

Renata Gonçalves

**GAMA-GLUTAMIL TRANSPEPTIDASE COMO ALVO DE
AÇÃO DA 1,25(OH)₂VITAMINA D₃ NA MEMBRANA
PLASMÁTICA DAS CÉLULAS DE SERTOLI**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Fátima Regina Mena Barreto Silva

Coorientadora: Profa. Dra. Ariane Zamoner Pacheco de Souza

Florianópolis
2014

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

Gonçalves, Renata

Gama-glutamil transpeptidase como alvo de ação da 1,25(OH)₂ vitamina D₃ na membrana plasmática das células de Sertoli / Renata Gonçalves ; orientadora, Fátima Regina Mena Barreto Silva ; co-orientadora, Ariane Zamoner Pacheco de Souza. - Florianópolis, SC, 2014.

81 p.

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

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. 1,25(OH)₂ vitamina D₃. 3. Células de Sertoli. 4. Gama-glutamil transpeptidase. 5. Lactato. I. Silva, Fátima Regina Mena Barreto. II. Souza, Ariane Zamoner Pacheco de. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. IV. Título.

RENATA GONÇALVES

**GAMA-GLUTAMIL TRANSPEPTIDASE COMO ALVO DE
AÇÃO DA 1,25(OH)₂ VITAMINA D₃ NA MEMBRANA
PLASMÁTICA DAS CÉLULAS DE SERTOLI**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

Florianópolis, 21 de fevereiro de 2014.

Prof. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof^ª. Fátima Regina Mena Barreto Silva, Dr^a.
Orientadora
BQA/CCB/UFSC

Prof^ª. Ariane Zamoner Pacheco de Souza, Dr^a.
Coorientadora
BQA/CCB/UFSC

Prof^ª. Aurea Elizabeth Linder, Dr^a.
FMC/CCB/UFSC

Prof. Carlos Peres Silva, Dr.
BQA/CCB/UFSC

Prof^ª. Luisa Helena Cazarolli, Dr^a.
UFFS

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Valdir e Ivone Gonçalves, pelos ensinamentos, incentivo e amor incondicional. Por entenderem os momentos distantes e sempre me apoiarem nas minhas escolhas. Ao meu irmão, Rodrigo, pela ajuda e pelo carinho em todos os momentos da minha vida.

Ao meu namorado, Luís Otávio Bastos, pelo apoio e incentivo nos momentos mais difíceis.

À minha orientadora, Profa. Dra. Fátima R. M .B. Silva e coorientadora Profa. Dra. Ariane Z. P. de Souza, pelo apoio, confiança e aprendizado, não só na elaboração deste trabalho mas também no dia a dia, com conselhos carinhosos e a presença constante. Vocês são um exemplo que levo para toda a vida.

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

À Samilla D. Schroeder, pela amizade, paciência e companhia desde os tempos de faculdade.

À Ana Paula Zanatta e Leila Zanatta, pela amizade, carinho e companheirismo nos momentos de trabalho e também fora do laboratório.

Aos colegas do Laboratório de Hormônios & Transdução de Sinais pela amizade e momentos de agradável convivência. Aos colegas que já não fazem parte do nosso convívio, mas que me ajudaram quando estavam perto e continuam presentes, Virgínia D. K. Trichez e Danielle Fontana Pereira.

Às meninas do Laboratório de Bioquímica Experimental e Sinalização Celular – LaBioSignal, em especial a Daiane Cattani e Camila Mariana Andrade, pela amizade e ajuda em todos os momentos.

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

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

A $1\alpha,25$ -diidroxivitamina D_3 ($1,25-D_3$) é o metabólito ativo da vitamina D_3 . A $1,25-D_3$ é crítica para a manutenção da reprodução, já que a redução da fertilidade foi observada em ratos machos deficientes de vitamina D. Este hormônio exerce ações via receptor nuclear (VDRn) e através de vias de respostas rápidas associadas a um receptor presente na membrana plasmática (VDRmem). As células de Sertoli são o principal componente estrutural do túbulo seminífero, e são responsáveis pela regulação do fluxo de nutrientes para as células germinativas em desenvolvimento. Dois fatores importantes no metabolismo das células de Sertoli são a atividade da enzima gama-glutamil transpeptidase (GGT) e a secreção de lactato para a nutrição das células germinativas. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito e o mecanismo de ação da $1,25-D_3$ na atividade da enzima GGT e no metabolismo energético através da secreção de lactato e captação de glicose em células de Sertoli de ratos de 30 dias de idade. Neste trabalho foi demonstrado que a $1,25-D_3$ aumentou a atividade da GGT em 6 h através da interação com o receptor VDRmem e possível ativação da proteína cinase A (PKA), e em tempos mais prolongados o bloqueio da síntese proteica inibiu o efeito do hormônio, sugerindo que a regulação da atividade da GGT pela $1,25-D_3$ também esteja relacionada à expressão da enzima. Como a GGT participa na regeneração da glutatona (GSH), os níveis de GSH foram estudados nas células de Sertoli, porém não houve alteração destes níveis no tratamento com a $1,25-D_3$. O lactato é o substrato energético preferencial das células germinativas, e foi verificado que o tratamento das células de Sertoli com a $1,25-D_3$ estimulou a liberação de lactato, além de aumentar a captação de [14 C]-2-Deoxi-d-glicose (14 C-DG) e a atividade intracelular da enzima lactato desidrogenase (LDH). A fosforilação oxidativa foi verificada nas células de Sertoli através de respirometria de alta resolução, e foi observado que a respiração mitocondrial não foi alterada nas células tratadas com a $1,25-D_3$ corroborando com o aumento da produção de lactato pelas células de Sertoli. Neste ensaio também foi observada uma diminuição significativa na produção de espécies reativas de oxigênio. Foi medida a atividade da enzima LDH extracelular, onde foi demonstrado que a $1,25-D_3$ não possui capacidade citotóxica. Como conclusão deste trabalho, a $1,25-D_3$ aumenta a atividade da GGT e secreção de lactato, parâmetros importantes da função das células de Sertoli, o que sugere que este hormônio representa um dos fatores importantes na regulação do metabolismo das células de Sertoli, destinado a aumentar o

fornecimento de nutrientes e melhorar os mecanismos de defesa antioxidantes para o desenvolvimento normal e completo da onda espermatogênica.

Palavras-chave: 1,25-D₃; GGT; lactato; ¹⁴C-DG; LDH; células de Sertoli; testículo.

ABSTRACT

1 α ,25-diidroxivitamin D₃ (1,25-D₃) is the biologically active metabolite of vitamin D₃. 1,25-D₃ is critical for the maintenance of normal reproduction since reduced fertility is observed in vitamin D-deficient male rats. This hormone acts through a nuclear receptor (VDRn) and via rapid response pathways associated to a putative membrane receptor (VDRmem). Sertoli cells are the most important structural component of seminiferous tubules, and they are responsible for regulating the nutrient influx for germ cells development. Two important factors in Sertoli cell metabolism regulation are the gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) enzyme activity and lactate secretion for germ cell nutrition. The aim of the present work was to study the effect and mechanism of action of 1,25-D₃ on GGT activity and on metabolic activity through lactate secretion and glucose uptake in 30-day-old rat Sertoli cells. The results show that 1,25-D₃ increased GGT activity in 6 h through interaction with VDRmem and possibly with protein kinase A (PKA) activation, and in longer incubations the protein synthesis inhibition prevented the hormone effect, suggesting that the GGT activity regulation by the 1,25-D₃ is also related to enzyme synthesis. As GGT is also related to glutathione (GSH) regeneration, the GSH levels in Sertoli cells were verified, but no alteration was observed in cells incubated with 1,25-D₃. Lactate is the preferred energetic substrate of germ cells, and it was observed that Sertoli cells treatment with 1,25-D₃ increased the lactate release, and also [¹⁴C]-2-Deoxy-d-glucose (¹⁴C-DG) uptake and lactate dehydrogenase (LDH) intracellular activity. The oxidative phosphorylation in Sertoli cells was verified through high resolution respirometry, and it was observed that mitochondrial respiration was not altered in cells treated with 1,25-D₃, although the increased lactate release in these cells. In this essay it was also observed a decrease in oxygen reactive species production. The extracellular LDH activity was measured and it was demonstrated that 1,25-D₃ doesn't have cytotoxic capacity. From this work, it is concluded that 1,25-D₃ regulates GGT activity and lactate release, significant parameters of Sertoli cell function, suggesting that this hormone represents an important factor in the regulation of Sertoli cell metabolism. Also, 1,25-D₃ improves cellular antioxidant defenses to the ongoing spermatogenesis.

Keywords: 1,25-D₃; GGT; lactate, ¹⁴C-DG; LDH; Sertoli cells; testis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Organização do testículo.....	18
Figura 2 – Ilustração esquemática da organização do túbulo seminífero.	19
Figura 3 – Ilustração esquemática do metabolismo das células de Sertoli.	22
Figura 4 – Ilustração esquemática da espermatogênese.....	24
Figura 5 – Esquema da participação da GGT no metabolismo da GSH.	28
Figura 6 – Metabolismo da vitamina D.....	30
Figura 7 – Mudanças conformacionais na estrutura da 1,25-D ₃	31
Figura 8 – (A) Efeito da 1,25-D ₃ na curva de tempo da atividade da GGT em células de Sertoli e (B) em fração rica em células germinativas.	43
Figura 9 – (A) Influência do ligante natural do VDR CM e (B, C) da síntese proteica na atividade da GGT em células de Sertoli.	45
Figura 10 – Envolvimento da via da (A) PKA e (B) PKC na atividade da GGT em células de Sertoli.	47
Figura 11 – Efeito da 1,25-D ₃ nos níveis de GSH em células de Sertoli.	48
Figura 12 – Efeito da 1,25D ₃ na curva de tempo na liberação de lactato (A) e atividade da LDH intracelular (B) em células de Sertoli.	49
Figura 13 – Efeito da 1,25-D ₃ na curva de tempo na captação de glicose em (A) células de Sertoli e (B) em fração rica em células germinativas.	51
Figura 14 – Efeito da 1,25-D ₃ no consumo de oxigênio (A) e liberação de LDH no meio extracelular (B) em células de Sertoli.	52
Figura 15 – Hipótese do mecanismo de ação do hormônio 1,25-D ₃ na atividade da GGT e secreção de lactato em células de Sertoli.	62

LISTA DE ABREVIATURAS

1,25-D₃ – 1alfa,25-diidroxitamina D₃
1⁴C-DG - [1⁴-C]-2-Deoxi-d-glicose
ALT – Alanina aminotransferase
AMPK – Proteína cinase ativada por AMP
AR – Receptor de andrógenos
BDC – Bisdemetoxicurcumina
CFTR – Reguladores da condutância transmembrana da fibrose cística
CH - Cicloheximida
CM - Curcumina
Cys – Cisteína
DBP – Proteína sérica ligadora de vitamina D
DMC - Demetoxicurcumina
FSH – Hormônio folículo estimulante
GCL – Glutamato-cisteína ligase
GGT – Gama-glutamil transpeptidase
Glu - Glutamato
GLUT – Transportadores específicos de glicose
Gly - Glicina
GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofina
GPX – Glutaciona peroxidase
GSH – Glutaciona reduzida
GSR – Glutaciona redutase
GSS – Glutaciona sintetase
GSSG – Glutaciona oxidada
IGF-I – Fator de crescimento semelhante à insulina
IL – Interleucina
KRb – Tampão Krebs Ringer-bicarbonato
LDH – Lactato desidrogenase
LH – Hormônio luteinizante
MAPK – Proteína serina-treonina cinase ativada por mitógeno
MCT – Transportadores monocarboxilatos específicos
MIS – Hormônio antimulleriano
PKA – Proteína cinase A
PKC – Proteína cinase C
PLC – Fosfolipase C
PMA – Forbol 12-miristato 14-acetato
RXR – Receptor retinóide
SSC – Célula tronco espermatoγονial
ST – Estearoil-carnitina

TGF – Fator de transformação de crescimento

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

VDCC – Canais de cálcio dependentes de voltagem

VDR – Receptor de vitamina D membranar

VDRmem – Receptor alternativo de membrana da vitamina D

VDRn – Receptor nuclear clássico da vitamina D

VDRKO – Deficiência do receptor VDR

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Sistema Reprodutor Masculino.....	17
1.1.1 Testículos.....	17
1.1.2 Células de Sertoli.....	18
1.1.3 Células germinativas e espermatogênese.....	23
1.1.4 Regulação da espermatogênese.....	25
1.1.5 Células de Sertoli e células germinativas.....	26
1.2 Gama-glutamil transpeptidase.....	27
1.3 $1\alpha,25$ -diidroxivitamina D_3	29
1.3.1 Metabolismo da vitamina D.....	29
1.3.2 Mecanismo de ação da $1,25$ - D_3	31
1.3.3 $1,25$ - D_3 e o sistema reprodutor.....	33
2 OBJETIVOS.....	35
2.1 Objetivo geral.....	35
2.2 Objetivos específicos.....	35
3 METODOLOGIA.....	37
3.1 Animais.....	37
3.2 Isolamento de células de Sertoli e obtenção de células germinativas.....	37
3.3 Atividade da enzima gama-glutamil transpeptidase.....	37
3.4 Captação de glicose.....	38
3.5 Determinação dos níveis de lactato.....	38
3.6 Atividade da enzima lactato desidrogenase (morte celular e atividade intracelular).....	39
3.7 Consumo de oxigênio mitocondrial.....	39
3.8 Conteúdo de glutatona reduzida.....	40
3.9 Análise estatística.....	40
4 RESULTADOS.....	43
4.1 $1,25$ - D_3 estimula a atividade da GGT em células de Sertoli.....	43
4.2 Efeito da CM e CH na ação estimulatória da $1,25$ - D_3 na atividade da GGT em células de Sertoli.....	44
4.3 Envolvimento da PKA e PKC no efeito estimulatório da $1,25$ - D_3 na atividade da GGT em células de Sertoli.....	46
4.4 Efeito da $1,25$ - D_3 no conteúdo de GSH em células de Sertoli.....	48
4.5 A $1,25$ - D_3 estimula a produção de lactato e atividade da LDH intracelular em células de Sertoli.....	49
4.6 Efeito da $1,25$ - D_3 na captação de glicose em células de Sertoli ...	50
4.7 Efeito da $1,25$ - D_3 na respiração mitocondrial e na morte celular em células de Sertoli.....	52

5	DISCUSSÃO	55
6	CONCLUSÕES.....	61
7	REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sistema Reprodutor Masculino

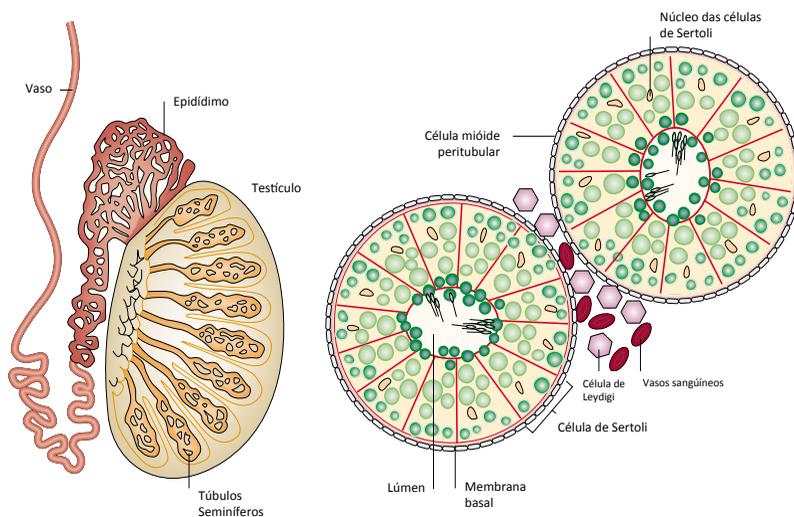
O Sistema Reprodutor Masculino de humanos consiste em um par de testículos, local de produção de espermatozóides e hormônios sexuais esteróides; vias espermáticas (epidídimo, canal deferente, uretra) que permitem a maturação, circulação e liberação de espermatozóides; pênis e glândulas anexas (vesículas seminais, próstata e glândulas bulbouretrais) que secretam o líquido que transporta os espermatozóides (FAWCETT, 1993).

1.1.1 Testículos

O testículo é um órgão complexo e compartimentalizado que possui duas funções importantes no processo de reprodução: a produção de hormônios sexuais esteróides e a produção de gametas (espermatogênese e espermiogênese). Estas funções testiculares são controladas por gonadotrofinas e diversos fatores sintetizados localmente, como esteróides, fatores de crescimento e citocinas (SAEZ, 1994; BOURGUIBA et al., 2003; CARREAU; HESS, 2010).

O tecido testicular é dividido em dois compartimentos: os túbulos seminíferos e o tecido intersticial (figura 1). O compartimento intersticial está situado entre os túbulos seminíferos e constituído de tecido conjuntivo frouxo, células de Leydig, as quais são responsáveis pela produção de testosterona, assim como fibroblastos, macrófagos, linfócitos e vasos sanguíneos e linfáticos. Nos túbulos seminíferos ocorre a produção de gametas, sendo o epitélio constituído por células de Sertoli rodeadas pelas células germinativas, as quais se diferenciam por meiose a espermatozóides. O epitélio seminífero é cercado por células peritubulares ou mióides, que estão em contato com a superfície basal das células de Sertoli (BELLVÉ et al., 1977; KRAWETZ; DE ROOIJ; HEDGER, 2009). Os túbulos seminíferos são a unidade funcional do testículo, enquanto que as células de Sertoli são consideradas o principal componente estrutural do epitélio seminífero por possuírem um papel central no desenvolvimento funcional do testículo (RATO et al., 2012a).

Figura 1 – Organização do testículo.



