

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

**MECANISMO DE AÇÃO NÃO-GENÔMICO DOS HORMÔNIOS TIREOIDIANOS
EM TESTÍCULOS DE RATOS IMATUROS: EFEITOS ELETROFISIOLÓGICOS E
CAPTAÇÃO DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$**

CARINE ROYER

Florianópolis
2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

MECANISMO DE AÇÃO NÃO-GENÔMICO DOS HORMÔNIOS
TIREOIDIANOS EM TESTÍCULOS DE RATOS IMATUROS: EFEITOS
ELETROFISIOLÓGICOS E CAPTAÇÃO DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$

**Trabalho apresentado como requisito
parcial para obtenção do título de
Mestre em Farmácia da Universidade
Federal de Santa Catarina**

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. FÁTIMA REGINA MENA BARRETO SILVA
Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. LAURA DIFINI LEITE

Florianópolis
2005

Dedico este trabalho aos meus pais, Geny Royer e Lauri A. Royer, e irmãos, Raul A. Royer e Lauri A. J. Royer, que apesar da distância física sempre se fizeram presentes através do estímulo, carinho e apoio incondicional em todos os momentos. Agradeço pelo exemplo de dignidade e retidão de caráter e por terem-me imprimido a sede do saber.

Agradecimento especial à minha orientadora professora Dr^a. Fátima Regina Mena Barreto Silva, pela orientação precisa, pela bondade, afetividade, amizade, pelo constante incentivo à pesquisa, sempre indicando a direção a ser tomada.

AGRADECIMENTOS

À minha co-orientadora professora Dr^a. Laura Difini Leite, pela amizade, paciência, exemplo de solidariedade humana e preciosa ajuda nos experimentos eletrofisiológicos.

Às colegas de laboratório que sempre estiveram presentes no decorrer deste período, e acima de tudo pela amizade, convivência e companheirismo, Poliane Folador, Leila Zanatta, Danusa Menegaz, Elga Alberton, Rosângela Damazio, Júlia Frare, Ângela Rosso, especialmente a Ariane Zamoner pelo apoio na realização dos experimentos, e Luisa Cazarolli que se mostrou sempre disposta frente a qualquer pedido de ajuda.

A minha família, em especial a minha tia Liris Euscate e o primo Allan Euscate, ao tio Milton Kunkel, tia Solange Z. Kunkel e a prima Bianca Z. Kunkel, pelo incentivo e apoio, sem o qual não seria possível a realização deste sonho.

Aos colegas de laboratório da engenharia biomédica que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, Daniela Suzuki e Viviane Palodeto, que se tornaram amigas fraternais, especialmente ao Euler Garcia, pelo carinho, atenção e companheirismo.

Ao professor Dr. Adair Roberto Soares dos Santos que gentilmente concedeu inibidores utilizados neste trabalho.

À professora Dr^a. Kátia P. Barreto pela preciosa ajuda na obtenção do $^{45}\text{Ca}^{2+}$.

À professora Dr^a. Rosângela C. Pedrosa por compartilhar equipamentos.

Ao Departamento de Farmacologia pelo espectrômetro de cintilação.

A todos os amigos aqui não mencionados e que de uma maneira ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

<u>LISTA DE FIGURAS.....</u>	<u>ix</u>
<u>LISTA DE TABELAS.....</u>	<u>xi</u>
<u>LISTA DE FLUXOGRAMAS.....</u>	<u>xii</u>
<u>LISTA DE ABREVIATURAS.....</u>	<u>xiii</u>
<u>RESUMO.....</u>	<u>xv</u>
<u>ABSTRACT.....</u>	<u>xvi</u>
<u>1 INTRODUÇÃO.....</u>	<u>01</u>
1.1. HORMÔNIOS TIREOIDIANOS.....	01
1.1.1. Eixo Hipotálamo-Hipófise-Tireóide.....	01
1.1.2. Produção e Secreção de Hormônios Tireoidianos.....	02
1.1.3. Receptores Nucleares dos Hormônios Tireoidianos.....	03
1.1.4. Hormônios Tireoidianos e Células de Sertoli.....	04
1.2. MECANISMO DE AÇÃO HORMONAL.....	06
1.2.1. Mecanismo de Ação Genômico de Hormônios Tireoidianos.....	06
1.2.2. Mecanismo de Ação Não-genômico de Hormônios Tireoidianos.....	07
1.2.3. Vias Genômica e Não-Genômica: Diferenças e Interação.....	08
1.2.4. Mecanismo de Ação Não-Genômico de Hormônios Tireoidianos em Testículo de Ratos.....	10

1.3. ELETROFISIOLOGIA.....	10
1.3.1. Concentrações Iônicas e Potencial de Repouso.....	10
1.3.2. Princípios Gerais Sobre Registros Intracelulares.....	11
1.3.3. Canais Iônicos Através da Membrana Celular.....	12
1.4. CANAIS DE POTÁSSIO.....	14
1.4.1. Canais de Potássio Dependentes de Cálcio.....	15
1.5 CANAIS DE CLORETO.....	16
1.5.1. Principais Famílias de Canais de Cloreto.....	17
1.5.1.1. Canais de Cloreto Reguladores da Condutância de Transmembrana na Fibrose Cística (tipo CFTR).....	17
1.5.1.2. Família CLC de Canais de Cloreto.....	18
1.5.1.3. Canais de Cloreto Ligados a Receptores.....	19
1.5.1.4. Canais de Cloreto Ativados por Cálcio.....	20
1.6. CÁLCIO.....	20
1.6.1. O Cálcio como Molécula Sinalizadora.....	20
1.6.2. Mudanças Temporal e Espacial na Concentração de Cálcio.....	21
1.6.3. Remoção e Armazenamento do Cálcio.....	23
1.6.4. Liberação do Cálcio dos Estoques Internos.....	25
1.6.5. Influxo de Cálcio da Região Extracelular.....	25
1.6.5.1. Canais de Cálcio Dependentes de Tensão.....	26
1.6.5.2. Canais de Cálcio Ligados ao Receptor.....	31
1.7. PROTEÍNAS CINASES.....	32
1.7.1. Proteína Cinase Dependente de AMPc.....	33
1.7.2. Proteína Cinase C.....	34
2 JUSTIFICATIVA.....	35

3 OBJETIVOS.....36

3.1. OBJETIVO GERAL.....36

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....36

4 MATERIAIS E MÉTODOS.....37

4.1. MATERIAIS.....37

4.1.1. Animais.....37

4.1.2. Soluções Utilizadas.....37

4.1.2.1. Tampão Krebs Ringer-bicarbonato37

4.1.2.2. Solução de Cloreto de Lantânio39

4.1.3. Substâncias Utilizadas.....40

4.1.4. Equipamentos Utilizados.....41

4.2. MÉTODOS.....42

4.2.1. Eletrofisiologia.....42

4.2.1.1. Preparação dos Túbulos Seminíferos.....42

4.2.1.2. Preparação do Microeletrodo.....42

4.2.1.3. Administração de Fármacos.....45

4.2.1.4. Filtragem do Potencial Transmembrana.....45

4.2.2. Captação de Cálcio.....49

4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....52

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....53

5.1. PARTE I: ELETROFISIOLOGIA.....53

5.1.1. Efeito Hiperpolarizante do T_4 em Células de Sertoli de Ratos Imaturos.....54

5.1.2. Curva de Dose-Resposta do Ácido Carboxílico 9-Antraceno no Potencial Transmembrana de Células de Sertoli.....57

5.1.3. Envolvimento dos Canais de Cloreto na Ação Hiperpolarizante do Hormônio T_4 no Potencial Transmembrana de Células de Sertoli.....58

5.2. PARTE II: CAPTAÇÃO DE CÁLCIO.....	61
5.2.1. Curva de Dose-Resposta dos Hormônios Tireoidianos na Captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em Testículos de Ratos Imaturos.....	61
5.2.2. Curva de Tempo da Captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ Estimulada por T_4 em Testículo de Ratos Imaturos.....	66
5.2.3. Efeito de Bloqueadores de Canais de Cálcio Dependentes da Tensão na Ação Estimulatória do T_4 na Captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em Testículos de Ratos Imaturos.....	67
5.2.3.1. Envolvimento dos CCDT tipo L na Captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ Estimulada por T_4	68
5.2.3.2. Envolvimento dos CCDT tipo T na Ação Estimulatória do T_4 na Captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$	70
5.2.4. Envolvimento dos Canais de Potássio Dependentes de Cálcio na Ação Estimulatória do T_4 na Captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em Testículos de Ratos Imaturos.....	72
5.2.5. Envolvimento dos Canais de Cloreto na Ação Estimulatória do T_4 na Captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em Testículos de Ratos Imaturos.....	74
5.2.6. Efeito da Via das Cinases (PKA e PKC) na Captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ Estimulada por T_4	76
<u>6 CONCLUSÕES.....</u>	83
<u>7 PERSPECTIVAS.....</u>	85
<u>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</u>	87
<u>9 ANEXOS.....</u>	114
9.1. Protocolo CEUA/UFSC.....	115

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Resumo esquemático do eixo-hipotálamo-hipófise-tireóide.....	02
Figura 1.2: Representação esquemática da membrana plasmática com a distribuição assimétrica dos íons.....	11
Figura 1.3: Representação das concentrações de cálcio nos diferentes compartimentos celulares.....	24
Figura 1.4: Representação esquemática das subunidades do canal de cálcio dependentes de tensão.....	27
Figura 4.1: Disposição da câmara de perfusão e do microeletrodo para o registro intracelular.....	44
Figura 4.2: Grupo de túbulos seminíferos seguros por uma tela e visualizados no microscópio invertido.....	44
Figura 4.3: Funções seno com freqüências diferentes.....	46
Figura 4.4: Sinal obtido através da soma de duas funções seno com freqüências diferentes.....	46
Figura 4.5: (A) Filtro passa-baixa de 20 HZ. (B) Filtro passa-alta de 20 Hz.....	47
Figura 4.6: Medição intracelular do potencial transmembrana das células de Sertoli em função do tempo.....	48
Figura 5.1: Efeito hiperpolarizante do T_4 (10^{-5} M) no potencial transmembrana de células de Sertoli.....	55
Figura 5.2: Curva dose-resposta do 9-AC no potencial transmembrana de células de Sertoli (10^{-6} , 10^{-5} e 10^{-4} M).....	57
Figura 5.3: Efeito do 9-AC na ação hiperpolarizante do T_4 (10^{-5} M) no potencial transmembrana de células de Sertoli.....	59
Figura 5.4: Curva dose-resposta do T_4 e T_3 (10^{-9} , 10^{-7} e 10^{-6} M) na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em testículos de ratos imaturos.....	62

Figura 5.5: Curva de tempo do T ₄ na captação de ⁴⁵ Ca ²⁺ em testículos de ratos imaturos.....	66
Figura 5.6: Efeito da nifedipina na ação estimulatória do T ₄ na captação de ⁴⁵ Ca ²⁺ em testículos de ratos imaturos.....	68
Figura 5.7: Efeito da flunarizina na ação estimulatória do T ₄ na captação de ⁴⁵ Ca ²⁺ em testículos de ratos imaturos.....	70
Figura 5.8: Efeito da apamina na ação estimulatória do T ₄ na captação de ⁴⁵ Ca ²⁺ em testículos de ratos imaturos.....	72
Figura 5.9: Efeito do 9-AC na ação estimulatória do T ₄ na captação de ⁴⁵ Ca ²⁺ em testículos de ratos imaturos.....	74
Figura 5.10: Efeito da via das cinases na captação de ⁴⁵ Ca ²⁺ estimulada por T ₄ em testículos de ratos imaturos.....	77
Figura 7.1: Diagrama esquemático da captação de ⁴⁵ Ca ²⁺ estimulada por T ₄ , com as perspectivas de futuros trabalhos.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Família CLC de canais de cloreto em mamíferos.....	19
Tabela 4.1: Composição salina e concentração na solução estoque de KRb.....	38
Tabela 4.2: Concentrações iônicas do KRb no líquido intra e extracelular.....	38
Tabela 4.3: Composição e concentração salina presente na solução de cloreto de lantânio.....	39
Tabela 4.4: Erro na menor amplitude de flexão de V_m	49

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 4.1: Representação esquemática do procedimento experimental para o estudo da captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$	51
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

9-AC	ácido carboxílico 9-antraceno
ADN	ácido desoxirribonucléico
ADP	adenosina difosfato
ARNm	ácido ribonucléico mensageiro
ATP	adenosina trifosfato
BAPTA	1,2-bis-(2-aminofenol) etano-N,N,N',N',-tetracético
BK	canais de K ⁺ dependentes de Ca ²⁺ de alta condutância
Ca ²⁺ -ATPase	bomba de cálcio dependente de ATP
CCDT	canais de cálcio dependentes de tensão
[Ca ²⁺] _i	concentração de cálcio intracelular
DAG	diacilglicerol
EGTA	ácido tetracético etileno glicol
Em	potencial de repouso
FSH	hormônio folículo estimulante
GABA	ácido gama-amino-butírico
H ⁺ -ATPase	bomba de hidrogênio dependente de ATP
HT	hormônios tireoidianos
IK	canais de K ⁺ dependentes de Ca ²⁺ de condutância intermediária
IL-8	interleucina oito
IP ₃	inositol trifosfato
INF- γ	interferon gama
K ⁺ _{ATP}	canais de potássio dependentes de ATP
KRb	Krebs Ringer-bicarbonato
LaCl ₃	cloreto de lantânio

MAPK	proteína cinase ativada por mitógeno
MEK	proteína cinase cinase ativada por mitógeno
MeAIB	aminoácido α -metil aminoisobutírico
PKA	proteína cinase dependente de AMPc
PKC	proteína cinase C
PLC	fosfolipase C
PLD	fosfolipase D
SK	canais de K^+ dependentes de Ca^{2+} de pequena condutância
T_2	diiodotironina
T_3	triiodotironina
T_{3r}	T_3 reverso
T_4	tiroxina
TEA	tetraetilamônio
RHT	receptores nucleares dos hormônios tireoidianos
TRH	hormônio liberador de tireotrofina
TSH	hormônio tireoestimulante
TTN	tricontetranuropeptídeo
$1,25 (OH)_2 D_3$	$1,25 (OH)_2$ vitamina D_3
ΔV	variação do potencial transmembrana
V_m	potencial transmembrana

RESUMO

Os hormônios tireoidianos (HT) regulam a esteroidogênese e a espermatogênese. O mecanismo clássico de ação dos HT ocorre através da ligação com receptores nucleares específicos. Todavia, as iodotironinas podem atuar por vias não-genômicas ou extranucleares, caracterizadas pela rapidez da resposta (de segundos a minutos), e desta forma sinalizam distintas vias de regulação celular. O objetivo do presente estudo foi estudar o envolvimento dos canais de cloreto no efeito hiperpolarizante do T_4 em células de Sertoli de túbulos seminíferos de ratos imaturos, e investigar a ação dos HT na captação de cálcio em testículos de ratos imaturos, assim como a caracterização das vias de entrada deste íon estimuladas por iodotironinas. Para isto foram utilizadas as técnicas eletrofisiológica e de captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Nos estudos eletrofisiológicos, os túbulos seminíferos foram mantidos em uma câmara de perfusão com KRb a 32 °C, pH 7,4 em atmosfera carbogênica ($\text{O}_2:\text{CO}_2$; 95:5 v/v). Quando usado o ácido carboxílico 9-antraceno (9-AC), este era adicionado e após 30 segundos o T_4 , e o potencial transmembrana monitorado. Para a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, os testículos foram pré-incubados e incubados em KRb na presença de 0,2 μCi $^{45}\text{Ca}^{2+}$ a 32 °C, pH 7,4; mantidos em atmosfera carbogênica ($\text{O}_2:\text{CO}_2$, 95:5 v/v). O T_3 ou T_4 foram adicionados no meio de incubação. Quando usados inibidores, estes eram adicionados 15 minutos antes do hormônio. O efeito hiperpolarizante do T_4 foi bloqueado totalmente na presença de 9-AC, indicando o envolvimento de canais de cloreto nesta ação do T_4 . Este hormônio também estimulou a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, efeito não evidenciado para o T_3 nos tempos e doses estudados. O uso de nifedipina e flunarizina, bloqueadores dos canais de Ca^{2+} dependentes de tensão (CCDT) tipo L e T, respectivamente, bloquearam a ação estimulatória do T_4 . Este estímulo também foi bloqueado pelo antagonista de canal de K^+ dependente de Ca^{2+} , apamina, e pelo 9-AC, antagonista de canal de Cl^- , sugerindo um mecanismo de retroalimentação entre o Ca^{2+} e Cl^- e/ou Ca^{2+} e K^+ . O inibidor de PKA, KT 5720, inibiu completamente o efeito do T_4 , indicando a ativação desta via no mecanismo de entrada do Ca^{2+} estimulada por T_4 . No entanto, este efeito não foi alterado pelo uso de cloreto de esteroilcarnitina, inibidor de PKC, sendo que este inibidor demonstrou um efeito *per se* estimulando a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Destes resultados pode-se concluir que os canais de Cl^- são importantes mediadores da ação hiperpolarizante do hormônio T_4 em células de Sertoli. O influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ modulado por T_4 é dirigido por correntes de canais de cálcio dependentes de tensão, Cl^- e K^+ , bem como, pela atividade da proteína cinase A, sinalizando uma via imediata de ação do T_4 na membrana plasmática.

Palavras-chave: Hormônios tireoidianos, testículos e ratos, canais iônicos, cálcio.

ABSTRACT

Non-genomic mechanism of action of thyroid hormones in immature rat testes: electrophysiological effects and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake

Thyroid hormones influence steroidogenesis as well as spermatogenesis. The genomic mechanism of action of thyroid hormones comprises binding to nuclear receptor and modulation of gene transcription. However, these hormones can also act through non-genomic mechanisms, showing effects in seconds to minutes after hormone introduction. The aim of this work was to study the involvement of chloride channels on the hyperpolarizing effect of thyroxine (T_4), the action of thyroid hormones on calcium uptake as well as the role of ionic channels and kinase activities on calcium uptake regulated by thyroid hormones. In the electrophysiological experiments, seminiferous tubules from 14 day-old rats were used. Intracellular recording of Sertoli cells were carried out in a chamber perfused with Krebs Ringer-bicarbonate buffer (KRb) with/ without T_4 (10^{-5} M) and/or 9-AC and the membrane potential was monitored. In $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake studies, 10 day-old rat testes were pre-incubated and incubated in KRb buffer with 0,2 μCi $^{45}\text{Ca}^{2+}$ at 32 °C, pH 7.4 and gassed with $\text{O}_2:\text{CO}_2$ (95:5 v/v). 3,5,3'-L-triiodothyronine (T_3) or T_4 were added during the incubation period (different times and doses). Antagonists were added in the pre-incubation time, 15 min before T_4 . The hyperpolarizing effect of T_4 was completely blocked by 9-anthracene carboxylic acid (9-AC), antagonist of chloride channel. Short-term incubation with T_4 (1 min) stimulated $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in rat testes, but this effect was not observed with T_3 in the time and doses studied. The stimulatory effect of T_4 on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake was abolished by L- and T-type calcium channel antagonists, nifedipine and flunarizine, respectively. Also, calcium-dependent potassium channels and chloride channels are involved in this mechanism of action of T_4 , since apamin and 9-AC blocked completely the stimulatory hormone action. These results point to a modulatory $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake based on feedback mechanisms influenced by Cl^- and/or K^+ . KT 5720, an inhibitor to protein kinase A (PKA), blocked completely the stimulatory effect of T_4 . On the other hand, this action of T_4 was not altered by sthearoylcarnitine chloride, an inhibitor to protein kinase C. In conclusion, these findings show that chloride channels are essential to the hyperpolarization triggered by T_4 in Sertoli cells. T_4 stimulated $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake through voltage-dependent calcium channels (L- and T- type), Cl^- and calcium-dependent K^+ channels, as well as PKA activity and specific thyroxine action on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in immature rat testes.

Key words: thyroid hormone, calcium, testes, kinases, ionic mechanism.

1 INTRODUÇÃO

1.1. HORMÔNIOS TIREOIDIANOS

Os hormônios tireoidianos (HT) modulam o consumo de oxigênio, a taxa metabólica basal e o metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas. Além disso, também causam mudanças nas taxas de síntese e degradação de uma grande variedade de fatores de crescimento e hormônios (NORMAN; LITWACK, 1997). Possuem importantes funções no crescimento, desenvolvimento, diferenciação celular e metabolismo (LAZZAR, 1993; BRENT, 1994).

Os efeitos dos HT podem ser descritos em duas categorias de respostas biológicas: a) efeitos no crescimento e diferenciação celular; b) efeitos nas vias metabólicas. Estas duas ações estão interligadas, onde mudanças no desenvolvimento e crescimento são uma consequência da modulação do metabolismo (NORMAN; LITWACK, 1997).

1.1.1. Eixo Hipotálamo-Hipófise-Tireóide

A regulação fisiológica da secreção dos HT é um sistema complexo que envolve além da glândula tireóide, o hipotálamo, a pituitária e a atividade neural. O hormônio liberador de tireotrofina (TRH), produzido e liberado pelo hipotálamo, que chega à hipófise através do sistema vascular porta, estimula a síntese e secreção do hormônio tireoestimulante (TSH). Este por sua vez possui receptores

nas células foliculares da tireóide e então estimula a síntese e secreção dos HT, cujos principais hormônios são a tiroxina (T_4) e a triiodotironina (T_3). Os níveis de TSH e TRH também são controlados por um sistema de retroalimentação negativa via T_3 e T_4 , que agem tanto no hipotálamo como na hipófise (GREENSPAN, 1997; NORMAN; LITWACK, 1997; BARDIN; PAULSEN, 1998) (Figura 1.1).

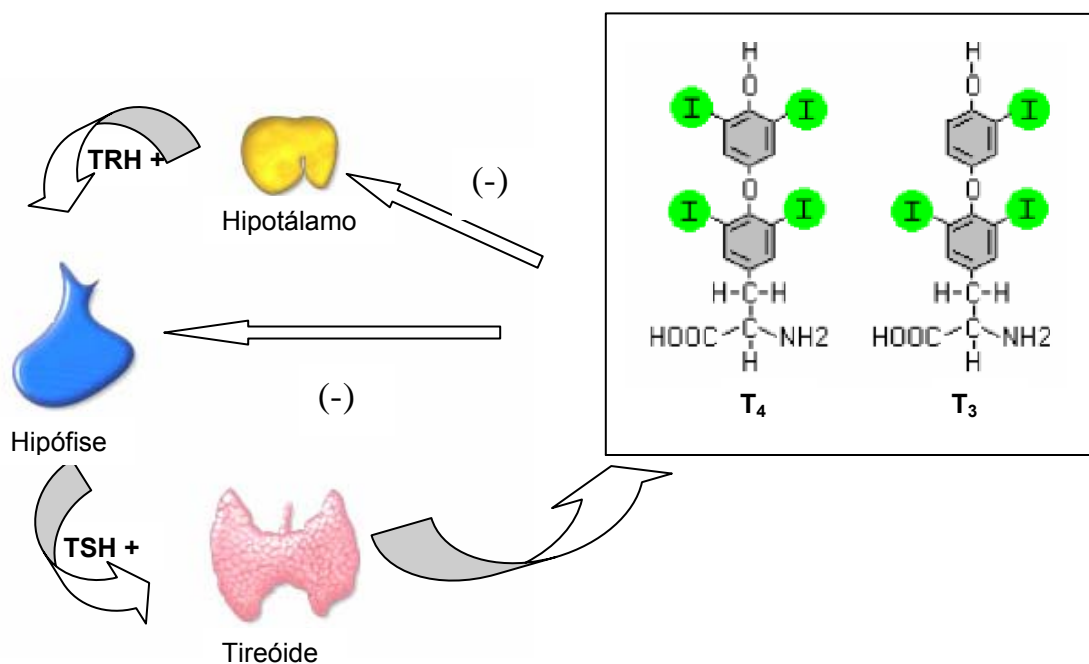


Figura 1.1: Resumo esquemático do eixo hipotálamo-hipófise -tireóide

1.1.2. Produção e Secreção de Hormônios Tireoidianos

A glândula tireóide secreta em maior quantidade T_4 , em menor quantidade o T_3 , T_3 -reverso (T_{3r}), diiodotironina (T_2) e monoiodotironina. Portanto, a maior quantidade de T_3 é gerado através da atividade de enzimas, denominadas de deiodinases, D1 e D2, que convertem T_4 para T_3 por 5' monodeiodinação (BIANCO et al., 2002). A D1 por estar presente no meio extracelular, gera T_3 para os outros tecidos, a D2 possui importante papel na geração de T_3 no meio intracelular (KOHRLER, 1999). No entanto a enzima D3 inativa T_4 e T_3 por 5' monodeiodinação.

Assim, níveis intracelulares de T_3 são dependentes da atividade relativa de três deiodinases (FISHER, 1996; para revisão ver BIANCO et al., 2002).

1.1.3. Receptores Nucleares dos Hormônios Tireoidianos

Os HT exercem um papel determinante na diferenciação e no desenvolvimento. Uma vez produzidos e secretados pela glândula tireóide, são transportados no sangue por proteínas circulantes e levados aos tecidos alvos. A ação em nível celular é mediada por ligação a receptores intranucleares, os quais ligam-se a sequências específicas do ácido desoxirribonucléico (ADN), regulando assim a transcrição gênica.

Os receptores do hormônio tireoideano (RHT) fazem parte da superfamília dos receptores nucleares, da qual também destacam-se como membros os receptores dos hormônios esteróides, do ácido retinóico, da vitamina D, e os receptores “órfãos” cujos ligantes ainda não foram identificados. Estes receptores nucleares agem como fatores reguladores da transcrição. Outra característica destes receptores é a formação de dímeros quando em contato com a sequência específica no ADN. Podem formar tanto homodímeros (duas moléculas de RHT) ou heterodímeros (uma molécula de RHT com outra molécula diferente) (YEN, 2001).

Os receptores nucleares dos HT são codificados por dois genes diferentes denominados $TR\alpha$ e $TR\beta$, gerando as isoformas $TR_{\alpha1}$, $TR_{\beta1}$ e $TR_{\beta2}$, que são formas ligantes, e as variantes $TR_{\alpha2}$ e $TR_{\alpha3}$, onde o hormônio não se liga (D'ARMIENTO; JANNINI, 1992). A função fisiológica das formas não ligantes dos RHT pode ser atribuída à modulação das ações dos HT (NIKODEM et al., 1990).

Sítios de ligação para os HT foram encontrados em testículos de ratos durante toda a fase proliferativa, mas receptores funcionais para estes hormônios

(TR_{α1}) encontram-se apenas na fase imatura do desenvolvimento (FUGASSA et al., 1987; JANNINI et al., 1994).

1.1.4. Hormônios Tireoidianos e Células de Sertoli

Em 1952, Barker e Klitgaard demonstraram que o T₄ não afeta o consumo de oxigênio em testículos de ratos adultos. A hipótese clássica da irresponsividade das gônadas masculinas aos HT deve-se a este fato e, por isso, durante muito tempo as ações destes hormônios no testículo não foram estudadas. Esta observação pode ser atribuída ao fato de terem sido utilizados, para aqueles estudos, ratos adultos, uma vez que receptores funcionalmente ativos para os HT em células de Sertoli encontram-se na fase imatura do desenvolvimento. No entanto, nos dias de hoje sabe-se da importância destes hormônios para o funcionamento normal e completo da atividade reprodutiva masculina (JANNINI et al., 1995; MARAN; 2003).

Estudos têm demonstrado que as células de Sertoli são o principal alvo da ação dos HT no testículo (FUGASSA et al., 1987; PALMERO et al., 1990; ULISSE et al., 1992; JANNINI et al., 1999). Oppenheimer e colaboradores (1984), revelaram que o papel dos HT no testículo é crítico na regulação, manutenção e desenvolvimento funcional e estrutural da função testicular em mamíferos.

Em testículos de ratos, os HT influenciam a esteroidogênese e a gametogênese; afetam a proliferação celular e a formação tubular em testículos de ratos. Diretamente, estimulam o transporte de glicose, aumentam a produção de lactato, gama-glutamiltanspeptidase, e fator de crescimento semelhante à insulina I, inibem a atividade da aromatase, diminuem a síntese da proteína ligadora de andrógenos e afetam o metabolismo da testosterona (JANNINI et al., 1995). Indiretamente, Palmero e colaboradores (1990) sugeriram que os HT modificam a

função das células de Leydig através de fatores parácrinos que se originam na célula de Sertoli.

Os HT são considerados importantes reguladores endócrinos do epitélio seminífero, indicando que a atividade da glândula tireóide é necessária para que haja uma expressão normal dos ciclos de atividade reprodutiva. As anormalidades no desenvolvimento testicular podem ser ocasionadas por exemplo, pela ausência dos efeitos dos HT durante a maturação testicular (JANNINI et al., 1995).

Em ratos, as células de Sertoli dividem-se durante o período fetal e prépuberal, atingindo uma capacidade de divisão muito baixa após os 16 dias de vida. O número de células de Sertoli depende da duração da fase proliferativa e da taxa de divisão durante esta fase, sendo que a taxa de divisão das células de Sertoli é estimulada principalmente pelo hormônio folículo estimulante (FSH) (MEACHEM et al., 1996) e ativina A (BOITANI et al., 1995), e o tempo de divisão das células de Sertoli envolve os HT. Hipotireoidismo neonatal prejudica a diferenciação das células de Sertoli, resultando na vida adulta, num aumento do tamanho testicular e um concomitante aumento da produção de espermatozóides (FRANCAVILLA et al., 1991). Em contrapartida, o hipertireoidismo acelera o período de proliferação das células de Sertoli, com diminuição do tamanho testicular e diminuição da produção de espermatozóides (COOKE; MEISAMI, 1991; VAN HAASTER et al., 1993; COOKE et al., 1994).

O tratamento de células de Sertoli, em fase de proliferação, com HT, induz a supressão da proliferação, aumento da expressão protéica, diminuição da atividade da aromatase, sugestivo de diferenciação. Trabalhos desenvolvidos por Buzzard e colaboradores (2003) e Holsberger e colaboradores (2003) sustentam evidências para a ação dos HT como sendo um ponto inicial requerido para induzir marcadores da diferenciação e limitar a proliferação das células de Sertoli, juntamente com a testosterona e o ácido retinóico. Especificamente, as proteínas

inibidoras do ciclo celular, p27^{Kip1} e p21^{Cip1}, são identificadas como sendo induzidas em resposta à esses hormônios.

