



**AÇÃO DA INSULINA NO TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS  
NEUTROS EM CÓRTEX ADRENAL BOVINO**

**MARIA DA GRAÇA FAUTH**

**ORIENTADOR**

**Prof. Dr. GUILLERMO FEDERICO WASSERMANN**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, em convênio com o Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

**CURITIBA**  
1995

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**E**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

Ação da Insulina no Transporte de Aminoácidos Neutros em  
Córtex Adrenal Bovino

MARIA DA GRAÇA FAUTH

Orientador

Prof. Dr. GUILLERMO FEDERICO WASSERMANN

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, em convênio com o Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Curitiba  
1995

Aos meus pais Elsa M. Rausch e Carlos Rausch (in memoriam). Ao esposo Fernando e filhos Luiz Fernando e Luis Felipe pelo carinho, apoio e compreensão pelas muitas horas de afastamento que ocorreram no decorrer desse trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Guillermo Federico Wassermann pela compreensão, amizade e pela dedicada e incansável orientação, proporcionando-me um crescimento social, científico e cultural.

Aos colegas do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em especial aos colegas de laboratório, Marcelo, Kátia, Eloísa, Fátima, Laura, Esther, Marilene, Mirna, Adriana, Letícia, Karine, Christina, Evandro, Olavo, Ilo, Sérgio pela amizade, pelo alegre convívio e pelo apoio.

Ao professor Moacir Wajner, coordenador do Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo estímulo e apoio.

À funcionária Elsa Pires pela dedicada colaboração.

Aos colegas do Instituto de Química da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul pelo estímulo e pela amizade.

Ao professor e colega do Instituto de Química da PUCRS Ivo Vedana pelo estímulo, apoio, amizade e pela cooperação e compreensão enquanto diretor desse Instituto.

Às colegas do Centro de Toxicologia Aplicada da PUCRS pela amizade e apoio.

Aos colegas Marcelo e Eloísa pela colaboração nos experimentos.

À colega Kátia pela dedicada participação em todos os experimentos realizados e pelo auxílio no uso do microcomputador.

Aos familiares pela compreensão e pelo carinho recebidos.

À professora Andiara Rêgo e Silva pela revisão dos manuscritos.

Ao meu filho Luiz Fernando pelo auxílio na organização da bibliografia e no uso do microcomputador.

De forma póstuma ao Dr. Alberto Furtado Rhade pelo apoio e estímulo.

A todos que, de alguma maneira, colaboraram na realização desse trabalho.

Ao Departamento de Bioquímica e ao Departamento de Fisiologia da UFRGS e ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade de poder realizar esse trabalho.

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul pelo apoio recebido, proporcionando a realização desse trabalho.

À direção do Frigorífico Líder pela gentileza em fornecer as glândulas adrenais bovinas.

Às seguintes instituições pelo apoio financeiro: PROPESP-UFRGS, FAPERGS, CNPq, CAPES, FINEP.

## SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO.....	1
I.1. AS GLÂNDULAS ADRENAIS.....	1
I.1.1. O Córtex Supra-renal.....	6
I.1.1.1. Biossíntese de hormônios esteróides.....	10
I.1.1.2. Mineralocorticóides.....	14
I.1.1.3. Glicocorticóides.....	14
I.1.1.4. Esteróides sexuais.....	15
I.1.2. A Medula Adrenal.....	16
I.1.2.1. Estrutura.....	16
I.2. TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS.....	18
I.2.1. Introdução.....	18
I.2.2. Sistemas de Transporte de Aminoácidos.....	21
I.2.2.1. Sistema A.....	21
I.2.2.2. Sistema ASC.....	23
I.2.2.3. Sistema L.....	24
I.2.2.4. Sistema N.....	26
I.2.2.5. Sistema GLY.....	26
I.2.2.6. Sistema $\beta$ .....	27
I.2.2.7. Sistema $Ly^+$ .....	27
I.2.2.8. Sistema $Y^+$ .....	28
I.2.2.9. Sistema $X_c^-$ .....	28
I.2.3. Influência Iônica no Transporte de Aminoácidos.....	29
I.2.4. Ação Hormonal sobre o Transporte de Aminoácidos.....	33
I.3. INSULINA.....	41
I.3.1. Síntese.....	41
I.3.2. Secreção.....	44
I.3.3. Receptores.....	45
I.4. CÁLCIO: PRINCIPAIS FUNÇÕES NOS EVENTOS CELURARES.....	52
I.4.1. Concentração e Distribuição Celulares.....	52
I.4.2. Mecanismos das Ações do Cálcio como Segundo Mensageiro.....	56
I.4.3. Mecanismos de Controle da Concentração de Cálcio.....	57
I.4.3.1. $Ca^{2+}$ -ATPase.....	57
I.4.3.2. Sistema de troca $Na^+/Ca^{2+}$ e $H^+/Ca^{2+}$ .....	59
I.4.4. Canais de Cálcio.....	60
I.4.4.1. Generalidades.....	60
I.4.4.2. Classificação dos canais de cálcio.....	62
I.4.4.3. Canais iônicos operados por mecanismos mediados por receptor.....	66
I.4.4.4. Os canais de cálcio na glândula adrenal	68
I.4.4.5. Bloqueio dos canais de cálcio por metais de transição.....	71
I.5. POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO DO VANÁDIO.....	76
I.5.1. Generalidades.....	76

I.5.2. Interação com ATPases.....	78
I.5.3. Semelhanças e Diferenças entre as Ações do Íon Vanadato e Insulina .....	83
I.6. OBJETIVOS.....	91
II.MATERIAL E MÉTODOS.....	93
II.1. AS GLÂNDULAS.....	93
II.2. MEIOS DE INCUBAÇÃO.....	97
II.3. SUBSTÂNCIAS ADICIONADAS.....	99
II.3.1. Não Radioativas.....	99
II.3.2. Radioativas.....	100
II.4. INCUBAÇÃO.....	101
II.5. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS E EXPRESSÃO DOS RESULTADOS.....	101
II.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	103
II.7. GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	103
III RESULTADOS.....	107
III.1 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS PARA A REALIZAÇÃO DE EXPERIMENTOS EM TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS EM CÓRTEX ADRENAL BOVINO "IN VITRO".....	107
III.1.1. Influência do Tempo de Pré-incubação.....	107
III.1.2. Influência do Tempo de Incubação.....	108
III.1.3. Influência do Hormônio no Período de Pré-Incubação.....	112
III.1.4. Determinação da Dose de Insulina.....	113
III.2. IDENTIFICAÇÃO DOS SISTEMAS DE TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS NEUTROS PRESENTES NO CÓRTEX ADRENAL BOVINO.....	114
III.2.1. Efeito da Insulina sobre o Transporte de $(^{14}\text{C})\text{MeAIB}$ .....	115
III.2.2. Efeito da Insulina sobre o Transporte de $(^{14}\text{C})\text{AIB}$ .....	116
III.2.3. Captação de Cicloleucina.....	117
III.3. DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES CINÉTICAS $K_m$ E $V_{max}$ .....	119
III.4. EFEITO DOS BLOQUEADORES DOS CANAIS DE CÁLCIO SOBRE O TRANSPORTE BASAL DE AMINOÁCIDOS NEUTROS E SOBRE O ESTIMULADO PELA INSULINA.....	125
III.5. AÇÃO DO VANADATO DE SÓDIO SOBRE O TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS NEUTROS EM CÓRTEX ADRENAL BOVINO E EM ADRENAIS DE RATOS.....	128
IV. DISCUSSÃO.....	133
V. CONCLUSÕES.....	160
VI. ANEXO.....	162
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	171

## LISTA DE TABELAS

TABELA II.1. CONCENTRAÇÕES IÔNICAS DAS SOLUÇÕES PREPARADAS E AS CONCENTRAÇÕES IÔNICAS DOS LÍQUIDOS INTRA E EXTRA CELULARES.....	98
TABELA III.1. TEMPO DE PRÉ-INCUBAÇÃO (TEMPO DE INCUBAÇÃO: 120 MIN.).....	108
TABELA III.2. EFEITO DA DOSE DE INSULINA SOBRE A CAPTAÇÃO DE ( <sup>14</sup> C)MeAIB (TEMPO DE PRÉ-INCUBAÇÃO DE 90 MIN E TEMPO DE INCUBAÇÃO DE 120 MIN.....	114
TABELA III.3. EFEITO DA INSULINA SOBRE O TRANSPORTE DE ( <sup>14</sup> C)AIB EM MEIO KRb NORMAL E MEIO ASSÓDICO (KRb-COLINA).....	117
TABELA III.4. EFEITO DA INSULINA SOBRE O TRANSPORTE DE ( <sup>14</sup> C)AIB EM MEIO KRb NORMAL E MEIO SATURADO COM MeAIB NÃO MARCADO.....	118
TABELA III.5. CAPTAÇÃO DE ( <sup>14</sup> C)Cleu EM MEIO KRb NORMAL E MEIO ASSÓDICO (KRb-COLINA).....	119
TABELA III.6. CAPTAÇÃO DE ( <sup>14</sup> C)MeAIB EM DIFERENTES TEMPOS DE INCUBAÇÃO (P. I. = 45 MIN.).....	120
TABELA III.7. CAPTAÇÃO DE ( <sup>14</sup> C)MeAIB EM PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MeAIB NÃO MARCADO.....	124
TABELA III.8. EFEITO DA INSULINA SOBRE AS CONSTANTES CINÉTICAS NA CAPTAÇÃO DE ( <sup>14</sup> C)MeAIB NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO AMINOÁCIDO NÃO MARCADO.....	124
TABELA III.9. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO VANADATO DE SÓDIO SOBRE O pH DO TAMPÃO KRb.....	129
TABELA III.10. PERCENTUAL DE AUMENTO INDUZIDO PELA INSULINA, SOBRE O TRANSPORTE DE ( <sup>14</sup> C) MeAIB EM DIFERENTES VALORES DE pH.....	130



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA I.1	VISTA VENTRAL DOS RINS E GLÂNDULAS ADRENAIS BOVINAS.....	2
FIGURA I.2	GLÂNDULA ADRENAL DIREITA.....	3
FIGURA I.3	GLÂNDULA ADRENAL ESQUERDA.....	3
FIGURA I.4.	CORTE TRANSVERSAL DA GLÂNDULA ADRENAL ESQUERDA.....	4
FIGURA I.5	VIAS DE BIOSÍNTESE DOS HORMÔNIOS CÓRTICO SUPRA-RENAIS.....	13
FIGURA I.6	MODELO ESQUEMÁTICO DO RECEPTOR DE INSULINA NA MEMBRANA PLASMÁTICA.....	49
FIGURA II.1	PERFUSÃO DA GLÂNDULA COM KRb-GLICOSE.....	94
FIGURA II.2	CORTE DOS "SLICES".....	94
FIGURA II.3	FATIA INTEGRAL CONTENDO MEDULA E CÓRTEX E MEDULA E CÓRTEX SEPARADOS.....	95
FIGURA III.1	EFEITO DA INSULINA SOBRE A CAPTAÇÃO DE ( <sup>14</sup> C)MeAIB EM DIFERENTES TEMPOS DE PRÉ-INCUBAÇÃO.....	109
FIGURA III.2	CAPTAÇÃO DE ( <sup>14</sup> C)MeAIB EM DIFERENTES TEMPOS DE INCUBAÇÃO.....	110
FIGURA III.3	CAPTAÇÃO DE ( <sup>14</sup> C)AIB EM DIFERENTES TEMPOS INCUBAÇÃO.....	111
FIGURA III.4	INFLUÊNCIA DO TEMPO DE INCUBAÇÃO SOBRE A CAPTAÇÃO DE ( <sup>14</sup> C)MeAIB BASAL E ESTIMULADA PELA INSULINA.....	112
FIGURA III.5	INFLUÊNCIA DA INSULINA NO PERÍODO DE PRÉ-INCUBAÇÃO.....	113
FIGURA III.6	AÇÃO DA INSULINA SOBRE A CAPTAÇÃO DE ( <sup>14</sup> C)MeAIB EM KRb NORMAL E KRb-COLINA.....	116
FIGURA III.7	CAPTAÇÃO BASAL DE ( <sup>14</sup> C)MeAIB EM DIFERENTES	

	TEMPOS DE INCUBAÇÃO (RELAÇÃO T/M).....	121
FIGURA III.8	CAPTAÇÃO DE ( <sup>14</sup> C)MeAIB EM DIFERENTES TEMPOS DE INCUBAÇÃO (nmol/g tec).....	121
FIGURA III.9	AÇÃO DA INSULINA SOBRE O TRANSPORTE DE ( <sup>14</sup> C)MeAIB NOS TEMPOS DE 8 E 15 MINUTOS.....	123
FIGURA III.10	CAPTAÇÃO ( <sup>14</sup> C)MeAIB EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MeAIB NÃO MARCADO NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE INSULINA.....	123
FIGURA III.11	GRÁFICO DE DUPLO RECÍPROCO DA CAPTAÇÃO DE ( <sup>14</sup> C)MeAIB EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO AMINOÁCIDO NÃO MARCADO NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE INSULINA.....	125
FIGURA III.12	EFEITO DO COBALTO SOBRE A CAPTAÇÃO DE ( <sup>14</sup> C)MeAIB BASAL E ESTIMULADA.....	126
FIGURA III.13	EFEITO DO NÍQUEL SOBRE A CAPTAÇÃO DE ( <sup>14</sup> C)MeAIB BASAL E ESTIMULADA.....	127
FIGURA III.14	EFEITO DO VERAPAMIL SOBRE A CAPTAÇÃO DE ( <sup>14</sup> C)MeAIB BASAL E STIMULADA.....	128
FIGURA III.15	INFLUÊNCIA DO pH NA CAPTAÇÃO DE ( <sup>14</sup> C)MeAIB BASAL E ESTIMULADA.....	131
FIGURA III.16	INIBIÇÃO DA CAPTAÇÃO DE ( <sup>14</sup> C)MeAIB BASAL E ESTIMULADA SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES MOLARES DE VANADATO DE SÓDIO, EM CÓRTEX ADRENAL BOVINO.....	131
FIGURA III.17	INIBIÇÃO DA CAPTAÇÃO BASAL E ESTIMULADA DE ( <sup>14</sup> C)MeAIB SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES MOLARES DE VANADATO DE SÓDIO, EM GLÂNDULAS ADRENAIS DE RATO.....	132
FIGURA IV.1	ESTRUTURA DE ALGUMAS DROGAS QUE LIGAM-SE A RECEPTORES ASSOCIADOS A CANAIS DE CÁLCIO (HOSEY, LAZDUNSKI, 1988).....	148

