

ANGELA ROSSO

**ESTUDO DO ENVOLVIMENTO IÔNICO E DE PROTEÍNAS
CINASES NO MECANISMO DE AÇÃO DA 1- α ,25(OH)₂
VITAMINA D₃ NO INFLUXO DE CÁLCIO EM CELULAS DE
SERTOLI E EM TESTÍCULOS DE RATOS**

Orientadora:

**Profa. Dra. FÁTIMA REGINA MENA BARRETO
SILVA**

Co-orientadora:

**Profa. Dra. ARIANE ZAMONER PACHECO DE
SOUZA**

FLORIANÓPOLIS, 2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOQUÍMICA**

**ESTUDO DO ENVOLVIMENTO IÔNICO E DE
PROTEÍNAS CINASES NO MECANISMO DE AÇÃO DA 1-
 $\alpha,25(\text{OH})_2$ VITAMINA D_3 NO INFLUXO DE CÁLCIO EM
CELULAS DE SERTOLI E EM TESTÍCULOS DE RATOS**

ANGELA ROSSO

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Bioquímica
do Centro de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial para a obtenção
do Título de Mestre**

**Orientadora: Profa. Dra. FÁTIMA REGINA MENA
BARRETO SILVA**

**Co-orientadora: Profa. Dra. ARIANE ZAMONER
PACHECO DE SOUZA**

FLORIANÓPOLIS, FEVEREIRO DE 2010

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Ângelo e Ivete Rosso, por serem exemplos de honestidade, de perseverança e por serem os melhores pais do mundo. Muito obrigado pelo amor incondicional e pela oportunidade que me propiciaram.

Agradeço em especial meu irmão, Diego Rosso, por ser meu melhor amigo, meu exemplo de vida, meu parceiro de todas as horas.

Agradeço à minha avó Dalva e avô Arlindo (in memoriam) por todo amor e paciência, também agradeço minha tia Tânia e prima Fernanda pelo suporte e carinho.

Agradimento muito especial ao meu amor, Anderson (Zé), por sempre acreditar em meu potencial, incentivar e dar suporte ao meu crescimento profissional e pessoal.

Agradecimento às “meninas do lab” pelos momentos maravilhosos que dividimos durante esses anos todos. Muito obrigado por serem minha segunda família.

Agradeço à minha orientadora, Dr. Fátima, e co-orientadora, Dr Ariane, pela oportunidade, exemplo e apoio durante o mestrado.

Por fim, agradeço às agências de fomento pesquisa, CAPES-COFECUB, CNPQ e FAPESC pelo apoio financeiro.

Resumo

Tendo em mente que a 1,25D₃, produto final do metabolismo da vitamina D3 é essencial para a integridade do sistema reprodutor masculino, e que, a homeostase do Ca⁺² desempenha papel chave em muitos processos envolvidos na espermatogênese, avaliamos o efeito em nível membranar da 1,25D₃ sobre o metabolismo do Ca⁺² em testículo inteiro e célula de Sertoli de ratos imaturos. Foi demonstrado que em após 60 minutos de pré-incubação com o hormônio, não houve variação da captação basal de ⁴⁵Ca⁺² nos tempos de incubação de 30, 60, 150, 300 e 600 segundos. No tempo de incubação de 60 segundos, foi verificado que a 1,25D₃ tem a capacidade de aumentar a captação de ⁴⁵Ca⁺² do meio extracelular em diferentes doses em ambos modelos experimentais, sendo este evento independente da ação genômica. Em testículos, observou-se que doses entre 10⁻¹⁵M e 10⁻⁹M foram eficazes em aumentar a captação de ⁴⁵Ca⁺², sendo o maior efeito evidenciado da dose de 10⁻¹⁰M (106%). Utilizando esta dose, foi demonstrado que os canais de CCDV do tipo L e T são as principais vias de entrada do íon nas células testiculares, e que há necessidade da manutenção das correntes de K⁺ e Cl⁻ para que ocorra este evento. Em células de Sertoli também não foi verificada a variação da captação basal de ⁴⁵Ca⁺². Neste sistema, foi verificado que no tempo de 60 segundos de incubação, o hormônio foi capaz de elevar a captação de ⁴⁵Ca⁺² entre as doses de 10⁻¹²M e 10⁻⁸ M, onde a dose de 10⁻¹² M aumentou em torno de 140% a captação do íon. Já a dose de 10⁻¹⁰ M elevou em 89% o influxo do íon. Desta forma, utilizando a dose de 10⁻¹⁰ M, verificamos que as células de Sertoli comportam-se assim como os testículos: há necessidade da ativação dos CCDV-L e T para a entrada do Ca⁺² assim como das correntes de K⁺ e Cl⁻. Também foi verificado que em células de Sertoli há necessidade da ativação das proteínas PKC e p38MAPK para a captação de Ca⁺² estimulada pela 1,25D₃. Além disso, as proteínas PI3K e ERK1/2 também estão em parte envolvidas neste processo. Por fim, avaliamos que a integridade dos microtúbulos e a atividade dos canais CIC3 faz-se necessária para que ocorra a entrada do íon nas células de Sertoli, sendo esta elevação do íon necessária para que ocorra o processo de secreção celular já demonstrada anteriormente pela 1,25D₃.

SUMÁRIO

Lista de figuras	iv
Lista de tabelas	v
Lista de abreviaturas	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Os testículos e as células de Sertoli	1
1.2 Sistema endócrino da vitamina D	2
1.3 O cálcio como molécula sinalizadora	7
1.4 Outros canais iônicos presentes na membrana plasmática	15
1.5 Vias de sinalização intracelular	24
2. OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo Geral	31
2.2 Objetivos específicos	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 Animais	32
3.2 Reagentes	32
3.3 Cultura primária de células de Sertoli	36
3.3 Influxo de $^{45}\text{Ca}^{+2}$ em células de Sertoli e testículo	38
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
5. RESULTADOS	40
6. DISCUSSÃO	71
7. CONCLUSÕES	78
8. BIBLIOGRAFIA	79

Lista de figuras

Figura 1. Rota da biossíntese da 1,25D ₃	3
Figura 2. Conformação 6-s-cis e 6-s-trans adotada pela 1,25D ₃	5
0. Vias de sinalização genômicas e não genômicas da 1,25D ₃	6
Figura 4. Rotas de ativação das MAPK relacionando os estímulos de cada rota e as respostas biológicas esperadas	28

Lista de tabelas

Tabela 1. Doenças associadas a distúrbios nos canais CIC.	17
Tabela 2 Compostos utilizados para o estudo do envolvimento dos CCDV no influxo de Ca^{+2} estimulado por $1,25\text{D}_3$	33
Tabela 3 Compostos utilizados para o estudo dos canais de Cl^- no influxo de Ca^{+2} estimulado por $1,25\text{D}_3$	34
Tabela 4 Compostos utilizados no estudo do envolvimento dos canais de K^+ no influxo de Ca^{+2} estimulado por $1,25\text{D}_3$	34
Tabela 5 Inibidores utilizados para o estudo da participação das proteínas cinases envolvidas no influxo de Ca^{+2} estimulado por $1,25\text{D}_3$	35

Lista de abreviaturas

1,25D ₃	1,α-25 dihidroxi vitamina D ₃
ATP	Adenosina trifosfato
Ca ⁺²	Cálcio
⁴⁵ Ca ⁺²	Cálcio radioativo
[Ca ⁺²] _i	Cálcio intracelular
CCDV	Canal de Cálcio dependente de voltagem
CaCCs	Canal de Cloreto ativados por Cálcio
CFTR	Reguladores da condutância transmembrana da fibrose cística
Cl ⁻	Cloreto
CIC	Canais de cloreto dependentes da voltagem
DAG	Diacilglicerol
DIDS	Ácido 4,4'-diisotiocinatoestilbeno-2,2'-disulfônico
FSH	Hormônio foliculo-estimulante
GABA	Ácido gama-aminobutírico
IP ₃	1,4,5-inositoltrifosfato
K ⁺	Potássio
K _{ATP}	Canais de potássio dependentes de ATP
MAPK	Proteína serina-treonina cinase ativada por mitógeno
mM	Mili molar

nM	Nanomolar
Na ⁺	Sódio
M	Molar
PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína cinase C
PI3K	Fosfatidil Inositol 3 cinase
P38MAPK	Proteína 38 serina-treonina cinase ativada por mitógeno
PMCA	Plasma membrane calcium-pump
SK _{Ca}	Canais de potássio dependentes da baixa condutância de c
μM	Micro molar
μCi	Micro Currie
VDR	Receptor da vitamina D
VDR _{MEM}	Receptor da vitamina D membranar
VDR _{nuc}	Receptor da vitamina D nuclear
RXR	Receptor retinóide

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Os testículos e as células de Sertoli*

Os testículos são órgãos pareados, ovóides, que em termos funcionais e anatômicos podem ser divididos em: tecido intersticial, responsável principalmente pela síntese de esteróides; e túbulos seminíferos que constituem um ambiente adequado para a espermatogênese (SKINNER, 1991).

O túbulo seminífero é constituído de uma população de células com baixa taxa de proliferação, as células de Sertoli, e uma população proliferante que se diferencia, formada pelas células germinativas. Em contato com a porção basal das células de Sertoli, estão as células mióides peritubulares (JOHSON, 2008). As células de Sertoli têm um papel central no desenvolvimento funcional do testículo bem como na expressão do fenótipo masculino. Elas são as primeiras a se diferenciarem na gônada primordial tornando o epitélio apto a estruturar-se (MACKAY, 2000).

A proliferação das células de Sertoli ocorre em períodos distintos entre as espécies. Em primatas ela ocorre predominantemente no período pré-puberal, enquanto nos roedores ocorre entre a vida fetal e neonatal, cessando por volta dos 12-15 dias de vida pós-natal (SHARPE, 2003). O fim da proliferação das células de Sertoli e o aparecimento das junções oclusivas entre elas, que se estabelece por volta da puberdade, estão relacionados com a formação da barreira hematotesticular, que proporciona um ambiente adluminal isolado do meio extratubular, impermeável a moléculas hidrofílicas maiores, onde a comunicação entre as células de Sertoli e germinativas ocorrem de maneira parácrina (SETCHELL, 1993). Além disso, a presença da barreira hematotesticular confere um ambiente imunologicamente protegido, garantindo assim a progressão espermatogênica (WONG e CHENG, 2005).

As células de Sertoli desempenham um papel crucial na espermatogênese. Além da participação ativa no processo de liberação de espermatozóides maduros elas também são responsáveis

pelo suporte mecânico, proteção e nutrição das células germinativas em desenvolvimento (FAWCETT, 1991). Estas células produzem e secretam diversas proteínas como a ceruloplasmina, transferrina, algumas proteases, inibidores de proteases, e glicoproteínas inibitórias, atuando de forma parácrina com as células adjacentes (GNESSI, 1997; GRISWOLD, 1998). Além disso, secretam na luz do túbulo seminífero um fluido rico em K^+ e Cl^- que estão envolvidos com a regulação do pH tubular (AUZANEAU et al., 2003, 2006) .

As funções das células de Sertoli são finamente controladas pelo sistema endócrino. Já foram caracterizados sítios de ligação nestas células para o hormônio folículo-estimulante (FSH), testosterona, retinol (vitamina A), 3,5,3'-triiodo-L-tironina (T3), e $1,25$ -dihidroxi vitamina D_3 ($1,25D_3$), entre outros (SANBORN, 1977; SKINNER, 1991; ESKILD et al., 1991; SILVA et al., 2002). A ação destes hormônios, juntamente com fatores parácrinos secretados pelas células de Leyding, peritubulares e germinativas, é responsável pela manutenção da atividade das células de Sertoli e pelo controle da espermatogênese (VERHOEVEN; CAILLEAU, 1990; MRUK, CHENG, 2004). Sendo assim, a elucidação das ações hormonais nas células de Sertoli, em especial da $1,25D_3$, é necessária para a avaliação da participação destas moléculas endócrinas em processos fisiológicos e patológicos que afetam o processo da espermatogênese.

1.2 Sistema endócrino da vitamina D

A vitamina D_3 é um pro-hormônio produzido pela ação dos raios ultravioletas no 7-dehidrocolesterol presente na pele, ou pode ser obtida em menores quantidades através da dieta. Para ser convertida em $1,25$ -dihidroxi vitamina D_3 ($1,25D_3$), a vitamina D_3 deve sofrer 2 hidroxilações. A primeira reação ocorre no fígado, pela ação da 25-hidroxilase que origina a 25-hidroxi vitamina D_3 ($25(OH)D_3$). Em seguida, este metabólito é transportado até o rim pela proteína sérica ligadora de vitamina D (DBP) e então é convertido pela $1,25$ -hidroxilase à $1,25D_3$ (MIZWICKI, NORMAN, 2009). Este sistema é finamente regulado na etapa de hidroxilação da $1,25$ -hidroxilase renal pela concentração sérica de hormônio da paratireóide (PTH), cálcio (Ca^{+2}) e fosfato (PO_4^-), assim como pelo próprio produto do sistema, a $1,25D_3$ (NORMAN, 2008) (Figura 1).

Há também evidências de que outros moduladores endócrinos como estrógenos, andrógenos, hormônios do crescimento, prolactina e insulina possam afetar a produção renal de $1,25D_3$ (NORMAN, 2006).

A produção da $1,25D_3$ não é restrita aos rins. Já foi identificada a presença da enzima 1α -hidroxilase em mais de 10 tecidos, indicando uma ação parácrina ou até mesmo autócrina do hormônio (MIZWICKI, NORMAN, 2009). Ao contrário da enzima renal, as 1α -hidroxilases localizadas em outros tecidos não sofrem regulação pelos níveis circulantes de Ca^{+2} , PO_4^- , PTH ou do próprio hormônio, contribuindo para a idéia de uma produção e ação local da $1,25D_3$ (HENDRIX, ANDERSON, 2005).

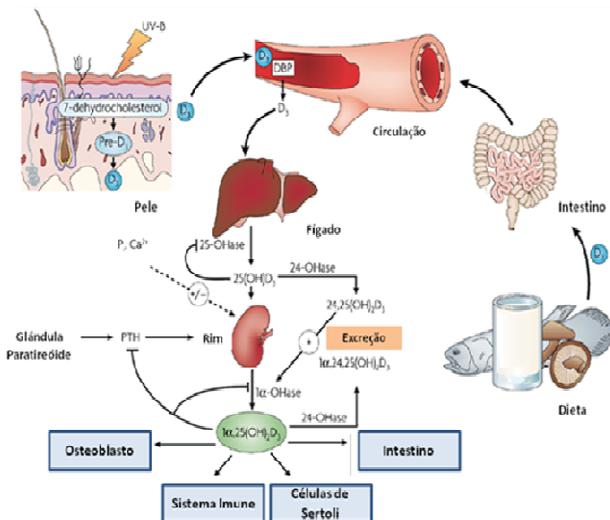


Figura 1. Rota da biossíntese da $1,25D_3$. A vitamina D_3 proveniente da produção na pele ou de alimentos é transportada na corrente sanguínea pela DBP. Ela chega ao fígado onde sofre a primeira hidroxilação pela 25-hidroxilase. Após, o produto segue até o rim onde é feita a segunda hidroxilação pela 1α -hidroxilase, dando origem a $1,25D_3$. Este hormônio vai agir em

mais de 37 tecidos distintos, dentre eles osteoblastos, sistema imune, células de Sertoli e intestino. (Adaptado de DEEB et al., 2007).

1.2.1 Hormônio 1,25D₃ e mecanismos de ação

A forma ativa da vitamina D₃, o hormônio 1,25D₃, é um seco esteróide pluripotente cujas funções biológicas vão muito além da ação clássica sobre a homeostase do Ca⁺² e metabolismo ósseo (JONES et al., 1998). Atualmente, a ação deste hormônio é descrita em 37 tecidos distintos, desempenhando papel fundamental no crescimento e diferenciação celular, contratilidade muscular e na modulação do sistema imune (REICHEL et al. 1989).

A 1,25D₃, assim como muitos outros hormônios esteróides exerce ações clássicas através da ligação ao receptor específico presente no núcleo (VDR_{nuc}). Este receptor é uma proteína de aproximadamente 50 kDa que na presença do hormônio ocorre heterodimerização com o receptor retinóide (RXR) interagindo com o DNA de forma a modular a expressão gênica (Figura 2). Acredita-se que cerca de 3% dos genes que compõe o genoma humano são regulados pela 1,25D₃ (NORMAN, 2008).

A primeira evidência da ação não genômica da 1,25D₃ surgiu em meados dos anos 80 quando Nemere e colaboradores (1984) conduziram um estudo em duodeno perfundido de pinto onde observaram um rápido influxo de Ca⁺² estimulado pela 1,25D₃, o qual foi denominado transcaltaquia. Inicialmente, os pesquisadores postularam a presença de uma nova proteína localizada na membrana plasmática da célula que serviria de receptor para a 1,25D₃ e seria responsável pelas rápidas respostas do hormônio. Recentemente foi demonstrado que este receptor de membrana é o próprio VDR (VDR_{mem}) associado a microregiões específicas da membrana plasmática, os caveolae, que consistem em invaginações ricas em esfingolípideos e colesterol (MIZWICKI, NORMAN, 2009).

A 1,25D₃ difere de outros hormônios esteróides por não ter uma conformação estrutural rígida. Esta molécula apresenta pontos de flexibilidade na estrutura que permite ao hormônio adotar distintas conformações. A rotação entre os carbonos 6,7 do anel B

possibilita a formação de dois análogos estruturais: 6-*s-cis* e 6-*s-trans*. A forma 6-*s-trans* liga-se preferencialmente ao VDR_{nuc} e produz respostas genômicas, que levam horas ou até mesmo dias para ocorrerem. Já a ligação da forma 6-*s-cis* com o VDR_{mem} resulta na ativação de sistemas intracelulares que vão originar respostas rápidas, que ocorrem dentro de segundos (abertura de canais iônicos) a minutos (ativação de proteínas citosólicas e formação de segundos mensageiros) (NORMAN, 2006).

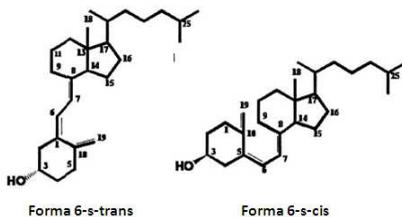
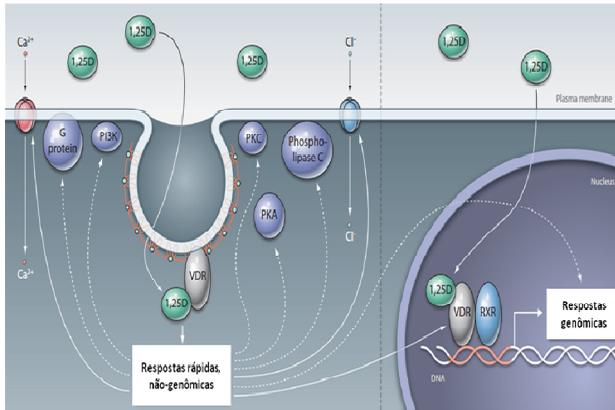


Figura 2. Conformação 6-*s-cis* e 6-*s-trans* adotada pela 1,25D₃ (NORMAN, 2008).

Uma variedade de sistemas de transdução de sinais são ativados pela ligação da 1,25D₃ ao VDR_{mem} e a consequente produção de segundos mensageiros como adenosina monofosfato cíclico (AMPc), guanosina monofosfato cíclico (GMPc) e também a elevação do Ca⁺² interno. Esses sinais são amplificados através da ativação de proteínas cinases, como a PKA, a PKC e as proteínas serina-treonina cinase ativada por mitógeno (MAPK), entre outras, causando mudanças no estado de fosforilação de proteínas e canais iônicos (De BOLAND; NORMAN, 1998; ZANELLO; NORMAN et al., 2004). Estas vias também são responsáveis por acoplar as respostas rápidas com eventos genômicos ao realizarem *cross-talk* com proteínas citosólicas, de forma a modular a expressão gênica (NORMAN, 2008). Mecanismos de respostas genômicas e não genômicas da 1,25D₃ e a relação entre eles estão esquematizados na figura 2.



1. Vias de sinalização genômicas e não genômicas da $1,25D_3$ (MIZWICKI, NORMAN, 2009).

1.2.2 Ações da $1,25D_3$ em testículos e células de Sertoli

A vitamina D desempenha um importante papel na função reprodutiva, já que a deficiência de tal vitamina ocasiona infertilidade em ratos do sexo masculino (KWIECINSKI et al., 1989), redução do peso das gônadas (HIRAI et al., 2009) e redução na quantidade e qualidade dos espermatozoides (KINUTA et al., 2000). Além disso, receptores para o hormônio (VDR_{nuc}) foram identificados em células de Sertoli, túbulos seminíferos e tecido intersticial de testículos de ratos e em testículos humanos, confirmando os testículos e células de Sertoli, como alvo da $1,25D_3$ (OSMUNDSSEN et al., 1989; HABIB et al., 1990). Recentemente, foi identificada a presença da enzima 1α , hidroxilase nas células de Sertoli e células de Leyding, indicando uma produção local do hormônio que atua de maneira autócrina e/ ou parácrina, reforçando a idéia da necessidade da $1,25D_3$ para a integridade da função testicular (ANDERSON et al., 2008).

Além das ações genômicas da $1,25D_3$ em células do trato reprodutivo, este hormônio desencadeia eventos fisiológicos em

curto prazo em testículos e em células de Sertoli. Menegaz e colaboradores (2009) evidenciaram o envolvimento de canais Ca^{+2} , K^{+} e da PKA no aumento da captação de aminoácidos neutros em testículo de ratos imaturos tratados com $1,25\text{D}_3$. Este trabalho também revelou um possível *cross-talk* entre a sinalização iniciada na membrana plasmática (rápidas respostas) e a sinalização nuclear, já que o efeito na captação de aminoácidos foi reduzido quando interrompida a síntese de proteínas. Também em testículos, foi evidenciado que a $1,25\text{D}_3$ aumenta a fosforilação da vimentina em testículos de ratos imaturos através de mecanismos independentes da síntese protéica, envolvendo a modulação de canais de Ca^{+2} e de proteínas cinases (ZAMONER et al., 2008).

Recentemente foi evidenciada, em linhagens de células de Sertoli (TM4) a participação direta da $1,25\text{D}_3$ no processo de secreção celular, sendo este evento dependente de correntes de Cl^{-} e das proteínas cinases PKA e PKC, que atuam modulando a atividade dos canais de Cl^{-} (MENEGAZ, 2009). Ainda nesta linhagem celular, foi observado que o aumento da captação de Ca^{+2} estimulado por $1,25\text{D}_3$ ocorreu dentro de 5 minutos após a exposição ao hormônio (AKERSTRON, WALTERS, 1992). No entanto, ainda que os receptores para $1,25\text{D}_3$ tenham sido detectados em células de Sertoli e que alguns estudos tenham sido realizados no intuito de revelar as ações deste hormônio nestas células, os efeitos genômicos e não-genômicos diretos da $1,25\text{D}_3$ nas células de Sertoli ainda permanecem elusivos.

1.3 O cálcio como molécula sinalizadora

O Ca^{+2} é uma das principais moléculas sinalizadoras intracelulares. Este íon é responsável pela conversão de estímulos externos em ações específicas dando origem a respostas biológicas importantes. Hormônios, como a $1,25\text{D}_3$, neurotransmissores e fatores de crescimento utilizam a via de sinalização do Ca^{+2} como rota para vários processos celulares, entre eles a proliferação celular, secreção, modificações no citoesqueleto e reações do metabolismo intermediário celular (BERRIDGE et al., 2003; ZAMONER et al., 2005; 2007).

Quando a célula está em repouso, a concentração citoplasmática do íon encontra-se em torno de 100 nM. No entanto,

quando a célula é estimulada por hormônios ou por estímulo mecânico, a concentração de Ca^{+2} passa para valores próximos a 1 μM . Este aumento temporal e espacial de Ca^{+2} deve-se a entrada do íon do meio extracelular através de canais expressos na membrana plasmática e/ou da mobilização das reservas intracelulares do íon: em especial do retículo endoplasmático e da mitocôndria, organelas cuja concentração do Ca^{+2} encontra-se na ordem de mM (KRAUSS,2003; CLAPHAM, 2007).

A abertura de canais de Ca^{+2} e o conseqüente aumento dos níveis do íon levam à formação de sinais elementares de Ca^{+2} que podem ativar tanto processos celulares localizados nas proximidades dos canais como ativar processos em nível global, como a ativação de outros canais e proteínas (BERRIDGE, 1998). Nas células de Sertoli, a elucidação das vias de entrada e sinalização do Ca^{+2} promovidos pela 1,25D₃ é de suma importância, já que este hormônio está envolvido no processo de secreção de substâncias necessárias para nutrição das células germinativas. Distúrbios nestas vias poderiam acarretar, por exemplo, uma queda quantitativa e qualitativa da espermatogênese (MENEGAZ, 2009).