1.2. MECANISMO DE AÇÃO HORMONAL

Os hormônios são substâncias que atuam como mensageiros químicos exercendo efeitos específicos na atividade bioquímica e/ou fisiológica em células alvo. Podem ser classificados em 3 grandes grupos: a) hormônios protéicos ou peptídicos (exemplo: TRH); b) hormônios esteróides (exemplo: testosterona); e c) hormônios derivados de aminoácidos (exemplo: T₄) (NORMAN; LITWACK, 1997).

1.2.1. Mecanismo de Ação Genômico dos Hormônios Tireoidianos

Os HT classicamente atuam através da ligação com receptores nucleares específicos, TR β e TR α . Quando ligam-se ao RHT, provocam mudanças conformacionais no receptor resultando na troca de cofatores/proteínas acessórias. Proteínas co-repressoras são trocadas por co-ativadoras, formando um complexo que se liga a regiões específicas do ADN, conhecidas como elemento responsivo aos HT. Desta forma os HT regulam a expressão gênica, podendo reprimir ou ativar a transcrição. Assim estas ações genômicas são sensíveis a inibidores da transcrição e tradução, como por exemplo os fármacos actinomicina D e ciclo-heximida, respectivamente, e são caracterizadas por um considerável período de latência, de horas a dias, entre o estímulo e a resposta (ARANDA; PASCUAL, 2001; YEN, 2001; NORMAN et al., 2004).

O T₃ ativa a transcrição de diversos genes, entre eles, o gene da bomba de Ca²⁺ dependente de ATP (Ca²⁺-ATPase) do retículo sarcoplasmático (NUNES et al., 1985), hormônio do crescimento (SAMUELS, 1987); genes da cadeia pesada da miosina do tipo I e II (FITTS et al., 1980; SANTOS et al., 2001). O T₃ possui

efeitos repressores sobre os genes do TSH (SHUPNIK, 2000) e do TRH (GUISOUMA et al., 1998), que são a base molecular do efeito de retroalimentação negativo exercido pelo hormônio tireoideano sobre a hipófise e hipotálamo, respectivamente.

1.2.2. Mecanismo de Ação Não-genômico dos Hormônios Tireoideanos

Embora os HT possam exercer ações através da regulação da transcrição genômica, sabe-se que podem agir também por mecanismos não-genômicos, que ocorrem de segundos a minutos e não são afetados por inibidores da transcrição e síntese protéica (DAVIS et al., 1989; WRUTNIAK-CABELLO et al., 2001). Estas ações caracterizadas como não genômicas ocorrem na membrana plasmática, citoesqueleto, citoplasma e organelas (DAVIS; DAVIS, 1996; ZAMONER et al., 2005a), e envolvem a modulação dos fluxos iônicos, como Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , H^+ , transporte de glicose (SEGAL; GORDON 1977; SEGAL et al., 1989) e aminoácidos (SILVA et al., 2001; INCERPI et al., 2002; MENEGAZ et al., 2006), atividade das cinases intracelulares (LIN et al., 1996; DAVIS et al., 2000) e a polimerização da actina e vimentina (DAVIS; DAVIS, 2002; ZAMONER et al 2005a; 2005b).

Dentre as ações não-genômicas, os HT podem ligar-se diretamente em proteínas efetoras, como por exemplo na subunidade Va da citocromo-c oxidase ativando-a (ARNOLD et al., 1998). Ainda, ligam-se diretamente ao monômero p58-M₂ da piruvato cinase de células humanas cancerosas epidermóides, modulando a atividade desta enzima (ASHIZAWA, et al., 1991).

Sítios de ligação para os HT já foram identificados na membrana plasmática de eritrócitos humanos e de ratos (BOTTA; FARIAS, 1983; BOTTA et al., 1985) e hepatócitos de ratos (PLIAM; GOLFINE, 1977; GAHRBI; TORRESANI, 1979). Recentemente foi identificado um sítio de ligação para os HT no domínio

extracelular da integrina $\alpha V\beta 3$ de células CV-1, a qual é uma proteína da superfície celular (BERGH et al., 2005).

Ainda, os HT podem exercer ações sobre os receptores da superfície celular acoplados à proteína G e desta forma alterar o fluxo iônico (SAKAGUCHI et al., 1996), ou então ativar cinases envolvidas na transdução do sinal, como a proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK) (LIN et al., 1996).

Outros estudos demonstram o efeito modulatório dos HT nas vias da proteína cinase dependente de AMPc (PKA), proteína cinase C (PKC), fosfolipase C (PLC) e D (PLD), onde o T_4 aumentou a formação de diacilglicerol (DAG) por ativar as vias PLC e PLD em células do fígado (KAVOK et al., 2001).

Outro efeito caracterizado de ação não-genômica dos HT inclui a estimulação do antitransportador Na^+/H^+ em miócitos de ratos e hepatócitos de pintos de maneira dose-dependente e, também a estimulação do transporte de aminoácidos não metabolizáveis, pelo sistema A (INCERPI et al., 1999; 2002).

Os HT podem ainda alterar a concentração de Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), estimulando a Ca^{2+} -ATPase da membrana plasmática e do retículo endoplasmático, aumentando assim o efluxo de Ca^{2+} do citosol (DAVIS et al., 1983; RUBINACCI et al., 1992). Além disso, os HT atuam na liberação de Ca^{2+} dos estoques internos através de receptores de inositol trifosfato (IP_3) (KAVOK et al., 2001).

1.2.3. Vias Genômica e Não-Genômica: Diferenças e Interação

Dentre as características que diferenciam as ações genômicas das não-genômicas dos HT estão: a) para as ações genômicas torna-se indispensável a presença do receptor nuclear, o que não se verifica para o estabelecimento de

ações não-genômicas, as quais podem ser demonstradas mesmo em células anucleadas como as hemácias; b) o tempo necessário para ocorrer o efeito biológico, que no caso da ação genômica é suficientemente longo para permitir a ativação da transcrição gênica enquanto que no caso da ação não-genômica, observa-se de segundos a minutos; c) as ações genômicas ocorrem preferencialmente pela ação do T_3 , enquanto as ações não-genômicas ocorrem tanto por ação do T_3 , T_4 , como também por T_{3r} e T_2 , iodotironinas estas consideradas biologicamente inativas em termos de ações nucleares dos HT, já que a afinidade dos RHT por T_{3r} e T_2 é praticamente nula; e d) a amplitude do efeito biológico, que é extremamente longa na ação genômica e curta na ação não-genômica (DAVIS; DAVIS, 1996). No entanto, as respostas rápidas dos HT podem ativar vias de transdução de sinais que resultam em diversas mudanças intracelulares, inclusive na transcrição gênica, modulando a função e o fenótipo das células responsivas a hormônios (FARACH-CARSON et al., 2003).

O T_4 pode interagir com receptores acoplados à proteína G (LIN et al., 1999) e ativar a PKC, Ras, Raf1 e proteína cinase cinase ativada por mitógeno (MEK) resultando na fosforilação da tirosina, ativação e translocação da MAPK para o núcleo, que assim fosforila o resíduo de serina do RHT (DAVIS et al., 2000). Esta fosforilação resulta na dissociação do RHT dos co-repressores e aumento da atividade transcricional (JONES et al., 1994; TING et al., 1997). O complexo nuclear MAPK/RHT também pode ligar-se e fosforilar a p53 para regular a atividade transcricional desta (SHIH et al., 2001).

Em uma via paralela, a fosforilação dos resíduos de tirosina da STAT1 α e STAT3 (ativadores da transcrição) pela MEK ativada por T_4 , resulta na translocação nuclear destes ativadores da transcrição, e a posterior fosforilação pela MAPK conduz a ativação da transcrição gênica (LIN et al., 1999). Assim as ações não-genômicas dos HT podem influenciar a transcrição gênica por três vias: STATs, p53 e RHT.

1.2.4. Mecanismo de Ação Não-Genômico de Hormônios Tireoidianos em Testículos de Ratos

Assim como demonstrado para o FSH, testosterona e retinol (SILVA et al., 2002), os HT também apresentam efeitos rápidos na membrana plasmática de células de Sertoli (SILVA et al., 2001; VOLPATO et al., 2004).

Recentemente, foi demonstrado que o T_4 e o T_3 induzem uma hiperpolarização da membrana da célula de Sertoli de ratos imaturos, e estimulam o transporte do aminoácido α -metilaminoisobutírico ($[^{14}C]$ -MeAIB) (VOLPATO et al., 2004; MENEGAZ et al., 2006). Também, Zamoner e colaboradores (2005a) demonstraram que o T_3 aumentou a fosforilação e a imunoreatividade da vimentina do citoesqueleto de células de Sertoli. Assim, estudos eletrofisiológicos, o transporte de aminoácidos e a fosforilação têm contribuído para o esclarecimento do mecanismo de ação não-genômico dos HT nas células de Sertoli de ratos imaturos.

1.3. ELETROFISIOLOGIA

1.3.1. Concentrações Iônicas e Potencial de Repouso

Na maioria das células há uma diferença de potencial elétrico estável através da membrana plasmática, chamada de potencial de repouso (E_m). O E_m de uma célula é o potencial elétrico através da membrana plasmática na ausência de sinalizações, e é determinado a qualquer momento pela permeabilidade relativa a diferentes íons e por gradientes de concentração desses íons através da membrana. Ele é portanto, mais próximo ao potencial de equilíbrio do íon para o qual a membrana é mais permeável. Origina-se da separação de cargas entre as margens interna e externa da membrana (VANDER, 1994).

Os diferentes tipos de íons são distribuídos assimetricamente através da membrana celular. O citosol é rico em potássio (K^+) e em íons orgânicos impermeáveis, constituídos basicamente por aminoácidos e proteínas. O fluido extracelular é rico em Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} (WILLIAMS, 1981) (Figura 1.2).

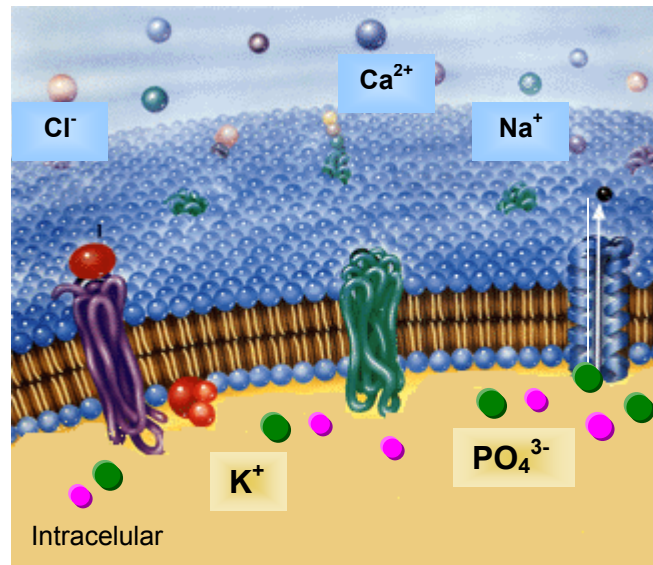


Figura 1.2 – Representação esquemática da membrana plasmática com a distribuição assimétrica dos íons (modificado de KANDELL, 1995).

1.3.2. Princípios Gerais Sobre Registros Intracelulares

Entre as informações contidas nos registros intracelulares pode-se citar as alterações de permeabilidade da membrana celular evocado por hormônios, neurotransmissores, nutrientes e fármacos. Além disso, o fluxo de corrente pode ser medido através das membranas celulares durante repouso e atividade. As atividades eletrofisiológicas destas substâncias na membrana plasmática possuem um papel importante no controle da função celular e contribuem na elucidação de diversos mecanismos fisiológicos (DEAN; MATTHEWS, 1970; BORDIN et al., 1995). Estudos eletrofisiológicos são empregados a fim de investigar o mecanismo de ação de hormônios, neurotransmissores e seus agonistas em vários tipos

celulares. Já foi demonstrado que as células de Sertoli mostram mudanças no potencial transmembrana quando expostas ao FSH (JOFRE; ROCHE, 1988; WASSERMANN et al., 1990; WASSERMAN et al., 1992a), testosterona (LEITE et al., 1999), T₃ e T₄ (VOLPATO et al., 2004; MENEGAZ et al., 2006).

As diferenças de potencial em sistemas biológicos podem ser medidas através de equipamentos eletrofisiológicos. As mudanças nos potenciais transmembrana são registradas com microeletrodos intracelulares, em contato com o citoplasma (microeletrodo de registro) e em contato com o líquido extracelular (eletrodo de referência). A diferença de potencial através da célula relaciona o potencial do interior da célula com o da solução externa. A diferença de potencial entre os microeletrodos é denominada V_m. A redução na magnitude do V_m (em direção ao zero) é chamada de despolarização; um aumento na magnitude é chamado de hiperpolarização (SILINSKY, 1992).

1.3.3. Canais Iônicos Através da Membrana Celular

A maior parte da membrana celular é quase completamente impermeável aos íons (SARGENT et al., 1992). Estes podem atravessá-la através de canais iônicos ou de transportadores. A abertura e fechamento dos canais são altamente regulados, sendo que diferentes canais têm especificidades iônicas diferentes e diferentes modos de regulação. A seletividade é em função do tamanho, carga e hidratação dos íons, e a regulação se dá por ligantes químicos, por segundos mensageiros intracelulares, por mudanças de potencial elétrico ou ainda, por estiramento mecânico ou pressão da célula (KANDEL, 1995). A direção e o equilíbrio do fluxo iônico através do canal são determinados pela força eletroquímica, que é a força resultante do gradiente elétrico e do gradiente de concentração do íon através da membrana (SARGENT, 1992).

Em termos de modelo matemático, os gradientes de concentração iônico e elétrico do íon entre os meios intra e extracelular, podem ser representados por

∇c_i e ∇V_i , respectivamente, ou seja, gradiente eletroquímico, para cada íon i existente. O movimento dos íons através da membrana é descrito pela equação de Nernst-Planck:

$$J_{mi} = -ez_i c_i \mu_i \nabla V_i - ez_i \kappa_i \nabla c_i$$

Esta equação descreve a densidade da corrente de condução e de difusão dos íons pela membrana, onde para um dado íon i :

- J_{mi} Densidade de corrente (A.cm⁻² ou C.s⁻¹cm⁻²);
- e Carga elétrica do elétron (C);
- z_i Valência do íon i ;
- μ_i Mobilidade do íon i (cm.V⁻¹.s⁻¹);
- c_i Concentração do íon i (mols.cm⁻³);
- κ_i Constante de difusão para o íon i (cm².s⁻¹);
- ∇V_i Gradiente do potencial elétrico entre os meios intra e extracelular ao qual o íon i está sujeito;
- ∇c_i Gradiente da concentração do íon i entre os meios intra e extracelular.

A corrente total através da membrana I_m é a soma da densidade de corrente de todos os íons multiplicado pela área da membrana A_m .

$$I_m = \sum_i J_{mi} * A_m$$

Aplicando-se a Lei de Ohm ($V = R*I$) na equação acima, temos que o potencial transmembrana V_m é dado por:

$$V_m = \sum_i R_{mi} * J_{mi} * A_m$$

onde, R_{mi} é a resistência da membrana à passagem de um dado íon i , sendo inversamente proporcional à permeabilidade da membrana. Quanto mais permeável ao íon i , menor é a resistência da membrana à passagem deste íon. Esta resistência representa os possíveis mecanismos pelos quais ocorre a transferência de um dado íon do meio externo para o citosol, ou vice-versa através de canais iônicos (STEN-KNUDSEN, 2002).

1.4. CANAIS DE POTÁSSIO

Os canais de potássio são proteínas tetraméricas integrais da membrana, presentes em todas as células dos mamíferos. Possuem uma grande variedade de funções em células excitáveis e não-excitáveis incluindo a regulação da atividade cardíaca, contração muscular, liberação de neurotransmissores, excitabilidade neuronal, secreção de insulina, proliferação celular, transporte epitelial de eletrólitos e regulação do volume celular (ROWAN; HARVEY, 1996; KAZIC; GOJKOVIC-BUKARICA, 1999; WICKENDEN, 2002).

Como já descrito, praticamente todas as células mantêm uma concentração citoplasmática de K^+ muito mais alta que a extracelular. A abertura de canais de K^+ automaticamente implica na mudança do potencial elétrico da célula através da membrana plasmática em direção à negatividade, ou seja, uma hiperpolarização que ocorre em diferentes contextos fisiológicos para diferentes propósitos.

Foram identificados vários tipos de canais de potássio: 1) canais de K^+ dependentes de tensão, são ativados em resposta a uma mudança no potencial transmembrana e são importantes na fase de repolarização do potencial de ação;

2) outros são chamados retificadores internos, onde a corrente passa primeiramente em voltagens hiperpolarizantes, dos quais destacam-se os canais de K^+ dependentes de ATP (K^+_{ATP}), que interligam funções do metabolismo celular e do potencial transmembrana, e os canais de K^+ ativados por proteína G; 3) há ainda os canais de K^+ ativados por aumento da concentração interna de Ca^{2+} , são denominados de canais de K^+ dependentes de Ca^{2+} . Estes canais previnem, indiretamente, a entrada excessiva de Ca^{2+} e estão envolvidos no relaxamento muscular e liberação de neurotransmissores (WICKENDEN, 2002).

Estudos eletrofisiológicos demonstram a presença de diversos tipos de canais de K^+ sensíveis a hormônios (HT), toxinas (apamina) e fármacos (tetraetilamônio (TEA)). Devido à grande diversidade de canais de K^+ , neste trabalho será descrito apenas o que está envolvido no foco principal dos objetivos.

1.4.1. Canais de Potássio Dependentes de Cálcio

Mudança na $[Ca^{2+}]_i$ é um mecanismo de sinalização que está freqüentemente associado a alterações no potencial transmembrana. O aumento da $[Ca^{2+}]_i$ está envolvido com a ativação de uma das famílias de canais, os canais de K^+ dependentes de Ca^{2+} , que se abrem pela elevação do cálcio citosólico resultando na hiperpolarização da membrana plasmática. Estes canais estão envolvidos em muitos processos fisiológicos, dentre os quais inclui-se a neurosecreção, a manutenção do tônus da musculatura lisa, a modulação do potencial de ação e a adaptação da freqüência dos picos de Ca^{2+} (SAH, 1996; VERGARA et al., 1998).

Os canais de K^+ dependentes de Ca^{2+} podem ser divididos em três subfamílias: canais de potássio dependentes de Ca^{2+} de condutâncias alta (BK), intermediária (IK) e baixa (SK). Em condições fisiológicas, os canais BK são ativados por despolarização e aumento da $[Ca^{2+}]_i$. Estas propriedades explicam a função de moduladores da atividade dos canais de cálcio dependentes de tensão

(CCDT) como um mecanismo de retroalimentação (VERGARA et al., 1998). São sensíveis ao tetraetilamônio (TEA). Os canais IK distinguem-se dos canais SK e BK em função das propriedades farmacológicas, biofísicas e fisiológicas. Estão presentes em muitos tecidos, tendo importantes funções no controle do volume dos eritrócitos, secreção de Cl^- nas células epiteliais das vias aéreas e do intestino, controle da proliferação e secreção de citocinas dos linfócitos. Os canais IK são bloqueados pela caribdotoxina (veneno de escorpião) (JENSEN et al., 1998; 2001).

Os canais SK possuem um papel fundamental em todas as células excitáveis, são seletivos para o K^+ e ativados por concentrações submicromolares de Ca^{2+} . A ativação destes canais causa uma hiperpolarização da membrana (VERGARA et al., 1998). Possuem semelhança estrutural com os canais de K^+ dependentes de tensão, exibindo seis domínios transmembranares e com as porções carbóxi- e amino-terminal no meio intracelular (KÖHLER et al., 1996). Podem ser farmacologicamente classificados com base na sensibilidade ao veneno de abelha, a apamina. Xia e colaboradores, 1998, demonstraram que a ativação dos canais SK não se dá pela ligação direta do Ca^{2+} a estes canais, e sim através da ligação deste íon na calmodulina, que está associada constitutivamente aos canais SK. Menegaz e colaboradores (2006), demonstraram que estes canais estão envolvidos na hiperpolarização do T_4 em células de Sertoli.

1.5. CANAIS DE CLORETO

Os canais aniônicos são proteínas presentes na membrana que permitem a difusão passiva de íons carregados negativamente através de um gradiente eletroquímico. Apesar destes canais conduzirem vários ânions, eles são freqüentemente chamados de Cl^- devido ao fato deste ânion ser o mais abundante nos organismos. Podem ser encontrados tanto na membrana plasmática quanto em organelas citoplasmáticas. Quando presentes na membrana plasmática, estes

canais exercem funções que incluem regulação do volume celular, transporte transepitelial, e regulação da excitabilidade elétrica da célula. Diferentemente dos íons Ca^{2+} , o Cl^- parece não exercer papel de mensageiro intracelular (JENTSCH et al.; 2002).

Muitos canais de Cl^- foram identificados em função das características eletrofisiológicas, seletividade iônica, comportamento de abertura e sensibilidade farmacológica, tais como os canais aniônicos regulados pelo volume, canais de Cl^- ativados por Ca^{2+} ou canais aniônicos de alta-condutância (STRANGE et al., 1996). De acordo com as características moleculares, foram classificados como canais de Cl^- ativados por ligantes (ácido gama amino butírico (GABA) e receptores de glicina), canais de Cl^- reguladores da condutância de transmembrana na fibrose cística (tipo CFTR) e os canais de Cl^- da família CLC (LAMBERT et al, 2001; XIN et al., 2001; JENTSCH et al, 2002; JIANG; YE, 2003).

1.5.1. Principais Famílias de Canais de Cloreto

1.5.1.1. Canais de Cl^- reguladores da condutância de transmembrana na fibrose cística (Tipo CFTR)

Os canais CFTR são regulados por proteínas cinases e fosfatases onde no domínio regulatório são encontrados sítios de fosforilação para PKA e PKC (DAHAN et al., 2001). São também substratos para cinases dependentes de GMP_c e tirosina cinases (JENTSCH et al., 2002). Requerem a presença de adenosina trifosfato (ATP) para a ativação eficiente, e são expressos na membrana apical de vários epitélios, principalmente nas células do intestino, glândulas secretoras, ductos biliares e epidídimo. Em células não estimuladas, os CFTR estão em um estado desfosforilado, pela ação de várias fosfatases que estão provavelmente associadas na membrana. A ativação desta classe de canais parece ser um processo que envolve muitos passos como a ativação da PKC, PKA, e uma alta

razão ATP/ADP para adquirir atividade máxima (DAHAN et al., 2001; JENTSCH et al., 2002).

1.5.1.2. Família CLC de canais de cloreto

A família de canais de Cl^- CLC divide-se, nos mamíferos, em nove diferentes subtipos: CIC-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, Ka, Kb. Muitos destes canais são modulados pelo potencial celular, adicionalmente, muitos são modulados por ânions, e pelo pH. Somente poucos estudos descrevem uma regulação destes canais por mensageiros intracelulares ou proteínas cinases. A recente análise cristalográfica da estrutura dos canais CLC de bactérias mostrou um dímero onde cada monômero contém um poro (DUTZLER et al., 2002). Assim a arquitetura dimérica é certamente uma característica de todos os canais CLC (LUDEWIG, et al., 1996).

Baseado na homologia, os 9 diferentes canais CLC podem ser agrupados em três classes (JENTSCH et al., 2002). Os membros da primeira classe (CIC-1, -2, -Ka e Kb) são expressos na membrana plasmática, onde influenciam a excitabilidade elétrica ou funções de transporte transepitelial. Os membros das outras duas classes (CIC-3 a -5 e CIC-6 e -7, respectivamente) encontram-se predominantemente em organelas intracelulares (GÜNTHER et al., 1998; KORNAK et al., 2001; STOBRAWA et al., 2001) mas podem ser inseridos na membrana plasmática em determinadas circunstâncias (KORNAK et al., 2001). Têm função de acidificar os compartimentos intra e extracelulares por redirecionar a corrente da bomba de hidrogênio dependente de ATP (H^+ -ATPase) (Tabela 1.1).

Tabela 1.1: Família CLC de canais de cloreto em mamíferos (Adaptada de Jentsch, et al; 2002).

Canal	Expressão	Função	Doença associada
CIC-0	--	--	--
CIC-1	Músculo esquelético	Estabilização da membrana	Miotonia
CIC-2	Geral	Transporte transepitelial (?), pH. Regulação do volume celular	Cegueira Infertilidade masculina
CIC-Ka	Rins, Ouvido interno	Transporte transepitelial	--
CIC-Kb	Rins, Ouvido interno	Transporte transepitelial	Síndrome de Bartter's
CIC-3	Geral	Acidificação de endossomos e vesículas sinápticas	Perda degenerativa do hipocampo e fotorreceptores
CIC-4	Geral	--	--
CIC-5	Rins, Intestino, Fígado	Acidificação de endossomos	Doença de Dent's
CIC-6	Geral	--	--
CIC-7	Geral	Acidificação de lisossomos. Reabsorção de osteoclastos	Osteosporose

1.5.1.3. Canais de cloreto ligados a receptores

Os receptores do ácido gama-amino-butírico (GABA) e da glicina pertencem a uma família de receptores ligados a canais iônicos. A ligação destes neurotransmissores aos receptores específicos promove a abertura dos canais aniônicos acoplados a estes receptores. Este evento produz um influxo de Cl^- , o qual hiperpolariza a célula nervosa e assim inibe a atividade neuronal (JENTSCH, et al; 2002).

1.5.1.4. Canais de cloreto ativados por cálcio

Existe uma grande diversidade molecular de canais de Cl^- ativados por Ca^{2+} e esta diversidade está relacionada também com as diferentes condutâncias apresentadas por estes canais. Os canais de Cl^- ativados por Ca^{2+} são encontrados em células epiteliais e não-epiteliais, dentre as quais pode-se citar as células cardíacas, neuronais, musculares, sanguíneas (MARTY, et al., 1984; FRIZZELL et al., 1986). Também foram caracterizados em células de Sertoli de ratos imaturos (LALEVEÉ; JOFFRE, 1999).

Os canais de Cl^- podem ser ativados por Ca^{2+} externo ou dos estoques intracelulares (GORDIENKO et al., 1999). Assim, a diversidade funcional destes canais ocorre também em função da procedência do Ca^{2+} envolvido na ativação. O Ca^{2+} pode ativar a condutância dos canais de Cl^- por interagir diretamente ou por fosforilação dependente de calmodulina dos canais de Cl^- (LALEVEÉ; JOFFRE, 1999). Garcia e colaboradores, em 1997, estudaram a modulação de canais de cálcio dependentes de tensão (CCDT) pelo íon Cl^- e demonstraram que o bloqueio do canal de Cl^- reduz a entrada de Ca^{2+} .

1.6. CÁLCIO

1.6.1. O Cálcio como Molécula Sinalizadora

O Ca^{2+} é um dos agentes sinalizadores intracelular mais estudados e o aumento de concentração deste íon, por estimulação elétrica ou hormonal, provoca sinalizações específicas na célula.

Os hormônios, neurotransmissores e fatores de crescimento, controlam de forma dependente de Ca^{2+} vários processos celulares, como a ativação de sistemas enzimáticos, a secreção, a síntese de segundos mensageiros, o transporte de açúcares e aminoácidos (BRONSTON; BRONSTON, 1980; WASSERMAN et al., 1992b), o crescimento e o ciclo celular (CLAPHAM, 1995).

O Ca^{2+} pode ativar diretamente proteínas, pois são muitas as que têm sítio de ligação específica e a atividade de tais proteínas é dependente da ligação do íon. Como exemplo pode-se citar muitas enzimas, entre elas a fosfolipase A_2 . Outro mecanismo do sinal de transdução exercido pelo Ca^{2+} é a ligação deste em receptores, os quais atuam como sensores que ativam proteínas alvos em resposta às mudanças da concentração de Ca^{2+} (KRAUSS, 2003).

1.6.2. Mudanças Temporal e Espacial na Concentração de Cálcio

Quando canais de Ca^{2+} da membrana plasmática ou de liberação intracelular abrem-se, uma nuvem altamente concentrada de Ca^{2+} forma-se ao redor do poro dissipando-se rapidamente após o fechamento do canal. Estes sinais localizados, que podem originar-se de canais presentes na membrana plasmática ou das organelas, representam os sinais elementares. Estes sinais elementares têm praticamente duas funções: a) podem ativar processos celulares localizados nas proximidades dos canais ou; b) podem ativar processos a nível global, uma vez que mantêm o controle local de muitos processos fisiológicos como a ativação de outros canais iônicos e sinais nucleares específicos do Ca^{2+} (BERRIDGE et al., 1998).

Os gradientes de concentração locais de Ca^{2+} podem ser agrupados em quatro categorias: 1) microdomínios, na ordem de nanômetros, que são aqueles gerados na superfície dos canais de Ca^{2+} ; 2) eventos altamente localizados, do tamanho de poucos microns, como os picos ou rajadas de Ca^{2+} ; 3) aumentos

locais de Ca^{2+} que podem durar vários segundos e manterem-se restritos a uma parte da célula; 4) ondas de Ca^{2+} , isto é, aumentos que originam-se num local específico da célula e difundem-se através do citoplasma (ZACCOLO et al., 2002).

Comumente, os sinais globais do Ca^{2+} são de natureza pulsátil e aparecem como ondas. Os mecanismos que geram estas correntes são diversos, entre eles, a sensibilidade diferencial dos receptores de IP_3 e rianodina a baixas e altas concentrações de Ca^{2+} . Um pequeno aumento da concentração de Ca^{2+} devido a um sinal elementar poderá ativar muitos canais liberadores e conseqüentemente o influxo de mais Ca^{2+} de uma maneira cooperativa. A concentração de Ca^{2+} aumenta até alcançar um valor limiar que é suficiente para inibir o influxo de Ca^{2+} pelo canal, e então a concentração cai novamente.

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

As propriedades espaço-temporais do aumento de Ca^{2+} intracelular, dependem da natureza e localização dos canais. A localização subcelular dos canais de Ca^{2+} é crucial para direcionar os sinais elementares. No músculo liso, por exemplo, os picos de Ca^{2+} que surgem próximos da membrana plasmática, ativam canais de K^+ , causando o relaxamento muscular. Mas quando os eventos elementares aparecem no interior celular, criam sinais globais e o músculo contrai (BERRIDGE et al., 1998).