## LISTA DE ABREVIATURAS

(<sup>14</sup>C)-AIB - ácido α-aminoisobutírico  
(<sup>14</sup>C)-MeAIB - ácido α-metil aminoisobutírico  
(<sup>14</sup>C)cLeu - ácido 2 amino-ciclopentano-1-carboxílico, cicloleucina  
(Bu)<sub>2</sub> cAMP - dibutiril adenosina monofosfato cíclico  
μCi - micro Curie  
μg - micro grama  
μl - micro litro  
μM - micro Molar  
μmol - micro mol  
°C - grau Celsius  
1,2 D-G - 1,2 diacilglicerol  
ACTH - hormônio adrenocórticotrófico  
ADP - adenosina difosfato  
ATP - adenosina trifosfato  
BCH - ácido 2 aminobiciclo-[2,2,1]-heptano-2 carboxílico  
cAMP - adenosina monofosfato cíclico  
cm - centímetro  
cpm - contas por minuto  
CRH - hormônio liberador de corticotropina  
DHEA - desidroepiandrosterona  
DHP - dihidropiridina  
DIDS - 4, 4 di-isotiocianato-2, 2 dissulfônico ácido stilbeno  
dl - decilitro  
DNA - ácido desoxi-ribonucléico  
E.P. - erro padrão  
FBPase - 2,6 bifosfatase  
FSH - hormônio folículo estimulante  
g - grama  
GABA - ácido δ aminobutírico  
GDP - guanosina difosfato  
G<sub>n</sub>RH - hormônio liberador gonadotrófico  
GTP - guanosina trifosfato  
HCG - gonadotrofina coriônica humana  
IBMX - isobutilmetilxantina  
IGF I - insulin like growth factor I  
IP<sub>3</sub> - inositol trifosfato  
KDa - quilodalton  
kg - quilograma  
K<sub>i</sub> - constante de inibição  
K<sub>m</sub> - constante de Michaelis  
KRB - Krebs-Ringer-bicarbonato

KRb-colina - Krebs-Ringer-bicarbonato com colina (meio assódico)  
KRb-glicose - Krebs-Ringer-bicarbonato com 0,2% de glicose  
KRb-glicose-colina - Krebs-Ringer-bicarbonato com 0,2% de glicose e colina (meio assódico)  
l - litro  
L-PK - piruvato quinase tipo L  
LDL - lipoproteínas de baixa densidade  
LH - hormônio luteinizante  
LHRH - hormônio liberador do hormônio luteinizante  
M - Molar  
mCi - mili Curie  
mg - miligrama  
min. - minuto  
ml - mililitro  
mM - mili molar  
mm - milímetro  
mmol - milimol  
mRNA - ácido ribonucléico mensageiro  
mU - mili unidade  
mV - mili Volt  
nmol nanomol  
ng - nanograma  
NMDA - N-metil-D-aspartato  
pg - picograma  
PFK-2 - 6 fosfofruto 2 quinase  
POMC - pro-opio-melanocortina  
ppb - parte por bilhão  
ppm - parte por milhão  
RNA - ácido ribonucléico  
s - segundo  
T/M - tecido/meio  
TRH - hormônio liberador tireotrófico  
TTP<sup>+</sup> - cátion tetrafenilfosfônio  
TTX - tetradotoxina  
UI - unidade internacional  
V<sub>max</sub> - velocidade máxima

## RESUMO

A ação estimulatória da insulina no transporte de aminoácidos neutros em glândulas adrenais de rato, foi demonstrado em 1989 por WASSERMANN e colaboradores.

A partir desses conhecimentos decidiu-se investigar o transporte de aminoácidos neutros, a ação da insulina e o envolvimento desse fenômeno com os canais de cálcio dependentes de voltagem, em córtex adrenal bovino. Decidiu-se, também, investigar a ação do vanadato de sódio, um agente com atividade "insulin-like", sobre a captação de aminoácidos neutros pelas células adreno-corticais.

Realizaram-se experimentos preliminares que determinaram as condições ótimas para a realização dos experimentos "in vitro" como o tempo de pré-incubação, tempo de incubação, dose de insulina e a integridade do tecido.

Foram utilizados como aminoácidos modelos, não metabolizáveis, o ácido  $\alpha$ -metil aminoisobutírico ( $^{14}\text{C}$ )MeAIB, o ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico ( $^{14}\text{C}$ )AIB e a cicloleucina ( $^{14}\text{C}$ )Cleu. Os resultados foram expressos pela relação entre a radioatividade no tecido e a radioatividade no meio (T/M).

"Slices" com cerca de 0,5mm de espessura foram pré-incubados e incubados em tampão Krebs-Ringer-bicarbonato-glicose (KRb-glicose) ou tampão KRb-glicose-colina (meio assódico), na presença ou ausência de insulina e dos fatores de teste.

Nos experimentos realizados com o objetivo de verificar o envolvimento dos canais de cálcio dependentes de voltagem com a captação basal de aminoácidos e com a ação da insulina, foram utilizados bloqueadores desses canais como, verapamil, níquel e cobalto.

O vanadato de sódio apresentou um efeito inibitório sobre o transporte de aminoácidos tanto em córtex adrenal bovino como em glândula adrenal de rato.

Os resultados encontrados permitem indicar que o transporte de aminoácidos neutros em córtex adrenal bovino ocorre preferentemente através do sistema A que sofre a ação estimulatória da insulina. A cinética da ação hormonal no transporte de aminoácidos em córtex adrenal está caracterizada por um aumento de  $V_{max}$  sem modificações significativas do  $K_m$ . Os canais de cálcio dependentes de voltagem estão envolvidos tanto com a captação basal como com a ação estimulatória do hormônio. O vanadato de sódio não exerce ação "insulin-like" sobre esse fenômeno, ao contrário, enquanto a insulina apresenta uma ação estimulatória, o vanadato exerce um efeito inibitório sobre

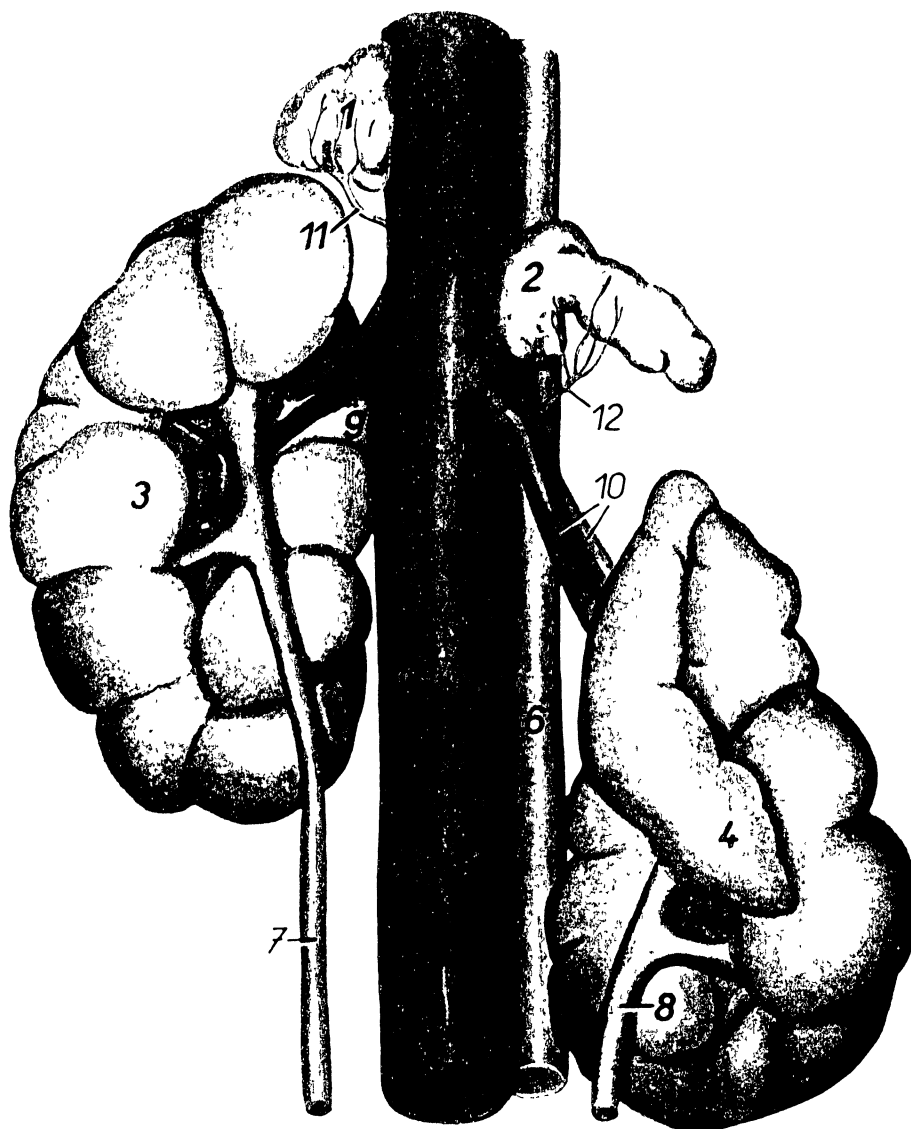
o transporte de aminoácidos através da membrana das células adreno-corticais.

## **I. INTRODUÇÃO**

### **I.1. As Glândulas Adrenais**

As glândulas adrenais constituem um par de estruturas piramidais aderidas à parte superior dos rins. Diferem na forma, localização e relação, requerendo, portanto, descrições separadas. Em bovino adulto a glândula adrenal direita possui grosseiramente a forma de um "V", está encostada à superfície medial do polo cranial do rim direito. A superfície medial da glândula é achatada, a superfície lateral é convexa e situa-se parcialmente na impressão renal do fígado. A superfície ventral da glândula é sulcada pela passagem da veia cava caudal. A base da glândula é irregularmente côncava e contata obliquamente com o polo cranial do rim. Do lado contrário, o ápice aguçado está localizado em um ângulo entre a veia caudal e a borda dorsal do fígado. A adrenal direita é mais leve que a esquerda, pesando de 12g a 13g no bovino adulto e medindo aproximadamente 8cm de comprimento, 3cm de largura e 2cm de espessura.





**FIGURA I.1.** VISTA VENTRAL DOS RINS E GLÂNDULAS ADRENAIS BOVINAS (POPESKO, 1985).

1- Glândula adrenal direita, 2-Glândula adrenal esquerda, 3-Rim direito, 4-Rim esquerdo, 5-Veia cava caudal, 6-Aorta, 7-Ureter direito, 8-Ureter esquerdo, 9-Artéria renal direita e veia renal direita, 10-Artéria e veia renal esquerda, 11-Ramo supra-renal caudal da artéria renal direita, 12-Ramo supra-renal caudal da artéria renal esquerda.

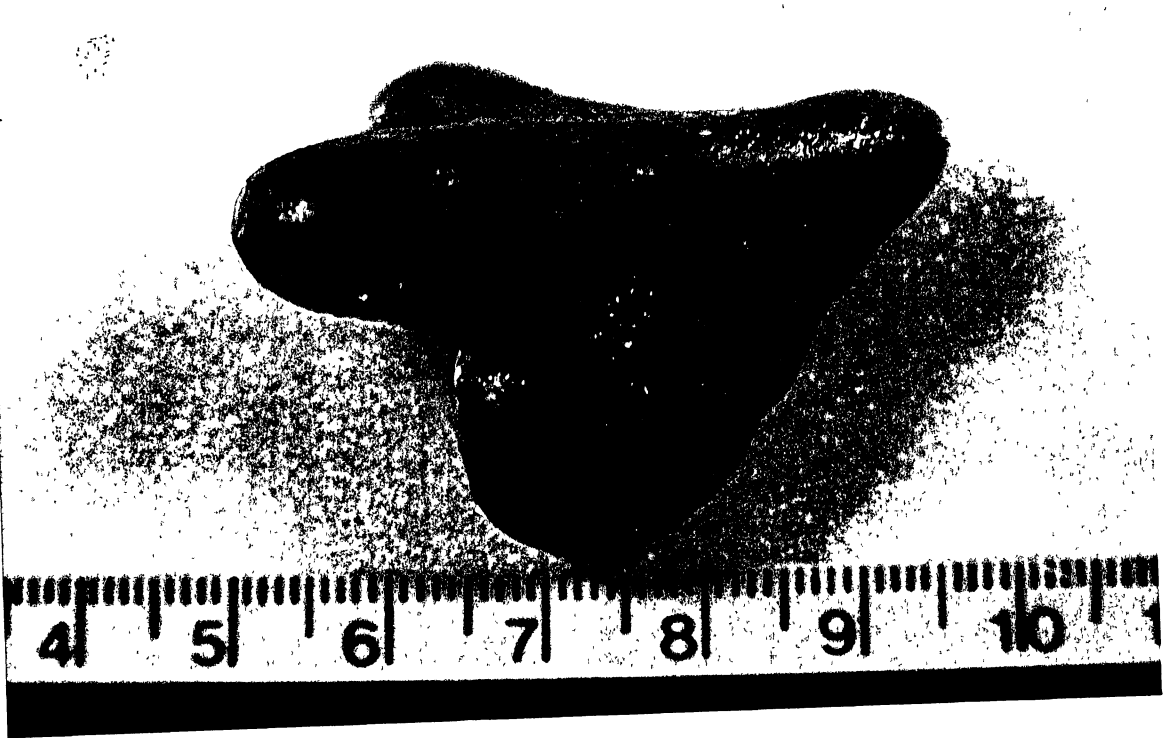


FIGURA I.2. GLÂNDULA ADRENAL DIREITA

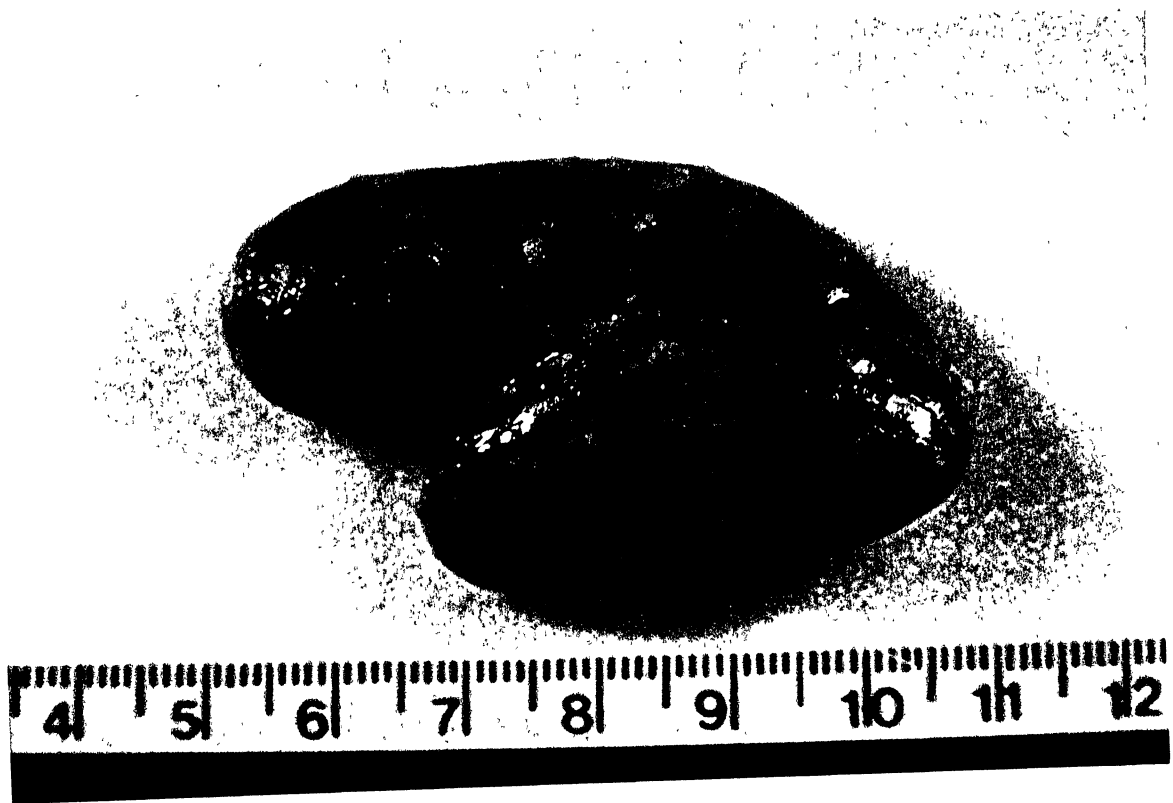


FIGURA I.3. GLÂNDULA ADRENAL ESQUERDA.