1.3.1 *Sistemas de troca de cálcio*

O Ca^{+2} é um íon extremamente importante para uma série de processos celulares, por isso, sua concentração no citosol é finamente regulada. (DAVILLA, 1999; CLAPHAM, 2007). Na membrana plasmática existem mecanismos importantes que bombeiam o Ca^{+2} para fora da célula. Um deles é o sistema de troca $\text{Na}^{+}-\text{Ca}^{+2}$, que utiliza o gradiente de Na^{+} através da membrana para dirigir o efluxo de Ca^{+2} . Este sistema apresenta uma estequiometria de três Na^{+} para dois Ca^{+2} e opera com alta capacidade e baixa afinidade, sendo importante para dirigir grandes quantidades do íon para fora da célula (KRAUSS, 2003). O outro sistema é a bomba de Ca^{+2} presente na membrana plasmática (PMCA- *plasma membrane calcium-pump*). Este sistema tem alta afinidade de interação com o Ca^{+2} , no entanto, possui baixa capacidade de transporte do íon. A PMCA transporta Ca^{+2} contra o gradiente de concentração, envolvendo consumo de energia com gasto de ATP. Esta bomba é regulada por diversos fatores, sendo o principal deles a ligação do complexo Ca^{+2} -calmodulina em um sítio específico da proteína. Além disso, o aumento dos níveis intracelulares do Ca^{+2} e a

fosforilação por proteínas cinases também regulam a atividade deste transportador (PETERSEN et al., 1994, CARAFOLI, 1997). Acredita-se que este sistema seja efetivo na manutenção dos baixos níveis de Ca^{+2} citosólico por longos períodos, enquanto as bombas de troca $\text{Na}^+-\text{Ca}^{+2}$ são responsáveis pelos ajustes rápidos dos níveis citosólicos do íon (CLAPHAM, 2007).

No retículo endoplasmático a entrada de Ca^{+2} é feita através de bombas de Ca^{+2} -ATPase. Neste sistema, há uma troca de dois íons Ca^{+2} por molécula de ATP hidrolisada (WUYTACK et al., 2002). Acredita-se que a mitocôndria desempenha um papel secundário na homeostasia do Ca^{+2} celular, já que o armazenamento restringe-se a momentos em que há um aumento considerável nos níveis citosólicos do íon. O movimento do Ca^{+2} ocorre através de um gradiente próton eletroquímico na membrana mitocondrial interna (KRAUSS, 2003).

1.3.2 Mobilização das reservas intracelulares

A liberação do Ca^{+2} das reservas intracelulares é mediada por segundos mensageiros intracelulares que atuam em canais presentes na membrana das organelas e também pela própria concentração do Ca^{+2} do citosol e reservas (movimento do Ca^{+2} segundo o gradiente de concentração). No caso do retículo endoplasmático, a ação de hormônios e muitos fatores de crescimento na membrana plasmática da célula, ativa a fosfolipase C (PLC) que eleva os níveis de diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP_3). Este último difunde-se no citosol e interage com receptores específicos presentes no retículo endoplasmático, o que ocasiona a alteração da conformação do canal e permite a saída do Ca^{+2} da organela. Outro meio de extrusão do íon do retículo endoplasmático é via receptores de rianodina, que são semelhantes estrutural e funcionalmente aos receptores InsP_3 , e são ativados quando a concentração citosólica do Ca^{+2} está entre 1-10 μM e inativados quando ultrapassa 10 μM (BOOTMAN et al., 2001). Outra via de saída de Ca^{+2} desta organela é através de canais de Ca^{+2} ativados por esfingolipídeos (SCamPER), cuja estrutura e ação fisiológicas ainda não foram totalmente elucidadas (CLAPHAM, 2007). A saída do Ca^{+2} mitocondrial é regulada principalmente pela concentração no citosol e se dá principalmente através dos trocadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$. Outros compartimentos como endossoma,

aparelho de Golgi e lisossomos também podem liberar o Ca^{+2} para o meio extracelular. Esta liberação parece estar ligada ao gradiente de concentração do íon e da presença de canais permeáveis ao Ca^{+2} . No entanto, ainda não está esclarecida a relevância destas reservas secundárias de Ca^{+2} em processos biológicos (CLAPHAM, 2007).

1.3.3 *Influxo de cálcio da região extracelular*

Em condições basais, o influxo de Ca^{+2} do meio extracelular para o intracelular é baixo. Porém, quando a célula é submetida a um estímulo, a permeabilidade dos canais presentes na membrana plasmática é alterada e deste modo há um aumento nas correntes de Ca^{+2} (HOSEY; LADZUNSKY, 1988). Os canais de Ca^{+2} na membrana plasmática são proteínas transmembranares que apresentam poros seletivos para este íon. Estes canais podem ser regulados pela variação do potencial transmembrana, por ligantes específicos, pela fosforilação, pela proteína G, pelo próprio Ca^{+2} intracelular ou pela interrelação destes fatores. O aumento do influxo de Ca^{+2} que freqüentemente acompanha a estimulação hormonal sugere que as alterações na permeabilidade sejam um processo essencial na ativação celular (HOSEY; LAZDUNSKI, 1988, BENITAH et al., 2009).

As principais vias de entrada de Ca^{+2} na célula são: através de canais de Ca^{+2} dependentes de voltagem (CCDV); canais de Ca^{+2} ligados à receptor; canais de Ca^{+2} ativados mecanicamente, que respondem ao estresse mecânico; canais de Ca^{+2} dependentes do estoque, que são ativados em resposta à depleção dos estoques intracelulares e causam uma entrada capacitativa de Ca^{+2} (KRAUSS, 2008). Dentre os canais de Ca^{+2} expressos na membrana plasmática, os CCDV representam a principal via de entrada do íon nas células quando submetidas a um estímulo externo, como ligação de um hormônio a receptores de membrana. Atribui-se à atividade destes canais a capacidade de converter sinais externos em eventos elétricos membranares e eventos citosólicos (CATERALL et al., 2000; CLAPHAM, 2007). Devido a importância em vários processos celulares e a participação destes canais descritos anteriormente em células de Sertoli e/ou testículo, o estudo destes canais foi objeto de investigação no presente trabalho.

1.3.4 Canais de cálcio dependentes de voltagem (CCDV)

Os canais de Ca^{+2} dependentes de voltagem (CCDV) são complexos protéicos transmembranares responsáveis pela conversão do estímulo elétrico em eventos celulares. Eles estão envolvidos numa série de processos fisiológicos e patológicos, como secreção, diferenciação, crescimento e morte celular (CATERALL et al., 2007). A liberação de hormônios e neurotransmissores de células neuronais e endócrinas, a expressão gênica em muitas células, e a contração dos músculos liso, cardíaco e esquelético dependem da ativação deste tipo de canal (RIOS; PIZARRO, 1991).

Os CCDV pertencem à superfamília dos canais iônicos protéicos transmembranares, na qual estão incluídos os canais de Na^{+} e K^{+} dependentes de voltagem (YU e CATERALL, 2004). Na década de 1980, a estrutura protéica dos CCDV foi purificada e foram identificadas as diversas subunidades que compõe o canal (BORSOTTO et al., 1985, FLOCKERZI et al., 1986, TAKAHASHI et al., 1987). A principal subunidade é denominada de α_1 , e as demais subunidades regulatórias são conhecidas como α_2 , β , δ e γ (HOFFMAN et al., 1999). A subunidade α_1 é a maior delas, e nela estão incluídos os sensores de voltagem e o poro de condução iônica, além disso, é o ponto chave para a regulação do canal por fármacos (HOFFMAN et al., 1999). A subunidade β é uma subunidade acessória que desempenha um papel crítico na regulação do canal. Enquanto a subunidade α_1 contém as propriedades que caracterizam os determinantes de dependência de voltagem e inativação, a associação com diferentes isoformas da subunidade β influencia, principalmente, a cinética de inativação do canal. Sobre as subunidades α_2 e δ , é descrito que elas modulam a interação com alguns bloqueadores dos CCDV, porém, há poucos dados conclusivos. Com relação à subunidade γ , ainda não está definido o papel desta na funcionalidade do canal (DRESVIANNIKOV et al., 2009).

1.3.5 Classificação dos CCDV

Inicialmente, os CCDV foram classificados de acordo com o potencial transmembrana em que eram ativados, sendo denominados canais de Ca^{+2} de alta e baixa voltagem (HILLE, 2001). Baseando-se

nas características eletrofisiológicas e/ou farmacológicas, os CCDV foram divididos em seis classes de correntes designadas L-, N-, P/Q-, R-, T- (TSIEN et al., 1991; HOFMANN et al., 1999). Outra forma de classificar os canais é de acordo com a estrutura da subunidade α_1 . Nesta classificação, o símbolo químico do cálcio (Ca) é utilizado para definir o íon, a designação de dependência de voltagem (Ca_v) e um sistema numérico relacionado ao gene da subfamília da subunidade α_1 . Desta forma os canais de Ca^{+2} podem ser divididos em três grandes famílias: a) Ca_{v1} , da qual fazem parte os CCDV do tipo L; b) Ca_{v2} , que conduz correntes de Ca^{+2} do tipo N, P/Q e R; e c) Ca_{v3} , que conduz correntes de Ca^{+2} do tipo T (CATTERALL, 2000).

1.3.5.1 Canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L (Ca_v1)

Os CCDV do tipo L são amplamente distribuídos nos tecidos e compreendem a principal via de entrada do Ca^{+2} nas células, participando de eventos celulares chaves como contração muscular, secreção endócrina e transcrição gênica. Segundo a classificação que leva em consideração as características da subunidade α_1 , eles podem ser subdivididos em quatro subgrupos: $Ca_{v1.1}$ a $Ca_{v1.4}$ (CATTERALL, 2000, BENITAH et al., 2009). Estes canais têm como característica a rápida ativação, porém apresentam uma condutância prolongada após a abertura do canal (*long-lasting*). Em geral a ativação ocorre em potenciais de até -40 mV, sendo por isso classificados como de alta tensão, apresentam picos entre 0 e +10 mV e tendem a reverter entre +60 mV e +70 mV (BENITAH et al., 2009).

Os CCDV-L são sensíveis a três classes de fármacos:

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

Benzotiazepinas: O diltiazem é o composto desta classe mais utilizado clinicamente (DIOCHOT et al., 1995). O bloqueio provocado pelo diltiazem ocorre pela ligação rápida ao estado aberto

do canal, além de ligar-se ao estado inativado, preferencialmente (HOCKERMAN, 1997).

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

Estas três classes de antagonistas dos canais de Ca^{+2} ligam-se em sítios distintos na subunidade α_1 do canal de maneira não competitiva, próximos do poro do canal e do sítio de ligação do Ca^{+2} (GLOSSMANN; STRIESSNIG, 1990). A regulação deste tipo de canal por moléculas intracelulares é amplo alvo de estudos. Já foi demonstrado que algumas proteínas cinases como PKC, PKA, PI3K e CaMKII modulam a atividade destes canais de forma diferente em tecidos distintos. Além disso, o próprio Ca^{+2} parece regular negativamente a atividade destes canais quando há um aumento significativo dos níveis intracelulares deste íon (BENITAH et al., 2009).

1.3.5.2 *Canais do tipo T (Cav3)*

Os CCDV do tipo T podem ser subdivididos em três grupos $\text{Ca}_{v3.1}$, $\text{Ca}_{v3.2}$ e $\text{Ca}_{v3.3}$ (PEREZ-REYES, 2006). Estes canais são caracterizados eletrofisiologicamente pela formação de correntes de Ca^{+2} de baixa voltagem, pela cinética de ativação rápida e pela baixa condutância unitária. Os CCDV do tipo T estão envolvidos em muitos eventos celulares, tais como a regulação da proliferação e diferenciação celular, geração do potencial de ação e síntese de esteróides (LOTSHAW, 2001; FERRON et al., 2002, LORY et al., 2006). Assim como outros CCDV, estes canais também sofrem regulação por biomoléculas. A interação direta de subunidades da proteína G com o canal pode inibir a atividade destes. Já a ativação, está relacionada com a ação de proteínas cinases como a PKA, PKC e CaMKII. Outro tipo de modulação ocorre através da interação do íon zinco com o canal, que pode tanto aumentar ($\text{Ca}_{v3.3}$) quanto diminuir ($\text{Ca}_{v3.2}$) a atividade (HUC et al., 2009). Entre os

bloqueadores para os canais do tipo T estão o amiloride, octanol, o níquel, e a flunarizina (MORI et al., 1993; MARINO et al., 2004).

1.3.5.3 Canais do tipo N ($Ca_{v2.2}$)

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

1.3.5.4 Canais do tipo P/Q ($Ca_{v2.1}$) e tipo R ($Ca_{v2.3}$)

Os canais do tipo P foram inicialmente descritos em correntes nas células cerebrais de Purkinje resistentes às dihidropiridinas e as conotoxinas e mais tarde foram descritos em diversos neurônios centrais e periféricos. A ω -agatoxina IVA é uma toxina que está presente no veneno de aranha, é um bloqueador altamente específico dos canais tipo P/Q. Esta toxina requer o estado aberto do canal para ter acesso ao sítio de ligação e quando liga, inativa-o (OLIVEIRA et al., 1994). Estes canais são ativados por alta tensão. Os canais de Ca^{+2} que contém uma subunidade $Ca_{v2.1}\alpha_1$ são responsáveis pelas correntes de Ca^{+2} tanto do tipo P quanto do tipo Q (HERLITZE et al., 2001).

Considerando a identificação CCDV-L e T nas células de Sertoli (D'AGOSTINO et al., 1992; LALEVEÉ et al., 1997) e de relatos anteriores que indicam que 1,25D₃ modula a atividade destes canais para gerar sinais de Ca^{+2} no meio intracelular de diversos tipos celulares (NEMERE et al., 1984; ZANELLO, NORMAN, 2004; TUPDOR et al., 2008; KHANAL et al., 2008), neste trabalho foi estudada a participação dos CCDV-L e T na via de entrada do Ca^{+2} em testículos e células de Sertoli quando tratadas com a 1,25D₃.

1.4 *Outros canais iônicos presentes na membrana plasmática*

Os canais iônicos presentes na membrana plasmática são proteínas transmembranares que permitem o fluxo de íons entre meio extracelular e intracelular. Eles desempenham importantes papéis na manutenção da integridade celular, e estão envolvidos em processos como secreção, contração e proliferação celular. A modulação da atividade dos canais e a influência entre eles é passo chave na conversão de um sinal externo em eventos citosólicos que podem culminar em respostas biológicas (SANDHIYA,DKHAR, 2009).

Nas células de Sertoli, acredita-se que os canais iônicos presentes na membrana plasmática desempenham papel chave no processo de secreção celular bem como na iniciação de eventos que culminam na ativação de processos nucleares (SILVA et al; 2001; SILVA et al; 2002; MENEGAZ, 2009). Sendo assim, a compreensão da interdependência de diferentes tipos de canais para a funcionalidade celular faz-se necessária para a elucidação da fisiologia celular e de processos patológicos que acometem este sistema. Para tanto, em nosso trabalho estudamos a possível participação de canais de Cl^- e K^+ no processo de entrada de Ca^{+2} estimulada pela $1,25\text{D}_3$.

1.4.1 *Canais de cloreto*

O íon cloreto (Cl^-) desempenha um papel relevante na homeostase celular em condições fisiológicas e patológicas. Apesar deste íon representar menos da metade do conteúdo aniônico celular, é o ânion de maior relevância fisiológica, já que difunde-se facilmente através das membranas. Desta forma, a variação no fluxo de Cl^- está associado a regulação do volume celular, processos secretórios e a manutenção do pH celular, essencial para a manutenção da atividade enzimática (FOSKETT, 1998; AUZENNEAU et al., 2006). Além disso, descobertas recentes têm atribuído ao Cl^- a capacidade de atuar como segundo mensageiro intracelular já que sua concentração dentro da célula é dinâmica e é capaz de modular a atividade de proteínas como transferrina, glicose-6-fosfatase, hemoglobina dentre outras (DURAN et al., 2010).

O transporte de Cl⁻ envolve numerosas vias incluindo trocadores de ânions, co-transportadores e canais iônicos. Os trocadores e co-transportadores permitem que a concentração do ânion seja mantida contra o gradiente termodinâmico, sendo este transporte associado a outros íons como Na⁺ e K⁺. Já os canais de Cl⁻ permitem a passagem de correntes do íon através da membrana influenciando desta forma o potencial de membrana e o transporte de solutos (FOSKETT, 1998). Vários canais foram identificados em função das características eletrofisiológicas, seletividade iônica, comportamento de abertura e sensibilidade farmacológica. No entanto, os canais de Cl⁻ ativados por ligantes (glicina e ácido gama-butírico - GABA), os reguladores da condutância da membrana na fibrose cística (CFTR) e os canais de Cl⁻ da família CIC são os mais estudados, pois defeitos nas suas funções estão relacionados a processos patológicos (JENTSCH et al., 2002; CHEN, HWANG, 2008). Os CFTR, CIC os canais ligados a receptores juntamente com os canais de Cl⁻ ativados por Ca⁺² serão abordados a seguir.

1.4.1.1 Família CIC de canais de cloreto

Os canais de cloretos membros da família CIC estão amplamente distribuídos em várias espécies e desempenham importantes funções biológicas (JENTSCH et al., 2002). Defeitos nessas proteínas estão associados a diversas doenças que estão sumarizadas na tabela 1.

Tabela 6. Doenças associadas a distúrbios nos canais CIC.
Adaptada de (JENTSCH et al., 2002)

Canal	Expressão	Função	Doença associada
CIC-1	Músculo esquelético	Estabilização da membrana	Miotonia
CIC-2	Geral	Transporte transepitelial, regulação de volume e pH celular	Cegueira Infertilidade masculina
CIC-Ka	Rins	Transporte transepitelial	--
CIC-Kb	Ouvido	Transporte transepitelial	Síndrome de Bartter
CIC-3	Geral	Acidificação intravesicular e secreção	Perda degenerativa do hipocampo e fotoreceptores
CIC-4	Geral	Acidificação de organelas	-
CIC-5	Rins, intestino, fígado	Acidificação de organelas	Doença de Dent
CIC-6	Geral	--	--

CIC-7	Geral	Acidificação de organelas e reabsorção de osteoclasto	Osteoporose
-------	-------	---	-------------

Os canais CIC são proteínas transmembrana constituídas de duas subunidades idênticas que apresentam vários sítios de ligação para o Cl⁻. Foram identificados até o momento 9 subtipos de canais que, em função da homologia estrutural, foram divididos em 3 subfamílias (CHEN, HWANG, 2008). A primeira delas compreende os canais CIC-1, CIC-2, CIC-Ka e CIC-Kb. Eles estão presentes principalmente na membrana plasmática das células e são responsáveis pela estabilização do potencial transmembrana e pelo transporte transepitelial (PUSH et al., 2006). A segunda família é composta pelos canais CIC-3, CIC-4 e CIC-5 os quais são expressos principalmente nas organelas intracelulares e estão relacionados com a regulação do pH vesicular (CHEN, HWANG, 2008). Diferentemente dos demais membros da família, o CIC-3 está localizado tanto na membrana plasmática quanto em organelas intracelulares e está presente na maioria dos tecidos (JENTSCH et al., 2002; CHEN, HWANG, 2008). Relata-se que o influxo de Cl⁻ através dos canais CIC-3, estimula a exocitose em células de mamíferos através de um mecanismo que neutraliza e previne o excesso de cargas positivas provenientes dos íons H⁺ culminando na acidificação intragranular necessária para secreção vesicular (BARG et al., 2001). Os canais CIC-6 e CIC-7, membros da terceira subfamília, estão presentes em vários tecidos e a expressão destes canais ocorre preferencialmente nas organelas onde atuam na manutenção do pH (PUSH et al., 2006).

A atividade dos canais CIC são moduladas principalmente pelo potencial transmembrana, porém, a regulação por ânions, pH, mensageiros intracelulares e proteínas cinases também foi relatada (DUTZLER et al., 2002). Sabe-se que o ânion Cl⁻ está envolvido no processo de homeostase intracelular do Ca⁺². A ativação de canais e transportadores de Cl⁻ mantém o potencial de membrana suficientemente negativo para facilitar o influxo de Ca⁺² (KERSCHBAUM et al., 1997). Bloqueadores de canais de Cl⁻ podem afetar a sinalização de [Ca⁺²]_i através da modulação do fluxo de Cl⁻ (LIN et al., 2003). Dessa forma, o Cl⁻ aparece como um

importante regulador de processos exocitóticos estimulados pelo Ca^{+2} (BARG et al., 2001).

Os canais CIC estão presentes em muitos tipos celulares, incluindo as células de Sertoli (AUZENNEAU, 2003). Acredita-se que estes canais desempenham papel chave em muitos eventos celulares, dentre eles os desencadeados pela $1,25\text{D}_3$. Neste sentido, já foi verificado a participação dos CIC-3 no processo de secreção celular estimulado pelo hormônio (MENEGAZ, 2009). No entanto, a participação dos demais tipos de CIC em eventos celulares nas células de Sertoli carecem de estudos.

1.4.1.2 Canais de cloreto reguladores da condutância transmembrana da fibrose cística (CFTR)

Os canais CFTR estão envolvidos no transporte de sal e água através de tecidos epiteliais (FRIZZEL, 1995). Mutações que reduzem a síntese ou atividade desse canal causam a fibrose cística (FC), uma doença genética letal que afeta a permeabilidade das células epiteliais ao íon ocasionando defeitos no transporte de proteínas, sais e água. Este canal é membro da superfamília dos transportadores ativados por ATP (HYDE et al., 1990), composto por dois domínios transmembrana formadores do poro do canal e dois domínios ligadores de nucleotídeos, que ligam e hidrolisam o ATP. Este canal também possui o domínio R, que é alvo da fosforilação por proteínas cinases, em especial a PKA que é conhecida como ativador natural do canal (MATHEWS et al., 1998). No entanto, outras proteínas como a PKC parecem também modular a atividade do canal através da fosforilação. A ativação e abertura dos CFTR tipicamente requerem a fosforilação do domínio R por proteínas cinases e a ligação de ATP a sítios específicos (FOSKETT, 1998; SHEPPARD, WELSH, 1999).

O papel dos canais CFTR no testículo durante a espermatogênese foi evidenciado em função de observações de que em pacientes com fibrose cística possuem células germinativas em número reduzido ou são células mal-formadas (EGAN et al., 2004)

1.4.1.3 Canais de cloreto ativados por Ca^{+2} (CaCCs)

Os canais de cloro ativados por Ca^{+2} (CaCCs) desempenham papéis importantes na fisiologia celular, incluindo secreção de eletrólitos e água, transdução sensorial, regulação da excitabilidade neuronal e cardíaca assim como a regulação do tônus vascular. Estes canais estão amplamente distribuídos pelo organismo, e são encontrados em células cardíaca, neuronais, pancreáticas, musculares, sanguíneas, da retina, inclusive em células de Sertoli (DURAN et al., 2010).

A ativação dos CaCCs requer altos níveis intracelulares de Ca^{+2} , seja ele proveniente do meio extracelular ou de organelas citoplasmáticas. Quando há o influxo de Ca^{+2} do meio extracelular, há evidências que a entrada do íon pelos CCDV do tipo L e T pode ativar os CaCCs, no entanto quando a principal porta de entrada são os CCDV-N, não há a ativação das correntes de Cl^- . Há dois mecanismos pelos quais o Ca^{+2} ativa os CaCCs: o primeiro é a ligação direta do íon ao canal, e a segunda é através da ativação da proteína cinase Ca^{+2} -calmodulina, que fosforila o canal tornando-o ativo. Estes canais também podem ser regulados diretamente pela proteína G através da interação com a subunidade $\text{GTP-}\gamma$ -S, e indiretamente através da ativação de segundos mensageiros como PLA, PLC e IP_3 . O pH intracelular e a voltagem também estão envolvidos na regulação da atividade dos CaCCs (KIDD, THORN, 2000; REISERT et al., 2003; EGGERMONT, 2004; HARTZELL et al., 2005).

Apesar dos esforços, até hoje não foi possível a elucidação das proteínas que compõem a família dos CaCCs. Recentemente foram identificadas duas proteínas que atuam como canais CaCCs, a Ano1 e Ano2. Estes canais são dependentes de voltagem e ativados pela interação com o Ca^{+2} intracelular e diferem entre si pela afinidade de ligação com o íon e pelo tempo de ativação (DURAN et al., 2010). Outro canal de Cl^- que também é ativado pelo Ca^{+2} é o CIC-3. Este atua como um canal ativado por Ca^{+2} putativo e sua atividade é mediada tanto pela interação com o cátion quanto pela fosforilação da proteína cinase Ca^{+2} -calmodulina. E, ainda a proteína bestrofina que é ativada pela ligação direta do Ca^{+2} ao canal, mas é insensível a fosforilação (HARTZELL et al., 2005; LALONDE et al., 2008; DURAN et al., 2010)

1.4.1.4 Canais de cloreto ligados a receptores

Os receptores gama-amino-butírico (GABA) e da glicina pertencem a uma família de receptores ligados a canais iônicos. A ligação dos neurotransmissores a receptores específicos promove a abertura dos canais aniônicos acoplados a estes receptores. Este evento produz um influxo de Cl^- , o qual hiperpolariza as células nervosas e inibem a atividade neural (JENTSCH et al., 2002).

1.4.2 Canais de potássio

O potássio (K^+) é o cátion intracelular mais abundante e está relacionado a várias funções celulares. A concentração do íon no meio intracelular é muito elevada se comparada ao meio extracelular. Esta diferença é essencial para a manutenção do potencial elétrico na membrana das células e para a manutenção da integridade e crescimento celular, já que está relacionado com processos de síntese de proteínas e DNA, além de participar juntamente com o íon Cl^- da manutenção do pH e volume intracelular (AHERN; KOBERTZ, 2009).