Os diferentes sinais de Ca^{2+} ativam diferentes moléculas efetoras e desencadeiam reações intracelulares específicas. Outro exemplo é a enzima

proteína-cinase II dependente de calmodulina, encontrada tanto em células animais como em vegetais e que tem a função de regular outras enzimas. A função desta enzima depende do número de pulsos de Ca^{2+} , variando a atividade de maneira correspondente. Esta enzima é composta de várias subunidades idênticas, que são ativadas em diferentes graus, dependendo da frequência das oscilações de Ca^{2+} (BERRIDGE et al., 1998).

1.6.3. Remoção e Armazenamento do Cálcio

O Ca^{2+} é indispensável à vida, entretanto, níveis intracelulares elevados deste íon por um longo tempo ocasionam a morte celular (CLAPHAM, 1995). Uma das razões para a manutenção da baixa concentração citoplasmática deste íon é devida à baixa capacidade deste formar complexos solúveis com o fosfato inorgânico, presente no meio intracelular. Por isso, é essencial que os níveis intracelulares de Ca^{2+} sejam mantidos sob estrito controle (DAVILA, 1999).

A concentração de Ca^{2+} no citosol é muito baixa, na ordem de 10^{-7} M, quando comparada com a concentração do meio externo (10^{-3} M) e dos estoques intracelulares (10^{-4} M) (Figura 1.3). Este gradiente é mantido pela saída do íon de forma ativa por meio de bombas de Ca^{2+} presentes na membrana plasmática, no retículo endoplasmático e na mitocôndria, onde cada uma destas membranas possui mecanismos distintos, que atuam modulando a concentração de Ca^{2+} intracelular (KHANNA et al., 1988).

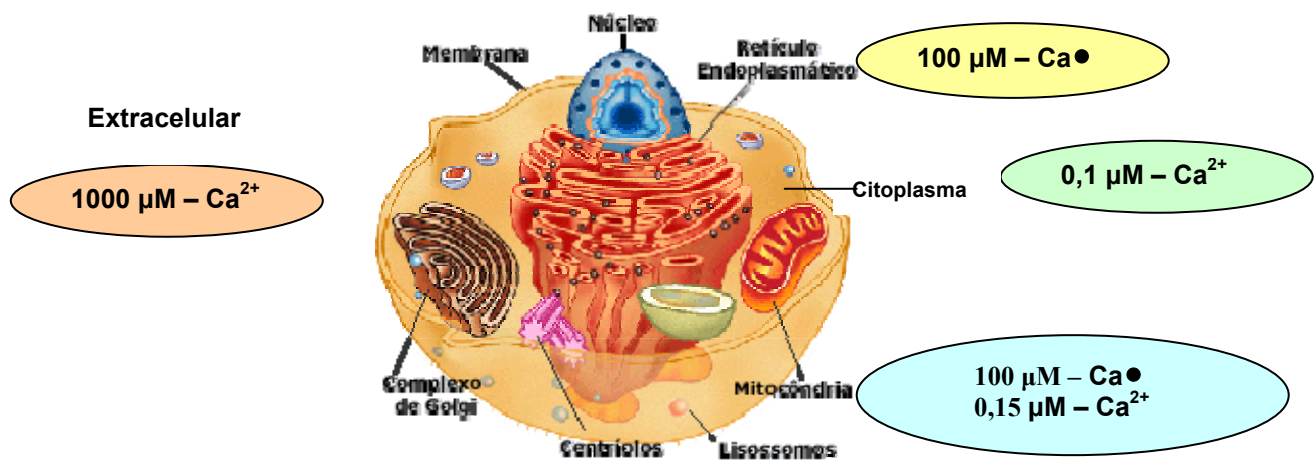


Figura 1.3 - Representação das concentrações de Ca^{2+} nos diferentes compartimentos celulares. Ca^{2+} - cálcio livre; $\text{Ca}\bullet$ - cálcio ligado à proteínas (adaptado de www.invivo.fiocruz.br/celula/celula_animal.htm).

Na membrana plasmática existem, pelo menos, dois tipos de mecanismos que bombeiam o cálcio para fora da célula. O primeiro é o sistema de troca $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$, que utiliza o gradiente de Na^+ através da membrana, que é mantido pela atividade da bomba de Na^+ , para dirigir o efluxo de Ca^{2+} . Este sistema apresenta uma estequiometria de 3 Na^+ para 2 Ca^{2+} . Opera com alta capacidade e baixa afinidade, sendo importante para dirigir grandes quantidades de cálcio para fora da célula, e ocorre principalmente nas células eletricamente excitáveis.

O segundo sistema é a bomba Ca^{2+} -ATPase, que é caracterizado por ter baixa capacidade e alta afinidade. A Ca^{2+} -ATPase transporta Ca^{2+} contra o gradiente de concentração, envolvendo consumo de energia com gasto de ATP. Esta bomba de Ca^{2+} é regulada por diversos fatores sendo que o aumento da concentração citoplasmática do Ca^{2+} leva ao aumento da atividade da bomba, e esta atividade é modulada principalmente através da ativação da Ca^{2+} -calmodulina. Este sistema é importante na manutenção da homeostasia intracelular do Ca^{2+} (PETERSEN et al., 1994).

No retículo endoplasmático a entrada de Ca^{2+} é feita através de uma bomba Ca^{2+} -ATPase, sendo que nesta organela este íon fica ligado à proteínas (CLAPHAM, 1995). A mitocôndria tem um papel secundário na homeostasia do Ca^{2+} celular, e parece que a função restringe-se a um depósito apenas em momentos em que há uma excessiva captação deste íon pela célula. O movimento do Ca^{2+} ocorre através de um gradiente próton eletroquímico na membrana mitocondrial interna (KRAUSS, 2003).

1.6.4. Liberação do Cálcio dos Estoques Internos

A mobilização de Ca^{2+} dos estoques internos ocorre através de dois tipos de receptores que são o receptor de IP_3 , localizado no retículo endoplasmático, e o receptor de rianodina, localizado no retículo sarcoplasmático. Ambos estão ligados ao canal de Ca^{2+} , onde o receptor e canal iônico formam uma única unidade estrutural e podem ser abertos no processo de transdução do sinal.

Em resumo, a liberação de Ca^{2+} dos estoques internos pode ser induzida através das seguintes formas: pelo influxo de Ca^{2+} através dos CCDT da membrana plasmática; pela adenosina difosfato (ADP) ribose cíclica que atua nos receptores de rianodina, como por exemplo nas células pancreáticas e no músculo cardíaco; pela liberação de Ca^{2+} provocada pela adenina dinucleotídeo fosfato; pelos receptores de IP_3 do retículo endoplasmático e por esfingolípídeos e leucotrienos (KRAUSS, 2003).

1.6.5. Influxo de Cálcio da Região Extracelular

O influxo de Ca^{2+} na célula é favorecido pela diferença no gradiente de concentração extra e intracelular, e pelo gradiente elétrico através da membrana. No entanto, o influxo é geralmente baixo na ausência de estímulo externo

(HOSEY; LADZUNSKY, 1988). Este fluxo é passivo, isto é, não requer energia, pois é direcionado pelo gradiente eletroquímico existente na membrana (KOESTER; SIEGELBAUM, 1995). As características destes canais serão discutidas adiante.

Os canais de Ca^{2+} na membrana plasmática são proteínas transmembranares que apresentam poros seletivos para estes íons, e a atividade dos canais seletivos para o Ca^{2+} pode ser modulada por diversos fatores. Estes canais podem ser regulados pela variação do potencial através da membrana, por ligantes específicos, pela fosforilação, pela proteína G, pelo próprio Ca^{2+} intracelular ou pela interrelação destes fatores (HOSEY; LAZDUNSKI, 1988). O aumento do influxo de Ca^{2+} que freqüentemente acompanha a estimulação hormonal sugere que as alterações na permeabilidade sejam um processo essencial na ativação da célula. O influxo de Ca^{2+} como consequência da estimulação por um sinal externo, é requerido em vários tecidos para que ocorra resposta. As principais vias de entrada de Ca^{2+} na célula são:

- através de CCDT;
- canal de Ca^{2+} ligados à receptor;
- canais de Ca^{2+} ativados mecanicamente, que respondem ao estresse mecânico;
- canais de Ca^{2+} dependentes do estoque. São ativados em resposta à depleção dos estoques intracelulares e causam uma entrada capacitativa de Ca^{2+} (KRAUSS, 2003).

1.6.5.1. Canais de cálcio dependentes de tensão

Os CCDT consistem de complexos de uma subunidade formadora de canal α_1 , sensível à variação de tensão, deste modo regulando a abertura, e é onde se ligam os antagonistas. Esta subunidade também contém importantes sítios de fosforilação (HOFMANN et al., 1999). As subunidades auxiliares do CCDT, que

são α_2 , β , δ e γ , regulam as propriedades funcionais da subunidade α_1 (HERLITZE, 2001) (Figura 1.4).

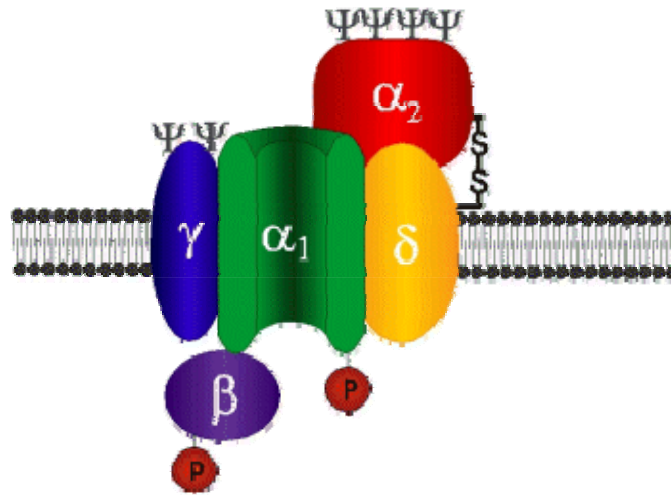


Figura 1.4 - Representação esquemática das subunidades do canal de cálcio dependente de tensão (adaptado de medweb.bham.ac.uk/research/calcium/Homeostasis/VOCC.html).

A atividade dos CCDT é modulada pela variação do potencial transmembrana. Estes canais podem existir em três estados funcionalmente distintos: fechados, abertos ou inativos. Os tipos CCDT diferem entre si pela sensibilidade à tensão, por propriedades cinéticas, pela afinidade a fármacos e pela estrutura. Apesar da predominância do controle do canal ser a modificação do potencial transmembrana, esta sensibilidade pode ser modificada por alguns fatores como: a) a fosforilação do canal (PKA, PKC, tirosina cinases), b) a ligação de uma proteína G (interação das subunidades $\beta\gamma$ da proteína G com a subunidade α_1 do canal de Ca^{2+}), e c) a ligação de fármacos com afinidade específica aos canais (Para revisão ver CATTERALL, 2000).

Os CCDT possuem um papel crítico em converter a atividade celular elétrica em sinais intracelulares de Ca^{2+} . A liberação de hormônios e neurotransmissores de células neuronais e endócrinas, a expressão gênica em muitas células, e a

contração dos músculos liso, cardíaco e esquelético dependem da ativação deste tipo de canal de Ca^{2+} (RIOS; PIZARRO, 1991).

Também, os CCDT podem ser classificados de acordo com as propriedades eletrofisiológicas e/ou farmacológicas em seis classes de correntes designadas L-, N-, P/Q-, R-, T- (TSIEN et al., 1991; HOFMANN et al., 1999). Antes da disponibilidade de toxinas e bloqueadores específicos dos CCDT, o conceito de canais de Ca^{2+} de alta e baixa tensão foi estabelecido em função do potencial transmembrana em que cada canal era ativado (HILLE, 2001). De acordo com a subunidade α_1 , os canais de Ca^{2+} podem ser divididos em três grandes famílias: a) Ca_v1 , da qual faz parte os CCDT do tipo L, b) Ca_v2 , que conduz correntes de Ca^{2+} do tipo N, P/Q e R, e c) Ca_v3 , que conduz correntes de Ca^{2+} do tipo T (Para revisão ver CATTERALL, 2000).

A principal via de entrada de Ca^{2+} nas células é representada pelos CCDT, que em neurônios e outros tipos celulares diferem na localização, propriedades biofísicas, farmacológicas e modulação (OLIVEIRA, 1994).

Canais do tipo L

Canais do tipo L são amplamente distribuídos nos tecidos, particularmente no coração e músculo liso. Estes canais são caracterizados por serem ativados por potenciais transmembrana mais positivo (faixas de alta tensão) e inativados lentamente. Participam da contração muscular, secreção endócrina e transcrição gênica, e são regulados por vias de fosforilação ativadas por segundos mensageiros (para revisão ver CATTERALL, 2000).

Os CCDT são sensíveis a três classes de fármacos:

Fenilalquilaminas: Entre as fenilalquilaminas, o verapamil é o mais utilizado clinicamente pela capacidade de bloquear os canais do tipo L, sendo utilizado principalmente no tratamento de doenças cardíacas (HOCKERMAN, 1997).

Benzodiazepinas: O diltiazem é o composto desta classe mais utilizado clinicamente (DIOCHOT et al., 1995). O bloqueio provocado pelo diltiazem ocorre pela ligação rápida ao estado aberto do canal, além de ligar-se ao estado inativado, preferencialmente (HOCKERMAN, 1997).

Dihidropiridinas: As dihidropiridinas são moduladores alostéricos e podem agir sobre os CCDT do tipo L tanto como agonistas ou antagonistas, isto vai depender da estrutura do fármaco, mas pode depender também do potencial transmembrana, da frequência da estimulação e do estado conformacional resultante do canal (McDONALD et al., 1994). As mais usadas são o Bay K 8644 (agonista) e a nifedipina (antagonista).

Estas três classes de antagonistas dos canais de Ca^{2+} ligam-se em sítios distintos na subunidade α_1 do canal de maneira não competitiva, próximos do poro do canal e do sítio de ligação do Ca^{2+} (GLOSSMANN; STRIESSNIG, 1990).

Canais do tipo T

Estes canais são ativados em potenciais muito negativos, por isso são também chamados de canais ativados por baixa tensão. Causam o fluxo de Ca^{2+} em células excitáveis (neurônios e células musculares), e células não excitáveis (células endócrinas, osteoclastos e células germinativas) (GU et al., 1999; JAGANNATHAN et al., 2002; PEREZ-REYES, 2003). Este tipo de canal de Ca^{2+} está envolvido em muitos eventos celulares, tais como a regulação da proliferação

e diferenciação celular, geração do potencial de ação, síntese de esteróides (LOTSHAW, 2001; FERRON et al., 2002). Entre os bloqueadores para os canais do tipo T encontram-se o amiloride, octanol, o níquel (MORI et al., 1993), a flunarizina (MARINO et al., 2004).

Canais do tipo N

São caracterizado por serem ativados por potencial alto, como o canal do tipo L, com a diferença de serem insensíveis às dihidropiridinas. A atividade destes canais está relacionada com a liberação dos neurotransmissores, ou eventos que se seguem a despolarização do terminal nervoso na transmissão sináptica em neurônios. Estes canais podem também ser modulados por sistemas de segundos mensageiros ligados à membrana, como a proteína G (SPEDDING; PAOLETTI, 1992). São sensíveis à ω -conotoxina, que é produzida pelo molusco marinho *Conus geographus*, sendo altamente seletiva para este tipo de canal (OLIVEIRA et al., 1994). A estrutura molecular do canal tipo N está estabelecida, apresentando homologia de 3 subunidades com o canal do tipo L: α_1 , α_2 e β (MORI et al., 1993).

Canais do tipo P/Q e tipo R

Os canais do tipo P foram inicialmente descritos baseando-se em correntes nas células cerebrais de Purkinje resistentes às dihidropiridinas e as conotoxinas e mais tarde foram descritos em diversos neurônios centrais e periféricos. A ω -agatoxina IVA é uma toxina que está presente no veneno de aranha, é um bloqueador altamente específico dos canais tipo P/Q. Esta toxina requer o estado aberto do canal para ter acesso ao sítio de ligação e quando liga, inativa-o (OLIVEIRA et al., 1994). Estes canais são ativados por alta tensão. Os canais de cálcio que contém uma subunidade $Ca_v2.1\alpha_1$ são responsáveis pelas correntes de cálcio tanto do tipo P quanto do tipo Q (HERLITZE et al., 2000)

D'agostino e colaboradores (1992) demonstraram a presença de CCDT sensíveis à nifedipina, nicardipina e ω -conotoxina em cultura de células de Sertoli. Também, Laleveé e colaboradores (1997) caracterizaram a presença de CCDT do tipo T nas células de Sertoli.

1.6.5.2. Canais de cálcio ligados ao receptor

A atividade dos canais de Ca^{2+} ligados ao receptor está relacionada com a ativação direta do canal iônico através da ligação do receptor com o agonista e, ao que parece, ocorre de forma independente da voltagem (DOLPHIN, 1991). Além desta ativação direta, estes canais podem ser regulados por intermédio de uma proteína G, ou por eventos de fosforilação e desfosforilação do canal (XIONG et al., 1994; CLAPHAM, 1995).

Tanto o Ca^{2+} intracelular, como o extracelular podem contribuir para aumentar a concentração citosólica provocada por estímulo externo. Os estoques intracelulares podem influenciar os sinais provocados pela entrada de Ca^{2+} por seqüestrar o Ca^{2+} que entra, por regular a entrada capacitativa de Ca^{2+} (PUTNEY, 1990) ou ainda pela capacidade de aumentar a concentração de Ca^{2+} citosólico, exercendo efeitos estimulatórios e inibitórios na entrada de Ca^{2+} (BERRIDGE, 1995). A entrada deste íon também pode ser influenciada pelos estoques intracelulares, pois tanto os receptores de rianodina quanto os de IP_3 são regulados pela concentração citosólica do íon. A capacidade dos receptores rianodina e de IP_3 em mediar a liberação de Ca^{2+} induzida pelo próprio íon permitem amplificar os sinais do Ca^{2+} sustentada pela entrada ou mobilização interna (BERRIDGE, 1997). Definir os sinais que regulam cada canal de Ca^{2+} , a interação entre as várias origens e os mecanismos responsáveis pela

subseqüente remoção, são importantes elementos para entender mudanças complexas na concentração de Ca^{2+} que ocorrem pela ativação de receptores e os meios que a célula usa para codificá-los.

Muitos hormônios aumentam a $[\text{Ca}^{2+}]_i$, via liberação dos estoques internos e/ou influxo. Este aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ estimulado por hormônios regula muitos processos celulares, incluindo a neurotransmissão, fertilização e transcrição (WOOTTON et al., 2004).

A testosterona, por exemplo, estimula o transporte de Ca^{2+} em células de Sertoli e este efeito é independente da idade (LEITE et al., 1999). O retinol (WASSERMANN et al., 1995), o FSH (GRASSO e REICHERT, 1989; 1990) e o isoproterenol (LOSS et al., 1998) também estimulam o transporte de cálcio e produzem mudanças no potencial elétrico nestas células.

Em miócitos de ratos o T_3 aumenta o cálcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) em poucos minutos. Efeitos similares deste hormônio envolvendo o transporte de Ca^{2+} na membrana ou a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ foram demonstrados em células hepáticas e hemácias de ratos (FALKENSTEIN et al., 2000).

1.7. PROTEÍNAS CINASES

Recentes pesquisas enfatizam a integração de diferentes componentes da rede de transdução de sinais em células eucarióticas. A fosforilação de proteínas tem um importante papel regulador em muitos processos celulares, é o principal evento de transdução do sinal (HUNTER, 1994). Muitas cinases modulam a atividade dos CCDT, das quais pode-se citar a PKA e PKC.

1.7.1. Proteína Cinase Dependente de AMPc

A PKA é o principal alvo do segundo mensageiro AMPc. Está envolvida com a regulação do metabolismo do glicogênio, lipídeos e açúcares, também tem um papel importante na regulação de canais iônicos (KRAUSS, 2003). Esta cinase consiste de duas subunidades regulatórias e duas subunidades catalíticas, formando um heterotetrâmero inativo. Quando cada subunidade regulatória liga-se a duas moléculas de AMPc, causa a liberação das subunidades catalíticas ativas (para revisão ver GRAY et al., 1997).

A atividade da PKA é regulada por mudanças na concentração de AMPc, fosforilação dos resíduos de serina/treonina presentes na subunidade catalítica, ligação de proteínas inibidoras, e pelas proteínas ancoradoras da PKA (KRAUSS, 2003). A PKA está muitas vezes ancorada próxima ao substrato pelas proteínas ancoradoras da PKA que liga-se a cinase através da interação com a subunidade reguladora da enzima (RUBIN, 1994) e a potencialização da atividade dos CCDT requer a PKA ancorada (GRAY et al., 1997; JOHNSON et al., 1997).

Uma grande variedade de proteínas, incluindo enzimas, receptores de membrana, canais iônicos, e fatores de transcrição, são substratos da PKA, com atividade modulada reversivelmente por fosforilação e desfosforilação (HARPER et al., 1985).

Vários estudos demonstram a ativação de CCDT através da fosforilação por PKA (GAO et al., 1997; GRAY et al., 1998; BENCINA et al., 2005). Outros trabalhos mostram a ativação da PKA por HT. Lin e colaboradores (1997), demonstraram em células HeLa, que o hormônio T₄ induziu um aumento no efeito antiviral do interferon gama humano (IFN- γ) de maneira dependente de PKC e PKA. Outro estudo mostra que a ativação da PKA por T₄ modula a transdução do sinal da MAPK na transcrição gênica (LIN et al., 2001). Ainda, a diferenciação

morfológica e a maturação de astrócitos por T_4 requer a ativação da PKA (GHOSH et al., 2005).

1.7.2. Proteína Cinase C

A PKC possui um papel central no sinal de transdução de hormônios, neurotransmissores, fatores de crescimento, antígenos, e outros ligantes. Está envolvida na transmissão sináptica, memória, aprendizado, crescimento celular, diferenciação, metabolismo, contração, exocitose, expressão gênica e na regulação da atividade de canais iônicos (NAOR et al., 1998). Entre os cofatores necessários para a ativação da cinase pode-se citar o Ca^{2+} , diacilglicerol (DAG), e os fosfolípides tais como a fosfatidilcolina. Em função do requerimento de cofatores para a ativação, a PKC pode ser dividida em três grupos: a PKC clássica ou convencional, a nova, e a atípica (KRAUSS, 2003).

A ativação da PKC por HT está relacionada com a estimulação do transportador Na^+/H^+ em mioblastos de ratos (INCERPI et al., 1999), bem como, com o aumento da atividade da Ca^{2+} -ATPase na membrana plasmática de vários tipos celulares (GALO et al., 1981; WARNICK et al., 1993; DAVIS et al., 1995).

Babenko e colaboradores, (1991), revelaram que o $L-T_4$ desencadeou a ativação e a translocação da PKC do citosol para frações da membrana. Além disso, estes pesquisadores demonstraram pela primeira vez, um efeito da tiroxina na ativação não-genômica da fosfolipase C e D, da PKC e no acúmulo de DAG. Evidências diretas da ativação da PKC por HT também foi demonstrado em eritrócitos de coelhos (LAWRENCE et al., 1989).

2 JUSTIFICATIVA

Os trabalhos realizados por Silva e colaboradores (2001) e Menegaz e colaboradores (2006) demonstraram que os HT estimulam o transporte do aminoácido neutro [^{14}C]-MeAIB, um evento essencialmente de membrana plasmática, em testículos de ratos imaturos e, este efeito é bloqueado por inibidor de CCDT (Ca^{2+} externo). As iodotironinas também causam uma hiperpolarização imediata em células de Sertoli de ratos imaturos. Na ação hiperpolarizante do T_3 há o envolvimento do Ca^{2+} externo e a parcial participação dos canais de K^+_{ATP} . Por outro lado, no efeito hiperpolarizante do T_4 está envolvido os canais de K^+ dependentes da tensão e, os canais de K^+ dependentes de Ca^{2+} são fundamentais para o completo efeito hiperpolarizante do hormônio.

Tendo em vista que o efeito hiperpolarizante dos HT ocorre devido a saída de íons K^+ ou entrada de Cl^- na célula, e que a ação hiperpolarizante do T_3 e T_4 envolve o K^+ , bem como, o Ca^{2+} externo, é relevante o estudo específico da participação dos canais de Cl^- no potencial transmembrana e no influxo de Ca^{2+} . Estes fatos justificaram o desenvolvimento dos objetivos abaixo.

3 OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do trabalho aqui apresentado foi estudar o mecanismo iônico a das vias de sinalização não-genômicas envolvidas na transdução de sinais de iodotironinas em testículos de ratos imaturos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudar o envolvimento dos canais de Cl^- no efeito hiperpolarizante do T_4 em células de Sertoli de ratos imaturos.
2. Estudar o efeito dos HT na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em testículos de ratos imaturos.
3. Estudar o envolvimento dos CCDT do tipo L e T, na ação estimulatória do T_4 na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em testículos de ratos imaturos.
4. Estudar o envolvimento dos canais de K^+ dependentes de Ca^{2+} e canais de Cl^- na ação estimulatória do T_4 na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em testículos de ratos imaturos.
5. Estudar o envolvimento da PKA e PKC na ação estimulatória do T_4 na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em testículos de ratos imaturos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Em todo este estudo, as unidades de medidas foram padronizadas de acordo com o sistema internacional de unidades (SIU).

4.1. MATERIAIS

4.1.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos de 10 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os filhotes eram mantidos com as mães até o momento do experimento. Os animais foram submetidos a um ciclo claro/escuro (luzes acesas das 7 às 19 horas), em salas climatizadas com temperatura controlada, ração padronizada e água *ad libitum*. Todos os animais foram cuidadosamente monitorados e mantidos segundo as recomendações do Conselho de Medicina Veterinária e do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Protocolo nº 323/CEUA-UFSC).

4.1.2. Soluções Utilizadas

4.1.2.1. Tampão Krebs Ringer-bicarbonato

A solução tampão Krebs Ringer-bicarbonato (KRb) foi utilizada como meio de incubação em todos os experimentos, sendo preparado imediatamente antes da realização dos experimentos. Todos os reagentes eram de pureza “pró-análise”

(P.A) da E. Merck (Darmstadt, Alemanha). O preparo da solução foi realizado a partir de soluções estoques conforme tabela 4.1.

Tabela 4.1: Composição salina e concentração na solução estoque de KRb (mM)

CaCl ₂ . H ₂ O - Cloreto de cálcio	2,50
KH ₂ PO ₄ - Fosfato de potássio monobásico	1,19
MgSO ₄ . H ₂ O - Sulfato de magnésio	0,76
NaHCO ₃ - Bicarbonato de sódio	25,0
NaCl - Cloreto de sódio	118,0
KCl - Cloreto de potássio	4,61
C ₆ H ₁₂ O ₆ - Glicose	5,5

No preparo da solução tampão, foram adicionados volumes iguais de cada solução, sendo o sulfato de magnésio e o cloreto de cálcio adicionados por último e completado o volume com água destilada. Logo após, a solução era gaseificada com carbogênio (O₂: CO₂, 95:5, v/v) até que o pH atingisse o valor de 7,4 monitorado através de um pH-metro. A solução assim obtida era mantida em gelo durante toda a preparação do experimento.

A tabela 4.2 apresenta as concentrações iônicas obtidas no final da preparação de KRb e os valores encontrados nos líquidos intracelulares e extracelulares (LONG, 1961).

Tabela 4.2: Concentrações iônicas do KRb no líquido intra e extracelular

Meio (mEq/L)	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	HCO ⁻³	HPO ⁴	Cl ⁻	SO ⁻⁴
Extracelular	140-145	4-5	2,5	1,5	27	1,0	100	-
Intracelular	10	145-150	2,0	4,0	8	65-70	5-20	-
KRb	146	4,7	2,5	1,2	25	1,2	127	1,2

4.1.2.2. Solução de cloreto de lantânio

Foi utilizada a solução de cloreto de lantânio (LaCl_3) 10 mM a 2 °C, técnica relatada por Batra e Sjögren (1983), com algumas modificações, para a interrupção do fluxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ao final de cada incubação. O HEPES foi obtido da SIGMA, o cloreto de lantânio da VETEC Química Fina Ltda e o restante dos sais utilizados para a preparação da solução de LaCl_3 foram obtidos da Cromato Produtos Químicos. A tabela 4.3 apresenta a composição e a concentração salina presente na solução de cloreto de lantânio.

Tabela 4.3: Composição e concentração salina presente na solução de cloreto de lantânio

Concentração final dos sais na solução (mM)	
NaCl - Cloreto de sódio	127,5
KCl - Cloreto de potássio	4,6
LaCl_3 - Cloreto de lantânio	10
MgSO_4 - Sulfato de magnésio	1,2
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ - Glicose	11

Para o preparo da solução de LaCl_3 , quantidades definidas de cada componente foram misturadas e completou-se o volume com água de Milli Q e o pH foi ajustado para 7,3 com NaOH 0,1N.

4.1.3. Substâncias Utilizadas

- **Tiroxina (L-T₄)**

Adquirido da SIGMA, pesado e dissolvido em NaOH 0,02 N. A solução estoque foi posteriormente diluída em KRb no momento do experimento, até atingir a concentração final desejada.

- **3,5,3'-triiodo-L-tironina (L-T₃)**

Adquirido da SIGMA, pesado e dissolvido em NaOH 0,02 N. A solução estoque foi posteriormente diluída em KRb no momento do experimento, até atingir a concentração final desejada.

- **Ácido carboxílico 9-Antraceno (9-AC)**

É um antagonista de canais de cloreto. Foi adquirido da SIGMA, pesado e dissolvido em etanol, sendo que a concentração final do etanol foi de 0,5%, posteriormente diluído em KRb no momento do experimento.

- **Nifedipina**

É um fármaco antagonista dos CCDT tipo L. Foi adquirida da SIGMA. Pesada e diluída em KRb no momento do experimento.

- **Flunarizina**

É um fármaco antagonista dos CCDT tipo T. Foi adquirida da SIGMA. Pesada e dissolvida em *tween*, sendo que a concentração final de *tween* foi menor que 0,1%. A solução estoque de flunarizina foi posteriormente diluída em KRb no momento do experimento.

- **KT 5720**

É um inibidor de PKA. Foi adquirido da SIGMA. Pesado e dissolvido em DMSO, sendo que a concentração final de dimetilsulfóxido foi de 0,1%. A solução

estoque de KT 5720 foi posteriormente diluída em KRb no momento do experimento.

- **Cloreto de esteroilcarnitina**

É um inibidor de PKC. Foi adquirido da SIGMA. Pesado e diluído em etanol, sendo que a concentração final de etanol foi menor de 0,1%. A solução estoque de cloreto de esteroilcarnitina foi posteriormente diluída em KRb no momento do experimento.

