônicas.

As respostas rápidas das células de Sertoli em cultura foram monitoradas utilizando medição elétrica de *patch clamp* e comparadas com dados obtidos utilizando ferramentas farmacológicas (a partir de túbulos seminíferos intactos). Um modelo matemático para células não-excitáveis, foi utilizado para definir os papéis dos canais de potássio e da bomba Sódio/Potássio (Na^+/K^+ -ATPase) nessas respostas. A verificação de dados matemáticos também foi realizada para determinar os potenciais de membrana em repouso e estimulados por hormônios, das células de Sertoli nos túbulos seminíferos intactos e das células de Sertoli em cultura (medições de *patch clamp*).

A predição desses dados, baseada em modelagem matemática, demonstrou pela primeira vez, o envolvimento dos canais de potássio e a ativação da Na^+/K^+ -ATPase na hiperpolarização das células de Sertoli e suas consequentes respostas rápidas. Além disso, a análise matemática que mostra o envolvimento do equilíbrio iônico nas respostas rápidas dessas células a hormônios, como o hormônio folículo-estimulante, é consistente com relatos anteriores, como Wasserman (1992), obtidos por meio de técnicas farmacológicas em células de Sertoli.

Assim, a validação de tais dados é confiável e representa um primeiro passo na proposição de um modelo matemático para prever respostas rápidas das células de Sertoli aos estímulos hormonais.

Palavras-chave: Células de Sertoli; análise matemática; canais iônicos; Na^+/K^+ -ATPase; respostas rápidas.

ABSTRACT

Sertoli cells are essential for the male reproduction system as they provide morphological support and nutrients for germ cells to guarantee ongoing spermatogenesis. The aim of this work was to predict the electrical properties at the plasma membrane that trigger Sertoli cell rapid responses by involving ionic channels. The rapid responses of Sertoli cells in culture were monitored using patch clamp electrical measurement and compared to data obtained using pharmacological tools from intact seminiferous tubules. A mathematical model was used to define the roles of potassium channels and the ATP-dependent Na^+/K^+ pump in these responses. Mathematical data verification was also performed to determine the resting and hormonal stimulated membrane potentials of Sertoli cells in the intact seminiferous tubules and of Sertoli cells in culture (patch clamp measurements). The prediction of these data based on mathematical modeling demonstrated, for the first time, the involvement of potassium channels and the activation of Na^+/K^+ pump in the hyperpolarization of Sertoli cells and their consequent rapid responses. Moreover, the mathematical analysis showing the involvement of ionic balance in the rapid responses of these cells to hormones, such as follicle-stimulating hormone, is consistent with previous reports obtained using pharmacological techniques in Sertoli cells.

Keywords: Sertoli cell; mathematical analysis; ionic channels; Na^+/K^+ pump; rapid responses.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ilustração esquemática de uma célula de Sertoli com os canais de Potássio Dependentes de Tensão e a Na^+/K^+ -ATPase.....	17
Figura 2 - Organização do testículo e a representação de uma seção transversal dos túbulos seminíferos.....	20
Figura 3 - Montagem de uma típica célula de Sertoli	22
Figura 4 – Cadeia química do Hormônio Folículo Estimulante – FSH.....	24
Figura 5 – Canais de Sódio, Cálcio, Potássio e Cloreto Dependentes de Tensão.	26
Figura 6 – Ilustração de como os Canais Potássio se movimentam através da membrana plasmática.....	27
Figura 7 – Representação do modelo de transporte eletrogênico mediado pela Na^+/K^+ ATPase descrito por Chapman et al.	31
Figura 8 – Esquema do arranjo experimental para medidas com grampo espacial e de potencial elétrico.....	32
Figura 9 – A) Amplificador Multiclamp 700B.....	33
B) Imagem ampliada do experimento com sua respectiva pipeta, no aparelho amplificador.....	33
Figura 10 – Imagem de uma célula de Sertoli em cultura capturada sob um microscópio invertido com aumento de 40x.....	34
Figura 11 – Circuito elétrico equivalente para o modelo proposto por Hodgkin e Huxley.	34
Figura 12 - Mecanismo de reação para funcionamento da bomba eletrogênica Na^+/K^+	39
Figura 13- Curva $I \times V$, obtida experimentalmente, pelo método <i>voltage clamp</i>	42
Figura 14 - Curva de estado estacionário.	43
Figura 15 - Família de curvas $I \times t$, cada curva é uma resposta a um pulso de tensão.....	44
Figura 16 - Constantes de tempo relativas aos transitórios das curvas de corrente.....	45
Figura 17 - Curvas obtidas pelo modelo matemático, considerando valores de 2, 3 e 4mU/ml respectivamente, para resposta hiperpolarizante devido aos canais de Potássio.	47
Figura 18 - Curva experimental obtida com valor de 3mU/ml de FSH e com a presença de Verapamil, comparada à curva modelada para o mesmo valor de FSH.	48
Figura 19 - Curvas experimentais simuladas, comparadas às curvas modeladas para valores de A) 2mU/ml de FSH na célula; B) 3mU/ml e C) 4mU/ml.	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de ATP, ADP, coeficientes de Permeabilidade P_i, P_{Na0}, P_{K0}, e taxas de valores constantes k_i e k_{-i}.....	39
Tabela 2 - Valores de concentrações iônicas, Constantes Universal dos Gases, Temperatura e Carga Elétrica por mol de Elétrons, usados na equação das correntes iônicas de Sódio e Potássio para Na^+/K^+ ATPase.	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GnRH	Hormônio Liberador das Gonadotrofinas
LH	Hormônio Luteinizante
TSH	Hormônio Estimulante da Tireoide
Na ⁺	Íon de Sódio
K ⁺	Íon de Potássio
Ca ²⁺	Íon de Cálcio
Na ⁺ /K ⁺ ATPase	Bomba de Sódio/Potássio
Nu	Núcleo
Nuc	Nucléolo
SK	Cariossomos Satélites
Gly	Gotículas Lipídicas
Jct	Complexos Juncionais
Go	Aparelhos de Golgi
RER	Retículo Endoplasmático Rude
RES	Retículo Endoplasmático Suave
Mit	Mitocôndria
Mt	Microtúbulos
CV	Corpos Vesiculares
Li	Lisossomos
Eps	Especialização Ectoplasmática
CT	Complexos Tubulobulbar
hCG	Gonadotrofina Coriônica
SCE	Células de Sertoli de túbulos seminíferos
CCDT	Canais de Cálcio dependentes de tensão

CPDT	Canais de Potássio dependentes de tensão
PA	Potencial de Ação
DDP	Diferença de Potencial
K_{ATP}	Canais de Potássio dependentes de ATP
ATP	Adenosina Trifosfato
ADP	Adenosina Difosfato
P_i	Inorgânico Fosfato
$[Na^+]_{in}$	Concentração iônica de Sódio intracelular
$[Na^+]_{out}$	Concentração iônica de Sódio extracelular
$[K^+]_{in}$	Concentração iônica de Potássio intracelular
$[K^+]_{out}$	Concentração iônica de Potássio extracelular
P_K	Permeabilidade iônica do Potássio
P_{Na}	Permeabilidade iônica do Sódio
P_{K0}	Permeabilidade iônica inicial do Potássio
P_{Na0}	Permeabilidade iônica inicial do Sódio
k_1	Taxa de coeficiente <i>forward</i> para primeiro passo
k_{-1}	Taxa de coeficiente <i>reverse</i> para primeiro passo
k_2	Taxa de coeficiente <i>forward</i> para segundo passo
k_{-2}	Taxa de coeficiente <i>reverse</i> para segundo passo
k_3	Taxa de coeficiente <i>forward</i> para terceiro passo
k_{-3}	Taxa de coeficiente <i>reverse</i> para terceiro passo
k_4	Taxa de coeficiente <i>forward</i> para quarto passo
k_{-4}	Taxa de coeficiente <i>reverse</i> para quarto passo
k_5	Taxa de coeficiente <i>forward</i> para quinto passo
k_{-5}	Taxa de coeficiente <i>reverse</i> para quinto passo
k_6	Taxa de coeficiente <i>forward</i> para sexto passo
k_{-6}	Taxa de coeficiente <i>reverse</i> para sexto passo

N	Densidade total da membrana
V_m	Diferença de potencial transmembrana
R	Constante universal dos gases
T	Temperatura em escala absoluta
F	Carga elétrica em um mol de elétrons
a_{is}	Coeficientes auxiliares para cálculos <i>forwards</i>
a_{-is}	Coeficientes auxiliares para cálculos <i>reverse</i>
Z_{Na}	Valência dos íons de Sódio
Z_K	Valência dos íons de Potássio
SSE	Erro quadrado da soma
R-Square	Coerência
I_{st}	Corrente estimulatória
C_m	Capacitância transmembrana
I_{Na}	Corrente para os canais de Sódio
I_K	Corrente para os canais de Potássio
I_{Nap}	Corrente de Sódio na Bomba de Sódio/Potássio
I_{Kp}	Corrente de Potássio na Bomba de Sódio/Potássio
I_L	Corrente de fuga
H-H	Hodgkin-Huxley
m^x	Porta 'x' do canal iônico ativando com 'm' probabilidade
h^y	Porta 'y' do canal iônico ativando com 'h' probabilidade
m_∞	Ativação do Canal iônico em regime permanente
h_∞	Inativação do Canal iônico em regime permanente
T_m	Constante de tempo de ativação do canal
T_h	Constante de tempo de inativação do canal
G_K	Condutância dos canais de Potássio
$V_{1/2}$	Tensão equivalente ao meio do eixo 'x' da curva $m_\infty (V_m)$

X	Inclinação da curva $m_{\infty}(V_m)$
V_K	Diferença de Potencial dos canais de Potássio
V_{K0}	Diferença de Potencial dos canais de Potássio para corrente FSH

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	18
2.1	Objetivos Gerais	18
2.2	Objetivos Específicos	18
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
3.1	Sistema Reprodutor Masculino	19
3.2	Testículos e Túbulos Seminíferos	19
3.3	Espermatogênese	20
3.4	Células de Sertoli	21
3.5	Função Testicular	23
3.5.1	Hormônio Folículo Estimulante (FSH)	23
3.5.2	Controle Glandular sobre as células de Sertoli	24
3.5.3	O processo de ação do FSH nas células de Sertoli	25
3.6	Canais Iônicos	25
3.6.1	Canais de Potássio	26
<u>3.6.1.1</u>	<u>Canais de Potássio Dependentes de Cálcio e Canais de Potássio Retificados Internamente</u>	<u>27</u>
<u>3.6.1.2</u>	<u>Canais de Potássio Dependentes de ATP</u>	<u>27</u>
<u>3.6.1.3</u>	<u>Canais de Potássio Dependentes de Tensão</u>	<u>28</u>
3.7	Efeitos do FSH em Canais Iônicos	28
3.8	Bomba de Sódio e Potássio	29
3.9	Modelamento Matemático	30
3.9.1	Modelamento da Bomba de Sódio e Potássio	31
3.9.2	Modelamento H-H	31
<u>3.9.2.1</u>	<u>Método de Medição de <i>Voltage Clamp</i></u>	<u>32</u>
<u>3.9.2.2</u>	<u>Modelo Matemático Proposto por Alan Hodgkin e Andrew F. Huxley</u>	<u>34</u>
4	MÉTODOS	36
4.1	Modelo Matemático	36
4.2	Modelamento dos Canais de Potássio Dependentes de Tensão	37
4.3	Modelamento da Na⁺/K⁺ ATPase	38
4.4	Implementação do Modelo	40
5	RESULTADOS	41
5.1	Análise Matemática dos Canais de Potássio Dependentes de Tensão	41

5.1.1	Curva de Ativação em Regime Permanente (n_{∞})	41
5.1.2	Cálculo dos valores da Constante de Tempo de Ativação (τ_{∞})	43
5.2	Corrente da Bomba Na^+/K^+ dependente de ATP	45
6	DISCUSSÃO	50
7	CONCLUSÃO	53
8	IMPACTO DO TRABALHO	54
	REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

As células de Sertoli, as quais nutrem e dão suporte morfológico às células germinativas, apresentam um microambiente de membrana plasmática que contém, entre as diferentes classes de lipídios, proteínas que funcionam como canais iônicos (SILVA; LEITE; WASSERMANN, 2002)(RATO et al., 2010). A cinética dos canais iônicos das células de Sertoli coordena eventos de resposta rápida, como o controle do potencial da membrana plasmática, influenciando o transporte de sódio e potássio através da membrana celular pela atividade da bomba de Na^+/K^+ , conhecida também como Na^+/K^+ -ATPase (SILVA et al., 2001)(SILVA, 2014), as atividades de enzimas que estão localizadas na membrana plasmática (ZANATTA et al., 2011), a secreção celular, bem como respostas genômicas como transcrição nuclear (ZANATTA et al., 2013)(DO NASCIMENTO et al., 2020). Consequentemente, as atividades de resposta rápida da Na^+/K^+ -ATPase, canais de potássio dependentes de cálcio (Ca^{2+} - K^+), canais de potássio dependentes de ATP (ATP-K^+) e correntes de potássio sensíveis à tensão (K_v) apoiam a função de Células de Sertoli para manter a espermatogênese e a fertilidade.

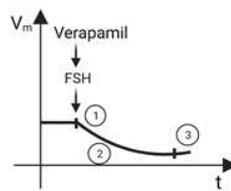
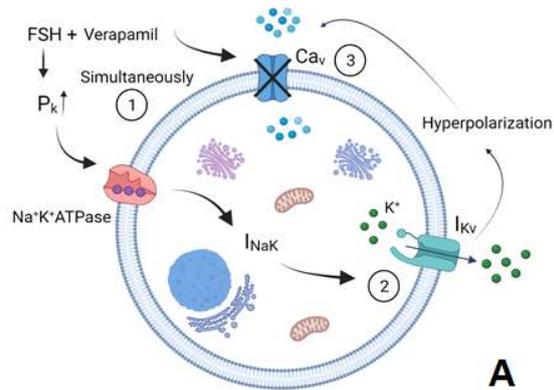
O hormônio folículo-estimulante (FSH) representa um dos reguladores hormonais das atividades secretoras e da proliferação nas células de Sertoli (SILVA; LEITE; WASSERMANN, 2002)(REIS et al., 2015). O FSH exibe maneiras diferentes e independentes de iniciar a sinalização nas células de Sertoli. O mecanismo do FSH é mediado por receptores acoplados à proteína G de alta afinidade e também pela alteração do potencial da membrana plasmática através da abertura ou fechamento de canais iônicos para desencadear vias intracelulares a jusante (SILVA; LEITE; WASSERMANN, 2002). Essa interação do canal iônico produz um efeito duplo, consistindo em uma rápida hiperpolarização seguida por uma despolarização prolongada (WASSERMANN et al., 1990). A fase de hiperpolarização pode ocorrer como resultado da saída de K^+ através da membrana plasmática ou pela ativação dos canais de cloreto (LOSS; JACOBUS; WASSERMANN, 2007)(MENEGAZ et al., 2016), enquanto a resposta despolarizante pode ser mediada por um aumento no influxo de Ca^{2+} ou pela ativação de o cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ ou o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) (RATO et al., 2010)(GONCALVES et al., 2018)(HAEFNER, 2005).

As análises matemáticas representam uma ferramenta poderosa para desvendar o mecanismo que conduz os sistemas biológicos (HAEFNER, 2005). Os

primeiros estudos em células excitáveis foram propostos há 60 anos por Hodgkin e Huxley usando axônios gigantes de lula (HODGKIN; HUXLEY, 1952). O primeiro modelo elétrico de tecido cardíaco foi proposto por Noble em 1962, com base em fibras de Purkinje (NOBLE, 1962). Desde então, diversas abordagens foram desenvolvidas para descrever o potencial de ação em células excitáveis, como modelos para células cardíacas, células uterinas, entre outras. Até onde pude verificar na literatura, este é o primeiro estudo a empregar um modelo matemático para canais iônicos em células de Sertoli. A utilização de um modelo matemático de função de canal pivô em células de Sertoli para realizar análises elétricas ampliará a compreensão das correntes de ativação que são geradas nessas células para obtenção de respostas rápidas, como processo biológico pelo qual as células liberam substâncias para o meio extracelular.

Nas células de Sertoli, as alterações no potencial da membrana plasmática são causadas por estímulos hormonais, que desencadeiam a abertura e o fechamento dos canais iônicos. Esses hormônios modificam a permeabilidade da membrana aos íons sódio e potássio (JOFFRE; ROCHE, 1988a) e a concentração intracelular de ATP (LOSS; JACOBUS; WASSERMANN, 2007), ativando respostas rápidas, incluindo a exocitose. Até onde sei, essa é a primeira análise matemática de alguns canais iônicos de interesse em células de Sertoli, com base em dois modelos descritos anteriormente: O modelo de Hodgkin & Huxley (H-H) para canais iônicos dependentes de tensão, e as equações do modelo enzimático Na^+/K^+ -ATPase, conforme descrito por Hernandez et al. (HERNANDEZ; FISCHBARG; LIEBOVITCH, 1989). A variação no potencial da membrana plasmática causada pelos hormônios produz a entrada de estímulo elétrico para o modelo H-H, igualando a abertura dos canais de potássio sensíveis à tensão nas células de Sertoli, conforme representado esquematicamente na figura 1.