Os canais de K^+ são proteínas tetraméricas integrais da membrana, presentes em todas as células de mamíferos. Estes canais são extremamente seletivos a passagem do íon K^+ através do gradiente eletroquímico e estão relacionados a uma série de eventos celulares incluindo a regulação da atividade cardíaca, contração muscular, liberação de neurotransmissores, excitabilidade neuronal, secreção de insulina, transporte epitelial de eletrólitos, regulação do volume e proliferação celular (ROWAN et al.; 1996; KAZIC, GOJKOVIC-BUKARICA, 1999; WICKENDEN, 2002). Defeitos nestes canais iônicos estão associados a diversas patologias, dentre elas a síndrome de Anderson-Tawil, diabetes melito, epilepsia, episódios de ataxia e disfunção erétil (SANDHIYA,DKHAR, 2009).

Os canais de K^+ conservam uma homologia estrutural entre as espécies e diferem entre si apenas pela maneira em que são ativados (MACKINNON, 2003). Os canais de potássio dependentes de voltagem são ativados em resposta a mudanças no potencial transmembrana e são importantes na fase de repolarização do potencial de ação. Outros são chamados retificadores internos, onde

a corrente passa primeiramente em voltagens hiperpolarizantes, dentre eles se destacam os canais de K^+ ativados por proteína G e os dependentes de ATP (K^+_{ATP}), que interligam funções do metabolismo celular e do potencial transmembrana. Há ainda os canais de K^+ ativados pelo aumento da concentração interna de Ca^{+2} , denominados canais de K^+ dependentes de Ca^{+2} . Estes canais previnem indiretamente a entrada excessiva de Ca^{+2} e estão envolvidos no relaxamento muscular e liberação de neurotransmissores, entre outros eventos (WICKENDEN, 2002). Devido a grande diversidade de canais de K^+ , serão abordados apenas os que foram alvo do presente trabalho, os canais K^+ dependentes de Ca^{+2} e os canais K^+ dependentes de ATP.

1.4.2.1 Canais K^+ dependentes de Ca^{+2}

O aumento das correntes de Ca^{+2} e conseqüente elevação dos níveis intracelulares deste íon estão relacionados com a ativação dos canais de K^+ dependentes de Ca^{+2} . A ligação do íon divalente ao canal facilita a abertura do poro, e este por sua vez, aumenta a afinidade de ligação do Ca^{+2} , permitindo uma abertura prolongada do canal. Desta forma, estes canais contribuem para a regulação do tônus vascular, determinação da duração e freqüência do potencial de ação e na liberação de neurotransmissores (HOU et al., 2009).

Os canais de K^+ dependentes de Ca^{+2} podem ser divididos em três subfamílias: os canais de alta condutância (100-300 pS - BKCa), de condutância intermediária (25-100 pS - IKCa) e de baixa condutância (2-25 pS - SKCa). Os BKCa foram os primeiros canais a serem estudados nesta família. Eles são ativados pela elevação dos níveis de Ca^{+2} e pela despolarização da membrana, no entanto, a ativação do canal pode ocorrer quando apenas um desses fatores está presente (GHATTA et al., 2006). Os BKCa também podem ser regulados por moléculas endógenas como fosfolipídeos, proteínas cinases, espécies reativas de oxigênio e pelo grupamento heme. Hormônios como estrogênio, testosterona e corticosterona também modulam a atividade desses canais através de ações não genômicas (HOU et al., 2009). Os canais IK distinguem-se dos demais em função das propriedades farmacológicas, biofísicas e fisiológicas. Estão presentes em muitos tecidos, tendo importantes funções no controle do volume dos enterócitos, secreção de Cl^- nas células epiteliais de vias aéreas e intestino, controle da proliferação e secreção de citocinas nos linfócitos (JENSEN et al., 2001).

Os canais SK são ativados por concentrações submicromolares de Ca^{+2} e estão relacionados com o processo de hiperpolarização membranar. Estes canais podem ser farmacologicamente classificados com base na sensibilidade ao veneno de abelha, apamina. Xia e colaboradores (1998) demonstraram que a ativação destes canais não se dá pela interação do Ca^{+2} diretamente com o canal, mas sim através da interação do íon com a calmodulina que está associada constitutivamente aos canais SK.

1.4.2.2 Canais de K^+ dependentes de ATP

Os canais de K^+ dependentes de ATP (K^+_{ATP}) são conhecidos por serem responsáveis pela conexão do metabolismo celular com a excitabilidade da membrana plasmática da célula, já que são bloqueados quando a relação citosólica ATP/ADP está elevada. Estes canais estão presentes em várias células e são relacionados a eventos celulares como secreção de insulina nas células beta pancreáticas, proteção contra eventos isquêmicos no coração e cérebro além de estarem envolvidos na regulação do tônus venoso (TERAMOTO, 2006).

Evidências farmacológicas e bioquímicas sugerem que há uma população distinta de K^+_{ATP} na membrana mitocondrial ($\text{K}^+_{\text{ATP-mit}}$) e na membrana plasmática ($\text{K}^+_{\text{ATP-sarc}}$). Apesar da estrutura dos $\text{K}^+_{\text{ATP-mit}}$ ainda permanecer obscura, sabe-se que os K^+_{ATP} em geral apresentam 2 subunidades: a primeira é a unidade formadora do poro que pertence a família dos canais de K^+ retificadores internos (Kir6.x); a segunda é a subunidade regulatória onde está localizado o receptor para as sulfoniluréias, fármacos que bloqueiam a atividade do canal (SUN e HU, 2009).

A ligação de bifosfato de fosfatidil inositol (InsP_2) ou cadeias longas de éster acil-CoA (Lc-CoA) reduzem a sensibilidade dos K^+_{ATP} às moléculas de ATP, e conseqüentemente aumentam a atividade intrínseca dos canais. A fosforilação do K^+_{ATP} por proteínas cinases também já foi relatada, assim como a modulação exercida pela rede de actina diretamente sobre o canal (TERAMOTO, 2006; PROKS e ASHCROFT, 2009).

1.5 Vias de sinalização intracelular

A ligação da $1,25D_3$ ao VDR_{memb} leva a ativação de várias proteínas citosólicas que são encarregadas de amplificar o sinal no meio intracelular. Dentro deste contexto, as proteínas cinases desempenham um papel central controlando o estado de fosforilação de diversas proteínas e modulando a atividade das mesmas (MIZWICKI, NORMAN, 2009).

As vias de sinalização relatadas para a $1,25D_3$ são muitas e variam de acordo com o tipo celular e da resposta a ser gerada (LIN, WHITE, 2003). Estas rotas não atuam de maneira isolada, mas são capazes de exercer influência uma sobre as outras modulando a atividade das proteínas envolvidas no processo. Este sistema complexo de interação é denominado *cross-talk* (KRAUSS, 2008).

Dentre as principais proteínas cinases que participam do processo de via de sinalização da $1,25D_3$ estão a PKA, PKC e PI3K (NEMERE et al., 1994; TUPDOR et al., 2008; MIZWICKI, NORMAN, 2009). Estas proteínas estão envolvidas na regulação de entrada de íons, aminoácidos, no processo de sobrevivência celular, dentre outros eventos desencadeados pelo hormônio (STERLING, NEMERE, 2005; MENEGAZ et al., 2009; XIAO et al., 2009). Ainda, a $1,25D_3$ pode ativar proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK), que são responsáveis por acoplar sinais citosólicos produzidos pela $1,25D_3$ com eventos genômicos. Dentre as MAPKs, as duas vias mais estudadas nos processos desencadeados pelo hormônio em diversos tipos celulares são: a via da ERK 1/2, envolvida em processos de sobrevivência e proliferação celular; e a via da p38MAPK, relacionada a processos de diferenciação celular e progressão do ciclo celular (VANDEWALLE et al., 1995; SONG et al., 1998; BOLAND et al., 2005). Desta forma, apoiado em relatos da literatura, foram estudadas a participação das proteínas cinases PKC, PKA, PI3K, ERK1/2 e p38MAPK no processo de captação de Ca^{+2} estimulado pela $1,25D_3$.

1.5.1 Proteínas cinase C (PKC)

As PKCs são proteínas chaves no processo de sinalização intracelular. Elas participam de processos que vão desde a regulação da expressão gênica, proliferação, diferenciação celular, modulação

da atividade do citoesqueleto até a regulação da atividade de receptores e canais iônicos localizados na membrana plasmática (BREITKREUTZ et al., 2007). Até o momento foram identificados 10 diferentes PKCs que estão subdivididas em três grupos de acordo com a sensibilidade aos cofatores DAG e Ca^{+2} : as PKCs clássicas ($\alpha, \beta I, \beta II, \gamma$) são ativadas por Ca^{+2} e DAG já as novas PKCs ($\delta, \epsilon, \eta, \theta$) não são responsivas ao cátion mas ativadas pelo DAG; e as atípicas são irresponsáveis a ambos os fatores (BREITKREUTZ et al., 2007; KRAUSS, 2008).

A PKC é a proteína cinase mais relacionada com as vias de sinalização desencadeada pela $1,25D_3$. Estudos que avaliaram ações não genômicas do hormônio relataram que esta proteína está envolvida na reorganização do citoesqueleto em células de Sertoli (ZAMONER et al., 2008), na regulação da entrada dos íons Ca^{+2} , PO_4^- e no processo de secreção celular em intestino de pintos (BISSONNETE et al., 1994; STERLING, NEMERE, 2005). Ainda nestas células, Bissonete e colaboradores (1995) demonstraram que a $1,25D_3$ é capaz de ativar a translocação da PKC do citosol para a membrana plasmática. Esta capacidade do hormônio de alterar a distribuição subcelular da proteína também foi relatada em queratinócitos (GNIADOCKI et al., 1997).

Do mesmo modo foi verificada a ativação da PKC pela $1,25D_3$ em condrócitos (SYLVIA et al., 1996; SYLVIA et al., 1998; SCHWARTZ et al., 2002a; SCHWARTZ et al., 2002b), células musculares (De BOLAND et al., 1996; VAZQUEZ et al., 1996) e hepáticas (BENO et al., 1995). A participação da PKC em eventos mediados pela $1,25D_3$ em testículos e células de Sertoli deixa evidente a importância desta proteína na via de transdução de sinal da $1,25D_3$. (MENEZAS, 2009).

1.5.2 Proteínas cinase A (PKA)

A PKA é uma proteína cinase ativada por AMPc que está envolvida em vários processos celulares como regulação do metabolismo intermediário, da expressão gênica e de canais iônicos (KRAUSS, 2008). Esta cinase consiste em duas subunidades regulatórias (R) e duas catalíticas (C), que formam um heterodímero inativo. Quando as subunidades R ligam-se a duas moléculas de AMPc há uma mudança conformacional na estrutura que ocasiona a

liberação das duas subunidades C ativas (GRAY et al., 1997). A atividade da PKA é modulada por mudanças na concentração de AMPc, fosforilação dos resíduos serina/treonina presentes na subunidade catalítica, ligação de proteínas inibidoras e pelas proteínas ancoradoras da PKA (AKAPs). Estas últimas vão determinar a localização celular da proteína nas proximidades dos substratos. Sabe-se que em muitos casos a interação da PKA com os CCDV mediada pelas AKAPs potencializa a atividade destes canais (JONHSON et al., 1997; GRAY et al., 1997).

A ativação da PKA pela $1,25D_3$ está envolvida no aumento da entrada de Ca^{+2} em células intestinais e musculares, sendo que em ambos os casos a proteína cinase modula a abertura dos CCDV (VAZQUEZ et al., 1995; KHANAL et al., 2008). Ainda, foi relatado o envolvimento da PKA nos eventos fisiológicos da $1,25D_3$ em testículo, estando envolvidas na reorganização do citoesqueleto e no aumento da captação de aminoácidos neutros (ZAMONER et al., 2008; MENEGAZ et al., 2009).

1.5.3 Fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K)

As PI3Ks constituem uma família de proteínas que têm a capacidade de fosforilar a posição 3 do anel inositol nos substratos inositídeos, dando origem às moléculas de fosfatidil-inositol-3,4,5-trifosfato ($InsP_3$), fosfatidil-inositol-3,4-bifosfato ($InsP_2$) e fosfatidil-inositol-3-fosfato ($Ins3P$) que atuam como segundos mensageiros dentro da célula (HAWKINS et al., 2006). Com base na homologia estrutural e funcional, estas proteínas foram organizadas em 3 classes. A classe I das PI3K é ativada por proteínas tirosinas-cinases ou por receptores acoplados a proteína G e vão dar origem ao $InsP_3$ que atua como segundo mensageiro e ativa várias vias de transdução de sinal envolvidas no processo de crescimento, diferenciação e metabolismo celular. A classe II e III das PI3K têm como produto os segundos mensageiros $InsP_2$ e $Ins3P$ que desempenham papel central no tráfego de vesículas e secreção celular (ANDREWS et al., 2007; KRAUSS, 2008).

A PI3K também está envolvida nas vias de transdução de sinais da $1,25D_3$. Vários estudos têm demonstrado que a ativação desta proteína pelo hormônio está relacionada a mecanismos de sobrevivência celular através da rota PI3K/Akt em podócitos,

osteoblastos e células HL60 de linhagens leucêmicas (ZHANG et al., 2006; ZHANG, ZANELLO, 2008; XIAO et al., 2009). Também foi evidenciada a participação da PI3K nos seguintes eventos induzidos pela $1,25D_3$: diferenciação celular das linhagens de células leucêmicas HL60 e THP1 (LEE et al., 2004; TSE et al., 2007), migração de células endoteliais (REBSAMEN et al., 2002) e transporte paracelular de Ca^{+2} no duodeno (TUPDOR et al., 2008).

1.5.4 Proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK)

As MAPK são proteínas cinases responsáveis por integrar sinais oriundos do meio extracelular com respostas citosólicas e genômicas através da fosforilação de outras proteínas cinases bem como de fatores de transcrição nuclear (SONG et al., 1998). A cascata de sinalização das MAPK consiste em três proteínas cinases (MAP cinase cinase cinase - MAPKKK, MAP cinase cinase - MAPKK, MAP cinase - MAPK) que são ativadas sequencialmente através de fosforilação em resíduos de tirosina (SCHWARTZ et al., 2002a). Atualmente são reconhecidas cinco rotas da MAPK: as cinases reguladas por sinais extracelulares (ERK 1/2), as cinases c-Jun N-terminal (JNK1,2 e 3), p38 MAPK, ERK 3/4 e a ERK 5 (KRAUSS, 2008).

Cada uma das vias de sinalização da MAPK tem características próprias de ativação. No entanto, em determinadas células, um mesmo estímulo pode ativar mais de uma via que podem atuar de modo sinérgico ou antagonizar os efeitos uma da outra (Figura 3) (BOLAND et al., 2005). Nas células de Sertoli, o entendimento da participação das vias da MAPK na ação da $1,25D_3$, torna-se relevante, uma vez que distúrbios nestas rotas estão relacionados à espermatogênese deficiente e a infertilidade masculina (LIA et al., 2009).

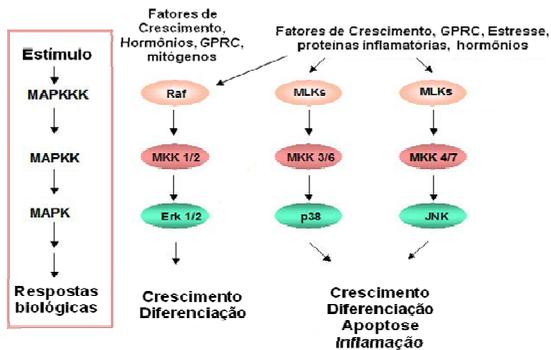


Figura 4. Rotas de ativação das MAPK relacionando os estímulos de cada rota e as respostas biológicas esperadas. Adaptado de DENT et al., 2003.

1.5.4.1 ERK 1/2

A via de sinalização da ERK1/2 está relacionada a processos de sobrevivência, crescimento e diferenciação celular. Esta família é composta de duas proteínas, a p42 (ERK2) e a p44 (ERK1) que são ativadas pela MAPK através da fosforilação em resíduos de tirosina (SCHWARTZ et al., 2002b). Este processo ocorre através da ativação de receptores acoplados a proteína G, por estímulo das proteínas Src-quinasas ou pela sinalização direta da Raf-1 via PKC (SONG et al., 1998).

Trabalhos recentes indicam que a rota da ERK 1/2 participa de muitos eventos celulares mediados pela 1,25D₃. Em células da musculatura esquelética foi demonstrado que a fosforilação de ERK1/2 induzida pelo hormônio e a conseqüente translocação para o núcleo está relacionada com a síntese de proteínas envolvidas no processo de diferenciação e proliferação celular, e que este processo é dependente da PKC e Ca⁺² (BUIRAGO et al., 2001; MORELI et al., 2001; BUIRAGO et al., 2003). Em queratinócitos, a fosforilação da ERK1/2 pelo hormônio está relacionada a processos de diferenciação e proliferação celular (GNIADCKI, 1998; JOHANSEN et al., 2003). Em osteoblasto, a diferenciação celular

mediada pela $1,25D_3$ requer a fosforilação da ERK1/2 via PKC (CHAE et al., 2002).

1.5.4.2 *p38 MAPK*

A ativação da via da p38 está envolvida em processos de crescimento, diferenciação, progressão do ciclo celular e ativação das vias de morte celular (SCHWARTZ et al., 2002a). Esta família contém 4 proteínas, a p38 α , p38 β , p38 γ e p38 δ , que são produtos do *splicing* alternativo de um único gene (KRAUSS, 2008). A ativação das isoformas da p38 ocorre sob vários estímulos externos como radiação UV, estresse osmótico, citocinas e fatores de crescimento (BUITRAGO et al., 2006). Esta ativação desencadeia mudanças no contexto celular, modificando a expressão de proteínas citosólicas, de receptores membranares e organização do citoesqueleto, o que pode afetar o ciclo celular ou ocasionar a apoptose (TREISMAN, 2006; BOLAND et al., 2005).

A ativação da p38 MAPK pela $1,25D_3$ gera respostas biológicas distintas dependendo do tipo celular. Em osteoclasto, a ativação desta via está relacionada ao processo de diferenciação celular (LI et al., 2002), enquanto em células leucêmicas está relacionada à indução da apoptose (PEPPER et al., 2003). Em linhagens de células musculares, a $1,25D_3$ ocasiona a fosforilação rápida da p38 MAPK e ERK1/2, sendo este evento dose e tempo dependente, evidenciando a capacidade do hormônio de ativar distintas vias da MAPK em uma mesma célula (BUITRAGO et al., 2006; RONDA et al., 2007).

Em resumo, muitas das respostas fisiológicas à estimulação hormonal dependem de uma integração contínua entre diferentes vias de sinalização. A sinalização celular modulada por Ca^{+2} compreende uma série de eventos moleculares conectando os estímulos externos com respostas intracelulares através do aumento nos níveis citosólicos deste íon como transdutor de sinal (BENITAH et al., 2009). O influxo de Ca^{+2} pode estar envolvido em diversas funções celulares e pode ser regulado por vários mecanismos, incluindo atividade de proteínas cinases, excitabilidade de membranas, hormônios, fatores de crescimento, sendo que este

evento desempenha um papel central na transdução de sinal de diversos tipos celulares, incluindo o sistema reprodutor (GORCZYNSKA-FJALLING, 2004; CLAPHAM, 2007).

Considerando-se a importância da $1,25D_3$ para a função reprodutiva e a diversidade de vias de sinalização moduladas pelo hormônio, compreender como este hormônio modula os níveis intracelulares do Ca^{+2} e as rotas de transdução de sinais envolvidas neste efeito pode ajudar na compreensão da função fisiológica da $1,25D_3$ em células testiculares.

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo Geral*

Estudar o envolvimento de canais iônicos presentes na membrana plasmática e de proteínas cinases no influxo de $^{45}\text{Ca}^{+2}$ estimulado pela $1,25\text{D}_3$, em testículos de ratos imaturos e em células de Sertoli. Também, investigar as possíveis interações das vias intracelulares que possam integrar as rápidas respostas com atividade nuclear.

2.2 *Objetivos Específicos*

- Determinar a ação do hormônio $1,25\text{D}_3$ no influxo de $^{45}\text{Ca}^{+2}$ em testículos e em cultura primária de células de Sertoli de ratos imaturos;
- Caracterizar o envolvimento de canais de Ca^{+2} dependentes de voltagem (tipo L e T), canais de K^+ dependentes de Ca^{+2} , canais de K^+ dependentes de ATP, canais de Cl^- dependentes de Ca^{+2} e canais de Cl^- dependentes de voltagem no efeito da $1,25\text{D}_3$ no influxo de Ca^{+2} em testículos e células de Sertoli de ratos imaturos;
- Estudar a participação de proteínas cinases PKA, PKC, PI3K, MEK (ERK1/2) e p38MAPK, que possam estar envolvidas na integração da transdução de sinais entre a membrana plasmática (influxo de $^{45}\text{Ca}^{+2}$) e o núcleo, em células de Sertoli de ratos imaturos;
- Comparar o envolvimento dos microtúbulos e dos canais de CIC3 no efeito estimulatório da $1,25\text{D}_3$ no influxo de $^{45}\text{Ca}^{+2}$.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 *Animais*

Foram utilizados ratos Wistar machos de 10 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os filhotes foram mantidos com as progenitoras até o momento dos experimentos. Os animais foram mantidos a um ciclo claro/escuro (12h/12h) em salas climatizadas com temperatura controlada, ração padronizada e água a vontade. Todos os animais foram mantidos segundo as recomendações do Conselho de Medicina Veterinária e do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Protocolo CEUA/PP00023.

3.2 *Reagentes*

$1\alpha,25$ dihidroxi-vitamina D_3 , DNase, tripsina, collagenase/dispase, Ham's F-12, meio de cultura DMEM, NaHCO_3 , penicilina, estreptomomicina, canamicina, fungizona e soro sintético de reposição foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich. Para a contagem da radioatividade das amostras foi utilizado o líquido de cintilação Optiphase Hisafe III adquirido pela BioAgency, São Paulo, Brasil. O $^{45}\text{Ca}^{+2}$ foi adquirido da Du Pont-NEM Research Products pela PerkinElmer, São Paulo, Brasil. Os reagentes utilizados na preparação do tampão Krebs Ringer-bicarbonato (KRb), das soluções de cloreto de lantânio e do tampão PBS eram todos de pureza "pró-análise" (P.A).

A lista dos bloqueadores e inibidores utilizados para o estudo dos canais iônicos e de proteínas cinases pode ser visualizada nas tabelas 2, 3, 4 e 5.

Tabela 7 Compostos utilizados para o estudo do envolvimento dos CCDV no influxo de Ca^{+2} estimulado por $1,25D_3$ (<http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>).

Composto	Ação farmacológica	Estrutura química
Verapamil	Bloqueador dos CCDV-L	
Nifedipina	Bloqueador dos CCDV-L	
Flunarizina	Bloqueador dos CCDV-T	

Tabela 8 Compostos utilizados para o estudo dos canais de Cl⁻ no influxo de Ca⁺² estimulado por 1,25D₃ (<http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>).

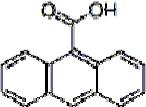
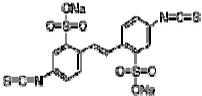
Composto	Ação farmacológica	Estrutura química
Ácido carboxílico 9-antraceno (9-AC)	Bloqueador de canais de cloreto	
DIDS - Disódio 4,4'-diisotiocianatostilbeno-2,2'-disulfonato	Bloqueador seletivo dos canais de cloreto CIC3	

Tabela 9 Compostos utilizados no estudo do envolvimento dos canais de K⁺ no influxo de Ca⁺² estimulado por 1,25D₃ (<http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>).

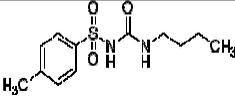
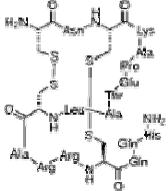
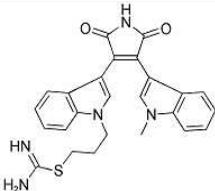
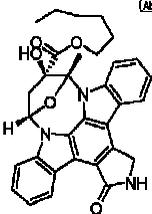
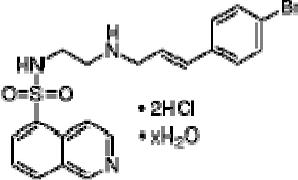
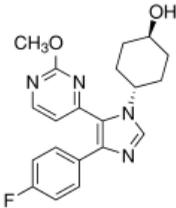
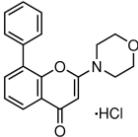
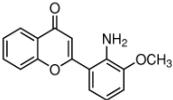
Composto	Ação farmacológica	Estrutura química
Tolbutamida	Bloqueador dos canais de K ⁺ dependentes de ATP	
Apamina	Bloqueador específico para canais de K ⁺ dependente de Ca ⁺²	

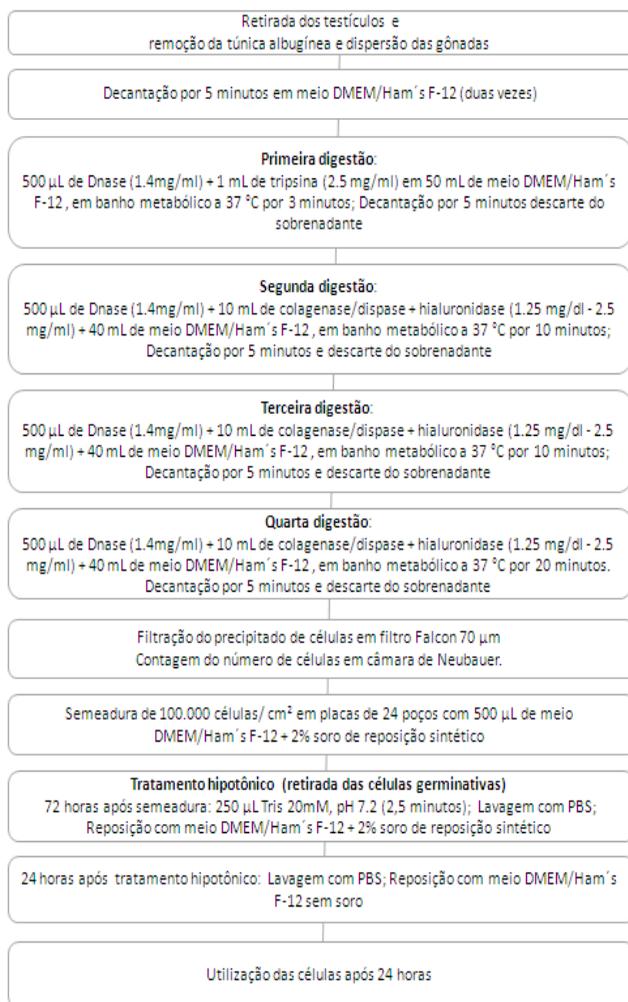
Tabela 10 Inibidores utilizados para o estudo da participação das proteínas cinases envolvidas no influxo de Ca^{+2} estimulado por $1,25\text{D}_3$ (<http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>).