- **Apamina**

É um antagonista específico para canais de K^+ dependente de Ca^{2+} . Obtida da SIGMA na forma líquida. Diluída no momento do experimento em KRb.

- **Líquido de cintilação**

Para a contagem da radioatividade das amostras utilizou-se o líquido de cintilação Optiphase Hisafe III adquirido pela BioAgency, São Paulo, Brasil.

- **Cálcio radioativo ($^{45}Ca^{2+}$)**

Atividade específica 8,67 μ Ci/mL adquirido da Du Pont–NEM Research Products. Em cada amostra foi adicionado 0,2 μ Ci/mL. A meia vida é de 163 dias, e o decaimento era calculado a partir de uma tabela fornecida pela DuPont-NEM Research Products, em função da data de fabricação.

4.1.4. Equipamentos utilizados

- **Espectrômetro de cintilação**

Foi utilizado o espectrômetro de cintilação líquida, com eficiência de 85 a 90%, para contagem da radioatividade (do departamento de Farmacologia – UFSC), modelo LKB 1209, Rack-Beta.

4.1. MÉTODOS

4.2.1. Eletrofisiologia

4.2.1.1. Preparação dos túbulos seminíferos

Foram utilizados túbulos seminíferos de testículos de ratos Wistar imaturos de 14 dias de idade. Os ratos foram sacrificados por deslocamento cervical e os testículos foram removidos imediatamente e decapsulados. Os túbulos seminíferos foram isolados e mantidos em KRb a 4 °C até o início do experimento. Um grupo de 3 a 6 túbulos foi fixado em uma câmara de perfusão, através da qual fluía KRb, pH 7,4, enriquecido com glicose 0,005 M, num fluxo de 1 mL/min. O volume de KRb na câmara era de aproximadamente 4 mL. Esse meio era mantido a 32 °C (através de um sistema termostatizado, que mantinha um fluxo de água através da câmara), equilibrado com carbogênio (O₂: CO₂; 95:5 v/v). A câmara foi montada sob um microscópio invertido, o qual foi utilizado para o controle visual do empalamento celular. A preparação foi fixada por uma tela de prata, onde após a estabilização, uma célula de Sertoli foi penetrada com uma micropipeta de vidro e registrada intracelularmente sob controle visual (WASSERMANN et al., 1990, 1992a; LEITE et al., 1999).

4.2.1.2. Preparação do microeletrodo

A técnica de registro intracelular utiliza um microeletrodo, feito a partir de uma micropipeta de vidro de borossilicato, com filamento interno e com diâmetro externo de 1,2 mm. Essa micropipeta foi preparada em um estirador de pipeta horizontal. O processo de estiramento consiste de duas etapas: estiramento lento e estiramento rápido. A intensidade do calor e a força de tração podem ser reguladas independentemente e foram fixadas apropriadamente por tentativa e erro. Esses parâmetros permitiram que a ponta da micropipeta fosse menor que

0,5 μm de diâmetro (aproximadamente 0,25 μm). A resistência da ponta, medida através do eletrômetro, foi em torno de 10-25 mega Ohms ($\text{M}\Omega$) (SILVA et al., 2001; VOLPATO et al., 2004; MENEGAZ et al., 2006).

Após a preparação da micropipeta para o empalamento, essa foi preenchida com uma solução de KCl 2,5 M. Um eletrodo de prata cloretado também preenchido com a solução de KCl faz contato elétrico com a micropipeta. Esse eletrodo de registro é então conectado a um eletrômetro e controlado mecanicamente por um macro e micromanipulador hidráulico, preenchido com água, capaz de movimento fino sobre os três eixos. Além do microeletrodo de registro, um outro eletrodo (eletrodo de referência) foi colocado dentro do banho de perfusão, do lado de fora do túbulo e conectado do mesmo modo ao eletrômetro. Esse eletrodo é também preenchido com KCl e contém um fio de prata cloretado (Ag/AgCl), soldado a um fio terra e inserido dentro de uma ponte de ágar de aproximadamente 5 cm de comprimento, a qual está em contato direto com o banho de perfusão (SILVA et al., 2001).

A fim de se obter um potencial estável durante o experimento, e que este não seja alterado pela passagem de pequenas correntes, é importante cloretar o fio de prata deixando-o imerso por uma a duas horas em água sanitária. Esse procedimento assegura um “eletrodo reversível”. A função do AgCl na reação reversível $\text{Ag} + \text{Cl}^- \leftrightarrow \text{AgCl} + \text{e}^-$ é servir de “estoque” de íons de cloreto em forma sólida, pronto a ser usado caso a reação prossiga para a esquerda.

Foi utilizado ágar da SIGMA, diluído em 2,5 M KCl a 2,5 % e fervido até ser totalmente dissolvido no KCl. A solução, ainda quente, foi colocada com uma seringa em um tubo de plástico adaptado onde foi inserido o fio de prata previamente cloretado. Após resfriada, a ponte de ágar foi então colocada no banho de perfusão e o fio foi conectado ao terminal “terra” do eletrômetro. O propósito da ponte foi manter o eletrodo de referência a uma distância segura das

variações na temperatura ou composição da solução de KRb. Após o preparo dos microeletrodos, utilizando-se o micromanipulador, uma célula foi empalada e através do eletrodo de registro, foi registrado o Em (SILVA et al., 2001; VOLPATO et al., 2004; MENEGAZ et al., 2006). Nas figuras 4.1 e 4.2 estão mostrados o equipamento eletrofisiológico e um grupo de túbulos seminíferos seguros por uma tela de prata, respectivamente.



Figura 4.1 - Disposição da câmara de perfusão e do microeletrodo para o registro intracelular.

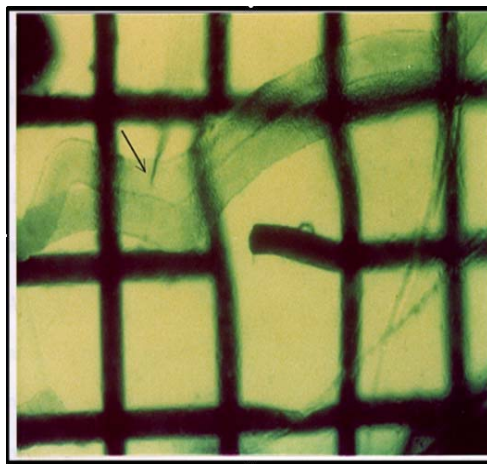


Figura 4.2: Grupo de túbulos seminíferos seguros por uma tela e visualizados no microscópio invertido.

4.2.1.3 Administração de fármacos

Após o empalamento da célula, o hormônio T_4 na concentração de 10^{-5} M e/ou antagonista do canal de cloreto, 9-AC, em diferentes concentrações (10^{-6} a 10^{-4} M), foram adicionados na câmara de perfusão através de uma micropipeta marca Gilson. Antes da realização de cada experimento, KRb foi adicionado às preparações como controle e para certificar-se que era célula de Sertoli foi adicionado o T_4 . Com o método empregado para o empalamento celular, foram obtidas médias do Em das células de Sertoli. O fármaco foi diluído em KRb mantendo-se o pH do meio em 7,4. O empalamento celular foi monitorado na tela do osciloscópio ou no monitor do computador. O Em e as mudanças desse potencial evocadas por hormônio e antagonista, foram quantificados digitalizando o sinal em arquivos de 2500 amostras, com um osciloscópio digital Tektronix modelo THS 720 TekScope (frequência de amostragem 250 Hz, resolução de 8 bits) e por anotações de 5 em 5 segundos. O sinal referente à tensão transmembrana, medido através do osciloscópio, foi acometido por vários ruídos de grande amplitude, tornando impossível a utilização deste registro para qualquer análise da relação entre as alterações no potencial transmembrana e a ação do hormônio. Buscando a solução para o problema descrito, foi estabelecida uma parceria com o Instituto de Engenharia Biomédica (IEB) da UFSC que possibilitou a investigação de um método de filtragem do sinal.

4.2.1.4. Filtragem do potencial transmembrana (V_m)

Os elementos mais simples dos sinais são senos e cossenos. E todas as curvas são formadas por somas de senos e/ou cossenos de diferentes frequências (Smith, 1997). Através da transformada de Fourier (FFT – *Fast Fourier Transform*) é possível identificar as frequências que compõem um determinado sinal.

A Figura 4.3 apresenta duas funções seno com frequências diferentes. Em (A) a frequência é de 1 Hz, significando que durante um segundo há apenas um período. Já em (B) a frequência da função é equivalente a 30 Hz, resultando em 30 períodos no intervalo de 1 segundo.

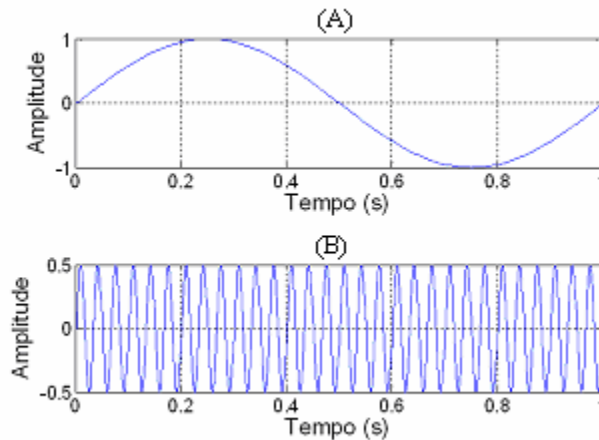


Figura 4.3 - Funções seno com frequências diferentes. Em (A) $f_1 = 1$ Hz e em (B) $f_2 = 30$ Hz.

A soma das duas funções ilustradas acima resulta no sinal apresentado na figura 4.4. Logo, este sinal (S) é composto por duas funções de frequências diferentes.

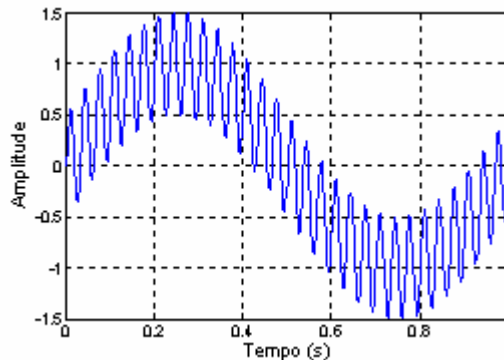


Figura 4.4 - Sinal obtido através da soma de duas funções seno com frequências diferentes.

Os filtros são funções matemáticas que quando aplicados a um sinal eliminam uma determinada faixa de frequência que compõe o mesmo. Os filtros podem ser divididos em várias classes dependendo das suas características. Um filtro é dito passa-baixa quando remove do sinal todas as frequências acima da frequência estabelecida (frequência de corte, f_c). Já o filtro passa-alta, remove do sinal as componentes de frequência inferior à frequência de corte. Há ainda os filtros passa-faixas que atuam removendo as componentes cujas frequências não pertencem a uma faixa estabelecida.

Desta forma, se fosse aplicado um filtro passa-baixa com frequência de corte de 20 Hz, o sinal de saída deste filtro teria apenas a componente de 1 Hz, mostrado na figura 4.3 (A). Se em outro caso, fosse utilizado um filtro passa-alta, com a mesma frequência de corte, o sinal obtido seria o mostrado na figura 4.3 (B).

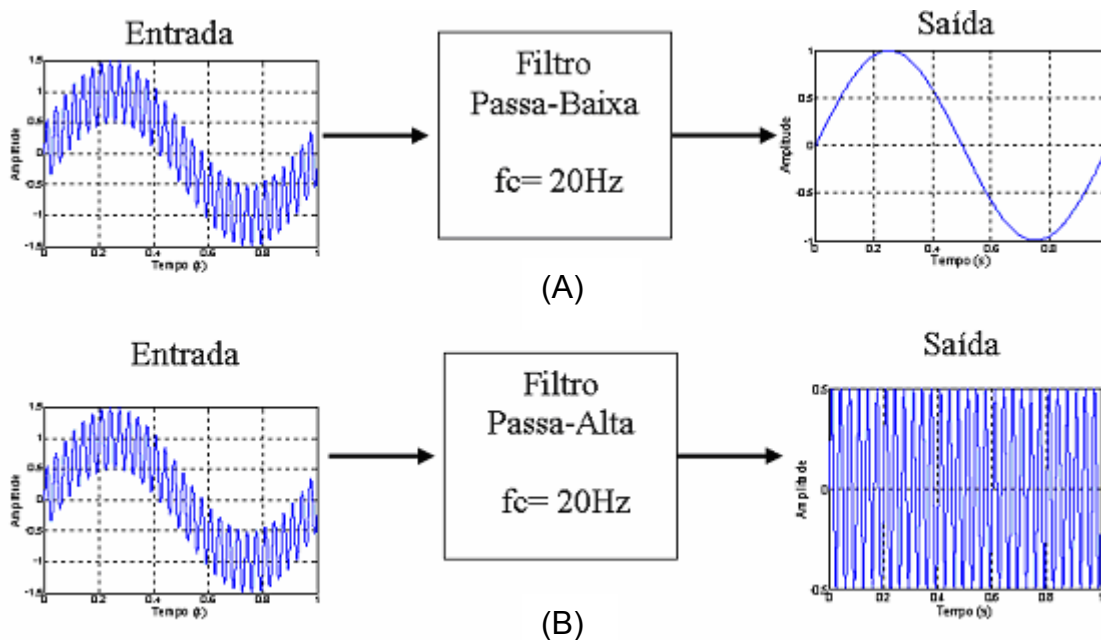


Figura 4.5 - (A) Filtro passa-baixa de 20 Hz. (B) Filtro passa-alta de 20 Hz.

Pode-se verificar na figura 4.5 que na saída tem-se apenas curvas com uma única frequência (HAYES, 1999).

Os filtros geralmente são aplicados para restaurar um sinal corrompido por ruídos (componentes indesejados captados juntamente com o sinal). Estes fazem com que o sinal apresente distorções, prejudicando a análise das informações registradas.

Inicialmente, para a filtragem do sinal obtido pelos registros deste estudo, foram aplicadas técnicas convencionais (filtro mediana, média móvel e operadores morfológicos). Contudo, os resultados obtidos apresentavam baixa eliminação do ruído, atenuação da deflexão do potencial transmembrana obtida com a ação do hormônio, e alguns métodos introduziam um atraso entre o evento anotado e o sinal filtrado. Os pontos marcados na figura 4.6 são os menores valores obtidos pelos filtros citados. Após vários experimentos e investigações, foi utilizada uma técnica híbrida que combina dois algoritmos de filtragem para eliminar o ruído, produzindo os resultados apresentados no decorrer do trabalho. A tabela 4.4 apresenta os erros decorrentes da aplicação de alguns dos métodos de filtragem.

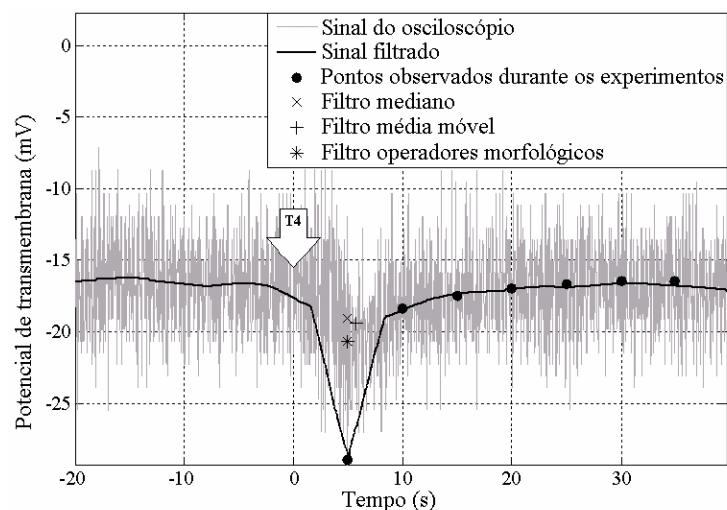


Figura 4.6 - Medição intracelular do potencial transmembrana das células de Sertoli no tempo. A seta indica o momento da administração de T_4 (10^{-5} M). Os pontos marcados correspondem aos dados obtidos através da observação no eletrômetro.

Tabela 4.4: Erro na menor amplitude de flexão de Em (comparado com valores medidos no eletrômetro) medições entre diferentes filtros são mostrados na figura 4.6.

Filtros	Em* (mV)	Erro (%)
Mediana	-19,025	34,4
Média móvel	-19,461	32,9
Operadores morfológicos	-20,645	28,8
Híbrido	-29,076	0,3
Anotações do eletrômetro	-29,000	0,00

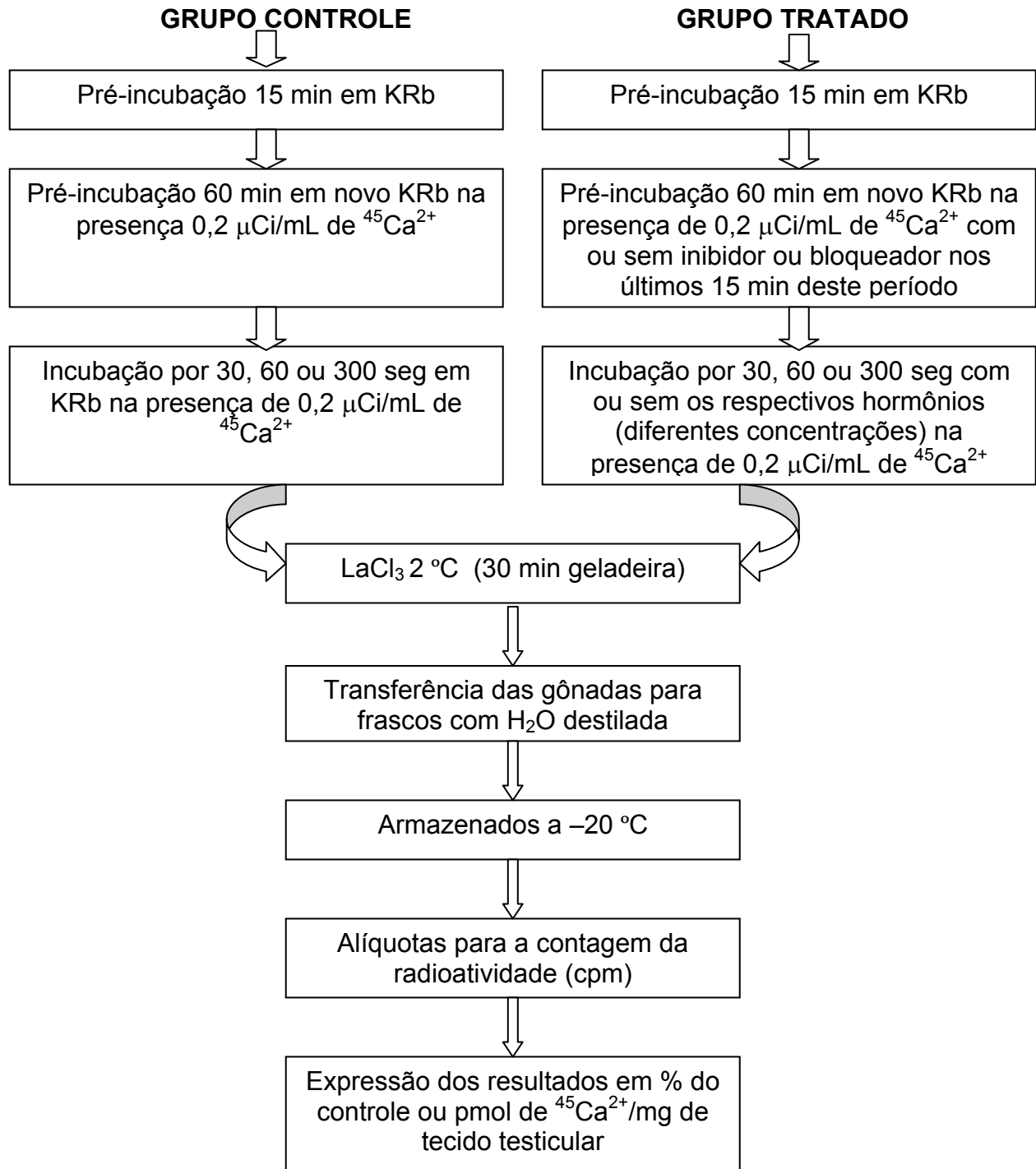
* Potencial transmembrana

4.2.2. Captação de Cálcio

Foram utilizados ratos Wistar machos imaturos (10 dias) para a realização dos experimentos. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os testículos removidos por incisão abdominal. As gônadas foram então pesadas e a túnica albugínea foi retirada. Um testículo foi separado para controle (alternadamente direito/esquerdo) e o contralateral tratado. Durante a obtenção dos testículos, estes foram mantidos em papel filtro umedecido com solução tampão KRb, e acondicionados em placas de Petri mantidas no gelo (SILVA et al., 2001).

Posteriormente, as gônadas foram pré-incubadas 15 minutos em KRb. Após, houve uma segunda pré-incubação de 60 minutos (JACOBSEN, 2003) em KRb fresco na presença de 0,2 $\mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em banho metabólico (Quimis), sob agitação em atmosfera carbogênica ($\text{O}_2:\text{CO}_2$, 95:5 v/v), pH 7,4; a 32 °C, para atingir o equilíbrio entre influxo e efluxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ nos testículos. Então, os testículos foram incubados em diferentes tempos com T_3 ou T_4 , e em diferentes concentrações nas mesmas condições das pré-incubações. Quando foram usados

os inibidores e antagonistas, estes foram adicionados 15 minutos antes da incubação com os HT, ou seja, 15 minutos antes de acabar a segunda pré-incubação. Após a incubação, a captação de cálcio foi interrompida pela transferência dos testículos para tubos com 1 mL de solução de cloreto de lantânio a 2 °C (10 mM), e assim permaneciam na geladeira por 30 minutos (BATRA; SJÖGREN., 1983). Para a remoção do excesso de cálcio radioativo na superfície da amostra, os testículos foram secados em papel filtro umedecido com solução de LaCl_3 e acondicionados em tubos com 1 mL de água destilada. Os testículos foram congelados à -20 °C e posteriormente fervidos por 5 minutos, para romper a membrana celular e obter o equilíbrio entre o líquido intracelular e a água adicionada. Desse meio, assim como da solução de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ utilizado para as incubações, foram retiradas alíquotas de 100 μL para a contagem do radioativo, obtido em contagens por minuto (cpm) num espectrômetro de cintilação líquida LKB (Rack- Beta). O valor em cpm foi convertido em pmoles de cálcio por mg de tecido testicular de acordo com o decaimento da atividade específica do $^{45}\text{Ca}^{2+}$ fornecida pelo fabricante e então este valor foi convertido para porcentagem do controle ($276,3 \pm 21,56$ pmoles de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ /mg de tecido testicular; n= 40) (Fluxograma 4.1).



Fluxograma 4.1 – Representação esquemática do procedimento experimental para o estudo da captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$.

4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados experimentais foram expressos como a média \pm E.P.M. As comparações entre os grupos foram realizadas através da análise da variância de uma via (ANOVA) seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Utilizou-se o programa GraphPAD INSTAT, versão 3.0. As diferenças encontradas entre dois grupos foram feitas através do teste “t” de Student. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para um “p” igual ou menor do que 0,05 (SNEDECOR; COCKRAN, 1973).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No mecanismo típico genômico, os HT ligam-se a receptores nucleares específicos, modulam a transcrição gênica e desenvolvem respostas biológicas dentro de minutos, horas ou dias. No entanto, os efeitos não-genômicos iniciados na membrana plasmática de células alvo ocorrem dentro de segundos a minutos e envolvem, a princípio, a modulação da atividade de canais iônicos, cinases e fosfatases e vias de transdução de sinais específicos.

Os protocolos experimentais utilizados neste trabalho para estudar as respostas rápidas dos HT em testículos de ratos imaturos foram a eletrofisiologia (estudo do potencial transmembrana) e a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, visto que estes parâmetros compõem um sistema de eventos mensuráveis num período muito curto e, essencialmente iniciam na membrana plasmática.

5.1. PARTE I: ELETROFISIOLOGIA

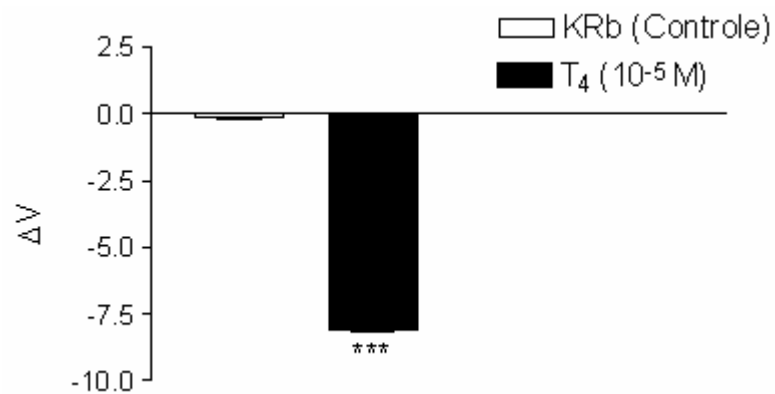
Este modelo experimental foi usado com o objetivo de detectar a participação dos canais de Cl^- no mecanismo da ação hiperpolarizante do T_4 , através da utilização de um bloqueador deste canal. Para certificar-se que o efeito observado era de fato em célula de Sertoli, T_4 era adicionado à preparação. Se o efeito hiperpolarizante era verificado, seguia-se o experimento com uma lavagem de 5 minutos com KRb e então, a adição do antagonista e/ou após 30 segundos a adição do hormônio. Uma alíquota de KRb era adicionada à preparação como controle de modo semelhante às outras substâncias adicionadas ao meio.

As variações do potencial transmembrana foram visualizadas utilizando-se um eletrômetro e anotadas de 5 em 5 segundos, também houve o registro do sinal através de osciloscópio digital. A técnica de registro do sinal tem como vantagem, em relação às anotações, a observação contínua da dinâmica da variação do potencial transmembrana produzida por hormônio e/ou bloqueadores, uma vez que as anotações são feitas em intervalos de tempo.

5.1.1. Efeito Hiperpolarizante do T_4 em Células de Sertoli de Ratos Imaturos

A figura 5.1(A) mostra a ação hiperpolarizante do T_4 10^{-5} M em células de Sertoli, onde a variação do potencial transmembrana foi anotada de 5 em 5 segundos. Pode-se observar que o T_4 apresentou um efeito hiperpolarizante com variação do potencial transmembrana (ΔV) em torno de -8 mV. A figura 5.1(B) mostra o primeiro registro do sinal da ação hiperpolarizante do T_4 através desta técnica. Nota-se que o efeito hiperpolarizante foi imediato, com o pico da variação do potencial transmembrana de -8 mV em 5 segundos, e após 20 segundos, o potencial transmembrana voltou ao estado de repouso.

(A)



(B)

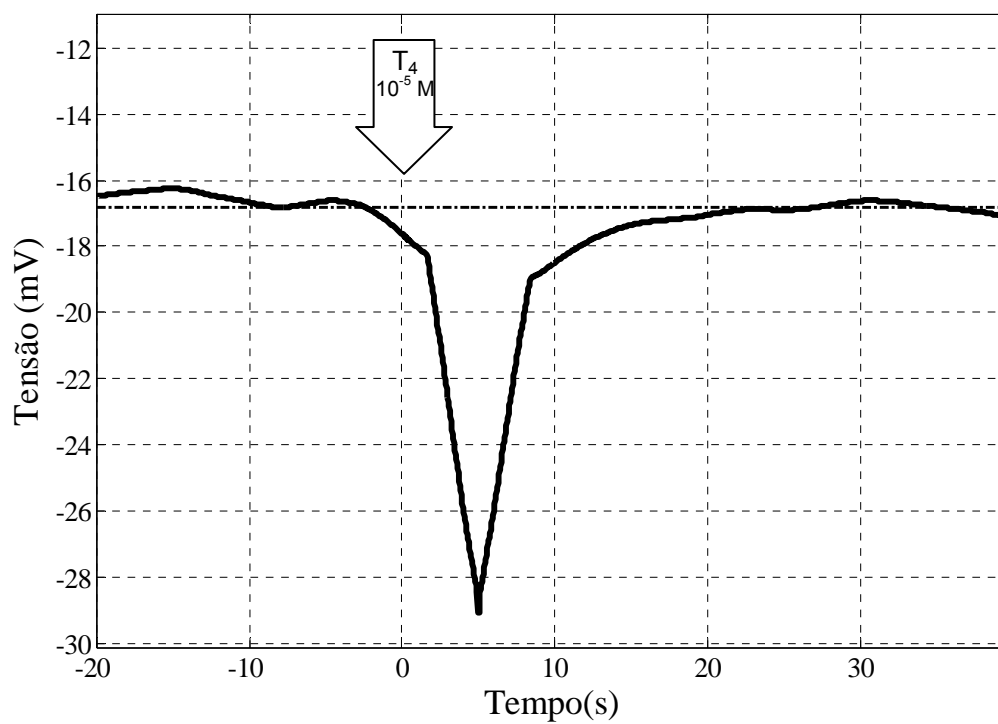


Figura 5.1 – Efeito hiperpolarizante do T_4 (10^{-5} M) no potencial transmembrana de células de Sertoli. (A) Variações do potencial transmembrana anotadas de 5 em 5 segundos. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M.; $n=16$. *** $P \leq 0,001$ em relação ao controle (KRb). (B) Registro do efeito hiperpolarizante do T_4 (10^{-5} M) no potencial transmembrana de células de Sertoli.

A hiperpolarização da célula caracteriza-se pelo surgimento de um potencial transmembrana mais negativo, que ocorre através de alterações do fluxo iônico pela abertura e/ou fechamento de canais iônicos. O efeito hiperpolarizante pode acontecer devido a saída de íons K^+ e/ou entrada de Cl^- , ou ainda devido ao fechamento de canais de Na^+ ou Ca^{2+} antes abertos (HERNADEZ-GONZALEZ et al., 2005). Estes eventos podem ocorrer pela ação direta de hormônios e/ou fármacos nos canais iônicos, ou então através da ação de segundos mensageiros.