Figura 1 - Ilustração esquemática de uma célula de Sertoli com os canais de Potássio Dependentes de Tensão e a Na⁺/K⁺-ATPase. Os canais de cálcio dependentes de tensão são bloqueados pela co-incubação com Verapamil e a abertura dos canais de K⁺ foi desencadeada pela alteração do potencial da Na⁺/K⁺-ATPase. A administração de FSH à célula desencadeia alterações na permeabilidade ao sódio e ao potássio, aumentando consequentemente a atividade da bomba (A). Esse processo é demonstrado na curva que retrata o exemplo de administração de FSH na célula e é descrito em três etapas: 1- Aplicação do hormônio; 2- hiperpolarização e 3- estabilização do novo potencial de membrana (B).



Fonte: Criado por Danusa Menegaz com software BioRender.com.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

O objetivo deste estudo foi utilizar uma abordagem matemática para analisar e propor um modelo para as propriedades elétricas da membrana plasmática das células de Sertoli. Validar o modelo através de simulação e comparações objetivas com resultados obtidos por meio de técnicas farmacológicas realizadas por WASSERMANN et al., 1992a.

2.2 Objetivos Específicos

Propor um modelo dos canais hiperpolarizantes (Canais de Potássio Dependentes de Tensão e Na^+/K^+ ATPase) da célula de Sertoli para estudos específicos desses canais *in silico* sem a interferência de outros canais, fármacos ou hormônios, que possam interferir nestes estudos.

Aplicar o modelo proposto nos Canais de Potássio Dependentes de Tensão e a Na^+/K^+ ATPase em células de Sertoli de ratos imaturos para comparar com resultados *in vivo*.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Sistema Reprodutor Masculino

O Sistema Reprodutor Masculino consiste em um par de testículos, vias espermáticas (epidídimo, canal deferente, uretra), pênis e glândulas anexas (vesículas seminais, próstata e glândulas bulbouretrais). Nos testículos ocorre a produção de espermatozoides e hormônios sexuais; nas vias espermáticas ocorre a maturação, circulação e liberação dos espermatozoides enquanto que as glândulas anexas secretam os fluidos de transporte e nutrição que irão formar, juntamente com os espermatozoides, o esperma (GONÇALVES, 2018).

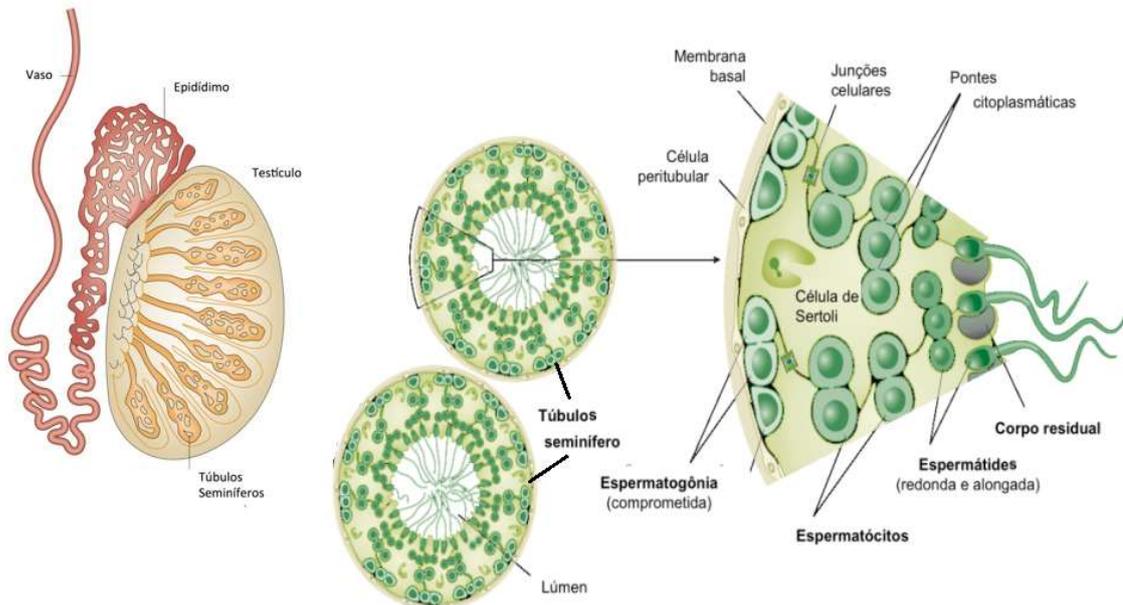
3.2 Testículos e Túbulos Seminíferos

O testículo dos mamíferos é um órgão complexo caracterizado por duas funções principais: síntese e secreção de hormônios esteroides e produção de espermatozoides. O desenvolvimento testicular normal e a manutenção da espermatogênese são controlados pelas gonadotrofinas e pela testosterona, cujos efeitos são modulados por fatores produzidos localmente, onde entre eles, estão envolvidos os estrogênios (BOURGUIBA, S., GENISSEL, C., LAMBARD, S., BOURAIMA, H., & CARREAU, 2003).

As principais funções do testículo são a espermatogênese e a esteroidogênese. A espermatogênese é um processo que envolve eventos celulares e bioquímicos, responsáveis pela formação das espermatogônias e ocorre dentro dos túbulos seminíferos, onde as células de Sertoli, sob ação da testosterona, FSH – Hormônio Folículo Estimulante entre outros hormônios, desempenham um papel fundamental na proliferação e diferenciação das mesmas (PÉREZ et al., 2013) (KOPERA et al., 2010).

Os túbulos seminíferos são estruturas tubulares especiais nos testículos que produzem espermatozoides continuamente durante todo o ciclo de vida masculino (NAKATA et al., 2015). Eles formam um ambiente adequado para as células germinativas se desenvolverem, sendo considerados a unidade funcional do testículo (GONÇALVES, 2018), como mostrado na figura 2.

Figura 2 - Organização do testículo e a representação de uma seção transversal dos túbulos seminíferos.



Fonte: Adaptado de GONÇALVES, 2018.

3.3 Espermatogênese

Como mencionado no item 3.2, o testículo dos mamíferos possui, pelo menos, duas funções complexas e coordenadas que garantem a fertilidade e a perpetuação das espécies: a espermatogênese e a esteroidogênese. A espermatogênese é controlada por uma miríade de fatores, inclusive pelas gonadotrofinas, FSH entre outros hormônios (VERDI et al., 2021).

Além de desenvolver células germinativas, o epitélio seminífero também é constituído por células de Sertoli, conhecidas por fornecer apoio estrutural ao desenvolvimento de células germinativas (GRISWOLD, 2015). Sabe-se que as células germinativas se diferenciam e se deslocam na direção do lúmen do túbulo ao longo da espermatogênese. As células de Sertoli e as células germinativas formam associações dinâmicas dentro do epitélio seminífero definido como estágios do epitélio seminífero (KOPERA et al., 2010). Durante toda a espermatogênese, as células germinativas permanecem em estreito contato com as células de Sertoli, que são essenciais para o seu desenvolvimento. Estas interações entre as células no epitélio seminífero são fundamentais para a produção de várias moléculas, como hormônios, fatores de crescimento, proteases, inibidores de protease e componentes da matriz extracelular (KOPERA et al., 2010).

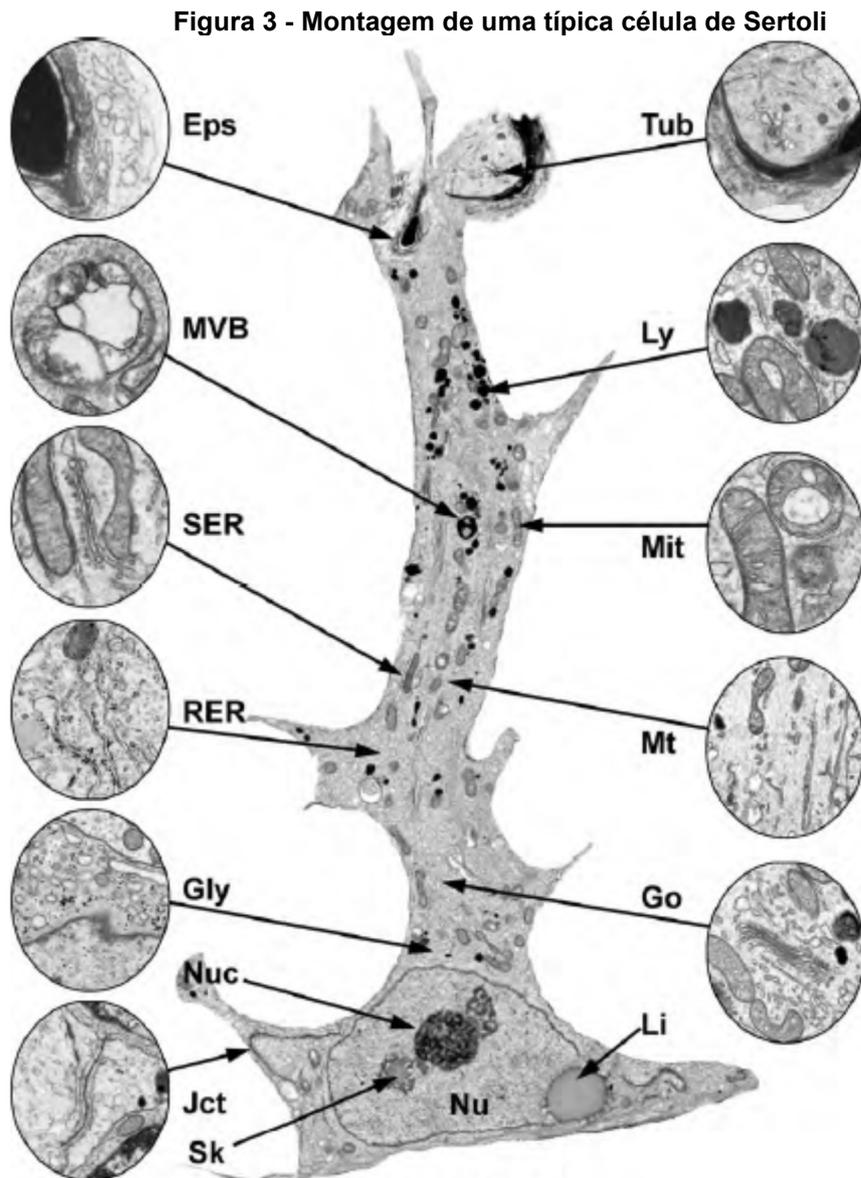
3.4 Células de Sertoli

As células de Sertoli são responsáveis por fornecer energia e suporte nutricional para o desenvolvimento de células germinativas. É muito importante que as células germinativas recebam um nível adequado de substratos energéticos, caso contrário elas podem se degenerar e entrar na via apoptótica (morte celular) (RATO et al., 2012). Elas estão associadas às células germinativas formando o túbulo seminífero. Após a formação do tecido testicular, o número de células de Sertoli aumenta rapidamente, e alguns estudos indicam que, em ratos, a replicação destas células pode se restringir ao período perinatal, cessando após a primeira meiose das espermatogônias, o que ocorre nos primeiros estágios da puberdade (ORTH, 1982). Em algumas espécies, um período pode ser muito mais importante do que o outro, todavia, na maioria das espécies, os períodos fetal e neonatal são provavelmente os mais importantes. Portanto o estudo destas células no estágio neonatal é tão importante para o entendimento de alguns fatores de infertilidade masculina.

A figura 3 apresenta a célula de Sertoli. As organelas descritas são ilustrações. Na base da célula, encontra-se o núcleo (Nu), o qual contém um grande nucléolo (Nuc) e cariossomos satélites (SK). Nesta região, gotículas lipídicas (Gly) são frequentemente notadas e complexos juncionais justos (Jct), entre células de Sertoli são encontrados. O corpo do citoplasma da célula contém as típicas organelas celulares epiteliais e corpos de inclusão:

- Um aparelho de Golgi (Go) que é pequeno comparado à maior célula secretória;
- Uma abundância de retículos endoplasmáticos rugoso (RER);
- Retículo endoplasmático liso (RES) que é frequentemente encontrado adjacente à mitocôndria (Mit), que são, ou alongadas paralelas aos microtúbulos (Mt) ou circular em forma de roscas;
- Grânulos glicogênicos, que podem ser vistos perto do núcleo, e outras inclusões como corpos vesiculares (CV) que são vistas espalhados ao longo do citoplasma;
- Lisossomos (Li), que são geralmente vistas perto do CV;
- Especialização ectoplasmática (Eps) são as únicas estruturas encontradas adjacentes às cabeças das espermátides e

- Complexos tubulobulbar (CT), os quais são vistos com maiores magnitudes de curvatura do que as cabeças de espermátides tardias e representam uma penetração ou invaginação na célula de Sertoli por citoplasma espermátides, o qual participa na ligação espermátide alongado para célula de Sertoli e na eliminação do excesso do citoplasma anterior à espermição (HESS; FRANÇA, 2005).



Fonte: Reproduzido de (HESS; FRANÇA, 2005)

As células de Sertoli secretam glicoproteínas para o lúmen do túbulo seminífero, e um número de importantes funções biológicas têm sido atribuídas a estas glicoproteínas secretadas (SKINNER E GRISWOLD, 1982). A síntese e secreção de glicoproteínas foram estudadas utilizando cultura de células de Sertoli e

as atividades detectáveis destas glicoproteínas são maiores em culturas que foram suplementadas com FSH (SKINNER E GRISWOLD, 1982).

3.5 Função Testicular

A função testicular é reconhecida como dependente das gonadotrofinas sintetizadas pela hipófise, contudo existe uma rede de reguladores que promovem o desenvolvimento da gônada masculina e da manutenção da função testicular. Envolvendo comunicação intercelular, intracelular, entre a célula e o meio ambiente, programação intracelular e de controle hormonal (GNESSI et al., 1997)

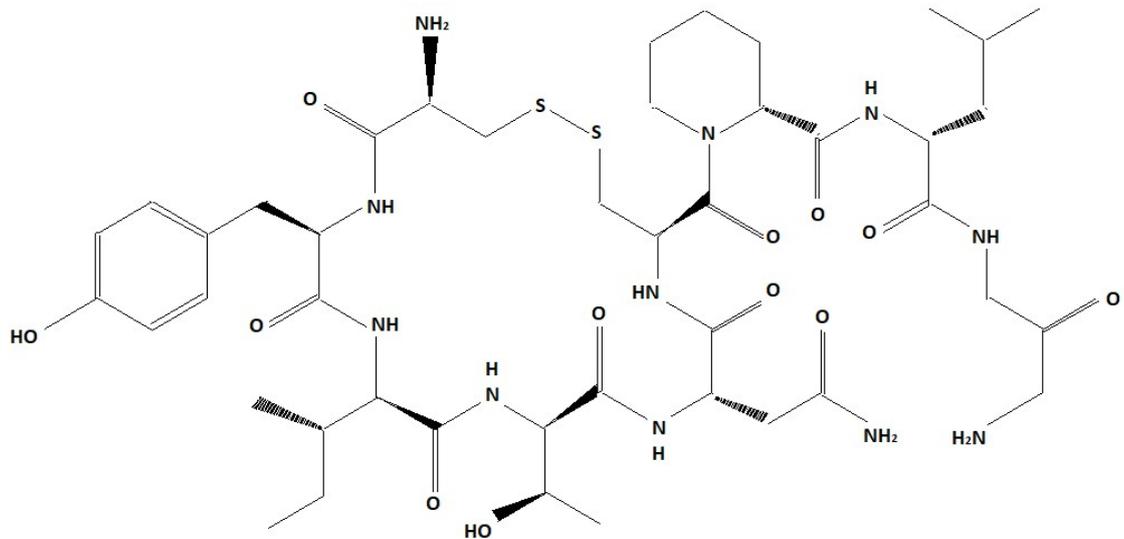
3.5.1 Hormônio Folículo Estimulante (FSH)

Existem na membrana das células de Sertoli receptores do Hormônio Folículo Estimulante – FSH. Este hormônio desenvolve o papel central de controle das funções da célula de Sertoli, como o controle da proliferação destas células no estágio pré-puberal, determinando assim, o número de células de Sertoli que estarão presentes em machos adultos (SHARPE et al., 2003).

A mitose das células de Sertoli decresce em torno de 15 (quinze) dias de idade do rato, sendo o FSH o controlador na diferenciação destas células, fundamental para o desenvolvimento das espermatogêneses no rato adulto (GRISWOLD, 2015).