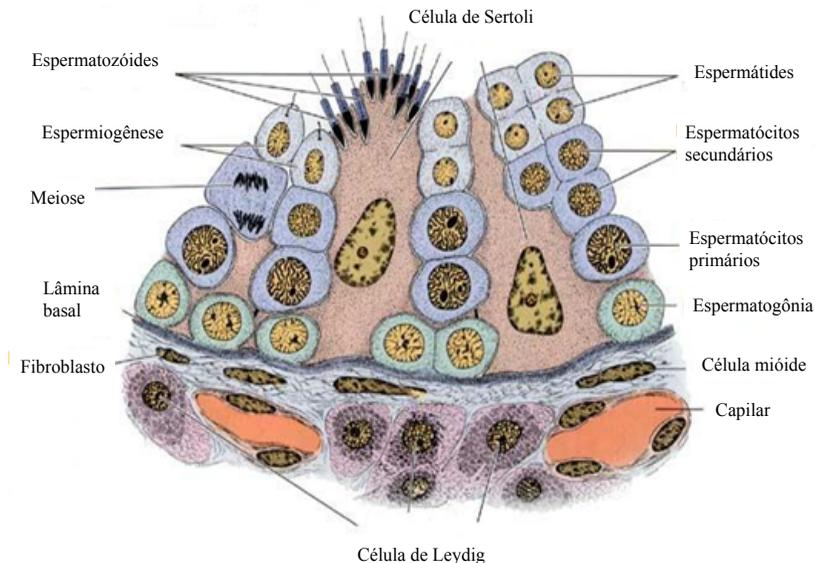
À esquerda, uma representação do testículo com os túbulos seminíferos circundados pelo tecido intersticial. À direita, a demonstração de um corte transversal dos túbulos seminíferos, demonstrando as células germinativas nos diferentes estágios de diferenciação (em verde) ao redor das células de Sertoli (amarelo). Em contato com a membrana basal das células de Sertoli estão representadas as células mióides peritubulares. No compartimento intersticial são demonstradas as células de Leydig e vasos sanguíneos.

Fonte: Adaptado de Cooke; Saunders, 2002.

1.1.2 Células de Sertoli

As células de Sertoli são o principal elemento estrutural do epitélio seminífero. Frequentemente chamadas de “células enfermeiras”, são responsáveis pela regulação do fluxo de nutrientes e fatores de crescimento para as células germinativas em desenvolvimento (figura 2). As células de Sertoli formam junções apertadas próximo à membrana basal entre as células adjacentes, criando a barreira hemato-testicular. A barreira hemato-testicular atua como uma barreira física, imunológica e fisiológica, controla o fluxo de moléculas, nutrientes, células do sistema imune e citocinas entre os compartimentos basal e luminal do túbulo seminífero (PETERSEN; SÖDER, 2006; RATO et al., 2012a).

Figura 2 – Ilustração esquemática da organização do túbulo seminífero.



As células germinativas durante o seu desenvolvimento se mantêm próximas às células de Sertoli. As células mióides estão em contato com a membrana basal das células de Sertoli, e no tecido intersticial são encontradas células de Leydig, fibroblastos e capilares sanguíneos, dentre outros.

Fonte: Adaptado de Junqueira e Carneiro, 2003.

As células de Sertoli fornecem fatores necessários para o metabolismo das células germinativas, como lactato, transferrina e proteína ligadora de andrógeno. São também responsáveis pela produção de fatores de crescimento (fator de célula tronco, fatores de transformação de crescimento alfa e beta ($TGF\alpha$ e $TGF\beta$), fator de crescimento semelhante à insulina-I ($IGF-I$)). Além disso, as células de Sertoli produzem hormônios (inibina e estradiol) que regulam o desenvolvimento das estruturas reprodutivas masculinas ou a retroalimentação negativa de sinais hormonais que afetam as células de Sertoli (hormônio antimulleriano (MIS) e inibina) (SKINNER, 2005). Além da nutrição e manutenção do epitélio germinativo, estas células

também fagocitam células germinativas em degeneração e corpos residuais, liberam espermátides na espermição, produzem proteínas que regulam e/ou respondem à liberação de hormônios pituitários e que influenciam a atividade mitótica das espermatogônias (SOFIKITIS et al., 2008).

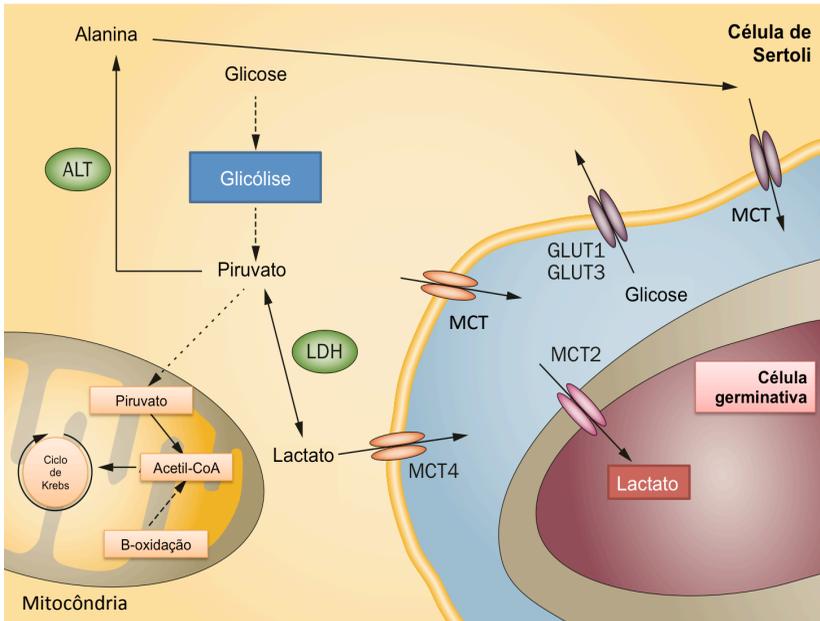
Nos testículos de mamíferos, as células de Sertoli exercem um papel chave no início e na manutenção da espermatogênese. A proliferação das células de Sertoli ocorre mais ativamente antes do nascimento, e em ratos a proliferação se estende até três semanas após o nascimento. Este processo possui várias etapas e é denominado “maturação”, onde as células se transformam de células “fetais” em “adultas”, perdendo a capacidade proliferativa e ativando várias funções necessárias para a manutenção e suporte da espermatogênese. Após este período, o número de células de Sertoli, por testículo, é considerado estável no decorrer da vida animal. O número de células de Sertoli no testículo adulto determina tanto o tamanho do testículo como a produção diária de esperma. Esta relação se dá pelo fato que cada célula de Sertoli possui capacidade fixa para o número de células germinativas que consegue suportar/sustentar (SILVA; LEITE; WASSERMANN, 2002; SHARPE et al., 2003; PETERSEN; SÖDER, 2006). As células de Sertoli formam associações íntimas com as células germinativas através de inúmeras prolongações citoplasmáticas nos diferentes estágios de desenvolvimento das células germinativas (RATO et al., 2012a).

Já foi demonstrado que as células de Sertoli são alvos da ação de diversos hormônios, fatores parácrinos e autócrinos. Entre eles, atuam nas Sertoli o hormônio folículo estimulante (FSH), testosterona, hormônios da tireóide, prolactina, retinol, vitamina D, estrogênio, fatores de crescimento, inibina B e citocinas inflamatórias (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α e IL-6). Vários destes hormônios agem nas células de Sertoli regulando funções celulares como secreção, proliferação, diferenciação e atividade enzimática. Dentre as enzimas reguladas por hormônios nas células de Sertoli está a gama-glutamil transpeptidase (GGT); uma enzima associada à membrana que age como sistema de transporte de aminoácidos através da membrana plasmática (TATE; MEISTER, 1981; SILVA; LEITE; WASSERMANN, 2002; SHARPE et al., 2003; PETERSEN; SÖDER, 2006). A investigação da função das células de Sertoli *in vitro* está focada na influência de vários fatores endócrinos e parácrinos na expressão e atividade de certas proteínas, como transferrina, aromatase, receptor de andrógenos e a lactato desidrogenase (LDH) (PETERSEN; SÖDER, 2006).

Os mecanismos que regulam o metabolismo das células de Sertoli são fundamentais para a manutenção da espermatogênese e fertilidade masculina. As células de Sertoli possuem plasticidade metabólica, e podem adaptar o metabolismo de acordo com os substratos energéticos disponíveis. A glicose não é o substrato principal utilizado pelas células de Sertoli, sendo a β -oxidação lipídica a via preferencial utilizada para produção de energia nestas células. As células de Sertoli mantêm a viabilidade em cultura na ausência de glicose, e produzem ATP através do metabolismo de lipídios e lactato a partir de aminoácidos, como a glutamina e a leucina, e também a partir do glicogênio. A importância da β -oxidação nestas células é enfatizada pelo papel como recicladoras de lipídios, já que as células de Sertoli podem fagocitar e degradar células espermatogênicas apoptóticas e corpos residuais para a formação de lipídios que serão utilizados para a produção de ATP durante a espermatogênese (KAISER et al., 2005; XIONG et al., 2009; RATO et al., 2012a).

A maior parte da glicose captada pelas células de Sertoli é convertida em lactato, o qual é secretado para a nutrição das células germinativas (ROBINSON; FRITZ; 1981). Já foram identificados três tipos de transportadores específicos de glicose (GLUTs) nas células de Sertoli: GLUT1, GLUT3 e GLUT8, sendo que o último não está relacionado com o transporte de glicose do meio extracelular (ANGULO et al., 1998; PIROLI et al., 2002; GALARDO et al., 2008). A enzima LDH converte o piruvato produzido a partir da glicose para lactato, o qual é exportado para o meio extracelular através de transportadores monocarboxilatos específicos (MCTs) presentes na membrana plasmática das células de Sertoli (figura 3) (OLIVEIRA et al., 2011). Diversos fatores regulam o metabolismo e a produção de lactato nas células de Sertoli como: FSH, insulina, IGF-I, citocinas, ácido araquidônico, proteína cinase ativada por AMP (AMPK) e hormônios esteróides sexuais (OONK; JANSEN, GROOTEGED, 1989; RIERA et al., 2001; MERONI et al., 2003; GALARDO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2011; RATO et al., 2012b).

Figura 3 – Ilustração esquemática do metabolismo das células de Sertoli.



A β -oxidação é a via preferida pelas células de Sertoli para a produção de energia, e a maior parte da glicose captada por estas células através dos transportadores de glicose (GLUTs) é convertida em lactato através da enzima lactato desidrogenase (LDH). O lactato é então transportado para fora das células de Sertoli através de transportadores de monocarboxilatos (MCTs) para a nutrição das células germinativas. Abreviações: ALT, alanina aminotransferase; GLUT, transportador de glicose; LDH, lactato desidrogenase; MCT, transportador de monocarboxilato.

Fonte: Adaptado de Rato et al., 2012a.

A regulação do metabolismo das células de Sertoli é fundamental e pode ter efeito direto na fertilidade masculina. A modulação de vias metabólicas em células testiculares somáticas, especialmente nas células de Sertoli, é determinada por diversos fatores, como a disponibilidade de substratos metabólicos e a ação de hormônios e outros fatores endógenos e exógenos que irão ter uma contribuição cooperativa/sinérgica para a progressão da espermatogênese (RATO et al., 2012a).

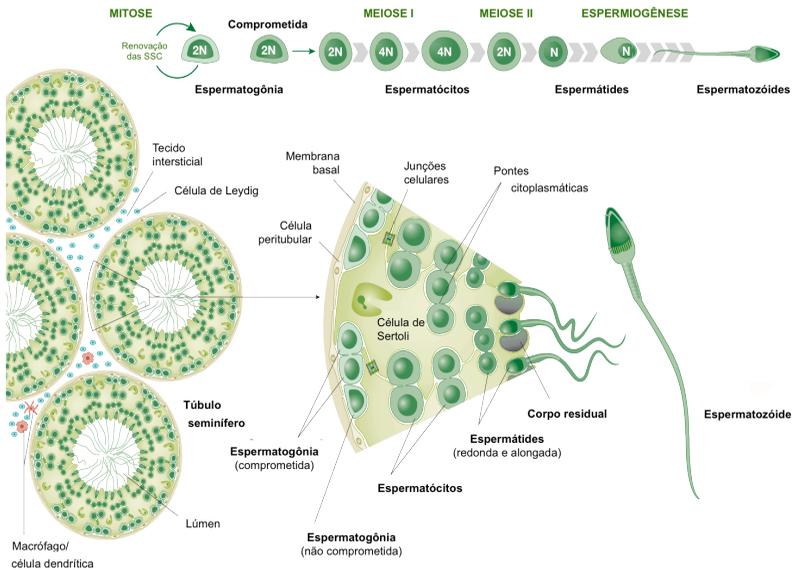
1.1.3 Células germinativas e espermatogênese

As células germinativas são encontradas nos túbulos seminíferos, entre as células de Sertoli. O processo de desenvolvimento e diferenciação das células germinativas possui diferentes estágios, no decorrer dos quais as células germinativas podem ser classificadas em espermatogônias, espermátocitos primário e secundário e espermátide (redonda e alongada) (HOLSTEIN; SCHULZE; DAVIDOFF, 2003).

Na espermatogênese as células germinativas passam por uma complexa diferenciação que envolve diversas alterações morfológicas, levando à formação de espermatozóides diferenciados. A espermatogênese pode ser subdividida em três fases principais: (i) proliferação mitótica espermatogonial, (ii) meiose e (iii) espermiogênese – processo morfológico onde a espermátide haplóide é convertida em espermatozóide (LEBLOND; CLERMONT, 1952). No decorrer da espermatogênese, as células germinativas se movem da periferia para o lúmen do túbulo seminífero. Um corte transversal do túbulo seminífero mostra as espermatogônias localizadas na base do túbulo, espermátocitos no meio, e espermátides no ápice do epitélio, demonstrando a progressão do desenvolvimento de células imaturas às células germinativas maduras à medida que elas se movem em direção ao lúmen, onde as espermátides são liberadas, ou espermiadas como espermatozóides (HESS; FRANÇA, 2008; RATO et al., 2012a).

A espermatogênese inicia com a replicação mitótica de células tronco espermatogênicas (espermatogônia A) para garantir a linhagem de células germinativas e dar início a novas populações. Uma das células filhas se diferencia a espermatogônia B, que pode ser identificada através de critérios morfológicos. A espermatogônia B se diferencia em espermátocito primário, o qual atravessa a barreira hemato-testicular e entra na primeira fase da divisão meiótica, gerando espermátocitos secundários. Na segunda divisão meiótica são produzidas espermátides redondas. Uma vez que espermátides são formadas, a divisão celular para e é iniciado o processo de espermiogênese, que dá origem a espermátides alongadas. Este processo culmina na liberação das espermátides alongadas do epitélio germinal no lúmen do túbulo seminífero, sendo as células livres chamadas de espermatozóides (figura 4) (DE ROOIJ, 2001; HOLSTEIN; SCHULZE; DAVIDOFF, 2003; HESS; FRANÇA, 2008)

Figura 4 – Ilustração esquemática da espermatogênese.



As células germinativas, no decorrer do processo da espermatogênese, sofrem diversas alterações morfológicas, se movimentando da membrana basal do túbulo seminífero em direção ao lúmen, onde o espermatozoide é liberado. Através de divisões mitóticas, uma célula tronco espermatogonial se divide, dando origem a uma célula filha com as mesmas características e a outra célula filha comprometida, que é direcionada para a espermatogênese. Durante este processo, as células germinativas passam por divisões meióticas, dando origem a um espermatozoide diferenciado e funcional. Abreviações: SSC, célula tronco espermatogonial.

Fonte: Adaptado de Krawetz et al., 2009.

Ainda que as células germinativas expressem todas as enzimas da via glicolítica, estas células são dependentes do lactato presente no meio extracelular fornecido pelas células de Sertoli para a produção de ATP. Em espermatócitos e espermatídeos, o metabolismo da glicose não é suficiente para a produção de energia, sendo o lactato o substrato preferencial para o metabolismo energético destas células. Embora a glicólise esteja inibida em espermatócitos e espermatídeos, as espermatogônias e os espermatozoides possuem alta capacidade

glicolítica e a presença de glicose é necessária para a motilidade hiperativada dos espermatozóides em humanos e camundongos, entre outras espécies. A motilidade hiperativada é requerida para a penetração da zona pelúcida dos ovócitos. A glicose também é necessária para os eventos de fosforilação de tirosinas de proteínas espermáticas relacionados com a capacitação dos espermatozoides. (BOUSSOUAR; BENAHMED, 2004; ALVES et al., 2012; RATO et al., 2012a).

1.1.4 Regulação da espermatogênese

A espermatogênese é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-testículo, basicamente por dois hormônios pituitários: FSH e LH, os quais ligam funcionalmente o cérebro com os testículos e a disfunção deste eixo leva a infertilidade. No hipotálamo, a secreção pulsátil do hormônio regulador de gonadotrofina (GnRH) inicia a liberação de LH da hipófise, estimulando as células de Leydig a produzir testosterona. A testosterona é distribuída por todo o organismo, o que fornece um controle de retroalimentação negativa para a hipófise relacionada à atividade secretória das células de Leydig. Nos túbulos seminíferos a testosterona atua no processo de espermatogênese. A estimulação das células de Sertoli pelo FSH secretado pela hipófise é necessária para a maturação das células germinativas. Em resposta a este processo, as células de Sertoli secretam inibina no mecanismo de feedback direcionado à hipófise (HOLSTEIN; SCHULZE; DAVIDOFF, 2003; PETERSEN; SÖDER, 2006; RUWANPURA; MCLACHLAN; MEACHEM, 2010).

A testosterona e o FSH possuem um papel importante na regulação da espermatogênese. Em roedores, o FSH tem ação principalmente no desenvolvimento espermatogonial, enquanto que a testosterona parece ter um efeito negativo na proliferação. A testosterona suporta parcialmente a maturação dos espermatócitos, porém em ratos é essencial na progressão de espermátides redondas para alongadas. Tanto a testosterona como o FSH são necessários para a liberação das espermátides das células de Sertoli (SHETTY et al., 2002; RUWANPURA; MCLACHLAN; MEACHEM, 2010).

A regulação da espermatogênese não depende somente dos hormônios do eixo hipotálamo-hipófise, mas também de diversas moléculas sintetizadas localmente pelas células somáticas e germinativas, como esteróides, fatores de crescimento e citocinas. Além dos andrógenos, o estrogênio tem um papel direto na regulação da espermatogênese, estimulando funções como motilidade, produção de

lactato e metabolização de diversos substratos em espermatozóides. Outros fatores de crescimento também são liberados pelas células de Sertoli e diversos tipos de células germinativas, formando um complexo sistema de regulação das funções celulares e dos processos de desenvolvimento das células germinativas (ALVES et al., 2012).