Composto	Ação farmacológica	Estrutura química
Ro31-3220	Inibidor de PKC	
KT 5720	Inibidor de PKA	
H-89	Inibidor da PKA	

SB 239063	Inibidor da p38MAPK isoformas α e β	
LY 294,002	Inibidor da PI3K	
PD 98,059	Inibidor da MEK1/2; rota ERK 1/2	

3.3 *Cultura primária de células de Sertoli*

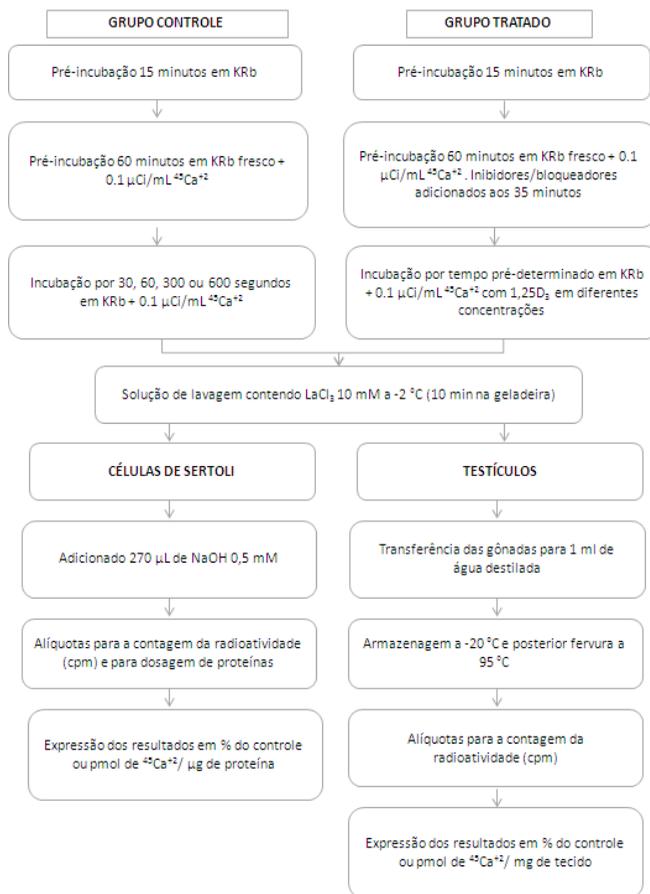
A cultura primária de células de Sertoli foi realizada de acordo com o fluxograma 1. Foram utilizados ratos Wistar machos com 10 dias de idade para a obtenção das células.



Fluxograma 1. Fluxograma representativo do processo de isolamento e cultivo das células de Sertoli (DORRINGTON et al., 1975; GALDIERI et al., 1981; LEVALLET et al., 2007).

3.4 Influxo de $^{45}\text{Ca}^{+2}$ em células de Sertoli e testículo

Para estudar o influxo de $^{45}\text{Ca}^{+2}$ nas células de Sertoli e em testículos foi utilizada a metodologia de BATRA e SJOGREN (1983), com modificações. Os testículos utilizados foram extraídos de ratos Wistar de 10 dias e decapsulados. Para os estudos realizados em testículos inteiros, uma gônada (alternadamente direita e esquerda) foi utilizada no grupo tratado e a contralateral no grupo controle. No estudo em cultura primária de células de Sertoli, a proteína na amostra foi medida através do método de Bradford (1976). A sequência experimental está resumida no fluxograma 2.



Fluxograma 2 Representação esquemática dos procedimentos para o estudo do influxo de $^{45}\text{Ca}^{+2}$ em células de Sertoli e em testículos inteiros de ratos imaturos (BATA e SJOGREN, 1983).

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados experimentais foram expressos como a média \pm E.P.M. As comparações entre os grupos foram realizadas através da análise da variância de uma via (ANOVA) seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Utilizou-se o programa GraphPAD INSTAT, versão 3.0. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para um “p” igual ou menor do que 0,05 (SNEDECOR; COCKRAN, 1956).

5 RESULTADOS

Os resultados foram organizados na forma de artigo científico submetido à revista Cell Calcium.

Stimulatory effect of $1\alpha,25(\text{OH})_2$ Vitamin D_3 on $^{45}\text{Ca}^{2+}$
influx in immature rat Sertoli cells and whole testis: Intracellular
pathways cross-talk

Angela Rosso^a, Mariane Pansera^a, Ariane Zamoner Pacheco
de Souza^a, H el ene Boura ima-Lelong^b, Serge Carreau^b, F atima
Regina Mena Barreto Silva^{a,*}

*^aDepartamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-Santa Catarina,
Brazil*

*^bUniversit  de Caen Basse-Normandie, EA 2608, INRA-USC
2006, 14032 Caen, France*

*Corresponding author: Dr. F atima Regina Mena Barreto Silva.
Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, UFSC.
Campus Universitário, Bairro Trindade, Cx Postal 5069, CEP: 88040-970
- Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. e-mail: mena@mbox1.ufsc.br,
Tel/Fax: +55-48.3721.96.72

Keywords: $1\alpha, 25(\text{OH})_2$ Vitamin D_3 ; $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx, Sertoli cells;
Immature rat testis

Abstract

It was characterized that the rapid response to $1,25D_3$ on $^{45}Ca^{2+}$ influx in rat Sertoli cells was mediated by VDCCs, PKC, ERK1/2 and p38 MAPK pathways. In primary culture of 10 day-old rats Sertoli cells as well as in the whole testis, the time-course of $^{45}Ca^{2+}$ influx did not change significantly in basal conditions. However, $1,25D_3$ showed a stimulatory effect on $^{45}Ca^{2+}$ influx from 10^{-15} to 10^{-8} M after 60 s of incubation. The maximum effect was around 140% at 10^{-12} M on purified Sertoli cells from showing a steady state on $^{45}Ca^{2+}$ influx between 10^{-11} and 10^{-9} M. Under this experimental condition, $1,25D_3$ stimulated $^{45}Ca^{2+}$ influx from 73% to 106% and no effect was observed at 10^{-16} , 10^{-8} and 10^{-7} M in whole testis. Voltage-dependent calcium channels activities are mandatory for a full and complete stimulatory effect of $1,25D_3$ in these approaches. Potassium and chloride channels also are strongly involved in this rapid response coordinated by $1,25D_3$. The participation of some selected kinases, points to PKC and ERK1/2 upstream activity to p38 MAPK activation suggesting an intracellular cross-talk between rapid $^{45}Ca^{2+}$ influx and nuclear events. In addition, the comparative effect of microtubules disassembles and CIC3 channels blocker on $^{45}Ca^{2+}$ influx provides evidence of secretory activity of Sertoli cells triggered by $1,25D_3$.

1. Introduction

The steroid hormone 1,25(OH)₂-vitamin D₃ (1,25D₃) activates multiple signaling pathways in its target cells [1,2]. The vitamin D receptor (VDR), a member of the superfamily of nuclear receptors exerts 1,25D₃-dependent responses in the nucleus as a ligand-activated transcription factor [3]. In addition to these relatively slow (hours to days) genomic effects, 1,25D₃ generates rapid responses (minutes to hours) including Ca²⁺ uptake. The first clear demonstration of 1,25D₃-induced nongenomic response emanated from the *ex vivo* study in perfused chick intestine, transcaltachia (the rapid hormonal stimulation of intestinal calcium absorption). In that study, it was observed that the transfer of ⁴⁵Ca²⁺ present in chick intestine to the circulatory system was stimulated within 4 to 5 min after addition of physiological concentrations of 1,25D₃ in the celiac artery [4]. Numerous rapid responses mediated by 1,25D₃ have been reported, including modulation of voltage-gated calcium and chloride channels [1], exocytosis of bone material [5], and modulatory effect on PKA, PKC, PI3-K, ERK and MAPK [2,6].

There is accumulating evidence that vitamin D and VDR are important in reproductive tract. Successful fertility rates are significantly decreased in vitamin D deficient male rats [7,8]. 1,25D₃ effects on cellular calcium homeostasis have been reported in a variety of cell types as chicken intestinal mucosa [9], and osteoblastic cells [5]. It has been described that receptors to 1,25D₃ are present in the cytoplasm and nucleus of male and female of reproductive tissues [10]. In addition, the wide expression of 1,25D₃ receptor as well as the biological functions was demonstrated by autoradiographic receptor studies on mouse testis [11]. The presence of 1,25D₃ receptors in the nucleus of a mouse Sertoli cell line and the stimulatory effect of 1,25D₃ on ⁴⁵Ca²⁺ influx, DNA synthesis and protein content have been shown [12].

In previous studies in whole immature rat testis, we demonstrated the stimulatory effect of 1,25D₃ through a specific and selective plasma membrane amino acid transport system [13]. These results pointed to both genomic effects, which can be triggered by PKA, and to rapid responses involving Ca²⁺/K⁺ channels on the plasma membrane. Furthermore, since it was demonstrated that extracellular calcium as well as voltage-dependent Ca²⁺ channels are necessary to mediate plasma membrane effect of 1,25D₃ in the testis [13], the present study was conducted to analyze the rapid response

and underlying the mechanism of action of $1,25D_3$ on $^{45}Ca^{2+}$ influx in purified Sertoli cells and whole testis from 10 day-old rats.

2. Methods

2.1. Chemicals

$1\alpha,25(OH)_2$ Vitamin D_3 ($1,25D_3$), verapamil, flunarizine, nifedipine, 9-anthracene carboxylic acid (9-AC), 4, 4'-Diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS), tolbutamide, apamine, KT-5720, H-89, RO 31-8220, LY 294002, SB 239063, PD 98059, and colchicine were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Ham's F12 medium, penicillin, streptomycin, kanamycin and amphotericin B were from PAN Biotech (Aidenbach, Germany). Collagenase-dispase and bovine serum albumin (BSA) were from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). Serum Replacement 3, bovine pancreas deoxyribonuclease (DNase type I), hyaluronidase (type I-S), trypsin, soybean trypsin inhibitor, sodium pyruvate, D-glucose, Hepes, sodium bicarbonate were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). [^{45}Ca]CaCl₂ (sp. act. 321 KBq/mg Ca²⁺) and Optiphase Hisafe III biodegradable liquid scintillation were purchased from PerkinElmer (Boston, USA). All other chemicals were of analytical grade.

2.2. Animals

Wistar rats were bred in animal house and maintained in an air-conditioned room (about 21 °C) with controlled lighting (12 h/12 h light/dark cycle). The suckling rats were kept with their mothers until euthanasia. Pelleted food (Nuvital, Nuvilab CR1, Curitiba, PR, Brazil) and tap water were available *ad libitum*. All animals were carefully monitored and maintained in accordance with ethical recommendations of the Brazilian Veterinary Medicine Council and the Brazilian College of Animal Experimentation (Protocol CEUA/PP00023).

2.3. Primary culture of Sertoli cells and calcium influx

Sertoli cells were obtained from 10 day-old Wistar rats. Rats were killed by decapitation, testes were removed and decapsulated. Sertoli cells were obtained by sequential enzymatic digestion as previously described by Dorrington et al. [14]. Sertoli cells were seeded at the concentration of 100 000 cells/cm² in 24 wells Falcon culture plates (Deutscher, Brummath, France) and cultured for 72 h in Ham's F12/DMEM (1:1) (PAN, 120 Deutscher, Brummath, France) medium supplemented with serum replacement 3 from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). 2.2 g/L sodium bicarbonate and antibiotics (50,000 IU/L penicillin, 50 mg/L streptomycin, 50 mg/L kanamycin), fungicide (0.25 mg/L amphotericin B), (PAN, Brummath, France) in a humidified atmosphere of 5% CO₂:95% air at 34°C. Three days after plating, residual germ cells were removed by a brief hypotonic treatment using 20 mM Tris-HCl (pH 7.2) [15]. Cells were washed with PBS (PAN, Dutscher, Brummath, France) and fresh medium Ham's F12/DMEM (1:1) was added. On day 5 after plating, cells were pre-incubated in Krebs Ringer-bicarbonate (KRb) buffer (122 mM NaCl; 3 mM KCl; 1.2 mM MgSO₄; 1.3 mM CaCl₂; 0.4 mM KH₂PO₄; 25 mM NaHCO₃) for 15 min in a Dubnoff metabolic incubator at 34°C, (pH 7.4) and gassed with O₂:CO₂ (95:5; v/v). After that, the medium was changed by fresh KRb containing 0.1 µCi/mL ⁴⁵Ca²⁺ during 60 min in order to establish intracellular and extracellular ⁴⁵Ca²⁺ concentration. For ⁴⁵Ca²⁺ influx measurements, cells were incubated for a further 30, 60, 150, 300 or 600 s in the absence (control) or presence of 1,25D₃ (10⁻¹³ to 10⁻⁷ M) [13]. In some experiments channel blockers or kinase inhibitors were added during the last 25 min before the hormone addition and maintained during all the incubation period (see figures). The following drugs were used: Flunarizine (1 µM), nifedipine (100 µM), verapamil (100 µM), 9-AC (1 µM), DIDS (200 µM), tolbutamide (100 µM), Apamine (0.1 µM), H-89 (10 µM), KT-5720 (1 µM), RO 31-8220 (20 µM), LY 294002 (25 µM), SB 239063 (10 µM), PD 98059 (10 µM), and colchicine (10 µM) [16,13].

Extracellular ⁴⁵Ca²⁺ from primary Sertoli cells culture was washed off in 127.5 mM NaCl, 4.6 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 10 mM HEPES, 11 mM Glucose, 10 mM LaCl₃, pH 7.4 after 10 min in this washing solution. The presence of La³⁺ in washing solution, was found to be essential to prevent release of the intracellular ⁴⁵Ca²⁺ [18]. After La³⁺ washing, 0.5 mM NaOH were added. Medium

aliquots were placed in scintillation fluid and in a LKB rack beta liquid scintillation spectrometer (model LS 6500; Multi-Purpose Scintillation Counter-Beckman Coulter, Boston, USA) [16].

2.4 Testis and calcium influx

One gonad (alternately left and right) from 10 day-old rats was used as experimental and the contralateral one as the control. The testes were weighed, decapsulated and pre-incubated in KRb buffer as described for Sertoli cells. After that, the testes were transferred to another series of wells with fresh KRb containing $0.1 \mu\text{Ci/mL } ^{45}\text{Ca}^{2+}$ during 60 min. Finally, $1,25\text{D}_3$ was included in this KRb containing $^{45}\text{Ca}^{2+}$ and the tissues were incubated with different doses of $1,25\text{D}_3$ (10^{-16} to 10^{-7} M) for 60 s. In some experiments ionic channel blockers were added during the last 25 min before the hormone addition and maintained during all the incubation period as described above for primary culture of Sertoli cells and calcium measurement [17,16].

As discibed for Sertoli cells, extracellular $^{45}\text{Ca}^{2+}$ was thoroughly washed off in La^{3+} washing solution. After tissue washing, they were removed to screw cap tubes containing 1 mL of distilled water. They were frozen at -20°C and afterwards boiled for 10 min; 100 μL aliquots of tissue medium were placed in scintillation fluid and in a LKB rack beta liquid scintillation spectrometer (model LS 6500; Multi-Purpose Scintillation Counter-Beckman Coulter, Boston, USA) [16].

2.5 Statistical analysis

The results are means \pm S.E.M. expressed as $\text{pmol } ^{45}\text{Ca}^{2+}/\mu\text{g}$ of protein, $\text{pmol } ^{45}\text{Ca}^{2+}/\text{mg}$ of tissue or % of control. The total protein was measured according to the method of Bradford [19]. When multiple comparisons were performed, evaluation was done using one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test. Differences were considered to be significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Basal time-course and dose-response curve of $1,25\text{D}_3$ on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx

The basal $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx is denoted by the entrance of calcium to the cytoplasm without external stimuli. After the calcium equilibrium in the Sertoli cells and in the testis for 60 min of incubation calcium measurement was additionally monitored for 30, 60, 150, 300 and 600 s without stimuli. Fig. 1A and 1B, show that no significant changes on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx was observed neither in Sertoli cells nor in the testis during this time-course studied. In order to verify just membrane effects of 1,25D₃, next experiments were performed using time incubation of 60 seconds.

We have recently described that 1,25D₃ was able to increase significantly amino acid accumulation at doses ranging from 10^{-12} to 10^{-6} M in immature rat testis [13]. Taking these results into account, we used this wide concentration range of 1,25D₃ and short period of incubation to study the direct effect of 1,25D₃ on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx. As illustrated in Fig. 1C, the addition of 1,25D₃ stimulates $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx from 10^{-12} to 10^{-8} M after 60 s of incubation. It was observed that the maximum stimulatory effect of 1,25D₃ was around 140% at 10^{-12} M after 60 s of incubation, compared with control group. An initial peak rise followed by a sustained rise from 10^{-12} to 10^{-9} M was evident. Significant difference on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx between 10^{-12} and 10^{-8} M was observed, but no difference was denoted between 10^{-12} and 10^{-10} M.

The effect of 1,25D₃ (from 10^{-16} to 10^{-7} M) on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx was studied in whole testis after 60 s of incubation. The stimulatory effect was observed from 10^{-15} to 10^{-9} M with a peak rise of calcium at 10^{-15} M with a sustained effect until 10^{-9} M of 1,25D₃. No stimulatory effect was observed at 10^{-16} , 10^{-8} and 10^{-7} M. Although the stimulatory effect profile of 1,25D₃ on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx was similar, in terms of percentage, the average of 1,25D₃ stimulatory effect on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx on 10^{-10} M was around 110% in Sertoli cells and 90% in whole testis (Fig. 1C and D). As described before, 10^{-10} M is considered physiological dose of 1,25D₃ [62], also, we reported that this dose was able to enhance amino acid accumulation in whole testis [13]. Take this into account, 10^{-10} M was used to perform next experiments.

3.2. Involvement of voltage-dependent Ca^{++} channels in the stimulatory effect of 1,25D₃ on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx

The calcium influx through the plasma membrane and the release of calcium from intracellular stores are the necessary events for a rise in intracellular calcium. Although we have reported the

involvement of extracellular calcium in the mechanism of action of 1,25D₃ in amino acid accumulation in immature rat testis, in the present study, we also used ⁴⁵Ca²⁺ influx as a tool to demonstrate the direct effect of 1,25D₃ and rapid-response of Sertoli cells and testis to this hormone.

Fig. 2A shows the involvement of two Ca²⁺ channel subtypes in the stimulatory action of 1,25D₃ on ⁴⁵Ca²⁺ influx in Sertoli cells. We first demonstrated that the blockers themselves, at the concentrations used, did not alter the basal calcium cellular equilibrium. In Fig. 2A, it was observed that when Sertoli cells were incubated for 25 min with 100 μM nifedipine or 1 μM flunarizine, L- and T-voltage-dependent Ca²⁺ channel (VDCCs) blockers respectively, the effect of the hormone was partially prevented. To better characterize the high-voltage Ca²⁺ currents involvement in the 1,25D₃ stimulatory effect on ⁴⁵Ca²⁺ influx, we used another specific L-voltage-dependent Ca²⁺ channel, verapamil, that completely blocked the 1,25D₃ effect. All together, these results highlighted that VDCCs are the preferential gate to calcium entrance on plasma membrane, triggered by 1,25 D₃.

Considering our previous data of membrane actions of 1,25D₃ in intact whole testis in amino acid accumulation [13], we take advantage of this approach to compare the profile of ⁴⁵Ca²⁺ influx stimulated by 1,25D₃ with that in isolated Sertoli cells. As showed in Fig. 2B, the efficacy of the L- and T-voltage-dependent Ca²⁺ channel blockers (without disturbing the basal calcium balance), was similar to that observed in isolated purified Sertoli cells strengthening therefore, the view that 1,25D₃ was able to activate these channels in the testis.

3.3. Involvement of K⁺ channels in the stimulatory effect of 1,25D₃ on ⁴⁵Ca²⁺ influx

It is well know that Ca²⁺ currents can be influenced by other ions as demonstrated by the presence of Ca²⁺-dependent K⁺ channels and Ca²⁺-dependent Cl⁻ channels [20,21], in Sertoli cells. Moreover, potassium is one of the ionic components engaged to keep the basal electrical characteristics of the cells. In the present study, we demonstrated that a specific blocker of Ca²⁺-dependent K⁺ current, 0.1 μM of apamine, as well as 100 μM of tolbutamide, an ATP-dependent K⁺ channel blocker inhibited the stimulatory effect of 1,25D₃ on ⁴⁵Ca²⁺ influx both in Sertoli cells and testis (Fig. 3A and B).

3.4. Involvement of Cl⁻ channels in the stimulatory effect of 1,25D₃ on ⁴⁵Ca²⁺ influx

The independent movement of either K⁺ efflux or Cl⁻ influx in cells can produce a hyperpolarization that changes completely the activity of the voltage-operated channels in the plasma membrane. Taking this into account, we investigated the involvement of Ca²⁺-activated chloride currents on the effect of 1,25D₃ on ⁴⁵Ca²⁺ influx by using 1 μM of 9-AC. As it can be observed in Fig. 4A and 4B, this blocker inhibited the stimulatory action of the hormone, suggesting that the activity of this type of channel might be part of the regulatory mechanism of 1,25D₃ effects initiated on the plasma membrane. Also, we analyzed the involvement of voltage-dependent chloride channels in isolated Sertoli cells as well as in the whole testis. The use of DIDS, a selective voltage-dependent chloride channels blocker, was able to partially inhibit the stimulatory effect of 1,25D₃ on ⁴⁵Ca²⁺ influx.

3.5. Involvement of PKC and PKA in the stimulatory effect of 1,25D₃ on ⁴⁵Ca²⁺ influx

We showed previously that nongenomic effect of 1,25D₃ on amino acid accumulation points to subsequent steps that require PKA activity in order to reach maximal hormonal stimulatory effect on amino acid accumulation in immature rat testis [13]. To study the hypothesis that PKC and/or PKA regulate the ionic channels or through a cross-talk pathway induce a downstream signal to the nucleus, we investigated the role of some target proteins in the mechanism of action of 1,25D₃ on ⁴⁵Ca²⁺ influx. As shown in Fig. 5A, treatment of Sertoli cells with RO 31-8220 (20 μM), a protein kinase C inhibitor, did not have any effect on control group; however, it significantly abolished the stimulatory effect of 1,25D₃ on ⁴⁵Ca²⁺ influx. We also found that incubation of Sertoli cells with PKA inhibitors KT-5720 and H-89, selective and potent PKA blockers, did not change neither basal ⁴⁵Ca²⁺ influx nor stimulatory effect of 1,25D₃ on ⁴⁵Ca²⁺ influx (Fig. 5B). Taken together, these results indicate that stimulatory effect of 1,25D₃ on ⁴⁵Ca²⁺ influx is modulated via phosphorylation cascades involving, at least, PKC pathway in Sertoli cells.

3.6. Involvement of PI-3K, MEK/MAPK pathways in the stimulatory effect of 1,25D₃ on ⁴⁵Ca²⁺ influx

There are increasing evidences that 1,25D₃ stimulates nongenomic effects associated with calcium-activated signaling pathways and kinases. In that context, in Sertoli cells, we performed the ⁴⁵Ca²⁺ influx assay in the presence of LY 294002, a specific inhibitor of PI-3K or PD 98059, a blocker of mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade, or SB 239063 that inhibits its established targets, p38 α and p38 β [22]. Fig. 6A shows that the presence of 25 μ M LY 294002 partially prevented the effect of 1,25D₃ on ⁴⁵Ca²⁺ influx. Otherwise, although a *per se* effect of LY 294002 on ⁴⁵Ca²⁺ influx, the 1,25D₃ stimulatory effect was significantly suppressed when co-incubated with this blocker. Also, 10 μ M PD 98059 significantly diminished the stimulatory effect of 1,25D₃ on ⁴⁵Ca²⁺ influx (Fig. 6B). However, p38 MAPK inhibitor (10 μ M) completely blocked ⁴⁵Ca²⁺ influx stimulated by 1,25D₃ (Fig. 6C), evidencing a kinase-dependent mechanism.