O FSH pertence à família dos hormônios glicoproteicos, a qual inclui também o LH, Gonadotrofina Coriônica - hCG e TSH. Estes hormônios glicoproteicos são heterodímeros ricos em pontes de dissulfetos com associações não covalentes entre as subunidades α e β . Os diferentes tipos de hormônios desta família têm a subunidade ou cadeia α comum, diferindo na estrutura da subunidade β (FAN; HENDRICKSON, 2005). A figura 4 apresenta a cadeia química do FSH.

Figura 4 – Cadeia química do Hormônio Folículo Estimulante – FSH.



Fonte: Reproduzido de (HESS; FRANÇA, 2005)

As substâncias: inibina, folistatina e ativina pertencem a um grupo de substâncias glicoproteicas que controlam a secreção do FSH. São secretadas pelas gônadas (DEPAOLO et al., 1991), atuando sobre as células gonadotrofas. A folistatina contém apenas uma cadeia peptídica e no mínimo três isoformas, todas com a mesma potência em inibir a secreção do FSH. A substância ativina estimula a liberação do FSH, possuindo duas cadeias peptídicas (DEPAOLO et al., 1991).

3.5.2 Controle Glandular sobre as células de Sertoli

A célula de Sertoli é considerada célula-alvo da ação do FSH no testículo de mamíferos (HANSSON et al., 1974), contudo, existem evidências de que receptores de FSH também são encontrados nas espermatogônias (GHOSH et al., 1992). A espermatogênese depende da ação conjunta entre FSH e testosterona na célula de Sertoli, servindo como mediadora dos efeitos desses hormônios nas células germinativas (MEANS et al., 1976).

A ação do FSH no túbulo seminífero do rato varia também, de acordo com o estágio em que se encontram as células do epitélio germinativo (RANNIKKO et al., 1996). Nos períodos fetal e neonatal, o FSH estimula a mitose das células de Sertoli, sendo máxima no final da fase fetal e reduzida após o nascimento; sendo que em aproximadamente 15 dias de idade, um número fixo de células de Sertoli se estabelece. Os gonócitos começam a proliferar a partir do 4º dia de vida do rato. Com 6 dias de idade as espermatogônias do tipo A produzem as espermatogônias

intermediárias que darão origem às espermatogônias do tipo B e finalmente no 15º dia os túbulos seminíferos exibem a primeira série completa de espermátócitos (RANNIKKO et al., 1996).

3.5.3 O processo de ação do FSH nas células de Sertoli

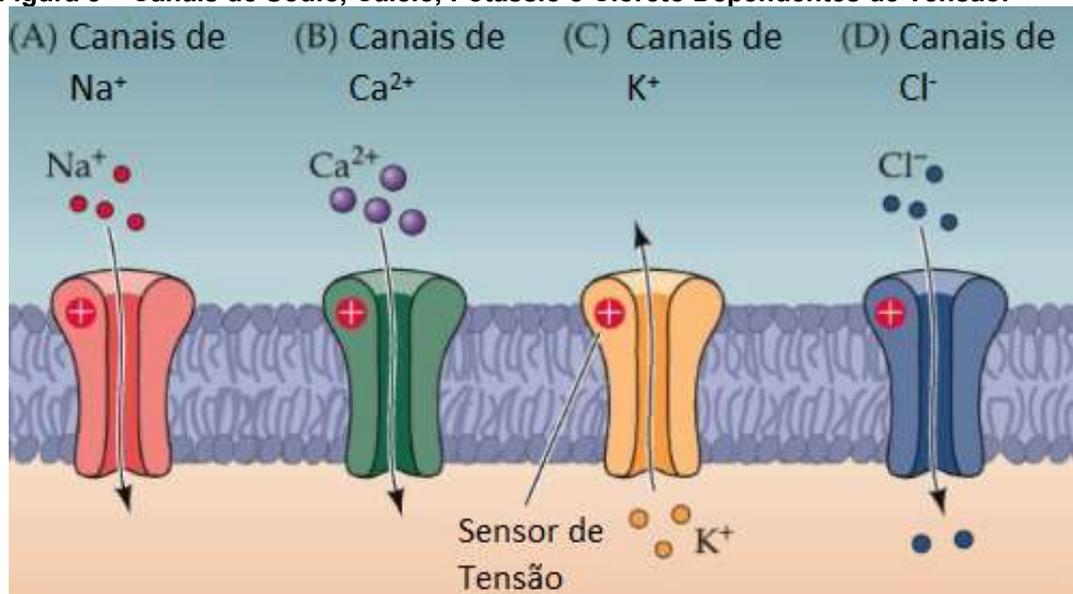
O FSH liga-se ao seu receptor na célula de Sertoli, gerando sinais intracelulares. Sendo que os receptores podem produzir estes sinais, através de ativação ou inibição de enzimas ligadas na membrana plasmática; ou da abertura ou fechamento de canais iônicos na membrana plasmática (BROWN; BIRNBAUMER, 1990).

Quando o FSH liga-se com o seu receptor, há o estímulo do aumento de níveis intracelulares de cálcio, devido a abertura de canais iônicos na membrana (GRASSO; REICHERT JR, 1989). Este aumento na concentração de Ca^{+2} , atua como um sinal de ativação de diversas funções celulares.

3.6 Canais Iônicos

Canais iônicos são poros aquosos fechados dos quais mudanças conformacionais, regidas por campos elétricos na membrana celular, podem levar a sua abertura ou fechamento. A difusão de íons através de canais abertos é muito rápida mas envolve muitas interações iônicas, poros e solventes que conduzem à seletividade iônica, saturação e acoplamento de fluxo (HILLE, 1978). A família de canais iônicos é classificada de acordo com a seletividade iônica do canal para potássio, cloreto, sódio e cálcio (figura 4), ou por sua não seletividade para diversos tipos de íons (MENEGAZ D; MENDES AKB; SILVA FRMB, 2021) e a forma com que esta seletividade acontece, ocasiona a abertura ou fechamento deles.

Figura 5 – Canais de Sódio, Cálcio, Potássio e Cloreto Dependentes de Tensão.



Fonte: Criado por Danusa Menegaz com software BioRender.com.

3.6.1 Canais de Potássio

Os canais de Potássio têm um papel crucial na determinação do potencial de repouso da membrana. Quando os canais de Potássio são ativados, a probabilidade de abertura dos canais de Sódio e Cálcio dependentes de despolarização é reduzida, pois a célula fica hiperpolarizada (KOLB, 1990).

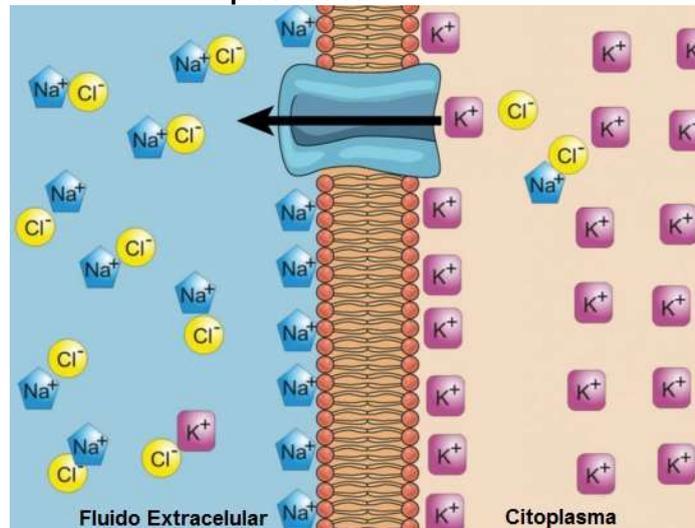
Os canais de Potássio foram classificados dentro de quatro classe:

- Canais de Potássio ativadas por Cálcio, K_{Ca} ;
- Canais de Potássio Retificado Internamente, K_{ir} ;
- Canais de Potássio Dependentes de ATP, K_{ATP} e
- Canais de Potássio Dependentes de Tensão, K_v (MENEGAZ D;

MENDES AKB; SILVA FRMB, 2021).

A figura 6 mostra uma ilustração dos movimentos iônicos dos canais de potássio.

Figura 6 – Ilustração de como os Canais Potássio se movimentam através da membrana plasmática.



Fonte: Criado por Danusa Menegaz com software BioRender.com.

3.6.1.1 Canais de Potássio Dependentes de Cálcio e Canais de Potássio Retificados Internamente

Os canais de Potássio Dependentes de Cálcio são ativados pelo cálcio intracelular e divididos, de acordo com sua condutância, em canais de grande condutância, condutância intermediária e condutância pequena. Os Canais de Potássio Retificados Internamente, denominados canais K_{ir} , são independentes de voltagem e são controlados por proteínas G, pH e trifosfato de adenosina (ATP). Esses canais controlam o potencial de repouso da membrana celular e a excitabilidade das células, desempenhando um papel importante em muitos tecidos endócrinos e no cérebro (KOBAYASHI; WASHIYAMA; IKEDA, 2003).

3.6.1.2 Canais de Potássio Dependentes de ATP

Os canais de Potássio dependentes de ATP são controlados pelos níveis de ATP no citoplasma. Concentrações elevadas de ATP intracelular promovem o fechamento destes canais, enquanto concentrações reduzidas promovem a abertura (LEITE, 1998). A atividade deste canal pode ser modulada por fosforilação e pelo pH intracelular. A ativação da proteína quinase A, em geral, estimula a abertura do canal (QUAST, 1996).

Os canais de Potássio Dependentes de ATP, K_{ATP} são caracterizados por tipos de 1 a 5, diferenciando-se na variabilidade da sua condutância e na concentração de ATP necessária para a inibição da atividade do canal. O canal tipo 1 é o mais

conhecido, podendo ser encontrados em músculos liso e esquelético, células β pancreáticas e em axônios de vertebrados. São relativamente insensíveis às variações no potencial de membrana e na concentração de Ca^+ intracelular (ASHCROFT; ASHCROFT, 1990).

3.6.1.3 Canais de Potássio Dependentes de Tensão

Foi demonstrado que os canais de Potássio dependentes de Tensão regulam o potencial de ação, a repolarização, modulam padrões de disparo neuronal e determinam o potencial de membrana de repouso da célula (HIGASHIDA, 1993).

Os canais de K^+ dependentes de tensão possuem três componentes principais:

- Via de condução iônica (poro), que quando abre, conduz predominantemente e seletivamente o íon com mesmo nome deste canal. O controle de abertura dessas vias de condução (um processo chamado *gating*) é dependente da tensão da membrana, daí o nome 'canais dependentes de tensão' (JIANG et al., 2003).
- Um sensor de tensão, responsável por detectar as variações no potencial de membrana e;
- Um mecanismo ligando o sensor ao poro para que o controle de abertura das vias seja efetuado, como descrito por Jiang et al., 2003.

Os canais dependentes de tensão funcionam por aminoácidos carregados '*gating charges*' se movendo através do campo elétrico da membrana em associação com a abertura do poro, permitindo a tensão da membrana fazer o desequilíbrio entre as conformações fechadas e abertas deste canal. Estes movimentos *gating charges* podem ser medidos como correntes elétricas transientes associados à uma entrada de tensão e separados por condução iônica (ARMSTRONG; BEZANILLA, 1974).

3.7 Efeitos do FSH em Canais Iônicos

Há poucos estudos eletrofisiológicos utilizando células dos túbulos seminíferos de testículos de rato. Potenciais intracelulares de membrana na ordem de $-28,2 \pm 0,3\text{mV}$ foram registrados nessas células por (CUTHBERT; WONG, 1975). Contudo, devido a heterogeneidade celular dos túbulos seminíferos, não foram registrados valores específicos. Joffre e Roche, em 1988, publicaram uma tensão

média de $-21,6 \pm 0,2\text{mV}$ para o potencial de repouso de células de Sertoli em cultura; e observaram que o FSH produzia uma resposta hiperpolarizante após 24hs de tratamento, sendo que esta hiperpolarização se relacionava com o aumento na permeabilidade do íon K^+ . Outros estudos registraram potenciais intracelulares de membrana em células de Sertoli de túbulos seminíferos "SCE" de ratos imaturos em condições basais e sob a ação do FSH, obtendo-se uma média de $-37,65 \pm 1,12\text{mV}$ (MCCONNELL, 1990) (WASSERMANN et al., 1990). Verificou-se que o hormônio causava um efeito bifásico, dependente da dose, sobre o potencial de repouso das células de Sertoli, através de uma hiperpolarização seguida de uma despolarização (MCCONNELL, 1990) (WASSERMANN et al., 1990).

A incubação de células de Sertoli em cultura com sulfato de quinidina, provocou a diminuição da hiperpolarização evocada pelo FSH nessas células (JOFFRE; ROCHE, 1988b). Em muitas células secretoras, o aumento na permeabilidade do K^+ é bloqueado pela droga quinidina, a qual é conhecida por inibir a abertura de canais de K^+ sensíveis a ATP.

Sabe-se que canais de K^+ estão envolvidos em diversas atividades biológicas. Por exemplo, alguns canais são sensíveis à despolarização de membrana enquanto outros são ativados por neurotransmissores, mensageiros intracelulares e ATP (STRONG et al., 1989). Joffre e Roche observaram que a hiperpolarização induzida pelo FSH em cultura de células de Sertoli estava relacionada a um aumento na permeabilidade do K^+ . Sugeriram ainda, que esta hiperpolarização poderia ser regulada por variações na concentração de Ca^{+2} intracelular (JOFFRE; ROCHE, 1988b), portanto, a hiperpolarização seria produzida pelo aumento na permeabilidade do K^+ e modulada pelas variações subsequentes do fluxo de Ca^{+2} .

3.8 Bomba de Sódio e Potássio

O transporte de substâncias entre os meios intra e extracelular faz-se por transporte passivo e/ou ativo, o transporte passivo é uma difusão simples facilitada pela passagem de substâncias pelos espaços intermoleculares da membrana, as proteínas permitem que certos solutos atravessem a membrana, sem o consumo de energia, apenas pelo movimento molecular proporcionado pela diferença de concentração entre os dois lados da membrana (ET AL ALBERTS, 1994). O transporte ativo é o transporte facilitado transmembrana que ocorre com a participação de proteínas (OLIVEIRA, 2004). Este transporte exige a interação com proteínas

transportadoras e a existência de gradientes de concentração, transportando substâncias importantes para a célula, em quantidades maiores e mais rapidamente em relação as que cruzam a bicamada de lipídeos por transporte passivo (BEAUGÉ, L. E LEW, 1977). No transporte ativo, há a necessidade de fonte adicional de energia para criar e manter gradientes iônicos, promovendo a movimentação de substâncias contra gradiente eletroquímico, permitindo que a célula permaneça em homeostase (ET AL ALBERTS, 1994). Para o transporte ativo ocorrer, as chamadas bombas iônicas, entre as quais a bomba de Na^+/K^+ usam moléculas de adenosina trifosfato (ATP) como fonte de energia (DE FRANCESCHI et al., 1997).

A Na^+/K^+ ATPase é responsável pela manutenção do gradiente iônico entre Na^+ e K^+ , e de outros processos de transporte de íons. As diferenças de concentração são mantidas pela membrana plasmática virtualmente, em todas as células animais (DORIS, 1994). No meio intracelular, a concentração de sódio varia entre 5 e 15 mEq/L, enquanto a concentração de potássio atinge 140 mEq/L. No meio extracelular, a concentração de sódio atinge 145 mEq/L, e a concentração de potássio atinge 5 mEq/L (ET AL ALBERTS, 1994). A ativação da bomba de sódio e potássio na membrana plasmática, quando no meio intracelular, leva à abertura do canal de potássio, aumentando assim a eletronegatividade intracelular e alterando o comportamento da célula (MIJATOVIC; DUFRASNE; KISS, 2012)(MENEGAZ D; MENDES AKB; SILVA FRMB, 2021).

Os íons Na^+/K^+ ATPase geram gradientes eletroquímicos de sódio e potássio que são vitais para as células animais, trocando três íons de sódio por dois íons de potássio através da membrana plasmática durante cada ciclo de hidrólise de ATP. (KAY, 2017).

3.9 Modelamento Matemático

Segundo Haefner: “Um modelo é uma descrição de um sistema. Um sistema é qualquer coleção de objetos inter-relacionados. Um objeto é algo elementar sobre o qual as observações podem ser feitas, mas cuja estrutura interna não existe ou é ignorado. Uma descrição é um sinal que pode ser decodificado ou interpretado por humanos” (HAEFNER, 2005).