1.1.5 Células de Sertoli e células germinativas

A íntima associação morfológica entre as células de Sertoli e germinativas em diferentes estágios de desenvolvimento é claramente visível no epitélio seminífero. Como resultado, é concebível que inúmeras interações ocorram entre estas células durante a espermatogênese, a nível molecular e/ou bioquímico (CHENG; MRUK, 2002).

As células de Sertoli são responsáveis por fornecer suporte energético e nutricional para as células germinativas em desenvolvimento. É imprescindível que as células germinativas recebam um nível adequado de substratos energéticos, caso contrário estas células podem sofrer degeneração e ativar vias apoptóticas. Células germinativas em desenvolvimento possuem necessidades metabólicas específicas, usando preferencialmente lactato como substrato para a produção de ATP. As células de Sertoli produzem lactato a partir de vários substratos, mas utilizam preferencialmente a glicose para este processo. As células de Sertoli asseguram o suporte nutricional das células germinativas secretando nutrientes ou intermediários metabólicos, como aminoácidos, carboidratos, lipídios, vitaminas e íons metálicos (RATO et al., 2012a).

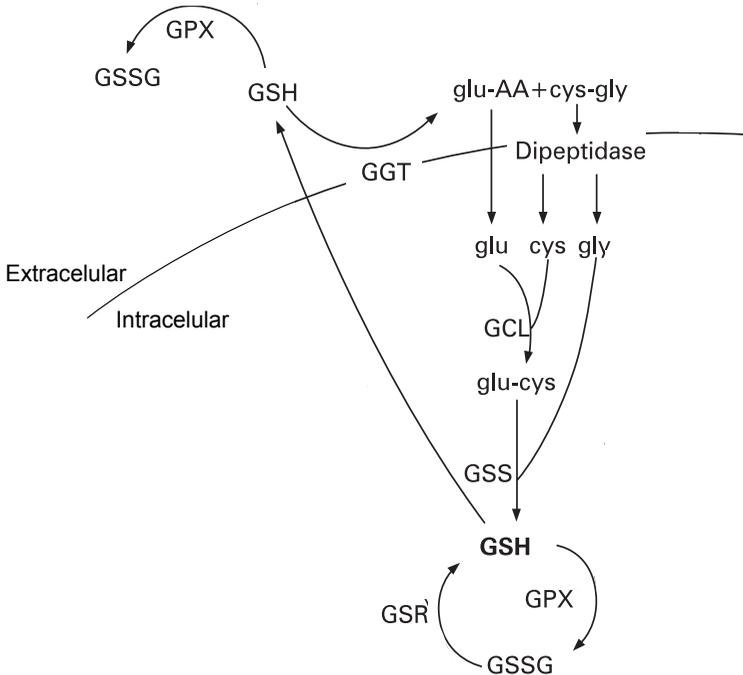
Durante a espermatogênese, as células germinativas em desenvolvimento permanecem próximas às células de Sertoli (KOPERA et al., 2010). Sem o apoio físico e metabólico das células de Sertoli, os processos de diferenciação, meiose e transformação em espermatozóides das células germinativas não ocorreriam (SHARPE et al., 2003). As células de Sertoli e germinativas produzem em conjunto diversas moléculas importantes para o contato célula-célula no epitélio seminífero, como hormônios, fatores de crescimento, proteases, inibidores de proteases e componentes da matriz extracelular. As células de Sertoli fornecem ainda outros fatores necessários para o processo de espermatogênese, como glicoproteínas que facilitam o transporte iônico e hormonal (p.e. transferrina e a proteína ligadora de andrógenos) e componentes estruturais na membrana basal entre as células de Sertoli e as células peritubulares (SOFIKITIS et al., 2008).

1.2 Gama-glutamil transpeptidase

A GGT é uma enzima localizada na membrana plasmática de células com atividade secretória e absorviva, com uma ampla distribuição em diversos tecidos de mamíferos (CASTON; SANBORN, 1988). A GGT catalisa a transferência de resíduos gama-glutamil para L-aminoácidos ou para outros peptídeos, sendo a glutatona (GSH) o principal substrato. A clivagem da glutatona eleva os níveis extracelulares de cisteína, o precursor limitante para a síntese de glutatona no meio intracelular (figura 5). Como consequência, a GGT participa da manutenção da homeostase redox de células e processos dependentes de oxiredução, como proliferação, diferenciação, aderência ou reatividade a condições adversas intra e extracelulares (MERONI et al., 1997; MARES et al., 2005). Além da contribuição da GGT na homeostase redox, esta também participa no transporte de aminoácidos através da membrana plasmática (TATE; MEISTER, 1981; MERONI et al., 1997). A síntese ou atividade da GGT é regulada por diversos fatores, como etanol, fatores de crescimento e hormônios (GARCION et al., 1999).

A GGT é considerada um marcador testicular da atividade das células de Sertoli em ratos (SCHTEINGART et al., 1988), e também marcador da diferenciação destas células, já que a atividade da GGT em células de Sertoli de ratos aumenta consideravelmente entre os 15 e 35 dias de idade (onde as células de Sertoli se transformam em células adultas) e continua constante dali em diante até os 100 dias de idade (LU; STEINBERGER, 1977; MERONI; SUBURO; CIGORRAGA, 2000). Estudos histoquímicos demonstraram a presença da GGT nos túbulos seminíferos, com uma pigmentação marcante na porção apical das células de Sertoli (HODGEN; SHERINS, 1973). A presença da GGT nas células de Sertoli foi confirmada posteriormente, onde foi demonstrado que a atividade da enzima em ratos de 30 dias de idade era quase 10 vezes maior em células de Sertoli isoladas do que em células germinativas, peritubulares ou intersticiais (LU; STEINGERGER, 1977; CASTON; SANBORN, 1988). Diversos estudos demonstram que a atividade da GGT nas células de Sertoli é regulada por diversos fatores, como FSH, interleucina 1- β e fator de crescimento fibroblástico básico, além de outros fatores secretados pelas células germinativas. (SCHTEINGART; RIVAROLA; CIGORRAGA, 1989; SCHTEINGART et al., 1999; MERONI, SUBURO, CIGORRAGA, 2000).

Figura 5 – Esquema da participação da GGT no metabolismo da GSH.



A GGT remove os resíduos gama-glutâmil de aminoácidos e outros peptídeos, como a glutatona reduzida (GSH), que é o seu principal substrato. Os aminoácidos resultantes são reincorporados nas células, onde a partir da ação das enzimas glutamato-cisteína ligase (GCL) e glutatona sintetase (GSS) a GSH é regenerada. A GSH, a partir da ação da enzima glutatona peroxidase (GPX), participa de reações de redução de peróxidos, sofrendo oxidação. A glutatona na forma oxidada (GSSG) sofre a ação da enzima glutatona redutase (GSR), voltando a sua forma reduzida e se tornando disponível novamente para participar de novas reações. A GSH também atua como molécula redutora em outras reações, como a redução de outros radicais livres e espécies reativas de oxigênio. A GSH pode atuar tanto no meio intracelular, em espécies reativas derivadas do metabolismo celular, ou pode ser liberada no meio extracelular, para exercer seu papel redutor neste meio. Abreviações: cys, cisteína; GCL, glutamato-cisteína ligase; GGT, gama glutamyl transpeptidase; glu, glutamato;

gly, glicina; GPX, glutationa peroxidase; GSH, glutationa reduzida; GSR, glutationa redutase, GSS, glutationa sintetase; GSSG, glutationa oxidada.

Fonte: Adaptado de Bentley; Emrani; Cassano, 2008.

A atividade da GGT é importante para a função reprodutiva, porém seu papel nas células de Sertoli ainda não é totalmente conhecido. Evidências de que a atividade desta enzima é essencial para o desenvolvimento sexual normal foram obtidas utilizando camundongos deficientes em GGT, onde os camundongos afetados se demonstraram inférteis, com diminuição no tamanho dos testículos, oligospermia e hipoplasia das glândulas acessórias (epidídimo e vesícula seminal) (HARDING et al., 1997; KUMAR et al., 2000).

1.3 1 α ,25-diidroxitamina D₃

1 α ,25-diidroxitamina D₃ (1,25-D₃), também conhecida como calcitriol, é a forma ativa do seco esteróide vitamina D₃, sendo descrita originalmente como um hormônio essencial para a homeostasia mineral e óssea. Esta molécula chave do sistema endócrino da vitamina D possui efeitos biológicos em cerca de 37 alvos celulares. A 1,25-D₃ está envolvida em uma série de processos celulares como homeostasia do cálcio, diferenciação celular, respostas imunológicas e regulação da expressão gênica (BOUILLON; OKAMURA; NORMAN, 1995; MIZWICKI; NORMAN, 2009).

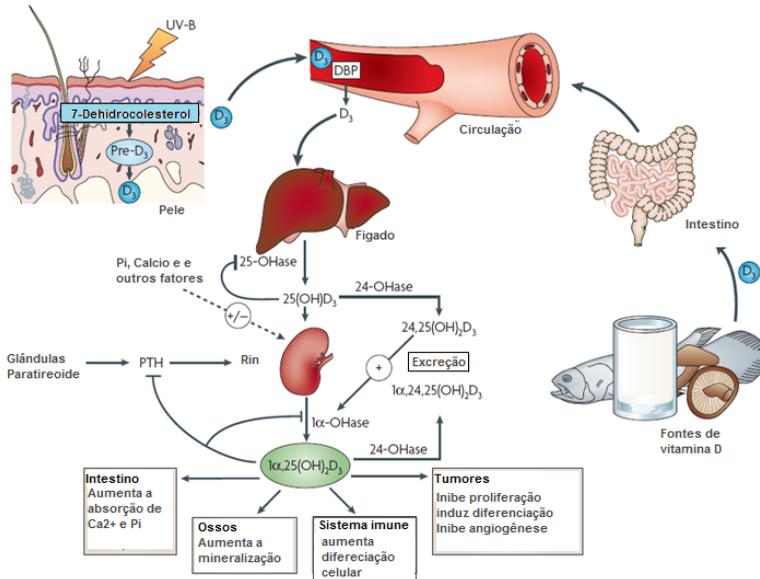
1.3.1 Metabolismo da vitamina D

A Vitamina D pode ser obtida a partir da dieta ou através de síntese endógena, desencadeada pela exposição à luz solar. A maior fonte de vitamina D em humanos e na maioria dos vertebrados é a exposição aos raios UVB solares, o que os torna dependentes da luz solar para a síntese dos níveis requeridos de Vitamina D no organismo (HOLICK; CHEN, 2008).

A síntese endógena da vitamina D inicia com a exposição da pele aos raios UVB, o que induz a conversão fotolítica do 7-deidrocolesterol a pré-vitamina D₃, seguida pela isomerização térmica à vitamina D₃. A vitamina D₃ é então transportada para o fígado pela proteína sérica ligadora de vitamina D (DBP), onde é hidroxilada enzimaticamente a 25-hidroxitamina D₃ pela enzima 25-hidroxilase. A 25-hidroxitamina D₃ é a principal forma circulante da vitamina D no

sangue, sendo alvo da enzima 1α -hidroxilase para a formação da $1\alpha,25$ -diidroxivitamina D_3 , forma ativa da vitamina D_3 (figura 6) (NORMAN, 2008; MIZWICKI; NORMAN, 2009). A 1α -hidroxilase é encontrada principalmente nos rins, porém já foi relatada em diversos outros tecidos e células como: osso, placenta, próstata, testículos, queratinócitos, macrófagos, linfócitos T, células dendríticas e várias células cancerosas (p.e. do pulmão, próstata e pele) (ZEHNDER et al., 2001; DUSSO; BROWN; SLATOPOLSKY, 2005; BLOMBERG JENSEN et al., 2010).

Figura 6 – Metabolismo da vitamina D.



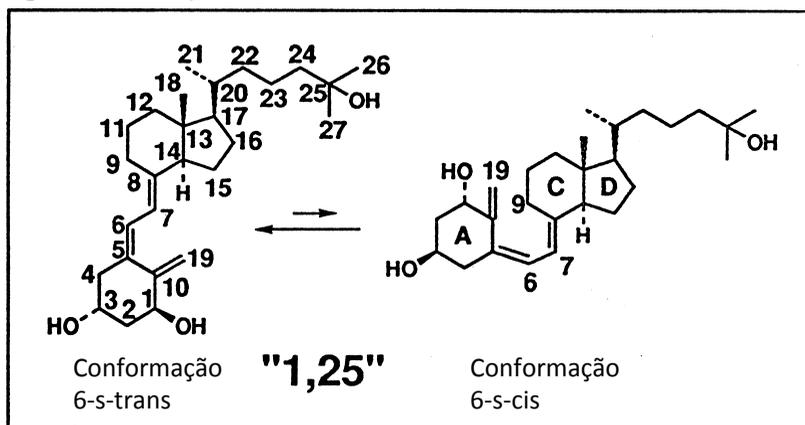
A vitamina D_3 pode ser obtida a partir da dieta, ou então através da síntese endógena, onde os raios UV-B solares em contato com a pele catalizam a conversão do 7-deidrocolesterol a vitamina D_3 . A vitamina D_3 , por sua vez, é transportada pela circulação através da proteína ligadora de vitamina D (DBP) até o fígado, onde sofre a ação da enzima 25-hidroxilase formando a 25-hidroxivitamina D_3 , que é a forma da vitamina D presente em maiores concentrações no sangue. A 25-hidroxivitamina D_3 , ao chegar nos rins, sofre a ação da enzima 1α -hidroxilase, formando a $1\alpha,25$ -diidroxivitamina D_3 , a forma ativa da vitamina D, que irá exercer suas ações biológicas em diversos tecidos.

Fonte: Adaptado de Deeb, Trump e Johnson, 2007.

1.3.2 Mecanismo de ação da 1,25-D₃

A 1,25-D₃ é um hormônio seco esteróide e possui uma estrutura conformacional dinâmica e flexível, permitindo que as respostas fisiológicas geradas nos tecidos alvos sejam resultantes tanto da ativação de mecanismos de ação genômicos quanto não-genômicos. A 1,25-D₃ pode mudar sua conformação da forma *cis* para a forma *trans* (figura 7), sendo a forma *cis* mais relacionada a eventos de membrana e a forma *trans* associada a efeitos nucleares (NORMAN; MIZWICKI; NORMAN, 2004; NORMAN, 2006).

Figura 7 – Mudanças conformacionais na estrutura da 1,25-D₃.



A 1,25-D₃ tem a capacidade de alterar a sua estrutura conformacional entre as formas 6-s-*cis* e 6-s-*trans*, sendo que a forma *cis* está mais relacionada com efeitos rápidos de membrana, enquanto que a forma *trans* está mais associada a eventos genômicos.

Fonte: Adaptado de Norman et al., 2001a.

A maior parte dos efeitos biológicos conhecidos da 1,25-D₃ são mediados pelo receptor de vitamina D₃ nuclear (VDRn), o qual na presença do hormônio sofre mudanças conformacionais que resultam na heterodimerização com o receptor retinóide (RXR), interagindo com o DNA de forma a modular a expressão gênica. Estas ações podem perdurar por horas ou dias e são conhecidas como respostas genômicas (BOUILLON; OKAMURA; NORMAN, 1995). Por outro lado, a 1,25-

D₃ também pode exercer funções através de um receptor alternativo de membrana (VDRmem), o que resulta na ativação de segundos mensageiros citosólicos, proteínas cinases e fosfatases assim como a abertura de canais iônicos. Estes efeitos geralmente ocorrem em segundos ou minutos e são reconhecidos como respostas não-genômicas, não sendo dependentes de transcrição gênica (DE BOLAND; NEMERE, 1992; NORMAN et al., 2002a). Dentre estes efeitos mediados pelo VDRmem estão a ativação de proteína cinase C (PKC), fosfolipase C (PLC), abertura de canais de Ca²⁺ ou Cl⁻, ativação da adenilato ciclase, aumento da concentração de Ca²⁺ intracelular e a ativação das vias Raf e MAPK (MIZWICKI; NORMAN, 2009; ZANATTA et al., 2011a).

A primeira demonstração que a 1,25-D₃ induz respostas não-genômicas surgiu da descoberta da transcaltaquia, que é o estímulo rápido de absorção de Ca²⁺ intestinal, envolvendo a abertura de canais de Ca²⁺ (DE BOLAND; NORMAN, 1990). Inicialmente foi sugerido que as respostas não-genômicas eram mediadas através da interação da 1,25-D₃ com um novo receptor proteico localizado na membrana externa da célula, uma vez que uma proteína/receptor no qual a 1,25-D₃ se liga com alta afinidade foi descrito no caveolae na membrana plasmática de duodeno de pintos (NORMAN et al., 2002b). Posteriormente foi demonstrado que este receptor membranar é provavelmente o VDRn associado ao caveolae na membrana plasmática (NORMAN; ISHIZUKA; OKAMURA, 2001b; HUHTAKANGAS et al., 2004). Caveolae são invaginações esféricas ou em forma de balão (*flask-shaped*) da membrana plasmática ricas em esfingolípideos e colesterol que são encontradas em regiões específicas da membrana plasmática (STAN, 2002). Utilizando camundongos *knockout* para VDR (VDRKO), pesquisadores relataram que a modulação rápida de respostas de canais iônicos pela 1,25-D₃ em osteoblastos necessita da presença do receptor VDR nuclear e do receptor localizado no caveolae (ZANELLO; NORMAN, 2004).

Uma ampla variedade de respostas rápidas estimuladas pela 1,25-D₃ foram relatadas em diversos sistemas, incluindo: a estimulação de transporte de Ca²⁺ em intestinos de pintos (transcaltaquia) (NEMERE; YOSHIMOTO; NORMAN, 1984), abertura de canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem (VDCC) (YUKIHIRO; POSNER; GUGGINO, 1994) e canais de cloreto (ZANELLO; NORMAN, 1996) em células de osteosarcoma de ratos; mudanças rápidas nas concentrações intracelulares de Ca²⁺ em linhagem de células beta pancreáticas (SERGEEV; RHOTEN, 1995); mudanças rápidas na fluidez da membrana e atividade da PKC em condrócitos (BOYAN et

al., 1994); ativação da MAPK em células leucêmicas NB4 promielóticas (SONG et al., 1998) e mais recentemente foi demonstrada a estimulação do acúmulo de aminoácidos em testículos de ratos e exocitose em células de Sertoli (MENEGAZ et al., 2009; MENEGAZ et al., 2010), além da estimulação do influxo de cálcio e atividade da GGT em testículos (ZANATTA et al., 2011b).