Recentemente foi demonstrado que o T_3 (10^{-6} , 10^{-5} , 2×10^{-5} e 10^{-4} M) induz uma hiperpolarização imediata em células de Sertoli de ratos imaturos. Este efeito foi dependente da dose e mais expressivo na concentração de 10^{-6} M (SILVA et al., 2001). Nesta ação hiperpolarizante do T_3 estão envolvidos os canais de K^+_{ATP} , e parecem depender do Ca^{2+} extracelular. Também foi demonstrado que o T_4 altera o potencial transmembrana em células de Sertoli. O efeito hiperpolarizante do T_4 foi de modo dependente da dose, mostrando um efeito máximo na concentração de 10^{-6} M e com o envolvimento dos canais de K^+ dependentes da tensão e canais de K^+ dependentes de Ca^{2+} (MENEZAS et al., 2006). Além disso, em outras células, os HT produzem uma hiperpolarização de -5,8 mV, como por exemplo na membrana de células da glândula submandibular (BRYANT et al., 1988), e em células tumorais da pituitária de ratos (Du PONT; ISRAEL, 1987).

Já foi demonstrado que várias substâncias alteram o potencial transmembrana de células de Sertoli. O FSH apresenta um efeito bifásico, caracterizado por uma hiperpolarização imediata seguida de despolarização (WASSERMANN et al., 1990). O isoproterenol, agonista β adrenérgico, também produz alterações no potencial transmembrana de forma bifásica, ou seja, uma hiperpolarização imediata, 7-10 segundos após a aplicação do fármaco, seguida de uma despolarização (LOSS et al., 1998). A testosterona produz uma despolarização dose-dependente (LEITE et al., 1999). Já o retinol produziu uma resposta oscilatória no potencial transmembrana (LOSS et al., 1998).

Os resultados de estudos descritos acima estão em concordância com os resultados apresentados neste trabalho. Demonstram que as células de Sertoli respondem de maneira diferente frente a diferentes substâncias corroborando, deste modo, a especificidade da ação destas substâncias nestas células.

5.1.2. Curva Dose-Resposta do Ácido Carboxílico 9-Antraceno no Potencial Transmembrana de Células de Sertoli

A figura 5.2 mostra o efeito *per se* do 9-AC no Em de células de Sertoli. Como pode-se observar, este antagonista de canal de Cl^- não apresentou efeito significativo no Em destas células quando comparado com o grupo controle (KRb).

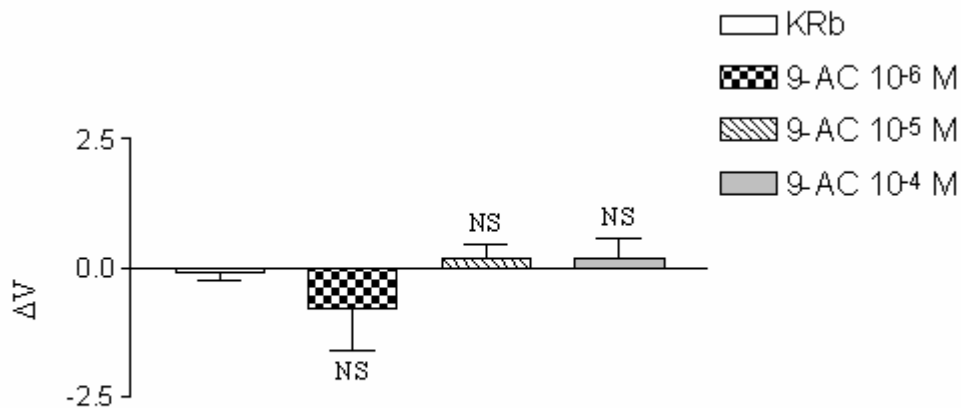


Figura 5.2 – Curva dose-resposta do 9-AC no potencial transmembrana de células de Sertoli (10^{-6} , 10^{-5} e 10^{-4} M). Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M.; n=4. NS = não significativo.

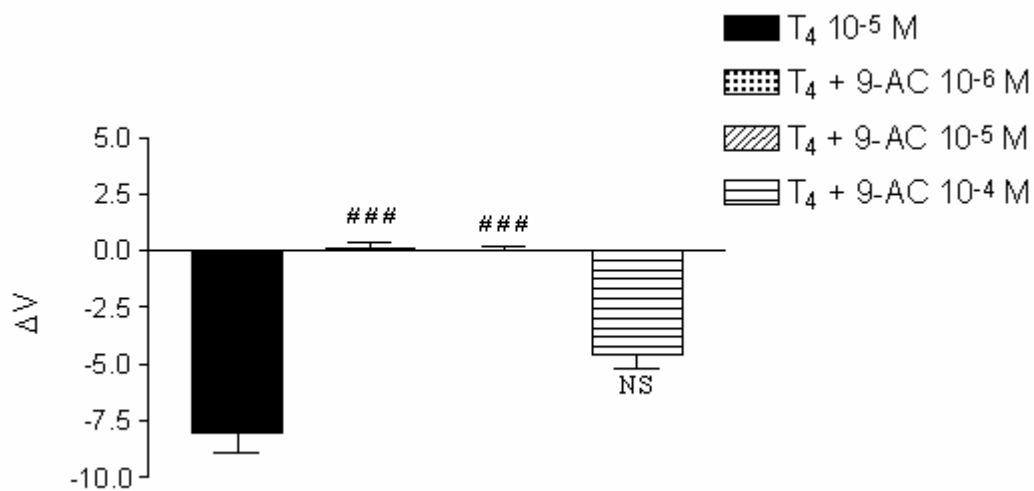
O 9-AC é um antagonista de canais de Cl^- do grupo arilaminoalquil benzoatos (CABANTCHIK; GREGER, 1992), é permeável à membrana e bloqueia os canais de Cl^- por ligar-se na porção citoplasmática (ESTÉVEZ et al., 2003). O estudo feito por Palade e Barchi (1977) mostrou que o 9-AC bloqueou a condutância do Cl^- no

músculo, inibiu potencialmente os canais de Cl^- do tipo CIC-1 (STEINMEYER et al., 1991), mas, apenas fracamente afetou os canais de Cl^- do tipo CIC-0 (STEINMEYER et al., 1991), CIC-2 (CLARK et al., 1998) ou os canais CIC-5 (STEINMEYER et al., 1995). Outro estudo demonstrou que o 9-AC inibiu a proliferação de células humanas leucêmicas (JIANG et al., 2004), e na concentração de 10^{-4} M inibiu canais de cloreto dependentes de cálcio em miócitos uterinos de ratos (JONES et al., 2004). Através destes estudos pode-se notar que o 9-AC bloqueou diferentes tipos de canais de cloreto, sendo que a especificidade parece depender da concentração deste antagonista.

5.1.3. Envolvimento dos Canais de Cl^- na Ação Hiperpolarizante do Hormônio T_4 no Potencial Transmembrana de Células de Sertoli

A figura 5.3 (A) mostra o efeito de diferentes concentrações de 9-AC na ação hiperpolarizante do T_4 . Como pode-se observar, o 9-AC nas concentrações de 10^{-5} e 10^{-6} M inibiu completamente a ação hiperpolarizante do T_4 10^{-5} M. No entanto, este antagonista, na concentração de 10^{-4} M não bloqueou o efeito hiperpolarizante do hormônio. Na figura 5.3(B) observa-se o registro da hiperpolarização do T_4 e posteriormente, este efeito bloqueado pelo 9-AC 10^{-5} M. O 9-AC adicionado no banho de perfusão não causou alteração do Em entretanto, o T_4 adicionado 30 segundos após a adição do antagonista teve o efeito hiperpolarizante bloqueado.

(A)



(B)

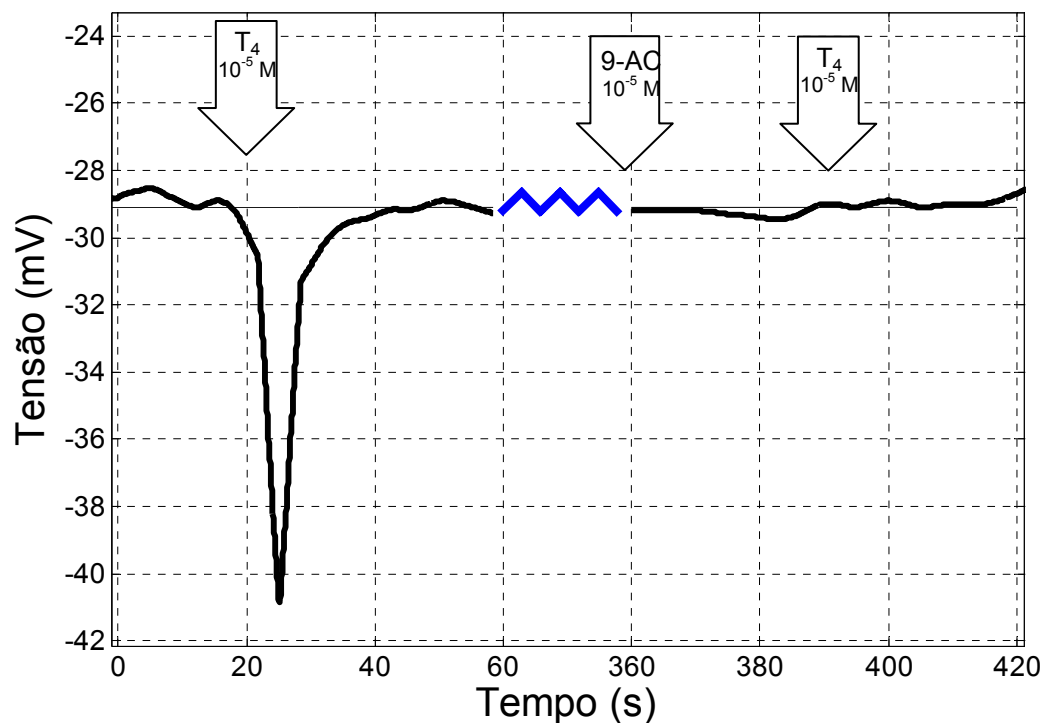


Figura 5.3 – Efeito do 9-AC na ação hiperpolarizante do T₄ (10⁻⁵ M) no potencial transmembrana de células de Sertoli. (A) Efeito de diferentes concentrações do 9-AC na ação hiperpolarizante do T₄. Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M.; n=4. NS= não significativo, ###p≤ 0,001 em relação ao T₄. (B) Registro do sinal do efeito do 9-AC 10⁻⁵ M na ação hiperpolarizante do T₄.

A hiperpolarização da membrana, ou seja, potencial mais negativo ocorre devido a entrada de Cl^- e/ou saída de K^+ . O T_4 apresenta um efeito hiperpolarizante em células de Sertoli de ratos imaturos, e nesta hiperpolarização está claro o envolvimento do íon K^+ (MENEGAZ et al., 2006). Este estudo visou investigar se há também o envolvimento do íon Cl^- nesta ação hiperpolarizante do T_4 . Para tanto, utilizou-se o 9-AC, bloqueador dos canais de Cl^- .

Com poucas exceções, os bloqueadores dos canais de Cl^- são inespecíficos e apresentam uma fraca potência, com concentrações efetivas na faixa de concentração micromolar a milimolar (JENTSCH et al., 2002). CIC-2 requer concentrações milimolares de 9-AC para bloqueio eficiente (CLARK et al., 1998; THIEMANN et al., 1992). Entretanto CIC-1 pode ser inibido por 9-AC na faixa micromolar (ASTILL et al., 1996). O 9-AC, em diferentes concentrações, bloqueia tipos distintos de canais de Cl^- , deve-se a isso o fato de a concentração maior deste fármaco não bloquear completamente a hiperpolarização provocada por T_4 .

A importância fisiológica dos canais de Cl^- é revelada por doenças que resultam das mutações nos genes destes canais. Bösl et al., 2001, demonstraram que os canais CIC-2 estão envolvidos com a fertilidade masculina. Estes canais são ativados sob lenta hiperpolarização (THIEMANN et al., 1992), pH extracelular ácido (JORDT; JENTSCH, 1997) e por inchamento osmótico celular (GRÜNDER et al., 1992).

Resumidamente, o bloqueio da ação hiperpolarizante do T_4 pelo 9-AC comprova a essencialidade da atividade destes canais na ação hiperpolarizante do hormônio. Isto está de acordo com Laleveé e Joffre, 1999, que através de estudos eletrofisiológicos, caracterizaram correntes de Cl^- dependentes de Ca^{2+} em células de Sertoli bloqueadas por 9-AC (10^{-3} M). No entanto, devido à baixa especificidade dos antagonistas dos canais de Cl^- , não se pode dizer exatamente qual é o tipo de canal de Cl^- envolvido.

5.2. PARTE II: CAPTAÇÃO DE CÁLCIO

A captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ foi utilizada neste trabalho com o objetivo de estudar se este é um fenômeno na membrana plasmática mediado por HT em testículos de ratos, bem como, caracterizar o mecanismo de entrada do $^{45}\text{Ca}^{2+}$ induzido por HT.

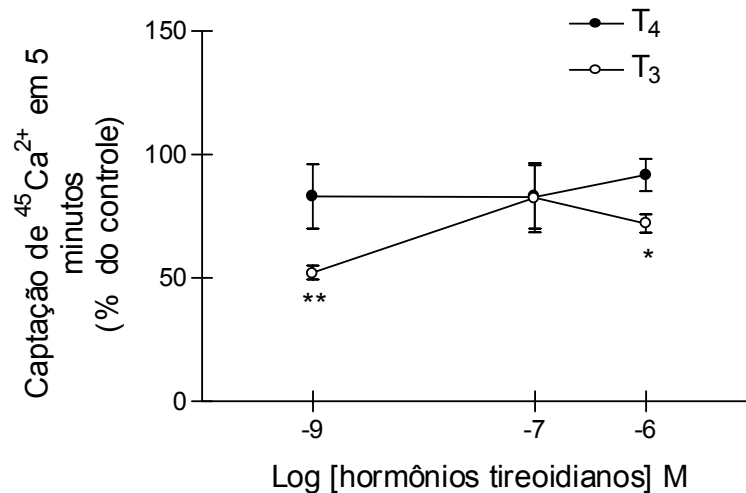
5.2.1. Curva Dose-Resposta dos Hormônios Tireoidianos na Captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em Testículos de Ratos Imaturos

Para estudar a sensibilidade da ação dos HT em testículos de ratos imaturos no estímulo da captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, foi realizada inicialmente uma curva de dose-resposta. Apoiados em dados da literatura, foi utilizado 5 minutos para o tempo de incubação com o hormônio (Figura 5.4(A)). Como pode-se observar na figura 5.4(A), o T_4 nas concentrações de 10^{-9} , 10^{-7} e 10^{-6} M não teve efeito estimulatório na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ neste período estudado. No entanto, o T_3 (10^{-9} e 10^{-6} M) inibiu a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ significativamente quando comparado com o controle.

Com o intuito de caracterizar o envolvimento dos HT na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em testículos de ratos imaturos, utilizou-se um tempo de incubação com os hormônios durante 1 minuto. A figura 5.4(B) demonstra a curva de dose-resposta do T_4 e T_3 , nas concentrações de 10^{-9} , 10^{-7} e 10^{-6} M na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ utilizando-se o tempo de incubação de 1 minuto com os hormônios. Pode-se observar que o T_4 teve um efeito estimulatório na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ nas concentrações de 10^{-9} e 10^{-6} M, onde o pico de captação foi com T_4 10^{-6} M, alcançando um estímulo de 100% superior ao controle. O T_4 na concentração de 10^{-9} M provocou um efeito estimulatório de 85% superior ao controle. Como o efeito máximo do T_4 na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ocorreu na concentração de 10^{-6} M, esta foi a concentração utilizada para os experimentos posteriores. Por outro lado, como demonstrado no gráfico, o T_3 (10^{-9} , 10^{-7} e 10^{-6} M) não teve um efeito estimulatório na captação de cálcio. Cabe ressaltar que o T_3 na concentração de

10^{-6} M (5.4(B)) diminuiu a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ significativamente quando comparado com o controle.

(A)



(B)

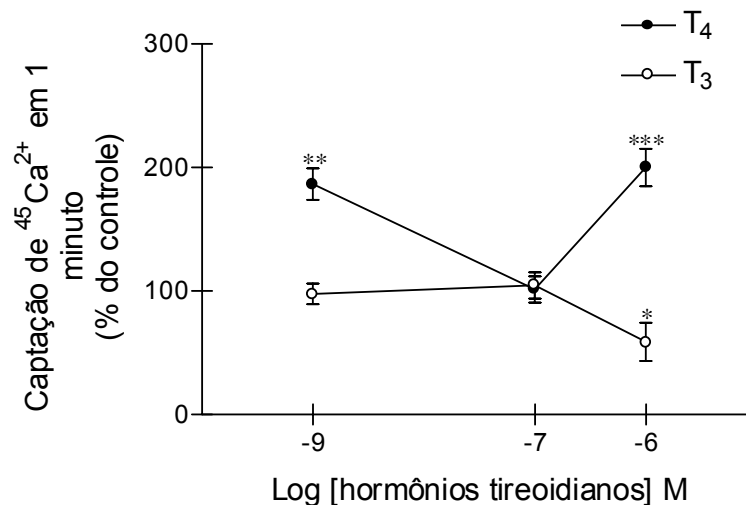


Figura 5.4 – Curva dose-resposta do T₄ e T₃ (10^{-9} , 10^{-7} e 10^{-6} M) na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em testículos de ratos imaturos. Pré-incubação de 15 min; pré-incubação de 60 min em KRb fresco com $0,2 \mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$; incubação na presença ou ausência de diferentes concentrações de T₄ ou T₃. (A) Tempo de incubação de 5 min na presença ou ausência do hormônio. (B) Tempo de incubação de 1 min na presença ou ausência do hormônio. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M.; n=6. * $P \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$ em relação ao controle.

Em 2001, Silva e colaboradores demonstraram que o T_3 estimula o transporte do aminoácido neutro MeAIB através do sistema “A”, numa faixa de concentração de 10^{-7} e 10^{-6} M. Este efeito estimulatório é dependente da idade, pois o T_3 estimula significativamente o transporte de aminoácido em ratos de 6 e 13 dias de idade e induz uma hiperpolarização em células de Sertoli de ratos imaturos. A ação estimulatória do T_3 no transporte do aminoácido [^{14}C]-MeAIB envolve os canais de K^+_{ATP} , porém sem a participação direta do cálcio intracelular, uma vez que a depleção do Ca^{2+} interno não alterou a resposta ao hormônio.

Os estudos eletrofisiológicos evidenciaram que o efeito hiperpolarizante do T_3 nas células de Sertoli de ratos imaturos é pelo menos em parte, regulado por canais de K^+_{ATP} e/ou Ca^{2+} extracelular (VOLPATO et al., 2004). Zamoner e colaboradores, 2005a, demonstraram que o T_3 (10^{-6} M) estimulou a fosforilação da vimentina em testículos de ratos imaturos por um mecanismo mediado pelo Ca^{2+} interno e externo que ficou evidente através do uso de bloqueadores de CCDT e por agentes quelantes 1,2-bis-(2-aminofenol) etano-N,N,N',N',-tetracético (BAPTA) e ácido tetracético etileno glicol (EGTA). Menegaz e colaboradores, 2006, demonstraram que o T_4 também estimula o transporte de aminoácido [^{14}C]-MeAIB e produz um efeito hiperpolarizante na faixa de concentração entre 10^{-9} a 10^{-6} M.

D'AREZZO e colaboradores (2004), demonstraram que o T_3 na concentração de 10^{-9} M causa um aumento da concentração de Ca^{2+} em mioblastos em 100 segundos após a exposição do hormônio. Este aumento da concentração de Ca^{2+} ocorre através da mobilização deste íon dos estoques internos, uma vez que o EGTA que é um quelante de Ca^{2+} externo, não alterou a resposta do T_3 e o BAPTA, quelante interno, e o U73122 (inibidor da fosfolipase C), inibem significativamente a ação estimulatória do T_3 . Os resultados desse estudo são condizente com os resultados apresentados neste trabalho, uma vez que o T_3 não estimulou o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$.

Ainda, como demonstrado na figura 5.4, o T_3 inibiu a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (comparado com o controle). Sugere-se que este hormônio possa estar atuando na Ca^{2+} -ATPase da membrana plasmática, uma vez que esta bomba, em vários tecidos, está sujeita à estimulação dos HT. Como demonstrado por Davis e colaboradores, 1989, o efeito dos HT na atividade desta bomba é dependente de calmodulina e é não-genômico. O mecanismo de ativação da Ca^{2+} -ATPase por HT envolve, pelo menos em parte, lipídeos da membrana plasmática, incluindo os componentes do ciclo do fosfatidil inositol.

Os HT estimulam o transporte de Ca^{2+} por aumentar a entrada de Ca^{2+} através das bordas em escova das células intestinais (microvilosidades), assim como, a saída do íon para a membrana basolateral do enterócito. O processo de entrada é regulado por mudanças no transportador de Ca^{2+} , e, a saída de Ca^{2+} é modulada através da ativação do trocador Na^+/H^+ pelo AMPc (KUMAR; PRASAD, 2003). Em células do coração, concentrações fisiológicas dos HT também aumentam a concentração de Ca^{2+} intracelular (HUMMERICH; SOBOLL, 1989).

Hormônios de natureza lipossolúvel também provocam aumento do influxo de Ca^{2+} em células de Sertoli de ratos. A testosterona produz um efeito estimulatório de 30% na captação de Ca^{2+} em células de Sertoli em vários estágios do desenvolvimento com 1 minuto de incubação (LEITE et al., 1999). O retinol aumenta a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ via CCDT em 20 segundos (WASSERMANN et al., 1995).

Também outras substâncias, como o isoproterenol e o retinol (10^{-6} M) estimulam a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em 30 segundos em células de Sertoli (LOSS et al., 1998). A glibenclamida, bloqueador de canais de K^+_{ATP} , 10^{-5} M, estimula a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, e após 4 minutos este efeito foi 77% superior ao controle (MIRANDA et al., 1998)

Assim como para a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, já foram demonstrados que outros efeitos de rápida resposta para o T_4 e T_3 são mediados por diferentes mecanismos, sensibilidade e potência. O T_4 estimulou o transporte do [^{14}C]-MeAIB numa faixa de concentração mil vezes menor que o melhor estímulo observado para o T_3 . Entretanto, quando comparados numa mesma faixa de concentração, 10^{-6} e 10^{-7} M, o T_3 é significativamente mais eficiente que o T_4 . Além disso, a síntese protéica, previamente inibida com ciclo-heximida, não alterou o efeito estimulatório do T_4 no transporte do aminoácido neutro MeAIB. Em contrapartida, o efeito estimulatório do T_3 no transporte do aminoácido neutro foi parcialmente inibido com a síntese protéica previamente bloqueada com ciclo-heximida. O T_3 também apresentou um efeito hiperpolarizante maior que o T_4 em células de Sertoli quando estes hormônios foram utilizados na concentração 10^{-6} M (MENEZES et al., 2006).

Incerpi e colaboradores, 2002, demonstraram que o estímulo do transporte de aminoácidos e do trocador Na^+/H^+ em hepatócitos de pintos estimulados por T_4 e T_3 , são inibidos em graus diferentes por inibidores de proteínas cinases, sugerindo diferenças nas vias de transdução de sinal entre estes hormônios.

O trabalho feito por D'Agostino e colaboradores (1992), demonstrou que a concentração basal de Ca^{2+} intracelular em cultura de células de Sertoli de ratos com 21 dias de idade é cerca de 100 nM. Segundo Segal (1990), o Ca^{2+} é o primeiro mensageiro para os efeitos rápidos dos HT que ocorrem na membrana plasmática, enfatizando que a captação de Ca^{2+} seria o primeiro evento aparente seguido à ligação do hormônio num sítio de ligação na membrana plasmática.

Portanto, como pode ser observado, no presente trabalho, o T_4 estimulou intensamente o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em testículos de ratos imaturos. Este íon pode ter diferentes funções na célula, como ativar segundos mensageiros e desencadear a ativação de cascatas de fosforilação. Taranta e colaboradores, 1997, demonstraram em cultura de células de Sertoli de ratos imaturos, que no mínimo

50-60% da secreção de proteínas é dependente de Ca^{2+} . Contudo, os resultados apresentados neste trabalho demonstram mais um efeito não-genômico do T_4 a nível de membrana plasmática em testículo de rato imaturo. E onde mais uma vez, o T_4 e T_3 mostraram resultados dissímiles corroborando com resultados anteriores que relatam que estes dois hormônios atuam por vias diferentes na transdução do sinal.

5.2.2. Curva de Tempo da Captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ Estimulada por T_4 em Testículo de Ratos Imaturos

Utilizando-se a dose de T_4 10^{-6} M, que estimulou ao máximo a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, foi realizada uma curva de tempo. A figura 5.5 mostra a curva de tempo (30, 60 e 300 segundos) da captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ estimulada por T_4 . Pode ser observado que o T_4 estimulou significativamente a captação já no tempo de 60 segundos. Este estímulo foi 100% superior ao controle. Portanto o tempo de incubação utilizado para os experimentos posteriores foi 60 segundos.

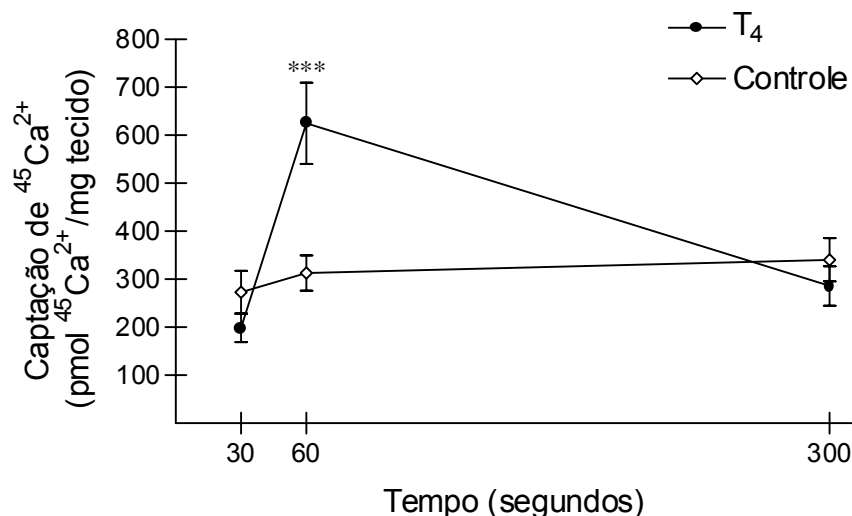


Figura 5.5 – Curva de tempo do T_4 na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em testículos de ratos imaturos. Pré-incubação de 15 min com KRb; pré-incubação de 60 min em KRb fresco com $0,2 \mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$; incubação de 30, 60 e 300 seg na presença ou ausência de T_4 10^{-6} M. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M.; $n=6$. *** $P \leq 0,001$ em relação ao controle.

Semelhante ao observado nesta figura, os HT aumentam significativamente a fosforilação de proteínas de filamentos intermediários num período de 30 minutos em testículos de ratos imaturos (ZAMONER et al. 2005a). Também, no sistema nervoso central, os HT estimularam a fosforilação de neurofilamentos NF-L, NF-M, G-FAP e vimentina após 30 minutos de incubação (ZAMONER et al., 2005b). Desta forma, estes resultados enfatizam as ações rápidas dos HT.

5.2.3. Efeito de Bloqueadores de Canais de Cálcio Dependentes da Tensão na Ação Estimulatória do T₄ na Captação de ⁴⁵Ca²⁺ em Testículos de Ratos Imaturos

A entrada de Ca²⁺ através da membrana plasmática pode ser por diferentes vias. Uma vez que o T₄ estimulou a captação de ⁴⁵Ca²⁺ quase que imediatamente à exposição do hormônio e com uma capacidade de uma vez mais ao observado para os níveis basais, foram utilizados bloqueadores específicos para caracterizar as vias de entrada de Ca²⁺ reguladas por este hormônio.

Os bloqueadores dos canais de Ca²⁺ são agentes terapêuticos de grande uso, exercem efeitos por bloquear reversivelmente os CCDT, ligando-se à subunidade α_1 do canal de Ca²⁺. A ligação do fármaco poderia facilitar mudanças conformacionais na proteína do canal, que são transmitidas para os mecanismos de abertura, sítios na região do poro e/ou sítios de ligação do Ca²⁺, resultando no bloqueio (antagonistas) ou abertura do canal (agonistas) (STRIESSNIG et al., 1998). Os CCDT podem ser classificados de acordo com as propriedades farmacológicas e eletrofisiológicas em seis classes de corrente de Ca²⁺ designadas L-, N-, T-, P/Q-, e R- (TSIEN et al., 1991; HOFMANN et al., 1999).

5.2.3.1. Envolvimento dos CCDT tipo L na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ estimulada por T_4

Para estudar o envolvimento dos CCDT do tipo L, utilizou-se o fármaco nifedipina, antagonista destes canais, na concentração de 10^{-4} M. Como pode ser observado na figura 5.6, a nifedipina não teve efeito *per se* na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em testículos de ratos imaturos. No entanto, na presença do T_4 (10^{-6} M), bloqueou completamente a ação estimulatória do hormônio na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$.

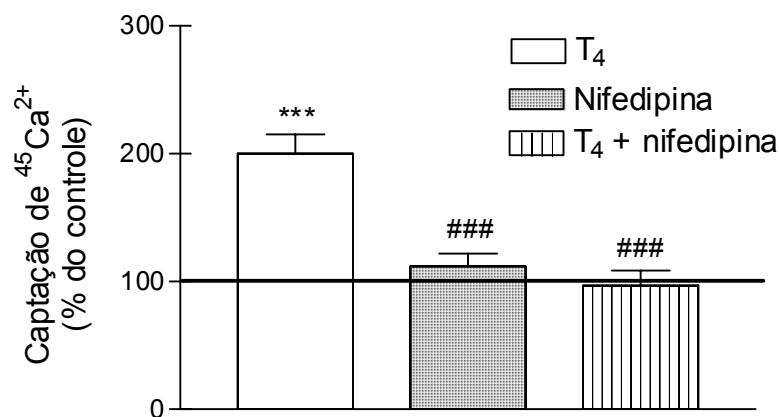


Figura 5.6 – Efeito da nifedipina na ação estimulatória do T_4 na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em testículos de ratos imaturos. Pré-incubação de 15 min com KRb; pré-incubação de 60 min em KRb fresco com $0,2 \mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$; a nifedipina (10^{-4} M) foi adicionada ao meio de pré-incubação 15 min antes da adição do T_4 ; incubação de 60 segundos na presença ou ausência de T_4 10^{-6} M. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M.; $n=6$. *** $P \leq 0,001$ em relação ao controle; ### $p \leq 0,001$ em relação ao T_4 .