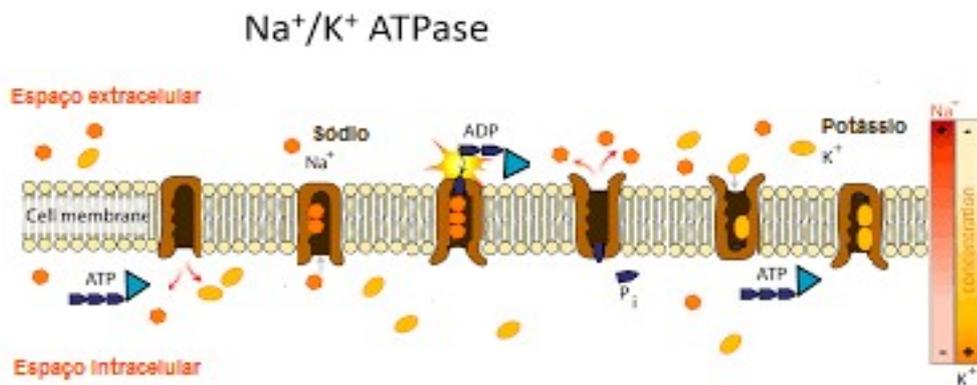
Os modelos são usados para o entendimento de qualquer sistema, predição do estado conhecido ou de controle de um sistema para produção de uma condição desejável. Os tipos de problemas em que são utilizados os modelos matemáticos são

relacionados à síntese, à análise e à instrumentação (HAEFNER, 2005). A síntese utiliza o conhecimento de entradas e saídas e deduz as características do sistema. A análise usa o conhecimento das partes e seus estímulos para avaliar as respostas observadas. E a instrumentação projeta um sistema com uma saída específica como resultado de entrada.

3.9.1 Modelamento da Bomba de Sódio e Potássio

Um modelo cinético dos efeitos das Enzimas Eletrogênicas no Potencial de Membrana foi proposto por Hernandez et al. (1989). Baseado no modelo Enzimático da Bomba de Sódio, descrito por Chapman et al. (1983), Hernandez mostrou um modelo onde a reação enzimática é representada por um esquema de seis passos e mostrado na figura 7. O modelo é usado para analisar o caso de uma membrana ser atravessada por íons de K^+ e Na^+ por simples difusão, e por transporte eletrogênico mediado pela Na^+/K^+ ATPase (HERNANDEZ; FISCHBARG; LIEBOVITCH, 1989).

Figura 7 – Representação do modelo de transporte eletrogênico mediado pela Na^+/K^+ ATPase descrito por Chapman et al.



Fonte: Criado por Danusa Menegaz com software BioRender.com.

3.9.2 Modelamento H-H

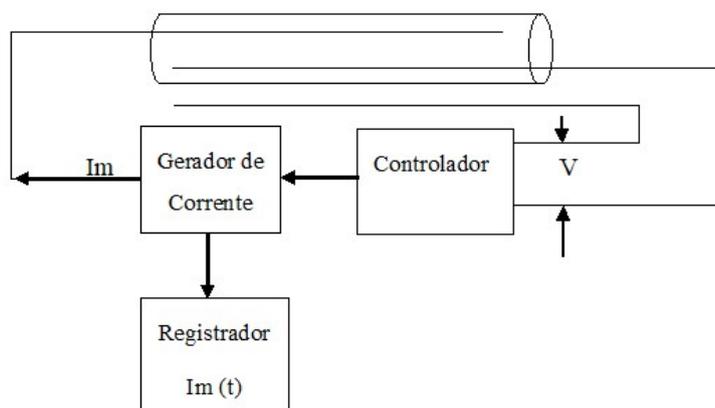
Alan Hodgkin e Andrew F. Huxley em 1952, desenvolveram um modelo de equações diferenciais, proposto originalmente para a propagação de sinais elétricos no axônio gigante de lula, as quais são modificadas para descrever o comportamento de neurônios em outros animais e para outros tipos de tecidos excitáveis. A realização dos experimentos de Hodgkin e Huxley utilizou duas técnicas, conhecidas como grampeamento espacial e grampeamento de potencial elétrico (*voltage clamp*).

3.9.2.1 Método de Medição de *Voltage Clamp*

A metodologia de medição *Voltage Clamp* é representada basicamente pela figura 8.

Ao longo do axônio são inseridos dois eletrodos finos e longos, e conectados ao gerador de corrente e controlador. Como a resistência dos eletrodos é muito baixa, considera-se que há o mesmo potencial elétrico em todos os pontos do axônio, como uma célula pontual, diz-se que a célula está sob grampo espacial.

Figura 8 – Esquema do arranjo experimental para medidas com grampo espacial e de potencial elétrico.



Fonte: Manual do amplificador Multi-Clamp 700B.

Um dos eletrodos está emparelhado com um eletrodo externo ao axônio, para medir a diferença de potencial “ V ” através da membrana. O outro eletrodo é usado para injetar ou retirar corrente da célula, com a função de manter a diferença de potencial através da membrana num valor constante. A medição dessa corrente permite o cálculo da condutância da membrana. Esta técnica é chamada de grampo de potencial elétrico e permite controlar o potencial de membrana, fazendo com que ele tenha qualquer valor desejado (BOWER, 1998).

Atualmente, equipamentos mais modernos fazem estas medições automaticamente, com softwares para geração da corrente desejada e medição da tensão transmembrana ou vice-versa. O equipamento usado nos experimentos que geraram os dados utilizados neste trabalho, foi o amplificador *Multi-Clamp 700B* (Molecular Devices Corp., Berkeley, CA), do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), mostrado na figura 9A, e com protocolo descrito em (HAMILL et al., 1981). A figura 9B mostra a imagem ampliada de um experimento com sua respectiva pipeta, sendo realizada no amplificador. A

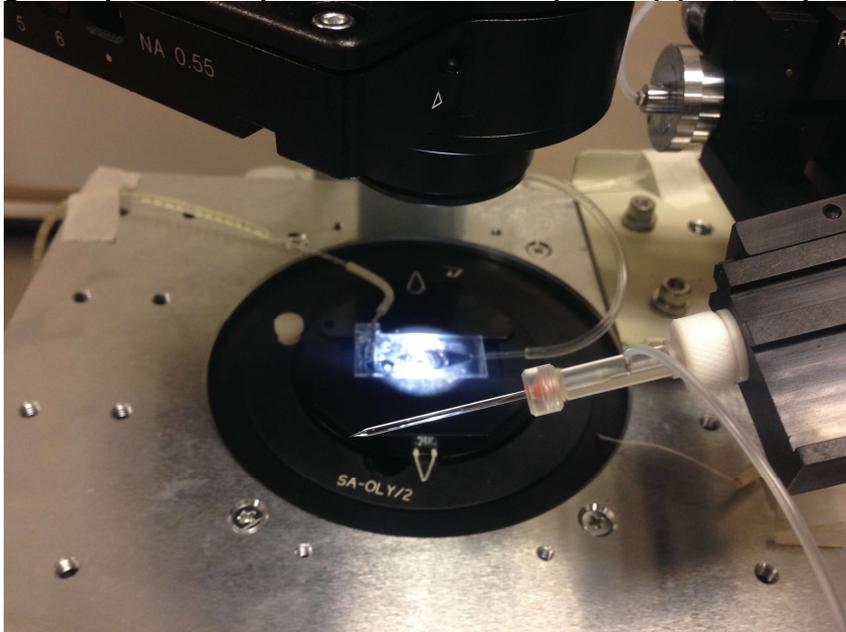
imagem de uma célula sendo perfurada por eletrodo para a respectiva medição é mostrada na figura 10.

Figura 9 – A) Amplificador Multiclamp 700B no Departamento de Farmácia na Universidade Federal de Santa Catarina - Nubiocel Lab.



Fonte: Autoria Própria

B) Imagem ampliada do experimento com sua respectiva pipeta, no aparelho amplificador.



Fonte: Autoria Própria

Figura 10 – Imagem de uma célula de Sertoli em cultura capturada sob um microscópio invertido com aumento de 40x.

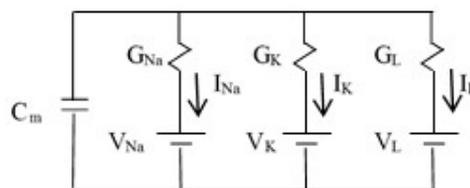


Fonte: Danusa Menegaz

3.9.2.2 Modelo Matemático Proposto por Alan Hodgkin e Andrew F. Huxley

Os estudos realizados por Hodgkin e Huxley foram desenvolvidos em 1952, e possibilitaram a construção de um modelo elétrico e matemático que reproduz diversos fenômenos eletrofisiológicos observadas em células excitáveis¹. A figura 11 apresenta o circuito elétrico equivalente do modelo H-H.

Figura 11 – Circuito elétrico equivalente para o modelo proposto por Hodgkin e Huxley. C_m : Capacitância da membrana, G_{Na} : Condutância do canal de sódio; G_K : Condutância do canal de potássio; G_L : Condutância do canal referente as correntes de fuga; I_{Na} : Corrente de sódio, I_K : Corrente de potássio; I_L : Corrente de fuga; V_{Na} : DDP dos canais de sódio; V_K : DDP dos canais de potássio; V_L : DDP dos canais de fuga.



Fonte: Autoria Própria

Este modelo, conhecido como modelo H-H, considera as correntes iônicas devido as condutâncias dos canais de Sódio I_{Na} , canais de Potássio I_K e as correntes de fuga I_L , a equação 1:

$$I_{st} = C_m \frac{dv}{dt} + I_{Na} + I_K + I_L \text{ [A]} \quad (1)$$

¹ As células de Sertoli, apesar de não serem células eletricamente excitáveis, possuem também alguns canais dependentes de tensão, como canais de Cálcio dependentes de tensão (CCDT) e canais de Potássio dependentes de tensão (CPDT).

Onde:

I_{st} = Corrente estimulatória do circuito

C_m = Capacitância da membrana

V_m = diferença de potencial transmembrana

I_{Na} = Corrente iônica para os canais de Sódio

I_K = Corrente iônica para os canais Potássio

I_L = Corrente iônica de fuga

Cada corrente iônica I_i ($i=Na, K$), é relacionada com o potencial de membrana V_m pela relação mostrada na equação 5 (HODGKIN; HUXLEY, 1952).

$$I_i = G_i m^x h^y (V_m - E_i) \text{ [A]} \quad (2)$$

Onde m e h denotam parâmetros de probabilidade de ativação e inativação dos canais de sódio e potássio respectivamente, e x e y a ativação das portas com probabilidades m e h respectivamente.

Em uma célula excitável, aplicando-se uma corrente estimulatória I_{st} , dada por um pulso de corrente transmembrana, observa-se variação na diferença de potencial entre o interior e o exterior da célula, chamada de Potencial de Ação - V_m . No modelo H-H esse PA é representado pelo somatório diferentes curvas, onde cada curva representa a contribuição de um canal iônico.

4 MÉTODOS

4.1 Modelo Matemático

O modelo matemático desenvolvido considera o fato das células de Sertoli serem células eletricamente não-excitáveis, isto é, não produzem potenciais de ação. Nestas células, a aplicação de um pulso de corrente despolarizante em estado estacionário, não provoca potencial de ação (JOFFRE; ROCHE, 1988b). Porém, como mostrado amplamente na literatura (DO NASCIMENTO et al., 2020)(MENEGAZ et al., 2016)(JOFFRE; ROCHE, 1988c)(LEITE, 1998), a aplicação de hormônios tireoidianos, provocam mudança na diferença de potencial entre o interior e o exterior da membrana. Sendo assim, consideramos algumas hipóteses, e a mais compatível com os experimentos realizados em laboratório, foi utilizada no modelo proposto.

O Hormônio Folículo Estimulante (FSH) provoca na célula de Sertoli de ratos imaturos, uma resposta bifásica. Esta resposta é caracterizada por uma rápida hiperpolarização seguida de uma despolarização (WASSERMANN et al., 1990). Em nosso trabalho consideramos somente a fase hiperpolarizante do efeito hormonal, pois segundo estes autores, a fase hiperpolarizante é atribuída às correntes *outwards* (geradas pelos íons de Potássio).

Segundo (LEITE, 1998) o efeito do uso de tolbutamida (um bloqueador de canais de K^+ sensíveis a ATP) no potencial de repouso de células de Sertoli, é de inibir ambas as fases do efeito bifásico evocado pelo FSH, sugerindo que, ao bloquear a saída de K^+ da célula, houve também a inibição da abertura dos canais de Cálcio dependentes de tensão (CCDT) e o influxo de Na^+ na célula, bloqueando também a ação despolarizante do hormônio.

Considerando que a ação do FSH ocorre através de um sistema de transporte de aminoácido (DA CRUZ CURTE; WASSERMANN, 1985), e que o gradiente transmembrana, que resulta da operação da Na^+/K^+ ATPase, é usado como força motriz para captação de vários aminoácidos (PETERSEN; FINDLAY, 1987) foi considerada a hipótese do FSH alterar o funcionamento desta bomba.

Uma modificação no funcionamento da Na^+/K^+ ATPase, gera uma mudança no potencial de repouso da célula e, conseqüentemente, uma corrente iônica devido à esta mudança, I_{Na-K} . Consideramos o modelamento da Na^+/K^+ ATPase e dos canais CPDT, o qual utiliza como variáveis, as permeabilidades iônicas para os íons de K^+ e Na^+ . Estudos anteriores mostram que essa hiperpolarização na membrana da célula

está relacionada a um aumento na permeabilidade do íon K^+ (LOSS; JACOBUS; WASSERMANN, 2011)(WASSERMANN; LOSS, 2005) (JOFFRE; ROCHE, 1988b).

4.2 Modelamento dos Canais de Potássio Dependentes de Tensão

Os canais de potássio são formados por proteínas incorporadas na membrana lipídica das células excitáveis e não-excitáveis. Tais canais de potássio exercem uma variedade funções biológicas (LI et al., 1993), e são responsáveis pela regulação do potencial de membrana. A regulação ocorre pelo fluxo seletivo dos íons de potássio através da membrana celular. Joffre e Roche (1988) observaram uma hiperpolarização (tensão interna menos negativa em relação ao lado externo) de membranas celulares induzidas por FSH. Este efeito foi relacionado à ativação das correntes de K^+ (VOLPATO et al., 2004)(JOFFRE et al., 1988).

Foi realizado um estudo no qual os canais de potássio foram modulados para investigar a fase de hiperpolarização da resposta bifásica e o efeito do FSH sobre o potencial de membrana das células de Sertoli de ratos imaturos. Nos baseamos na teoria elaborada por Huxley e Hodgkin para formular as equações utilizadas no nosso modelo. Os parâmetros necessários para o equacionamento foram obtidos nos experimentos realizados pelo método *voltage-clamp*, no laboratório de Farmácia na Universidade Federal de Santa Catarina, e analisados com Clampfit 10 (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA) e Origin 7.0 (Origin Lab Corporation, One Roundhouse Plaza, Northampton, MA).

No modelo proposto para a célula de Sertoli, foram consideradas apenas as correntes iônicas hiperpolarizantes, isto é, aquelas dos canais de potássio dependentes de tensão, I_K , e aquelas correntes iônicas da Na^+/K^+ ATPase, I_{Na-K} , por serem estas duas correntes responsáveis pelas respostas rápidas do PA. Devido ao fato das células de Sertoli não serem células excitáveis, elas não reagem aos estímulos elétricos direto (JOFFRE; ROCHE, 1988b), isto é, corrente elétrica ($I_{st}=0$). No entanto, elas respondem à aplicação de hormônios, o que desencadeia uma mudança no potencial de repouso da célula. Essa mudança no potencial de membrana celular, induzida pela atividade hormonal, resulta na produção de uma corrente elétrica que, por sua vez, leva à abertura dos canais dependentes de tensão. Este processo pode ser descrito pela equação 3:

$$C_m \frac{dV_m}{dt} = -(I_K + I_{Na-K}) \quad (3)$$

Onde V_m é o potencial transmembrana, I_K é a corrente para canais de potássio, I_{Na-K} é a corrente para Na^+/K^+ ATPase e C_m é a capacitância da membrana. A C_m foi inferida a partir de dados experimentais pelo *software* Origin 7.0, presente no Amplificador Multiclamp 700B.

A corrente iônica de potássio I_K está relacionada ao potencial de membrana V pela relação mostrada na equação 7:

$$I_K = G_K n^x h^y (V - E_K) \text{ [A]} \quad (4)$$

Onde, G_K é a condutância iônica máxima para o canal de potássio; o produto $n^x h^y$ são as probabilidades de aberturas das portas dos canais (x porta ativando com n probabilidade, e y porta inativando com h probabilidade)(RIHANA et al., 2009); E_K é o potencial de equilíbrio do íon potássio e foi obtido a partir das Equações de Nernst para íons potássio, com $E_K = 88,7$ mV.

Considerando que os canais de potássio não estão desativados nas células de Sertoli, o parâmetro h não foi considerado neste modelo.