**FIGURA I.4.** CORTE TRANSVERSAL DA GLÂNDULA ADRENAL ESQUERDA.

A glândula adrenal esquerda possui a forma de um "C", está localizada sobre a linha mediana justamente caudal à artéria mesentérica cranial e sobre a face medial da veia cava caudal aproximadamente 5 a 8 cm cranial ao rim esquerdo. A superfície lateral está relacionada com o saco dorsal do rúmen. A superfície medial está relacionada com a veia cava caudal. No bovino adulto a glândula pode medir 8cm de comprimento, 6cm de largura e 3cm de espessura, pesando cerca de 14,5g.

Os nervos aferentes para as glândulas adrenais de animais domésticos são quase todos simpáticos, originando-

se dos últimos e poucos nervos torácicos espinhais. Eles alcançam a adrenal através do plexo adrenal que é derivado primariamente do plexo celíaco. Aproximadamente 50 a 70% são fibras pré-ganglionares mielinizadas as quais terminam nas células medulares. O parênquima córtico-adrenal não é inervado. Feixes nervosos são muito evidentes na medula adrenal de boi (GETTY, 1981).

As glândulas adrenais dos mamíferos consistem em duas glândulas endócrinas distintas funcionalmente dentro de uma única cápsula. Possuem dois tipos distintos de tecidos constituindo a medula e o córtex. A medula é formada pelo tecido cromafínico, assim chamado porque suas células são coradas com dicromato de potássio. Produz adrenalina e noradrenalina. È derivada da simpatogônia que migra da crista neural sendo de origem ectodermal. Em anfíbios, répteis e aves as células cromafínicas são amplamente distribuídas através do tecido cortical. Nos mamíferos a medula é envolvida pelo córtex e então encapsulada (ORTH, KOVACS, DEBOLD, 1992).

O córtex é indispensável para a vida, estando envolvido em muitos processos fisiológicos da economia celular. Deriva-se do epitélio celômico e tem origem mesodermal. O reconhecimento da importância vital do córtex supra-renal remonta a 1855 quando Thomas Addison definiu a

síndrome que leva seu nome, provocada pela insuficiência de esteróides (cortisol e aldosterona), enquanto que a hiperfunção do córtex caracteriza a Síndrome de Cushing com muitas manifestações deletérias para o organismo.

Nos últimos 35 anos tornou-se possível o uso de técnicas experimentais mais sofisticadas, o que permitiu um aumento do conhecimento da ação dos hormônios esteróides, bem como os mecanismos que regulam os seus níveis plasmáticos e a fisiopatologia das síndromes de excesso ou falta desses esteróides. Os hormônios esteróides ligam-se a receptores intracelulares e o complexo resultante liga-se ao DNA nuclear, regulando a transcrição de gens específicos cuja produção media os efeitos dos hormônios. Assim, muitos estudos tem fornecido informações não somente sobre a atividade secretora do córtex adrenal mas também sobre os mecanismos pelos quais a expressão dos gens é regulada.

#### I.1.1. O Córtex Supra-renal

O córtex constitui aproximadamente 80% do peso e volume da glândula, sendo formado por células epitelióides dispostas em cordões ou colunas contínuas, separadas por capilares. Produz mais de 50 diferentes esteróides sendo

fonte de glicocorticóides, mineralocorticóides e também de andrógenos e estrógenos.

As células adrenocorticais diferenciam-se muito cedo no desenvolvimento fetal, aproximadamente entre a quarta e a sexta semana de vida fetal. A estrutura cortical cresce rapidamente excedendo em até três vezes o tamanho do rim. O córtex adrenal fetal regride no último mês de gestação, sendo esse processo acelerado logo após o nascimento. Em humanos adultos o tamanho da adrenal é somente cerca de 1/30 do tamanho do rim (ORTH, KOVACS, DEBOLD, 1992).

Estruturalmente, o córtex está dividido em três zonas: glomerulosa, fasciculada e reticular.

A zona glomerulosa é a mais extensa, adjacente à cápsula da glândula, e suas células estão dispostas em massas irregulares. A microscopia eletrônica revelou, nessas células, a existência de numerosas e longas mitocôndrias com cristas lamelares que diferem nitidamente da aparência das mitocôndrias de outras zonas corticais. A aldosterona é específica e exclusivamente elaborada pelas células da zona glomerulosa, na maioria dos mamíferos.

A zona mediana é chamada zona fasciculada; os cordões ou colunas de células apresentam-se retilíneos e dispostos

radialmente. Essa zona é a mais extensa da adrenal e suas células apresentam um grande número de gotas lipídicas e um abundante retículo endoplasmático liso. As mitocôndrias variam em tamanho e são frequentemente maiores que as mitocôndrias das zonas reticular e glomerulosa. A zona fasciculada é a principal fonte de cortisol na maioria dos mamíferos, e de corticosterona em muitos roedores, sendo que em bovinos adultos produz tanto cortisol como corticosterona.

A zona cortical mais interna é chamada zona reticular onde os cordões ou colunas de células formam uma rede irregular. Essa células possuem um número menor de gotas lipídicas e suas mitocôndrias são parecidas com as da zona fasciculada. A zona reticular produz esteróides sexuais, andrógenos e estrógenos, além de seus precursores.

Apesar do córtex adrenal estar dividido em distintas zonas, sabe-se que a glândula, como um todo, reage prontamente a mudanças na pressão sanguínea, nos eletrólitos e responde ao stress com liberação de hormônios. Esse comportamento supõe a existência de um efetivo sistema de comunicação celular, o qual poderia ser atribuído à presença de "gap junctions (BLACK et al. 1979).

As "gap junctions" permitem a passagem de pequenas moléculas hidrossolúveis do citoplasma de uma célula para o de outra. Dessa maneira, ligam as células tanto elétrica como metabolicamente e ajudam a coordenar a função do órgão. Pequenas moléculas fluorescentes injetadas numa célula passam rapidamente para as células adjacentes sem escoar pelo espaço extracelular, demonstrando a comunicabilidade entre as mesmas.

A permeabilidade das "gap junctions" é rápida e reversivelmente diminuída por processos experimentais que baixem o pH intracelular ou aumentem a concentração intracelular de cálcio livre (TURIN, WARNER, 1980), sendo aumentada com a concentração intracelular de cAMP. Essas observações confirmam a possibilidade de que as "gap junctions" são estruturas dinâmicas cuja permeabilidade pode ser controlada pelas células que as formam.

USADEL e colaboradores em 1993 demonstraram a presença de "gap junctions" em córtex adrenal de rato assim como em culturas primárias de células adrenocorticais bovinas. Na transição entre as zonas glomerulosa e fasciculada as comunicações ocorrem entre os dois tipos de células bem como em células adjacentes da mesma zona. USADEL e colaboradores em 1993 sugeriram que as "gap junctions" exercem um importante papel na rápida mediação de sinais



parácrinos entre as células adrenocorticais. Assim, estando as células das diferentes zonas conectadas entre si, sinais parácrinos podem ser transmitidos por toda a glândula realçando o conceito de uma unidade funcional.

#### I.1.1.1. Biossíntese de hormônios esteróides

Os hormônios esteróides produzidos pelo córtex adrenal são membros de um grupo de compostos derivados de uma estrutura básica, o ciclopentano perhidrofenantreno. Esses compostos estão amplamente distribuídos tanto entre os vegetais como entre os animais, existindo muitos esteróides não hormonais como o ergosterol, colesterol, ácidos biliares e outros. Modificações químicas introduzidas na estrutura básica desses compostos, como insaturação entre carbonos, adição de grupos hidroxila, cetônicos ou outros grupos, determinam as suas diferentes funções biológicas. O colesterol é a fonte de todos os hormônios esteróides, sendo que o principal suprimento para a esteroidogênese é o colesterol circulante no plasma ligado às lipoproteínas de baixa densidade (LDL).

As células produtoras de hormônios esteróides apresentam receptores para as lipoproteínas de baixa densidade, localizados na membrana plasmática em estruturas chamadas "coated pits" (ORTH, KOVACS, DEBOLD, 1992). Após a

ligação, as "coated pits" juntamente com o colesterol e receptor sofrem endocitose na forma de vesículas. Em seguida os componentes protéicos são hidrolizados liberando o colesterol não esterificado. Esse poderá ser utilizado imediatamente na síntese dos hormônios esteróides ou ser reesterificado e armazenado em vacúolos lipídicos.

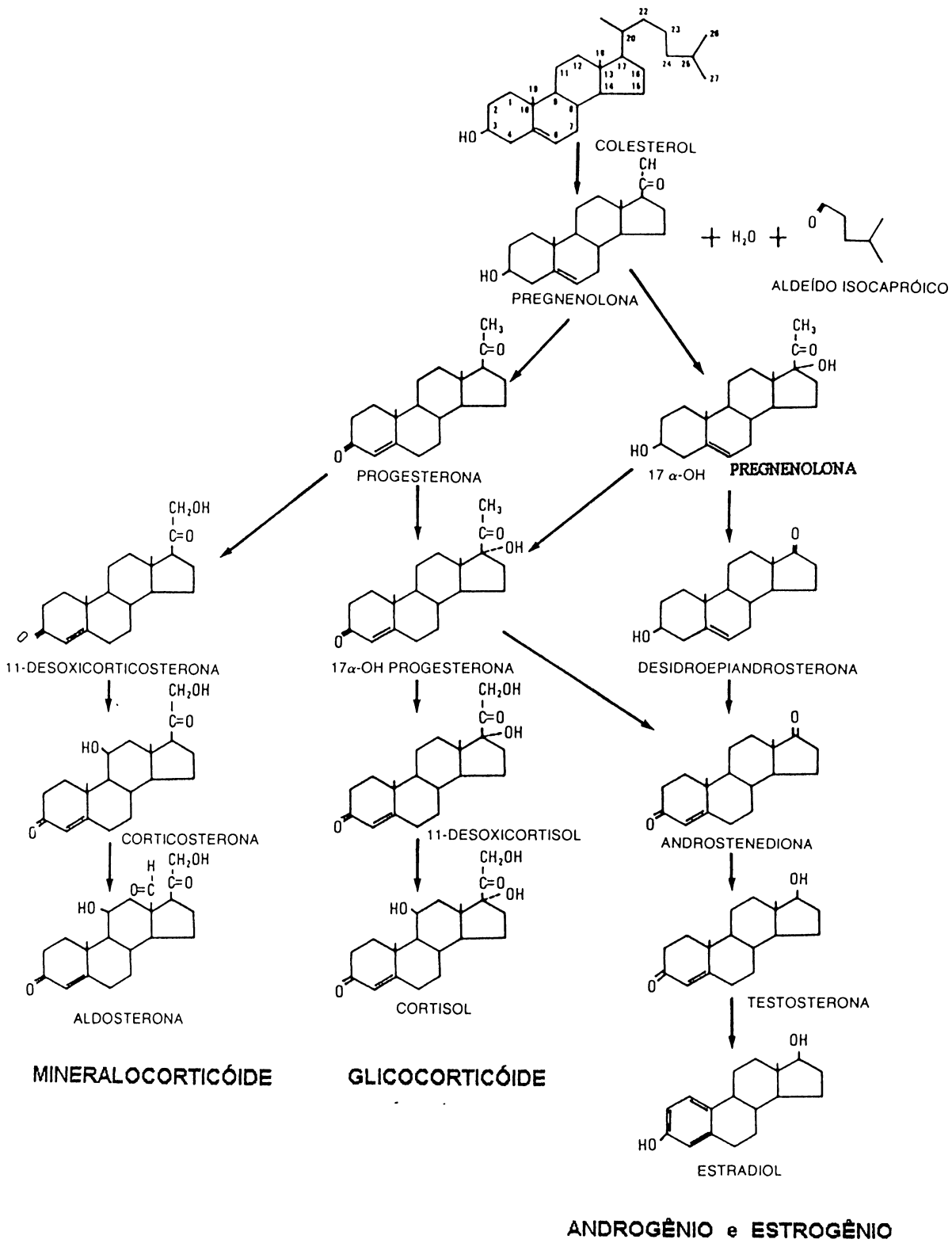
O córtex adrenal também sintetiza colesterol "de novo" a partir de acetil coenzima A. Sob condições normais cerca de 20% da capacidade esteroidogênica depende da biossíntese intracelular de colesterol.

A maioria das reações envolvidas na síntese dos hormônios esteróides é catalizada por enzimas do citocromo P450, localizadas nas membranas do retículo endoplasmático e das mitocôndrias. Assim a primeira etapa da síntese de esteróides consiste na transformação do colesterol à pregnenolona e aldeído isocapróico. Essa etapa é catalizada pela enzima, ligada ao citocromo P<sub>450</sub>, de clivagem da cadeia lateral do colesterol localizada na membrana interna da mitocôndria (BEST, TAYLOR, 1989).

Em todos os tecidos produtores de hormônios esteróides como supra-renal, ovários e testículos, que estão sob o controle de hormônios tróficos como ACTH, LH e HCG, a etapa limite da esteroidogênese é justamente a formação da

pregnenolona. Essa etapa requer constante síntese protéica e pode envolver a formação de polifosfoinositol para facilitar a interação entre enzima e substrato. De outra maneira pode-se afirmar que a limitação dessa etapa consiste na disponibilidade do substrato, colesterol, para a enzima de clivagem mitocondrial. O ACTH e outros estímulos esteroidogênicos aumentam a interação do substrato com a enzima no sentido de aumentar a produção de esteróides.