1.3.3 1,25-D₃ e o sistema reprodutor

Existem diversas evidências na literatura que sugerem que a 1,25-D₃ é crítica para a manutenção da reprodução, porém o papel deste hormônio e do VDR no sistema reprodutor masculino ainda não é completamente entendido. Já foi relatado em ratos machos deficientes em vitamina D uma redução da fertilidade (KWIECINSKI; PETRIE; DE LUCA, 1989), e em camundongos deficientes em vitamina D e do receptor VDR (VDRKO) foram observadas insuficiências gonadais com contagem de espermatozóides diminuída e anormalidades histológicas no testículo (KINUTA et al., 2000). O receptor VDR já foi identificado em homogenatos e preparados de matriz nuclear de testículos, espermatozóides e próstata de humanos (HABIB; MADDY; GELLY, 1990; JOHNSON et al., 1996; NANGIA et al., 1998; AQUILA et al., 2008) e no músculo liso do epidídimo, espermatogônias e células de Sertoli de roedores (MERKE; HUGEL; RITZ, 1985; OSMUNDSSEN et al., 1989). Anderson et al. (2008) demonstraram a presença da enzima 1 α -hidroxilase nas células de Sertoli e células de Leydig, indicando uma produção local do hormônio e reforçando a necessidade da 1,25-D₃ para a integridade da função testicular.

Osmundsen et al. (1989) sugeriram que as células de Sertoli são o sítio de ação principal da Vitamina D. Além disso, respostas rápidas da 1,25-D₃ foram demonstradas em células reprodutivas como TM4 (linhagem de células de Sertoli provenientes de camundongos), nas quais o hormônio estimulou a captação de cálcio (AKERSTROM; WALTERS, 1992) e secreção celular via ativação de canais de cloreto (MENEGAZ et al., 2010). Também já foi demonstrado que em culturas primárias de células de Sertoli de ratos, a 1,25-D₃ regula a expressão da enzima aromatase e estimula o influxo de cálcio (ZANATTA et al., 2011c; ZANATTA et al., 2011d; ROSSO et al., 2012).

Como descrito anteriormente, a vitamina D₃ possui um papel importante na função reprodutiva, porém o efeito do hormônio 1,25-D₃ no testículo ainda não é completamente entendido. Embora esteja claro que as respostas genômicas para os hormônios esteróides sejam

conduzidas através da formação de um complexo com o receptor nuclear cognato, novas evidências indicam que as respostas rápidas são mediadas por uma variedade de tipos de receptores associados à membrana plasmática. Dessa forma, um dos alvos de interesse deste trabalho foi estudar os efeitos rápido e genômico da $1,25\text{-D}_3$ e a inter-relação destes eventos em células testiculares (Sertoli e germinativas), no intuito de esclarecer os mecanismos envolvidos em processos celulares e moleculares de elevada importância fisiológica (espermatogênese completa e ativa). Sendo assim, o foco deste trabalho foi detectar o papel da $1,25\text{-D}_3$ em eventos de membrana plasmática (atividade da GGT, captação de glicose e secreção de lactato) em células de Sertoli e germinativas de ratos de 30 dias de idade.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar o efeito e o mecanismo de ação da $1,25\text{-D}_3$ na atividade da enzima GGT e no metabolismo energético através da secreção de lactato e captação de glicose em células testiculares: Sertoli e germinativas.

2.2 Objetivos específicos

1. Investigar o efeito e o mecanismo de ação da $1,25\text{-D}_3$ na atividade da enzima GGT em células de Sertoli e germinativas;
2. Investigar o efeito da $1,25\text{-D}_3$ na secreção de lactato e na atividade da enzima LDH em células de Sertoli;
3. Investigar o efeito da $1,25\text{-D}_3$ na captação de glicose em células de Sertoli e germinativas;
4. Investigar o efeito da $1,25\text{-D}_3$ na cadeia respiratória em células de Sertoli.

3 METODOLOGIA

3.1 Animais

Ratos Wistar machos de 30 dias de idade foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas sob um ciclo claro/escuro (luzes acesas das 6 às 18 horas), em sala climatizada com temperatura controlada, ração padronizada e água à vontade. Todos os animais foram monitorados e mantidos em concordância com as recomendações do Comitê de Ética do uso de Animais, protocolo 398; 479/CEUA/UFSC.

3.2 Isolamento de células de Sertoli e obtenção de células germinativas

As células de Sertoli foram isoladas de testículos de ratos de 30 dias de idade através de uma digestão enzimática sequencial de acordo com o método de Dorrington, Roller e Fritz (1975). Uma fração rica em células germinativas foi obtida a partir do sobrenadante da digestão enzimática e utilizadas em seguida. As células de Sertoli obtidas no final do processo foram semeadas na densidade de 650.000 células/cm² e cultivadas em meio Ham's F12/DMEM (1:1) suplementado com 2% de soro sintético (Serum Replacement 3, da Sigma-Aldrich), bicarbonato de sódio 2,2 g/L e antibióticos (penicilina 50.000 UI/L, estreptomomicina 50 mg/L, kanamicina 50 mg/L) e fungicida (anfotericina B 0,25 mg/L) em atmosfera úmida, contendo 5% de CO₂ e 95% de O₂, a 34 °C. No terceiro dia, as células germinativas remanescentes foram removidas do meio de cultura através de um breve tratamento hipotônico com uma solução de 20 mM de Tris-HCl (pH 7,3) (GALDIERI et al., 1981). 24 h após o choque hipotônico, foi realizada a troca do meio de cultura para meio sem soro e no dia seguinte as células de Sertoli foram submetidas a diferentes tratamentos em um novo meio de cultura desprovido de soro (ZANATTA et al., 2011c).

3.3 Atividade da enzima gama-glutamil transpeptidase

As células foram incubadas em meio sem soro na presença ou ausência de 1,25-D₃ 1 nM por 1, 3, 6, 24, 48 e 72 h. Nos experimentos onde foram utilizados inibidores, as células foram pré-incubadas na presença ou ausência de H-89, estearoilcarnitina (ST), PMA, cicloheximida (CH) e CM por 30 min, seguido de uma incubação de 6

ou 72 h com ou sem 1,25-D₃, e os inibidores foram mantidos durante o período de incubação. Após a incubação, as células foram lavadas com tampão PBS e homogeneizadas em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,5 e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951). A atividade da GGT foi determinada usando-se a técnica modificada descrita por Orłowski e Meister (1963), utilizando L- γ -glutamil-p-nitroanilina como substrato e glicilglicina como molécula aceptora. Alíquotas das amostras foram incubadas com o substrato enzimático por 60 min a 34 °C, e a reação enzimática foi interrompida pela adição de ácido acético 1 M. As absorbâncias foram determinadas em leitor de placas (Tecan Infinite® 200 PRO) a 530 nm. Os resultados foram expressos como % do controle (ZANATTA et al., 2011b).

3.4 Captação de glicose

Para o ensaio de captação de glicose, o meio de cultura das células foi retirado e as células foram pré-incubadas com tampão Krebs Ringer-bicarbonato (KRb) (NaCl 122 mM, KCl 3 mM, MgSO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 1,3 mM, KH₂PO₄ 0,4 mM, NaHCO₃ 25 mM) por 30 min em atmosfera carbogênica (O₂:CO₂, 95:5 v/v), pH 7,4; a 34 °C. Após, as células foram incubadas com tampão KRb contendo 0,1 μ Ci/mL de [¹⁴C]-2-Deoxi-d-glicose (¹⁴C-DG) por 15, 30 e 60 min. 1,25-D₃ 1 nM foi adicionada ao meio de pré-incubação (30 min) e ao meio de incubação (15, 30 e 60 min). Posteriormente as células foram lavadas com tampão KRb e homogeneizadas em solução de NaOH 0,5 M. Alíquotas de 100 μ L das amostras foram colocadas em líquido de cintilação para a determinação da radioatividade, que foi realizada em espectrômetro de cintilação líquida (Modelo LS 6500, Multi-Portoposse Scintillation Counter – Beckman Coulter, Boston, USA) e uma alíquota de 50 μ L foi utilizada para a dosagem de proteínas pelo método de Lowry et al. 1951. Os resultados foram expressos em % do controle (KAPPEL et al., 2013).

3.5 Determinação dos níveis de lactato

As células de Sertoli foram incubadas em meio sem soro na presença ou ausência da 1,25-D₃ 1 nM por 1, 3, 6, 24, 48 e 72 h. Após, o meio de incubação foi retirado e os níveis de lactato foram determinados através do método da lactato oxidase (HUTCHESSON et al., 1997) e os resultados foram expressos como % do controle (ZANATTA et al., 2011b).

3.6 Atividade da enzima lactato desidrogenase (morte celular e atividade intracelular)

Para os ensaios de atividade enzimática intracelular, as células foram incubadas em meio sem soro na presença ou ausência da 1,25-D₃ 1 nM por 6 h. Após a incubação, as células foram lavadas com tampão PBS e homogeneizadas em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,3 e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951). Para os ensaios de morte celular, as células foram incubadas em meio sem soro na presença ou ausência da 1,25-D₃ 1 nM por 1, 3, 6, 24, 48 e 72 h. Após, o meio de incubação das células foi retirado para determinar a atividade da enzima liberada no meio extracelular. A atividade da enzima foi determinada pela mensuração da oxidação do NADH através de um método colorimétrico (NEHAR et al., 1997). Os resultados foram expressos como % do controle (ZANATTA et al., 2011b).

3.7 Consumo de oxigênio mitocondrial

Para a determinação do consumo de oxigênio mitocondrial, as células de Sertoli foram incubadas em meio sem soro na presença ou ausência da 1,25-D₃ 1 nM por 1 h. Após a incubação, as células foram lavadas com tampão PBS e tripsinizadas com solução Tripsina/EDTA (0,05%/0,53 mM). Após, as células foram ressuspensas em meio sem soro e a respiração foi medida a 34 °C por respirometria de alta resolução utilizando Oxígrafo Oroboros. O ensaio foi realizado com concentração celular de 350.000 células/mL em câmaras com volume de 2 mL. Para a aquisição e análise dos dados foi utilizado o software DatLab (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) com intervalos de 1 ou 2 s. Utilizando esta técnica, é possível verificar o fluxo de elétrons e o consumo de oxigênio de tecidos, células e mitocôndrias isoladas. Nesta técnica, a respiração mitocondrial é dividida em 4 estágios (HUTTER et al., 2004; REMOR et al., 2011):

- (1) Respiração basal: observação do consumo de oxigênio em condições basais sem acréscimo de inibidores, substratos ou desacopladores;
- (2) Estado IV de respiração mitocondrial: representado pelo consumo de oxigênio ocasionado pela transferência de elétrons através da cadeia respiratória. Após observado o fluxo respiratório em estado constante no intervalo de 15 a

30 min, a atividade da ATP sintetase foi inibida com oligomicina (1 µg/mL).

- (3) Respiração máxima: representa o consumo de oxigênio observado após titular o sistema experimental com o desacoplador mitocondrial FCCP (carbonil cianida 4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona) até a concentração de 5,6 µM (80% da atividade máxima de transferência de elétrons mitocondrial). O desacoplamento da fosforilação oxidativa pelo FCCP permite que íons orgânicos passem facilmente através das membranas. Assim, a transferência de elétrons da fosforilação oxidativa é desacoplada pela dissipação dos prótons que formam o gradiente eletroquímico através da membrana mitocondrial. Este parâmetro indica a capacidade máxima mitocondrial em transferir elétrons;
- (4) Consumo de oxigênio residual: indica o consumo de oxigênio não proveniente da respiração mitocondrial, representado pela redução incompleta do oxigênio em espécies reativas. A cadeia transportadora de elétrons é inibida pela adição de rotenona 0,5 µM (inibe o complexo I) e antimicina A 2,5 µM (inibe o complexo III). Assim, com a cadeia inibida, o oxigênio consumido não é devido a passagem de elétrons pela cadeia respiratória.

3.8 Conteúdo de glutatona reduzida

Para a determinação do conteúdo de GSH, as células de Sertoli foram incubadas em meio sem soro por 6 h na presença ou ausência da 1,25-D₃ 1 nM. Após, as células foram lavadas com tampão PBS e homogeneizadas em solução de ácido tricloroacético 12% (TCA 12%). Os níveis de GSH foram determinados segundo o método descrito por Beutler, Duron e Kelly (1963), que é baseado na reação da GSH com DTNB (5,5'-Dithiobis(ácido 2-nitrobenzóico) formando um ânion conjugado, TNB (ácido tionitrobenzóico) de cor amarelada, que é mensurável em 412 nm. Os resultados foram expressos como % do controle (DE LIZ OLIVEIRA CAVALLI et al., 2013).

3.9 Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média ± erro padrão da média (E.P.M.) por µg de proteína ou em % do controle de determinações realizadas em 3 a 4 experimentos independentes. As

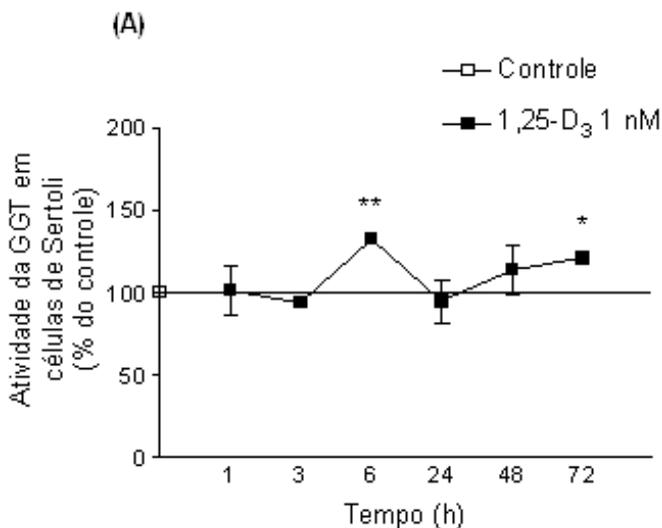
comparações estatísticas foram realizadas através do teste t de Student ou ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Bonferroni, quando necessário. Foi utilizado o programa INSTAT versão 2.02. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para um p igual ou menor que 0,05.

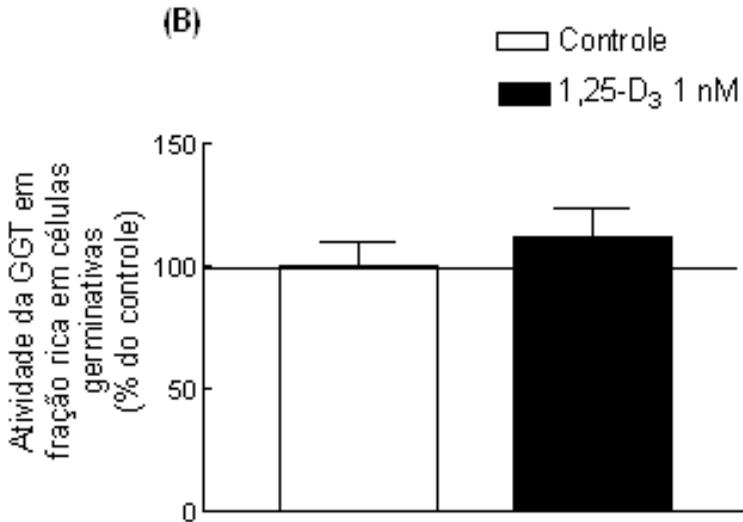
4 RESULTADOS

4.1 1,25-D₃ estimula a atividade da GGT em células de Sertoli

Para estudar o efeito da 1,25-D₃ na atividade da GGT em células de Sertoli, inicialmente foi realizada uma curva de tempo com o hormônio (**figura 8A**). Um efeito estimulatório significativo foi observado após 6 e 72 h de tratamento. Este aumento foi de 33% e 21%, respectivamente, comparado com o grupo controle. A atividade da GGT também foi medida em fração rica em células germinativas isoladas de testículos de ratos de 30 dias de idade. A **figura 8B** demonstra que nesta idade a atividade da GGT nas células germinativas não é alterada por 1,25-D₃ depois de uma hora de incubação.

Figura 8 – (A) Efeito da 1,25-D₃ na curva de tempo da atividade da GGT em células de Sertoli e (B) em fração rica em células germinativas.