Os CCDT podem ser encontrados em três estados funcionalmente distintos: aberto, fechado ou inativo. A nifedipina é um antagonista dos CCDT do grupo das dihidropiridinas que se liga ao estado fechado do canal, mantendo-o nesta condição (SPEDDING, PAOLETTE, 1992).

Um estudo feito em cultura de células de Sertoli mostrou a presença de CCDT sensíveis à nifedipina (D'AGOSTINO et al., 1992). O bloqueio dos CCDT tipo L por verapamil, antagonista deste canal de Ca^{2+} , inibiu o efeito estimulatório

de iodotironinas no transporte do aminoácido neutro MeAIB, e o efeito hiperpolarizante deste hormônio (VOLPATO et al., 2004). A nifedipina (10^{-4} M) bloqueou o efeito estimulatório do T_3 na fosforilação da vimentina de testículo de ratos imaturos. Estes resultados indicam o envolvimento do cálcio externo nestes eventos (ZAMONER et al., 2005a).

Estudos com outras substâncias que estimulam a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em células de Sertoli mostraram o envolvimento dos CCDT tipo L. A nifedipina (0,5 mM) bloqueou o efeito estimulatório do isoproterenol na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, mas não foi capaz de inibir o efeito estimulatório do retinol em células de Sertoli isoladas (LOSS et al., 1998). Gorczyńska e Handelsman (1995), reportaram que em células de Sertoli de ratos de 20 dias, a testosterona causou um aumento do influxo de Ca^{2+} através de CCDT do tipo L. Ainda, a presença do verapamil (10^{-4} M) bloqueou o efeito estimulatório da glibenclamida na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em células de Sertoli (MIRANDA et al., 1998).

Resultados com $^{45}\text{Ca}^{2+}$ e fura-2 sugerem a presença de CCDT e canais de Ca^{2+} independentes da tensão em células de Sertoli isoladas (GORCZYŃSKA; HANDELSMAN, 1991) e em cultura (D'AGOSTINO et al., 1992). O trabalho descrito por Grasso e Reichert (1989) evidenciou a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ por proteolipossomas em células de Sertoli estimuladas por FSH, e o envolvimento de CCDT e canais de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ independentes da tensão. Também demonstraram que a nifedipina (10^{-4} M) bloqueou a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ estimulada pelo FSH.

As correntes de Ca^{2+} do tipo L são aumentadas por HT em miócitos de ratos. Este evento ocorre devido a ativação da cascata da adenilato ciclase, via não-genômica, apesar de também ser observado uma diminuição da expressão gênica dos canais de Ca^{2+} , com diminuição dos níveis de ácido ribonucléico mensageiro (ARNm) da subunidade α_1 do canal, provocado por hormônio (WATANABE et al., 2005). Estes estudos apontam o envolvimento de CCDT tipo L no influxo de Ca^{2+} em células de Sertoli estimulado por várias substâncias através do uso de

bloqueadores destes canais. Isto é condizente com os resultados apresentados neste estudo, onde o T_4 também apresentou um efeito estimulatório na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ via canais de CCDT tipo L.

5.2.3.2. Envolvimento dos CCDT tipo T na ação estimulatória do T_4 na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$

A figura 5.7 mostra o efeito da flunarizina (10^{-5} M), antagonista de CCDT tipo T, sobre a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ induzida por T_4 . Pode-se observar que a flunarizina não teve efeito *per se*, contudo, quando se adicionou o T_4 , bloqueou completamente o efeito estimulatório deste hormônio na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$.

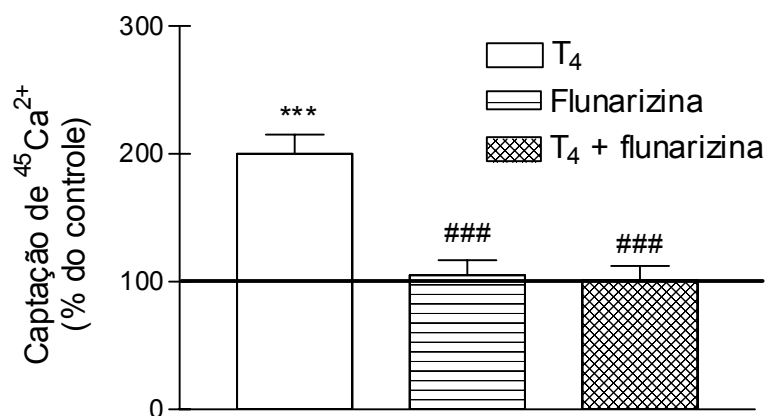


Figura 5.7 – Efeito da flunarizina na ação estimulatória do T_4 na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em testículos de ratos imaturos. Pré-incubação de 15 min com KRb; pré-incubação de 60 min em KRb fresco com $0,2 \mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$; a flunarizina (10^{-5} M) foi adicionada no meio de pré-incubação 15 min antes da adição do T_4 ; incubação de 60 seg na presença ou ausência de T_4 10^{-6} M. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M.; $n=6$. *** $P \leq 0,001$ em relação ao controle; ## $p \leq 0,001$ em relação ao T_4 .

A endodiazepina tricontetraneuropeptídeo (TTN) resulta em um modelo típico de ativação celular que inclui aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em leucócitos polimorfonucleares humano, com conseqüente expressão do ARNm de interleucina-8 (IL-8) e liberação de citocinas pró-inflamatórias, quimiotaxia, indução do metabolismo

oxidativo e fagocitose. A entrada de Ca^{2+} estimulada por TTN foi bloqueada pela flunarizina (2×10^{-6} M), deste modo indicando o envolvimento dos CCDT tipo T neste evento (MARINO et al., 2004).

Os canais de Ca^{2+} ativados por tensão baixa (CCDT tipo T) estão envolvidos em muitos processos celulares. Medeiam o influxo de Ca^{2+} em células excitáveis e não excitáveis, incluindo células endócrinas, neurônios, osteoblastos e células germinativas. Contribuem para a geração do potencial de ação mas também estão envolvidos em processos como a regulação da proliferação e diferenciação celular. Os CCDT tipo L diferem dos canais do tipo T através de características eletrofisiológicas (inativados lentamente) e farmacológicas (sensibilidade a dihidropiridinas). Os CCDT tipo L são expressos em muitos tecidos onde regulam o tônus muscular, expressão gênica, e a secreção de hormônios (Para revisão ver AGOSTON et al., 2004).

O resultado observado neste trabalho mostra o envolvimento dos CCDT do tipo T na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ estimulado por T_4 , e está de acordo com estudos prévios que caracterizaram CCDT do tipo T em cultura de células de Sertoli de ratos imaturos usando a técnica de *patch-clamp* (LALEVEÉ et al., 1997).

Em resumo, através dos resultados observados nas figuras 5.6 e 5.7, podemos concluir que o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ estimulado por T_4 em testículos de ratos imaturos ocorre através de CCDT do tipo L e T. De acordo com o estudo desenvolvido por Fragale e colaboradores (2000) a principal via de entrada de Ca^{2+} nas células ocorre através dos CCDT.

5.2.4. Envolvimento dos Canais de Potássio Dependentes de Cálcio na Ação Estimulatória do T₄ na Captação de ⁴⁵Ca²⁺ em Testículos de Ratos Imaturos

A figura 5.8 mostra a influência dos canais de potássio dependentes de cálcio na captação de ⁴⁵Ca²⁺ estimulada por T₄ através de estudos com apamina, bloqueador seletivo do canais de K⁺ dependentes de Ca²⁺. Pode-se observar que a apamina usada na concentração de 10⁻⁷ M não teve um efeito *per se* na captação de ⁴⁵Ca²⁺. No entanto, esta toxina bloqueou completamente a captação de ⁴⁵Ca²⁺ induzida por T₄.

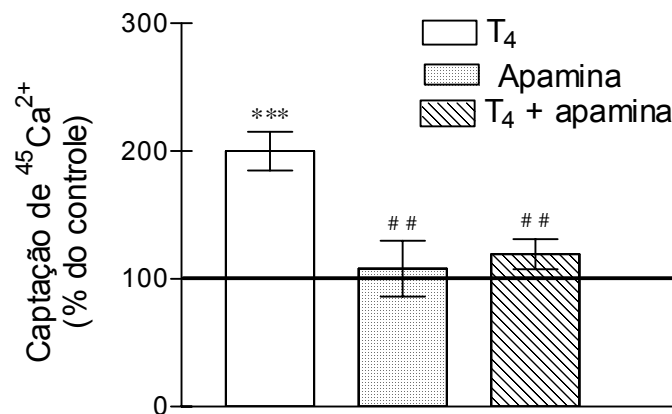


Figura 5.8 – Efeito da apamina na ação estimulatória do T₄ na captação de ⁴⁵Ca²⁺ em testículos de ratos imaturos. Pré-incubação de 15 min com KRb; pré-incubação de 60 min em KRb fresco com 0,2 µCi/mL de ⁴⁵Ca²⁺; a apamina (10⁻⁷ M) foi adicionada no meio de pré-incubação 15 min antes da adição do T₄; incubação de 60 seg na presença ou ausência de T₄ 10⁻⁶ M. Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M.; n=6. ***P ≤ 0,001 em relação ao controle; ## p ≤ 0,01 em relação ao T₄.

A apamina é um peptídeo isolado do veneno da abelha *Apis mellifera* (HABERMANN, 1972), e segundo Kazic; Gojkovic-Bukarica (1999), é um bloqueador seletivo e específico dos canais SK. Estes canais são topologicamente semelhantes aos canais de potássio dependentes de tensão (FINALAYSON et al.,

2001). Em geral, são ativados por aumento nos níveis de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, mudanças no Em e fosforilação de proteínas (MUYDERMAN et al., 2001).

O bloqueio dos canais de K^+ dependentes de Ca^{2+} com o uso da apamina, inibe o efluxo de K^+ , provocando mudanças no V_m da membrana plasmática (KAWAI; WATANABE, 1986). De acordo com o trabalho de Menegaz e colaboradores, 2006, o bloqueio dos canais de K^+ dependentes de Ca^{2+} inibe completamente a ação hiperpolarizante do T_4 (10^{-6} M) em células de Sertoli. Este efeito foi evidenciado pelo uso de apamina nas concentrações 10^{-7} , 2×10^{-7} e 3×10^{-7} M, sendo que todas as doses inibiram completamente a hiperpolarização provocada pelo T_4 . Uma vez que os canais de K^+ dependentes de Ca^{2+} são ativados por um aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, o objetivo deste experimento foi esclarecer o papel do Ca^{2+} externo na ativação deste tipo de canal de K^+ .

Estudos demonstraram que a ativação dos canais SK não se dá pela ligação direta do Ca^{2+} a estes canais, e sim através da ligação deste íon na calmodulina, que está associada constitutivamente aos canais SK. Uma mudança conformacional na calmodulina é induzida por ligação do Ca^{2+} , o que causa a abertura do canal SK (XIA et al., 1998). Já o estudo desenvolvido por SAH (1996) demonstra que a rápida ativação dos canais SK frente a aplicação de Ca^{2+} sugere que este canal esteja localizado em associação com os CCDT.

Os canais SK também estão envolvidos com a liberação de catecolaminas da adrenal, onde o aumento da concentração de Ca^{2+} pode, simultaneamente, ativar os canais de potássio dependentes de cálcio, conduzindo a uma hiperpolarização e inibir o influxo de mais Ca^{2+} (NAGAYAMA et al., 1997).

Os canais de K^+ dependentes de Ca^{2+} são ativados por um aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Como visto neste trabalho, o T_4 estimulou a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, e como a ativação dos canais SK ocorre devido a um aumento do $[\text{Ca}^{2+}]_i$, sugere-se que estes canais de K^+ possam ser ativados para regular o influxo de Ca^{2+} estimulado

por hormônio. Apoiado nestes resultados, é provável que a ativação deste tipo de canal de K^+ por T_4 , em testículos de ratos, possa ocorrer por aumento do influxo de Ca^{2+} induzido por este hormônio.

5.2.5. Envolvimento dos Canais de Cloreto na Ação Estimulatória do T_4 na Captação de $^{45}Ca^{2+}$ em Testículos de Ratos Imaturos

A figura 5.9 mostra o efeito do 9-AC na ação estimulatória do T_4 na captação de $^{45}Ca^{2+}$. Como pode ser constatado, o 9-AC (10^{-5} M), não mostrou alteração da captação basal de $^{45}Ca^{2+}$, entretanto, bloqueou completamente o efeito estimulatório do T_4 na captação de $^{45}Ca^{2+}$.

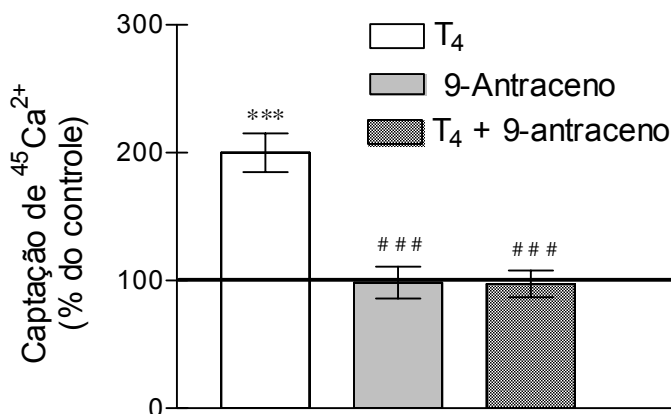


Figura 5.9 – Efeito do 9-AC na ação estimulatória do T_4 na captação de $^{45}Ca^{2+}$ em testículos de ratos imaturos. Pré-incubação de 15 min com KRb; pré-incubação de 60 min em KRb fresco com $0,2 \mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}Ca^{2+}$; o 9-AC (10^{-5} M) foi adicionado no meio de pré-incubação 15 min antes da adição do T_4 ; incubação de 60 seg na presença ou ausência de T_4 10^{-6} M. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M.; $n=6$. *** $P \leq 0,001$ em relação ao controle; ### $p \leq 0,001$ em relação ao T_4 .

A homeostasia intracelular de Cl^- tem um importante papel na excitação e outras funções celulares e intracelulares (LAI et al., 2003). O bloqueio de canais de Cl^- pode resultar na diminuição do volume regulatório (CHAN et al., 1994), mudanças na organização do citoesqueleto ou no meio iônico (ULLRICH;

SONTHEIMER, 1997), e indução da acidificação citosólica pelo bloqueio da entrada de HCO_3^- (MASTROCOLA et al., 1998). Tais mudanças no ambiente intracelular podem afetar a expressão ou função do ciclo celular.

De acordo com os resultados apresentados neste trabalho, em que o íon Cl^- afeta a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ estimulado por T_4 , outros estudos também mostraram a modulação dos canais de Ca^{2+} pelo íon Cl^- . Sartor e colaboradores (1990), usando a técnica de *patch clamp*, observaram que o TRH induziu uma hiperpolarização em lactotrófos de rato, onde a amplitude máxima chegou aos 5 segundos após a adição do hormônio, e que este efeito estava associado com a concomitante ativação da condutância de Cl^- e K^+ via a liberação de Ca^{2+} intracelular.

Outrossim, Garcia e colaboradores, em 1997, demonstraram que em lactotrófos de ratos, o bloqueio de canais de Cl^- pelo antagonista 9-AC reduz a entrada de Ca^{2+} nestas células, evidenciando um novo mecanismo modulatório para os CCDT, por demonstrar que o influxo de Ca^{2+} é influenciado pelo Cl^- . Com estes resultados, eles sugeriram um mecanismo de retroalimentação baseado na interação entre o Ca^{2+} e o Cl^- . Além disso, a modulação das correntes de Ca^{2+} por 9-AC é inibido pela *toxina pertussis*, sugerindo que este inibidor interfere na fosforilação de proteínas G envolvidas na ativação dos canais de Ca^{2+} . Em células de Sertoli, Laleveé e Joffre (1999) demonstraram correntes de Cl^- ativadas por aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, sendo que esta corrente foi inibida por 9-AC 1 mM.

A interação entre o Ca^{2+} e outros íons também pode ocorrer em resposta a exposição às iodotironinas. Em miócitos, a exposição aguda ao T_3 aumenta as correntes de Na^+ diretamente através do influxo, e indiretamente aumenta a $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Este aumento da concentração de Na^+ pode alterar o gradiente intracelular de Na^+ e então reverter a atividade do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, resultando em um aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (YONG et al., 2003).

Nos estudos eletrofisiológicos apresentados neste trabalho, constatou-se que os canais de Cl^- são essenciais para o efeito hiperpolarizante do T_4 em membranas de células de Sertoli de ratos imaturos. Este resultado corrobora com os resultados obtidos na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ estimulada por T_4 , indicando uma interação entre os íons Ca^{2+} e Cl^- . Isto implica que para o T_4 ter ação estimulatória na captação de cálcio, os canais de Cl^- precisam estar funcionantes. No entanto, o mecanismo pelo qual o íon Cl^- afeta a condutância do Ca^{2+} ainda não foi devidamente elucidado.

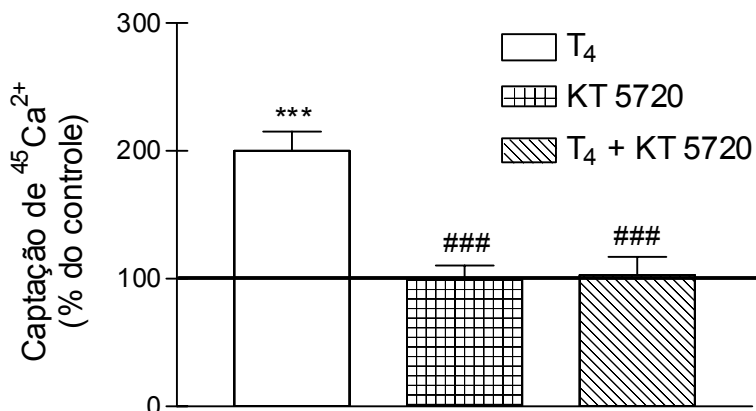
5.2.6. Efeito da Via das Cinases (PKA e PKC) na Captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ Estimulada por T_4

Para estudar o envolvimento da via das cinases, PKA e PKC, na ação estimulatória do T_4 na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, utilizou-se o inibidor de PKA, KT 5720, e como inibidor de PKC foi utilizado o cloreto de esteroilcarnitina (Figura 5.10).

Na figura 5.10(A) o KT 5720, na concentração de 10^{-6} M, não mostrou efeito *per se* na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$. No entanto, quando o T_4 mais o inibidor foram usados, este bloqueou a ação estimulatória do hormônio na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Isto mostra que a via da PKA está envolvida na eficácia da captação $^{45}\text{Ca}^{2+}$ estimulada por T_4 .

Por outro lado, quando se utilizou o cloreto de esteroilcarnitina (10^{-6} M), este mostrou um estímulo de 58% em relação ao controle na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, sendo significativo. Quando utilizado o T_4 com a PKC previamente inibida, houve um aumento da captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ de 63% quando comparado com o controle (5.10(B)).

(A)



(B)

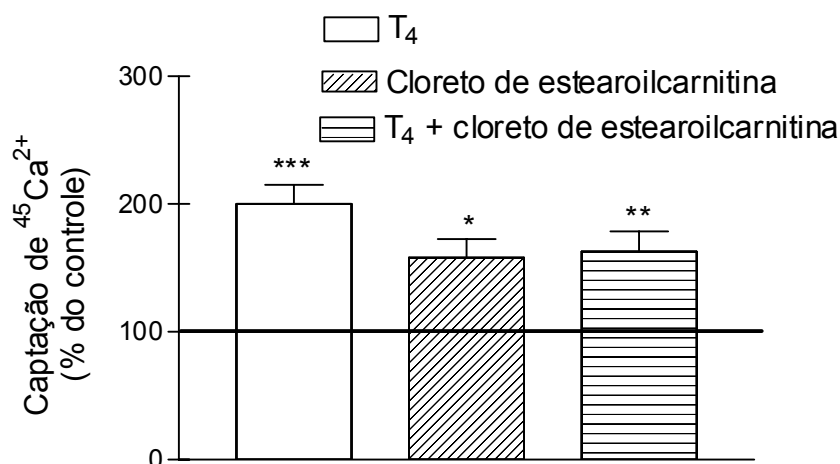


Figura 5.10 – Efeito da via das cinases na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ estimulada por T₄ em testículos de ratos imaturos. Pré-incubação de 15 min com KRb; pré-incubação de 60 min em KRb fresco com 0,2 $\mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$; inibidores de PKA e PKC foram adicionados no meio de pré-incubação 15 min antes da adição do T₄; incubação de 60 seg na presença ou ausência de T₄ 10^{-6} M. (A) Efeito do KT 5720 (10^{-6} M) na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ estimulada por T₄. (B) Efeito do cloreto de esteroilcarnitina na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ estimulada por T₄. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M.; n=6. ** $P \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$ em relação ao controle; # $p \leq 0,01$ e ### $p \leq 0,001$ em relação ao T₄.

Trabalhos recentes enfatizam a integração de diferentes componentes da rede de transdução de sinal nas células. Está bem estabelecido que a sinalização do Ca^{2+} celular interage com muitas outras vias, entre elas, vias da PKA e PKC (SATO, 1992; De BERNARDI; BROOKER, 1996; BERRIDGE et al., 2003).

Há evidências de que os CCDT precisam ser fosforilados para responder às variações do potencial transmembrana (TAKAHASHI et al., 1987), sendo que estes canais possuem sítios de fosforilação principalmente na subunidade α_1 . A PKA, PKC, AMPc e proteínas ligadoras de GMPc mostraram participação na fosforilação dos subtipos de canais de Ca^{2+} . E, muitos efeitos rápidos dos hormônios esteróides nos canais de Ca^{2+} ocorrem via fosforilação (De BOLAND; BOLAND; 1994; MERMELSTEIN et al., 1996).

O Ca^{2+} influencia os níveis de AMPc por regular as atividades das enzimas adenilato ciclase, que sintetiza AMPc, e fosfodiesterase, que quebra AMPc (De BERNARDI; BROOKER, 1996; MOORE et al., 1998). No entanto, a fosforilação por PKA regula a homeostasia do Ca^{2+} celular primeiramente por ativar os canais de Ca^{2+} ou Ca^{2+} -ATPase.

A existência de receptores para os HT na superfície celular que podem estar conectados às vias de transdução do sinal foi recentemente documentada por Bergh e colaboradores, 2005. Estes demonstraram que o domínio extracelular de uma proteína estrutural de membrana, a integrina $\alpha\text{V}\beta_3$, é capaz de ligar-se aos HT, e esta ligação conduziu a ativação da MAPK. A oclusão deste sítio previne a ativação de MAPK pelas iodotironinas e as ações celulares que seguem após a ativação desta cinase .

Outrossim, em células HeLa previamente expostas ao $\text{IFN-}\gamma$, o T_4 potencializou a ação antiviral em concentrações fisiológicas. O KT 5720 (5×10^{-7} M) e inibidor de PKC bloquearam a potencialização do T_4 no efeito antiviral, indicando que tanto a PKA quanto a PKC precisam ser ativadas pelo hormônio

para aumentar a ação antiviral do INF- γ (LIN et al., 1996). A ativação da PKC também está relacionada com a estimulação do trocador Na^+/H^+ pelos HT em mioblastos de ratos (INCERPI et al., 1999). D'Arezzo e colaboradores, 2004, demonstraram que a ativação do trocador Na^+/H^+ por HT ocorreu através de duas vias, que são: a) a mobilização de cálcio intracelular e; b) a ativação de cinases.

Os resultados deste trabalho, mostram uma possível ativação da PKA pelo T_4 com posterior fosforilação dos CCDT e conseqüente influxo de Ca^{2+} e são condizentes com vários estudos que relatam a fosforilação dos CCDT pelo sistema PKA, sugerindo que tal fosforilação possa controlar a atividade do canal (LEVITAN, 1985; CATTERAL, 1988; KRUEGER, 1989). Os CCDT do tipo L do músculo esquelético possuem sítios de fosforilação dependentes de PKA nas subunidades α_1 e β (para revisão ver CATTERAL, 2000). Estes canais são regulados pela fosforilação por PKA de uma maneira dependente de tensão, e que requer a associação física direta entre o canal e a cinase através de proteínas ancoradoras de PKA. Assim, a PKA ancorada aos canais de Ca^{2+} através das proteínas ancoradoras, favorece a fosforilação rápida e conseqüente modulação destes canais (GRAY et al., 1997).

As iodotironinas regulam as correntes de Ca^{2+} do tipo L em miócitos de porcos-da-índia, através da modulação da atividade da adenilato ciclase, levando a um aumento dos níveis de AMPc, ativação da PKA e conseqüente fosforilação dos CCDT tipo L (MAGER et al., 1992).

Em fungos *Aspergillus niger*, o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ocorre devido a ativação dos canais por fosforilação dependente de PKA (BENCINA et al., 2005). O estudo feito por Xiong e colaboradores, 1994, mostrou que o isoproterenol modula os CCDT da musculatura lisa de coelhos diretamente através da ativação da proteína $\text{Gs}\alpha$, e através de uma via indireta envolvendo a PKA. Também, o FSH causou um aumento da concentração de Ca^{2+} citosólico possivelmente via a ativação de PKA, que fosforila os canais de Ca^{2+} da membrana (ARMSTRONG; ECKERT, 1987).

Zanello e Norman, 2003, sugeriram que a interação direta da $1,\alpha\text{-}25(\text{OH})_2$ vitamina D_3 ($1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$) com canais de Ca^{2+} causou alteração da tensão, provocando a entrada de Ca^{2+} em osteoblastos. Um mecanismo modulatório indireto destes canais de Ca^{2+} ocorre através da via do AMPc por ação da $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ em receptor de membrana.

Em relação à modulação dos CCDT sobre a PKC, a ativação desta cinase em miócitos cardíacos teve um efeito bifásico nas correntes de Ca^{2+} , inicialmente, observa-se um aumento das correntes de Ca^{2+} , seguido por uma diminuição (TSENG; BOYDEN, 1991; SATOH, 1992). Já em neurônios, a expressão de CCDT do tipo L não são modulados por PKC (STEA et al., 1995).

Em leucócitos polimorfonucleares humanos, o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ através de CCDT do tipo T e da expressão do ARNm de IL-8, induzidos por TTN, mostra uma modulação envolvendo a PKC. O tetradecanoilforbol acetato, ativador de PKC, previne o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e da expressão do ARNm de IL-8 induzidos por TTN, sendo que inibidores da PKC revertem esta ação. Sugeriu-se que em leucócitos polimorfonucleares humano, o TTN ative receptores da membrana acoplados à proteína G, resultando em uma cascata de sinalização que inclui a PLC e PKC. Esta proteína cinase pode exercer efeitos negativos e positivos na sinalização do TTN, possivelmente dependendo da isoforma envolvida (MARINO et al., 2004).

Outros trabalhos demonstraram o envolvimento também da PKC no aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, e uma possível interação desta via com a PKA. Foi demonstrado que o estímulo do influxo de Ca^{2+} em mioblastos de pintos e ratos pela $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ requer a ativação dos CCDT do tipo L através da fosforilação envolvendo a via da PKA e PKC (VAZQUEZ et al., 1995; VAZQUEZ; De BOLAND, 1996).

Entretanto, muitos trabalhos demonstram que inibidores de PKC possuem ação estimulatória na captação de Ca^{2+} , corroborando com os resultados

apresentados neste estudo, onde o estímulo do cloreto de estearoilcarnitina na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ foi 58% superior ao controle. Massheimer e De Boland (1994) demonstraram que o inibidor de PKC, estaurosporina, potencializou a captação de Ca^{2+} evocada por $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ em músculo de pinto. Já Marinissen et al., 1994, mostraram que o influxo de Ca^{2+} também é estimulado por inibidores da PKC em torno de 50% em miócitos de pintos. Tanto a captação de Ca^{2+} estimulada pelos inibidores de PKC quanto a evocada por $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$, foram completamente bloqueadas por inibidores de PKA, sugerindo que a captação de Ca^{2+} estimulada por este hormônio é fortemente regulada por interação entre as vias de PKC e PKA, com modulação negativa da PKC sobre a PKA.

Em células do músculo cardíaco os efeitos da PKC também são contraditórios. Muitos trabalhos apontam a PKC como estimuladora dos canais de Ca^{2+} (DOSEMECI et al., 1988; HE et al., 2000), enquanto outros, reportam que esta cinase origina um efeito inibitório nestes canais (ZHANG et al., 1997). McHUGH e colaboradores, 2000, demonstraram que a PKC inibiu os CCDT do tipo L cardíacos através de dois sítios de fosforilação presentes no domínio N-terminal do canal de Ca^{2+} , nas posições 27 e 31. A fosforilação de ambos os resíduos é necessária para a modulação dependente de PKC.

No entanto, estudos relatam a possibilidade de inibidores da PKC agirem diretamente no canal iônico, inativando-o. A Calfofostina C, um inibidor seletivo da PKC, bloqueou diretamente os CCDT do tipo L (HARTZELL; RINDERKNECHT, 1996). Igualmente, a estaurosporina, um potente inibidor de PKC, possivelmente bloqueou os CCDT em coração de coelhos, através de uma interação direta com estes canais (KO et al., 2005). Hartzell e Rinderknecht, 1996, demonstraram que a seqüência de aminoácidos 1175-1194 da subunidade α_1 dos CCDT cardíacos, possuem 70% de homologia como os resíduos 92-144 da PKC. Deste modo, é provável que inibidores da PKC liguem-se diretamente aos CCDT.

Os resultados apresentados neste estudo permitem inferir que o T_4 inibe a PKC, e esta inibição provoca um aumento da captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, uma vez que a inibição desta via de cinases, com ou sem o T_4 , estimula a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Ou ainda, a PKC pode estar envolvida com a ativação da Ca^{2+} -ATPase, deste modo aumentando o efluxo de Ca^{2+} . Esta análise está apoiada pelo fato de que a PKC estimula a atividade da Ca^{2+} -ATPase na membrana plasmática de eritrócitos e os HT aumentam a atividade desta bomba de Ca^{2+} , e estimulam a PKC em uma variedade de células (eritrócitos, músculo esquelético) (GALO et al., 1981; SMALLWOOD et al., 1988; LAWRENCE et al., 1989; WARNICK et al., 1993; DAVIS et al., 1995). Desta forma, é provável que a PKC medeia o efeito das iodotironinas na atividade da Ca^{2+} -ATPase.