O parâmetro n varia de acordo com:

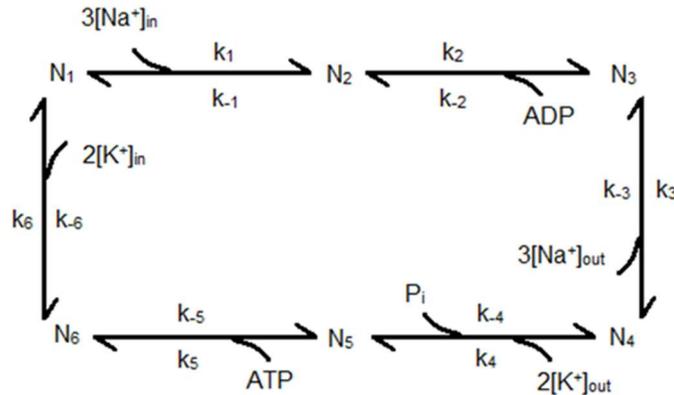
$$\frac{dn}{dt} = \frac{(n_\infty - n)}{\tau_n} \quad (5)$$

Onde τ_m é a constante de tempo de ativação, e n_∞ denota a ativação em regime permanente.

4.3 Modelamento da Na^+/K^+ ATPase

Para a realização do modelo foi considerado o modelo de enzimas para bomba de Sódio e Potássio descrito por Chapman et al., (1983 e 1983a). Este modelo descreve as propriedades eletroquímicas de um esquema de seis passos de reações para Na^+/K^+ -ATPase por simulação computacional. Este esquema é mostrado na figura 12, e os valores referentes aos dados da figura são mostrados na tabela 1.

Figura 12 - Mecanismo de reação para funcionamento da bomba eletrogênica $\text{Na}^+\text{-K}^+$. N_i ($i=1, 2, \dots, 6$) é o i -ésimo estado intermediário da reação enzimática. ATP, ADP e P_i representam trifosfato de adenosina, difosfato de adenosina e fosfato inorgânico, respectivamente; $[\text{Na}^+]_{\text{in}}$, $[\text{Na}^+]_{\text{out}}$, $[\text{K}^+]_{\text{in}}$, $[\text{K}^+]_{\text{out}}$ referem-se às concentrações iônicas de íons Na^+ e K^+ intra e extracelulares, respectivamente; e k_i e k_{-i} ($i=1, 2, \dots, 6$) são as taxas de coeficiente *forward* e *reverse* para *ith* passos.



Fonte: Hernandez et al., 1989.

Tabela 1 - Valores de ATP, ADP usados por Chapman et al. (1983), os coeficientes de Permeabilidade P_i , $P_{\text{Na}0}$, $P_{\text{K}0}$, com ordem de magnitude encontrados por vários tecidos, inclusive para células de Sertoli mostrado por Leite, (1998). Taxas de valores constantes para funcionamento da Na^+/K^+ ATPase (k_i e k_{-i}).

GRANDEZAS	VALORES
Concentrações de ATP, ADP e P_i	ATP=0,00499 mol lt^{-1} ADP=0,00006 mol lt^{-1} P_i =0,00495 mol lt^{-1}
Permeabilidade iônica do Sódio	$P_{\text{Na}0}=5 \times 10^{-7}$ cm s^{-1}
Permeabilidade iônica do Potássio	$P_{\text{K}0}=1 \times 10^{-7}$ cm s^{-1}
Taxas constantes de Na^+/K^+ -ATPase	$k_1=2,5 \times 10^{11}$ $\text{lt}^3 \text{mol}^{-3} \text{s}^{-1}$ $k_{-1}=10^5$ s^{-1} $k_2=10^4$ s^{-1} $k_{-2}=10^5$ $\text{lt mol}^{-1} \text{s}^{-1}$ $k_3=172$ s^{-1} $k_{-3}=10^2$ s^{-1} $k_4=1,5 \times 10^7$ $\text{lt}^2 \text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$ $k_{-4}=2 \times 10^5$ $\text{lt}^2 \text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$ $k_5=2 \times 10^6$ $\text{lt}^2 \text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$ $k_{-5}=30$ s^{-1} $k_6=1,15 \times 10^4$ s^{-1} $k_{-6}=6 \times 10^8$ $\text{lt}^2 \text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$

Fonte: Hernandez et al., 1989.

Este modelo, utilizado para analisar o transporte de Na^+ e K^+ por simples difusão através da membrana plasmática, foi baseado em um modelo cinético proposto para estudar a influência das enzimas eletrogênicas no potencial de membrana celular (HERNANDEZ; FISCHBARG; LIEBOVITCH, 1989).

4.4 Implementação do Modelo

O modelo foi implementado com o software MATLAB®, e foi utilizado a função 'ode45' para solução das equações diferenciais usadas no modelo.

O computador utilizado foi da marca Acer, modelo Aspire 4830T-6605; processador Intel Corel I5 – 2450M, 2,5 MHz, 8Gbytes de memória RAM e 750GB de armazenamento interno. Sistema operacional original Windows 7 e instalado Linux – Ubuntu, para utilização do software G3Data, para captação de pontos em curvas encontradas nas figuras de artigos ou outros documentos usados para este modelamento.

5 RESULTADOS

5.1 Análise Matemática dos Canais de Potássio Dependentes de Tensão

Na fase de hiperpolarização os canais de potássio dependentes de tensão foram modelados com base na teoria de Hodgkin e Huxley. De acordo com as curvas, obtidas por meio do experimento de *voltage-clamp* em células de Sertoli, pôde-se observar que estes canais não apresentam inativação. Portanto, para este modelamento, apenas os parâmetros de ativação serão utilizados. Sendo assim, a corrente I_K para os canais de Potássio em células de Sertoli de ratos imaturos, torna-se:

$$I_K = G_K n^x (V_m - E_K) \quad (6)$$

Onde G_K é a condutância máxima do canal iônico; x é o número de portas ativando com m probabilidade de ativação; V_m é o potencial transmembrana da célula e E_K é o potencial de equilíbrio para os canais de potássio. A curva $I \times V$ dos canais de potássio na figura 13 fornece valores para calcular $G_K = 0,2 \text{ mS/cm}^2$.

5.1.1 Curva de Ativação em Regime Permanente (n_∞)

A curva de ativação em regime permanente é representada pela equação de Boltzmann, dada por:

$$n_\infty = \frac{1}{1 + e^{\left(\frac{V_{1/2} + V_m}{X}\right)}} \quad (7)$$

Onde:

n_∞ = é a probabilidade de ativação em regime permanente;

V_m = é o potencial transmembrana da célula;

$V_{1/2}$ = é o potencial de membrana em que a probabilidade de ativação é de 50%;

X = é a inclinação da curva de ativação.

A curva de ativação em regime permanente obtida pelo método de *voltage clamp*, para a célula de Sertoli é mostrada na figura 13. O valor de $V_{1/2}$ é dado como o valor de tensão equivalente ao meio do eixo de corrente. E o valor de X é o valor de inclinação da curva (YOSHINO; WANG; KAO, 1997). A curva de regime permanente apresentada na figura 14 foi obtida pela razão de cada valor de condutância, na sua

respectiva tensão, pelo valor máximo de condutância $\overline{G_K} = 4,9\eta S$ (Eq. 8), calculado pela curva $I \times V$ (Figura 13):

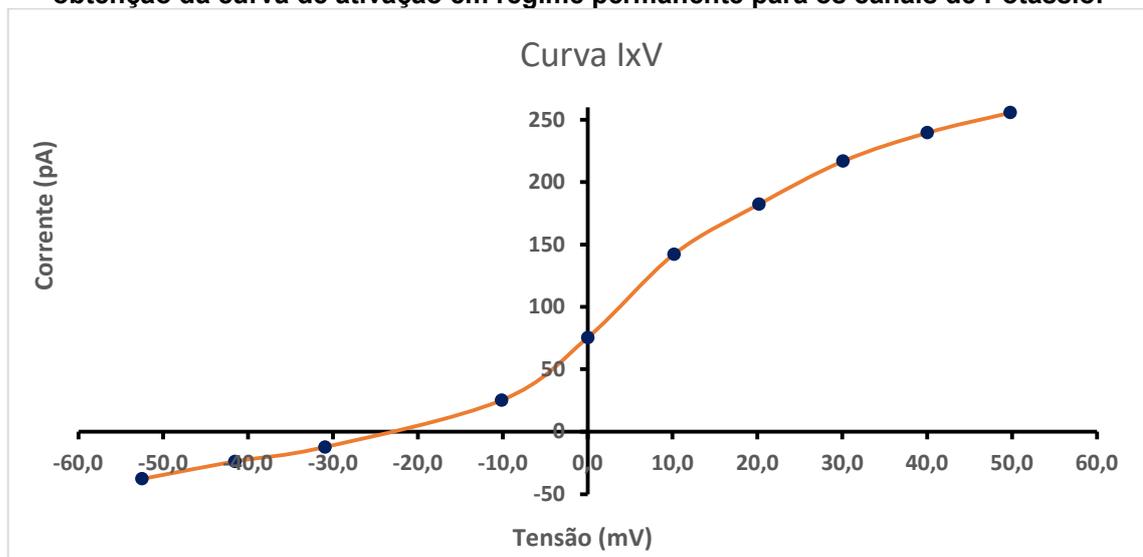
$$n_{\infty} = \frac{G_K}{\overline{G_K}} \quad (8)$$

A condutância G_K é calculada para cada valor de I e V mostrados da curva, usando a relação (B. HILLE, 1992):

$$G_K = \frac{I_K}{(V_K - V_{K0})} \quad (9)$$

Os valores de tensão usados no cálculo são os resultados da diferença entre as tensões do ponto a ser calculado e o valor de tensão para o qual a corrente é nula e $(V_K - V_{K0})$.

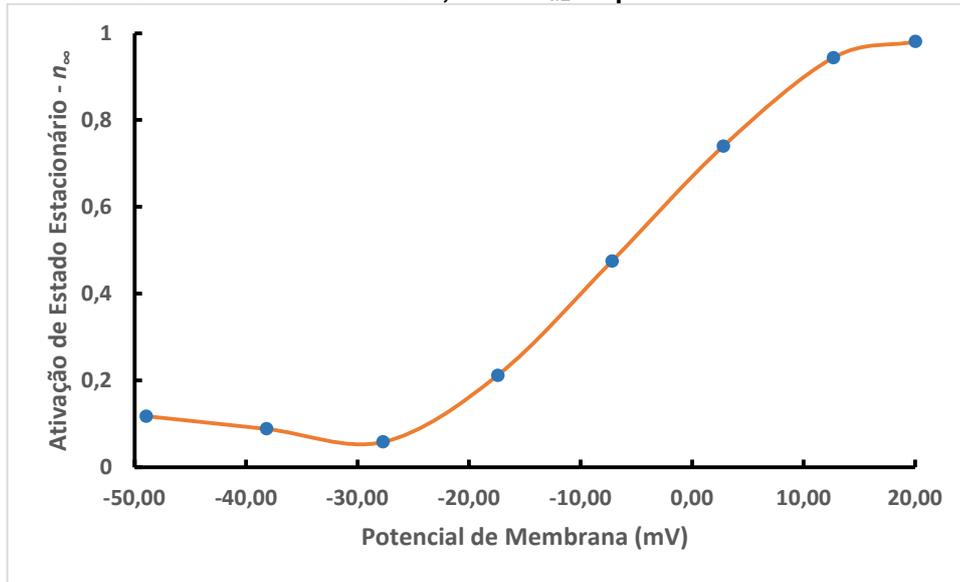
Figura 13- Curva $I \times V$, obtida experimentalmente, pelo método *voltage clamp* e utilizada para obtenção da curva de ativação em regime permanente para os canais de Potássio.



Fonte: Autoria Própria

Considerando os valores obtidos da curva $I \times V$ para os canais de Potássio das células de Sertoli, o valor de $V_{1/2}$ fica em aproximadamente -7 mV e o valor de X_{∞} - 90mV.

Figura 14 - Curva de estado estacionário, onde $V_{1/2}$ é aproximadamente -7 mV e X_{∞} -90 mV.

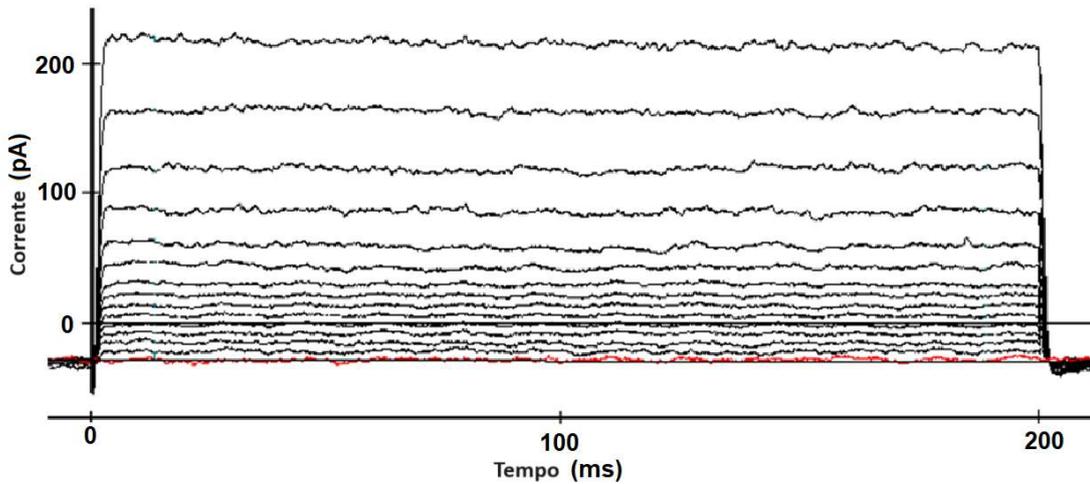


Fonte: Autoria Própria

5.1.2 Cálculo dos valores da Constante de Tempo de Ativação (τ_{∞})

No laboratório da Universidade Federal de Santa Catarina, utilizou-se o método de *voltage clamp*, para obter uma família de curvas $I \times t$, em resposta à pulsos retangulares de tensão. Esses pulsos representam a faixa de ativação e inativação dos canais. Observou-se que, nas respostas aos canais de Potássio em células de Sertoli, apenas os transitórios de ativação eram evidentes. A corrente permaneceu constante durante todo o período de gravação, sem a ocorrência de inativação desses canais. A figura 15 apresenta uma dessas famílias de curvas, com seus transitórios de ativação.

Figura 15 - Família de curvas $I \times t$, cada curva é uma resposta a um pulso de tensão. Curvas obtidas em células de Sertoli de controle, através do método de *voltage clamp*.



Fonte: Autoria Própria

Para uma família de curvas $I \times t$, existe uma família de equações exponenciais, cada qual com sua constante de tempo. Estas curvas foram adquiridas em *software* MATLAB®, e com a ferramenta *cftool* foram encontradas as equações para cada uma delas.

Estas curvas foram ajustadas para a equação exponencial:

$$I_K = I_m \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_\infty}} \right)^2 \text{ pA} \quad (10)$$

Onde:

I_K =Corrente para os canais de potássio;

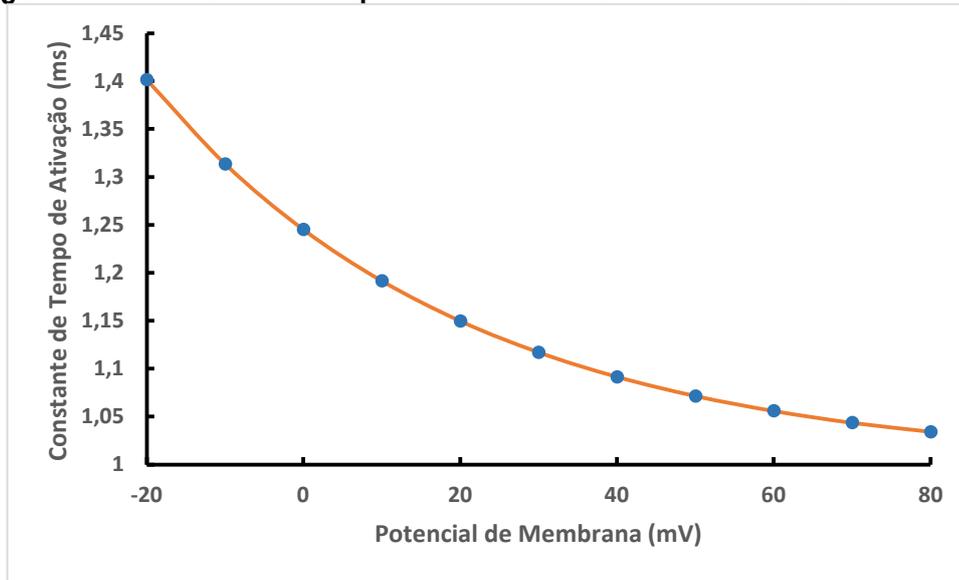
I_m =Corrente transmembrana da célula e

τ_∞ =Constante de tempo de ativação.

Encontrados os valores de τ_∞ , foi traçada a curva mostrada na figura 16. Para esta curva, utilizando a ferramenta *cftool* do *software* Matlab®, pode-se encontrar a equação da constante de tempo de ativação τ_∞ em função do potencial transmembrana V_m , dada pela equação 11.

$$\tau_\infty = (0.2451e^{-24.66V} + 1) \quad (11)$$

Figura 16 - Constantes de tempo relativas aos transitórios das curvas de corrente.