Após a formação de pregnenolona seguem-se diferentes rotas que levarão à formação de mineralocorticóides, glicocorticóides e esteróides sexuais (BEST, TAYLOR, 1989).



**FIGURA 1.5.** VIAS DE BIODISSÍNTESE DOS HORMÔNIOS CÓRTICO-SUPRA-RENAIS.

#### I.1.1.2. Mineralocorticóides

A síntese de mineralocorticóides ocorre, na sua maioria, na zona glomerulosa. O principal mineralocorticóide e o principal hormônio esteróide retentor de sódio na grande maioria dos mamíferos, é a aldosterona, cuja produção é regulada pelo sistema renina-angiotensina, ACTH e potássio. A aldosterona exerce no mínimo 95% da atividade mineralocorticóide do córtex supra-renal, sendo o restante exercido pela corticosterona e pela pequena quantidade de desoxicorticosterona secretada pela zona glomerulosa.

#### I.1.1.3. Glicocorticóides

O cortisol (hidrocortisona) e corticosterona são os principais glicocorticóides produzidos pela zona fasciculada do córtex adrenal. O cortisol é predominante no homem. Em alguns roedores a predominância é da corticosterona e nos ruminantes encontram-se quantidades proporcionais de ambos esteróides. Cerca de 29 esteróides são secretados pela supra-renal bovina, dos quais apenas sete são conhecidos como biologicamente ativos. Em outras espécies mais amplamente estudadas foram encontrados cerca de 50 diferentes esteróides. Cortisol e corticosterona são os principais glicocorticóides produzidos pelas adrenais de

bovinos adultos. A proporção entre cortisol e corticosterona no sangue venoso supra-renal é de 1:1 em bovinos, 15-20:1 em ovinos e de 0,05:1 em ratos e coelhos. Em bezerros recém nascidos o principal glicocorticóide produzido é o cortisol, sendo que a secreção de corticosterona inicia somente a partir do décimo dia de vida (McDONALD, 1978).

#### I.1.1.4. Esteróides sexuais

Os esteróides sexuais são sintetizados pelas células da zona reticular a partir da 17-hidroxiprogesterona e da 17-hidroxipregnenolona (ver figura 5). A cadeia lateral dos carbonos 20 e 21 são removidas originando, respectivamente, desidroepiandrosterona (DHEA) e androstenodiona. A DHEA é sulfatada por uma enzima específica. As formas livre e sulfatada da DHEA são os principais andrógenos produzidos pela glândula adrenal.

## I.1.2. A Medula Adrenal

### I.1.2.1. Estrutura

A medula adrenal e o sistema nervoso simpático formam uma unidade anatômica e fisiológica, freqüentemente chamada de sistema simpatomedular. As células com grânulos cromafínicos da medula supra-renal são equivalentes aos neurônios pós-ganglionares. A medula é inervada por fibras pré-ganglionares colinérgicas derivadas do nervo esplâncnico. A acetilcolina liberada desses neurônios pré-ganglionares ativa as células da medula no sentido de sintetizar e secretar catecolaminas: adrenalina e noradrenalina.

A noradrenalina representa o principal neurotransmissor ou mediador químico secretado pelas terminações nervosas em nível de sistema nervoso central e dos tecidos, sendo portanto neurotransmissor de ação localizada. A adrenalina, por outro lado, é o principal produto das células cromafínicas. É secretada para a circulação sistêmica, exercendo efeito sobre todos os tecidos e órgãos que possuam receptores específicos. Cerca de 80% da secreção da medula adrenal é representada pela adrenalina e 20% pela noradrenalina. É importante considerar que a adrenalina e a noradrenalina liberadas

pela medula estimulam estruturas não enervadas diretamente pelo sistema nervoso simpático podendo a adrenalina, por exemplo, intensificar o metabolismo celular.



## **I.2. Transporte de Aminoácidos**

### I.2.1. Introdução

O conteúdo celular encontra-se separado do meio extracelular pela membrana plasmática, constituída de proteínas e de uma bicamada lipídica servindo, portanto, como uma barreira para a maioria das moléculas polares. Por essa razão, as células possuem maneiras especiais de transferir moléculas polares através da membrana. Assim como em membranas lipídicas artificiais, as membranas celulares permitem que a água e outras pequenas moléculas polares, bem como moléculas apolares, atravessem a membrana por simples difusão física.

As membranas celulares apresentam proteínas específicas responsáveis pela transferência de um soluto ou de um grupo de solutos polares, como por exemplo, íons, aminoácidos, açúcares, nucleotídeos e muitos metabólitos celulares. Essas proteínas "proteínas carreadoras", ocorrem em muitas formas e em todos os tipos de membranas biológicas.

Algumas proteínas transportadoras transferem apenas um soluto de um lado a outro da membrana, constituindo o

sistema "uniport". Outras funcionam como um sistema de cotransporte onde a transferência de um soluto depende simultaneamente da transferência de um segundo soluto. Quando ocorre na mesma direção constitui o chamado "symport" e quando em direções opostas o "antiport".

Muitas proteínas transportadoras permitem o movimento de solutos específicos através da membrana pelo sistema chamado "transporte passivo". Quando a molécula é apolar, sua concentração determina a direção do transporte, entretanto, quando o soluto é polar, a direção do transporte é determinada por seu gradiente de concentração e pelo gradiente elétrico, ou seja, pelo seu gradiente eletroquímico. Algumas proteínas transportadoras que mediam o transporte passivo formam canais aquosos-"canais protéicos", permitindo que solutos de tamanho apropriado e carregados atravessem a bicamada por difusão simples. Outras proteínas transportadoras, os "carriers protéicos", ligam-se a moléculas específicas transferindo-as através da membrana, num processo chamado "difusão facilitada".

Algumas proteínas funcionam como bombas que dirigem ativamente o movimento de solutos específicos contra seu gradiente eletroquímico pelo chamado "transporte ativo". Ao contrário do transporte passivo que pode ocorrer espontaneamente, o transporte ativo está firmemente ligado

a uma fonte de energia metabólica. Mais frequentemente isso envolve hidrólise de ATP ou cotransporte de  $\text{Na}^+$  e  $\text{H}^+$ , diminuindo seus gradientes eletroquímicos.

As proteínas transportadoras especificamente ligam e transferem a molécula solúvel através da bicamada lipídica. Esse processo é semelhante à reação enzima-substrato. A molécula carreadora possui um sítio de ligação específico para o soluto. Quando o carreador está saturado, isto é, todos os sítios estão ocupados, a velocidade de transporte é máxima. Essa velocidade é a  $V_{\text{max}}$ , característica específica de cada molécula carreadora, assim como a constante de ligação,  $K_m$ , igual à concentração do soluto quando a velocidade de transporte é a metade do valor máximo. A ligação do soluto pode ser bloqueada por inibidores competitivos, que competem pelo sítio de ligação ou por inibidores não competitivos que ligam-se a outro sítio diferente do sítio de ligação do substrato e alteram a estrutura da molécula carreadora.

A maioria dos aminoácidos é transportada ativamente para o interior da célula chegando a atingir concentrações de 2 a 20 vezes maiores que no meio extracelular. O transporte de aminoácidos está ligado ao gradiente eletroquímico de sódio, estabelecido pelo transporte ativo para fora das células, o que proporciona a energia para o

transporte ativo do soluto orgânico. Assim, a molécula transportadora de aminoácido também possui um sítio de ligação para o sódio. A interação do íon com a molécula carreadora aumenta a afinidade do sítio para o aminoácido. Uma vez que a concentração de sódio intracelular é baixa, a possibilidade de sua interação com a molécula carreadora no interior da célula é reduzida. Assim o gradiente de sódio através da membrana conduz a uma assimetria nas afinidades do carreador do aminoácido, resultando no transporte ativo do aminoácido para o interior da célula.

Os sistemas de transporte mediados estão sujeitos a regulação hormonal. Vários hormônios atuam sobre o transporte mediado de solutos específicos. Em alguns casos o efeito do hormônio consiste em alterar a afinidade da molécula carreadora pelo soluto transportado. Em outras situações, o hormônio estimula a síntese de novas proteínas transportadoras de modo a aumentar a capacidade máxima de transporte.

## I.2.2. Sistemas de Transporte de Aminoácidos

### I.2.2.1. Sistema A

O sistema A media o transporte de aminoácidos neutros, zwitteriônicos. O sistema aceita aminoácidos

alifáticos lineares com cadeia lateral curta como glicina, alanina, treonina, asparagina, glutamina, serina, metionina e iminoácidos como a prolina. Aceita a alquilação do grupo  $\alpha$ -amino e media o transporte de análogos não metabolizáveis como o ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico ( $\alpha$ -AIB) e o seu derivado N-metilado,  $\alpha$ -metilaminoisobutírico ( $\alpha$ -MeAIB) (GAZZOLA et al., 1980). É sódio dependente e tem sua atividade alterada em função do pH extracelular. O transporte por esse sistema está sujeito à transinibição por substratos intracelulares.

RIGGS e PAN (1972) usando preparações de útero de ratas e, GUIDOTTI e colaboradores (1976) em células de coração de embrião de pinto, demonstraram que o sistema A sofre regulação adaptativa, isto é, quando estas células foram incubadas em meio livre de aminoácidos, houve um aumento da atividade do sistema, um transporte induzido por privação. O aumento da atividade do sistema por privação de aminoácidos requer, aparentemente, síntese de DNA e de proteínas. Inibidores de síntese protéica inibem essa resposta em vários tipos de células. Assim, GAZZOLA, DALL'ASTA e GUIDOTTI (1981) utilizando cicloheximida e actinomicina D, em cultura de fibroblastos humanos, concluíram que a atividade do sistema A pode ser regulada a nível transcricional.

A regulação do sistema A é complexa, sendo que sua atividade pode ser modulada por hormônios, fatores de crescimento, condições nutricionais e gradiente eletroquímico de sódio.

O sistema A é o principal sistema de transporte de aminoácidos neutros na maioria dos tipos celulares de aves e mamíferos, com exceção de eritrócitos e reticulócitos.

#### I.2.2.2. Sistema ASC

O sistema ASC foi caracterizado por Christensen em 1967, em células de Ehrlich.

É um sistema sódio dependente e praticamente restrito à alanina, serina e cisteína. Diferencia-se do sistema A por sua relativa insensibilidade à mudança de pH externo, por sua alta estereoespecificidade e pela intolerância a substratos N-metilados, não havendo alteração na sua atividade em presença de excesso de ácido  $\alpha$ -metilaminoisobutírico e N-metilalanina. Sofre transestimulação por aminoácidos intracelulares, não sofre regulação adaptativa e também não está sujeito à regulação hormonal.

O sistema ASC atua em diferentes tipos celulares, mas sua participação quantitativa, embora variável, é pouco expressiva.

#### I.2.2.3. Sistema L

O sistema L media o transporte de aminoácidos de cadeia lateral ramificada ou aminoácidos aromáticos. Assim, apresenta estereoespecificidade para leucina, isoleucina, valina, fenilalanina e os análogos não metabolizáveis 2-amino-biciclo-[2,2,1]-heptano-2-carboxílico (BCH) e ácido 2-amino-ciclopentano-1-carboxílico (cicloleucina - cLeu). Entretanto, quase todos os aminoácidos neutros são transportados em maior ou menor extensão, mesmo quando esses são substratos preferenciais de outros sistemas (GUIDOTTI, BORGHETTI, GAZZOLA., 1978).

O transporte pelo sistema L é independente de sódio, o que constitui uma importante diferença dos outros sistemas de transporte de aminoácidos neutros. As taxas de distribuição em equilíbrio de aminoácidos transportados pelo sistema L são muito menores do que aquelas observadas no transporte de aminoácidos por sistemas dependentes de sódio. Essas observações concordam com o conceito de que sistemas dependentes de sódio são capazes de efetuar transporte ativo, enquanto que sistemas independentes de

sódio estão restritos a uma difusão facilitada (SCHULTZ, CURRAN, 1970). Entretanto, de acordo com GUIDOTTI, BORGHETTI e GAZZOLA em 1978 o sistema L não pode ser considerado simplesmente um sistema de troca porque pode induzir concentrações de aminoácidos para o interior da célula.

A captação de aminoácidos pelo sistema L é transestimulada por substratos intracelulares desse sistema. Contudo, quando se trata de transestimulação, os fenômenos de troca tornam-se mais importantes. A transestimulação requer que a translocação do transportador carregado seja mais rápida do que a do transportador vazio (HEINZ, DURBIN, 1957).

O sistema L é pouco influenciável pela mudança de pH externo, entretanto já foi observada, em alguns casos, uma estimulação pela diminuição do pH extracelular. O transporte por esse sistema praticamente não sofre regulação hormonal.

Estudos em células não mutantes CHO (SHOTWELL et al., 1982) mostraram um aumento da atividade do sistema L quando essas células eram incubadas em meio com baixa concentração de leucina, mas com níveis normais de outros nutrientes. Esse fato sugeriu que a resposta adaptativa do sistema L



está relacionada a uma regulação dependente de leucina, enquanto que a resposta adaptativa do sistema A está relacionada à regulação de todos os aminoácidos desse sistema. Nesse mesmo trabalho, SHOTWELL utilizando inibidores de síntese protéica, cicloheximida e actinomicina D, sugeriu que o sistema L pode ser regulado a nível translacional.

O sistema L e o sistema A já foram descritos na maioria dos tipos celulares tanto de aves como de mamíferos.

#### I.2.2.4. Sistema N

O sistema N é restrito ao transporte de glutamina, asparagina, histidina e poucos análogos sintéticos. Todos esses substratos possuem nitrogênio na cadeia lateral. O transporte pelo sistema N foi descrito em células de hepatócitos de ratos por KILBERG e colaboradores em 1980 e por CHRISTENSEN e HANDLOGTEN em 1981. É insensível à ação da insulina e do glucagon. Em 1984, CHRISTENSEN sugeriu que esse sistema só ocorra em hepatócitos e células de hepatomas.

#### I.2.2.5. Sistema GLY

É um sistema específico para o transporte de glicina, seus derivados N-metilados e sarcosina. Foi descrito em

eritrócitos de pombos (VIDAVER, ROMAIN, HAUROVITZ, 1964) e em reticulócitos de coelhos (CHRISTENSEN, 1967). Mais recentemente foi descrito em hepatócitos de rato e em células da linha HTC (CHRISTENSEN, HANDLOGTEN, 1981). É um sistema dependente de sódio e CHRISTENSEN sugeriu que seja apenas uma variante do sistema A.

#### I.2.2.6. Sistema $\beta$

O sistema  $\beta$  foi descrito por CHRISTENSEN em 1967. Media o transporte de aminoácidos como  $\beta$  alanina e taurina, sendo esse último um aminoácido modelo para o estudo do sistema por ser muito pouco metabolizado. É dependente de sódio e foi caracterizado primeiramente em células de Ehrlich, sendo também encontrado em outras células eucarióticas.