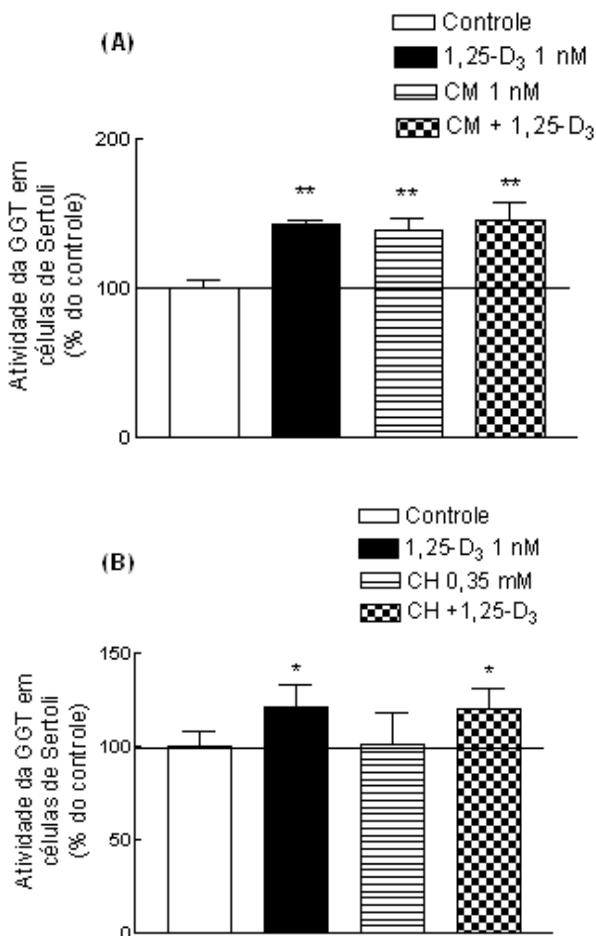
As células de Sertoli e células germinativas foram incubadas com 1,25-D₃ 1 nM em diversos tempos para verificar o efeito do hormônio na atividade da enzima GGT. Tempo de incubação: 1 h (B). Os valores representam a média ± E.P.M. expressos como % do controle. * $P < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparado com o grupo controle. (Figura A – controle 6 h = $0,116 \pm 0,01$ UI/ μ g proteína/min; 72 h = $0,144 \pm 0,016$ UI/ μ g proteína/min. Figura B – controle = $0,047 \pm 0,005$ UI/ μ g proteína/min)

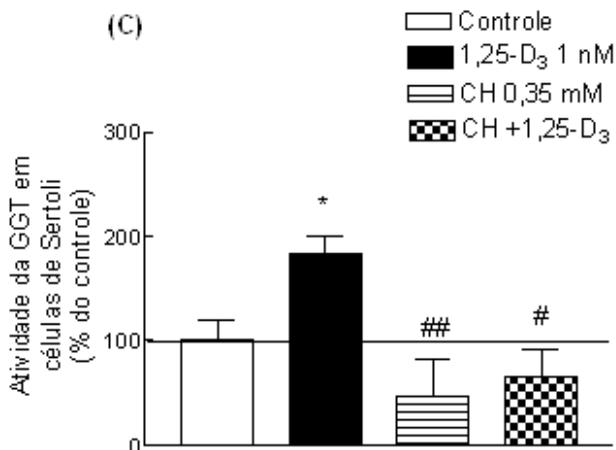
4.2 Efeito da CM e CH na ação estimulatória da 1,25-D₃ na atividade da GGT em células de Sertoli

A **figura 9A** mostra o potencial de um agonista natural do VDR, a CM, em estimular a atividade da GGT em células de Sertoli em 6 h comparado com a 1,25-D₃. Como é demonstrado, a CM na dose 1 nM aumentou a atividade da GGT na mesma intensidade da 1,25-D₃. Além disso, quando ambos foram utilizados na incubação não houve alteração no efeito estimulatório do hormônio na atividade da GGT. As **figuras 9B e 9C** mostram o efeito de um inibidor da síntese proteica (CH) na atividade da GGT estimulada por 1,25-D₃ após 6 e 72 h, respectivamente. A CH, em uma dose que reduz a síntese proteica testicular em 96% (0,35 mM) (MENEGAZ et al., 2006) não alterou a atividade da GGT basal ou a atividade estimulada por 1,25-D₃ em 6 h.

Entretanto, depois de 72 h, a atividade basal e a atividade estimulada por 1,25-D₃ foi bloqueada significativamente, sugerindo que a atividade estimulatória do hormônio na atividade da enzima em 72 h seja dependente da síntese proteica ativa nas células de Sertoli.

Figura 9 – (A) Influência do ligante natural do VDR CM e (B, C) da síntese proteica na atividade da GGT em células de Sertoli.





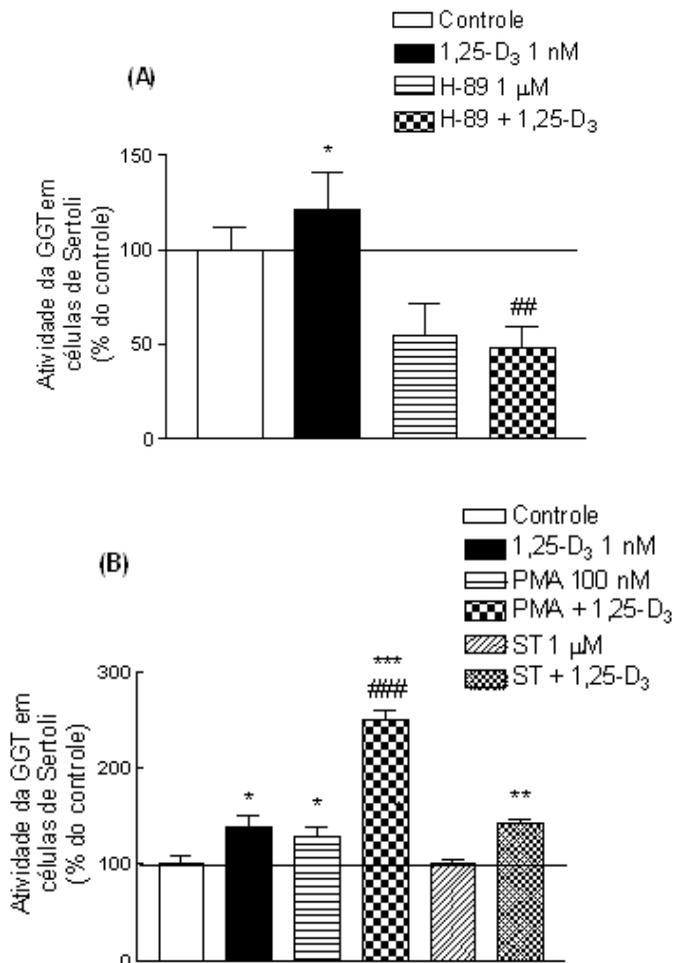
As células de Sertoli foram incubadas com a 1,25-D₃ 1 nM na presença e/ou ausência do ligante natural do VDR curcumina (CM) 1 nM e do inibidor da síntese proteica cicloheximida (CH) 0,35 mM. Os inibidores foram adicionadas 30 min antes do hormônio. Tempo de incubação: 6 h (A e B) e 72 h (C). Os valores representam a média ± E.P.M. expressos como % do controle. **P* < 0,05 comparado com o grupo controle. #*P* < 0,05 e ##*p* < 0,01 comparado com o grupo 1,25-D₃ (Figura A – controle = 0,658 ± 0,119 UI/μg proteína/min. Figura B – controle = 0,658 ± 0,129 UI/μg proteína/min. Figura C – controle = 1,150 ± 0,279 UI/μg proteína/min).

4.3 Envolvimento da PKA e PKC no efeito estimulatório da 1,25-D₃ na atividade da GGT em células de Sertoli

Foi demonstrado previamente que a 1,25-D₃ aumenta a atividade da GGT em testículos de ratos de 30 dias de idade através da ativação da via da PKA (ZANATTA et al., 2011b). Para estudar a hipótese de que a GGT, uma enzima localizada na membrana plasmática seja um alvo da 1,25-D₃ no testículo, foi verificada a atividade da enzima nas células de Sertoli. A **figura 10A** sugere o envolvimento da PKA no mecanismo de ação da 1,25-D₃ na atividade da GGT em células de Sertoli, já que o inibidor da PKA, H-89, bloqueou o efeito estimulatório do hormônio na atividade da enzima. O pré-tratamento das células de Sertoli com um ativador da PKC, o PMA, promoveu um aumento significativo na atividade da GGT comparado com o grupo controle. Quando o PMA foi utilizado em conjunto com a 1,25-D₃ foi

observado um efeito sinérgico. Por outro lado, na presença de ST, um inibidor da PKC, o efeito da 1,25-D₃ não foi alterado (**figura 10B**). Também não foi observado um efeito *per se* da ST na atividade basal da GGT.

Figura 10 – Envolvimento da via da (A) PKA e (B) PKC na atividade da GGT em células de Sertoli.



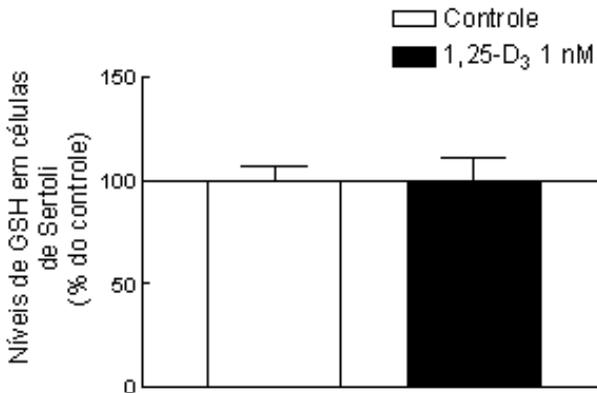
As células de Sertoli foram incubadas com a 1,25-D₃ 1 nM na presença e/ou ausência de inibidores e ativador de proteínas cinases para determinar o mecanismo de ação do hormônio sobre a enzima GGT. H-89 1 μM (inibidor da

PKA), PMA 100 μM (ativador da PKC) e esteroilcarnitina (ST) 1 μM (inibidor da PKC) foram adicionados 30 min antes do hormônio. Tempo de incubação: 6 h. Os valores representam a média \pm E.P.M. expressos como % do controle. * $P < 0,05$; ** $p < 0,01$ comparado com o grupo controle. ### $P < 0,01$ e #### $p < 0,001$ comparado com o grupo 1,25-D₃ (Figura A – controle = $1,94 \pm 0,274$ UI/ μg proteína/min. Figura B – controle = $0,139 \pm 0,014$ UI/ μg proteína/min)

4.4 Efeito da 1,25-D₃ no conteúdo de GSH em células de Sertoli

Devido a diversos trabalhos demonstrarem o papel da GGT no metabolismo da GSH e na remoção de substâncias oxidadas, foi investigado o efeito da 1,25-D₃ nos níveis de GSH nas células de Sertoli. A **figura 11** mostra que após 6 h de incubação com o hormônio, não houve alteração significativa nos níveis de GSH, sugerindo que o aumento da atividade da GGT por 1,25-D₃ pode não estar relacionado, a princípio, com a biossíntese de GSH nas células de Sertoli.

Figura 11 – Efeito da 1,25-D₃ nos níveis de GSH em células de Sertoli.

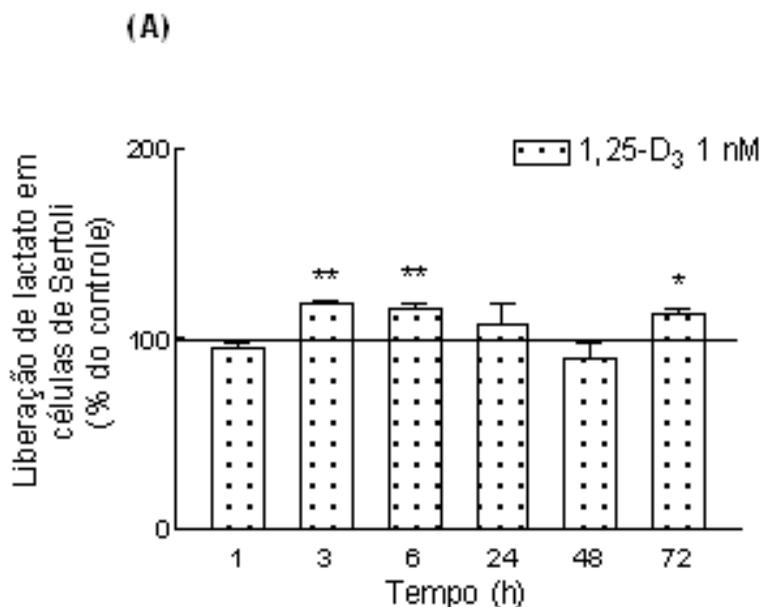


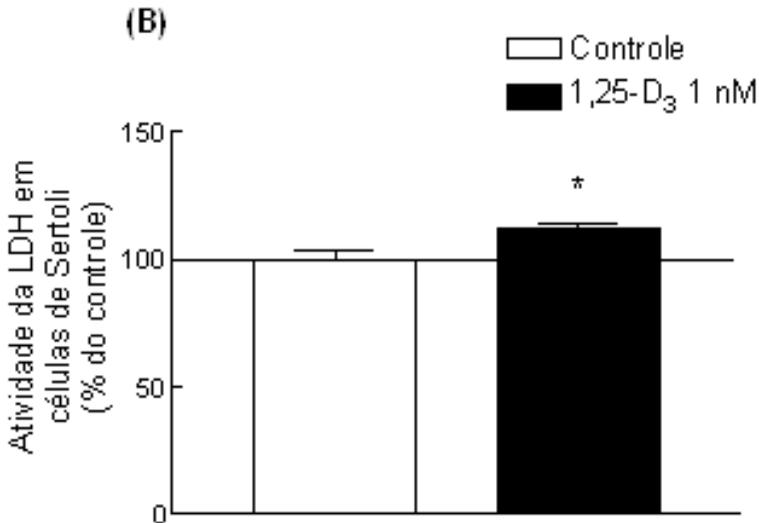
As células de Sertoli foram incubadas com a 1,25-D₃ 1 nM para verificar o efeito do hormônio nos níveis de glutathiona (GSH) das células. Tempo de incubação: 6 h. Os valores representam a média \pm E.P.M. expressos como % do controle (Controle = $0,228 \pm 0,015$ mmol/ μg proteína).

4.5 A 1,25-D₃ estimula a produção de lactato e atividade da LDH intracelular em células de Sertoli

A **figura 12A** mostra a curva de tempo na liberação de lactato no meio de cultura pelas células de Sertoli estimuladas por 1,25-D₃ por 1, 3, 6, 24, 48 e 72 h. Os resultados demonstram um aumento significativo na produção de lactato após 3, 6 e 72 h de incubação na presença do hormônio. A **figura 12B** mostra os resultados obtidos para a determinação da atividade da LDH intracelular em células de Sertoli estimuladas por 6 h com 1,25-D₃. Um aumento significativo na atividade da enzima em culturas tratadas com 1,25-D₃ foi observado, em acordo com o aumento da produção de lactato.

Figura 12 – Efeito da 1,25D₃ na curva de tempo na liberação de lactato (A) e atividade da LDH intracelular (B) em células de Sertoli.



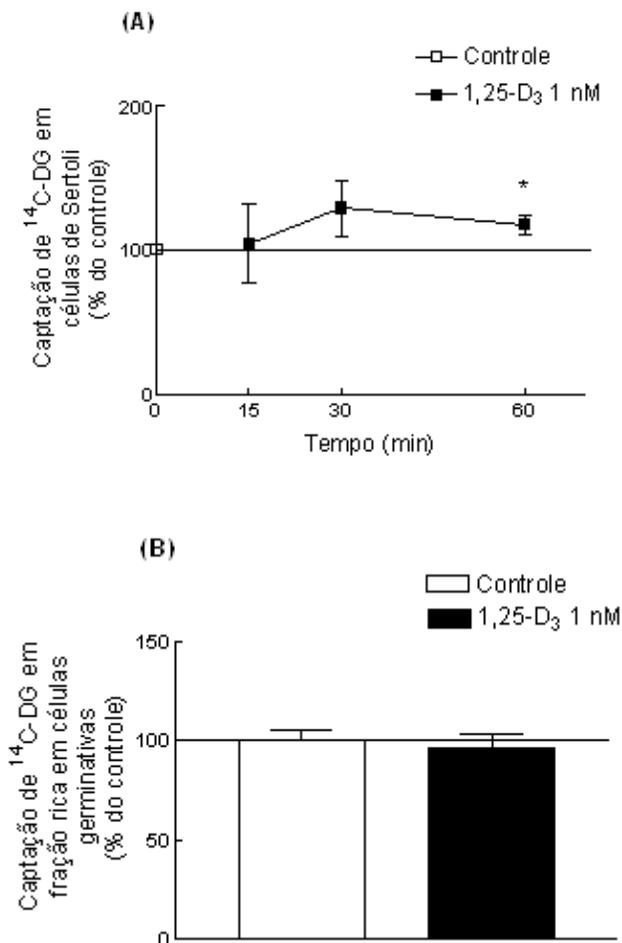


As células de Sertoli foram incubadas com 1,25-D₃ 1 nM por diferentes tempos para verificar o efeito do hormônio na liberação de lactato no meio extracelular e a atividade da LDH intracelular nestas células. Os valores representam a média ± E.P.M. expressos como % do controle. * $P < 0,05$; ** $p < 0,01$ comparado com o grupo controle (Figura A – controle 3 h = 8,260 ± 0,191 mg/dL/ ug proteína; 6 h = 166,745 ± 3,845 mg/dL/ug proteína; 72 h = 666,067 ± 12,168 mg/dL/ ug proteína. Figura B – controle = 10,543 ± 0,981 UI/ug proteína).

4.6 Efeito da 1,25D₃ na captação de glicose em células de Sertoli

Como foi observado que a 1,25-D₃ estimula a secreção de lactato e aumenta a atividade da enzima LDH intracelular, foi verificado se a 1,25-D₃ possui ação na captação de glicose nas células estudadas. A **figura 13** mostra a captação de ¹⁴C-DG em células de Sertoli (A) e em fração rica em células germinativas (B) com diferentes tempos de incubação (15, 30 e 60 min) com a 1,25-D₃. Os resultados mostram que o hormônio aumentou significativamente a captação de ¹⁴C-DG em células de Sertoli (60 min), porém não houve efeito estimulatório nas células germinativas.

Figura 13 – Efeito da 1,25-D₃ na curva de tempo na captação de glicose em (A) células de Sertoli e (B) em fração rica em células germinativas.



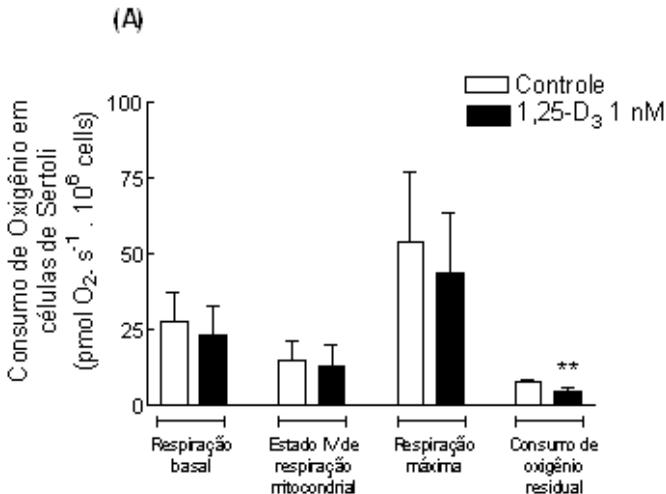
As células de Sertoli e germinativas foram incubadas com a 1,25-D₃ 1 nM por diferentes tempos para verificar o efeito do hormônio na captação de glicose nestas células. Tempo de incubação: 1 h (B). Os valores representam a média ± E.P.M. expressos como % do controle. **P* < 0,05 comparado com o grupo controle. (Figura A – controle 1 h = 0,926 ± 0,054 mg glicose/mL/ug proteína. Figura B – controle = 0,00025 ± 1,425x10⁻⁵ mg glicose/mL/ug proteína).