Fonte: Autoria Própria

5.2 Corrente da Bomba Na^+/K^+ dependente de ATP

A corrente iônica $I_{\text{Na-K}}$ devido ao transporte enzimático mediada pela Na^+/K^+ ATPase é dada por:

$$I_{\text{Na-K}} = -(I_{p\text{Na}} + I_{p\text{K}}) \quad (12)$$

Onde

$$I_{p\text{Na}} = FP_{\text{Na}} \left\{ [\text{Na}^+]_i e^{\left(\frac{FV_m}{2R}\right)} - [\text{Na}^+]_e e^{\left(-\frac{FV_m}{2R}\right)} \right\} \quad (13)$$

e

$$I_{p\text{K}} = FP_{\text{K}} \left\{ [\text{K}^+]_i e^{\left(\frac{FV_m}{2RT}\right)} - [\text{K}^+]_e e^{\left(-\frac{FV_m}{2RT}\right)} \right\} \quad (14)$$

P_{Na} e P_{K} são os coeficientes de permeabilidade para os íons de Na^+ e K^+ , respectivamente. A variável R é a constante universal dos gases; T é a temperatura na escala absoluta e F é a carga elétrica por mol de elétrons. $[\text{Na}^+]_e$ é a concentração externa de íons sódio; $[\text{Na}^+]_i$ é a concentração interna de íons sódio; $[\text{K}^+]_e$ é a concentração externa de íons potássio; $[\text{K}^+]_i$ é a concentração interna de íons potássio. Esses valores são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores de concentrações iônicas, Constantes Universal dos Gases, Temperatura e Carga Elétrica por mol de Elétrons, usados na equação das correntes iônicas de Sódio e Potássio para Na⁺/K⁺ ATPase.

GRANDEZAS	VALORES
Constante Universal dos Gases (<i>R</i>)	8.315 J K ⁻¹ mol ⁻¹
Temperatura (<i>T</i>)	298.2 K (25 °C)
Carga Elétrica <i>per</i> mol de elétrons (<i>F</i>)	96485 C mol ⁻¹
Concentração Externa dos íons de Sódio [Na ⁺] _e	140 mM
Concentração Externa dos íons de Potássio [K ⁺] _e	4.5 mM
Concentração Interna dos íons de Sódio [Na ⁺] _i	10 mM
Concentração Interna dos íons de Potássio [K ⁺] _i	145 mM

Fonte: Hernandez et al., 1989.

Os coeficientes de permeabilidades iônicas usados, são descritos em (HERNANDEZ; FISCHBARG; LIEBOVITCH, 1989), como:

$$P_{Na} = \frac{P_{Na0}(z_{Na}FV_m/RT)}{e^{(z_{Na}FV_m/2RT)} - e^{(-z_{Na}FV_m/2RT)}} \quad (15)$$

e

$$P_K = \frac{P_{K0}(z_KFV_m/RT)}{e^{(z_KFV_m/2RT)} - e^{(-z_KFV_m/2RT)}} \quad (16)$$

Os valores de z_{Na} e z_K representam a valência dos íons de Sódio e potássio respectivamente e, P_{Na0} e P_{K0} , os valores para os coeficientes de permeabilidade dos íons de Sódio e Potássio quando $V_m=0$, dados por (B. CHAPMAN, E. A. JOHNSON, J. M. KOOTSEY, 1983).

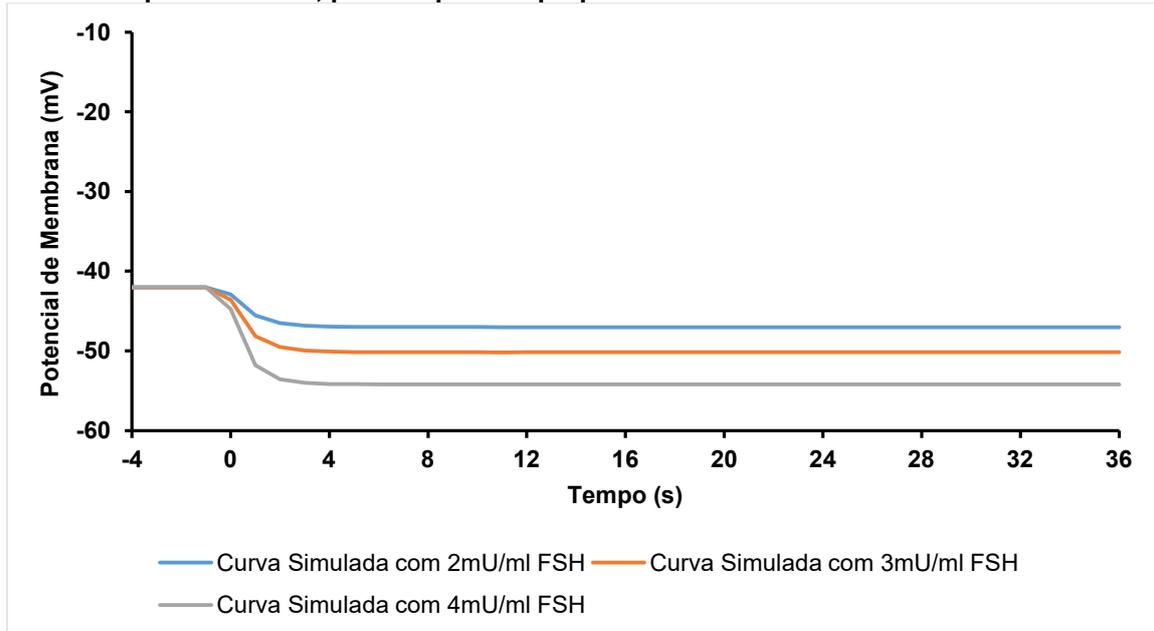
Considerando a potencial de repouso da célula de Sertoli sendo $V_m=-37,65mV$ (WASSERMANN et al., 1990), e utilizando as Equações 15 e 16, obtemos os valores de permeabilidade aos íons sódio e potássio.

Diferentes concentrações hormonais causam variações nos valores de permeabilidade celular (P_{K0} e P_{Na0}). Assim, variações na concentração hormonal aplicada à célula levam a alterações na corrente da bomba Na⁺/K⁺ dependente de ATP, abrindo os canais K_v. Como exemplo, o modelo foi aplicado a diferentes valores de permeabilidade celular, o que na prática seria causado por alterações na concentração do hormônio FSH, pois o aumento na concentração de FSH leva a um aumento na permeabilidade iônica celular ao potássio e ao sódio. Resultado similar foi encontrado por (JOFFRE; ROCHE, 1988d).

Neste modelo os resultados foram obtidos para diferentes níveis de FSH, os quais causaram variações na permeabilidade dos íons de Potássio da membrana

celular. Essas variações por sua vez, afetam a diferença de potencial da membrana, fazendo com que a Na^+/K^+ ATPase atue na abertura dos Canais de Potássio Dependentes de Tensão (CPDT). O potencial de membrana em função do tempo para três níveis de concentração de FSH em função do tempo e mostrado no gráfico da figura 17.

Figura 17 - Curvas obtidas pelo modelo matemático, considerando valores de 2, 3 e 4mU/ml respectivamente, para resposta hiperpolarizante devido aos canais de Potássio.

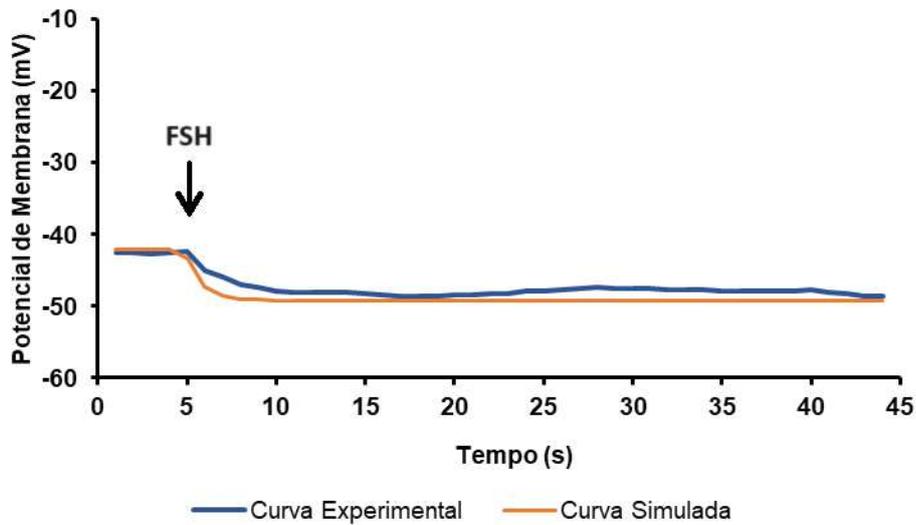


Fonte: Autoria Própria

Para validação dos dados foram utilizados valores obtidos experimentalmente por (WASSERMANN et al., 1990) e comprovados por (LOSS; JACOBUS; WASSERMANN, 2007), onde são mostradas curvas com a diferença de potencial em relação ao tempo (V_{xt}), para diferentes valores de FSH, 2 mU/ml, 3 mU/ml, 4mU/ml e 3mU/ml com uso de Verapamil, o qual inibe os canais despolarizantes, mostrando somente a resposta hiperpolarizante provocada pelos canais de Potássio.

Considerando que, experimentalmente em Wassermann et al. (1992), somente a curva com 3mU/ml de FSH foi adquirida com a utilização de Verapamil, o qual bloqueia o efeito despolarizante da célula, podemos comparar o nosso modelo com canais hiperpolarizantes somente com esta curva. Neste caso as curvas ficaram muito próximas, por não ter sido considerado neste modelamento os canais de Cálcio encontrados nas células de Sertoli. Essa comparação é mostrada na figura 18.

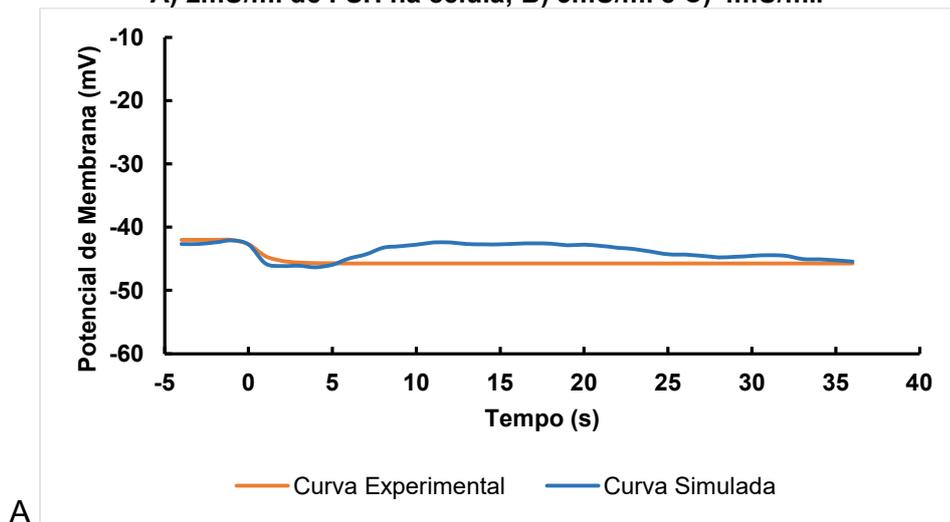
Figura 18 - Curva experimental obtida com valor de 3mU/ml de FSH e com a presença de Verapamil, comparada à curva modelada para o mesmo valor de FSH.



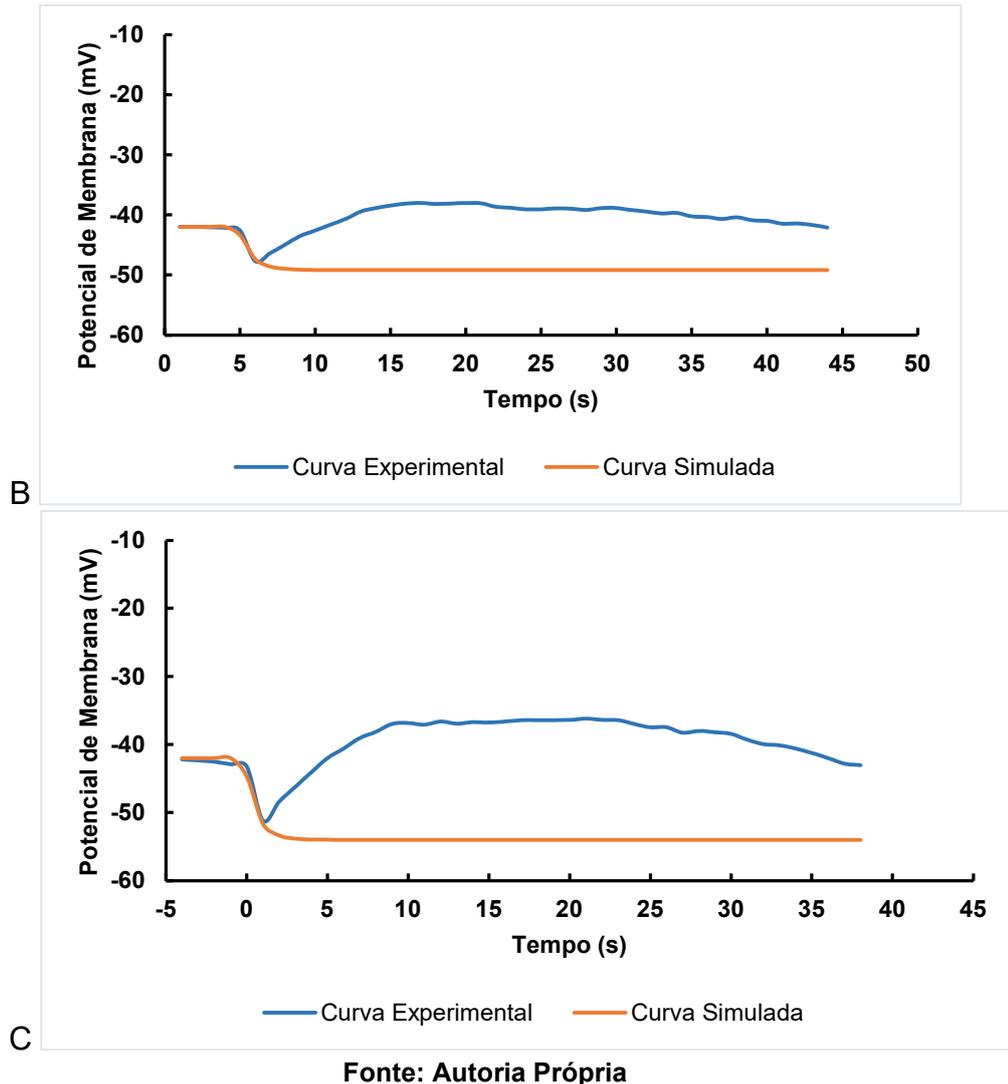
Fonte: Autoria Própria

Para fins comparativos, os dados simulados com o modelamento proposto foram ajustados para os valores de tensão hiperpolarizante das curvas de potencial transmembrana total, isto é, sem a utilização de bloqueador. A figura 19 mostra o comparativo entre as curvas modeladas e experimentais para células submetidas a: A) 2mU/ml de FSH; B) 3mU/ml e C) 4mU/ml.

Figura 19 - Curvas experimentais simuladas, comparadas às curvas modeladas para valores de A) 2mU/ml de FSH na célula; B) 3mU/ml e C) 4mU/ml.



A



As equações baseadas no modelo de Hodgkin e Huxley utilizadas para obtenção destes resultados foram encontradas através de curvas obtidas experimentalmente. Para cada equação, foram levantadas várias curvas experimentais, com mesmas características, como a idade celular entre 4 e 11 dias. E as equações usadas foram encontradas pela média de quatro curvas com características semelhantes, com ratos de 4 dias de idade. Apesar dos ratos usados em (WASSERMANN et al., 1990), serem de 16 a 20 dias de idade, os resultados se mostraram bem próximos, não sendo qualitativamente nem quantitativamente afetados.

6 DISCUSSÃO

Os resultados encontrados por Wassermann et al. (1992) foram obtidos em células de Sertoli localizadas dentro de túbulos seminíferos inteiros, no entanto as curvas usadas neste modelo foram derivadas de células de Sertoli isoladas, obtidas por meio de uma digestão enzimática sequencial, conforme descrito por Dorrington et al. (1975). Apesar de algumas variáveis, como potencial de repouso e resistência elétrica transmembrana da célula, poderem ter seus valores alterados com o isolamento das células, o modelo que se baseia nos mecanismos comuns descritos por vários autores, mantém seus padrões qualitativos inalterados.