#### I.2.2.7. Sistema $Ly^+$

O sistema  $Ly^+$  foi descrito por GUIDOTTI e colaboradores em 1978. Está presente nas células de animais superiores e media o transporte de aminoácidos básicos como, por exemplo, lisina e arginina, requer a presença de um grupo carregado positivamente na cadeia lateral.

#### I.2.2.8. Sistema Y<sup>+</sup>

Em 1982, WHITE e colaboradores descreveram em cultura de fibroblastos humanos, um sistema de transporte de aminoácidos catiônicos semelhante ao sistema Ly<sup>+</sup>, já descrito por GUIDOTTI, BORGHETTI e GAZZOLA em 1978. O sistema Y<sup>+</sup> possui características cinéticas diferentes dos sistemas de transporte de aminoácidos ácidos e media também o fluxo de aminoácidos ω-guanidina e α, ω diaminoácidos. A captação de substratos catiônicos é independente de sódio, insensível a variações de pH, estereoseletiva e inibida por aminoácidos neutros em presença do íon sódio.

#### I.2.2.9. Sistema X<sup>-c</sup>

A captação de L-cistina e D-glutamato em cultura de fibroblastos humanos diplóides, IMR-90, foi investigada por BANNAI, KITAMURA em 1980. Esses aminoácidos parecem ser transportados por um mesmo sistema mediador independente de sódio, que foi inicialmente denominado de sistema CG. As seguintes observações indicam a possibilidade desses aminoácidos serem captados por um único sistema de transporte: A captação de L-cistina e L-glutamato é mutuamente competitiva. O Km para a captação de L-cistina é similar ao K<sub>i</sub> (constante de inibição) para a inibição da captação de L-glutamato pela L-cistina. De maneira similar,

o  $K_m$  para a captação de L-glutamato é quase o mesmo  $K_i$  para a inibição de L-cistina pelo L-glutamato. Aminoácidos que inibem a captação de L-cistina inibem a captação de L-glutamato na mesma extensão.

### I.2.3. Influência Iônica no Transporte de Aminoácidos

O envolvimento iônico no transporte de aminoácidos pode manifestar-se através de diversos mecanismos. Assim, os íons podem participar como cosubstratos e estimular a captação, podem desestabilizar transportadores, inibir o transporte, mudar a permeabilidade da membrana ou simplesmente não interferir no transporte.

O transporte dependente de sódio é característico de um grande número de tecidos, bem como de organelas celulares como mitocôndrias e núcleos.

O sódio é considerado como um cosubstrato no transporte de aminoácidos através da membrana (LERNER, 1978). Ele pode aumentar a afinidade do aminoácido pelo sítio de ligação da molécula carreadora ou aumentar a velocidade da etapa de translocação.

LE CAM e FREYCHET, em 1977, caracterizaram os sistemas A e L em hepatócitos isolados de rato. Observaram que em baixas concentrações externas de ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico (2 a 5 mM) cerca de 25% da entrada do aminoácido ocorre por um processo não saturável e 75% por um processo saturável. O transporte saturável é dependente de sódio externo, sendo que o  $K_m$  aparente para o influxo de  $\alpha$ -AIB parece não ser dependente da concentração de sódio, indicando que a afinidade do aminoácido pelos sistemas de transporte não é afetada pelo sódio. Entretanto,  $V_{max}$  é aumentada quando a concentração de sódio aumenta. Isso sugere que o sódio exerce um efeito estimulatório na translocação do complexo carrier-aminoácido através da membrana. O influxo dependente de sódio é inibido competitivamente pelo ácido  $\alpha$ -metil aminoisobutírico e alanina na proporção de 70 e 100% respectivamente. O componente independente de sódio pode representar de 20 a 30% do total de entrada em baixas concentrações de aminoácido. Esse componente pode representar um processo de difusão passiva ou a contribuição de outros sistemas com muito pouca afinidade. Suas principais propriedades são: insensibilidade ao sódio, à variação de pH, à diminuição da energia celular e à ação inibitória de análogos estruturais. É pouco sensível a variações de temperatura.

O componente do transporte de  $\alpha$ -AIB sensível ao sódio é altamente sensível a variações de pH. É dependente de energia o que foi comprovado por experimentos realizados em células tratadas com oligomicina ou cianeto de potássio, onde o transporte foi drasticamente diminuído. No meio onde o sódio foi substituído por colina o transporte do ácido  $\alpha$  aminoisobutírico foi fortemente diminuído. Para verificar se a inibição do influxo não seria apenas uma resposta ao efeito da colina "per se", a colina foi substituída por sacarose e os resultados obtidos foram os mesmos (LE CAM, FREYCHET, 1977).

A captação de cicloleucina por hepatócitos isolados de ratos é insensível ao sódio, e de acordo com HEINZ, DURBIN em 1957, esse processo de transporte ocorre através de uma difusão por troca. O total da captação de cicloleucina sob o ponto de vista cinético pode ser dividido em três componentes: um saturável e sensível ao sódio, um insaturável e sensível ao sódio e um terceiro saturável e insensível ao sódio. Curvas de tempo realizadas com células marcadas indicam que a aceleração na captação causada pela difusão por troca é restrita ao transporte independente de sódio. A captação insensível ao sódio é concentrativa, indicando ser um processo dependente de energia, o que foi confirmado por experimentos que utilizaram oligomicina e

cianeto de potássio. Essa parte da captação de cicloleucina é independente de pH mas fortemente influenciada pela temperatura. O influxo de cicloleucina sensível ao sódio é completamente inibido pelo ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico indicando que a cicloleucina utiliza também os sistemas A e ASC.

A energização do sistema A em fibroblastos humanos foi estudada por DALL'ASTA e colaboradores em 1991. Foi medida a energia transferida do gradiente eletroquímico de sódio para o sítio do substrato específico do sistema A, o ácido  $\alpha$ -metilaminoisobutírico. O cotransporte sódio/aminoácido estudado por análise cinética e radioquímica mostra a relação de 1:1. A acumulação do ácido  $\alpha$ -metilaminoisobutírico é fortemente sensível a mudanças no gradiente de sódio e do potencial de membrana, indicando que o gradiente eletroquímico de sódio fornece energia para o aumento do transporte de aminoácidos através do sistema A.

A correlação entre o gradiente químico do ácido  $\alpha$ -metilaminoisobutírico e o potencial eletroquímico de sódio sugere que a energia estocada no gradiente eletroquímico de sódio é suficiente para energizar os sítios reativos do sistema A em fibroblastos humanos.

A influência de outros íons sobre o transporte de aminoácidos também tem sido investigada. O íon vanadato possui ação estimulatória sobre o sistema A em músculo Soleus de ratos Wistar, conforme trabalhos realizado por MUÑOS e colaboradores em 1992. Esses pesquisadores atribuem o efeito estimulatório do vanadato ao aumento do pH tanto intra como extracelular, uma vez que o sistema A é dependente de pH (KILBERG, HANDLOGTEN, CHRISTENSEN, 1980) (ver cap. 5).

#### I.2.4. Ação Hormonal sobre o Transporte de Aminoácidos

O efeito da ação hormonal sobre o transporte de aminoácidos tem sido intensamente estudado nas últimas décadas, uma vez que a captação de aminoácidos é de essencial importância para o metabolismo celular.

A influência do hormônio folículo estimulante (FSH) no transporte de aminoácidos em testículos de ratos imaturos foi investigada por CRUZ CURTE, WASSERMANN em 1985. Esses pesquisadores observaram que o FSH estimulou a captação do ácido  $\alpha$ - metilaminoisobutírico e do ácido  $\alpha$ - aminoisobutírico somente quando o íon sódio estava presente no meio de incubação, o que sugere um transporte pelos sistemas A ou ASC, que são sódio dependentes. O transporte



de cicloleucina, que ocorre preferentemente pelo sistema L, não foi alterado pela ação do FSH quando na presença ou ausência de sódio. Esses resultados indicam que a captação de aminoácidos em testículos de ratos imaturos é estimulada pelo FSH somente em presença de íons sódio e que esse hormônio não exerce nenhuma ação sobre o sistema L, que é sódio independente. A integridade funcional dos microtúbulos e a síntese protéica estão relacionadas com a ação estimulatória do FSH sobre o transporte de aminoácidos neutros em testículos de ratos imaturos (WASSERMANN et al., 1989-a). Essa ação estimulatória do FSH sobre o transporte de aminoácidos parece estar relacionada aos canais de potássio sensíveis a ATP e aos canais de cálcio dependentes de voltagem, particularmente os do tipo "T", sensíveis ao níquel ( WASSERMANN et al., 1992-a) A aplicação tópica do FSH produz nas células de Sertoli uma rápida hiperpolarização seguida de uma despolarização (WASSERMANN et al., 1990). Essa despolarização é prolongada e potenciada por aminoácidos neutros. É anulada pela presença de verapamil, bloqueador de canais de cálcio dependentes de voltagem (WASSERMANN et al., 1992-b).

O retinol estimula o transporte de aminoácidos em cultura de células de Sertoli e em testículos de ratos imaturos enriquecidos em células de Sertoli. Esse efeito é

observado quando o transporte ocorre através do sistema A e parece estar relacionado com canais de cálcio dependentes de voltagem, provavelmente canais do tipo "T" (WASSERMANN et al., 1993).

A ação do glucagon foi investigada em células de fígado de rato, sendo que HANDLOGTEN, KILBERG e CHRISTENSEN em 1982 concluíram que esse hormônio estimula a captação de aminoácidos pelo sistema A, enquanto VADGAMA e CHISTENSEN em 1983 demonstraram que esse hormônio não altera o sistema N de transporte em hepatócitos de rato. Ainda sobre a investigação dos efeitos do glucagon no transporte de aminoácidos, PRENTKI e colaboradores em 1981 demonstraram que o transporte de AIB em hepatócitos de rato é estimulado por esse hormônio, e que essa ação estimulatória é bloqueada por inibidores de microtúbulos como, por exemplo, a colchicina e vinblastina. Esses resultados sugerem que os microtúbulos estão envolvidos na regulação do transporte de aminoácidos pelo glucagon e pode afetar a transferência da informação hormonal da membrana celular até aos sítios de síntese do carreador protéico.

Os hormônios esteróides também influenciam o transporte de aminoácidos em vários tecidos, podendo aumentar ou diminuir a captação, dependendo da natureza do

tecido. A eficiência da ação dos esteróides parece diminuir com a idade, e a sua ação sobre o transporte de aminoácidos possivelmente encontra-se em nível de síntese protéica. McDONALD, GELEHRTER em 1977 demonstraram que a dexametasona, um glicocorticóide sintético, inibe reversivelmente o transporte de  $\alpha$  AIB em células de hepatoma de rato. Esse efeito, entretanto, pode ser inibido pela cicloheximida e actinomicina D, sugerindo que a síntese protéica está envolvida na ação desses hormônios. Collemid e citocalasina B, inibidores de microtúbulos, não inibem o transporte nem interferem nos efeitos da dexametasona, sugerindo que esse glicocorticóide induz a síntese de uma proteína lábil que, ou decresce a percentagem de síntese de um componente do sistema de transporte, ou aumenta a percentagem de degradação desse componente, ou apresenta as duas ações.

Os efeitos da dexametasona também foram estudados em hepatócitos de ratos adultos por TAKADA e BANNAI em 1984. Observaram um aumento na captação de cistina por um sistema sódio independente. Em 1984 NADZIEJKO e REICHBERG observaram que a dexametasona exerce um efeito inibitório sobre a atividade de um sistema independente de sódio para leucina em células de hepatomas de ratos.

A insulina talvez seja o hormônio mais estudado no que se refere á ação sobre o transporte de aminoácidos. O maior efeito da insulina nos tecidos-alvo é estimular o transporte, na superfície celular, de açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, íons e precursores de ácidos nucléicos (GOLDFINE, 1981). A insulina, quando interage com seus receptores, exerce uma complexa ação celular que afeta profundamente a fisiologia da membrana plasmática. O hormônio ativa enzimas como a  $\text{Na}^+$ -  $\text{K}^+$ - ATPase ou fosfodiesterase. Em vários tipos celulares, modula o número de receptores na superfície celular para insulin-like growth factor II ou transferrina, aumentando também o transporte de vários metabólitos importantes como a glicose ou aminoácidos neutros.

Muito é conhecido sobre o mecanismo pelo qual a insulina ativa o transporte de glicose em adipócitos ou em músculo. A insulina media esse efeito aumentando o número de transportadores de glicose disponíveis na membrana plasmática da célula. Entretanto, o mecanismo de ação da insulina sobre o transporte de aminoácidos é muito pouco conhecido.

No fígado de rato o efeito estimulatório da insulina no transporte de aminoácidos neutros depende da síntese protéica, da função dos microtúbulos e é caracterizada por

um aumento de  $V_{\max}$ . (FEHLMANN et al., 1979; PRENTKI et al., 1981). Em músculo tem sido encontrados dados contraditórios a respeito da cinética da ação da insulina no transporte de aminoácidos (AKEDO, CHRISTENSEN, 1962; ELSAS et al., 1975).

GUMÁ e colaboradores em 1988 estudaram os mecanismos através dos quais a insulina estimula o sistema A de transporte de aminoácidos neutros em músculo extensor digitorum longus. Utilizaram como substrato o ácido  $\alpha$ -metilaminoisobutírico, cuja entrada na célula ocorre especificamente pelo sistema A, diferente do ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico que entra na célula através dos sistemas A e ASC.

Os resultados encontrados por GUMÁ e colaboradores permitem concluir que o efeito estimulatório da insulina sobre o sistema A em músculo esquelético é rápido, caracterizado por um aumento de  $V_{\max}$ , independente de síntese protéica "de novo" e independente do gradiente eletroquímico de sódio. Essas observações também permitem postular que a ação da insulina ocorra diretamente sobre os transportadores do sistema A, ou pelo aumento de sua atividade intrínseca (independente do gradiente eletroquímico de sódio) ou em conseqüência de sua

translocação do "pool" intracelular da membrana plasmática, como descrito para os transportadores de glicose.

A regulação do transporte de aminoácidos pela insulina foi estudada em cultura de fibroblastos humanos (LONGO et al., 1985). Um total de seis sistemas de transporte de aminoácidos operam em fibroblastos humanos, dois deles, A e X<sup>-c</sup> são fortemente estimulados pela insulina e quatro, ASC, X<sup>-ag</sup>, Y<sup>+</sup> e L não são sensíveis à presença do hormônio no meio de incubação. A insulina aumenta a atividade do transporte por um aumento da velocidade máxima de transporte ( $V_{max}$ ) sem significativa alteração de Km. Esse fato sugere que o hormônio aumenta a disponibilidade de transportadores ativos na membrana da célula. A insulina pode promover a síntese de novas proteínas transportadoras ou pode converter proteínas transportadoras inativas em formas ativas ou pode translocar proteínas transportadoras de outros compartimentos celulares para a membrana (LIENHARD, 1983). A ação de curta e de longa duração do hormônio sobre o transporte de aminoácidos permite postular um efeito direto na síntese "de novo" das moléculas transportadoras. Experimentos em que foram utilizadas concentrações de cicloheximida e actinomicina D que inibem os processos de transcrição e translação também inibiram o efeito da insulina (GAZZOLA et al., 1981).