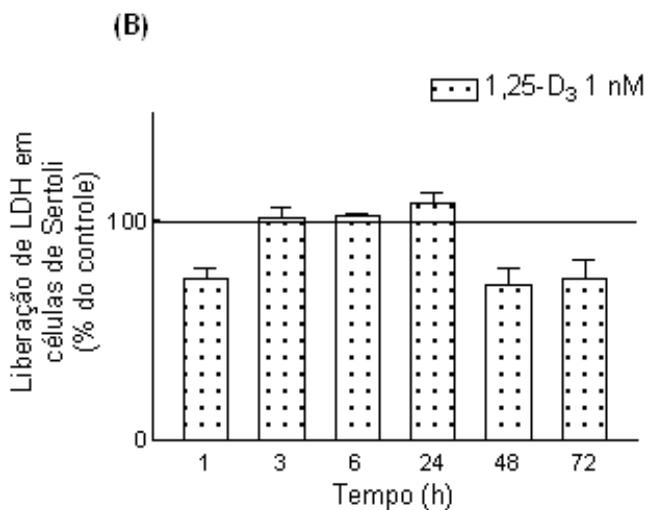
4.7 Efeito da 1,25-D₃ na respiração mitocondrial e na morte celular em células de Sertoli

Como o consumo de oxigênio pode estar relacionado com a atividade metabólica, aumento da atividade oxidativa e morte celular, foi investigado se há uma relação entre o aumento da captação de glicose e produção de lactato estimulada pela 1,25-D₃ e o consumo de oxigênio pelas células de Sertoli tratadas com 1,25-D₃ durante 1 h.

Como pode ser observado na **figura 14A**, não houve alteração na respiração basal (sem a adição de substratos ou efetores) das células. Além disso, o tratamento com inibidores (oligomicina, FCCP e rotenona mais antimicina A) não alterou o consumo de oxigênio nas células de Sertoli tratadas com 1,25-D₃ em comparação com os respectivos grupos controles, porém foi observado a diminuição do consumo de oxigênio residual. A **figura 14B** mostra os níveis de liberação de LDH no meio de incubação depois de 1, 3, 6, 24, 48 e 72 h de tratamento com o hormônio. De acordo com os resultados obtidos, não houve alterações após o tratamento com 1,25-D₃ em diferentes tempos, indicando que os efeitos do hormônio não estão associados com morte celular.

Figura 14 – Efeito da 1,25-D₃ no consumo de oxigênio (A) e liberação de LDH no meio extracelular (B) em células de Sertoli.





As células de Sertoli foram incubadas com a 1,25-D₃ 1 nM por diferentes tempos para verificar o efeito do hormônio no consumo de oxigênio e na morte celular destas células. Tempo de incubação: 1 h (A) e 1, 3, 6, 24, 48, 72 h (B). O consumo de oxigênio através da respiração basal, estado IV de respiração mitocondrial (oligomicina), respiração máxima (FCCP) e consumo de oxigênio residual (rotenona e antimicina A) foi realizado como indicado em Materiais e Métodos. Os valores representam a média ± E.P.M. expressos como % do controle. * $P < 0,05$; ** $p < 0,01$ comparado com o grupo controle.

5 DISCUSSÃO

Os efeitos biológicos da vitamina D foram estudados em inúmeros tecidos ao longo dos anos. A $1,25\text{-D}_3$, um metabólito ativo da vitamina D, interage com o receptor VDR para exercer as ações em tecidos-alvo. A necessidade deste hormônio para a absorção e manutenção dos níveis de cálcio e fosfato a partir da dieta já está bem descrita, porém a observação da presença do receptor VDR em tecidos que não participam na homeostase iônica mineral levou à descoberta de novas funções para este hormônio. O receptor VDR é um membro da superfamília de receptores nucleares para hormônios esteróides, envolvido na regulação da expressão gênica (DUSSO; BROWN; SLATOPOLSKY, 2005; BLOMBERG JENSEN, 2012). Porém a observação de efeitos rápidos envolvendo o transporte de cálcio através da membrana intestinal levantou a hipótese da existência de um receptor VDR associado à membrana plasmática das células. A partir disso, diversos efeitos rápidos ou não-genômicos já foram descritos, como abertura de canais VDCC e canais de cloreto, assim como a ativação de proteínas cinases (ZANATTA et al., 2011a).

A $1,25\text{-D}_3$ possui um papel importante na manutenção da reprodução masculina. Estudos anteriores demonstraram que há uma redução da fertilidade em ratos deficientes de vitamina D, porém sua função no sistema reprodutor masculino ainda não está completamente entendida (KWIECINSKI; PETRIE; DE LUCA, 1989; KINUTA et al., 2000). Neste trabalho, foram avaliados os efeitos da $1,25\text{-D}_3$ em alvos na membrana plasmática e funções metabólicas de células de Sertoli de ratos de 30 dias de idade. As células de Sertoli possuem um papel fundamental na espermatogênese. Uma célula de Sertoli é capaz de manter várias células germinativas em diferentes estágios de desenvolvimento, fornecendo a elas substratos energéticos e fatores de crescimento necessários para o desenvolvimento normal e completo da onda espermatogênica. Devido a este papel de suporte, o número de células de Sertoli na vida adulta determina o tamanho testicular e a produção de esperma (PETERSEN; SÖDER, 2006).

Neste estudo, foi demonstrado que a $1,25\text{-D}_3$ estimula a atividade da enzima GGT, uma enzima de membrana associada às células de Sertoli no sistema reprodutor masculino (LU; STEINBERGER, 1977). Já foi demonstrado que a atividade da GGT é importante para o desenvolvimento sexual normal (HARDING et al., 1997; KUMAR et al., 2000) e estudos previamente publicados pelo nosso grupo também demonstraram que a $1,25\text{-D}_3$ estimula a ação da

GGT em testículos de ratos (ZANATTA et al., 2011b). A ação estimulatória da 1,25-D₃ sobre a GGT também já foi demonstrada em astrócitos (GARCION et al., 1999).

Para investigar a origem do efeito estimulatório da 1,25-D₃ na atividade da GGT nas células de Sertoli, foram utilizados um ligante natural do receptor VDR, a CM, e um inibidor da síntese proteica, a CH. A CM é um polifenol isolado do rizoma da planta tumérica (*Curcuma longa*) efeitos conhecidos antioxidante, antiangiogênico, anticancerígeno e para o tratamento de feridas, dentre outros (TIYABOONCHAI; TUNGPRADIT; PLIANBANGCHANG, 2007; PÉREZ-LARA; CORBALÁN-GARCÍA; GÓMEZ-FERNÁNDEZ, 2011). Já foi demonstrado que a CM e a BDC servem como ligantes naturais para o receptor de vitamina D (JURUTKA et al., 2007; MASOUMI et al., 2009; BARTIK et al., 2010), e foi demonstrado por Menegaz et al. (2011) que a CM se liga no receptor alternativo de membrana VDR em baixas concentrações (0,1 e 1 µM) em células de Sertoli TM4, sugerindo que estes compostos se ligam no VDRmem e desencadeiam ações como abertura de canais de cloreto, com mecanismo de ação semelhante a 1,25-D₃. Devido a sua estrutura fixa e estes efeitos não-genômicos conhecidos na membrana plasmática, a CM se torna um composto interessante para os estudos de efeitos rápidos na membrana plasmática juntamente com a 1,25-D₃. No presente estudo, quando as células de Sertoli foram incubadas com a 1,25-D₃ juntamente com a CM, houve um aumento da atividade da GGT semelhante ao estímulo de ambos os compostos isolados. Isto sugere que o efeito da 1,25-D₃ e da CM na atividade da GGT nas células de Sertoli tenha origem pelo menos em parte no mesmo receptor, o VDRmem. Quando foi utilizado o CH em 6 h, não houve alteração significativa no efeito estimulatório do hormônio, reforçando a hipótese que a estimulação da atividade da GGT por 1,25-D₃ aconteça através do receptor membranar VDRmem. Porém, em incubações mais prolongadas, a inibição da síntese proteica diminuiu significativamente o efeito estimulatório da 1,25-D₃, sugerindo que a regulação da atividade da GGT pelo hormônio possa ocorrer também através do controle da expressão da enzima.

Considerando estes resultados, que indicam que o efeito da 1,25-D₃ na atividade da GGT iniciaria na membrana, foram utilizados inibidores específicos de proteínas cinases no intuito de esclarecer um pouco mais o mecanismo de ação deste hormônio. Alguns trabalhos já demonstraram o envolvimento das vias da PKA e PKC nas ações rápidas e genômicas da 1,25-D₃ em diferentes células e tecidos (AVILA et al., 2007; MENEGAZ et al., 2009; ZANATTA et al., 2011d). Os resultados

deste trabalho sugerem o efeito estimulatório da 1,25-D₃ é dependente da atividade da PKA, mas independente da atividade da PKC. Estudos anteriores já demonstraram que a PKA está envolvida no efeito da 1,25-D₃ na atividade da GGT em testículos (ZANATTA et al., 2011b). Porém, como o inibidor também foi capaz de diminuir a atividade da enzima nas células estudadas, outras estratégias precisam ser utilizadas para confirmar o envolvimento da PKA neste mecanismo, como diferentes inibidores e ativadores desta enzima cinase. Neste estudo também foi utilizado o PMA, um ativador da PKC, o qual gerou um efeito estimulatório *per se* na atividade da GGT nas células de Sertoli. Quando as células foram pré-incubadas com PMA e incubadas com 1,25-D₃, podemos observar um efeito sinérgico dos compostos, sugerindo que a estimulação da atividade da GGT ocorra por vias diferentes. Meroni et al. (1997) demonstraram que a regulação da atividade da GGT por FSH em células de Sertoli ocorre por uma via dependente da PKC e de cálcio, sendo que a inibição da PKC aumentou a estimulação da atividade da GGT por FSH. Também já foi demonstrado que a inibição da PKC em ratos diabéticos aumentou a secreção da GSH biliar (LU et al., 1997). O PMA é um ativador da PKC, porém já foi demonstrado que o PMA altera a atividade da enzima NADPH oxidase, enzima que participa na regulação da expressão e atividade da GGT através do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (RAVURI; SCVINENG; PANKIV, 2011; PANDUR et al., 2013). O aumento da atividade da GGT pelo PMA observado neste estudo pode estar relacionado com a ativação da NADPH oxidase, resultando no estímulo da expressão e atividade da GGT.

A GGT é uma enzima relacionada com a regeneração da GSH, um antioxidante não enzimático presente nas células, capaz de se ligar a espécies reativas de oxigênio e moléculas oxidantes e facilitar a sua eliminação (ZHANG; FORMAN; CHOI, 2005). Para verificar se o estímulo da atividade da GGT por 1,25-D₃ nas células de Sertoli está envolvido na recuperação da GSH, foram verificados os níveis de GSH nas células após o tratamento com a 1,25-D₃. Conforme demonstrado nos resultados, os níveis de GSH nas células tratadas não sofreram alterações, sugerindo que a 1,25-D₃ atue na atividade da GGT mas não altere, a princípio, a formação de GSH nestas células.

As células germinativas em desenvolvimento possuem necessidades metabólicas específicas, utilizando preferencialmente lactato como substrato para a produção de ATP. É imprescindível que as células germinativas recebam níveis adequados de substratos energéticos, ou elas podem sofrer degeneração, levando a ativação de

vias apoptóticas (RATO et al., 2012a). Sendo assim, foram verificados os níveis de lactato produzidos pelas células de Sertoli e liberados no meio. Os resultados mostram que o tratamento com a 1,25-D₃ aumentou os níveis de lactato liberados pelas células de Sertoli. Este aumento sugere que o hormônio possa estar envolvido na regulação do metabolismo das células de Sertoli, através de mecanismos que auxiliem a nutrição e desenvolvimento das células germinativas. A importância do lactato para o desenvolvimento normal da espermatogênese é ressaltado por estudos demonstrando que em adultos com criptorquidia há uma melhora na espermatogênese com a infusão intratesticular de lactato (COURTENS; PLÖEN, 1999), e em células germinativas o lactato possui um efeito antiapoptótico (ERKKILÄ et al., 2002). Já foi demonstrado também que diversos hormônios, como FSH, IGF-1 e insulina também estimulam o transporte de lactato para o meio extracelular. Assim, a produção de lactato pelas células de Sertoli se torna um ponto importante no controle metabólico da espermatogênese. (ALVES et al., 2012).

Nas células de Sertoli, a maior parte da glicose captada pelas células é convertida em lactato para a nutrição das células germinativas (ROBINSON; FRITZ, 1981). A glicose é captada pelas células através dos GLUTs, sendo metabolizada a piruvato pela via glicolítica. Posteriormente, o piruvato é convertido a lactato com a oxidação/redução simultânea no NADH a NAD⁺, catalisada pela enzima LDH. O lactato é então excretado pelos MCTs através da membrana plasmática para a nutrição das células germinativas (MARTINS et al., 2013). Como a 1,25-D₃ aumentou a liberação de lactato pelas células de Sertoli, foi investigado o efeito do hormônio na captação de ¹⁴C-DG e na atividade da enzima LDH. Os resultados demonstram que a 1,25-D₃ foi capaz de aumentar a captação de glicose e a atividade da LDH, corroborando com os resultados anteriores que demonstram o aumento da liberação de lactato pelas células de Sertoli tratadas com o hormônio. Isto sugere que a 1,25-D₃ atue no metabolismo das células de Sertoli aumentando a captação de glicose nestas células, a fim de estimular a produção de lactato pela LDH para depois ser liberado no meio extracelular para a nutrição das células germinativas.

O metabolismo energético nas células de mamíferos é composto por diversas etapas oxidativas, oriundas da degradação de substratos metabólicos, como carboidratos, lipídios e aminoácidos. Todas estas etapas convergem para a fosforilação oxidativa, que é o estágio final da respiração celular no qual a energia proveniente da oxidação é responsável pela síntese de ATP. A fosforilação oxidativa nos

eucariontes ocorre na mitocôndria, através do transporte de elétrons pela cadeia respiratória (LEHNINGER; NELSON; COX, 2006). Os resultados deste trabalho demonstram que não há alteração na respiração mitocondrial nas células tratadas com a 1,25-D₃, o que demonstra que o aumento da captação de ¹⁴C-DG e produção de lactato estimulada pela 1,25-D₃ não altera a capacidade mitocondrial e a capacidade energética das células de Sertoli. Foi observado também uma diminuição significativa no consumo de oxigênio residual, sugerindo que o tratamento com a 1,25-D₃ diminuiu a produção de espécies reativas de oxigênio nas células. Embora o tratamento com a 1,25-D₃ não tenha alterado os níveis de GSH nas células de Sertoli, a diminuição de espécies reativas de oxigênio observada pode ser resultado da utilização da GSH intracelular, e assim o estímulo da 1,25-D₃ na síntese da GSH não seria visível. Diversos estudos demonstram que a 1,25-D₃ possui um efeito protetor contra o estresse oxidativo em células epiteliais (POLIDORO et al., 2013; UBERTI et al., 2013) e também em modelos de diabetes, com efeito protetor sistêmico (SALUM et al., 2013) atuando em diversos tecidos como fígado, rins (HAMDEN et al., 2009; GEORGE et al., 2012) e testículos de ratos diabéticos (HAMDEN et al., 2008), dentre outros tecidos.

Neste trabalho, também foi determinada a atividade da enzima LDH no meio de cultura das células de Sertoli incubadas com a 1,25-D₃ como parâmetro de morte celular. A LDH é uma enzima exclusivamente intracelular, e a sua presença no meio extracelular é um indicador de morte celular. Neste trabalho, foi demonstrado que a 1,25-D₃ não alterou os níveis de LDH extracelulares nos tempos estudados, indicando que o hormônio não possui capacidade citotóxica nestas células.

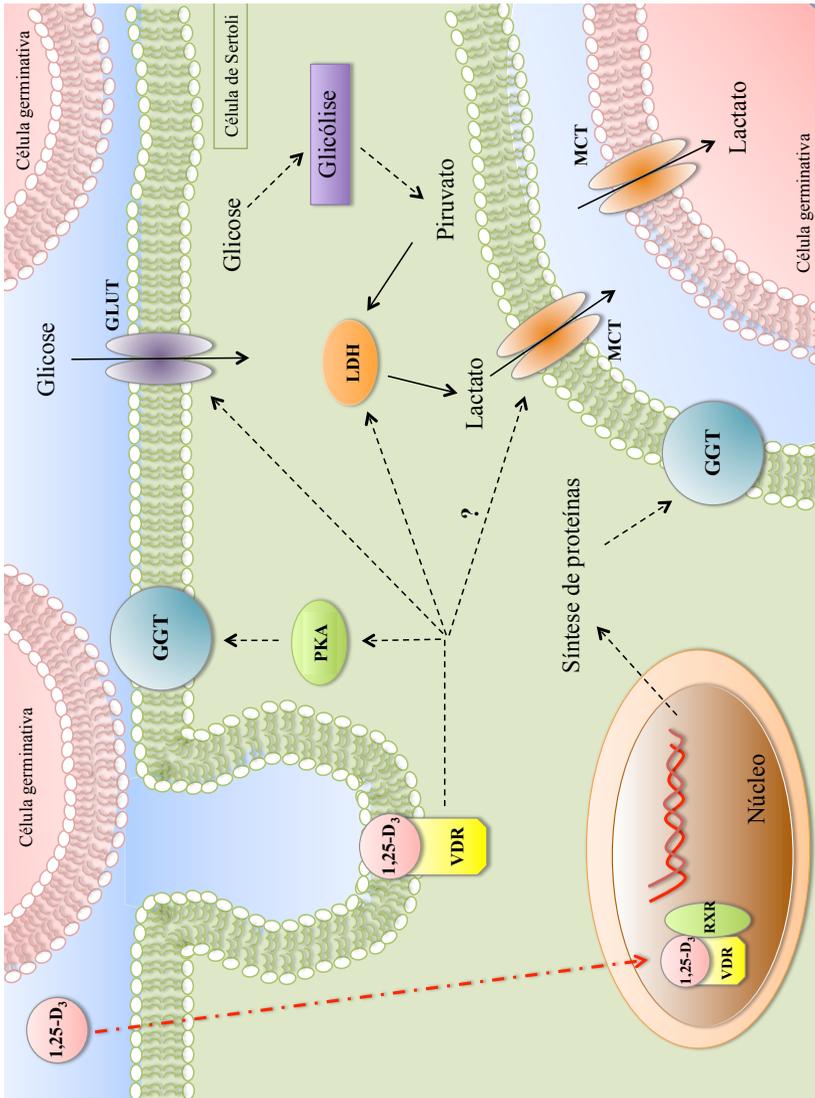
6 CONCLUSÕES

Dos resultados apresentados, podemos concluir que:

- A 1,25-D₃ estimula a atividade da GGT em células de Sertoli. Este efeito parece ser iniciado com a ligação do hormônio no receptor VDRmem presente na membrana, já que a co-incubação com a CM não alterou o efeito estimulatório da 1,25-D₃;
- O efeito estimulatório da 1,25-D₃ na atividade da GGT em células de Sertoli envolve respostas rápidas e respostas genômicas, visto que a inibição da síntese proteica pela CH teve efeitos diferentes nos tempos estudados;
- A ativação da GGT pela 1,25-D₃ parece envolver a via da PKA, porém a via da PKC parece não estar envolvida neste mecanismo de ação;
- A 1,25-D₃ estimula a liberação de lactato pelas células de Sertoli, através do aumento da captação de ¹⁴C-DG e aumento da atividade da LDH nas células;
- A 1,25-D₃ não altera o metabolismo energético das células de Sertoli, e exibe um efeito protetor devido a diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio.