3.7. Involvement of microtubules integrity and CIC-3 Cl channel activity in the stimulatory effect of 1,25D₃ on ⁴⁵Ca²⁺ influx

It is well known that tubulin, present in all eukaryotes, is an abundant, hydrophilic, heterodimeric protein that is the chief component of microtubules, ciliary axonemes, basal bodies and centrioles. It has been described that the integrity of network cytoskeletal proteins is essential for the amino acid transport through membrane in testis [23]. The contribution of microtubules integrity to the stimulatory effect of 1,25D₃ on ⁴⁵Ca²⁺ influx was verified by using 10 μ M colchicine, a network microtubule disruptor. Fig. 7 shows that the stimulatory effect of 1,25D₃ on ⁴⁵Ca²⁺ influx diminished significantly in the presence of colchicine. In addition, in this figure, we compared the effect of DIDS, a specific blocker of voltage-dependent Cl⁻ channels, and colchicine in the stimulatory effect of 1,25D₃ on ⁴⁵Ca²⁺ influx. Both agents were able to disturb the stimulatory effect of 1,25D₃ on ⁴⁵Ca²⁺ influx suggesting that, at least in part, as much microtubules network as CIC-3 channel activity (both involved on cellular secretion), participate on the stimulatory effect of 1,25D₃ on ⁴⁵Ca²⁺ influx in Sertoli cells.

4. Discussion

The presence of specific 1,25D₃ receptors was demonstrated to be localized in the nucleus of Sertoli cells and seminiferous tubules [24]. Furthermore, the evidence of Sertoli cells as primary site for 1,25D₃ receptor binding in mouse testis was reported by Schleicher et al. [11]. Also, it has been reported that 1,25D₃ binds to cytosolic and nuclear fractions of whole rat testis and its various cellular components [10].

In 10 day-old rats, the immediate effect of 1,25D₃ on ⁴⁵Ca²⁺ influx was evident and the stimulatory effect of the hormone was around 110% in Sertoli cells and 90% on whole testis. In addition, the effect of this hormone on ⁴⁵Ca²⁺ influx was very rapid, occurring in seconds, a time lag non-compatible with the classical scheme for a nuclear receptor action. This result confirms a plasma membrane effect of 1,25D₃ and a rapid response from Sertoli cells. Our data, are in good agreement with Akerstrom and Walters [12] who demonstrated that 1,25D₃ induced a dose-dependent rapid uptake of ⁴⁵Ca²⁺ within 5 min in a mouse Sertoli cell line. Also, the rate of ⁴⁵Ca²⁺ influx is in line with those reported for retinol stimulatory effect on ⁴⁵Ca²⁺ influx in isolated Sertoli cells [25], as well as to testosterone in whole testis and/or Sertoli cells [26,27].

Ionized free calcium (Ca²⁺) is an ubiquitous signaling ion that serves as both a charge carrier and a chemical intermediate linking many physiological stimuli to their intracellular effectors [28]. In general, [Ca²⁺] is tightly regulated by multiple Ca²⁺ channels, pumps, exchangers and buffers. Ca²⁺ influx can be regulated, at least, by three major mechanisms: voltage-dependent Ca²⁺ channels (VDCC), second messenger-mediated channels and/or receptor-mediated channels [29,30,31].

Considering previous evidences that nongenomic actions of 1,25D₃ deeply involve extracellular calcium in immature rat testis [13], we then analyzed the mechanism of Ca²⁺ influx, by investigating L- and T-type voltage-operated Ca²⁺ channels, which were described to be present in the plasma membrane of rat Sertoli cells and in the testis [32]. Indeed, our data demonstrate that Sertoli cells and whole testis treated with L-type voltage-operated Ca²⁺ channel antagonists, either flunarizine or nifedipine or verapamil, lead to an effective blockage of L- and T-1,25D₃-induced Ca²⁺ influx. Therefore, we conclude that the rapid response activation in Sertoli cell and in the testis, elicited by 1,25D₃, is predominantly by VDCC channels. These data corroborates the importance of extracellular calcium to 1,25D₃ acts on plasma membrane [13].

K⁺ channels are an ubiquitous family of membrane proteins that play critical roles in a variety of physiological processes, including electrolyte transport, cell volume regulation and also along with the coordinated activity of other ion channels and membrane transporters, are essential for fluid secretion. Besides, K⁺ channels play an essential role to maintain an adequate electrical driving force for Ca²⁺ entry [33].

We demonstrated the participation of ATP-dependent K⁺ channels and Ca²⁺-dependent K⁺ currents in studies involving plasma membrane events and nongenomic responses to thyroid hormones [34,35,17], as well as to 1,25D₃ in immature rat testis [13]. In the present work, the functional integrity of K⁺ currents was essential to the hormone effect, since the blockage of K⁺ channels by tolbutamide and apamine abolished the stimulatory action of 1,25D₃ on Ca²⁺ influx. In agreement with this, several reports sustained the role of K⁺ channels and Ca²⁺ influx associated with the regulation of cellular secretion [36,20]. Similar results were observed in Sertoli cells from immature rat testis when incubated with testosterone [37]. An immediate depolarization evoked by testosterone was blocked by diazoxide, a K⁺-ATP channel agonist, and totally inhibited the action of testosterone. In that case, the closure of K⁺-ATP channels caused the depolarizing effect, consequently opening the voltage-dependent Ca²⁺ channels (L-type) and allowing the influx of Ca²⁺ [37]. These results indicate that ⁴⁵Ca²⁺ influx is associated with other plasma membrane ion channels and are mandatory to full stimulatory effect of 1,25D₃ on ⁴⁵Ca²⁺ influx in purified Sertoli cells and whole testis. Also, the blockage of ⁴⁵Ca²⁺ entry produced by apamine, a blocker of K⁺ channel involving in hyperpolarization process, sustain the hypothesis of an immediate hyperpolarization produced by 1,25D₃.

Modulation of voltage-dependent Ca²⁺ conductance by changing Cl⁻ concentration was described in different tissues including the testis [21]. Sertoli cells are key cells involved in the development and maintenance of spermatogenesis as well as in the secretion of a Cl⁻ and K⁺-rich fluid into the lumen of seminiferous tubules [38]. They express a variety of chloride channels, including Ca²⁺-dependent Cl⁻ channels [21], voltage-dependent Cl⁻ channels [39], cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) Cl⁻ channels [40], and acid sensing Cl⁻ channel (ASCC) [41,38]. In this context, 9-AC, an aromatic compound that has been widely used as an anion probe to study Ca²⁺-activated Cl⁻ currents as well as DIDS, a stilbene derivative which blocks ClC-3 outwardly rectifying chloride channels [42,43], were used to study the influence of these

both types of ionic currents in the stimulatory effect of 1,25D₃ on Ca⁺² influx. The total blockage of the hormone on Ca⁺² influx by 9-AC highly suggest the modulatory role of chloride currents on Ca⁺² influx in purified Sertoli cells and in whole testis. However, although the presence of ClC-2, ClC-3, ClC-6 and ClC-7 members of the family of voltage gated Cl⁻ channels were previously described to be expressed in primary culture rat Sertoli cells [39], they seemed not to be the main chloride channels currents to modulate Ca⁺² influx in Sertoli cells and testis from 10 day-old rat, in our experimental conditions.

We investigated the signaling events underlying the effect of 1,25D₃ on Ca⁺² influx keeping in mind the role of PKC and PKA commonly described either by phosphorylation of ionic channels or as a target cross-talk proteins to mediate extracellular signals to the nucleus [44,6,13,45]. It has been reported that 1,25D₃ activation of PKC may cause PKA activation via a cross-talk mechanism with the cAMP pathway to mediate 1,25D₃-dependent Ca⁺² uptake in the skeletal muscle [46]. Here, we demonstrated that in the presence of a PKC blocker, 1,25D₃ stimulatory effect on Ca⁺² influx was abolished, while two inhibitors of PKA activity did not produced any alteration on the hormone stimulatory action, which rules out the participation of PKA in the action of 1,25D₃ on Ca⁺² influx in immature Sertoli cell. This indicates the involvement of PKC in 1,25D₃ nongenomic modulation of calcium currents, and agrees with results obtained in other tissues [47,48]. Also, consistent with these findings, the results of our previous report [13], evidenced differential mechanism of action to 1,25D₃ targeting the amino acid accumulation, supporting that 1,25D₃ can nongenomically alters distinct signal-transducing pathways.

It has been described that the conformationally flexible 1,25D₃ can interact with the VDR localized in the cell nucleus to generate genomic responses or in caveolae of the plasma membrane to generate rapid responses [49,50]. Binding of 1,25D₃ to the caveolae-associated VDR may result in the activation of one or more second messenger systems, including PKC, G protein-coupled receptors, or phosphatidylinositol-3-kinase (PI-3K). There are a number of possible outcomes including opening of cells voltage-gated calcium or chloride channels or generation of second messengers. Some of these second messengers, particularly RAF/MAPK, may be involved in cross-talk with the nucleus to modulate gene expression [51]. We found that in the presence of LY

294002, an inhibitor of PI-3K, the stimulatory effect of 1,25D₃ on Ca⁺² influx was attenuated and a significant inhibition of Ca⁺² influx was detected when PD 98059, a blocker of MAPK cascade was co-incubated with 1,25D₃. This is in agreement with some reports showing the partial involvement of PI3-K and MEK (ERK1/2) on rapid signal transduction of 1,25D₃ in intestine [51], vascular smooth muscle [52], NB4 cells and osteoblasts [53,51].

Several studies suggest that steroid hormones and related compounds can activate members of the mitogen-activated protein kinases (MAPKs), including ERK1/2 and p38 MAPK in different rapid responses linked or not to nuclear activation [2]. Pardo et al., [6], reported that p38 MAPK stimulation by 1,25D₃ involves Ca⁺², c-Src and PKA as upstream regulators to c-Fos induction in intestinal cells. Also, p38 MAPK family has been involved in classic genomic events in HL60 and THP-1 cell lines [54].

We demonstrated that SB 239063, a potent inhibitor of p38 MAPK, blocked the stimulatory effect of 1,25D₃ on Ca⁺² influx. In this context, the present results provide strong evidence that Ca⁺² and PKC are upstream modulators of ERK1/2 in the activation of p38 MAPK by 1,25D₃ in Sertoli cells.

In agreement with our results, extracellular Ca⁺² has been shown to modulate p38 MAPK and CREB [55,44,56]. Furthermore, it has also been reported that depending of the stimulus and of the cell type, p38 activation has been shown to be dependent [57,58], or independent of PKC [59,6]. Taking together these results indicate that more than one signal contributes to the 1,25D₃ mechanism of action, depending on the tissue.

p38 MAPK downstream effectors consist in a cascade of kinases and transcription factors [44,60]. In the testis, we previously demonstrated that the plasma membrane effect of 1,25D₃ is mediated by extracellular Ca⁺² and PKA [13]. In this study we found that PKC, p38 MAPK and to a lesser extend PI3-K are stimulated by 1,25D₃ to generate a rapid response of Sertoli cells connecting plasma membrane effect with genomic activity and supporting a role for PKC in the upstream activity to ERK1/2 and p38 MAPK activation.

In order to verify the contribution of microtubules assembly in Sertoli cell in the stimulatory effect of 1,25D₃ on ⁴⁵Ca⁺² influx, we co-incubated the hormone with a microtubules disruptor, colchicine. The stimulatory effect of 1,25D₃ on ⁴⁵Ca⁺² influx was significantly diminished with microtubules disassemble. These results show that microtubules network has a significant contribution on intracellular

substances or vesicles traffic on Sertoli cells as already demonstrated to plasma membrane amino acid transport in immature rat testis, in the presence of colchicine [23]. Also, in this Fig. 7, we compared the effect of a specific blocker of CIC-3 in the stimulatory effect of 1,25D₃ on ⁴⁵Ca²⁺ influx demonstrated in the Fig. 4A and 4B, with the colchicine effect. Both drugs were able to diminish the stimulatory effect of 1,25D₃ on ⁴⁵Ca²⁺ influx suggesting the calcium contribution on intracellular vesicles trafficking in Sertoli cells. The involvement of chloride channels activities in bone material secretion has been reported [1,5]. Cytosolic Cl⁻ ions enhance Ca²⁺-dependent exocytosis in melanotrophs [61]. In addition, CIC-3 channel, which is known to be involved in exocytosis, is present at the membrane of secretory vesicles. Taking in account these findings, studies are underway to clarify the involvement of calcium influx and the activation of CIC-3 channels to mediate a rapid response of Sertoli cells to secretory activities regulated by 1,25D₃.

In conclusion, our data support our working hypothesis schematized in Fig. 8. 1,25D₃ interaction with the Sertoli cell plasma membrane open K⁺_{ATP}, K⁺_{Ca+2} and Cl⁻ channels “hyperpolarizing” the cells. This hyperpolarization induces an opening of voltage-dependent Ca⁺² channels, Ca⁺² influx and “depolarization”. The local Ca⁺² transient activates protein kinase C that may regulate plasma membrane ionic channels activities (Ca⁺² and/or Ca⁺²-dependent Cl⁻ channels). Also, PKC has a central role as upstream regulator of MEK and ERK½ to p38 MAPK activation. p38 MAPK can modulate cellular responses through the activation of phosphorylation of other kinases, cytoplasmic and membrane proteins and/or activation of specific transcription factors altering nuclear activity. Concomitantly, a specific signal transduced from the receptor to PI3-K that links Ca²⁺ influx to microtubules movement and CIC3 activity can produce some of the effects commonly associated with local Ca⁺² increase, as for example, secretory activity.

Acknowledgements

This work was supported by grants from CAPES-COFECUB N° 554/07, CNPq-Brasil and FAPESC-SC. AR is registered on the Biochemistry Postgraduate Program of the Federal University of Santa Catarina.

References

- [1] L.P. Zanello, A.W. Norman, Multiple molecular mechanisms of 1,25(OH)₂-vitamin D₃ rapid modulation, *Bone* 33 (2003) 71–79.
- [2] A.W. Norman, M.T. Mizwicki, D.P.G. Norman, Steroid hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model, *Nat Rev Drug Discov.* 3 (2004) 27–41.
- [3] D.J. Mangelsdorf, C. Thummel, M. Beato, et al., The nuclear receptor superfamily: the second decade, *Cell* 83 (1995) 835–839.
- [4] I. Nemere, Y. Yoshimoto, A.W. Norman, Calcium transport in perfused duodena from normal chicks: enhancement within 14 minutes of exposure to 1,25-dihydroxyvitamin D₃, *Endocrinology* 115 (1984) 1476–1483.
- [5] Z. Xiaoyu, B. Payal, O. Melissa, L.P. Zanello, 1,25(OH)₂-vitamin D₃ membrane-initiated calcium signaling modulates exocytosis and cell survival, *J Steroid Biochem Mol Biol.* 103 (2007) 457–461.
- [6] V.G. Pardo, R. Boland, A.R. de Boland, 1, 25(OH)₂-vitamin D₃ stimulates intestinal cell p38 MAPK activity and increases c-Fos expression, *Intern J Biochem Cell Biol.* 38 (2006) 1181–1190.
- [7] B.C. Osmunden, H.F.S. Huang, M.B. Anderson, S. Christakos, M.R. Walters, Multiple sites of action of the vitamin D endocrine system: FSH stimulation of testis, 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ receptors, *J Steroid Biochem.* 34 (1989) 339–343.
- [8] T. Hirai, T. Tsujimura, T. Ueda, et al., Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D on testicular morphology and gene expression in experimental cryptorchid mouse: testis specific cDNA microarray analysis and potential implication in male infertility, *J Urol.* 181 (2009) 1487–1492.
- [9] Y. Yoshimoto, I. Nemere, A.W. Norman, Hypercalcemia inhibits the “rapid” stimulatory effect on calcium transport in perfused duodena from normal chicks mediated by 1,25-dihydroxyvitamin D, *Endocrinology* 118 (1986) 2300–2304.
- [10] J.A. Johnson, J.P. Grande, P.C. Roche, R. Kumar, Immunohistochemical detection and distribution of the 1,25-

dihydroxyvitamin D₃ receptor in rat reproductive tissues, *Histochem Cell Biol.* 105 (1996) 7-15.

[11] G. Scheicher, T.H. Provette, W.E. Stumpf, Distribution of soltrioI [1, 25(OH)₂-vitamin D₃] binding sites in male sex organs of the mouse: an autoradiographic study, *J Histochem Cytochem.* 37 (1989) 1083-1086.

[12] V.L. Akerstrom, M.R. Walters, Physiological effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in TM4 Sertoli cell line, *Am J Physiol.* 262 (1992) (Endocrinol. Met. 25) E884-E890.

[13] D. Menegaz, A. Rosso, C. Royer, L.D. Leite, A.R.S. Santos, F.R.M.B. Silva, Role of 1,25(OH)₂ vitamin D₃ on alpha-[1-¹⁴C]MeAIB accumulation in immature rat testis. *Steroids* 74 (2009) 264-269.

[14] J.H. Dorrington, N.F. Roller, I.B. Fritz, Effects of follicle-stimulating hormone on cultures of Sertoli cell preparations, *Mol Cell Endocrinol.* 3 (1975) 57-70.

[15] M. Galdieri, E. Ziparo, F. Palombi, M. Russo, M. Stefanini, Pure Sertoli cell cultures: a new model for the study of somatic-germ cell interactions, *J Androl.* 5 (1981) 249-254.

[16] A. Zamoner, C. Royer, K.P. Barreto, R. Pessoa-Pureur, F.R.M.B. Silva, Ionic involvement and kinase activity on the mechanism of nongenomic action of thyroid hormones on ⁴⁵Ca²⁺ uptake in cerebral cortex from young rats, *Neurosci Res.* 57 (2007) 98-103.

[17] D. Menegaz, A. Zamoner, C. Royer, L.D. Leite, Z.A. Bortolotto, F.R.M.B. Silva, Rapid responses to thyroxine in the testis: active protein synthesis-independent pathway, *Mol Cell Endocrinol.* 246 (2006) 128-134.

[18] S. Batra, C. Sjögren, Effect of estrogen treatment on calcium uptake by the rat uterine smooth muscle, *Life Sci.* 32 (1983) 315-319.

[19] M.M. Bradford, A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Anal Biochem.* 72 (1976) 248-254.

[20] S.H. Kim, K.W. Cho, S.H. Chang, S.Z. Kim, S.W. Chae, Glibenclamide suppresses stretch-activated ANP secretion. Involvement of KATP + channels and L-type Ca^{2+} channel modulation, *Pflügers Arch.* 434 (1997) 362–372.

[21] N. Lalevéé, M. Joffre, Inhibition by cAMP of calcium-activated chloride currents in cultured Sertoli cells from immature testis, *J Membr Biol* 169 (1999) 167–174.

[22] D.C. Underwood, R.R. Osborn, C.J. Kotzer, et al., SB 239063, a potent p38 MAP kinase inhibitor, reduces inflammatory cytokine production, airways eosinophil infiltration, and persistence, *J Pharmacol Exp Ther.* 293 (2000) 281–288.

[23] G.F. Wassermann, L.M. Bloch, M.L. Grillo, F.R.M.B. Silva, E.S. Loss, L.L. McConnell, Biochemical factors involved in the FSH action on amino acid transport in immature rat testes, *Horm Met Res.* 24 (1992) 276-279.

[24] J. Merke, U. Hugel, E. Ritz, Nuclear testicular 1,25-dihydroxyvitamin D_3 receptors in Sertoli cells and seminiferous tubules of adult rodents, *Biochem Biophys Res Commun.* 127 (1985) 303-309.

[25] G.F. Wassermann, E.S. Loss, S.W. Wechsler, Retinol stimulates $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in Sertoli cells through a verapamil-sensitive voltage-dependent-channel, *Med Sci Res.* 23 (1995) 633-634.

[26] E. Loss, K.P. Barreto, L.D. Leite, G.F. Wassermann, Comparative study of the actions of isoproterenol and retinol in the amino acid accumulation, $^{45}\text{Ca}^{++}$ uptake, and membrane potential in Sertoli cells, *Med Sci Res.* 26 (1998) 195-199.

[27] L.D. Leite, R. Luchi, E.I.C.F. von Ledebur, E.S. Loss, G.F. Wassermann, Testosterone induces immediate membrane depolarization and stimulates $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in Sertoli cells from rats of different maturation stages, *Med Sci Res.* 27 (1999) 25-58.

[28] M. J. Berridge, M. D. Bootman, H. L. Roderick, Calcium signaling: dynamics, homeostasis and remodelling, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4 (2003) 517-529.

- [29] T.J. Rink, T.J. Hallam, Calcium signalling in non-excitable cells: notes on oscillations and store refilling, *Cell Calcium* 10 (1989) 385-395.
- [30] E. Neher, G.J. Augustine, Calcium gradients and buffers in bovine chromaffin cells, *J Physiol.* 450 (1992) 273-301.
- [31] D.D. Friel, H.J. Chiel, Calcium dynamics: analyzing the Ca^{2+} regulatory network in intact cells, *Trends Neurosci* 31 (2009) 8-19.
- [32] F.R.M.B. Silva, L.D. Leite, G.F. Wassermann, Rapid signal transduction in Sertoli cells, *Eur J Endocrinol.* 147 (2002) 425-433.
- [33] A.D. Wickenden, K^+ channels as therapeutic drug targets, *Pharmacol Ther.* 5484 (2002) 1-26.
- [34] F.R.M.B. Silva, L.D. Leite, K.P. Barreto, C. D'Agostini, A. Zamoner, Effect of 3,5,3'-Triiodo-L-thyronine on amino acid accumulation and membrane potential in Sertoli cells, *Life Sci.* 69 (2001) 977-986.
- [35] K. C. Volpato, D. Menegaz, L.D. Leite, K.P. Barreto, E.V. Garcia, F.R.M.B. Silva, Involvement of K^+ -channels and calcium-dependent pathways in the action of T_3 on amino acid accumulation and membrane potential in Sertoli cells of immature rat testis, *Life Sci.* 74 (2004) 1277-1288.
- [36] P. Sartor, L. Dufy-Barbe, J.B. Corcuff, A. Taupignon, B. Dufy, Electrophysiological response to thyrotropin-releasing hormone of rat lactotrophs in primary culture, *Am J Physiol.* 258E (1990) 311-319.
- [37] E.I.C.F. van Ledebur, J.P. Almeida, E.S. Loss, G.F. Wassermann, Rapid effect of testosterone on rat Sertoli cell membrane potential. Relationship with KATP^+ channels, *Horm Metab Res* 34 (2002) 550-555.
- [38] C. Auzanneau, C. Norez, F. Antigny, et al., Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channels in cultured rat Sertoli cells regulate an acid sensing chloride, *Biochem Pharmacol.* 75 (2008) 476-483.
- [39] C. Auzanneau, V. Thoureau, A. Kitzis, F. Becq, A Novel voltage-dependent chloride current activated by extracellular acidic pH in cultured rat Sertoli cells, *J Biol Chem.* 278 (2003) 19230-19236.

[40] F. R. Boockfor, R. A. Morris, D. C. DeSimone, D. M. Hunt, K. B. Walsh, Sertoli cell expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, *Am J Physiol.* 274 (1998) C-922-C930.

[41] C. Auzanneau, C. Norez, S. Noël, C. Jouglu, F. Becq, C. Vandebrouck, Pharmacological profile of inhibition of the chloride channels activated by extracellular acid in cultured rat Sertoli cells, *Reprod Nutr Dev.* 46 (2006) 241-255.

[42] T.J. Jentsch, V. Stein, F. Weinreich, A. Anselm, Molecular structure and physiological function of chloride channels, *Physiol Rev.* 82 (2002) 503-568.

[43] Z. Qu, R.W. Wei, H.C. Hartzell, Characterization of Ca²⁺-activated Cl⁻ currents in mouse kidney inner medullary collecting duct cells, *Am J Physiol.* 285 (2003) F326–F335.

[44] T.W. Wu, J.M. Wang, S. Chen, R.D. Brinton, 17 bet-estradiol induced Ca²⁺ influx via L-type calcium channels activates the SRC/ERK/cyclic-AMP response element binding protein signal pathway and BCL-2 expression in rat hippocampal neurons: a potential initiation mechanism for estrogen-induced neuroprotection, *Neuroscience* 135 (2005) 59-72.

[45] H. Bouraïma, M. Vanneste, C. Delalande, L. Zanatta, S. Wolczynski, S. Carreau, Aromatase gene expression in immature rat Sertoli cells: age-related changes in the FSH signaling pathway, *Reprod Fertil Dev.* 22 (2010). In press.

[46] V. Masseheimer, A.R. Boland, Modulation of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ -dependent Ca²⁺ uptake in skeletal muscle by protein kinase C, *Biochem J.* 281 (1992) 349-352.

[47] M. Bissonnette, X-Y. Tien, S.M. Niedziela, et al., 1,25(OH)₂ vitamin D₃ activates PKC-α in Caco-2 cells: A mechanism to limit secosteroid-induced rise in [Ca²⁺]_i, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 267 (1994) G465–G475.

[48] S.J. Slater, M.B. Kelly, F.J. Taddeo, et al., Direct activation of protein kinase C by 1,25-dihydroxyvitamin D₃, *J Biol Chem.* 270 (1995) 6639–6643.