O efeito estimulatório da insulina sobre o sistema A de transporte de aminoácidos neutros foi observado em glândulas adrenais de ratos (WASSERMANN et al., 1989-b). A captação do ácido  $\alpha$ -metilaminoisobutírico e do ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico mostrou-se dependente do íon sódio. O mesmo efeito foi observado sobre o transporte de glicose e aminoácidos neutros em glândulas tireóides de tartarugas *Chrysemys dorsalis* (MACHADO et al., 1991).

As discrepâncias entre os resultados obtidos em músculo esquelético e em outros tecidos, inclusive o endócrino, poderão ser atribuídas à heterogeneidade entre os diferentes tipos de tecidos.

### I.3. **Insulina**

#### I.3.1. Síntese

A insulina é secretada pelas células  $\beta$  das ilhotas de Langerhans no pâncreas, sob forma inativa. O pâncreas humano contém um milhão de ilhotas, com peso inferior a dois gramas. Usando técnicas especiais de coloração, é possível diferenciar quatro tipos de células nas ilhotas. 75% são células redondas com grânulos regulares, as células  $\beta$ , sintetizadoras e secretoras de insulina. 20% são células  $\alpha$  em forma de chama de vela localizadas essencialmente na periferia das ilhotas apresentando grânulos irregulares. Essas células sintetizam e secretam glucagon. O restante das células são as células D que constituem o sítio de síntese de somatostatina e as chamadas células F ou PP que sintetizam o peptídeo pancreático.

A síntese de insulina é semelhante a de outros hormônio peptídicos, hormônios polipeptídicos e da maioria das proteínas celulares. Ocorre sobre os ribossomas através de um RNA mensageiro que organiza a seqüência de aminoácidos. Como o destino dos hormônios é a sua liberação pelas células, eles são isolados das demais proteínas celulares através da



1

formação de envoltórios hormonais cujo processo inicia-se no local de sua biossíntese. Os hormônios peptídicos são sintetizados como proteínas precursoras maiores, chamadas pré-pró-hormônios, que são convertidas inicialmente a pró-hormônios e posteriormente a hormônios através de clivagens proteolíticas seqüenciais. O primeiro precursor da insulina é conhecido como pré-pró-insulina, chamado peptídeo sinalizador, composto por aminoácidos lipofílicos. Enquanto a pró-insulina está sendo sintetizada o peptídeo sinalizador penetra na bicamada lipídica do retículo endoplasmático rugoso. Uma vez no interior do lúmen do retículo o peptídeo sinalizador é clivado por uma proteinase. Após a liberação para o interior do retículo, os pró-hormônios são transportados até ao complexo de Golgi em vesículas ligadas à membrana, que se desprendem do retículo próximo a essa organela e unem-se com a membrana de Golgi adjacente, derramando seu conteúdo no interior de suas cisternas. No complexo de Golgi os pró-hormônios são acondicionados em vesículas secretoras que posteriormente destacam-se da membrana de Golgi e migram até à membrana plasmática (GOODMAN et al., 1988).

O complexo de Golgi parece ser o local de conversão dos pró-hormônios a hormônios através da clivagem dos pró-segmentos. Assim, o polipeptídeo chamado de pró-insulina

contendo 84 resíduos de aminoácidos é convertido à insulina nessa organela. A pró-insulina contém três segmentos designados por cadeia B, cadeia C e cadeia A. A cadeia B contém 30 resíduos iniciando pelo amino terminal. Resíduos de 31 a 63 constituem a cadeia C e de 64 a 84 a cadeia A. Duas pontes dissulfeto ligam as cadeias A e B e uma terceira ponte dissulfeto liga dois resíduos de cisteína na cadeia A. A pró-insulina é convertida a insulina por clivagens proteolíticas que destacam dois dipeptídeos, Arg-31 - Arg-32 e Lys-62 - Arg-63, liberando, desse modo, a cadeia C. As cadeias A e B permanecem unidas por pontes dissulfeto constituindo a molécula de insulina, com 51 resíduos de aminoácidos, 21 na cadeia A e 30 na cadeia B com um peso molecular em torno de 6000 (RAWN, 1989).

Os hormônios peptídicos são liberados pela célula através de exocitose. A vesícula secretora aproxima-se da superfície celular, sua membrana funde-se com a membrana plasmática e a vesícula libera seu conteúdo no líquido extracelular. Portanto, os hormônios, pró-segmentos e pró-hormônios podem ser secretados pelas glândulas endócrinas, sendo que os dois últimos, em geral, possuem baixa ou nenhuma atividade biológica (GOODMAN et al., 1988).

### I.3.2. Secreção

A regulação dos níveis de glicose no sangue é um dos ajustes mais finos do mecanismo homeostático de mamíferos. Em muitos tecidos a insulina está envolvida no metabolismo de açúcares, lipídeos, aminoácidos e íons. Nas células-alvo a insulina possui três principais sítios de regulação metabólica. Na membrana plasmática ela aumenta o transporte de íons, glicose e outros substratos. No citoplasma e em suas organelas ativa enzimas intracelulares como a glicogênio sintetase e a piruvato desidrogenase, por um processo de desfosforilação. No núcleo, a insulina regula a síntese de DNA e RNA.

A regulação da secreção de insulina é o resultado da interação entre substratos e hormônios que atingem as ilhotas via circulação e, influência neural via terminais de fibras nervosas autônomas. Em mamíferos um dos mais importantes controles sobre a liberação de insulina é exercido pelas variações da concentração de glicose no fluído extracelular. O íon cálcio também possui função regulatória em muitos eventos celulares. Seu envolvimento no processo de secreção foi demonstrado primeiramente na liberação de adrenalina na medula adrenal. Sabe-se que o cálcio extracelular é essencial para a liberação de insulina e que o cálcio intracelular

regula a atividade do sistema de microtúbulos e microfilamentos envolvendo a exocitose dos grânulos  $\beta$ . De maneira análoga à contração-exitação em células musculares, o aumento da concentração de cálcio no citosol é considerada causadora da exocitose.

Na cascata de eventos intracelulares que levam ao recrutamento dos grânulos de insulina e sua extrusão das células, o fechamento dos canais de potássio sensíveis a ATP é a etapa chave, levando à despolarização da membrana e subsequente influxo de cálcio.

### I.3.3. Receptores

As ações da insulina em nível celular são iniciadas por sua ligação ao receptor na membrana plasmática. Esse receptor está presente em quase todos os tipos de células de mamíferos, variando em uma faixa de menos de 100 receptores por célula em eritrócitos circulantes a mais de 300.000 por célula em hepatócitos e adipócitos.

O receptor de insulina é sintetizado nos ribossomas do retículo endoplasmático na forma de um precursor formado por cerca de 1370 resíduos de aminoácidos, passa para o complexo

de Golgi de onde é eliminado na forma de subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ . É uma proteína heterotetramérica constituída por duas subunidades  $\alpha$  e duas subunidades  $\beta$ , ligadas por pontes dissulfeto formando uma estrutura  $\beta$ - $\alpha$ - $\alpha$ - $\beta$  (CZECH, 1985). A subunidade  $\alpha$  possui um peso molecular de 135 KDa e a  $\beta$  de 95 KDa. As duas subunidades são glicosiladas, sendo que a subunidade  $\alpha$  possui N-glicosilação e a  $\beta$  possui N e O-glicosilação (KAHN et al., 1993). As duas subunidades exercem funções diferentes. A subunidade  $\alpha$  é inteiramente extracelular e contém o sítio de ligação para a insulina. A subunidade  $\beta$  é uma proteína transmembrânica e contém o sítio sinalizador tirosina quinase no seu segmento intracelular (KAHN et al., 1993).

O receptor de insulina possui alta homologia com o receptor de IGF-1 que é uma glicoproteína de membrana constituída por duas subunidades  $\alpha$  de 135 KDa e duas  $\beta$  de 90 Kda unidas por pontes dissulfeto (JACOBS et al., 1983). O receptor de IGF-1, assim como o receptor de insulina, contém subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  derivadas de um precursor comum. Ligando-se ao seu receptor no domínio extracelular o IGF-1 estimula a atividade tirosina quinase da subunidade  $\beta$  com a subsequente autofosforilação (JACOBS et al., 1983). O receptor de IGF-1

possui mais de 50% da seqüência de aminoácidos homóloga ao receptor de insulina. O maior grau de homologia seqüencial (84%) é encontrado no domínio tirosina quinase (GODFINE, 1987).

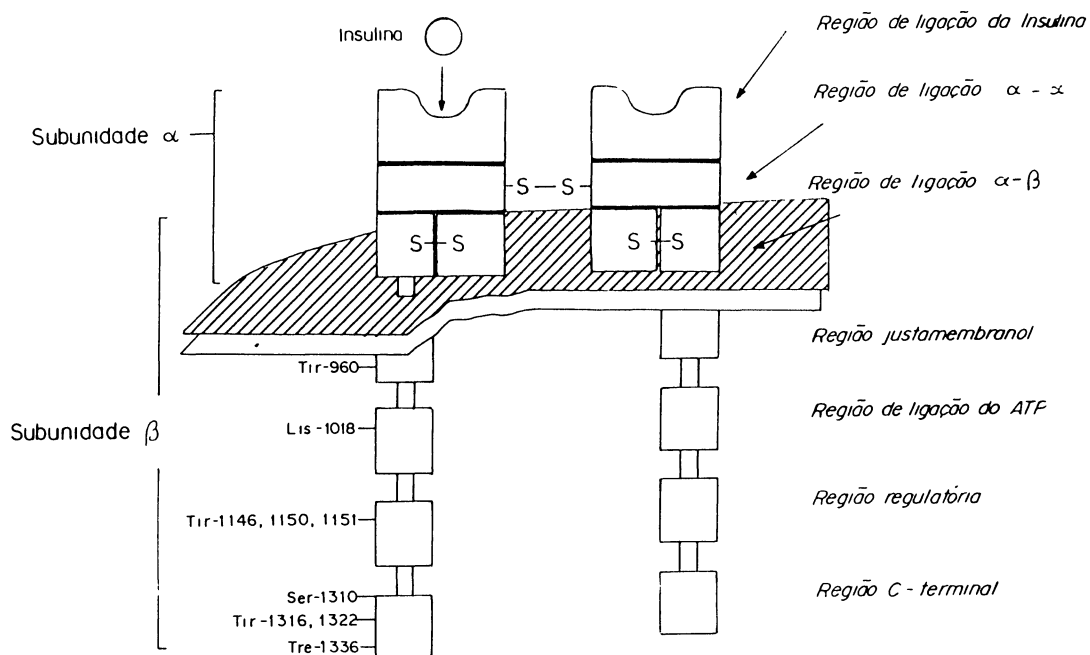
Cada subunidade do receptor de insulina pode ser dividida em regiões funcionais específicas. Assim, a subunidade  $\alpha$ , extracelular, é formada pela região N-terminal, por uma região rica em cisteína, uma região envolvendo a ligação dissulfeto  $\alpha$ - $\alpha$  e uma quarta região envolvendo a ligação dissulfeto  $\alpha$ - $\beta$ . Com base em modificações químicas e em estudos mutagênicos *in vitro* o domínio mais crítico para a ligação de alta afinidade com a insulina consiste dos primeiros 298 aminoácidos do receptor (DEMEYTS et al., 1990; RAFAELOFF et al., 1989). Mudanças num único resíduo de aminoácido reduzem significativamente a ligação da insulina ao receptor.

A subunidade  $\beta$  contém um domínio extracelular de cerca de 193 aminoácidos, um domínio transmembrânico de 23 aminoácidos e um complexo domínio intracelular de 402 aminoácidos. Pouco é conhecido sobre as funções da região extracelular, exceto que possui resíduos de cisteína envolvidos na ligação dissulfeto entre as unidades  $\alpha$  e  $\beta$  e,

sítios de N-glicosilação e O-glicosilação (CHEATHAN, KAHN, 1992). O domínio transmembrânico da subunidade  $\beta$  é uma  $\alpha$  hélice de 23 aminoácidos que liga o domínio extracelular ao intracelular do receptor. Como essa simples hélice forma apenas uma ligação física entre as regiões extra e intracelulares da subunidade  $\beta$ , sua função é crítica na transdução do sinal.

A região intracelular ou citoplasmática da subunidade  $\beta$  é formada por 402 aminoácidos e pode ser funcionalmente dividida em quatro domínios: um domínio junto à membrana importante na ligação do substrato e internalização do receptor, um domínio catalítico quinase, uma região de autofosforilação de tirosina envolvida na regulação da atividade quinase e o domínio C-terminal contendo dois sítios de tirosina, assim como vários sítios de fosforilação de serina e treonina (KAHN et al., 1993). O domínio da subunidade  $\beta$  que foi mais facilmente identificado é o domínio catalítico que contém sítios de ligação para ATP. Em contraste com os domínios extracelular e transmembrânico, essa região contém o maior grau de homologia entre o receptor de insulina e todos os membros da família das proteínas tirosina quinase.

Em 1992 ITO e colaboradores caracterizaram a presença de receptores de insulina em córtex e medula adrenal bovina. Observaram a ligação da insulina suína marcada com  $^{125}\text{I}$  em preparações de membrana do córtex e da medula, separadamente. A ligação da insulina mostrou dependência do tempo, temperatura e pH, sendo que o nível máximo de ligação foi observado à temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  num pH de 7,6 a 8,0 em 24



**FIGURA I.6.** MODELO ESQUEMÁTICO DO RECEPTOR DE INSULINA NA MEMBRANA PLASMÁTICA (KAHN; WHITE; SHOELSON ET AL., 1993)



horas de incubação. Pró-insulina humana, IGF-1 e glucagon suínos apresentaram um potencial inibitório sobre a ligação da <sup>125</sup>I insulina, de maneira semelhante ao efeito observado nos clássicos tecidos alvos de mamíferos (CUATRECASAS, DESBUQUOIS, KRUG, 1971; OLEFSKHY, JEN, REAVEN, 1974).