Através dos resultados apresentados, concluímos que a 1,25-D₃ afeta a atividade da GGT e secreção de lactato, parâmetros importantes da função das células de Sertoli. Estes efeitos são iniciados, pelo menos em parte, pela interação da 1,25-D₃ com o receptor presente na membrana plasmática, o VDRmem. O hormônio exerce o efeito na GGT através da ativação de proteínas cinases e dependente da síntese *de novo* de proteínas, aumenta a captação de glicose, ativa a enzima LDH e a secreção de lactato. Sendo assim, estes resultados sugerem que a 1,25-D₃ representa um dos fatores parácrinos/autócrinos destinados a aumentar o fornecimento de energia e nutrientes e melhorar os mecanismos de defesa em células de Sertoli, para o desenvolvimento normal e completo da onda espermatogênica (figura 15).

Figura 15 – Hipótese do mecanismo de ação do hormônio 1,25-D₃ na atividade da GGT e secreção de lactato em células de Sertoli.



A interação da 1,25-D₃ com o receptor VDRmem ativa PKA que estimula a ação da enzima GGT na membrana. A interação do hormônio com o receptor

nuclear regula a síntese proteica e a expressão de proteínas/enzimas, dentre elas a GGT. A interação da $1,25\text{-D}_3$ com o VDR também estimula a captação de glicose e liberação de lactato, através da estimulação da atividade da LDH, para a nutrição das células germinativas.

Fonte: próprio autor.

7 REFERÊNCIAS

- AHMED, T.; GILANI, A.H. Therapeutic Potential of Tumeric in Alzheimer's Disease: Curcumin or Curcuminoids? **Phytotherapy Research**, v. 19, 2013 (epub ahead of print).
- AKERSTROM, V.L.; WALTERS M.R. Physiological effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in TM4 Sertoli cell line. **American Journal of Physiology**, v. 262, p. E884-E890, 1992.
- ALVES, M.G.; RATO, L.; CARVALHO, R.A.; MOREIRA, P.I.; SOCORRO, S.; OLIVEIRA, P.F. Hormonal control of Sertoli cell metabolism regulates spermatogenesis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, p. 777-793, 2012.
- ANDERSON, P.H.; HENDRIX, I.; SAWYER, R.K.; ZARRINKALAM, R.; MANAVIS, J.; SARVESTANI, G.T.; MAYD, B.K.; MORRIS, H. Co-expression of CYP27B1 enzyme with the 1.5 kb CYP27B1 promoter-luciferase transgene in the mouse. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 285, p. 1-9, 2008.
- ANGULO, C.; RAUCH, M.C.; DROPELMANN, A.; REYES, A.M.; SLEBE, J.C.; DELGADO-LÓPEZ, F.; GUAQUIL, V.H.; VERA, J.C.; CONCHA, I.I. Hexose Transporter Expression and Function in Mammalian Spermatozoa: Cellular Localization Transport of Hexoses and Vitamin C. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 71, p. 189-203, 1998.
- AQUILA, S.; GUIDO, C.; PERROTTA, I.; TRIPEPI, S.; NASTRO, A.; ANDÒ, S. Human sperm anatomy: ultrastructural localization of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D receptor and its possible role in the human male gamete. **Journal of Anatomy**, v. 213, p. 555-564, 2008.
- AVILA, E.; DÍAZ, L.; BARRERA, D.; HALHALI, A.; MÉNDEZ, I.; GONZÁLEZ, L.; ZUEGEL, U.; STEINMEYER, A.; LARREA, F. Regulation of Vitamin D hydroxylases gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and cyclic AMP in cultured human syncytiotrophoblasts. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 103, p. 90-96, 2007.

BARTIK, L.; WHITFIELD, G.K.; KACZMARSKA, M.; LOWMILLER, C.L.; MOFFET, E.W.; FURMICK, J.K.; HERNANDEZ, Z.; HAUSSLER, C.A.; HAUSSLER, M.R.; JURUTKA, P.W. Curcumin: a novel nutritionally derived ligand of the vitamin D receptor with implications for colon cancer chemoprevention. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, p. 1153-1161, 2010.

BELLVÉ, A.R.; MILLETTE, C.F.; BHATNAGAR, Y.M.; O'BRIEN, D.A. Dissociation of the mouse testis and characterization of isolated spermatogenic cells. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 25, p. 480-494, 1977.

BENTLEY, A.R.; EMRANI, P.; CASSANO, P.A. Genetic variation and gene expression in antioxidant related enzymes and risk of COPD: a systematic review. **Thorax**, v. 63, p. 956-961, 2008.

BERGER, A.L.; RANDAK, C.O.; OSTEDGAARD, L.S.; KARP, P.H.; VERMEER, D.W.; WELSH, M.J. Curcumin stimulates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 5221-5226, 2005.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. **The journal of laboratory and clinical medicine**, v. 61, p. 882-888, 1963.

BLOMBERG JENSEN, M.; NIELSEN, J.E.; JORGENSEN, A.; RAJPERT-DE MEYTS, E.; KRISTENSEN, D.M.; JORGENSEN, N.; SKAKKEBAEK, N.E.; JUUL, A.; LEFFERS, H. Vitamin D receptor and vitamin D metabolizing enzymes are expressed in the human male reproductive tract. **Reproductive endocrinology**, v. 25, p. 1303-1311, 2010.

BLOMBERG JENSEN, M. Vitamin D metabolism, sex hormones, and male reproductive function. **Reproduction**, v. 144, p. 135-152, 2012.

BOUILLON, R.; OKAMURA, W.H.; NORMAN, A.W. Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system. **Endocrine Reviews**, v. 16, p. 200-257, 1995.

BOURGUIBA, S.; GENISSEL, C.; LAMBARD, S.; BOURAÏMA, S.; CARREAU, S. Regulation of aromatase gene expression in Leydig cells and germ cells. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 86, p. 335-343, 2003.

BOUSSOUAR, M.; BENAHMED, M. Lactate and energy metabolism in male germ cells. **TRENDS in Endocrinology and Metabolism**, v. 15, p. 345-350, 2004.

BOYAN, B.D.; DEAN, D.D.; SYLVIA, V.L.; SCHWARTZ, Z. Nongenomic regulation of extracellular matrix events by vitamin D metabolites. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 56, p. 331-339, 1994.

CARREAU, S.; HESS, R.A. Oestrogens and spermatogenesis. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v. 365, p. 1517-1535, 2010.

CASTON, L.A.; SANBORN, B.M. Regulation of Testicular and Sertoli Cell Gamma-Glutamyl Transpeptidase by Follicle-Stimulating Hormone. **Biology of Reproduction**, v. 38, p. 109-113, 1988.

CHENG, C.Y.; MRUK, D.D. Cell Junction Dynamics in the Testis: Sertoli-Germ Cell Interactions and Male Contraceptive Development. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 825-874, 2002.

COURTENS, J.L.; PLÖEN, L. Improvement of spermatogenesis in adult cryptorchid rat testis by intratesticular infusion of lactate. **Biology of reproduction**, v. 61, p. 154-161, 1999.

COOKE, H.J.; SAUNDERS, P.T. Mouse models of male infertility. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, p. 790-801, 2002.

DE BOLAND, A.R.; NORMAN, A.W. Influx of extracellular calcium mediates 1,24-dihydroxyvitamin D₃-dependent transcaltachia (the rapid stimulation of duodenal Ca²⁺ transport). **Endocrinology**, v. 127, p. 2475-2480, 1990.

DE BOLAND, A.R.; NEMERE, I. Rapid actions of vitamin D compounds. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 49, p. 32-36, 1992.

DE LIZ OLIVEIRA CAVALLI, V.L.; CATTANI, D.; HEINZ RIEG, C.E.; PIEROZAN, P.; ZANATTA, L.; BENEDETTI PARISOTTO, E.; WILHELM FILHO, D.; MENA BARRETO SILVA, F.R.; PESSOA-PUREUR, R.; ZAMONER, A. Roundup disrupts male reproductive functions by triggering calcium-mediated cell death in rat testis and Sertoli cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 65, p. 335-346, 2013.

DE ROOIJ, D.G. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. **Reproduction**, v. 121, p. 347-354, 2001.

DEEB, K.K.; TRUMP, D.L.; JOHNSON, C.S. Vitamin D signaling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. **Nature**, v. 7, p. 684-700, 2007.

DHILLON, N.; AGGARWAL, B.B.; NEWMAN, R.A.; WOLFF, R.A.; KUNNUMAKKARA, A.B.; ABBRUZZESE, J.L.; BADMAEV, V.; KURZROCK, R. Phase II trial of curcumin in patients with advanced pancreatic cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 14, p. 4491-4499, 2008.

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

DUSSO, A.S.; BROWN, A.J. SLATOPOLSKY, E. Vitamin D. **American Journal of Renal Physiology**, v. 289, p. F8-F28, 2005.

ERKKILÄ, K.; AITO, H.; PENTIKÄINEN, V.; DUNKEL, L. Lactate inhibits germ cell apoptosis in the human testis. **Molecular Human Reproduction**, v. 8, p. 109-117, 2002.

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

GALARDO, M.N.; RIERA, M.F.; PELLIZZARI, E.H.; CIGORRAGA, S.B.; MERONI, S.B. The AMP-activated protein kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside, regulates lactate production in rat Sertoli cells. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 39, p. 279-288, 2007.

GALARDO, M.N.; RIERA, M.F.; PELLIZZARI, E.H.; CHEMES, H.E.; VENARA, M.C.; CIGORRAGA, S.B.; MERONI, S.B. Regulation of expression of Sertoli cell glucose transporters 1 and 3 by FSH, IL1 β and bFGF at two different time-points in pubertal development. **Cell Tissue Research**, v. 334, p. 295-304, 2008.

GALDIERI, M.; ZIPARO, E.; PALOMBI, F.; RUSSO, M.; STEFANINI, M. Pure Sertoli cell cultures: A new model for the study of somatic-germ cell interactions. **Journal of Andrology**, v. 5, p. 249-254, 1981.

GARCION, E.; SINDJI, L.; LEBLONDEL, G.; BRACHET, P.; DARCY, F. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Regulates the Synthesis of γ -Glutamyl Transpeptidase and Glutathione Levels in Rat Primary Astrocytes. **Journal of Neurochemistry**, v. 73, p. 859-866, 1999.

GEORGE, N.; KUMAR, T.P.; ANTONY, S.; JAYANARAYANAN, S.; PAULOSE, C.S. Effect of vitamin D₃ in reducing metabolic and oxidative stress in the liver of streptozotocin-induced diabetic rats. **British Journal of Nutrition**, v. 108, p. 1410-1418, 2012.

HABIB, F.K.; MADDY, S.Q.; GELLY, K.J. Characterisation of receptors for 1,25 dihydroxyvitamin D₃ in the human testis. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 35, p. 195-199, 1990.

HAMDEN, K.; CARREAU, S.; JAMOUSSE, K.; AYADI, F.; GARMAZI, F.; MEZGENNI, N.; ELFEKI, A. Inhibitory effects of 1 α , 25dihydroxyvitamin D₃ and Ajuva iva extract on oxidative stress, toxicity and hypo-fertility in diabetic rat testes. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 64, p. 231-239, 2008.

HAMDEN, K.; CARREAU, S.; JAMOUSSE, K.; MILADI, S.; LAJMI, S.; ALOULOU, S.; AYADI, F.; ELFEKI, A. 1 α ,25 dihydroxyvitamin D₃: therapeutic and preventive effects against oxidative stress, hepatic, pancreatic and renal injury in alloxan-induced diabetes in rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 55, p. 215-222, 2009.

HARDING, C.O.; WILLIAMS, P.; WAGNER, E.; CHANG, D.S.; WILD, K.; COLWELL, R.E.; WOLFF, J.A. Mice with Genetic γ -Glutamyl Transpeptidase Deficiency Exhibit Glutathionuria, Severe Growth Failure, Reduced Life Spans, and Infertility. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 12560-12567, 1997.

HASIMA, N.; AGGARWAL, B.B. Targeting Proteasomal Pathways by Dietary Curcumin for Cancer Prevention and Treatment. **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, 2013 (epub ahead of print).

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

HODGEN, G.D.; SHERINS, R.J. Enzymes as markers of testicular growth and development in the rat. **Endocrinology**, v. 93, p. 985-990, 1973.

HOLICK, M.F.; CHEN, T.C. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, p. 1080S-1086S, 2008.

HOLSTEIN, A.F.; SCHULZE, W.; DAVIDOFF, M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 107, 2003.

HUHTAKANGAS, J.A.; OLIVERA, C.J.; BISHOP, J.E.; ZANELLO, L.P.; NORMAN, A.W. The Vitamin D Receptor is Present in Caveolae-Enriched Plasma Membranes and Binds $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamin D_3 *in Vivo* and *in Vitro*. **Molecular Endocrinology**, v. 18, p. 2660-2671, 2004.

HUTCHESSON, A.; PREECE, M.A.; GRAY, G.; GREEN, A. Measurement of lactate in cerebrospinal fluid in investigation of inherited metabolic disease. **Clinical Chemistry**, v. 43, p. 158-161, 1997.

HUTTER, E.; RENNER, K.; PFISTER, G.; STÖCKL, P.; JANSEN-DÜRR, P.; GNAIGER, E. Senescence-associated changes in respiration and oxidative phosphorylation in primary human fibroblasts. **The Biochemical Journal**, v. 380, p. 919-928, 2004.

JOHNSON, J.A.; GRANDE, J.P.; ROCHE, P.C.; KUMAR, R. Immunohistochemical detection and distribution of the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor in rat reproductive tissues. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 105, p. 7-15, 1996.

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

JURUTKA, P.W.; BARTIK, L.; WHITFIELD, G.K.; MATHERN, D.R.; BARTHEL, T.K.; GUREVICH, M.; HSIEH, J.C.; KACZMARSKA, M.; HAUSSLER, C.A.; HAUSSLER, M.R. Vitamin D receptor: key roles in bone mineral pathophysiology, molecular mechanism of action, and novel nutritional ligands. **Journal of Bone Mineralization. Research**, v. 22, p. 2-10, 2007.

KAISER, G.R.R.F.; MONTEIRO, S.C.; GELAIN, D.P.; SOUZA, L.F.; PERRY, M.L.S.; BERNARD, E.A. Metabolism of amino acids by cultured rat Sertoli cells. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 54, p. 515-521, 2005.

KAPPEL, V.D.; CAZAROLLI, L.H.; PEREIRA, D.F.; POSTAL, B.G.; ZAMONER, A.; REGINATTO, F.H.; SILVA, F.R.M.B. Involvement of GLUT-4 in the stimulatory effect of rutin on glucose uptake in rat soleus muscle. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, p. 1179-1186, 2013.

KINUTA, K.; TANAKA, H.; MORIWAKE, T.; AYA, K.; KATO, S.; SEINO, Y. Vitamin D is an important factor in estrogen biosynthesis of both female and male gonads. **Endocrinology**, v. 141, p. 1317-1324, 2000.

KOPERA, I.A.; BILINSKA, B.; CHENG, C.Y.; MRUK, D.D. Sertoli-germ cell junctions in the testis: a review of recent data. **Philosophical Transactions of The Royal Society B**, v. 365, p. 1593-1605, 2010.

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

KUMAR, T.R.; WISEMAN, A.L.; KALA, G.; KALA, S.V.; MATZUK, M.M.; LIEBERMAN, M.W. Reproductive Defects in γ -Glutamyl Transpeptidase-Deficient Mice. **Endocrinology**, v. 141, p. 4270-4277, 2000.

KWIECINSKI, G.G.; PETRIE, G.I.; DE LUCA, H.F. Vitamin D is necessary for reproductive functions of the male rat. **Journal of Nutrition**, v. 119, p. 741-744, 1989.

LEBLOND, C.P.; CLERMONT, Y. Spermiogenesis of the rat, mouse, hamster, and guinea pig as revealed by the "periodic acid-fuchsin sulfurous acid technique". **American Journal of Anatomy**, v. 90, p. 167-216, 1952.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica** 4^a ed. São Paulo: Savier, 2006.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 1, p. 265-275, 1951.

LU, C.; STEINBERGER, A. Gamma-Glutamyl Transpeptidase Activity in the Developing Rat Testis. Enzyme Localization in Isolated Cell Types. **Biology of Reproduction**, v. 17, p. 84-88, 1977.

LU, S.C.; KUHLENKAMP, J.; SUN, W.M.; STONE, L.; KAPLOWITZ, S. Progressive defect in biliary GSH secretion in streptozotocin-induced diabetic rats. **The American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 272, p. G374-382, 1997.