- [49] A.W. Norman, J.E. Bishop, C.M. Bula, et al., Molecular tools for study of genomic and rapid signal transduction responses initiated by 1,25(OH)₂-vitamin D₃, *Steroids* 67 (2002a) 457–466.
- [50] A.W. Norman, C.J. Olivera, F.R. Barreto Silva, J.E. Bishop, A specific binding protein/receptor for 1,25-dihydroxy D₃ is present in an intestinal caveolae membrane fraction, *Biochem Biophys Res Commun.* 298 (2002b) 414–419.
- [51] A.W. Norman, Minireview: Vitamin D Receptor: New assignments for an already busy receptor, *Endocrinology* 147 (2006) 5542–5548.
- [52] M.C. Rebsamen, J. Sun, A.W. Norman, J.K. Liao, 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ induces vascular smooth muscle cell migration via activation of phosphatidylinositol 3-kinase, *Circ Res* 91 (2002) 17–24.
- [53] A.M. Vertino, C.M. Bula, J.-R. Chen, et al., Nongenotropic, antiapoptotic signaling of 1 α ,25(OH)₂-vitaminD₃ and analogs through the ligand binding domain of the vitamin D receptor in osteoblasts and osteocytes. Mediation by Src, phosphatidylinositol 3-, and JNKkinases, *J Biol Chem.* 280 (2005) 14130–14137.
- [54] E. Goceka, M. Kielbinskib, E. Marcinkowskaa, Activation of intracellular signaling pathways is necessary for an increase in VDR expression and its nuclear translocation, *FEBS Lett.* 581 (2007) 1751–1757.
- [55] Y. Sakai, H. Hashimoto, N. Shintani, et al., Involvement of intracellular Ca²⁺ elevation but not cyclic AMP in PACAP-induced p38 MAP kinase activation in PC12cells, *Regul Pept.* 109 (2002) 149–153.
- [56] A. Blanc, N.R. Pandey, A.K. Srivastava, Distinct roles of Ca²⁺, calmodulin, and protein kinaseCinH₂O₂-induced activation of ERK1/2, p38 MAPK, and protein kinase B signaling in vascular smooth muscle cells, *Antioxid Redox Signal.* 6 (2004) 353–366.
- [57] M. Hofmann, J. Zaper, A. Bernd, J. Bereiter-Hahn, R. Kaufmann, S. Kippenberger, Mechanical pressure-induced phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase in epithelial cells via Src and protein kinase C, *Biochem Biophys Res Comm.* 316 (2004) 673–679.

[58] T. Togo, T., Long-term potentiation of wound-induced exocytosis and plasma membrane repair is dependent on cAMP-response element-mediated transcription via a protein kinase C- and p38 MAPK-dependent pathway, *J Biol Chem*; 279 (2004) 4996–5003.

[59] J. Lemonnier, C. Ghayor, J. Guicheux, J. Caverzasio, Protein kinase C-independent activation of protein kinaseDis involved in BMP-2-induced activation of stress mitogen-activated protein kinases JNK and p38 and osteoblastic cell differentiation. *J Biol Chem*. 279 (2004) 259–264.

[60] E. Vicini, M. Loiarro, S. Di Agostino, et al., 17-beta-estradiol elicits genomic and non-genomic responses in mouse male germ cells, *J. Cell Physiol*. 206 (2006) 238-245.

[61] J.E. Turner, S. Sedej, M. Rupnik, Cytosolic Cl⁻ ions in the regulation of secretory and endocytotic activity in melanotrophs from mouse pituitary tissue slices, *J Physiol*. 566 (2005) 443-453.

[62] A. Norman. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *Am J Clin Nutr*. 88 (2008) 491S-499S.

Legends

Figure 1. Basal $^{45}\text{Ca}^{+2}$ influx in Sertoli cells (A) and testis (B). Pre- incubation time: 60 min in the presence of $^{45}\text{Ca}^{+2}$ 0.1 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$. After that the groups were incubated for an additional time 30, 60, 150, 300 and 600 s, in the same solution. Dose-response curve of 1,25D₃ on $^{45}\text{Ca}^{+2}$ influx in Sertoli cells (C) and testis (D). Pre-incubation: 60 min. After that Sertoli cells or testis were incubated with or without different concentration of 1,25D₃ for 60 s in the presence of $^{45}\text{Ca}^{+2}$ 0.1 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$. Values are means \pm S.E.M for three independent experiments carried out in quadruplicate. $***P < 0.001$, $**p < 0.01$ and $*p < 0.05$ compared with control group.

Figure 2. Involvement of voltage-dependent calcium channels (T and L types) on the stimulatory effect of 1,25D₃ on $^{45}\text{Ca}^{+2}$ influx in Sertoli cells (A) and testis (B). Pre- incubation time: 60 min in the presence of $^{45}\text{Ca}^{+2}$ 0.1 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$. Drugs were added 25 minutes before the incubation time. Incubation: 60 s in the presence of 1,25D₃ and $^{45}\text{Ca}^{+2}$ 0.1 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$. Values are means \pm S.E.M for three independent experiments carried out in quadruplicate. $***P < 0.001$ and $**p < 0.01$ compared with control group; $\# p < 0.05$, $##p < 0.01$ and $###p < 0.001$ compared with 1,25D₃ group.

Figure 3. Involvement of potassium channels on the stimulatory effect of 1,25D₃ on $^{45}\text{Ca}^{+2}$ influx in Sertoli cells (A) and testis (B). Pre- incubation time: 60 min in the presence of $^{45}\text{Ca}^{+2}$ 0.1 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$. Drugs were added 25 minutes before the incubation time. Incubation: 60 s in the presence of 1,25D₃ and $^{45}\text{Ca}^{+2}$ 0.1 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$. Values are means \pm S.E.M for three independent experiments carried out in quadruplicate. $***P < 0.001$ and $**P < 0.01$ compared with control group; $\# p < 0.05$ and $###p < 0.001$ compared with 1,25D₃ group.

Figure 4. Involvement of chloride channels on the stimulatory effect of 1,25D₃ on $^{45}\text{Ca}^{+2}$ influx in Sertoli cells (A) and testis (B). Pre- incubation time: 60 min in the presence of $^{45}\text{Ca}^{+2}$ 0.1

$\mu\text{Ci/mL}$. Drugs were added 25 minutes before the incubation time. Incubation: 60 s in the presence of $1,25\text{D}_3$ and $^{45}\text{Ca}^{+2}$ 0.1 $\mu\text{Ci/mL}$. Values are means \pm S.E.M for three independent experiments carried out in quadruplicate. *** $P < 0.001$, ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$ compared with control group; # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ compared with $1,25\text{D}_3$ group.

Figure 5. Involvement of PKC (A) and PKA (B) on the stimulatory effect of $1,25\text{D}_3$ on $^{45}\text{Ca}^{+2}$ influx in Sertoli cells. Pre-incubation time: 60 min in the presence of $^{45}\text{Ca}^{+2}$ 0.1 $\mu\text{Ci/mL}$. Drugs were added 25 minutes before the incubation time. Incubation: 60 s in the presence of $1,25\text{D}_3$ and $^{45}\text{Ca}^{+2}$ 0.1 $\mu\text{Ci/mL}$. Values are means \pm S.E.M for three independent experiments carried out in quadruplicate. *** $P < 0.001$ compared with control group; ### $p < 0.001$ compared with $1,25\text{D}_3$ group.

Figure 6. Involvement of PI3K (A), MAPK (B) and p38 MAPK(C) on the stimulatory effect of $1,25\text{D}_3$ on $^{45}\text{Ca}^{+2}$ influx in Sertoli cells. Pre-incubation time: 60 min in the presence of $^{45}\text{Ca}^{+2}$ 0.1 $\mu\text{Ci/mL}$. Drugs were added 25 minutes before the incubation time. Incubation: 60 s in the presence of $1,25\text{D}_3$ and $^{45}\text{Ca}^{+2}$ 0.1 $\mu\text{Ci/mL}$. Values are means \pm S.E.M for three independent experiments carried out in quadruplicate.*** $P < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared with control group; ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$ compared with $1,25\text{D}_3$ group.

Figure 7. Effect of microtubules integrity and CLC3 channel activity on the stimulatory effect of $1,25\text{D}_3$ on $^{45}\text{Ca}^{+2}$ influx in Sertoli cells. Pre- incubation time: 60 min in the presence of $^{45}\text{Ca}^{+2}$ 0.1 $\mu\text{Ci/mL}$. Drugs were added 25 minutes before the incubation time. Incubation: 60 s in the presence of $1,25\text{D}_3$ and $^{45}\text{Ca}^{+2}$ 0.1 $\mu\text{Ci/mL}$. Values are means \pm S.E.M for three independent experiments carried out in quadruplicate.*** $P < 0.001$ and * $p < 0.05$ compared with control group; # $p < 0.05$ compared with $1,25\text{D}_3$ group.

Fig. 8. Schematic representation of the possible mechanisms of action of 1,25D₃ on ⁴⁵Ca⁺² influx on plasma membrane of Sertoli cells. 1,25D₃ interaction with the Sertoli cell plasma membrane open K⁺_{ATP}, K⁺_{Ca+2} and Cl⁻ channels “hyperpolarizing” the cells. This hyperpolarization induces an opening of voltage-dependent Ca⁺² channels, Ca⁺² influx and “depolarization”. The local Ca⁺² transient activates protein kinase C that may regulates plasma membrane ionic channels activities (Ca⁺² and/or Ca⁺²-dependent Cl⁻ channels). Also, PKC has a central role as upstream regulator of MEK and ERK½ to p38 MAPK activation. p38 MAPK can modulate cellular responses through the phosphorylation of other kinases, cytoplasmic and membrane proteins and transcription factors. Concomitantly, a specific signal transduced from the receptor to PI3-K that links Ca²⁺ influx to microtubules movement and CIC3 activity can produce some of the effects commonly associated with local Ca⁺² increase, as for example, secretory activity.

Figure 1

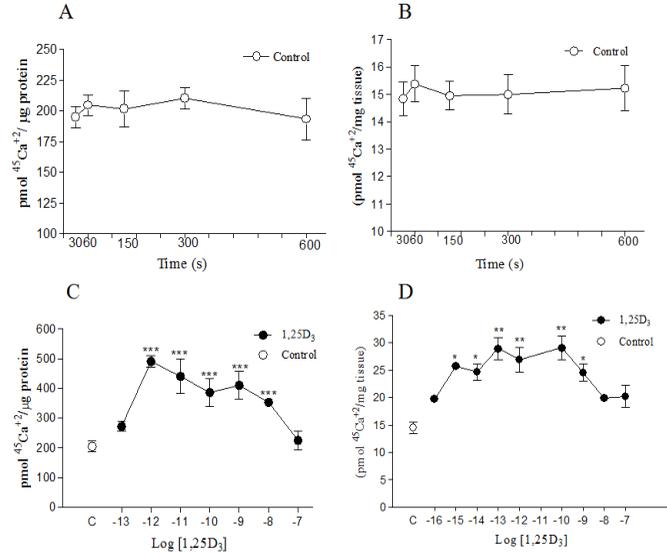


Figure 2

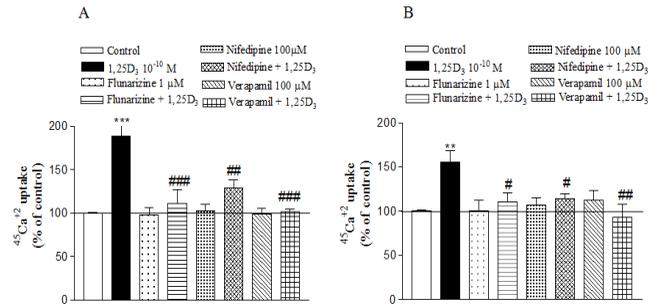


Figure 3

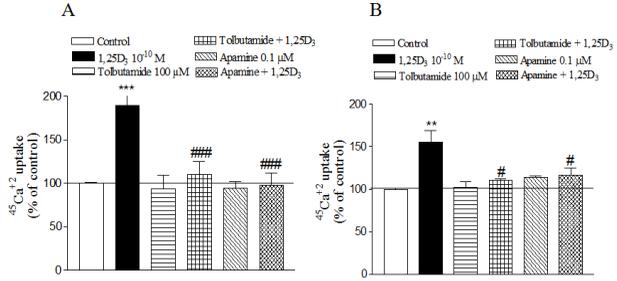


Figure 4

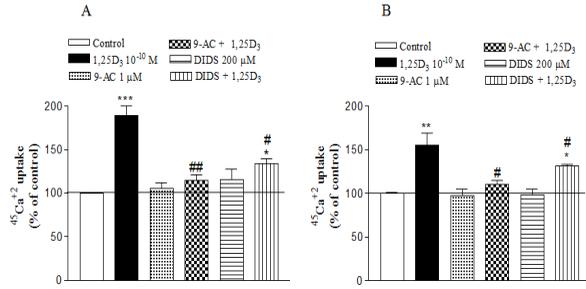


Figure 5

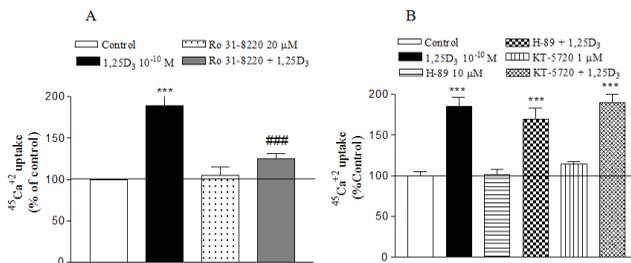


Figure 6

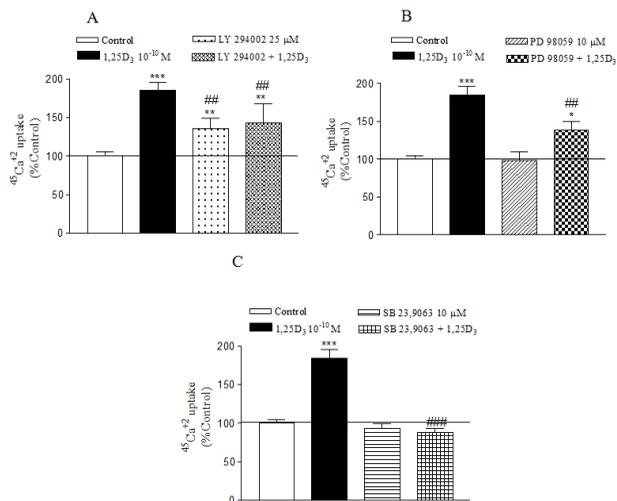


Figure 7

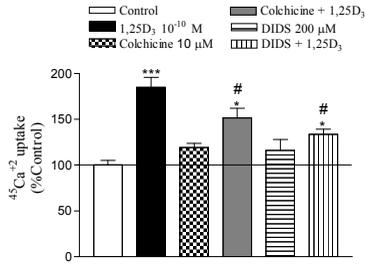
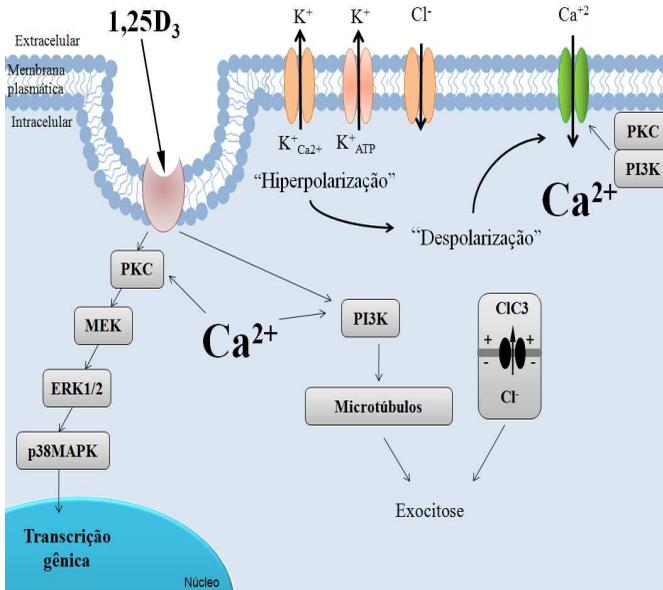


Figure 8



6. DISCUSSÃO

A presença de receptores específicos da $1,25D_3$ no núcleo das células de Sertoli e em várias células dos túbulos seminíferos (MERK et al., 1985), assim como a presença da enzima 1α -hidroxilase nos testículos (HIRAI et al., 2009) evidenciam os testículos como órgão alvo da ação da $1,25D_3$ (Schleicher et al., 1989).

No presente trabalho, em ratos de 10 dias de idade, foi verificado que, quando os testículos e as células de Sertoli foram incubadas com a $1,25D_3$, ocorre um aumento na concentração citosólica de Ca^{+2} .

Na concentração de 10^{-10} M, dose relatada na literatura como dentro da faixa fisiológica do hormônio, o efeito estimulatório da $1,25D_3$ foi em torno de 90% no testículo inteiro e 110% em células de Sertoli, demonstrando uma relação de efeito entre ambos sistemas estudados. Além disso, aumento temporal de Ca^{+2} citosólico deu-se dentro de um curto espaço de tempo e não compatível com o clássico período descrito para ações hormonais mediadas por receptores nucleares. Estes resultados confirmam o efeito da $1,25D_3$ na membrana plasmática e uma resposta rápida das células de Sertoli e testículo. Nossos resultados estão de acordo com os descritos por Akerstrom e Walters (1992), que demonstraram que a $1,25D_3$ induziu, em células TM4, uma rápida captação de $^{45}Ca^{+2}$, em cinco minutos e dependente da dose. Também, vale salientar que a taxa do influxo de $^{45}Ca^{+2}$ foi semelhante ao relatado para o efeito estimulatório do retinol (WASSERMANN et al., 1995) no influxo de $^{45}Ca^{+2}$ em células de Sertoli, bem como, ao relatado para a testosterona em testículos inteiros e/ou em células de Sertoli (LOSS et al. 1998; LEITE et al., 1999).

O íon cálcio (Ca^{+2}) pode ter influência tanto na membrana plasmática, através da modulação da atividade de canais iônicos, assim como no citosol, onde atua como um intermediário químico que liga muitos estímulos fisiológicos a efetores intracelulares (BERRIDGE et al., 2003). Em geral, a $[Ca^{+2}]$ é estreitamente regulada por múltiplos canais Ca^{+2} , bombas, trocadores e tampões. O influxo de Ca^{+2} pode ser regulado, no mínimo, por três mecanismos: canais de Ca^{+2} dependentes da voltagem (CCDV), canais mediados por segundos mensageiros e/ou canais mediados pelo receptor (RINK e HALLAM, 1989; NEHER e AUGUSTINE, 1992; FRIEL e CHIEL, 2009).

Considerando resultados anteriores que demonstraram ações não genômicas da $1,25D_3$, em testículos de ratos imaturos dependem do Ca^{+2} extracelular (MENEGAZ et al., 2009), e, afim de avaliar a participação dos CCDV no processo de entrada do íon nas células e testículos, analisamos o mecanismo do influxo de Ca^{+2} , mediado por canais de CCDV do tipo L e do tipo T, já descritos na membrana plasmática de células de Sertoli e em testículos de ratos (SILVA et al., 2002) De fato, nossos resultados demonstraram que as células de Sertoli e os testículos inteiros tratados com antagonistas dos canais de Ca^{+2} dependentes da voltagem do tipo L (nifedipina e verapami) e tipo T (flunarizina), provocaram um bloqueio efetivo no influxo de $^{45}Ca^{+2}$ ativados por $1,25D_3$. Disto, concluímos que a entrada maciça de Ca^{+2} quando as células de Sertoli são tratadas com o hormônio dá-se predominantemente via CCDV do tipo L e T. Estes resultados estão de acordo com achados anteriores que relatam estes canais como a principal via de entrada do Ca^{+2} nas células quando estas são submetidas a estímulo (CATERALL et al., 2000; CLAPHAM, 2007). Ainda, eles corroboram a importância do Ca^{+2} extracelular para ações da $1,25D_3$ na membrana plasmática (MENEGAZ et al., 2009).

Os canais de K^+ compõem uma família de proteínas de membrana que tem um papel crucial em uma variedade de processos fisiológicos, incluindo transporte de eletrólitos e regulação do volume celular. Também coordenam a atividade de outros canais iônicos, de transportadores de membrana e são essenciais para a secreção de fluidos. Além disso, os canais de K^+ têm um papel essencial na manutenção do gradiente eletroquímico que regula a entrada de Ca^{+2} (WICKENDEN, 2002).

A participação dos canais de K^+ dependentes de ATP e de canais de K^+ dependentes de Ca^{+2} em estudos envolvendo eventos na membrana plasmática e respostas não genômicas aos hormônios tireoideos, bem como, a $1,25D_3$ em testículos de ratos imaturos foi demonstrada previamente (SILVA et al., 2001; VOLPATO et al., 2004; MENEGAZ et al., 2006; MENEGAZ, 2009).No presente trabalho, a integridade funcional das correntes de K^+ foi essencial para o efeito do hormônio uma vez que o bloqueio dos canais de K^+ pela tolbutamida e apamina inibiu a ação estimulatória da $1,25D_3$ no influxo de Ca^{+2} . O bloqueio do influxo de $^{45}Ca^{+2}$ quando os canais de K^+ dependentes de Ca^{+2} de baixa condutância foram bloqueados pela apamina, demonstrou que a atividade destes canais, ativados por

baixas concentrações intracelular de Ca^{+2} e envolvidos no processo de hiperpolarização celular, é essencial para a abertura dos CCDV. Além disso, vários relatos corroboram o papel dos canais de K^{+} e o influxo de Ca^{+2} associado com a regulação de secreção celular (SARTOR et al., 1990; KIMSH et al., 1997). Resultados semelhantes foram observados em células de Sertoli de testículos de ratos imaturos quando incubados com testosterona (van LEDEBUR et al., 2002). Uma despolarização imediata provocada pela testosterona foi bloqueada por diazoxide, um agonista de canais de K^{+} dependentes de ATP, e totalmente inibiu a ação da testosterona. Assim, o fechamento dos canais de K^{+} dependentes de ATP causou um efeito despolarizante, conseqüentemente, abrindo os canais de Ca^{+2} dependentes da voltagem (tipo L) e, permitindo o influxo de Ca^{+2} (van LEDEBUR et al., 2002). Estes resultados indicam que o influxo de Ca^{+2} está associado a outros canais iônicos na membrana plasmática e são essenciais para o máximo efeito estimulatório da $1,25\text{D}_3$ no influxo de Ca^{+2} em células de Sertoli purificadas e em testículos inteiros.

As células de Sertoli são células chaves envolvidas no desenvolvimento e na manutenção da espermatogênese, bem como, na secreção de um fluido rico em Cl^{-} e K^{+} para o lúmen dos túbulos seminíferos (AUZANNEAU et al., 2008). Elas expressam uma variedade de canais de Cl^{-} , incluindo canais de Cl^{-} dependentes de Ca^{+2} (LALEVÉE e JOFFRE, 1999), canais de Cl^{-} dependentes da voltagem (AUZANNEAU et al., 2003), canais de Cl^{-} reguladores da condutância transmembrana da fibrose cística (CFTR) (BROOCKFOR et al., 1998), e canais de Cl^{-} sensíveis a ácidos (ASCC) (AUZANNEAU et al., 2006; 2008). Sabe-se ainda, que o íon Cl^{-} tem a capacidade de modular a atividade dos CCDV presentes na membrana plasmática, sendo que a ocorrência deste evento já foi relatada em testículo de ratos (LALEVÉE e JOFFRE, 1999). Neste contexto, o 9-AC, um composto aromático é utilizado como uma sonda aniônica para estudar as correntes de Cl^{-} ativadas por Ca^{+2} bem como o DIDS, que bloqueia os canais CIC-3 que conduz as correntes retificadoras do efluxo de Cl^{-} (JENTSCH et al., 2002; QU et al., 2003), foram usados para estudar a influência destes tipos de correntes iônicas no efeito estimulatório da $1,25\text{D}_3$ no influxo de Ca^{+2} . O bloqueio total do efeito do hormônio no influxo de Ca^{+2} , pelo 9-AC, sugere o papel modulatório das correntes de Cl^{-} no influxo de Ca^{+2} em células de Sertoli purificadas e em testículos inteiros. Entretanto, embora membros da família dos canais de Cl^{-} abertos pela voltagem, CIC-2, CIC-3, CIC-6 a CIC-7, tenham sido

previamente descritos como proteínas que são expressadas em células de Sertoli em cultura (AUZANNEAU et al., 2003), estas, parecem não ser as principais correntes de Cl^- que modulam o influxo de Ca^{+2} nas células de Sertoli e no testículo de ratos de 10 dias de idade, a condições experimentais estudadas.

Levando em conta a identificação prévia de receptores para a $1,25\text{D}_3$ nas células de Sertoli e da similaridade de comportamento no influxo de $^{45}\text{Ca}^{+2}$ exibida pelas células de Sertoli e testículo quando canais de K^+ e Cl^- foram bloqueados, a idéia das células de Sertoli como alvo da ação da $1,25\text{D}_3$ nos testículos é reforçada. Sendo assim, o estudo da participação de proteínas cinases na entrada de $^{45}\text{Ca}^{+2}$ estimulada pela $1,25\text{D}_3$ foi estudada apenas nas células de Sertoli.