Os resultados de ITO e colaboradores (1992) indicaram que tanto o córtex como a medula de adrenal bovina apresentam receptores para insulina e que são indistinguíveis daqueles encontrados em outros tecidos de mamíferos. A presença desses receptores na adrenal aumenta a possibilidade de que a insulina possui um efeito fisiológico nessa glândula. Vários estudos já demonstraram os efeitos da insulina no crescimento e na função celular em tecidos adrenocorticais. Assim, a insulina afeta o metabolismo do glicogênio adrenal em ratos (PIRAS et al. 1973), estimula o crescimento celular em cultura de células adrenocorticais bovinas quando em concentrações fisiológicas (SIMONIAN, WHITE, GILL, 1982; SIMONIAN, GILL, 1979), e aumenta a captação de aminoácidos neutros em adrenais de ratos (WASSERMANN, FAUTH, MACHADO, 1989-b). A insulina exerce um efeito permissivo na regulação de receptores LDL dependentes de cAMP (ITO et al., 1992) e interage com ACTH na regulação da síntese de esteróides e de enzimas degradativas em cultura de células adrenocorticais (PENHOAT et al., 1988).

Também foi demonstrado que a insulina estimula o transporte de glicose e síntese protéica (DELICADO, MIRAS PORTUGAL, 1987) e aumenta o conteúdo de catecolaminas em cultura de células cromafínicas (WILSON, KIRSHNER, 1983).

## **I.4. Cálcio: Principais Funções nos Eventos Celulares**

### **I.4.1. Concentração e Distribuição Celulares**

O íon cálcio está envolvido em vários processos vitais nas células, incluindo atividades secretórias além de atividades contráteis e neurais. Como íon livre ou ligado a complexos, é ativador de várias importantes enzimas celulares (GODFRAIND, MILLER, WIBO, 1986).

Na maioria das células eucarióticas diversos sistemas de transporte de cálcio são conhecidos para manter o gradiente de concentração entre o cálcio extracelular, estimado em torno de 1,2mM, e o intracelular, que varia de 0,1 a 10 $\mu$ M, dependendo do estado da célula. Diversos tipos de sistemas de transporte de cálcio servem para manter a baixa concentração de cálcio intracelular, através do transporte de cálcio ou para fora da célula ou para dentro dos estoques intracelulares (CARAFOLI, 1987).

A manutenção do gradiente custa muito pouco em termos de energia para a célula, menos de 1% da energia do metabolismo basal, isso porque admite-se que a membrana plasmática na célula não ativada é relativamente impermeável ao cálcio. O íon cálcio entra na célula não ativada na razão

de 4  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$  de água celular (BORLE, 1981) sendo bombeado para fora da célula por uma bomba de cálcio dependente de ATP que é a  $\text{Ca}^{2+}\text{-H}^+\text{-ATPase}$  (GIMBLE et al., 1982; NIGGLI, SIGEL, CARAFOLI, 1982; SMALLWOOD et al., 1983). Conseqüentemente, para manter a homeostase do cálcio são requeridos 4  $\mu\text{mol ATP min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$  de água celular. Nas células do músculo esquelético, a taxa basal do "turnover" de ATP é de 10.000  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$  de água celular e 10 a 20% desse total é utilizado pela bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  para manter a homeostase de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , uma quantidade bem maior de energia se comparada com cerca de 1% para manter a homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  (BIRON et al., 1979). O requerimento de energia para a manutenção da homeostase do cálcio é diferente quando se considera a movimentação de cálcio através da membrana interna mitocondrial e a membrana do retículo endoplasmático. Não existem medidas diretas desses fluxos, mas a partir da cinética das trocas de cálcio no "pool" intracelular pode ser estimado que o custo energético total para a célula seja em torno de 20  $\mu\text{mol de ATP min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$  de água celular, ou seja, 0,2% da energia do metabolismo basal da célula (RASMUSSEN, BARRET, 1984).

Em conseqüência desse gradiente e do gradiente elétrico transmembrânico, a entrada de cálcio na célula é bastante

favorecida, mas a taxa de influxo é pequena na ausência de estímulo externo. O aumento da concentração intracelular de cálcio livre resultante de uma estimulação externa poderá ter origem na liberação de cálcio estocado intracelularmente e/ou pela alteração da permeabilidade da membrana plasmática através da ativação dos canais de cálcio. Os canais de cálcio podem ser considerados como "poros" funcionais da membrana plasmática, entretanto, algumas formas desses canais também são encontrados em membranas intracelulares onde exercem a importante função de liberar o cálcio dos estoques intracelulares (HOSEY, LAZDUNSKI, 1988).

A membrana plasmática não apenas possui um papel predominante na manutenção da homeostase do cálcio como também tem função vital na relação estímulo-resposta quando a célula emprega o sistema mensageiro do cálcio. O cálcio está ligado tanto na superfície interna da membrana como em grande parte no glicocálix (RASMUSSEN, BARRET, 1984). Na ativação da célula por um mensageiro específico, os canais de cálcio podem abrir temporariamente ou de maneira mais lenta, persistente, permitindo a entrada do íon na célula e alterando o gradiente de concentração. A importância do cálcio ligado à membrana plasmática foi evidenciada por FLECKENSTEIN em 1983 (FLECKENSTEIN apud SPEDDING; PAOLETTI, 1992) concluindo que o cálcio ligado ao glicocálix é uma

importante fonte de entrada do íon na célula durante cada sístole. De maneira similar, LOUZENHISER e VAN BREEMAN (1992) observaram que o influxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  ativado pelo V-44069, análogo da prostaglandina  $\text{H}_2$ , no músculo liso arterial apresenta duas fases: uma inicial, rápida e transitória e uma fase mais lenta e sustentada. Concluíram que a fase inicial representa a entrada do cálcio ligado extracelularmente. Conclusões semelhantes foram obtidas por TAN e TASKJIAN (1981) em seus estudos na ativação de células pituitárias em cultura, induzida por TRH. Em contraste a esses resultados, SCHULZ (1980) demonstrou que quando células exócrinas do pâncreas são induzidas a secretar enzimas por agonistas naturais existe um rápido efluxo de cálcio da célula, que foi atribuído à perda do "pool" intracelular.

Além da membrana plasmática, duas membranas internas são importantes para a manutenção da concentração de cálcio: a membrana do retículo endoplasmático e a membrana interna mitocondrial. Ambas possuem sistemas de bombas de vazão orientadas de forma que tenham uma ativa extrusão de cálcio do citosol e uma passiva vazão de cálcio para o citosol. O sistema de bomba de vazão da membrana mitocondrial confere a ela duas funções: em baixas concentrações de cálcio é responsável por estabilizar a concentração, e em altas concentrações serve como um reservatório para estocar o

cálcio durante os períodos de acumulação excessiva desse íon na célula.

O retículo endoplasmático funciona como fonte de cálcio para a fase inicial de ativação em muitas células (RASMUSSEN, BARRET, 1984). É evidente que o tamanho desses "pools" intracelulares de cálcio varia de um tipo de célula para outro.

#### I.4.2. Mecanismos das Ações do Cálcio como Segundo Mensageiro

Durante a ação hormonal, a função mensageira do cálcio depende de rápidas mudanças na sua concentração em sítios intracelulares específicos, para o controle dos processos metabólicos dependentes dele. Esses efeitos usualmente envolvem a ativação ou inibição de enzimas reguladas por proteínas quinases dependentes de cálcio (CATT, 1987). Essas proteínas transferem o grupo fosfato terminal ( $\gamma$ ) do ATP para uma variedade de outras proteínas. A adição de fosfato à molécula protéica altera sua carga elétrica podendo também mudar sua conformação. Essas mudanças podem alterar a atividade biológica da proteína fosforilada (LEVITAN, KAEZMAREK, 1991).

O cálcio, durante a ação hormonal, age sobre a adenilato ciclase, guanilato ciclase e fosfodiesterases, enzimas

críticas no controle dinâmico dos níveis intracelulares dos nucleotídeos cíclicos.

#### I.4.3. Mecanismos de Controle da Concentração de Cálcio

##### I.4.3.1. $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase

A concentração intracelular de cálcio livre é várias ordens de grandeza menor que a concentração extracelular desse íon. A regulação da concentração interna de cálcio é vital para as funções de todas as células mas é particularmente importante na regulação dos sistemas intraneurais: a concentração de cálcio regula canais catiônicos, atua como sistema de segundo mensageiro e participa da liberação de neurotransmissores. A manutenção da concentração interna de cálcio é realizada por um eficiente mas complexo sistema que envolve várias bombas localizadas na membrana plasmática e em membranas de organelas intracelulares. Os dois maiores sistemas que regulam a concentração interna de cálcio são a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase e o sistema "antiporter"  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ .

A  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase é constituída por uma única cadeia polipeptídica com cerca de 1.000 resíduos de aminoácidos. Dois íons cálcio são transportados para o interior do retículo por



molécula de ATP hidrolizada. Cada molécula de ATPase hidroliza cerca de 10 moléculas de ATP por segundo. O retículo sarcoplasmático funciona como um reservatório de cálcio. Os íons cálcio são estocados dentro do lúmen do retículo pela calsequestrina, uma proteína que possui cerca de 40 sítios de ligação para o cálcio.

O retículo é composto por túbulos membranosos longitudinais que alojam-se paralelamente às miofibrilas. Esses túbulos terminam em canais alargados chamados de cisternas terminais. A liberação de cálcio pela cisterna terminal é estimulada por impulsos nervosos. O potencial de ação gerado pela estimulação do neurônio é transmitido, na forma de ondas de despolarização a partir do citoplasma das fibras musculares, via túbulos transversos para as cisternas terminais. A cisterna terminal que tem uma concentração interna de cálcio de  $10^{-9}$  M libera o íon para o interior do citoplasma. Esse influxo de cálcio eleva sua concentração no citoplasma de  $10^{-7}$  a  $10^{-5}$  M. O gradiente de cálcio entre o retículo e o citoplasma é mantido pela  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase que bombeia cálcio de volta para o interior do retículo sarcoplasmático (RAWN, 1989).

#### I.4.3.2. Sistema de troca $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ e $\text{H}^+ / \text{Ca}^{2+}$

O sistema de troca  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$  possui particular importância no tecido cerebral, onde parece ser o principal regulador da concentração interna de cálcio. Estudos diretos dos fluxos  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$  sugerem uma relação no transporte de 3:1, e sob condições fisiológicas essa troca é responsável por 30 a 50% do total do efluxo de cálcio.

A mitocôndria também funciona como um tampão temporário quando as capacidades dos sistemas de manutenção da concentração de cálcio da membrana plasmática e do retículo endoplasmático desse tecido são excedidas. O cálcio é transportado na mitocôndria por um processo de transporte secundário dirigido pelo potencial de membrana: a captação de 1  $\text{Ca}^{2+}$  é compensada pela extrusão de 2 $\text{H}^+$  produzidos pela cadeia respiratória (SIEGAL, 1989). O gradiente de prótons que é gerado permite a síntese de ATP. O potencial de membrana gerado pela cadeia de transporte de elétrons torna o interior da membrana negativo em relação ao lado externo. Esse gradiente de energia produz a força para o transporte de íons  $\text{Ca}^{2+}$  (RAWN, 1989).

#### I.4.4. Canais de Cálcio

##### I.4.4.1. Generalidades

A importância do cálcio na manutenção da contratibilidade do miocárdio foi observada por RINGER em 1880, (SPEDDING, PAOLETTI, 1992) mas somente nas últimas três décadas foi estabelecida a função crítica do cálcio no processo contrátil do músculo esquelético, cardíaco e liso. O cálcio tem uma função de grande importância na resposta secretória sendo talvez o mais comum segundo mensageiro em células eucarióticas.

Durante os anos de 1960 o conceito de drogas que atuam como "antagonistas de cálcio" foi desenvolvido pelas pesquisas dos grupos de FLECKENSTEIN e GODFRAIND (SPEDDING, PAOLETTI, 1992). O grupo de FLECKENSTEIN descobriu a alta seletividade da ação do verapamil e seu derivado metóxi, que mostraram interferência com o processo de excitação-contração dependente de cálcio no miocárdio, sem influência inibitória nos parâmetros dependentes de sódio. Mais tarde adicionaram a esse grupo de drogas a nifedipina e diltiazem. O efeito das drogas pode ser superado pelo aumento da concentração de cálcio extracelular ou por agentes que possam melhorar a

disponibilidade de cálcio ao sistema contrátil, como agonistas  $\beta$  ou glicosídeos cardíacos.

O grupo de GODFRAIND, realizando estudos em músculo liso, demonstrou que análogos da difenilpiperazina, como a cinarizina, inibiram as contrações evocadas por agonista dependente de cálcio extracelular e definiram a inter-relação do efeito inibitório das drogas com  $K^+$  e  $Ca^{2+}$ . O conceito de antagonista de cálcio foi depois estendido a muitas outras drogas incluindo muitos derivados da difenilpiperazina e da dihidropiridina (SPEDDING, PAOLETTI, 1992).

A descrição inicial de correntes de cálcio em miocárdio por REUTER em 1967 (SPEDDING, PAOLETTI, 1992) deu início a muitos trabalhos para definir as propriedades dos canais de cálcio. São conhecidos diferentes tipos de canais de cálcio e caracterizados por diferenças fundamentais nos mecanismos que governam sua abertura e fechamento. Alguns canais de cálcio são dependentes de voltagem e abrem em resposta a uma apropriada despolarização da membrana, enquanto outros são operados através de mecanismos dependentes de receptor (HOSEY, LAZDUNSKI, 1988).

#### I.4.4.2. Classificação dos canais de cálcio

Os canais de cálcio dependentes de voltagem são classificados de acordo com sua cinética de ativação e desativação, sua condutância, sua especificidade iônica e sua sensibilidade a drogas e toxinas. TSIEN e colaboradores (SPEDDING, PAOLETTI, 1992) identificaram por meios eletrofisiológicos e farmacológicos diferentes canais dependentes de voltagem. Chamaram canais tipo "L" aqueles ativados por alta voltagem ( $> -10$  mV), conduzem longa e duradoura corrente com grande condutância, também conhecidos como canais lentos. Canais tipo "T", ativados por baixa voltagem ( $> -70$  mV), caracterizados por correntes passageiras com pequena condutância, também conhecidos como canais rápidos. Canais tipo "N", ativados por voltagem relativamente alta ( $-30$  mV), conduzem corrente moderadamente transitória. LLINAS e colaboradores (1989-b) encontraram canais de cálcio em neurônios chamando-os de canais tipo "P", de células Purkinje.

#### Canais de cálcio tipo "L"

São altamente distribuídos nos tecidos, principalmente no coração e músculo liso, sendo sensíveis a dihidropiridinas, fenilalquilaminas e benzodiazepinas. Os

canais tipo "L" consistem de várias subunidades como  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ . A sub- unidade  $\alpha_1$  contém importantes sítios de fosforilação e de ligação para alguns antagonistas do cálcio. Essa subunidade tem forte semelhança com os canais de sódio, por isso algumas drogas podem ter afinidade tanto com canais de sódio como com canais de cálcio tipo "L" (GRIMA et al., 1986). A subunidade  $\alpha_1$  aparentemente forma um poro íon- seletivo e sensor de voltagem possuindo sítios de ligação para dihidropiridinas, fenilalquilaminas como o verapamil e benzodiazepinas como o diltizem. A função das outras subunidades não está bem caracterizada, mas parece que possuem a capacidade de modular a atividade da subunidade  $\alpha_1$ . Parecem existir diversas formas de canais de cálcio tipo "L" admitindo seletividade de tecido e diversificidade de função. Assim, a subunidade  $\alpha_1$  do músculo esquelético é menor (212 KDa) que a forma cardíaca (242 KDa) podendo ser codificada a partir de diferentes genes e apresentar propriedades diversas da forma  $\alpha_1$  cardíaca (SPEDDING, PAOLETTI, 1992).