Joffre & Roche (1986) encontraram um potencial de repouso de $-21,6 \pm 0,2$ mV em células de Sertoli de ratos imaturos com período de cultura variando entre 3 e 7 dias, isoladas por tratamento enzimático. Já em Loss et al. (2011), foram usadas células de Sertoli em túbulos seminíferos mais negativos, -35 mV. Estudos feitos por (WASSERMANN et al., 1992b), em células em túbulos seminíferos enriquecidos com 15 dias, foram encontradas médias de potencial de repouso entre $-44 \pm 0,5$ mV. Os experimentos usados neste modelamento usaram células isoladas por tratamento enzimático, com ratos imaturos de 4 a 11 dias, com potencial de repouso médio de $-37,5$ mV. Todos estes diferentes trabalhos mostram que dependendo da idade dos ratos usados nos experimentos, o tipo de cultura de células, entre outras variáveis, pode mudar o valor do potencial de repouso destas células. Porém, este modelamento tem fácil adaptação aos valores de potenciais de repouso, pois o valor do potencial de repouso da célula é considerado como tensão inicial para o cálculo da curva do potencial transmembrana.

Joffre & Roche (1986) encontraram um potencial de repouso de $-21,6 \pm 0,2$ mV em células de Sertoli de ratos imaturos com período de cultura variando entre 3 e 7 dias, isoladas por tratamento enzimático. Já em Loss et al. (2011), foram usadas células de Sertoli em túbulos seminíferos mais negativos, -35 mV. Estudos feitos por (WASSERMANN et al., 1992b), em células em túbulos seminíferos enriquecidos com 15 dias, foram encontradas médias de potencial de repouso entre $-44 \pm 0,5$ mV. Os experimentos usados neste modelamento usaram células isoladas por tratamento enzimático, com ratos imaturos de 4 a 11 dias, com potencial de repouso médio de $-37,5$ mV. Todos estes diferentes trabalhos mostram que dependendo da idade dos ratos usados nos experimentos, o tipo de cultura de células, entre outras variáveis,

pode mudar o valor do potencial de repouso destas células. Porém, este modelamento tem fácil adaptação aos valores de potenciais de repouso, pois o valor do potencial de repouso da célula é considerado como tensão inicial para o cálculo da curva do potencial transmembrana.

Joffre & Roche (1986) encontraram um potencial de repouso de $-21,6 \pm 0,2$ mV em células de Sertoli de ratos imaturos com período de cultura variando entre 3 e 7 dias, isoladas por tratamento enzimático. Já em Loss et al. (2011), foram usadas células de Sertoli em túbulos seminíferos mais negativos, -35 mV. Estudos feitos por (WASSERMANN et al., 1992b), em células em túbulos seminíferos enriquecidos com 15 dias, foram encontradas médias de potencial de repouso entre $-44 \pm 0,5$ mV. Os experimentos usados neste modelamento usaram células isoladas por tratamento enzimático, com ratos imaturos de 4 a 11 dias, com potencial de repouso médio de $-37,5$ mV. Todos estes diferentes trabalhos mostram que dependendo da idade dos ratos usados nos experimentos, o tipo de cultura de células, entre outras variáveis, pode mudar o valor do potencial de repouso destas células. Porém, este modelamento tem fácil adaptação aos valores de potenciais de repouso, pois o valor do potencial de repouso da célula é considerado como tensão inicial para o cálculo da curva do potencial transmembrana.

O modelo que desenvolvemos para as células de Sertoli pode ser adaptado para estudar o efeito de outros hormônios nestas células. Isso porque as características físicas, como canais iônicos presentes parecem semelhantes. O que deverá ser analisado, em trabalhos futuros, é onde a aplicação desses hormônios afetará na célula, podendo abrir ou não diferentes canais iônicos.

Este trabalho considerou apenas o efeito de um hormônio (FSH), e apenas a corrente iônica do Potássio, por ser um primeiro modelamento de células de Sertoli, as quais são células não excitáveis. A descrição do modelamento deste tipo de célula, na literatura é muito limitado, o que dificulta o entendimento do mesmo. Porém, os resultados ficaram muito próximos dos resultados obtidos experimentalmente, isso auxiliará no modelamento de outros canais iônicos e para diferentes efeitos hormonais nestas células em trabalhos futuros. O modelamento destes efeitos hormonais sobre as células pode auxiliar no melhor entendimento sobre os canais iônicos atuantes nelas. Conhecer quais e como atuam na membrana plasmática da célula e como podem modificar seu potencial transmembrana. Apesar destas células não possuírem potencial de ação, como as células excitáveis, uma alteração no seu potencial

transmembrana com aplicação hormonal, modificam a conformação dos canais dependentes de tensão, gerando correntes que podem ser modeladas pelo conhecido Modelo H-H. Isto faz com que este modelo possa ajudar a prever outras mudanças não obtidas experimentalmente.

7 CONCLUSÃO

Até onde sabemos este estudo é uma primeira proposta de um modelo matemático para prever a resposta rápida das células de Sertoli à estimulação hormonal. O modelo proposto mostra o envolvimento de canais de potássio e bomba eletrogênica de Na^+/K^+ na hiperpolarização das células de Sertoli. O modelo é consistente com resultados experimentais obtidos em estudos anteriores. O conhecimento dos efeitos do FSH nas alterações iônicas na membrana celular de Sertoli é essencial para a compreensão do papel hormonal na reprodução masculina.

O modelo matemático dos canais de K^+ desenvolvido nesse trabalho alcançou as expectativas, comportando-se similarmente às medições realizadas fisicamente nas células de Sertoli em laboratório, através do método *patch-clamp*.

Muitos outros modelos devem ser desenvolvidos para esta célula, considerando outros tipos de hormônios atuantes e outros tipos de canais iônicos. Assim como, os canais de Sódio, presentes na Na^+/K^+ ATPase, e os canais de Cálcio e Sódio dependentes de tensão, responsáveis pela fase despolarizante da resposta bifásica para a diferença de potencial transmembrana, que podem ser modelados com as equações do modelo H_H.

8 IMPACTO DO TRABALHO

O Modelo Matemático permite caracterizar um alvo molecular específico de interesse terapêutico. Pois em experimentos *in silico*, consegue-se estudar cada canal isoladamente, sem a presença de outros canais, fármacos ou hormônios. Este estudo de canais isolados facilita o desenvolvimento de fármacos que possam atuar em um alvo preciso, o que favorece o direcionamento terapêutico.

O conhecimento do comportamento dos canais iônicos e trocadores em células de sertoli é crucial para o tratamento da infertilidade masculina, pois estas células só se multiplicam até a puberdade, e o seu funcionamento interfere na proliferação das células germinativas para o toda vida adulta. A transposição desse conhecimento para um modelo matemático, é o início do desenvolvimento de uma ferramenta computacional, que pode auxiliar pesquisadores em estudos *in silico*, mitigando o uso de insumos, cobaias, hormônios e equipamentos para *pesquisa in vitro*.

REFERÊNCIAS

- ARMSTRONG, C. M.; BEZANILLA, F. Charge movement associated with the opening and closing of the activation gates of the Na channels. **The Journal of general physiology**, v. 63, n. 5, p. 533–552, 1974.
- ASHCROFT, S. J. H.; ASHCROFT, F. M. Properties and functions of ATP-sensitive K-channels. **Cellular signalling**, v. 2, n. 3, p. 197–214, 1990.
- B. CHAPMAN, E. A. JOHNSON, J. M. KOOTSEY, J. Electrical and Biochemical Properties of an Enzyme Model of the Sodium Pump. **The Journal of Membrane Biology**, v. 74, n. 0, p. 139–153, 1983.
- B. HILLE. **Ionic Channels of Excitable Membranes**. 2.ed. ed. Massachusetts: [s.n.].
- BEAUGÉ, L. E LEW, V. L. Passive fluxes of sodium and potassium across red cell membranes. In: ELLORY, C. e LEW, V. Membrane transport in red cells. p. 39–51, 1977.
- BOURGUIBA, S., GENISSEL, C., LAMBARD, S., BOURAIMA, H., & CARREAU, S. Regulation of aromatase gene expression in Leydig cells and germ cells. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 86, n. 3–5, p. 335–343, 2003.
- BOWER, J. M. Constructing new models. In: **The Book of GENESIS**. [s.l.] Springer, 1998. p. 195–201.
- BROWN, A. M.; BIRNBAUMER, L. Ionic channels and their regulation by G protein subunits. **Annual Review of Physiology**, v. 52, n. 1, p. 197–213, 1990.
- CUTHBERT, A. W.; WONG, P. Y. Intracellular potentials in cells of the seminiferous tubules of rats. **The Journal of physiology**, v. 248, n. 1, p. 173, 1975.
- DA CRUZ CURTE, A.; WASSERMANN, G. F. Identification of amino acid transport systems stimulated by FSH in rat testes. **Journal of endocrinology**, v. 106, n. 3, p. 291–294, 1985.
- DE FRANCESCHI, L. et al. Deficiency of Src family kinases Fgr and Hck results in activation of erythrocyte K/Cl cotransport. **Journal of Clinical Investigation**, v. 99, n. 2, p. 220–227, 1997.
- DEPAOLO, L. V et al. Follistatin and activin: a potential intrinsic regulatory system within diverse tissues. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 198, n. 1, p. 500–512, 1991.
- DO NASCIMENTO, M. A. W. et al. Crosstalk in the non-classical signal transduction of testosterone and retinol in immature rat testes. **Steroids**, v. 153, p. 108522, 2020.
- DORIS, P. A. Regulation of Na, K-ATPase by endogenous ouabain-like materials. **Experimental Biology and Medicine** **205.3**, p. 202–212, 1994.
- ET AL ALBERTS, B. Molecular biology of the cell. **New York: Garland Publishing Inc**, p. 1408 p., 1994.

FAN, Q. R.; HENDRICKSON, W. A. Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor. **Nature**, v. 433, n. 7023, p. 269–277, 2005.

GHOSH, S. et al. Structural manifestations of the rat Sertoli cell to hypophysectomy: a correlative morphometric and endocrine study. **Endocrinology**, v. 131, n. 1, p. 485–497, 1992.

GNESSI, L. et al. Gonadal Peptides as Mediators of Development and Functional Control of the Testis : An Integrated System with Hormones and Local Environment *. v. 18, n. 4, 1997.

GONCALVES, R. et al. Acute effect of bisphenol A: Signaling pathways on calcium influx in immature rat testes. **Reproductive Toxicology**, v. 77, p. 94–102, 2018.

GONÇALVES, R. **INTERAÇÕES ENTRE AS VIAS DE SINALIZAÇÃO DA 1,25(OH)₂ VITAMINA D₃ E DO ESTRADIOL EM CÉLULAS TESTICULARES**. [s.l: s.n.].

GRASSO, P.; REICHERT JR, L. E. O. E. Follicle-stimulating hormone receptor-mediated uptake of ⁴⁵Ca²⁺ by proteoliposomes and cultured rat Sertoli cells: evidence for involvement of voltage-activated and voltage-independent calcium channels. **Endocrinology**, v. 125, n. 6, p. 3029–3036, 1989.

GRISWOLD, M. Griswold , M . D . Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis . Biol . Reprod . 52 ,. n. February 1995, p. 211–216, 2015.

HAEFNER, J. W. **Modeling biological systems: principles and applications**. 2^a ed. New York: [s.n.].

HAMILL, O. P. et al. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. **Pflügers Archiv European journal of physiology**, v. 391, n. 2, p. 85–100, 1981.

HANSSON, V. et al. Androgen transport and receptor mechanisms in testis and epididymis. **Nature**, v. 250, n. 5465, p. 387–391, 1974.

HERNANDEZ, J.; FISCHBARG, J.; LIEBOVITCH, L. S. Kinetic model of the effects of electrogenic enzymes on the membrane potential. **Journal of Theoretical Biology**, v. 137, n. 1, p. 113–125, 1989.

HESS, R. A.; FRANÇA, L. R. Structure of the Sertoli Cell. **Sertoli Cell Biology**, n. January 2005, p. 19–40, 2005.

HIGASHIDA, H. **Molecular basis of ion channels and receptors involved in nerve excitation, synaptic transmission and muscle contraction**. [s.l: s.n.].

HILLE, B. Ionic channels in excitable membranes. Current problems and biophysical approaches. **Biophysical Journal**, v. 22, n. 2, p. 283–294, 1978.

HODGKIN, A. L.; HUXLEY, A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. **The Journal of physiology**, v. 117, n. 4, p. 500, 1952.

JOFFRE, B. Y. M.; ROCHE, A. Follicle-stimulating hormone induces hyperpolarization of immature. p. 481–499, 1988a.

JOFFRE, B. Y. M.; ROCHE, A. Follicle-stimulating hormone induces hyperpolarization of immature rat sertoli cells in monolayer culture. **Journal of Physiology**, v. 400, p. 481–499, 1988b.

JOFFRE, B. Y. M.; ROCHE, A. Follicle-stimulating hormone induces hyperpolarization of immature rat sertoli cells in monolayer culture. **Journal of Physiology**, v. 400, p. 481–499, 1988c.

JOFFRE, M. et al. Electrophysiological studies of the action of gonadotropins on Leydig and Sertoli cells from rat testis. **Reproduction Nutrition D{é}veloppement**, v. 28, n. 4B, p. 1019–1029, 1988.

JOFFRE, M.; ROCHE, A. Follicle-stimulating hormone induces hyperpolarization of immature rat Sertoli cells in monolayer culture. **The Journal of physiology**, v. 400, p. 481, 1988d.

KAY, A. R. How Cells can Control their Size by Pumping Ions i v o r l a n o. v. 5, n. May, p. 1–14, 2017.

KOBAYASHI, T.; WASHIYAMA, K.; IKEDA, K. Inhibition of G protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels by fluoxetine (Prozac). **British Journal of Pharmacology**, v. 138, n. 6, p. 1119–1128, 2003.

KOLB, H.-A. Potassium Channels in Excitable and Non-Excitable Cells. **Reviews of Physiology, Bioche**, v. 115, p. 51–91, 1990.

KOPERA, I. A et al. Sertoli-germ cell junctions in the testis: a review of recent data. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 365, n. 1546, p. 1593–1605, 2010.

LEITE, L. D. **Modulação Hormonal do Potencial de Membrana da Célula de Sertoli**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998.

LI, M. et al. Assembly of potassium channels. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 707, n. 1, p. 51–59, 1993.

LOSS, E. S.; JACOBUS, A. P.; WASSERMANN, G. F. Diverse FSH and Testosterone Signaling Pathways in the Sertoli Cell. **Horm Metab Res**, v. 39, n. 11, p. 806–812, 2007.

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

MCCONNELL, L. L. **Efeitos Eletrofisiológicos do FSH na célula de Sertoli. Tese de Mestrado em Fisiologia**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1990.

MEANS, A. R. et al. Follicle-stimulating hormone, the Sertoli cell, and spermatogenesis. **Recent progress in hormone research**, v. 32, p. 477–527, 1976.

MENEGAZ D; MENDES AKB; SILVA FRMB. Physiological functions of potassium and chloride channels through non-classical hormone signal transduction in Sertoli cells: Clinical significance. **Physiological functions of potassium and chloride channels**

through non-classical hormone signal transduction in Sertoli cells: Clinical significance, v. 188, n. 978-1-68507-179– 0, p. 268, 2021.

MENEGAZ, D. et al. Potassium channels couple o 1, 25 (OH) 2 vitamin D3 rapid responses and secretion in immature Sertoli cells. **J Clin Mol Endocrinol**, v. 1, p. 33, 2016.

MIJATOVIC, T.; DUFRASNE, F.; KISS, R. Cardiotonic Steroids-Mediated Targeting of the Na⁺/K⁺-ATPase to Combat Chemoresistant Cancers. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 5, p. 627–646, 2012.

NAKATA, H. et al. Three-dimensional structure of seminiferous tubules in the adult mouse. **Journal of Anatomy**, v. 227, n. 5, p. 686–694, 2015.

NOBLE, D. A modification of the Hodgkin--Huxley equations applicable to Purkinje fibre action and pace-maker potentials. **The Journal of physiology**, v. 160, n. 21, p. 317–352, 1962.

OLIVEIRA, R. M. D. E. Efeito de radiocontrastes sobre determinados sistemas de transporte de membrana celular de eritr{ó}citos humanos. 2004.

ORTH, J. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic studyo Title. **The Anatomical record**, v. 203, n. 4, p. 485–492, 1982.

PÉREZ, C. V et al. Dual role of immune cells in the testis: Protective or pathogenic for germ cells? **Spermatogenesis**, v. 3, n. 1, p. e23870, 2013.

PETERSEN, O. H.; FINDLAY, I. Electrophysiology of the pancreas. **Physiological reviews**, v. 67, n. 3, p. 1054–1116, 1987.

QUAST, U. ATP-sensitive K⁺ channels in the kidney. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 354, n. 3, p. 213–225, 1996.

RANNIKKO, A. et al. Stage-specific expression of the FSH receptor gene in the prepubertal and adult rat seminiferous epithelium. **Journal of endocrinology**, v. 151, n. 1, p. 29–35, 1996.

RATO, L. et al. Tubular fluid secretion in the seminiferous epithelium: Ion transporters and aquaporins in sertoli cells. **Journal of Membrane Biology**, v. 236, n. 2, p. 215–224, 2010.