Através dos estudos acima relatados, conclui-se que o T_4 atua nas proteínas cinases, exercendo influências nas vias da PKA e PKC. Os resultados apresentados neste trabalho também apontam para uma interação da ação estimulatória do T_4 na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ com a via da PKA. O T_4 pode ativar a PKA e assim fosforilar os CCDT, visto que a atividade destes canais é regulada por fosforilação.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que:

1. A atividade dos canais de Cl^- é fundamental na ação hiperpolarizante do T_4 .
2. O T_4 estimulou a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ já em 1 minuto após a incubação com o mesmo, mostrando mais um efeito rápido, não-genômico, à nível de membrana plasmática em testículos de ratos imaturos.
3. O T_3 não estimulou a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ nos tempos e doses estudados. E, ainda, inibiu significativamente a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em 5 minutos, nas doses de 10^{-5} e 10^{-6} M, e em 1 minuto na dose de 10^{-6} M.
4. O efeito estimulatório do T_4 na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ envolve a atividade dos canais de cálcio dependentes de tensão do tipo L e T.
5. O influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ estimulado por T_4 envolve os canais de K^+ dependentes de Ca^{2+} e canais de Cl^- .
6. A via da PKA está envolvida na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ estimulada por T_4 , provavelmente fosforilando os CCDT.
7. A via da PKC não está diretamente relacionada com a ação estimulatória do T_4 na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$.

Além do objetivo principal deste estudo, devido as diferentes metodologias utilizadas na tentativa de demonstrar efeitos diretos dos HT na membrana plasmática, naturalmente ficou evidenciado a interface entre duas grandes áreas - ciências biológicas (bioquímica e fisiologia) e engenharia (engenharia biomédica), e o proveito científico que esta interação possibilita.

7 PERSPECTIVAS

Em vista dos resultados apresentados neste trabalho, fica o questionamento sobre:

- O envolvimento dos outros tipos de canais de CCDT tipo N e P/Q, na ação estimulatória do T_4 de captação de $^{45}Ca^{2+}$, os quais já foram caracterizados em células de Sertoli.
- Outro ponto a ser esclarecido, é ver se há uma interrelação das vias de transdução de sinal entre a PKA e PKC na captação de Ca^{2+} estimulada pelo T_4 .
- Ainda outro fato a ser elucidado é como esta ação estimulatória na captação de Ca^{2+} poderia estar envolvida com a transdução de sinal induzida pelo T_4 (secreção de proteínas? fosforilação de canais?, etc.)
- O efeito das iodotironinas na atividade da Ca^{2+} -ATPase nestas células, entre outros (Figura 7.1).

Extracelular

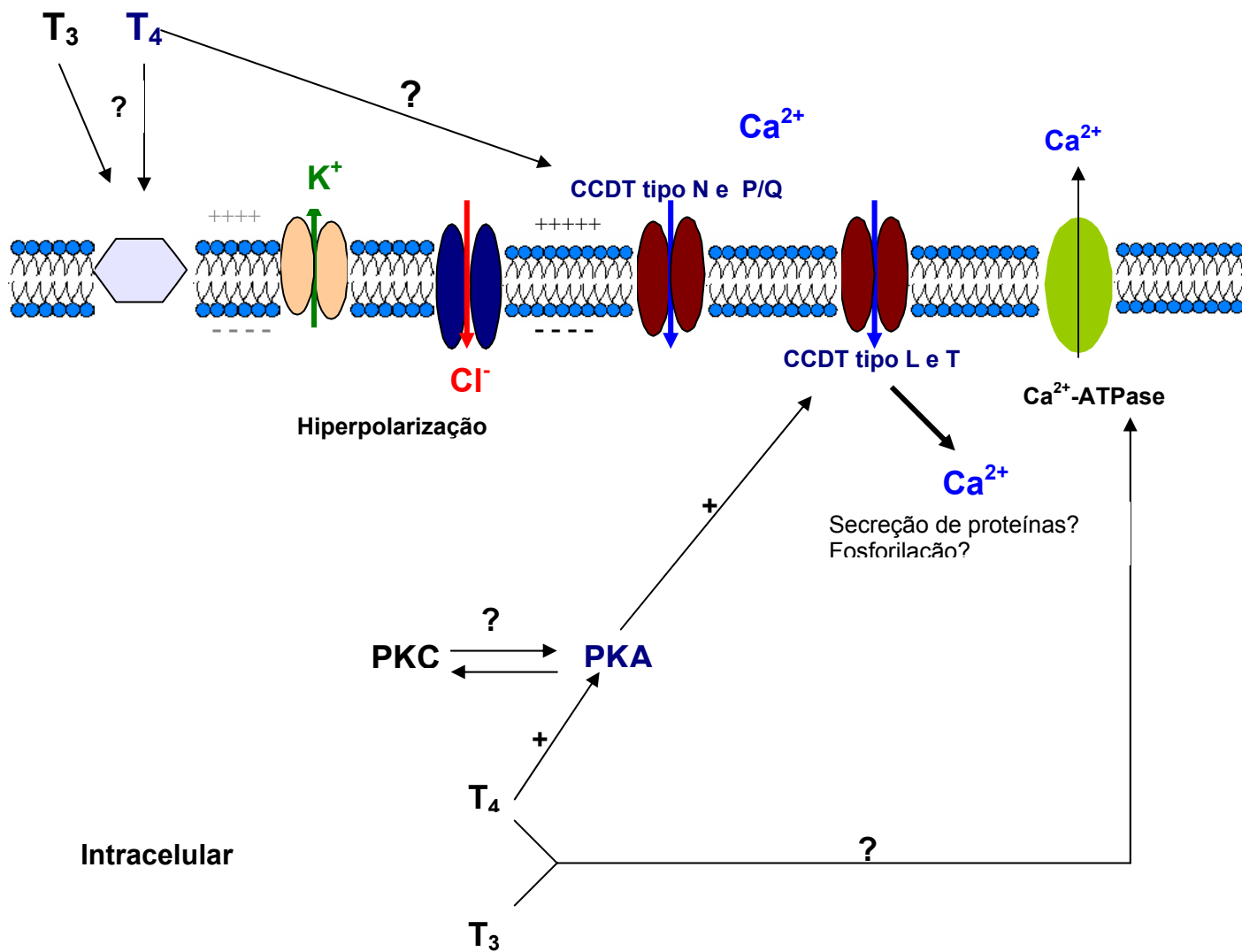


Figura 7.1 - Diagrama esquemático da capturação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ estimulada por T_4 com as perspectivas de futuros trabalhos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTON, A.; KUNZ, L.; KRIEGER, A.; MAYERHOFER, A. Two types of calcium channels in human ovarian endocrine cells: involvement in steroidogenesis. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, p. 4503-4512, 2004.

ARANDA, A.; PASCUAL, A. Nuclear hormone receptors and gene expression. **Physiological Reviews**, v. 81, p. 1269-1304, 2001.

ARMSTRONG, D.; ECKERT, R. Voltage-activated calcium channels that must be phosphorylated to respond to membrane depolarization. **Neurobiology**, v. 84, p. 2518-2522, 1987.

ARNOLD, S.; GOGLIA, F.; KADENBACH, B. 3,5-Diiodothyronine binds to subunit Va of cytochrome-c oxidase and abolishes the allosteric inhibition of respiration by ATP. **European Journal of Biochemistry**, v. 252, p. 325-330, 1998.

ASHIZAWA, K.; McPHIE, P.; LIN, K.H. CHENG, S.Y. An in vitro novel mechanism of regulating the activity of pyruvate kinase M2 by thyroid hormone and fructose 1,6-bisphosphate. **Biochemistry**, v. 30, p. 7105-7111, 1991.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 10520: Informação e documentação: citações em documentos: apresentação. Rio de Janeiro, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 14724: Informação e documentação: trabalhos acadêmicos - apresentação. Rio de Janeiro, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação: referências - elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ASTILL, D.S.; RYCHKOV, G.; CLARKE, J.D.; HUGHES, B.P.; ROBERTS, M.L.; BRETAG, A.H. Characteristics of skeletal muscle chloride channel ClC-1 and point mutant R304E expressed in Sf9 insect cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1280, p. 178-186, 1996.

BABENKO, N.A.; FILONENKO, N.S.; VIL'IASEN'OR, V.S.; NIKITIN, V.N. Stimulation of phospholipase D by thyroid hormones in hepatocytes of rats of various ages and thyroid status. **Doklady Akademii nauk SSSR**, v. 320, n. 3, p. 745-748, 1991.

BARDIN, W; PAULSEN, A. The Testes. In: WILSON, J.D.; FOSTER, D.W. **Williams: Textbook of Endocrinology**. 9.ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, p. 1848, 1998.

BARKER, S.B.; KLITGAARDH.M. Metabolism of tissue excised from thyroxine-injected rats. **American Journal of Physiology**, v. 170, p. 81-86, 1952.

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

BENCINA, M.; LEGISA, M.; READ, N.D. Cross-talk between cAMP and calcium signalling in *Aspergillus niger*. **Molecular Microbiology**, v. 56, p. 268-281, 2005.

BERG, J.J.; LIN, H.Y.; LANSING, L.; MOHAMED, N.S.; DAVIS, F.B.; MOURA, S.; DAVIS, J.P. Integrin alphaVbeta3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. **Endocrinology**, v. 146, p. 2864-2871, 2005.

BERRIDGE, M.J. Capacitative calcium entry. **Biochemistry**, v. 312, p. 1-11, 1995.

BERRIDGE, M.J. Elementary and global aspects of calcium signalling. **The Journal of Physiology**, v. 499, p. 291-306, 1997.

BERRIDGE, M.J.; BOOTMAN, M.D.; LIPP, P. Calcium – a life and death signal. **Nature**, v. 395, p. 645-648, 1998.

BERRIDGE, M.J.; BOOTMAN, M.D.; RODERICK, H.L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. **Nature Review Molecular Cellular Biology**, v. 4, p 517-529, 2003.

BIANCO, A.C, SALVATORE, D.; GEREBEN, B.; BERRY, M.J., LARSEN, P.R. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. **Endocrinology Review**, v. 23, n. 1, p. 38-89, 2002.

BOITANI C.; STEFANINI, M.; FRAGAL, A.; MORENA, A.R. Activin stimulates Sertoli cell proliferation in a defined period of rat testis developmen. **Endocrinology**, v. 136, p. 5438-5444, 1995.

BORDIN, S.; BOSCHERO, A.C.; CARNEIRO, E.M.; ATWATER, I. Ionic mechanisms involved in the regulation of insulin secretion by muscarinic agonists. **The Journal of Membrane Biology**, v. 148, n. 2, p. 177-184, 1995.

BÖSL, M.R.; STEIN, V.; HÜBNER, C.; ZDEBIK, A.A.; JORDT, Sven-Eric; MUKHOPADHYAY, A.K.; DAVIDOFF, M.S.; HOLSTEIN, Adolf-Friedrich; JENTSCH, T.J. Male germ cells and photoreceptors, both dependent on close cell-cell interactions, degenerate upon CIC-2 Cl⁻ channel disruption. **The EMBO Journal**, v.20, n.6, p.1289-1299, 2001.

BOTTA, J.A.; FARIAS, R.N. Solubilization of L-triiodothyronine binding sites on washed rat erythrocyte membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 258, p. 6690-6692, 1983.

BOTTA, J.A.; de MENDOZA, D.; MORERO, R.D. FARIAS, R.N. High affinity L-triiodothyronine binding sites from human erythrocyte membrane. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 133, p. 442-448, 1985.

BRENT, G.A. The molecular basis of thyroid action. **The New England Journal of Medicine**, v. 331, p. 847-853, 1994.

BRONSTON, C.; BRONSTON, M.A. Calcium-dependent regulation of protein synthesis in intact mammalian cells. **Annual Review of Physiology**, v. 52, p. 577-590, 1980.

BRYANT, H.J.; ENG, S.P.; KLEIN, L.E.; LO, C.S. Effects of triiodothyronine on resting membrane potential of primary cultured rat submandibular gland cells. **Cell Biology International Reports**, v. 12, p. 1027-1036, 1988.

BUZZARD, J.J.; WREFORD, N.G.; MORRISON, J.R. Thyroid hormone, retinoic acid, and testosterone suppress proliferation and induce markers of differentiation in cultured Sertoli cells. **Endocrinology**, v. 144, p. 3722-3731, 2003.

CABANTCHIK, Z.I.; GREGER, R. Chemical probes for anion transporters of mammalian cell membranes. **American Journal of Physiology**, v. 262, p. C-803-C-827, 1992.

CATTERALL, W.A. Structure and function of voltage-sensitive ion channels. **Science**, v. 242, p. 50-61, 1988.

CATTERALL, W.A. Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. **Annual Review of Cell Biology**, v. 16, p. 521-555, 2000.

CHAN, H.C.; FU, W.O.; CHUNG, Y.W.; HUANG, S.J.; CHAN, P.S.F.; WONG, P.Y.D. Swelling-induced anion and cation conductances in human epididymal cells. **The Journal of Physiology**, v. 478, p. 449-460, 1994.

CLAPHAM, D.E. Calcium signaling. **Cell**, v. 80, p. 259-268, 1995.

CLARK, S.; JORDT, S.E.; JENTSCH, T.J.; MATHIE, A. Characterization of the hyperpolarization-activated chloride current in dissociated rat sympathetic neurons. **The Journal of Physiology**, v. 506, p. 665-678, 1998.

COOKE, P.S.; MEISAMI, E. Early hypothyroidism in rats causes increased adult testis and reproductive organ size but does not change testosterone levels. **Endocrinology**, v. 129, p. 237-243, 1991.

COOKE, P.S.; ZHAO, J.-D.; BUNICK, D. Triiodothyronine inhibits proliferation and stimulates differentiation of cultured neonatal Sertoli cells: possible mechanism for increased adult rat testis weight and sperm production induced by neonatal goitrogen treatment. **Biological Reproduction**, v.51, p.1000-1005, 1994.

D'AGOSTINO, A.; MENÈ, P.; STEFANINI, M. Voltage-gated Ca^{2+} channels in rat Sertoli cells. **Biology of. Reproduction**, v. 4, p. 414-418, 1992.

DAHAN, D.; EVAGELIDIS, A.; HANRAHAN, J.W.; HINKSON, D.A.; JIA, Y.; LUO, J.; ZHU, T. Regulation of the CFTR channel by phosphorylation. **Pflugers Archiv: European journal of physiology**, v. 443, p. S92-S96, 2001.

D'AREZZO, S.; INCERPI, S.; DAVIS, F.B.; ACCONCIA, F.; MARINO, M.; FARIAS, R.N.; DAVIS, P.J. Rapid nongenomic effects of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine on the intracellular pH of L-6 myoblasts are mediated by intracellular calcium mobilization and kinase pathways. **Endocrinology**, v. 145, p. 5694-5703, 2004.

D'ARMIENTO, M.; JANINNI, E.A. Thyroid hormone action. In: TRONCONE L., SHAPIRO, B.; SATTA, M.A.; MONACO, F.; (Eds), **Thyroid diseases: basic science, pathology, clinical and laboratory diagnoses**. Boca Raton: CRC Press, p. 145-154, 1992.

DAVILA, H.M.; Molecular and functional diversity of voltage-gated calcium channels. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 868, p. 102-117, 1999.

DAVIS, F.B.; CODY, V.; DAVIS, P.J.; BORZYNSKI, L.J.; BLAS, S.D. Stimulation by thyroid hormone analogues of red blood cell Ca^{2+} -ATPase activity in vitro. Correlations between hormone structure and biological activity in a human cell system. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 258, p. 12373-12377, 1983.

DAVIS, P.J.; DAVIS, F.; LAWRENCE, W.D. Thyroid hormone regulation of membrane Ca^{2+} -ATPase activity. **Endocrinology Research**, v. 15, n. 4, p. 651-682, 1989.

DAVIS, F.B.; DAVIS, P.J.; BLAS, S.D.; GOMBAS, D.Z. Inositol phosphates modulate human red blood cell Ca^{2+} -adenosine triphosphatase activity in vitro by a guanine nucleotide regulatory protein. **Metabolism**, v. 44, p. 865-868, 1995.

DAVIS, P.J.; DAVIS, F.B. Nongenomic actions of thyroid hormone. **Thyroid**, v. 6, n. 5, p. 497-504, 1996.

DAVIS, P.J.; SHIH, A.; LIN, H.Y.; MARTINO, L.J.; DAVIS, F.B. Thyroxine promotes association of mitogen-activated protein kinase and nuclear thyroid hormone receptor (TR) and causes serine phosphorylation of TR. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 1, n. 48, p. 38032-38039, 2000.

DAVIS, P.J.; DAVIS, F.B. Nongenomic actions of thyroid hormone on the heart. **Thyroid**, v. 12, p. 459-466, 2002.

DAVIS, P.J.; TILLMANN, H.C.; DAVIS, F.B.; WEHLING, M. Comparison of the mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone and steroid hormones. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 25, p. 377-388, 2002.

DEAN, P.M.; MATTHEWS, E.K. Glucose-induced electrical activity in pancreatic islet cells. **Journal of Physiology**, v. 210, p. 255-264, 1970.

De BERNARDI, M.A.; BROOKER, G. Single cell Ca^{2+} /cAMP cross-talk monitored by simultaneous Ca^{2+} /cAMP fluorescence ratio imaging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 4577-4582, 1996.

De BOLAND, A.R.; BOLAND, R. Non-genomins signal transduction pathway of vitamin D in muscle. **Cell Signal**, v. 6, p. 717-724, 1994.

DIOCHOT, S.; RICHARD, S.; BALDY-MOULINIER, M. NARGEOT, J.; VALMIER, J. Dihydropyridines, phenylalkilamines and benzothiazepines block N-, P/Q and R-type calcium currents. **Pflugers Archiv: European journal of physiology**, v.431, p.10-19,1995.

DOLPHIN, A.C. Regulation of calcium channel activity by GTP binding proteins and second messengers. **Biochemica et Biophysica Acta**, v.1091, p.68-80, 1991.

DOSEMECI, A.; DHALLAN, R.S.; COHEN, N.M.; LEDERER, W.J.; ROGERS, T.B. Phorbol ester increases calcium current and stimulates the effects of angiotensin II on cultured neonatal rat heart myocytes. **Circulation Research**, v. 62, p. 347-357, 1988.

Du PONT, J.S.; ISRAEL, J.M. Evidence of a direct action of triiodothyronine (T_3) on the cell membrane of GH3 cells: an electrophysiological approach. **Experientia**, v. 43, p. 596-598, 1987.

DUTZLER, R.; CAMPBELL, E.B.; CADENE, M.; CHAIT, B.T.; MACKINNON, R. X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. **Nature**, v.415, p.287-294, 2002.

ESTÉVEZ, R.; SCHROEDER, B.C.; ACCARDI, A.; JENTSCH, T.J.; PUSCH, M. Conservation of chloride channel structure revealed by an inhibitor binding site in ClC-1. **Neuron**, v. 38, p. 47059, 2003.

FALKENSTEIN, E.; TILLMANN, H.C.; CHRIST, M.; FEURING, M.; WEHLING, M. Multiple actions of steroid hormones-A focus on rapid, nongenomic effects. **Pharmacological Reviews**, v. 52, p. 513-555, 2000a.

FARACH-CARSON, M.C.; DAVIS, P.J. Steroid hormone interactions with target cells: cross talk between membrane and nuclear pathways. **Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics**, v. 307, n. 3, p. 839-845, 2003.

FERRON, L.; CAPUANO, V.; DEROUBAIX, E.; COULOMBE, A.; RENAUD, J.F. Functional and molecular characterization of a T-type Ca^{2+} channel during fetal and postnatal rat heart development. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 34, p. 533-546, 2002.

FINLAYSON, K.; MCLUCKIE, J.; HERN, J.; ARAMORI, I.; OLVERMAN, H.J.; KELLY, J.S. Characterisation of [^{125}I]-apamin binding sites in rat brain membranes with HE293 cells transfected with SK channel subtypes. **Neuropharmacology**, v. 41, n. 3, p. 341-350, 2001.

FISHER, D. Physiological variations in thyroid hormones: physiological and pathological considerations. **Clinical Chemistry**, v. 42, p. 135-139, 1996.

FITTS, R.H.; WINDER, W.W.; BROOKE, M.H.; KAISER, K.K.; HOLLOSZY, J.O. Contractile, biochemical, and histochemical properties of thyrotoxic rat soleus muscle. **American Journal Physiology**, v. 238, p. C15-C20, 1980.

FRAGALE, A.; AGUANNO, S.; KEMP, M.; REEVES, M.; PRICE, K.; BEATTIE, R.; CRAIG, P.; VOLSEN, S.; SHER, E.; D'AGOSTINO, A. Identification and cellular localisation of voltage-operated calcium channels in immature rat testis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 162, p. 25-23, 2000.

FRANCAVILLA, S.; CORDESCHI, G.; PROPERZI, G.; Di Cicco, L.; JANNINI, E.A.; PALMERO, S.; FUGASSA, E.; LORAS, B.; D'ARMIENTO, M. Effect of thyroid hormone on the pre- and post-natal development of the rat testis. **Journal of Endocrinology**, v. 129, p. 35-42, 1991.

FRIZZEL, R.A.; HALM, D.R.; RECHKEMMER, G.; SHOEMAKER, R.L. Chloride channel regulation in secretory epithelia. **Federation Proceedings**, v. 45, p. 2727-2731, 1986.

FUGASSA, E.; PALMERO, S.; GALLO, G. Triiodothyronine decreases the production of androgen-binding protein by rat Sertoli cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 143, p. 241-247, 1987.

GAHRBI, J.; TORRESANI, J. High affinity thyroxine binding to purified rat liver plasma membranes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 88, p. 170-177, 1979.

GALO, M.G.; UNATES, L.E.; FARIAS, R.N. Effect of membrane fatty acid composition on the action of thyroid hormones on $(Ca^{2+} + Mg^{2+})$ -adenosine triphosphatase from rat erythrocyte. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 256, p. 7113-7114, 1981.

GAO, T.; YATANI, A.; DELL'ACQUA, M.L.; SAKO, H.; GREEN, S.A.; DASCAL, N.; SCOTT, J.D.; HOSEY, M.M.; cAMP-dependent regulation of cardiac L-type Ca^{2+} channels requires membrane targeting of PKA and phosphorylation of channel subunits. **Neuron**, v. 19, p. 185-196, 1997.

GARCIA, L.; FAHMI, M.; PREVARSKAYA, N.; DUFY, B.; SARTOR, P. Modulation of voltage-dependent Ca^{2+} conductance by changing Cl^- concentration in rat lactotrophs. **The American Journal of Physiology**, v. 272, p. C1178-1185, 1997.

GHOSH, M.; GHARAMI, K.; PAUL, S.; DAS, S. Thyroid hormone-induced morphological differentiation and maturation of astrocytes involves activation of protein kinase A and ERK signalling pathway. **European Journal of Neuroscience**, v. 22, p. 1609-1617, 2005.

GLOSSMANN, H.; STRIESSNIG, J. Molecular property of Ca^{2+} channels. **Review Physiol Biochem. Pharmacol**, v. 114, p. 1-105, 1990.

GORCZYNSKA, E.; HANDELSMAN, D.J. The role of calcium in follicle-stimulating hormone signal transduction in Sertoli cells.toli cell. **The Journal of Biology end Chemistry**, v. 266, p. 23739-23744, 1991.

GORCZYNSKA, E.; HANDELSMAN, D.J. Androgen rapidly increase the cytosolic calcium concentration in Sertoli cell. **Endocrinology**, v. 136, p. 2052-2059, 1995.

GORDIENKO, D.V.; ZHOLOS, A.V.; BOLTON, T.B. Membrane ion channels as physiological targets for local Ca^{2+} signalling. **Journal of Microscopy**, v. 196, p. 305-316, 1999.

GRASSO, P.; REICHERT, L.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, p. 3029-3036, 1989.

GRASSO, P.; REICHERT, L.E. Follicle-stimulating hormone receptor-mediated uptake of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ by cultured rat Sertoli Cells does not require activation of cholera toxin or pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide binding proteins or adenylate cyclase. **Endocrinology**, v. 127, p. 949-956, 1990.

GRAY, P.C.; TIBBS, V.C.; CATTERAL, W.A.; MURPHY, B.J. Identification of a 15-kDa cAMP-dependent protein kinase-anchoring protein associated with skeletal muscle L-type calcium channels. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 6297-6302, 1997.

GRAY, P.C.; SCOTT, J.D.; CATTERAL, W.A. Regulation of ion channels by cAMP-dependent protein kinase and A-kinase anchoring proteins. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 8, p. 330-334, 1998.

GREENSPAN, M.F. The thyroid gland. In: Greenspan FS,Strewler GJ, editors. **Basic & Clinical Endocrinology**, p.193-262, 1997.

GRÜNDER, S.; THIEMANN, A.; PUSCH, M.; JENTSCH, T.J. Regions involved in the opening of CIC-2 chloride channel by voltage and cell volume. **Nature**, v. 360, p. 759-762, 1992.

GU, Y.; PRESTON, M.R.; el HAJ, A.J.; HAMID, J.; ZAMPONI, G.W.; HOWL, J.; PUBLICOVER, S.J. Osteoblasts derived from load-bearing bones of the rat express both L-and T-like voltage operated calcium channels and mRNA for $\alpha 1C$, $\alpha 1D$ and $\alpha 1G$ subunits. **Pflugers Archiv: European journal of physiology**, v. 438, p. 553-560, 1999.

GUISSOUMA, H.; GHORBEL, M.T.; SEUGNET, I.; OUATAS, T.; DEMENEIX, B.A. Physiological regulation of hypothalamic TRH transcription in vivo is T_3 receptor isoform specific. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 12, n. 15, p. 1755-1764, 1998.

GÜNTHER, W.; LÜCHOW, A.; CLUZEAUD, F.; VANDEWALLE, A.; JENTSCH, T.J. CIC-5, the chloride channel mutated in Dent's disease, colocalizes with the proton pump in endocytotically active kidney cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 8075-8080, 1998.

HABERMANN, E. Bee and wasp venoms. **Science**, v. 177, p. 314-322, 1972.

HARPER, J.F.; HADDOX, M.K.; JOHANSON, R.; HANLEY, R.M.; STEINER, A.L. Compartmentation of second messenger action: immunocytochemical and biochemical evidence. **Vitamins and Hormones**, v. 42, p. 197-252, 1985.

HARTZELL, C.H.; RINDERKNECHT, A. Calphostin C, a widely used protein kinase inhibitor, directly and potently blocks L-type Ca channels. **American Journal of Physiology**, v. 270, p. C1293-1299, 1996.

HAYES, M.H. **Digital signal processing**. NY: MCGRAW-HILL, 1999.

HE, J.Q.; PI, Y.; WALKER, J.W.; KAMP, T.J.; Endothelin-1 and photoreleased diacylglycerol increase L-type Ca^{2+} current by activation of protein kinase C in rat ventricular myocytes. **Journal of Physiology (Lond.)**, v. 524, p. 807-820, 2000.

HERLITZE, S.; ZHONG, H.; SCHEUER, T.; CATTERALL, W.A. Allosteric modulation of Ca^{2+} channels by G proteins, voltage-dependent facilitation, protein kinase C and $\text{Ca}_v\beta$ subunits. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, p. 4699-4704, 2001.

Hernández-González, E.O; Sosnik, J.; Edwards, J.; Acevedo, J.J.; Mendoza-Lujambio, I.; López-González, I., Demarco, I., Wertheimer, E.; Darszon, A.; Visconti, P.E. Sodium and epithelial sodium channels participate in the regulation of the capacitation-associated hyperpolarization in mouse sperm Sodium and epithelial sodium channels participate in the regulation of the capacitation-associated hyperpolarization in mouse sperm. **The Journal of biological chemistry**. In press, 2005.

HILLE, B. **Ion channels of excitable membranes**. 3 ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates, p. 95-129, 2001.

HOCKERMAN, GH.; PETERSON, BZ.; JOHSON, BD.; CATTERALL, WA. Molecular determinants of drug binding and action on L-type calcium channels. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 37, p. 361-196, 1997.

HOFMANN, F.; LACINOVA, L.; KLUGBAUER, N. Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v. 139, p. 33-87, 1999.

HOLSBERGER, D.R.; JIRAWATNOTAI, S.; KIYOKAWA, H.; COOKE, P.S. Thyroid hormone regulates the cell cycle inhibitor p27^{Kpi} in postnatal murine Sertoli cells. **Endocrinology**, v. 144, p. 3732-3738, 2003.

HOSEY, M.M.; LAZDUNSKI, M. Calcium channels: molecular pharmacology, structure and regulation. **Journal of Membrane Biology**, v. 104, p. 81-105, 1988.

HUMMERICH, H.; SOBOLL, S. Rapid stimulation of calcium uptake into rat liver by L-tri-iodothyronine. **Journal of Biochemistry**, v. 1, n. 2, p. 363-367, 1989.

HUNTER, T. 1001 protein kinases redux-towards 2000. **Seminars in Cell Biology**, v. 5, p. 367-76, 1994.

INCERPI, S.; LULY, P.; DE VITO, P.; FARIAS, R.N. Short-term effects of thyroid hormones on the Na/H antiporter in L-6 mioblasts: high molecular specificity for 3,3', 5-triiodo-L-thyronine. **Endocrinology**, v. 140, p. 683-689, 1999.

INCERPI, S.; DE VITO, P.; LULY, P.; SPAGNUOLO, S.; LEONI, S. Short-term effect of thyroid hormones and 3,5-diiodothyronine on membrane transport systems in chick embryo hepatocytes. **Endocrinology**, v. 143, p. 1660-1668, 2002.

JACOBSEN, M.S. Ações da testosterona e da glibenclamida no transporte de membrana das células de Sertoli: canais de KATP e canais de cálcio dependentes de voltagem (CCDV). 2003. Tese de doutorado em ciências biológicas: Fisiologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

JAGANNATHAN, S.; PUNT, E.L.; GU, Y.; ARNOULT, C.; SAKKAS, D.; BARRATT, C.L.; PUBLICOVER, S.J. Identification and localization of T-type voltage-operated calcium channel subunits in human male germ cells. Expression of multiple isoforms. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 8449-8456, 2002.

JANNINI, E.A.; DOLCI, S.; ULISSE, S.; NOKODEM, V.M. Developmental regulation of the thyroid hormone receptor $\alpha 1$ mRNA expression in the rat testis. **Molecular Endocrinology**, V. 8, P. 89-96, 1994.

JANNINI, E.A.; ULISSE, S.; D'ARMIENTO, M. Thyroid hormone and male gonadal function. **Endocrine Review**, v.16, p.443-459, 1995.

JANNINI, E.A.; CAROSA, E.; RUCCI, N.; SCREPONI, E.; D'ARMIENTO, M. Ontogeny and regulation of variant thyroid hormone receptor isoforms in developing rat testis. **Journal of Endocrinology Investigation**, v. 22, p. 843-848, 1999.