Neste trabalho foram investigados os eventos de sinalização que medeiam o efeito da $1,25\text{D}_3$ no influxo de Ca^{+2} tendo em mente o papel da PKC e da PKA já descritos anteriormente. Estas cinases medeiam sinais extracelulares através da regulação da atividade de canais iônicos, por fosforilação, ou atuando como proteínas que integram (*cross-talk*) as diferentes vias de sinalização intracelular, podendo levar um sinal que iniciou na membrana plasmática, até o núcleo celular (WU et al., 2005; PARDO et al., 2006; MENEGAZ et al., 2009; BOURAÍMA et al., 2010).

Está descrito na literatura que a ativação da PKC pela $1,25\text{D}_3$ pode causar uma ativação da PKA via um mecanismo de integração celular, ativando a produção de AMPc e modulando a captação de Ca^{+2} estimulada por $1,25\text{D}_3$ (MASSEHEIMER e BOLAND, 1992). No presente estudo, demonstramos que a presença de um bloqueador de PKC, aboliu o efeito estimulatório da $1,25\text{D}_3$ no influxo de Ca^{+2} , enquanto inibidores da atividade da PKA não produziram qualquer alteração na ação estimulatória do hormônio, isentando uma participação expressiva da PKA na ação da $1,25\text{D}_3$ no influxo de Ca^{+2} em células de Sertoli de ratos imaturos. Isto indica o envolvimento da PKC na modulação não genômica das correntes de Ca^{+2} ativadas pela $1,25\text{D}_3$, e está de acordo com resultados obtidos em outros tecidos (BISSONNETTE et al., 1994; SLATER et al., 1995). Resultados do nosso grupo demonstram um mecanismo de ação diferente da $1,25\text{D}_3$ no transporte de aminoácidos neutros, revelando que a $1,25\text{D}_3$ pode ativar vias não genômicas através de distintas sinalizações celulares (MENEGAZ et al., 2009).

A $1,25D_3$ é um seco esteroide cuja flexibilidade conformacional permite que esta interaja com o VDR localizado no núcleo da célula para gerar respostas genômicas ou com receptores localizados em microregiões específicas na membrana plasmática, os caveolae, para gerar rápidas respostas (NORMAN et al., 2002a; NORMAN et al., 2002 b). A ligação da $1,25D_3$ na sua conformação 6-s-cis ao VDR associado ao caveolae pode resultar na ativação de um ou mais sistemas de segundos mensageiros, incluindo PKC, receptores acoplados a proteína-G ou a ativação da fosfatidilinositol-3-cinase (PI-3K). A partir destes, diversas ações podem ser iniciada como a ativação de canais de Ca^{+2} regulados pela voltagem, ativação de canais de Cl^- ou a geração de segundos mensageiros. Alguns destes segundos mensageiros, particularmente a RAF/MAPK, podem levar mensagens ao núcleo para modular a expressão gênica (NORMAN, 2006).

No presente trabalho, observamos que na presença de LY 294002, um inibidor da PI-3K, o efeito estimulatório da $1,25D_3$ no influxo de $^{45}Ca^{+2}$ foi atenuado. Também, uma significativa inibição do influxo de $^{45}Ca^{+2}$ foi detectada quando o PD 98059, um bloqueador da cascata da MAPK (MEK - via ERK 1/2), foi co-incubado com a $1,25D_3$. Este resultados, estão de acordo com alguns relatos que mostram o envolvimento parcial da PI-3K e da MEK (ERK1/2) no rápido sinal de transdução da $1,25D_3$ no intestino (NORMAN et al., 2006), na musculatura lisa dos vasos sanguíneos (REBSAMEN et al., 2002), em células NB4 e em osteoblastos (VERTINO et al., 2005; NORMAN et al., 2006).

Vários estudos sugerem que a $1,25D_3$ possa ativar membros de proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs), incluindo as ERK1/2 e a p38 MAPK, em diferentes rápidas respostas, ligadas ou não a ativação nuclear (NORMAN et al., 2004). Pardo et al., (2006), relatou que a ativação da p38 MAPK pela $1,25D_3$ envolve Ca^{+2} , c-Src e PKA como precursores para a ativação da c-Fos em células do intestino. Também, a família da p38 MAPK está envolvida em eventos genômicos clássicos do hormônio em células da linhagem HL60 e THP-1 (GOCEKA et al., 2007).

Neste trabalho, demonstramos que o SB 239063, um potente inibidor da p38 MAPK, bloqueou o efeito estimulatório da $1,25D_3$ no influxo de $^{45}Ca^{+2}$. Neste contexto, nossos resultados fornecem fortes evidências de que o Ca^{+2} e a PKC são moduladores importantes da ERK1/2 e da p38 MAPK em células de Sertoli. Trabalhos anteriores já relataram que o Ca^{+2} extracelular é capaz de modular a

atividade das proteínas p38 MAPK e o CREB (SAKAI et al., 2002; WU et al., 2005; BLANC et al., 2004). Além disso, já foi demonstrado que de acordo com o estímulo e tipo celular, a ativação da p38MAPK pode ser dependente ou não da atividade da PKC (HOFMANN et al., 2004; TOGO et al., 2004; LEMONNIER et al., 2004; PARDO et al., 2006). Neste estudo, mostramos que a PKC, a p38 MAPK e em menor extensão a PI-3K, são estimuladas pela 1,25D₃ para gerar uma rápida resposta das células de Sertoli conectando o efeito iniciado na membrana plasmática com a atividade genômica e atribuindo um papel para a PKC como moduladora da ERK1/2 e p38 MAPK.

Para verificar a contribuição da atividade da rede de microtúbulos no efeito estimulatório da 1,25D₃ no influxo de ⁴⁵Ca⁺² nas células de Sertoli, co-incubamos o hormônio com um despolimerizador da rede de microtúbulos, a colchicina. O efeito estimulatório da 1,25D₃ no influxo de ⁴⁵Ca⁺² foi significativamente diminuído com os microtúbulos despolimerizados. Estes resultados mostram que os microtúbulos têm um papel importante no trânsito intracelular de substâncias ou na exocitose em células de Sertoli como já demonstrado para o transporte de aminoácidos na membrana plasmática em testículos de ratos imaturos, na presença de colchicina (WASSERMANN et al., 1992b). Como pode ser observado na Fig. 7, comparamos o efeito de um bloqueador específico dos canais de Cl⁻ do tipo CIC3 no efeito estimulatório da 1,25D₃ no influxo de ⁴⁵Ca⁺² demonstrado na Fig. 4A e 4B, com o efeito da colchicina. Ambos os fármacos foram efetivos em diminuir o efeito estimulatório da 1,25D₃ no influxo de ⁴⁵Ca⁺² sugerindo a contribuição do Ca⁺² no trânsito de vesículas intracelulares nas células de Sertoli. O envolvimento da atividade dos canais de cloreto em secreção de material ósseo já foi demonstrado (ZANELLO e NORMAN, 2003; XIAOYU et al., 2007). Também já foi relatado que os íons cloreto do citosol aumentam a exocitose dependente de Ca⁺² em melanotrofos (TURNER et al., 2005). Além disso, o canal CIC-3 o qual é conhecido por estar envolvido na exocitose, está presente na membrana de vesículas secretórias. Considerando estes resultados, estudos estão em andamento para entender o envolvimento do influxo de Ca⁺² e a ativação dos canais CIC-3 para mediar as rápidas respostas das células de Sertoli em atividades secretórias reguladas pela 1,25D₃.

Concluindo, nossos resultados sustentam a hipótese de trabalho esquematizada na Fig. 8. A interação da 1,25D₃ na membrana plasmática das células de Sertoli abre canais de K⁺

dependentes de ATP, canais de K^+ dependentes de Ca^{+2} de baixa condutância e canais de Cl^- . O efluxo de K^+ e influxo de Cl^- promovem a hiperpolarização transitória nas células. Em seguida, a exemplo da testosterona (van LEDEBUR et al., 2002), acredita-se que ocorra uma despolarização prolongada que induz a abertura de canais de Ca^{+2} dependentes da voltagem permitindo o influxo de Ca^{+2} . O acúmulo de Ca^{+2} ativa a PKC que pode regular a atividade dos canais iônicos na membrana plasmática (Ca^{+2} e/ou canais de Cl^- dependentes de Ca^{+2}). Também, a PKC tem um papel central como reguladora da MEK, ERK1/2 e p38 MAPK. Estas proteínas podem modular as respostas celulares através da ativação da fosforilação de outras cinases, de proteínas de membrana e citosólicas e/ou da ativação de fatores de transcrição específicos e alteração da atividade nuclear. Concomitantemente, um sinal específico do receptor via PI3-K que liga o influxo de Ca^{+2} ao movimento dos microtúbulos e a atividade do CIC3 pode produzir alguns efeitos comumente associado com um aumento localizado de Ca^{+2} , como por exemplo, a excitose.

6 CONCLUSÕES

- ✓ Evidenciado efeito não-genômico (rápido) da $1,25D_3$ em testículos e células de Sertoli;
- ✓ Células de Sertoli confirmadas como alvo da $1,25D_3$ nos testículos;
- ✓ Doses fisiológicas da $1,25D_3$ aumentam o influxo de Ca^{+2} em testículo (106%) e células de Sertoli (140%) em um curto espaço de tempo;
- ✓ Os canais de Ca^{+2} dependentes de voltagem do tipo L e T são cruciais no processo de entrada do Ca^{+2} em ambos modelos experimentais;
- ✓ Os canais de K^+ e em menor parte os de Cl^- modulam a entrada do íon;
- ✓ A PKC e p38MAPK são ativadas pela $1,25D_3$ e participam diretamente do efeito do hormônio sobre o metabolismo do Ca^{+2} nas células de Sertoli;
- ✓ PI3K e ERK1/2 estão parcialmente envolvidas na ação da $1,25D_3$;
- ✓ Resultados corroboram com achados anteriores de que a $1,25D_3$ estimula eventos de secreção celular.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHERN CA; KOBERTZ WR. Chemical Tools for K⁺ Channel Biology. *Biochemistry*. v. 48, p. 517–526, 2009.

AKERSTROM VL; WALTERS MR. Physiological effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in TM4 sertoli cell line. *American Journal of Physiology*, v. 262, E884-E890, 1992.

ANDERSON PH; HENDRIX I; SAWYER RK; ZARRINKALAM R; MANAVIS J; SARVESTANI GT; MAYD BK; 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.

ANDREWS S; STEPHENS L; HAWKINS P. PI3K class IB pathway. *Science*. v.7, cm2, 2007.

AUZENNEAU, C.; THOREAU, V.; KITZIZ, A.; BECQ F. A novel voltage dependent chloride current activated by extracellular acidic pH in cultured rat Sertoli cells. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, p. 19230-19236, 2003.

AUZENNEAU, C.; NOREZ, C.; NOEL, S.; JOUGLA, C.; BECQ F.; VANDERBROUCK, C. Pharmacological profile of inhibition of the chloride channels activated by extracellular acid in cultured rat Sertoli cells. *Reproduction Nutrition Development*, v. 46, p. 241-255, 2006.

AUZANNEAU C; NOREZ C; ANTIGNY F. Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channels in cultured rat Sertoli cells regulate an acid sensing chloride, *Biochemical Pharmacology*, v. 75, p. 476-483, 2008.

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

BARG S; HUANG P; ELIASSON L. Priming of insulin granules for exocytosis by granular Cl⁻ uptake and acidification. *Journal of Cell Science*, v. 114, p. 2145-2154, 2001.

BENITAH, J.P., ALVAREZ J.L., GÓMEZ, A.M. L-type Ca²⁺ current in ventricular cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. ARTICLE IN PRESS, 2009.

BENO DWA, BRADY LM, BISSONNETTE M, DAVIS H. Protein kinase C and mitogen-activated protein kinase are required for 1,25-dihydroxyvitamin D₃-stimulated Egr induction. *Journal of Biological Chemistry*, v. 270, p. 3642–3647, 1995.

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

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

BISSONNETTE M, TIEN XY, NIEDZIELA SM, HARTMANN SC, Frawley BP, ROY HK, SITRIN MD, PERLMAN RL, BRASITUS TA. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ activates protein kinase C in Caco-2 cells: A mechanism to limit secosteroid induced rise in Ca²⁺. *American Journal of Physiology*, v. 267, p. G465–G475, 1994.

BISSONNETTE M, WALI RK, HARTMANN SC, NIEDZIELA SM, ROY HK, TIEN XY, SITRIN MD, BRASITUS TA. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and 12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate cause differential activation of Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent isoforms of protein kinase C in rat colonocytes. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 95, p. 2215–2221, 1995.

BOLAND R, BUITRAGO C, de BOLAND AR. Modulation of tyrosine phosphorylation signalling pathways by 1 α ,25(OH)₂-vitamin D₃. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, v. 16, n. 6, p. 280-287, 2005.

dE BOLAND AR; FACCHINETTI MM; BALOGH G; MASSHEIMER V; BOLAND RL. Age-associated decrease in inositol 1,4,5-trisphosphate and diacylglycerol generation by

1,25(OH)₂-vitamin D₃ in rat intestine. *Cell Signalling*, v. 8, n 3, p. 153-157, 1996.

de BOLAND AR, NORMAN AW. 1 α ,25(OH)₂-vitamin D₃ signaling in chick enterocytes: enhancement of tyrosine phosphorylation and rapid stimulation of mitogen-activated protein (MAP) kinase. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 15, n. 69, p. 470-472, 1998.

BOOTMAN, M; COLLINS, TJ; PEPPIAT, CM; PROTHERO, LS; MACKENZIE, L; SMET, P; TRAVERS M; TOVEY SC; SEO JT; BERRIDGE MJ; CICCOLINI F; LIPP P. Calcium signalling- an overview. *Cell & Developmental Biology*, v. 12, p. 3-10, 2001.

BORSOTTO M; BARHANIN J; FOSSET M; LAZDUNSKI M. The 1,4-dihydropyridine receptor associated with the skeletal muscle voltage-dependent Ca²⁺ channel. Purification and subunit composition. *Journal of Biology and Chemistry*, v. 260, n. 26, p.14255-14263, 1985.

BOURAÏMA H; VANNESTE V; DELALANDE C; ZANATTA L; WOLCZYNSKI S; CARREAU S. Aromatase gene expression in immature rat Sertoli cells: age-related changes in the FSH signaling pathway. *Reproduction, Fertility and Development*. v. 22, 2010. *In press*.

BRADFORD M M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p.248-254, 1976.

BREITKREUTZ D; BRAIMAN-WIKSMAN L; DAUM N; DENNING MF; TENNENBAUM T. Protein kinase C family: on the crossroads of cell signaling in skin and tumor pithelium. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. v. 133, n 11, p. 793-808, 2007.

BROOCKFOR FR; MORRIS RA; DESIMONE DC; HUNT DM; WALSH KB. Sertoli cell expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, *American Journal of Physiology*. v. 274, p. C-922-C930, 1998.

BUITRAGO C, BOLAND R, DE BOLAND AR. The tyrosine kinase c-Src is required for 1,25(OH)₂-vitamin D₃ signalling to the nucleus in muscle cells. *Biochimica and Biophysica Acta*. v. 19, p. 179-87, 2001.

BUITRAGO CG, PARDO VG, DE BOLAND AR, BOLAND R. Activation of RAF-1 through Ras and protein kinase C- α mediates 1 α ,25(OH)₂-vitamin D₃ regulation of the mitogen-activated protein kinase pathway in muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*. v. 278, p. 2199–2205, 2003.

BUITRAGO CG; RONDA AC; DE BOLAND A; BOLAND R. MAP Kinases p38 and JNK are activated by the steroid hormone 1 α ,25(OH)₂-vitamin D₃ in the C2C12 Muscle Cell Line. *Biochemistry*. v. 97, p. 698–708, 2006.

CARAFOLI, E. Plasma membrane calcium pump: structure function and relationships. *Basic Research in Cardiology*, v. 92, p. 59-61, 1997.

CATTERALL WA. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annual Review of Cell Biology*, v. 16, p. 521-555, 2000.

CATTERALL, WA; CESTÈLE S; YAROV-YAROVY V; YU FH; KONOKI K; SCHEUER T. Voltage gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon*, v. 49, p. 124-141, 2007.

CHAE, H. JEONG M; HÁ MS; LEE JK; BYUN JO. ERK MAP kinase is required in 1,25(OH)₂D₃-induced differentiation in human osteoblasts. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, v. 24, p.31–41, 2002.

CHEN T-Y, HWANG T-C. CLC-0 and CFTR: Chloride Channels Evolved From Transporters. *Physiology Reviews*. v. 88; p.351–387, 2008.

CLAPHAM, D.E. Calcium signaling. *Cell*, v. 131, p. 1047-1058, 2007.

D'AGOSTINO A; MENÈ P; STEFANINI M. Voltage-gated Ca²⁺ channels in rat Sertoli cells. *Biology of Reproduction*, v. 4, p. 414-

418, 1992.

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

DEEB KK; TRUMP DL. JOHNSON CS. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nature Reviews Cancer*. v. 7, p. 684-700 , 2007.

DENT P; YACOB A; FISHER PB; HAGAN MP; GRANT S. MAPK pathways in radiation responses. *Oncogene*, v. 22, p. 5885–5896, 2003.

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

DORRINGTON JH; ROLLER NF; FRITZ IB. Effects of follicle-stimulating hormone on cultures of Sertoli cell preparations. *Mol.Cell. Endocrino*. v.3, p. 57–70, 1975.

DRESVIANNIKOV AV; PAGE KM; LEROY J; PRATT WS; DOLPHIN AC. Determinants of the voltage dependence of G protein modulation within calcium channel beta subunits *Pflugers Archiv: European journal of physiology*, v. 457, n.4, p. 743-56, 2009.

DURAN C; THOMPSON CH; XIAO Q; HARTZELL C. Chloride Channels: Often Enigmatic, Rarely Predictable. *Annual Review of Physiology*. v.72; p.13.1–13.27, 2009.

DUTZLER R, CAMPBELL EB, CADENE M, CHAIT BT, MACKINNON R. X-ray structure of a Cl⁻ channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature*. v. 415, n.6869, p. 287-294, 2002.

EGAN ME; PEARSON M; WEINER SA; RAJENDRAN V; RUBIN D; GLÖCKNER-PAGEL J; LUKACS GL; CAPLAN MJ.

Curcumin, a major constituent of turmeric, corrects cystic fibrosis defects. *Science*, v. 23, p. 600-2, 2004.

EGGERMONT J. Calcium-activated Chloride Channels: (Un)known, (Un)loved?. Proceedings of the American *Thoracic Society*, v. 1, p 22–27, 2004

ESKILD W; REE AH; LEVY FO; JAHNSEN T; HANSSON V. Cellular localization of mRNAs for retinoic acid receptor-alpha, cellular retinol-binding protein, and cellular retinoic acid-binding protein in rat testis: evidence for germ cell-specific mRNAs. *Biology of reproduction*, v. 44, p. 53-61, 1991.

FAWCETT, D.W. Spermatogenesis. In: BROWDER, LW, ERICKSON CA, JEFFRY WR. *Development Biology*. 3ed. New York: Saunders College Publishing, Ch.2, p.31, 1991.

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

FLOCKERZI V, OEKEN HJ, HOFMANN F. Purification of a functional receptor for calcium-channel blockers from rabbit skeletal-muscle microsomes. *European Journal of Biochemistry*, v. 161, n. 17, p. 217-24, 1986.

FOSKETT K. CIC and CFTR chloride channel gating. *Annual Review of Physiology*, v. 60, p.689–717, 1998.

FRIEL DD; CHIEL HJ. Calcium dynamics: analyzing the Ca^{2+} regulatory network in intact cells, *Trends in Neuroscencei*. v.31, p. 8-19, 2009.

FRIZZELL RA. Functions of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 151, p. 54-8, 1995.

GALDIERI M; ZANI B. Hormonal induced changes in sertoli cell glycoproteins. *Cell Biology International*, v. 5, n. 2, p. 111, 1981.

GHATTA S, NIMMAGADDA D, XU X, O'ROURKE ST. Large-conductance, calcium-activated potassium channels: Structural and functional implications. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 110, v. 1, p. 103-116, 2006.

GLOSSMANN H; STRIESSNIG J. Molecular properties of calcium channels. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. v. 114, p.101-105, 1990.

GORCZYNSKA-FJALLING E. The role of calcium in signal transduction process in Sertoli cells. *Reproductive Biology*, v. 4, n. 3, p. 219-241, 2004.

GNESSI L, FABBRI A, SPERA, G. Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis: an integrated systems. *Endocrinology Reviews*, v. 18, p. 541-609, 1997.

GNIADECKI R, GAJKOWSKA B, HANSEN M. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates the assembly of adherens junctions in keratinocytes: Involvement of protein kinase C. *Endocrinology*, v. 138, p. 2241-2248, 1997.

GNIADECKI R. Nongenomic signaling by vitamin D: A new face of Src. *Biochemical Pharmacology*, v. 56, p.1273-1277, 1998.

GOCEKA E; KIELBINSKIB M; MARCINKOWSKAA E. Activation of intracellular signaling pathways is necessary for an increase in VDR expression and its nuclear translocation, *FEBS Letters*. v. 581, p. 1751-1757, 2007.

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

GRAY PC, TIBBS VC, CATTERALL WA, MURPHY BJ. Identification of a 15-kDa cAMP-dependent protein kinase-anchoring protein associated with skeletal muscle L-type calcium channels. *Journal of Biology Chemistry*, v. 272, n. 10, p. 6297-302, 1997.

GRISWOLD MW. The central role of Sertoli cells. In: *Spermatogenesis Seminars In Cell & Developmental Biology*, v.9, p 411-416, 1998.

HABIB, FK; MADDY SQ.; GELLY KJ. Characterisation of receptors for 1,25-dihydroxyvitamin D3 in the human testis. *Journal of Steroid biochemistry*, v. 35, 195-199, 1990.

HARTZELL C; PUTZIER I; ARREOLA J. Calcium-activated chloride channels. *Annual Review of Physiology*. v. 67, p.719–58, 2005.

HAWKINS PT; ANDERSON KE; DAVIDSON K; STEPHENS LR. Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochemical Society Transactions*. v. 34, p. 647- 662, 2006.

HENDRIX I; ANDERSON PH. Response of the 5' -flanking region of the human 25-hydroxyvitamin D 1{alpha}-hydroxylase gene to physiological stimuli using a transgenic mouse model. *Journal of Molecular Endocrinology*, v. 34, p. 237–245, 2005.

HERLITZE S; ZHONG H; SCHEUER, T; CATTERALL WA. Allosteric modulation of Ca²⁺ channels by G proteins, voltage-dependent facilitation, protein kinase C and Ca,β subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, p. 4699-4704, 2001.

HIRAI T;TSUJIMURA A;UEDA T; FUJITA F; MATSUOKA Y; TAKAO T; MIYAGAWA Y; KOIKE N; OKUYAMA A. Effect of 1,25-Dihydroxyvitamin D on Testicular Morphology and Gene Expression in Experimental Cryptorchid Mouse: Testis Specific cDNA Microarray Analysis and Potential Implication in Male Infertility. *Journal of Urology*. v. 181, n3, p. 1487-1492, 2009.

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

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

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

HOFMANN M; ZAPER J; BERND A; BEREITER-HAHN R, KAUFMANN V; KIPPENBERGER S. Mechanical pressure-induced phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase in epithelial cells via Src and protein kinase C. *Biochemical and Biophysical Research*, v.316, p. 673–679, 2004.

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

HOU S, HEINEMANN SH, HOSHI T. Modulation of BKCa Channel Gating by Endogenous Signaling Molecules. *Physiology*, v. 24, p. 26-35, 2009.

HYDE SC; EMSLEY P; HARTSHORN MJ.; MIMMACK MM; GILEADI U; PEARCE SR; GALLAGHER MP; GILL DR; HUBBARD RE; HIGGINS CF. Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature*, v. 26, p. 362-5, 1990.

HOULLIER P; BLANCHARD A; PAILLARD M. Métabolisme du potassium. *Endocrinologie*. v. 1; p. 138–157, 2004.

HUC S, MONTEIL A, BIDAUD I, BARBARA G, CHEMIN J, LORY P. Regulation of T-type calcium channel: signaling pathways and functional implications. *Biochimica and Biophysica Acta*, v. 1793, p. 947-952, 2009.

JENSEN, B.S.; STROBAEK, D.; OLESEN, S.P CHRISTOPHERSEN, P. The Ca²⁺-activated K⁺ channel of intermediate conductance: a molecular target for novel treatments?. *Current Drug Targets*, v. 2, p. 401-422, 2001.

JENTSCH, T. J.; STEIN V.; WEINREICH, F.; ANSELM, A. Molecular Structure and Physiological Function of Chloride Channels. *Physiological Reviews*, v. 82, p. 503-568, 2002.

JOHANSEN C; KRAGBALLE K; HENNINGSEN J; WESTERGAARD M; KRISTIANSEN K; IVERSEN L. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates activator protein 1 DNA-binding activity by a phosphatidylinositol 3-kinase/Ras/MEK/extracellular signal regulated kinase 1/2 and N-Jun N-terminal kinase 1-dependent increase in c-Fos, Fra1, and c-Jun expression in human keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*. v. 120, p. 561–570, 2003.

JOHNSON BD, BROUSAL JP, PETERSON BZ, GALLOMBARDO PA, HOCKERMAN GH, LAI Y, SCHEUER T, CATTERALL WA. Modulation of the cloned skeletal muscle L-type Ca²⁺ channel by anchored cAMP-dependent protein kinase. *Journal of Neuroscience*, v. 17, n. 4, p. 1243-55, 1997.