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

MARTINS, A.D.; ALVES, M.G.; SIMÕES, V.L.; DIAS, T.R.; RATO, L.; MOREIRA, P.I.; SOCORRO, S.; CAVACO, J.E.; OLIVEIRA, P.F. Control of Sertoli cell metabolism by sex steroid hormones is mediated through modulation in glycolysis-related transporters and enzymes. **Cell Tissue Research**, v. 354, p. 861-868, 2013.

MASOUMI, A.; GOLDENSON, B.; GHIRMAI, S.; AVAGYAN, H.; ZAGHI, J.; ABEL, K.; ZHENG, X.; ESPINOSA-JEFFERY, A.; MAHANIAN, M.; LIU, P.T.; HEWISON, M.; MIZWICKI, M.; CASHMAN, J.; FIALA, M. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ interacts with curcuminoids to stimulate amyloid- β clearance by macrophages of Alzheimer's disease patients. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 17, p. 703-717, 2009.

MENEGAZ, D.; ZAMONER, A.; ROYER, C.; LEITE, L.D.; BORTOLOTTI, Z.A.; SILVA, F.R.M.B. Rapid Responses to thyroxine in the testis: Active protein synthesis-independent pathway. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 246, p. 128-134, 2006.

MENEGAZ, D.; ROSSO, A.; ROYER, C.; LEITE, L.D.; SANTOS, A.R.S.; SILVA, F.R.M.B. Role of 1,25(OH)₂ vitamin D₃ on alpha-[1-¹⁴C]MeAIB accumulation in immature rat testis. **Steroids**, v. 74, p. 2640269, 2009.

MENEGAZ, D.; BARRIENTOS-DURAN, A.; KLINE, A.; SILVA, F.R.M.B.; NORMAN, A.W.; MIZWICKI, M.T.; ZANELLO, L.P. 1 α ,25(OH)₂-vitamin D₃ stimulation of secretion via chloride channel activation in Sertoli cells. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 119, p. 127-134, 2010.

MENEGAZ, D.; MIZWICKI, M.T.; BARRIENTOS-DURAN, A.; CHEN, N.; HENRY, H.L.; NORMAN, A.W. Vitamin D Receptor (VDR) Regulation of Voltage-Gated Chloride Channels by Ligands Preferring a VDR-Alternative Pocket (VDR-AP). **Molecular Endocrinology**, v. 25, p. 1289-1300, 2011.

MERKE, J.; HUGEL, U.; RITZ, E. Nuclear testicular 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors in Sertoli cells and seminiferous tubules of adult rodents. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 127, p. 303, 1985.

MERONI, S.; CÁNEPA, D.; PELLIZZARI, E.; SCHTEINGART, H.; CIGORRAGA, S. Regulation of γ -glutamyl transpeptidase activity by Ca²⁺- and protein kinase C-dependent pathways in Sertoli cells. **International Journal of Andrology**, v. 20, p. 189-194, 1997.

- MERONI, S.B.; SUBURO, A.B.; CIGORRAGA, S.B. Interleukin-1 β Regulates Nitric Oxide Production and γ -Glutamyl Transpeptidase Activity in Sertoli Cells. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 855-861, 2000.
- MERONI, S.B.; RIERA, M.F.; PELLIZZARI, E.H.; SCHTEINGART, H.F.; CIGORRAGA, S.B. Possible role of arachidonic acid in the regulation of lactate production in rat Sertoli cells. **International Journal of Andrology**, v. 26, p. 310-317, 2003.
- MIZWICKI, M.T.; NORMAN, A.W. The Vitamin D Sterol-Vitamin D Receptor Ensemble Model Offers Unique Insights into Both Genomic and Rapid-Response Signaling. **Science Signal**, v. 2, p. 4, 2009.
- NANGIA, A.K.; BUTCHER, J.L.; KONETY, B.R.; VIETMEIER, B.N.; GETZENBERG, R.H. Association of vitamin D receptors with the nuclear matrix of human and rat genitourinary tissues. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 66, p. 241-246, 1998.
- NEHAR, D.; MAUDUIT, C.; BOUSSOUAR, F.; BENAHMED, M. Tumor necrosis factor-alpha-stimulated lactate production is linked to lactate dehydrogenase A expression and activity increase in porcine cultured Sertoli cells. **Endocrinology**, v. 138, p. 1964-1971, 1997.
- NEMERE, I.; YOSHIMOTO, Y.; NORMAN, A.W. Studies on the mode of action of calciferol. Calcium transport in perfused duodena from normal chicks: enhancement with 14 minutes of exposure to 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. **Endocrinology**, v. 115, p. 1476-1483, 1984.
- NORMAN, A.W.; HENRY, H.L.; BISHOP, J.E.; SONG, X.D.; BULA, C.; OKAMURA, W.H. Different shapes of the steroid hormone 1 α ,25(OH)₂-vitamin D₃ act as agonists for two different receptors in the vitamin D endocrine system to mediate genomic and rapid responses. **Steroids**, v. 66, p. 147-158, 2001a.
- NORMAN, A.W.; ISHIZUKA, S.; OKAMURA, W.H. Ligands for the vitamin D endocrine system: different shapes function as agonists and antagonists for genomic and rapid response receptors or as a ligand for the plasma vitamin D binding protein. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 76, p. 49-59, 2001b.

NORMAN, A.W.; BISHOP, J.E.; BULA, C.M.; OLIVERA, C.J.; MIZWICKI, M.T.; ZANELLO, L.P.; ISHIDA, H.; OKAMURA, W.H. Molecular tools for study of genomic and rapid signal transduction responses initiated by $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamin D_3 . **Steroids**, v. 67, p. 457-466, 2002a.

NORMAN, A.W.; OLIVERA, C.J.; SILVA, F.R.M.B.; BISHOP, J.E. A specific binding protein/receptor for $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 is present in an intestinal caveolae membrane fraction. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 298, p. 414-419, 2002b.

NORMAN, A.W.; MIZWICKI, M.T.; NORMAN, D.P.G. Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, p. 27-41, 2004.

NORMAN, A.W. Minireview: Vitamin D Receptor: New assignments for an Already Busy Receptor. **Endocrinology**, v. 147, p. 5542-5548, 2006.

NORMAN, A.W. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88, p. 491S-499S, 2008.

OHTSU, H.; XIAO, Z.; ISHIDA, J.; NAGAI, M.; WANG, H.K.; ITOKAWA, H.; SHIH, C.; CHANG, T.; CHANG, E.; LEE, Y.; TSAI, M.Y.; CHANG, C.; LEE, K.H. Antitumor agents. 217. Curcumin analogues as novel androgen receptor antagonists with potential as anti-prostate cancer agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 5037-5042, 2002.

OLIVEIRA, P.F.; ALVES, M.G.; RATO, L.; SILVA, J.; SÁ, R.; BARROS, A.; SOUZA, M. CARVALHO, R.A.; CAVACO, J.E.; SOCORRO, S. Influence of 5α -dihydrotestosterone and 17β -estradiol on human Sertoli cells metabolism. **International Journal of Andrology**, v. 34, p. e612-e620, 2011.

OONK, R.B.; JANSEN, R.; GROOTEGOED, J.A. Differential effects of follicle-stimulating hormone, insulin and insulin-like growth factor I on hexose uptake and lactate production by rat Sertoli cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 139, p. 210-218, 1989.

ORLOWSKI, M.; MEISTER, A. Gamma-glutamyl-p-nitroanilide: A new convenient substrate for determination and study of L- and D-Gamma-glutamyltranspeptidase activities. **Biochimica e biophysica acta**, v. 6, p. 679-681, 1963.

OSMUNDSEN, B.C.; HUANG, H.F.S.; ANDERSON, M.B.; CHRISTAKOS, S.; WALTERS, M.R. Multiple sites of action of the vitamin D endocrine system: FSH stimulation of testis 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 34, p. 339-343, 1989.

PANDUR, S.; RAVURI, C.; MOENS, U.; HUSEBY, N.E. Combined incubation of colon carcinoma cells with phorbol ester and mitochondrial uncoupling agents results in synergic elevated expression. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 27, 2013 (epub ahead of print).

PÉREZ-LARA, A.; CORBALÁN-GARCÍA, S.; GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J.C. Curcumin modulates PKC α activity by a membrane-dependent effect. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 513, p. 36-41, 2011.

PETERSEN, C.; SÖDER, O. The Sertoli Cell – A Hormonal Target and ‘Super’ Nurse for Germ cells That Determines Testicular Size. **Hormone Research**, v. 66, p. 153-161, 2006.

PIROLI, G.G.; GRILLO, C.A.; HOSKIN, E.K.; ZNAMENSKY, V.; KATZ, E.B.; MILNER, T.A.; MCEWEN, B.S.; CHARRON, M.J.; REAGAN, L.P. Peripheral Glucose Administration Stimulates the Translocation of GLUT8 Glucose Transporter to the Endoplasmic Reticulum in the Rat Hippocampus. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 452, p. 103-114, 2002.

POLIDORO, L.; PROPERZI, G.; MARAMPON, F.; GRAVINA, G.L.; FESTUCCIA, C.; DI CESARE, E.; SCARSELLA, L.; CICCARELLI, C.; ZANI, B.M.; FERRI, C. Vitamin D protects human endothelial cells from H₂O₂ oxidant injury through the Mek/Erk-Sirt1 axis activation. **Journal of Cardiovascular Translational Research**, v. 6, p. 221-231, 2013.

RATO, L.; ALVES, M.G.; SOCORRO, S.; DUARTE, A.I.; CAVACO, J.E.; OLIVEIRA, P.F. Metabolic regulation is important for spermatogenesis. **Nature Reviews Urology**, v. 9, p. 330-338, 2012a.

RATO, L. ALVES, M.G.; SOCORRO, S.; CARVALHO, R.A.; CAVACO, J.E.; OLIVEIRA, P.F. Metabolic modulation induced by oestradiol and DHT in immature rat Sertoli cells cultured in vitro. **Bioscience Reports**, v. 32, p. 61-69, 2012b.

RAVURI, C.; SVINENG, G.; PANKIV, S. Endogenous production of reactive oxygen species by the NADPH oxidase complexes is determinant of γ -glutamyltransferase expression. **Free Radical Research**, v. 45, p. 600-610, 2011.

REMOR, A.P.; DE MATOS, F.J.; GHISONI, K.; DA SILVA, T.L.; EIDT, G.; BÚRIGO, M.; DE BEM, A.F.; SILVEIRA, P.C.; DE LEÓN, A.; SANCHEZ, M.C.; HOHL, A.; GLASER, V.; GONÇALVES, C.A.; QUINCOZES-SANTOS, A.; BORBA ROSA, R.; LATINI, A. Differential effects of insulin on peripheral diabetes-related changes in mitochondrial bioenergetics: involvement of advanced glycosylated end products. **Biochimica et Biophysica acta**, v. 1812, p. 1460-1471, 2011.

RIERA, M.F.; MERONI, S.B.; GÓMEZ, G.E.; SCHTEINGART, H.F.; PELLIZZARI, E.H.; CIGORRAGA, S.B. Regulation of Lactate Production by FSH, IL1 β and TNF α in Rat Sertoli Cells. **General and Comparative Endocrinology**, v. 122, p. 88-97, 2001.

ROBINSON, R.; FRITZ, I.B. Metabolism of Glucose by Sertoli Cells in Culture. **Biology of Reproduction**, v. 24, p. 1032-1041, 1981.

ROSSO, A.; PANSERA, M.; ZAMONER, A.; ZANATTA, L.; BOURAÏMA-LELONG, H.; CARREAU, S.; SILVA, F.R.M.B. 1 α ,25(OH) $_2$ -vitamin D $_3$ stimulates rapid plasma membrane calcium influx via MAPK activation in immature rat Sertoli cells. **Biochimie**, v. 94, p. 146-154, 2012.

RUWANPURA, S.M.; MCLACHLAN, R.I.; MEACHEM, S.J. Hormonal regulation of male germ cell development. **Journal of Endocrinology**, v. 205, p. 117-131, 2010.

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

SALUM, E.; KALS, J.; KAMPUS, P.; SALUM, T.; ZILMER, K.; AUNAPUU, M.; AREND, A.; EHA, J.; ZILMER, M. Vitamin D reduces deposition of advanced glycation end-products in the aortic wall and systemic oxidative stress in diabetic rats. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 100, p. 243-249, 2013.

SCHTEINGART, H.F.; CIGORRAGA, S.; LEON, M.; MOYA, S.; PELLIZZARI, H.; CHEMES, H.; RIVAROLA, M.A. Hormonal Regulation of Rat Testicular γ -Glutamyl Transpeptidase "In Vivo" and "In Vitro". **Andrologia**, v. 20, p. 351-359, 1988.

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

SCHTEINGART, H.F.; MERONI, S.B.; CÁNEPA, D.F.; PELLIZZARI, E.H.; CIGORRAGA, S.B. Effects of basic fibroblast growth factor and nerve growth factor on lactate production, γ -glutamyl transpeptidase and aromatase activities in cultured Sertoli cells. **European Journal of Endocrinology**, v. 141, p. 539-545, 1999.

SERGEEV, I.N.; RHOTEN, W.B. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ evokes oscillations of intracellular calcium in a pancreatic β -cell line. **Endocrinology**, v. 136, p. 2852-2861, 1995.

SHETTY, G.; WILSON, G.; HARDY, M.P.; NIU, E.; HUHTANIEMI, I.; MEISTRICH, M.L. Inhibition of Recovery of Spermatogenesis in Irradiated Rats by Different Androgens. **Endocrinology**, v. 143, p. 3385-3396, 2002.

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.

SHARPE, R.M.; MCKINNELL, C.; KIVLIN, C.; FISHER, J.S. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. **Reproduction**, v. 125, p. 769-784, 2003.

SKINNER, M.K. Sertoli Cell Secreted Regulatory Factors. In: SKINNER, M.K.; GRISWOLD, M.D. **Sertoli Cell Biology**. San Diego: Elsevier Science, 2005, p. 107-120.

SOFIKITIS, N.; GIOTITSAS, N.; TSOUNAPI, P.; BALTOGIANNIS, D.; GIANNAKIS, D.; PARDALIDIS, N. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 109, p. 323-330, 2008.

SONG, X.; BISHOP, J.E.; OKAMURA, W.H.; NORMAN, A.W. Stimulation of phosphorylation of mitogen-activated protein kinase by $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ in promyelocytic NB4 leukemia cells: a structure/function study. **Endocrinology**, v. 139, p. 457-465, 1998.

STAN, R-V. Structure and function of endothelial caveolae. **Microscopy Research and Technique**, v. 57, p. 350-364, 2002.

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

TIYABOONCHAI, W.; TUNGPRADIT, W.; PLIANBANGCHANG, P. Formulation and characterization of curcuminoids loaded solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 337, p. 299-306, 2007.

UBERTI, F.; LATTUADA, D.; MORSANUTO, V.; NAVA, U.; BOLIS, G.; VACCA, G.; SQUARZANTI, D.F.; CISARI, C.; MOLINARI, C. Vitamin D protects Human Endothelial Cells from oxidative stress through the autophagic and survival pathways. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, nov 2013 (epub ahead of print).

VERKMAN, A.S.; GALIETTA, L.J. Chloride channels as drug targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, p. 153-171, 2009.

WANG, W.; BERNARD, K.; LI, G.; KIRK, K.L. Curcumin opens cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channels by a novel mechanism that requires neither ATP binding nor dimerization of the nucleotide-binding domains. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 4533-4544, 2007.

XIONG, W.; WANG, H.; WU, H.; CHEN, Y.; HAN, D. Apoptotic spermatogenic cells can be energy sources for Sertoli cells. **Reproduction**, v. 137, p. 469-479, 2009.

YUKIHIRO, S.; POSNER, G.H.; GUGGINO, S.E. Vitamin D₃ analogs stimulate calcium currents in rat osteosarcoma cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 296, p. 23889-23893, 1994.

ZANATTA, L.; ZAMONER, A.; ZANATTA, A.P.; BOURAÏMA-LELONG, H.; DELALANDE, C.; BOIS, C.; CARREAU, S.; SILVA, F.R.M.B. Nongenomic and genomic effects of 1 α ,25(OH)₂ vitamin D₃ in rat testis. **Life Sciences**, v. 89, p. 515-523, 2011a.

ZANATTA, L.; ZAMONER, A.; GONÇALVES, R.; ZANATTA, A.P.; BOURAÏMA-LELONG, H.; BOIS, C.; CARREAU, S.; SILVA, F.R.M.B. Effect of 1 α ,25(OH)₂ vitamin D₃ in plasma membrane targets in immature rat testis: Ionic channels and gamma-glutamyl transpeptidase activity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 515, p. 46-53, 2011b.

ZANATTA, L.; ZAMONER, A.; GONÇALVES, R.; ZANATTA, A.P.; BOURAÏMA-LELONG, H.; CARREAU, S.; SILVA, F.R.M.B. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ Signaling Pathways on Calcium Uptake in 30-Day-Old Rat Sertoli Cells. **Biochemistry**, v. 50, p. 10284-10292, 2011c.

ZANATTA, L.; BOURAÏMA-LELONG, H.; DELALANDE, C.; SILVA, F.R.M.B.; CARREAU, S. Regulation of aromatase expression by 1 α ,25-(OH)₂ vitamin D₃ in rat testicular cells. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, p. 725-735, 2011d.

ZANELLO, L.P.; NORMAN, A.W. 1 α ,25(OH)₂ vitamin D₃-mediated stimulation of outward anionic currents in osteoblast-like ROS 17/2.8 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 225, p. 551-556, 1996.

ZANELLO, L.P.; NORMAN, A.W. Rapid modulation of osteoblast ion channel responses by $1\alpha,25(\text{OH})_2$ vitamin D_3 requires the presence of a functional vitamin D nuclear receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 1589-1594, 2004.

ZEHNDER, D.; BLAND, R.; WILLIAMS, M.C.; MCNINCH, R.W.; HOWIE, A.J.; STEWART, P.M.; HEWISON, M. Extrarenal Expression of 25-Hydroxyvitamin D_3 - 1α -Hydroxylase. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, p. 888-894, 2001.

ZHANG, H.; FORMAN, H.J.; CHOI, J. γ -Glutamyl Transpeptidase in Glutathione Biosynthesis. **Methods in Enzymology**, v. 401, p. 468-483, 2005.