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

REIS, M. M. S. et al. Sertoli cell as a model in male reproductive toxicology: Advantages and disadvantages. **Journal of Applied Toxicology**, v. 35, n. 8, p. 870–883, 2015.

RIHANA, S. et al. Mathematical modeling of electrical activity of uterine muscle cells. **Med Biol Eng Comput**, v. 47, p. 665–675, 2009.

SHARPE, R. M. et al. Review Proliferation and functional maturation of Sertoli cells , and their relevance to disorders of testis function in adulthood. p. 769–784, 2003.

SILVA, F. R.; LEITE, L. D.; WASSERMANN, G. F. Rapid signal transduction in Sertoli

cells. **European Journal of Endocrinology**, v. 147, n. 3, p. 425–433, 2002.

SILVA, F. R. M. B. et al. Effect of 3, 5, 3'-triiodo-L-thyronine on amino acid accumulation and membrane potential in Sertoli cells of the rat testis. **Life Sciences**, v. 69, n. 8, p. 977–986, 2001.

SILVA, F. R. M. B. Functional Importance of $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D₃ and the Identification of Its Nongenomic and Genomic Signaling Pathways in the Testis. **Advances in Andrology**, v. 2014, p. 1–10, 2014.

STRONG, P. N. et al. Effects of potassium channel toxins from *Leiurus quinquestriatus hebraeus* venom on responses to cromakalim in rabbit blood vessels. **British journal of pharmacology**, v. 98, n. 3, p. 817–826, 1989.

VERDI, A. et al. No The Effect of Recombinant Human Follicle-Stimulating Hormone on Sperm Quality, Chromatin Status and Clinical Outcomes of Infertile Oligozoospermic Men Candidate for Intracytoplasmic Sperm Injection: A Randomized Clinical Trial. **Int J Fertil Steril**, v. 15, n. 1, p. 1–7, 2021.

VOLPATO, K. C. et al. 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.

WASSERMANN, G. F. et al. FSH-induced rapid hyperpolarization followed by a Ca²⁺-channel mediated depolarization in rat Sertoli cell. **Med Sci Res**, v. 18, p. 175–176, 1990.

WASSERMANN, G. F. et al. Biochemical factors involved in the FSH action on amino acid transport in immature rat testes. **Hormone and metabolic research**, v. 24, n. 06, p. 276–279, 1992a.

WASSERMANN, G. F. et al. Electrophysiological changes of Sertoli cells produced by the acute administration of amino acid and FSH. **Hormone and metabolic research**, v. 24, n. 07, p. 326–328, 1992b.

WASSERMANN, G. F.; LOSS, E. S. Testosterone Action on the Sertoli Cell Membrane: A KIR6.x Channel Related Effect. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, n. 21, p. 2649–2656, 2005.

YOSHINO, M.; WANG, S. Y.; KAO, C. Y. Sodium and calcium inward currents in freshly dissociated smooth myocytes of rat uterus. **Journal of General Physiology**, v. 110, n. 5, p. 565–577, 1997.

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

ZANATTA, L. et al. Effect of $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ in plasma membrane targets in immature rat testis: Ionic channels and gamma-glutamyl transpeptidase activity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 515, n. 1–2, p. 46–53, 2011.

ARMSTRONG, C. M.; BEZANILLA, F. Charge movement associated with the opening and closing of the activation gates of the Na channels. **The Journal of general physiology**, v. 63, n. 5, p. 533–552, 1974.

ASHCROFT, S. J. H.; ASHCROFT, F. M. Properties and functions of ATP-sensitive K-channels. **Cellular signalling**, v. 2, n. 3, p. 197–214, 1990.

B. CHAPMAN, E. A. JOHNSON, J. M. KOOTSEY, J. Electrical and Biochemical Properties of an Enzyme Model of the Sodium Pump. **The Journal of Membrane Biology**, v. 74, n. 0, p. 139–153, 1983.

B. HILLE. **Ionic Channels of Excitable Membranes**. 2.ed. ed. Massachusetts: [s.n.].

BEAUGÉ, L. E LEW, V. L. Passive fluxes of sodium and potassium across red cell membranes. In: ELLORY, C. e LEW, V. Membrane transport in red cells. p. 39–51, 1977.

BOURGUIBA, S., GENISSEL, C., LAMBARD, S., BOURAIMA, H., & CARREAU, S. Regulation of aromatase gene expression in Leydig cells and germ cells. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 86, n. 3–5, p. 335–343, 2003.

BOWER, J. M. Constructing new models. In: **The Book of GENESIS**. [s.l.] Springer, 1998. p. 195–201.

BROWN, A. M.; BIRNBAUMER, L. Ionic channels and their regulation by G protein subunits. **Annual Review of Physiology**, v. 52, n. 1, p. 197–213, 1990.

CUTHBERT, A. W.; WONG, P. Y. Intracellular potentials in cells of the seminiferous tubules of rats. **The Journal of physiology**, v. 248, n. 1, p. 173, 1975.

DA CRUZ CURTE, A.; WASSERMANN, G. F. Identification of amino acid transport systems stimulated by FSH in rat testes. **Journal of endocrinology**, v. 106, n. 3, p. 291–294, 1985.

DE FRANCESCHI, L. et al. Deficiency of Src family kinases Fgr and Hck results in activation of erythrocyte K/Cl cotransport. **Journal of Clinical Investigation**, v. 99, n. 2, p. 220–227, 1997.

DEPAOLO, L. V et al. Follistatin and activin: a potential intrinsic regulatory system within diverse tissues. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 198, n. 1, p. 500–512, 1991.

DO NASCIMENTO, M. A. W. et al. Crosstalk in the non-classical signal transduction of testosterone and retinol in immature rat testes. **Steroids**, v. 153, p. 108522, 2020.

DORIS, P. A. Regulation of Na, K-ATPase by endogenous ouabain-like materials. **Experimental Biology and Medicine** **205.3**, p. 202–212, 1994.

ET AL ALBERTS, B. Molecular biology of the cell. **New York: Garland Publishing Inc**, p. 1408 p., 1994.

FAN, Q. R.; HENDRICKSON, W. A. Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor. **Nature**, v. 433, n. 7023, p. 269–277, 2005.

GHOSH, S. et al. Structural manifestations of the rat Sertoli cell to hypophysectomy: a correlative morphometric and endocrine study. **Endocrinology**, v. 131, n. 1, p. 485–497, 1992.

GNESSI, L. et al. Gonadal Peptides as Mediators of Development and Functional

Control of the Testis : An Integrated System with Hormones and Local Environment *. v. 18, n. 4, 1997.

GONCALVES, R. et al. Acute effect of bisphenol A: Signaling pathways on calcium influx in immature rat testes. **Reproductive Toxicology**, v. 77, p. 94–102, 2018.

GONÇALVES, R. **INTERAÇÕES ENTRE AS VIAS DE SINALIZAÇÃO DA 1,25(OH)₂VITAMINA D₃ E DO ESTRADIOL EM CÉLULAS TESTICULARES**. [s.l: s.n.].

GRASSO, P.; REICHERT JR, L. E. O. E. Follicle-stimulating hormone receptor-mediated uptake of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ by proteoliposomes and cultured rat Sertoli cells: evidence for involvement of voltage-activated and voltage-independent calcium channels. **Endocrinology**, v. 125, n. 6, p. 3029–3036, 1989.

GRISWOLD, M. Griswold , M . D . Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis . Biol . Reprod . 52 , n. February 1995, p. 211–216, 2015.

HAEFNER, J. W. **Modeling biological systems: principles and applications**. 2^a ed. New York: [s.n.].

HAMILL, O. P. et al. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. **Pflügers Archiv European journal of physiology**, v. 391, n. 2, p. 85–100, 1981.

HANSSON, V. et al. Androgen transport and receptor mechanisms in testis and epididymis. **Nature**, v. 250, n. 5465, p. 387–391, 1974.

HERNANDEZ, J.; FISCHBARG, J.; LIEBOVITCH, L. S. Kinetic model of the effects of electrogenic enzymes on the membrane potential. **Journal of Theoretical Biology**, v. 137, n. 1, p. 113–125, 1989.

HESS, R. A.; FRANÇA, L. R. Structure of the Sertoli Cell. **Sertoli Cell Biology**, n. January 2005, p. 19–40, 2005.

HIGASHIDA, H. **Molecular basis of ion channels and receptors involved in nerve excitation, synaptic transmission and muscle contraction**. [s.l: s.n.].

HILLE, B. Ionic channels in excitable membranes. Current problems and biophysical approaches. **Biophysical Journal**, v. 22, n. 2, p. 283–294, 1978.

HODGKIN, A. L.; HUXLEY, A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. **The Journal of physiology**, v. 117, n. 4, p. 500, 1952.

JOFFRE, B. Y. M.; ROCHE, A. Follicle-stimulating hormone induces hyperpolarization of immature. p. 481–499, 1988a.

JOFFRE, B. Y. M.; ROCHE, A. Follicle-stimulating hormone induces hyperpolarization of immature rat sertoli cells in monolayer culture. **Journal of Physiology**, v. 400, p. 481–499, 1988b.

JOFFRE, B. Y. M.; ROCHE, A. Follicle-stimulating hormone induces hyperpolarization of immature rat sertoli cells in monolayer culture. **Journal of Physiology**, v. 400, p. 481–499, 1988c.

JOFFRE, M. et al. Electrophysiological studies of the action of gonadotropins on Leydig and Sertoli cells from rat testis. **Reproduction Nutrition D{é}veloppement**, v. 28, n. 4B, p. 1019–1029, 1988.

JOFFRE, M.; ROCHE, A. Follicle-stimulating hormone induces hyperpolarization of immature rat Sertoli cells in monolayer culture. **The Journal of physiology**, v. 400, p. 481, 1988d.

KAY, A. R. How Cells can Control their Size by Pumping Ions i v o r l a n o. v. 5, n. May, p. 1–14, 2017.

KOBAYASHI, T.; WASHIYAMA, K.; IKEDA, K. Inhibition of G protein-activated inwardly rectifying K + channels by fluoxetine (Prozac). **British Journal of Pharmacology**, v. 138, n. 6, p. 1119–1128, 2003.

KOLB, H.-A. Potassium Channels in Excitable and Non-Excitable Cells. **Reviews of Physiology, Bioche**, v. 115, p. 51–91, 1990.

KOPERA, I. A et al. Sertoli-germ cell junctions in the testis: a review of recent data. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 365, n. 1546, p. 1593–1605, 2010.

LEITE, L. D. **Modulação Hormonal do Potencial de Membrana da Célula de Sertoli**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998.

LI, M. et al. Assembly of potassium channels. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 707, n. 1, p. 51–59, 1993.

LOSS, E. S.; JACOBUS, A. P.; WASSERMANN, G. F. Diverse FSH and Testosterone Signaling Pathways in the Sertoli Cell. **Horm Metab Res**, v. 39, n. 11, p. 806–812, 2007.

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

MCCONNELL, L. L. **Efeitos Eletrofisiológicos do FSH na célula de Sertoli. Tese de Mestrado em Fisiologia**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1990.

MEANS, A. R. et al. Follicle-stimulating hormone, the Sertoli cell, and spermatogenesis. **Recent progress in hormone research**, v. 32, p. 477–527, 1976.

MENEGAZ D; MENDES AKB; SILVA FRMB. Physiological functions of potassium and chloride channels through non-classical hormone signal transduction in Sertoli cells: Clinical significance. **Physiological functions of potassium and chloride channels through non-classical hormone signal transduction in Sertoli cells: Clinical significance**, v. 188, n. 978-1-68507-179– 0, p. 268, 2021.

MENEGAZ, D. et al. Potassium channels couplet o 1, 25 (OH) 2 vitamin D3 rapid responses and secretion in immature Sertoli cells. **J Clin Mol Endocrinol**, v. 1, p. 33, 2016.

MIJATOVIC, T.; DUFRASNE, F.; KISS, R. Cardiotonic Steroids-Mediated Targeting of

the Na⁺/K⁺-ATPase to Combat Chemoresistant Cancers. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 5, p. 627–646, 2012.

NAKATA, H. et al. Three-dimensional structure of seminiferous tubules in the adult mouse. **Journal of Anatomy**, v. 227, n. 5, p. 686–694, 2015.

NOBLE, D. A modification of the Hodgkin–Huxley equations applicable to Purkinje fibre action and pace-maker potentials. **The Journal of physiology**, v. 160, n. 21, p. 317–352, 1962.

OLIVEIRA, R. M. D. E. Efeito de radiocontrastes sobre determinados sistemas de transporte de membrana celular de eritrócitos humanos. 2004.

ORTH, J. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. **The Anatomical record**, v. 203, n. 4, p. 485–492, 1982.

PÉREZ, C. V et al. Dual role of immune cells in the testis: Protective or pathogenic for germ cells? **Spermatogenesis**, v. 3, n. 1, p. e23870, 2013.

PETERSEN, O. H.; FINDLAY, I. Electrophysiology of the pancreas. **Physiological reviews**, v. 67, n. 3, p. 1054–1116, 1987.

QUAST, U. ATP-sensitive K⁺ channels in the kidney. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 354, n. 3, p. 213–225, 1996.

RANNIKKO, A. et al. Stage-specific expression of the FSH receptor gene in the prepubertal and adult rat seminiferous epithelium. **Journal of endocrinology**, v. 151, n. 1, p. 29–35, 1996.

RATO, L. et al. Tubular fluid secretion in the seminiferous epithelium: Ion transporters and aquaporins in sertoli cells. **Journal of Membrane Biology**, v. 236, n. 2, p. 215–224, 2010.

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

REIS, M. M. S. et al. Sertoli cell as a model in male reproductive toxicology: Advantages and disadvantages. **Journal of Applied Toxicology**, v. 35, n. 8, p. 870–883, 2015.

RIHANA, S. et al. Mathematical modeling of electrical activity of uterine muscle cells. **Med Biol Eng Comput**, v. 47, p. 665–675, 2009.

SHARPE, R. M. et al. Review Proliferation and functional maturation of Sertoli cells , and their relevance to disorders of testis function in adulthood. p. 769–784, 2003.

SILVA, F. R.; LEITE, L. D.; WASSERMANN, G. F. Rapid signal transduction in Sertoli cells. **European Journal of Endocrinology**, v. 147, n. 3, p. 425–433, 2002.

SILVA, F. R. M. B. et al. Effect of 3, 5, 3'-triiodo-L-thyronine on amino acid accumulation and membrane potential in Sertoli cells of the rat testis. **Life Sciences**, v. 69, n. 8, p. 977–986, 2001.

SILVA, F. R. M. B. Functional Importance of 1 α ,25(OH) 2 -Vitamin D 3 and the Identification of Its Nongenomic and Genomic Signaling Pathways in the Testis .

Advances in Andrology, v. 2014, p. 1–10, 2014.

STRONG, P. N. et al. Effects of potassium channel toxins from *Leiurus quinquestriatus hebraeus* venom on responses to cromakalim in rabbit blood vessels. **British journal of pharmacology**, v. 98, n. 3, p. 817–826, 1989.

VERDI, A. et al. No The Effect of Recombinant Human Follicle-Stimulating Hormone on Sperm Quality, Chromatin Status and Clinical Outcomes of Infertile Oligozoospermic Men Candidate for Intracytoplasmic Sperm Injection: A Randomized Clinical Trial. **Int J Fertil Steril**, v. 15, n. 1, p. 1–7, 2021.

VOLPATO, K. C. et al. Involvement of K⁺ channels and calcium-dependent pathways in the action of T 3 on amino acid accumulation and membrane potential in Sertoli cells of immature rat testis. **Life sciences**, v. 74, n. 10, p. 1277–1288, 2004.

WASSERMANN, G. F. et al. FSH-induced rapid hyperpolarization followed by a Ca²⁺-channel mediated depolarization in rat Sertoli cell. **Med Sci Res**, v. 18, p. 175–176, 1990.

WASSERMANN, G. F. et al. Biochemical factors involved in the FSH action on amino acid transport in immature rat testes. **Hormone and metabolic research**, v. 24, n. 06, p. 276–279, 1992a.

WASSERMANN, G. F. et al. Electrophysiological changes of Sertoli cells produced by the acute administration of amino acid and FSH. **Hormone and metabolic research**, v. 24, n. 07, p. 326–328, 1992b.

WASSERMANN, G. F.; LOSS, E. S. Testosterone Action on the Sertoli Cell Membrane: A KIR6.x Channel Related Effect. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, n. 21, p. 2649–2656, 2005.

YOSHINO, M.; WANG, S. Y.; KAO, C. Y. Sodium and calcium inward currents in freshly dissociated smooth myocytes of rat uterus. **Journal of General Physiology**, v. 110, n. 5, p. 565–577, 1997.

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

ZANATTA, L. et al. Effect of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D 3 in plasma membrane targets in immature rat testis: Ionic channels and gamma-glutamyl transpeptidase activity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 515, n. 1–2, p. 46–53, 2011.