JOHNSON L, THOMPSON DL, VARNER DD. Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. *Animal Reproduction Science*, v. 105, p. 23-51, 2008.

JONES G; STRUGNELL SA; DeLUCA HF. Current understanding of the molecular actions of Vitamin D. *Physiological Reviews*, v. 78, n. 4, p. 1193-1231, 1998.

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

KERSCHBAUM HH, NEGULESCU PA, CAHALAN MD. Ion channels, Ca²⁺ signaling, and reporter gene expression in antigen-specific mouse T cells. *Journal of Immunology*. v. 159, n. 4, p. 1628-1638, 1997.

KHANAL RC; PETERS TMS; SMITH NM; NEMERE I. Membrane Receptor-Initiated Signaling in 1,25(OH)₂D₃-Stimulated Calcium Uptake in Intestinal Epithelial Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. v. 105, p. 1109–1116, 2008.

KIDD JF, THORN P. Intracellular Ca²⁺ and Cl⁻ channel activation in secretory cells. *Annual Review of Physiology*.v. 62, p. 493–513, 2000.

KIMSH; CHO KW; CHANG SH; KIM SZ; CHAE SW. Glibenclamide suppresses stretch-activated ANP secretion. Involvement of KATP + channels and L-type Ca²⁺ channel modulation. *Pflügers Archiv* v. 434, p. 362–372, 1997.

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, n. 4, 2000.

KWIECINSKI GG.; PETRIE GI; DeLUCA HF. Vitamin D is necessary for reproductive function on male rat. *Journal of Nutrition*, v. 119, p. 741-744, 1989.

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

LALONDE MR; KELLY ME; BARNES S. Calcium-activated chloride channels in the retina. *Channels*. v.2, n.4, p. 252-60, 2008.

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

LEE J, HMAMA Z, MUI A, REINER N. Stable gene silencing in human monocytic cell lines using lentiviral-delivered siRNA: Silencing of the p110a isoform of phosphoinositide 3-kinase reveals differential regulation of adherence induced by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 and bacterial lipopolysaccharide. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 279, p. 9379–9388, 2004.

LEMONNIER J; GHAYOR C; GUICHEUX J; CAVERZASIO J. Protein kinase C-independent activation of protein kinase Dis involved in BMP-2-induced activation of stress mitogen-activated protein kinases JNK and p38 and osteoblastic cell differentiation. *J Biol Chem*. v. 279, p. 259–264, 2004.

LEVALLET G, LEVALLET J, BONNAMY PJ. Alterations in proteoglycan synthesis selectively impair FSH-induced particulate cAMP-phosphodiesterase 4 (PDE4) activation in immature rat

Sertoli cells..*Biochemical and Biophysical Acta*. v. 1770, n. 4, p. 638-648, 2007.

van LEDEBUR EICF, ALMEIDA JP, LOSS ES, WASSERMAN GF. Rapid effect of testosterone on rat Sertoli cell membrane potential. Relationship with K^+ ATP channel. *Hormone and Metabolic Research*, v. 34, p. 550-555, 2002.

LEITE LD; LUCHI L; VON LEDEBUR EICF; LOSS ES; WASSERMANN GF. Testosterone induces immediate membrane depolarization and stimulates $^{45}Ca^{2+}$ uptake in Sertoli cells from rats of different maturation stages. *Journal of Medical Sciences Research*. v.27, p.25-58, 1999.

LI X; UDAGAWA N; ITOH K; SUDA K; MURASE Y; NISHIHARA T; SUDA T; TAKAHASHI. p38 MAPK-mediated signals are required for inducing osteoclast differentiation but not for osteoclast function, *Endocrinology*. v. 143, p. 3105–3113, 2002.

LIA AWM; MRUKA DD; CHENG Y. Mitogen-activated protein kinases in male reproductive function. *Trends in Molecular Medicine*. v. 15, p.159-168, 2009.

LIN R; WHITE JH. The pleiotropic actions of vitamin D. *BioEssays*, v. 26, p. 21–28, 2003.

LOSS E; BARRETO KP; LEITE LD; WASSERMANN GF. Comparative study of the actions of isoproterenol and retinol in the amino acid accumulation, $^{45}Ca^{++}$ uptake, and membrane potential in Sertoli cells. *Journal of Medical Sciences Research*. v. 26, p. 195-199, 1998.

LOSS ES, JACOBUS AP, WASSERMAN GF. Diverse FSH and testosterone signaling pathways in the Sertoli cell. *Hormone and Metabolic Research*, v.39, p. 1-7, 2007.

LORY, P., BIDAUD, I., CHEMIN, J. T-type calcium channel in differentiation and proliferation. *Cell Calcium*, v. 40, p. 135-146, 2006.

LOTSHAW, DP. Role of membrane depolarization and T-type Ca^{2+}

channels in angiotensin II and K^+ stimulated aldosterone secretion. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 175, p. 157-171, 2001.

MASSEHEIMER V; BOLAND AR. Modulation of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ -dependent Ca^{2+} uptake in skeletal muscle by protein kinase C. *Biochemical Journal*. v. 281, p.349-352, 1992.

MACKAY S. Gonadal development in mammalian at the cellular and molecular levels. *International Review of Cytology*, v. 200, p. 47-99, 2000.

MACKINNON R. Potassium channels. *FEBS Letters*. v.555, p.62-65, 2003.

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

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

MENEGAZ D; ZAMONER A; ROYER C; LEITE LD; BORTOLOTTO LA; SILVA FRMB. 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 LD; SANTOS ARS; SILVA FMB. Role of 1 α ,25(OH)₂ vitamin D₃ on alpha-[1-14C]MeAIB accumulation in immature rat testis. *Steroids*. v. 74, p. 264-269, 2009.

MENEGAZ, D. Estudo do mecanismo de ação não-genômico da tiroxina e da 1 α ,25(OH)₂-vitamina D₃ em sistemas de membrana plasmática: transporte de aminoácidos e fluxo iônico em testículos de ratos e em células TM4. Florianópolis: UFSC, 2009. 149 p. Tese

(Doutorado)- Programa de Pós Graduação de Farmácia.
Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

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 Community*. v. 127, p. 303-309, 1985.

MORELLI S; BUITRAGO C; BOLAND R; DE BOLAND AR. The stimulation of MAP kinase by 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ in skeletal muscle cells is mediated by protein kinase C and calcium. *Mol. Cell. Endocrinol* .v. 173, p. 41–52, 2001.

MORELLI A; SQUECCO R; FAILLI P; FILIPPI S; VIGNOZZI L; FIBBI B; MANCINA R; LUCIANI G; FRANCONI F; ADORINI L; MAGGI M. The vitamin D receptor agonist elocalcitol upregulates L-type calcium channel activity in human and rat bladder. *Cell Physiology* v. 294, p. C1206–C1214, 2008.

MATHEWS, C.J.; TABCHARANI, J.A.; CHANG, X.B.; JENSEN, T.J.; RIORDAN, J.R.; HANRAHAN, J.W. Dibasic protein kinase A sites regulate bursting rate and nucleotide sensitivity of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *Journal of Physiology*, v. 15, p. 365-77, 1998.

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

MIZWICKI MT; NORMAN AW. The vitamin D sterol–vitamin D receptor ensemble model offers unique insights into both genomic and rapid-response signaling. *Science Signalling*. v. 2, p. 1-14, 2009.

MRUK DD; CHENG CY. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during permatogenesis. *Endocrinology Review*, v. 25, p. 747-806, 2004.

NEHER E; AUGUSTINE GJ. Calcium gradients and buffers in bovine chromaffin cells. *Journal of Physiology*. v. 450, p. 273-301, 1992.

NEMERE, I; YOSHIMOTO, Y; NORMAN AW. Calcium transport in perfused duodena from normal chicks: enhancement within fourteen minutes of exposure to 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Endocrinology*, v. 115, p.1476-1486, 1984.

NEMERE I; DORMANEN MC; HAMMOND MW; OKAMURA WH; NORMAN AW. Identification of a specific binding protein for 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ in basal-lateral membranes of chick intestinal epithelium and relationship to transcaltachia. *The Journal of Biological Chemistry*. v.269, p. 23750-23756, 1994.

NORMAN A; SONG X; ZANELLO L; OKAMURA WH. Rapid and genomic biological responses are mediated by different shapes of the agonist steroid hormone, 1 α ,25(OH)₂vitamin D₃. *Steroids*. v. 64, n.1, p. 120-128, 1990.

NORMAN AW; BISHOP JE. Bula cm. Molecular tools for study of genomic and rapid signal transduction responses initiated by 1,25(OH)₂-vitamin D₃. *Steroids*, v. 67, p.457-466, 2002a.

NORMAN AW; OLIVERA CJ; SILVA FRMB; BISHOP JE. A specific binding protein/receptor for 1,25-dihydroxy D₃ is present in an intestinal caveolae membrane fraction, *Biochemical and Biophysical Research Communication*. v. 298, p.414-419, 2002b.

NORMAN AW; MIZWICKI MT.; DEREK PG. Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. *Nature Reviews Drug Discovery*, v.3, p. 27-41, 2004.

NORMAN A. Minireview: Vitamin D receptor: new assignments for na already busy receptor. *Endocrinology*, v. 17, n. 12, p. 5542-5548, 2006.

NORMAN A. 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.

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

OSMUNDSEN, BC; HUANG HF; ANDERSON MB; CHRISTAKOS S; WALTERS MR. 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.

PARDO VG; BOLAND R; BOLAND AR. 1, 25(OH)₂-vitamin D₃ stimulates intestinal cell p38 MAPK activity and increases c-Fos expression. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. v. 38, p. 1181-1190, 2006.

PEPPER C, THOMAS A, HOY T, MILLIGAN D, BENTLEY P, FEGAN C. The vitamin D₃ analog EB1089 induces apoptosis via a p53-independent mechanism involving p38 MAP kinase activation and suppression of ERK activity in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells in vitro. *Blood*. v. 101, p. 2454-2460, 2003.

PEREZ-REYES E. Molecular characterization of T-type calcium channels. *Cell Calcium*. v. 40, n.1, p. 89-96, 2006.

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

PROKS P; ASHCROFT FM. Modeling KATP channel gating and its regulation. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, v. 99, p. 7-19, 2009.

PUSCH M; ZIFARELLI G; MURGIA AR; PICOLLO A; BABINI E. Channel or transporter? The CLC saga continues. *Experimental Physiology*. v. 91.1, p.149-152, 2006.

QU Z; WEI RW; HARTZELL RH. Characterization of Ca²⁺-activated Cl⁻ currents in mouse kidney inner medullary collecting duct cells. *American Journal of Physiology*. v. 285, p. F326-F335, 2003.

REBSAMEN MC, SUN J, NORMAN AW, LIAO JK. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ induces vascular smooth muscle cell migration via activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Circulation Research*. v. 91, p.17-24, 2002.

REICHEL H.; KOEFLER HP; NORMAN AW. The role of vitamin D endocrine system in health and disease. *New England Journal of Medicine*, v. 320,p. 980-991, 1989.

REISERT J, BAUER PJ, YAU KW, FRINGS S. The Ca-activated Cl channel and its control in rat olfactory receptor neurons. *Journal of General Physiology*. v. 122, p. 349–64, 2003.

RONDA AC; BUITRAGO C; COLICHEO A; BOLAND AR; ROLDAN E; BOLAND R. Activation of MAPKs by 1 α ,25(OH)₂-Vitamin D₃ and 17 β -estradiol in skeletal muscle cells leads to phosphorylation of Elk-1 and CREB transcription factors. *Journal of Steroids Biochemistry & Molecular Biology*, v. 103, p. 462-446, 2007.

RINK TJ; HALLAM T. Calcium signalling in non-excitabile cells: notes on oscillations and store refilling. *Cell Calcium*. v.10, p. 385-395, 1989.

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

ROWAN EG; HARVEY AL. Toxins affecting K⁺ channels. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v. 29, n. 12, p. 1765-80, 1996.

SARTOR P; DUFY-BARBE L; CORCUFF JB; TAUPIGNON A; DUFY B. Electrophysiological response to thyrotropin-releasing hormone of rat lactotrophs in primary culture. *American Journal of Physiology*. v. 258E, p. 311–319, 1990.

SAKAI S; HASHIMOTO S; SHINTANI N. Involvement of intracellular Ca²⁺ elevation but not cyclic AMP in PACAP-induced p38 MAP kinase activation in PC12cells, *Regulatory Peptide*, v. 109, p. 149–153, 2002.

SANDHIYA S; DKHAR SD. Potassium channels in health, disease & development of channel modulators. *Indian Journal of Medical Research*. v. 129, p 223-232, 2009.

SANBORN BM; STEINBERGER A; TCHOLAKIAN RK.; STEINBERGER E. Direct measurement of androgen receptors in cultured Sertoli cells. *Steroids*, v. 29, p. 493-502, 1977.

SCHLEICHER G; PROVETTE TH; STUMPF WE. Distribution of solatriol [1, 25(OH)₂-vitamin D₃] binding sites in male sex organs of the mouse: an autoradiographic study. *Journal of the Histochemical Society*, v. 37, p. 1083-1086, 1989.

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

SCHWARTZ Z; SYLVIA VL; LARSSON D; NEMERE I; CASSOLA D; DEAN D; BOYAN D. 1alpha,25(OH)₂D₃ regulates chondrocyte matrix vesicle protein kinase D (PKC) directly via G protein-dependent mechanisms and indirectly via incorporation of PKC during matrix vesicle biogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. v. 277, p. 11828–11837, 2002B.

SERGEEV IN; RHOTEN WB. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ evokes oscillations of intracellular calcium in a pancreatic beta-cell line. *Endocrinology*. v. 136, 2852–2861, 1995.

SETCHELL BP. In: The Sertoli cell. RUSSEL, L.D.; GRISWOLD, M.D. (eds). Cache River Press, Clearwater, FL. 1993.

SHARPE RM; MCKINNER C; KILVIN, C; FISHER JS. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*, v. 125, p. 769-784, 2003.

SHEPPARD, D.N.; WELSH, M.J. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiology Review*, v. 79, p. 23-45, 1999.

SHI H; NORMAN AW; OKAMURA WH; SEN A; ZEMEL MB. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ modulates human adipocyte metabolism via nongenomic action. *FASEB Journal*. v.15, p.2751–2753, 2001.

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

SILVA FRMB., LEITE LD; WASSERMANN GF. Rapid signal transduction in Sertoli cells. *European Journal of Endocrinology*. v.147, p. 425-433 2002.

SKINNER MK; GRISWOLD MD. Cell cell interactions in the testis. *Endocrinology Reviews*, v. 12, p. 45-68, 1991.

SLATER SJ; KELLY MB; TADDEO FJ. Direct activation of protein kinase C by 1,25-dihydroxyvitamin D₃, *Journal of Biological Chemistry*. v. 270, p. 6639–6643, 1995.

SNEDECOR G W ; COCHRAN W G. Statistical methods applied to experiments in agriculture and biology. 5th ed. Ames, Iowa. Iowa State University Press, 1956.

SCHEICHER G; PROVETTE TH; STUMPF WE. Distribution of soltrioi [1, 25(OH)₂-vitamin D₃] binding sites in male sex organs of the mouse: an autoradiographic study. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. v. 37, 1083-1086, 1989.

SONG X; BISHOP JE; OKAMURA WH; NORMAN AW. Stimulation of phosphorylation of mitogen-activated protein kinase by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ in promyelocytic NB4 leukemia cells: A structure-function study. *Endocrinology*. v.139, p. 457–465, 1998.

SUN X-L; HU GH. ATP-sensitive potassium channels: A promising target for protecting neurovascular unit function in stroke. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. In press, 2009.

SPEDDING M; PAOLETTI R. Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying channel function. *Pharmacology Review*, v. 44, n. 3, p. 363-76, 1992.

STERLING TM, NEMERE I. 1,25-dihydroxyvitamin D3 stimulates vesicular transport within 5 s in polarized intestinal epithelial cells. *Journal of Endocrinology*. v.185, n. 1, p. 81-91, 2005.

SYLVIA VL; SCHWARTZ Z; ELLIS EB; HELM SH; GOMEZ R; DEAN DD; BOYAN DB. Nongenomic regulation of protein kinase C isoforms by the vitamin D metabolites 1 α ,25-(OH) $_2$ D $_3$ and 24R,25-(OH) $_2$ D $_3$. *Journal of Cellular Physiology*. v. 167, 380–393,1996.

SYLVIA VL; SCHWARTZ Z; CURRY DB; CHANG Z; DEAN DD; BOYAN BD. 1,25(OH) $_2$ D $_3$ regulates protein kinase C activity through two phospholipid-dependent pathways involving phospholipase A $_2$ and phospholipase C in growth zone chondrocytes. *Journal of Bone Mineral Research*, v. 13, n. 4, p. 559-69, 1998.

TAKAHASHI M; SEAGAR MJ; JONES JF; REBER BF.; CATTERAL WA. Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v, 84, p. 5478-5482, 1987.

TERAMOTO N. Physiological roles of ATP-sensitive K $^+$ channels in smooth muscle. *The Journal of Physiology*. v.572, p. 617-624, 2006.

TOGO T. Long-term potentiation of wound-induced exocytosis and plasma membrane repair is dependent on cAMP-response element-mediated transcription via a protein kinase C- and p38 MAPK-dependent pathway. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, p.4996–5003, 2004.

TREISMAN R. Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Current opinion in cell Biology*. v. 8, n. 2, p. 205-215, 2006.

TSE AK, WAN CK, SHEN XL, ZHU GY, CHEUNG HY, YANG M, FONG WF. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ induces biphasic NF-kappaB responses during HL-60 leukemia cells differentiation through protein induction and PI3K/Akt-dependent phosphorylation/degradation of IkappaB. *Experimental Cellular Research*. v. 313, n. 8, p. 1722-34, 2007.

TUDPOR K; TEERAPORNPUNTAKIT J; JANTARAJIT W; KRISHNAMRA N; CHAROENPHANDHU N. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Rapidly Stimulates the Solvent Drag-Induced Paracellular Calcium Transport in the Duodenum of Female Rats. *Journal of Physiology Science*. v. 58, n. 5, p. 297-307, 2008.

TURNER JE; SEDEJ S; RUPNIK M. Cytosolic Cl⁻ ions in the regulation of secretory and endocytotic activity in melanotrophs from mouse pituitary tissue slices. *Journal of Physiology*. v. 566, p. 443-453, 2005.

VANDEWALLE B; WATTEZ N; LEFEBVRE J. Effects of vitamin D₃ derivatives on growth, differentiation and apoptosis in tumoral colonic HT 29 cells: possible implication of intracellular calcium. *Cancer Letters*. v. 97, n. 1, p. 99-106, 1995.

VAN LEDEBUR EICF; ALMEIDA JP; LOSS ES; WASSERMANN GF. Rapid effect of testosterone on rat Sertoli cell membrane potential. Relationship with KATP⁺ channels. *Hormonal and Metabolism Research*, v. 34, p. 550-555, 2002.

VAZQUEZ G; BOLAND R; DE BOLAND AR. Modulation by 1,25(OH)₂-vitamin D₃ of the adenylyl cyclase/cyclic AMP pathway in rat and chick myoblasts. *Biochemical and Biophysical-Molecular Cell Research*. v. 1269, p. 91-97, 1995.

VAZQUEZ G; DE BOLAND AR. Involvement of protein kinase C in the modulation of 1alpha, 25-dihydroxy-vitamin D₃-induced 45Ca²⁺ uptake in rat and chick cultured myoblasts. *Biochemical*

and Biophysical- Molecular Cell Research. v. **1310**, p. 157–162, 1996.

VERTINO AM; BULA CM; CHEN J-R. Nongenotropic, antiapoptotic signaling of 1 α ,25(OH) $_2$ -vitaminD3 and analogs through the ligand binding domain of the vitamin D receptor in osteoblasts and osteocytes. Mediation by Src, phosphatidylinositol 3-, andJNKkinases, *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, p. 14130–14137, 2005.

VERHOEVEN G; CAILLEAU J. Influence of coculture with Sertoli cells on steroidogenesis in immature rat Leydig cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 71, p. 239-51, 1990.

VICINI E; LOIARRO M; DI AGOSTINO S. 17-beta-estradiol elicits genomic and non-genomic responses in mouse male germ cells. *Journal of Cell Physiology*, v. 206, p.238-245, 2006.

VOLPATO K; MENEGAZ D; LEITE LD; BARRETO KP; GARCIA EV; SILVA FRMBS. Involvement of K $^+$ channels and calcium-dependent pathways in the action of T3 on amino acid accumulation and membrane potential in Sertoli cells of immature rat testis. *Life Sciences*. v. 74, p. 1277–1288, 2004.

WASSERMAN G; MONTI BLOCH L; GRILLO ML; SILVA FRMB; LOSS ES; MACCONELL LL. Electrophysiological changes in Sertoli cells produces by acute administration of amino acid and FSH. *Hormonal Metabolic Research* v. 24, n. 7, p. 326-328, 1992

WASSERMANN GF; LOSS ES; WECHSLER SW. Retinol stimulates $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in Sertoli cells through a verapamil-sensitive voltage-dependent-channel, *Medical Science Research*. v. 23, p. 633-634, 1995.

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

WAN T; SHEN CK; ZHU GY; CHEUNG HY; YANG M; FONG WF. 1,25-dihydroxyvitamin D3 induces biphasic NF-kB responses during HL-60 leukaemia cells differentiation through protein induction and PI3K/Aktdependent phosphorylation/ degradation of

IkB. *Experimental Cellular Research*. v. 313, p. 1722–1739, 2007.

WONG C.H.; CHENG, C.Y. The blood testis barrier: its biology, regulation, and physiological role in spermatogenesis. *Current Topics In Developmental Biology*, v. 71, p. 236-298, 2005.

WUYTACK, L. RAEYMAEKERS, L. MISSIAEN. Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. *Cell Calcium*, v. 32, p.279-305, 2002

WU TW; WANG MJ; CHEN S; BRINTON RD. 17 beta-estradiol induced Ca^{2+} influx via L-type calcium channels activates the SRC/ERK/cyclic-AMP response element binding protein signal pathway and BCL-2 expression in rat hippocampal neurons: a potential initiation mechanism for estrogen-induced neuroprotection. *Neuroscience*. v. 135, p. 59-72, 2005.

YU FH; CATTERALL WA. The VGL-channome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Science*. v.5, n. 253, p. 15, 2004.

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

XIAO H; SHI W; LIU S; WANG W; ZHANG B; ZANG YZ; XU L; LIANG Y. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Prevents Puromycin Aminonucleoside-Induced Apoptosis of Glomerular Podocytes by Activating the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt-Signaling Pathway. *American Journal of Nephrology*. v.30, p. 34–43, 2009.

XIAOYU Z; PAYAL B; MELISSA O; ZANELLO LP. 1 α ,25(OH)₂-Vitamin D₃ Membrane-Initiated Calcium Signaling Modulates Exocytosis and Cell Survival. *Steroid Biochem Mol Biol*. v.103, p. 457–461, 2007.

ZAMONER A; CORBELINI PF; FUNCHAL C; MENEGAZ D; SILVA FRMBS; PESSOA PUREUR. Involvement of calcium-

dependent mechanisms in T3-induced phosphorylation of vimentin of immature rat testis. *Life Sciences*. v. 77, p. 3321–3335, 2005.

ZAMONER A; ROYER C; BARRETO KP; PESSOA-PUREUR R; SILVA FR. Ionic involvement and kinase activity on the mechanism of nongenomic action of thyroid hormones on 45Ca^{2+} uptake in cerebral cortex from young rats. *Neuroscience Research*, v. 57, n. 1, p. 98-103, 2007.

ZAMONER A; PIEROZAN P; VIDAL LF; LACERDA BA; DOS SANTOS NG; VANZIN CS; PESSOA-PUREUR R. Vimentin phosphorylation as a target of cell signaling mechanisms induced by $1\alpha,25\text{-dihydroxyvitamin D}_3$ in immature rat testes. *Steroids*. v.73, n.14, p. 1400-1408, 2008.

ZANELLO LP; NORMAN AW. $1\alpha,25(\text{OH})_2$ vitamin D_3 -mediated stimulation of outward anionic currents in osteoblast-like ROS 17/2.8 cells. *Biochemical and Biophysical Research Community*. v. 225, p.551–556,1996.

ZANELLO LP; NORMAN AW. Multiple molecular mechanisms of $1,25(\text{OH})_2$ -vitamin D_3 rapid modulation. *Bone*. v.33, p. 71–79, 2003.

ZANELLO LP; NORMAN AW. Steroid hormone-regulated exocytosis in osteoblasts. *Biophysical Journal*. v. 86, p. 171a, 2004.

ZHANG Y; ZHANG J; STUDZINSKI GP. AKT Pathway Is Activated by $1, 25\text{-Dihydroxyvitamin D}_3$ and Participates In Its Anti-Apoptotic Effect and Cell Cycle Control in Differentiating HL60 Cells. *Cell Cycle*. v.5. n. 4, p. 447-451, 2006.

ZHANG X; ZANELLO L. Vitamin D Receptor–Dependent $1\alpha,25(\text{OH})_2$ Vitamin D_3 –Induced Anti-Apoptotic PI3K/AKT Signaling in Osteoblast. *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 23, n. 8, p. 1238-1248, 2008.