JENSEN, B.S.; STROBAEK, D.; CHRISTOPHERSEN, P.; JORGENSEN, T.D.; HANSEN, C.; SILAHTAROGLU, A.; OLESEN, S.P.; AHRING, P.K. Characterization of the cloned human intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel. **American Journal of Physiology**, v. 275, p. C848-856, 1998.

JENSEN, B.S.; STROBAEK, D.; OLESEN, S.P CHRISTOPHERSEN, P. The Ca^{2+} -activated K^+ channel of intermediate conductance: a molecular target for novel treatments? **Current Drugs Targets**, v. 2, p. 401-422, 2001.

JENTSCH, T.J.; STEIN, V.; WEINREICH, F.; ZDEBIK, A.A. Molecular structure and physiological function of chloride channels. **Physiological Reviews**, v.82, p.503-568, 2002.

JIANG, Z.L.; YE, J.H. Protein kinase C is involved in ethanol potentiation of glycine-gated Cl^- current in rat neurons of ventral tegmental area. **Neuropharmacology**, v. 44, p.493-502, 2003.

JIANG, B.; HATTORI, N.; LIU, B.; NAKAYAMA, Y.; KITAGAWA, K.; INGAKI, C. Suppression of cell proliferation with induction of p21 by Cl^- channel blockers in human leukemic cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 488, p. 27-34, 2004.

JOFFRE.; ROCHE, A. Follicle-stimulating hormone induces hyperpolarization of immature rat Sertoli cells in monolayer culture. **Journal of Physiology**, v. 60, p. 481-499, 1988.

JOHNSON,B.D.; BROUSAL, J.P.; PETERSON, B.Z.; GALLOMBARDO, P.A.; HOCKERMA, G.H.; et al. Modulation of the cloned skeletal muscle L-type Ca^{2+} channel by anchored cAMP-dependent protein kinase. **The Journal of Neuroscience**, v. 17, p. 1243-1255, 1997.

JONES, K.E.; BRUBAKER, J.H.; CHIN, W.W. Evidence that phosphorylation events participate in thyroid hormone action. **Endocrinology**, v. 134, p. 543-548, 1994.

JONES, K.; SHMYGOL, A.; KUPITTAYANANT, S.; WRAY, S. Electrophysiological characterization and functional importance of calcium-activated chloride channel in rat uterine myocytes. **Cellular and Molecular Physiology**, v. 424, p. 1224-1227, 2004.

JORDT, S.E.; JENTSCH, T.J. Molecular dissection of gating in the ClC-2 chloride channel. **EMBO Journal**, v. 16, p. 1582-1592, 1997.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M. **Membrane Potential in Essentials of Neural Science and Behavior**, Prentice Hall International Inc., London, UK, Sessão III, cap. 8, p. 133-147, 1995.

KAVOK, N.S.; KRASILNIKOVA, A.O.; BABENKO, N.A. Thyroxine signal transduction in liver cells involves phospholipase C and phospholipase D activation. Genomic independent action of thyroid hormone. **BMC Cell Biology**, v. 2, p. 5, 2001.

KAWAI, T.; WATANABE, M. Blockade of Ca-activated K conductance by apamin in rat sympathetic neurones. **British Journal of Pharmacology**, v. 87, p. 225-232, 1986.

KAŽIĆ, T.; GOJKOVIĆ-BUKARICA, L. Ion channels and drug development. Focus on potassium channels and their modulators. **Medicine and Biology**, v. 6, n. 1, p. 23-30, 1999.

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

KO, J.H.; PARK, W.S.; EARM, Y.E. The protein inhibitor, staurosporine, inhibits L-type Ca^{2+} current in rabbit atrial myocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 329, p. 531-537, 2005.

KOESTER, J.; SIEGELBAUM, S. Ion channels. In: KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M. **Essentials of neural science and behavior**. Ed Prentice Hall International, Inc. p. 115-132, 1995.

KÖHLER, M.; HIRSCHBERG, B.; BOND, C.T.; KINZIE, J.M.; MARRION, N.V.; MAYLIE, J.; ADELMAN, J.P. Small conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. **Science**, v. 273, p. 1709-1714, 1996.

KOHRLE, J. Local activation and inactivation of thyroid hormones: The deiodinase family. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 151, p. 103-119, 1999.

KORNAK, U.; KASPER, D.; BÖSL, M.R.; KAISER, E.; SCHWEIZER, M.; SCHULZ, A.; FRIEDRICH, W.; DELLING, G.; JENTSCH, J.T. Loss of the CIC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. **Cell**, v.104, p.205-215, 2001.

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

KRUEGER, B.K. Toward an understanding of structure and function of ion channels. **The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, v. 8, p. 1906-1914, 1989.

KUMAR, V.; PRASAD, R. Thyroid hormones stimulate calcium systems in rat intestine. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1639, p. 185-194, 2003.

LAI, Z-F.; CHEN, Y-Z.; NISHI, K. Modulation of intracellular Cl⁻ homeostasis by lectin-stimulation in Jurkat T lymphocytes. **European Journal of Pharmacology**, v. 482, p. 1-8, 2003.

LALEVEÉ, N; PLUCIENNIK, F.; JOFFRE, M. Voltage-dependent calcium current with properties of T-type current in Sertoli cells from immature rat testis in primary cultures. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 680-687, 1997.

LALEVEÉ, N; JOFFRE, M. Inhibition by cAMP of calcium-activated chloride currents in cultured Sertoli cells from immature testis. **Journal of Membrane Biology**, v. 169, p. 167-174, 1999.

LAMBERT, G.; BECKER, B.; SCHREIBER, R.; BOUCHEROT, A.; RETH, M.; KUNZELMANN, K. Control of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression by BAP31. **The Journal of Biological Chemistry**, v.276, p.20340-20345, 2001.

LAWRENCE, W.D.; SCHOENL, M.; DAVIS, P.J. Stimulation in vitro of rabbit erythrocyte cytosol phospholipid-dependent protein kinase activity. A novel action of thyroid hormone. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 4766-4768, 1989.

LAZZAR, M.A. Thyroid hormone receptor: multiple forms, multiple possibilities. **Endocrinology Reviews**, v. 14, p. 184-193, 1993.

LEITE, L.; LUCHI, R.; VON LEBEBUR, E.I.C.F.; LOSS, E.S.; WASSERMANN, G.F. Testosterone induces immediate membrane depolarization and stimulates $^{45}\text{Ca}^{++}$ uptake in Sertoli cells from rats of different maturation stages. **Medical Science Research**, v. 27, p. 25-28, 1999.

LEVITAN, I.B. Phosphorylation of ion channels. **Journal of Membrane Biology**, v. 87, p. 177-190, 1985.

LIN H.Y.; THACORF, H.R.; DAVIS, F.B.; DAVIS, P.J. Potentiation by thyroxine of interferon-gamma-induced antiviral state requires PKA and PKC activities. **The American Journal of Physiology**, v. 271, p. C1256-C1261, 1996.

LIN, H.Y.; YEN, P.M.; DAVIS, F.B.; DAVIS, P.J. Protein synthesis-dependent potentiation by thyroxine of antiviral activity of interferon-gamma. **The American Journal of Physiology**, v. 273, p. C1225-1232, 1997.

LIN, H.Y.; DAVIS, F.B.; GORDINIER, J.K.; MARTINO, L.J.; DAVIS, P.J. Thyroid hormone induces activation of mitogen-activated protein kinase in cultured cells. **The American The Journal of Physiology**, v. 276, p. 1014-1024, 1999.

LIN, H.Y.; SHIH, A.; DAVIS, F.B.; DAVIS, P.J. Thyroid hormone down regulates TGF- α -induced immediate-early gene expression via a PKA-dependent pathway. Proceedings of the 83rd Annual Meeting of the Endocrine Society, June, 2001.

LONG, C. Chemical Data. In: VAN NOSTRAND, D. **Biochemist's handbook**. New Jersey, p. 85, 1961.

LOSS, E.; BARRETO, K.P.; LEITE, L.D.; WASSERMANN, G.F. Comparative study of the actions of isoproterenol and retinol in the amino acid accumulation, $^{45}\text{Ca}^{++}$ uptake, and membrane potential in Sertoli cells. **Medical Science Research**, v. 26, p.195-199, 1998.

LOTSCHAW, D.P. Role of membrane depolarization and T-type Ca^{2+} channels in angiotensin II and K^{+} stimulated aldosterone secretion. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 175, p. 157-171, 2001.

LUDEWIG, U.; PUSCH, M.; JENTSCH, T.J. Two physically distinct pores in the dimeric CIC-0 chloride channel. **Nature**, v.383, p.340-343, 1996.

MAGER, S.; PALTI, Y.; BINAH, O. Mechanism of hyperthyroidism-induced modulation of the L-type Ca^{2+} current in guinea pig ventricular myocytes. **Pflugers Archiv: European journal of physiology**, v. 421, p. 425-430, 1992.

MARAN, R.R. Thyroid hormones: their role in testicular steroidogenesis. **Archiv of Andrology**, v. 49, p. 375-88, 2003.

MARINISSEN, M.J.; SELLES, J.; BOLAND, R. Involvement of protein kinase C in $1,25(\text{OH})_2$ -vitamin D_3 regulation of calcium uptake by cultured myocytes. **Cell Signal**, v. 6, p. 531-538, 1994.

MARINO, F.; COSENTINO, M.; FERRARI, M.; CATTANEO, S.; FRIGO, G.; FIETTA, A.M.; LECCHINI, S.; FRIGO, G.M. Intracellular calcium changes induced by the endopeptide triakontatetrapeptide in human polymorphonuclear leukocytes: role of protein kinase C and effect of calcium channel blockers. **Cell Communication and Signaling**, v. 2, p. 6, 2004.

MARTY, A.; TAN, Y.P.; TRAUTMANN, A. Three types of calcium-dependent channels in rat lacrimal gland. **Journal of Physiology**, v. 357, p. 293-325, 1984.

MASSHEIMER, V.; de BOLAND, A.R. Modulation of $1,25$ -dihydroxyvitamin D_3 -dependent Ca^{2+} uptake in skeletal muscle by protein kinase C. **Biochemical Journal**, v. 281, p. 349-352, 1992.

MASTROCOLA, T.; PORCELLI, A.M.; RUGOLO, M. Role of CFTR and anion exchanger in bicarbonate fluxes in C127 cell lines. **FEBS Letters**, v. 440, p. 268-272, 1998.

McDONALD, T.F.; PELZER, S.; TRAUTWEIN, W.; PELTZER, D. Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells. **Physiological Reviews**, v.74, p.365-507, 1994.

McHUGH, D.; SHARP, E.M.; SCHEUER, T.; CATTERALL, W.A. Inhibition of cardiac L-type calcium channels by protein kinase C phosphorylation of two sites in the N-terminal domain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.97, p. 12334-12338, 2000.

MEACHEM, S.J.; McLACHLAN, R.I.; De KRETSSER, D.M.; ROBERTSON, D.M.; WREFORD, N.G. Neonatal exposure of rats to recombinant follicle stimulating hormone increases adult Sertoli and spermatogenic cell numbers. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 36-44, 1996.

MENEGAZ, D; ZAMONER, A.; ROYER, C.; LEITE, L.D.; BORTOLOTO, Z.A.; SILVA, F.R.M.B. Rapid responses to thyroxine in the testis: active protein synthesis-independent pathway. **Molecular and Cellular Endocrinology**. In press, 2006.

MERMELSTEIN, P.G.; BECKER, J.B.; SURMEIER, D.J. Estradiol reduces calcium currents in rat neostriatal neurons via a membrane receptor. **Journal of Neuroscience**, v, 16, p. 595-604, 1996.

MIRANDA, M.J.; LIEDKE, P.E.R.; LEITE, L.; LOSS, E.S.; WASSERMANN, G.F. Glibenclamide changes membrane potential and stimulates $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake and amino acid accumulation in Sertoli cells of immature rats. **Medical Science Research**, v. 26, p. 703-706, 1998.

MOORE, T.M.; CHETHAM, P.M.; KELLY, J.J.; STEVENS, T. Signal transduction and regulation of lung endothelial cell permeability. Interaction between calcium and cAMP. **Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 19, p. L203-L222, 1998.

MORI, Y.; NIIDOME, T.; FUJITA, Y.; MYNLIEFF, M.; DIRKSEN, R.T.; BEAM, K.G.; IWABE, N.; MIYTA, T.; FURUTAMA, D.; FURUICHI, T.; MIKOSHIBA, K. Molecular diversity of voltage-dependent calcium channel. **Annals of New York Academy of Sciences**. V.707, p.87-108, 1993.

MUYDERMAN, H.; SINCLAIR, J.; JARDEMARK, K.; HANSSON, E.; NILSSON, M. Activation of beta-adrenoceptors opens calcium-activated potassium channels in astroglial cells. **Neurochemistry International**, v. 38, n. 3, p. 269-276, 2001.

NAGAYAMA, T.; KOSHIKA, T.; HISA, H.; KIMURA, T.; SATOH, S. Apamin-sensitive SKCa channels modulate adrenal catecholamine release in anesthetized dogs. **European Journal of Pharmacology**, v. 327, p. 135-141, 1997.

NAOR, Z.; HARRIS, D.; SHACHAM, S. Mechanism of GnRH receptor signaling: combinatorial cross-talk of Ca^{2+} and protein kinase C. **Front Neuroendocrinol.**, v. 19, p. 1-19, 1998.

NIKODEM, V.M.; PETTY, K.J.; MITSUHASHI, T.; DESVERGNE, B.; Structure of thyroid hormone receptors. In: MONTE, A.; GEER, B.(Eds.). **The thyroid gland**. New York: Raven press, p. 307-321, 1990.

NORMAN, A.W.; LITWACK, G. Thyroid Hormones. IN: NORMAN, A.W.; LITWACK, G. **Hormones**, 2.ed. San Diego: Academic Press, p.169-191, 1997.

NORMAN, A.W.; MATHEW, M.T.; DEREK, P.G.N. Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 3, p. 127-141, p. 2004.

NUNES, M.T.; BIANCO, A.C.; MIGALA, A.; AGOSTINI, B. HASSELBACH W. Thyroxine induced transformation in sarcoplasmic reticulum of rabbit soleus and psoas muscles. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 40, p. 726-734, 1985.

OLIVEIRA, B.M.; MILJANICH, G.P.; RAMACHANDRAN, J. ADAMS, M.E. Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the omega-conotoxins and omega-agatoxins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 63, p. 823-867, 1994.

OPPENHEIMER, J.H.; SCHWARTZ, H.L.; JUMP, D.B.; MARIASH, C.N. Recent studies of thyroid hormone action at the hepatocellular level. **Hormone and Metabolic Research**, v. 14, p. 6-15, 1984.

PALADE, P.T.; BARCHI, R.L. On the inhibition of muscle membrane chloride conductance by aromatic carboxylic acids. **The Journal of General Physiology**, v. 69, p. 879-896, 1977.

PALMERO, S.; PRATI, M.; BARRECA, A.; MINUTO, F.; GIORDANO, G.; FUGASSA, E. Thyroid hormone stimulates the production of insulin-like growth factor I (IGF-I) by rat Sertoli cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 68, p. 61-65, 1990.

PEREZ-REYES, E. Molecular physiology of low-voltage-activated T-type calcium channels. **Physiology Review**, v. 83, p. 117-161, 2003.

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

PLIAM, N.B.; GOLDFINE, I.D.; High affinity thyroid hormone binding sites on purified rat liver plasma membranes . **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v.79, p.166-172, 1977.

PUTNEY, J.W Jr. Capacitative calcium entry revisited. **Cell Calcium**, v. 11, p. 611-624, 1990.

RIOS, E., PIZARRO, G. Voltage sensor of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. **Physiological Reviews**, v. 71, p. 849-908, 1991.

ROWAN, HARVEY. Toxins affecting K⁺ channels. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 29, n. 12, p. 1765-1780, 1996.

RUBIN, C.S. A kinase anchor proteins and the intracellular targeting of signals carried by cyclic AMP. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1224, p. 467-479, 1994.

RUBINACCI, A.; DIVIETI, P.; LODIGIANI, S.; De PONTI, A.; SAMAJA, M. Thyroid hormone and active calcium transport of inside-out red cell membrane vesicles. **Biochemical Medicine and Metabolic Biology**, v. 48, p. 235-240, 1992.

SAH, P. Ca^{2+} -activated K^+ currents in neurones: types, physiological roles and modulation. **Trends in Neuroscience**, v. 19, p. 150-154, 1996.

SAKAGUCHI, Y.; CUI, G.; SEN, L. Acute effects of thyroid hormone on inward rectifier potassium channel currents in guinea pig ventricular myocytes. **Endocrinology**, v. 137, p. 4744-4751, 1996.

SAMUELS, H.H. Cis-acting elements of the rat growth hormone gene, which mediate basal and regulated expression by thyroid hormone. **The Journal of biological chemistry**, v. 262, p. 6373-6382, 1987.

SANTOS, R.A.; GIANNOCCO, G.; NUNES, M.T. Thyroid hormone stimulates myoglobin expression in soleus and extensorum digitalis longus muscles of rats: Concomitant alterations in the activities of Krebs cycle oxidative enzymes. **Thyroid**, v. 6, p. 545-550, 2001.

SARGENT, P.B. Electrical Signaling em An Introduction to Molecular Neurobiology. In: HALL, A.W. e 11 contribuidores. Massachusetts, USA: Sinauer Associate, Ibnc. Publishers, Sunderland, Cap.2, p. 33-80, 1992.

SARTOR, P.; DUFY-BARBE, L.; CORCUFF, J.B.; TAUPIGNON, A.; DUFY, B. Electrophysiological response to thyrotropin-releasing hormone of rat lactotrophs in primary culture. **Am The Journal of physiology**, v. 258, p. 311-319, 1990.

SATOH, H. Inhibition in L-type Ca^{2+} channel by stimulation of protein kinase C in isolated guinea pig ventricular cardiomyocytes. **General Pharmacology**, v. 23, p. 1097-1102, 1992.

SEGAL, J.; GORDON, A. The effect of actinomycin D, puromycin, cycloheximide and hydroxyurea on 3',5,3-triiodo-L-thyronine stimulated 2-deoxy-D-glucose uptake in chick embryo heart cells in vitro. **Endocrinology**, v. 101, p. 150-156, 1977.

SEGAL, J.; HARDIMAN, J.; INGBAR, S.H. Stimulation of calcium-ATPase activity by 3,5,3'-tri-iodothyronine in rat thymocyte plasma membranes. **Biochemistry Journal**, v. 261, p. 749-754, 1989.

SEGAL, J. In vivo effect of 3,5,3'-tri-iodothyronine on calcium uptake in several tissues in the rat: Evidence for a physiological role for calcium as the first messenger for the prompt action of thyroid hormone at the level of the plasma membrane. **Endocrinology**, v. 127, p. 17-24, 1990.

SHIH, A.; LIN, H.Y.; DAVIS, F.B.; DAVIS, P.J. Thyroid hormone promotes serine phosphorylation of p53 by mitogen-activated protein kinase. **Biochemistry**, v. 6, n. 9, 2870-2878, 2001.

SHUPNIK, M.A. Thyroid hormone suppression of pituitary hormone gene expression. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders**, v. 1, p. 35-42, 2000.

SILINSKY, E.M. In: **Monitoring Neuronal Activity**. Ed: Stanford JA., Oxford University Press, p. 29-57, 1992.

SILVA, F.R.M.B.; LEITE, L.D.; BARRETO, K.P.; D'AGOSTINI, C.; ZAMONER, A. Effect of 3,5,3'-Triiodo-L-Thyronine on amino acid accumulation and membrane potential in Sertoli cells of the rat testis. **Life Science**, v. 69, p. 977-986, 2001.

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

SMALLWOOD, J.I.; GUGI, B.; RASMUSSEN, H. Regulation of erythrocyte Ca^{2+} pump activity by protein kinase C. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p. 2195-2202, 1988.

SMITH, S W. **The Scientist and Engineer's Guide to Digital Signal Processing**. California: Technical Publishing, 1997.

SNEDECOR, G.W.; COCKRAN, W.G. Correlation. In: **Statistical Methods**. Ames, USA: The Yoma State University Press, p. 172-195, 1973.
SPEDDING, M.; PAOLETTE, R. III. Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying function. **Pharmacological Reviews**, v.44, p.363-376, 1992.

STEA, A.; SOONG, T.W.; SNUTCH, T.P. Determinants of PKC-dependent modulation of a family of neuronal calcium channels. **Neuron**, v. 15, p. 929-940, 1995.

STEINMEYER, K.; ORTLAND, C.; JENTSCH, T.J. Primary structure and functional expression of a developmentally regulated skeletal muscle chloride channel. **Nature**, v. 354, p. 301-304, 1991.

STEINMEYER, K.; SCHWAPPACH, B.; BENS, M.; VANDEWALLE, A.; JENTSCH, T.J. Cloning and functional expression of rat CLC-5, a chloride channel related to kidney disease. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 31172-31177, 1995.

STEN-KUNDSSEN, O. **Biological Membranes: Theory of transport potentials and electric impulses**. Nova York: Cambridge University Press, 2002.

STOBRAWA, S.M.; BREIDERHOFF, T.; TAKAMORI, S.; ENGEL, D.; SCHWEIZER, M. ZDEBIK, A.A.; BÖSL, M.R.; REUTHER, K.; JAHN, H.; DRAGUHN, A.; et al. Disruption of CIC-3, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus. **Neuron**, v.29, p.185-196, 2001.

STRIESSNIG, J.; GRABNER, M.; MITTERDORFER, J.; HERING, S.; SINNEGGER, M.; GLOSSMANN, H. Structural basis of drug binding to L Ca²⁺ channels. **TIPS Book Reviews**, v. 98, p. 1171-1177, 1998.

STRANGE, K.; EMMA, F.; JACKSON, PS. Cellular and molecular physiology of volume-sensitive anion channels. **American Journal of Physiology**, v.270, p. C711-C730, 1996.

TAKAHASHI, M.; SEAGAR, M.J.; JONES, J.F.; REBER, B.F.; CATTERAL, W.A. Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v, 84, p. 5478-5482, 1987.

TARANTA, A.; MORENA, A.R.; BARBACCI, E.; D'AGOSTINO, A. ω -Conotoxin-sensitive Ca²⁺ voltage-gated channels modulate protein secretion in cultured rat Sertoli cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 126, p. 117-123, 1997.

THIEMANN, A.; GRÜNDER, S.; PUSCH, M.; JENTSCH, T.J. A chloride channel widely expressed in epithelial and non-epithelial cells. **Nature**, v. 356, p. 57-60, 1992.

TING, Y.T.; BHAT, M.K.; WONG, R.; CHENG, S. Tissue-specific stabilization of the thyroid hormone beta nuclear receptor by phosphorylation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 4129-4134, 1997.

TSENG, G.N.; BOYDEN, P.A. Different effects of intracellular Ca and protein kinase C on cardiac T and L Ca currents. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 261, p. H364-H379, 1991.

TSIEN, R.W.; ELLINOR, P.T.; HORNE, W.A. Molecular diversity of voltage-dependent Ca⁺⁺ channels. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 12, p. 349-354, 1991.

ULISSE, S.; JANNINI, E.A.; CAROSA, E.; PIERSANTI, D.; GRAZIANO, F.M.; D'ARMIENTO, M. Thyroid hormone stimulates glucose transport and GLUT1 mRNA in rat Sertoli cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 87, p. 131-137, 1992.

ULLRICH, N.; SONTHEIMER, H. Cell cycle-dependent expression of a glioma-specific chloride current: proposed link to cytoskeletal changes. **American Journal of Physiology**, v. 273, p. C1290-C1297, 1997.

VANDER, A.J.; SHERMAN, J.H.; LUCIANO, D. In: **Human Physiology**. 6th ed. New York: McGraw-Hill Inc., p.164-190, 1994.

VAN HAASTER, L.H.; DE JONG, F.H.; DOCTER, R.; DE ROOIJ, D.G. High neonatal triiodothyronine levels reduce the period of Sertoli cell proliferation and accelerate tubular lumen formation in the rat testis, and increase serum inhibin levels. **Endocrinology**, v. 133, p. 755-760, 1993.

VAZQUEZ, G.; BOLAND, R.I.; De BOLAND, A.R. Modulation by 1,25(OH)₂-vitamin D₃ of the adenylyl cyclase/cyclic AMP pathway in rat and chick myoblasts. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1269, p. 91-97, 1995.

VAZQUEZ, G.; De BOLAND, A.R. Involvement of protein kinase C in the modulation of $1\alpha,25$ -dihydroxy-vitamin D_3 -induced $^{45}Ca^{2+}$ uptake in rat and chick cultured myoblasts. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1310, p. 157-162, 1996.

VERGARA, C.; LATORRE, R.; MARRION, N.; ADELMAN, J.P. Calcium-activated potassium channels. **Current Opinion in Neurobiology** (Signalling mechanisms) v. 8, p. 321-329, 1998.

VOLPATO, K.C.; MENEGAZ, D.; LEITE, L.D.; BARRETO, K.P.; GARCIA, E. V.; SILVA, F.R. 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 Science**, v. 23, n. 10, p. 1277-88, 2004.

WARNICK, P.R.; DAVIS, P.J.; DAVIS, F.B.; CODY, V.; GALINDO, J.Jr.; BLAS, S.D. Rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum $Ca^{(2+)}$ -ATPase activity: stimulation in vitro by thyroid hormone analogues and bipyridines. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1153, p. 184-190, 1993.

WASSERMANN, G.F.; MONTI, B.L.; McCONNEL, L.L.; GRILLO, M.L. FSH induced hyperpolarization followed by a Ca^{++} channel-mediated depolarization in rat Sertoli cells. **Medical Science Research**, v. 18, p. 175-176, 1990.

WASSERMANN, G.F.; MONTI BLOCH, L.; GRILLO, M.L.; SILVA, F.R.M.B.; LOSS, E.S.; McCONNELL, L.L. Electrophysiological changes of Sertoli cells produced by the acute administration of amino acid and FSH. **Hormone and Metabolic Research**, v. 24, p. 326-328, 1992a.

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

WASSERMANN, G.F.; LOSS, E.S.; WECHSLER, S.W. Retinol stimulates $^{45}Ca^{++}$ uptake in Sertoli cells through a verapamil-sensitive voltage-dependent-channel. **Medical Science Research**, v. 23, p. 633-634, 1995.

WATANABE, H.; WASHIZUDA, T.; KOMURA, S.; YOSHIDA, T.; HOSAKA, Y.; HATADA, K.; AIZAWA, Y.; CHINUSHI, M.; YAMAMOTO, T.; MA, M.; WATANABE, K. Genomic and non-genomic regulation of L-type calcium channels in rat ventricle by thyroid hormone. **Endocrine Research**, v. 31, p. 59-70, 2005.

WICKENDEN, A.D. Potassium channels as anti-epileptic drug targets. **Neuropharmacology**, v. 43, n. 7, p. 1055-1060, 2002.

WILLIAMS, J.A. Electrical correlates of secretion in endocrine and exocrine cells. **Federal Proceedings**, v. 40, p. 128-134, 1981.

WOOTON, L.L.; ARGENT, C.C.; WHEATLEY, M.; MICHELANGELI, F. The expression, activity and localisation of the secretory pathway Ca^{2+} -ATPase (SPCA1) in different mammalian tissues. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1664, p. 189-97, 2004.

WRUTNIAK-CABELLO, C.; CASAS, F.; CABELLO, G. Thyroid hormone action in mitochondria. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 26, p. 67-77, 2001

XIA, X.-M.; FAKLER, B.; RIVARD, A.; WAYMAN, G.; JOHNSON-PAIS, T.; KEEN, J.E.; ISHII, T.; HORSCHBERG, B.; BOND, C.T.; LUTSENKO, S.; MAYLIE, J.; ADELMAN, J.P. Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. **Nature**, v. 395, p. 503-507, 1998.

XIN, Y.R.; YU, L.; CHEN, Z.; ZHENG, L.H.; FU, Q.; JIANG, J.M.; ZHANG, P.Z.; GONG, R.M.; ZHAO, S.Y. Cloning, expression patterns, and chromosome localization of three human and two mouse homologues of GABA_A receptor-associated protein. **Genomics**, v. 74, p. 408-413, 2001.

XIONG, Z.; SPERALAKIS, N.; FENOGLIO-PREISER, C. Isoproterenol modulates calcium channels through two different mechanism in smooth-muscle cells from rabbit portal vein. **Pflugers Archiv: European journal of physiology**, v.428, p.105-113, 1994.

YEN, P.M. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. **Physiological Review**, v. 81, n. 3, p. 1097-1142, 2001.

YONG, G.; WANG, D.E.D.; KOVA, E.N.; FIENING, J.P.; OJAMAA, K.; BLATTER, L.A.; LIPSIUS, S. Acute exposure to thyroid hormone increases Na^+ current and intracellular Ca^{2+} in cat myocytes. **Journal of Physiology**, v. 546, p. 491-499, 2003.

ZACCOLO, M.; MAGALHÃES, P.; POZZAN, T. Compartmentalization of cAMP and Ca^{2+} signals. **Current Opinion in Cell. Biology.**, v. 14, p. 160-166, 2002.

ZAMONER, A.; CORBELINI, P.F.; FUNCHAL, C.; MENEGAZ, D.; SILVA, F.R.M.B.S.; PESSOA-PUREUR, R. Involvement of calcium-dependent mechanisms in T_3 -induced phosphorylation of vimentin of immature rat testis. **Life Sciences**, v. 77, p. 3321-3335, 2005a.

ZAMONER, A.; FUNCHAL, C.; HEIMFARTH, L.; SILVA, F.R.M.B.; PESSOA-PUREUR, R. Short-term effects of thyroid hormones on cytoskeletal proteins are mediated by gabaergic mechanisms in slices of cerebral cortex from young rats. **Cellular and Molecular Neurobiology**. In press, 2005b.

ZANELLO, L.P.; NORMAN, A.W. Multiple molecular mechanisms of $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamin D_3 rapid modulation of three ion channel activities in osteoblasts. **Bone**, v. 33, p. 71-79, 2003

ZHANG, Z.H.; JOHNSON, L.; CHEN, N.; EL SHERIF, D.; MOCHLY-ROSEN, M. Boutjdir, C2 region-derived peptides of b-protein kinase C regulate cardiac Ca^{2+} channels. **Circulation Research**, v. 80, p. 720-729, 1997.

9 ANEXOS

9.1. Protocolo da CEUA