Os canais de cálcio tipo "L" dependentes de voltagem estão relativamente bem definidos através da alta afinidade por determinadas drogas e por estudos genéticos. Podem ser definidos simplesmente como canais de cálcio sensíveis a dihidropiridinas.

## Canais de cálcio tipo "T"

São chamados de canais rápidos, possuem muitas características diferentes dos canais tipo "L", requerendo baixa despolarização para ativação, e inativam rapidamente. Os canais do tipo "T" estão distribuídos em muitos tecidos, estando concentrados no nodo sinoatrial, nodo atrioventricular, células do músculo liso e neurônios (SPEDDING, PAOLETTI, 1992). Existem poucos ou nenhum bloqueador específico para canais tipo "T", sendo que a falta de alta afinidade tem dificultado a sua definição estrutural.

## Canais de cálcio tipo "N"

Os canais do tipo "N" são considerados como sensíveis a  $\omega$ -conotoxinas e em certos instantes podem estar ligados à liberação de neurotransmissores (HIRNING et al., 1988; MILLER, 1987), enquanto agonistas seletivos dos canais tipo "L" normalmente não modificam a liberação de transmissores (HAENSLER, 1972). TSIEN e colaboradores (SPEDDING, PAOLETTI, 1992) observaram que adrenoceptores  $\alpha_2$  pré-sinápticos, quando estimulados por noradrenalina, inibem o movimento de cálcio através dos canais tipo "N". Então, alguns canais tipo "N",

embora predominantemente ativados por voltagem e conseqüentemente contribuindo para liberação de neurotransmissores ou outros eventos seguidos de despolarização de terminais nervosos, podem ser modulados por sistemas de segundo mensageiro ligado a receptor como a proteína G. A  $\omega$ -conotoxina liga-se e inibe a atividade dos canais tipo "N".

#### Canais de cálcio tipo "P"

Os canais tipo "P" foram propostos por LLINAS e colaboradores (1989b). Esses canais formam a maior proporção de canais de cálcio no cérebro (LEONARD et al., 1987; LIN, RUDY, LLINAS, 1990; REGAN, SAH, BEAN, 1991), e podem ser responsáveis pela liberação de neurotransmissores nas áreas cerebrais (HILLMAN et al., 1991). Recentemente MORI e colaboradores (1991) definiram a partir de cDNA cerebral, a estrutura de um canal de cálcio com características farmacológicas dos canais tipo "P".

Existem evidências conclusivas, a partir de experimentos utilizando biologia molecular, eletrofisiologia e técnicas com ligantes radioativos, da existência de uma série de tipos de canais de cálcio no cérebro. Assim, SMUTCH e colaboradores, em 1990, estimaram que devam existir no



mínimo oito tipos diferentes de canais de cálcio transcritos em cérebro de rato. Igualmente devem existir muitos tipos de canais de cálcio dependente de voltagem, sendo que pequenas mudanças na seqüência de aminoácidos poderá levar a marcadas alterações nas propriedades eletrofisiológicas, seletividade iônica e sensibilidade a drogas.

#### I.4.4.3. Canais iônicos operados por mecanismos mediados por receptor

A segunda grande categoria de canais iônicos inclui os canais operados através de mecanismos dependentes de receptor. Canais desse tipo incluem os canais iônicos não específicos associados com o receptor nicotínico acetilcolina e canais de cloro associados com GABA e receptores de glicina (HOSEY, LAZDUNSKI, 1988). Muitos canais associados a receptor são permeáveis a cálcio e podem ser considerados como canais de cálcio associados a receptores. Exemplos incluem canais do músculo liso que são operados por receptores de ATP (BENHAM, TSIEN, 1987) e canais iônicos neuronais que estão associados com um sub-tipo particular de receptores de glutamato chamados de N-metil-D-aspartato (NMDA) (ASCHER, NOWAK, 1986).

Muito pouco é conhecido a respeito dos canais de cálcio operados por receptores quando comparados com os canais dependentes de voltagem. Entretanto, estudos recentes têm sugerido que, assim como para os canais dependentes de voltagem, devam existir diferentes tipos de canais de cálcio modulados por receptor. Os canais de cálcio considerados como canais regulados por receptor, na realidade são regulados por processos dependentes de receptor. Então, além do mecanismo fundamental que governa sua abertura e fechamento, um número crescente de canais de cálcio, incluindo os dependentes de voltagem são regulados por mais de um mecanismo. Assim certos canais de cálcio são regulados por uma variedade de eventos reversíveis de fosforilação e desfosforilação que ocorrem em resposta a alterações dependentes de receptor no segundo mensageiro intracelular (REUTER, 1983; MILLER, 1987-a).

#### I.4.4.4. Os canais de cálcio na glândula adrenal

A produção de aldosterona pelas células da glomerulosa adrenal e a produção de corticosteróides pela zona fasciculada, são fenômenos relacionados com canais de cálcio presentes nessa glândula.

É conhecido que o cAMP serve como segundo mensageiro para o ACTH quando esse hormônio estimula a síntese de esteróides, e sabe-se que o cálcio interfere na ligação do ACTH a seu receptor (CHEITLIN, BUCKLEY, RAMACHANDRAN, 1985 ). A injeção de cálcio a células da linha YI não produz efeito sobre a síntese de esteróides, entretanto, fortes evidências, indicam o envolvimento da  $Ca^{2+}$ -calmodulina na regulação do transporte intracelular de colesterol nessas células (HALL , OSAWA, THOMASON, 1981).

YANAGIBASHI, KAWAMURA, PETER em 1990 estudaram a produção de corticosteróides em células dispersas da zona fasciculada de adrenais de rato e de bovinos. Observaram que ambas espécies apresentam resposta esteroidogênica ao ACTH e que essa resposta é estimulada pelo aumento da concentração de cálcio. Uma elevação das concentrações de potássio ( 0-20 mM) promovem um aumento na produção de corticosteróides e no

influxo de cálcio em células fasciculadas bovinas, sem ocorrer mudanças desses parâmetros em células de rato. O aumento da concentração de potássio produz uma despolarização nas membranas das células fasciculadas bovinas, havendo maior entrada de cálcio, o que induz a possibilidade de que a captação de cálcio nessas células ocorra por um processo dependente de voltagem. Inibidores dos canais de cálcio dependentes de voltagem, como nifedipina e PY108-068, inibem a produção de esteróides em células bovinas não estimuladas e em células estimuladas por ACTH, potássio e  $(\text{Bu})_2$  cAMP. YANAGIBASHI e colaboradores em 1990 observaram que a resposta esteroidogênica ao ACTH é mais resistente a esses inibidores do que a resposta do potássio. Essa observação sugere que esses dois agonistas não atuem através de um mesmo efector, no caso, canais de cálcio dependentes de voltagem. Os canais de cálcio ligados a receptores do ACTH não respondem ao potássio, o que poderia explicar a diferença nas respostas do ACTH e do potássio aos inibidores dos canais de cálcio dependentes de voltagem.

Os resultados de YANAGIBASHI e colaboradores em 1990 mostraram que nas células fasciculadas bovinas tanto o cAMP como o cálcio estão envolvidos na esteroidogênese. Como esses dois segundos mensageiros estão envolvidos na síntese de

esteróides, ainda não está claro, mas recentes publicações (LI, PARK, La BELLA, 1989) mostram que o ACTH<sub>1-10</sub> atua via cAMP e que o ACTH<sub>11-24</sub> atua via mecanismo dependente de cálcio. Em outros sistemas também foram encontradas interações entre vários segundos mensageiros.

Em conclusão, os trabalhos de YANAGIBASHI e colaboradores em 1990 sugerem que a esteroidogênese nas células fasciculadas é um fenômeno relacionado com cálcio e cAMP. O influxo de cálcio nas células bovinas ocorre através de canais dependentes de voltagem, enquanto nas células de rato esse influxo ocorre por um mecanismo independente de voltagem.

#### I.4.4.5. Bloqueio dos canais de cálcio por metais de transição

Cátions de metais de transição ligam-se a sítios específicos nas proteínas e são importantes na atividade catalítica de muitas enzimas. Esses íons ligam-se a sítios distintos dos sítios do cálcio nas proteínas, possuindo também a capacidade de exercer um efeito de bloqueio da corrente através dos canais. Os metais de transição são usados extensivamente para bloquear os canais de cálcio dependentes de voltagem numa grande variedade de tipos celulares. Sabe-se que os íons bloqueiam o fluxo de corrente por ligação a sítios no canal, entretanto, poucas informações existem a respeito do mecanismo pelo qual esses íons inibem o fluxo de cálcio por permeabilidade iônica.

Em 1984 NACHSEN estudou o bloqueio produzido por vários cátions multivalentes na captação de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  estimulada por  $\text{K}^+$  em sinaptossomas de cérebro de rato e mostraram que  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Ni}^{2+}$  bloqueiam a captação de  $\text{Ca}^{2+}$  com aproximadamente a mesma afinidade ( $50\mu\text{M}$ ). Por outro lado, em 1987 NARAHASHI e colaboradores mostraram que o  $\text{Ni}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$  bloqueiam tanto o componente sustentado como o transitório da corrente de  $\text{Ba}^{2+}$  em neuroblastoma, apesar da afinidade do  $\text{Ni}^{2+}$  ser duas vezes

maior para o componente sustentado e três vezes maior para o transitório.

Os metais de transição do grupo VIII pertencem a uma classe de bloqueadores iônicos que possuem uma afinidade relativamente moderada pelos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  quando comparados com bloqueadores mais eficientes como  $\text{Cd}^{2+}$  e lantanídeos, ou bloqueadores mais fracos como o  $\text{Mg}^{2+}$  (NACHSEN, 1984). Em 1991 WINEGAR e colaboradores confirmaram as ações de bloqueio dos metais de transição do grupo VIII e mostraram que bloqueiam a corrente através dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  sensíveis a dihidropiridinas em músculo esquelético. Os mesmos autores demonstraram que a cinética do bloqueio dos canais pelos metais de transição do grupo VIII é significativamente diferente quando observada a nível de um único canal. Enquanto o  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$  produzem rápidos bloqueios num mesmo canal, o  $\text{Ni}^{2+}$  produz eventos de bloqueio muito mais longos, comparáveis aos produzidos por bloqueadores de alta afinidade como  $\text{Cd}^{2+}$  e lantanídeos. Apesar das afinidades do  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Ni}^{2+}$  pelo canal serem similares a nível macroscópico, as constantes individuais que determinam a afinidade diferem significativamente. Assim o  $\text{Ni}^{2+}$  liga-se firmemente ao sítio do canal, mas sua entrada é bastante lenta. Isso contrasta com os bloqueadores de alta afinidade como  $\text{Cd}^{2+}$  que possuem

entrada extremamente rápida e onde a afinidade do "steady-state" é determinada pela quantidade de bloqueador existente no canal.

Os resultados obtidos por WINEGAR e colaboradores, em 1991, mostraram que a hiperpolarização acelera a saída dos bloqueadores estudados (metais de transição) ainda que existam diferenças quantitativas nos valores absolutos das taxas de desbloqueio. Existindo uma taxa de desbloqueio que aumenta com a hiperpolarização, os metais de transição assemelham-se a outros bloqueadores estudados a nível de um único canal como  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e os lantanídeos (LANSMAN et al., 1986, LANSMAN 1990, WINEGAR, LANSMAN, 1990). A hipótese de que os sítios de bloqueio residem no poro do canal e que o efeito de hiperpolarização aumenta a quantidade de bloqueador existente no interior da célula foi proposta por WOODHULL em 1973.

Os fatores físicos que governam o tempo de permanência do íon no canal ainda não estão bem esclarecidos. Os metais de transição diferem entre si não apenas no tamanho, mas também em propriedades químicas assim como a capacidade de polarização e requerimentos estéricos do complexo de coordenação. O  $\text{Ni}^{2+}$  com um raio iônico de 0,55 Angstrom



permanece no canal um tempo 50 vezes maior que o  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  que possuem raios iônicos de 0,58 e 0,57 Angstrom, respectivamente. Os resultados de WINEGAR e colaboradores, em 1991, apontam para a importância de forças não elétricas na determinação do tempo de permanência do metal de transição no poro.

Em 1986 e 1990 LANSMAN e colaboradores sugeriram que a etapa limite para entrada do íon no canal de  $\text{Ca}^{2+}$  depende primariamente da perda da água de hidratação do íon. O  $\text{Ni}^{2+}$  entra mais lentamente no canal e exerce efeitos de bloqueio semelhantes aos bloqueadores de alta afinidade (WINEGAR et al., 1991) o que poderia ser explicado pela sua lenta desidratação. Ele desidrata cerca de 100 vezes mais lentamente que  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$  e 1000 vezes mais lento que  $\text{Zn}^{2+}$  (DIEBLER et al., 1969). Assim,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e lantanídeos possuem uma entrada mais rápida ( $10^7 - 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ),  $\text{Co}^{2+}$  é pouco mais lento ( $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) e  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Ni}^{2+}$  possuem uma baixa taxa de entrada no canal ( $2 \times 10^5$  e  $6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) na presença de 110 mM  $\text{Ba}^{2+}$  e 0 mV (LANSMAN et al., 1986; LANSMAN, 1990; WINEGAR, LANSMAN, 1990).

Análises do bloqueio de correntes monovalentes através dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  em linfócitos de camundongos sugeriram que

o sítio de complexação do cálcio está localizado no poro do canal num potencial correspondente a cerca de 60% do valor do potencial a partir da superfície de membrana (FUKUSHIMA, HAGIWARA, 1985). Isso é comparável ao bloqueio produzido em correntes unitárias de bário por lantanídeos, onde o sítio de complexação desses metais está localizado a 40% e 70% do valor do potencial a partir da superfície de membrana (LANSMAN, 1990). Cálculos das distâncias elétricas efetivas a partir de dados cinéticos indicam que  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Ni}^{2+}$  ligam-se aproximadamente a 6% e 20% do valor de potencial da superfície de membrana, respectivamente. Esses resultados são qualitativamente consistentes com a idéia de que  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Ni}^{2+}$  ligam-se a sítios mais superficiais no poro, do que o  $\text{Ca}^{2+}$  e os lantanídeos.

A natureza dos sítios de ligação para os metais de transição é de grande interesse, porque fornece informações sobre a estrutura dos canais perto da superfície externa da membrana. Metais de transição preferem ligar-se a grupos doadores de nitrogênio (MARTIN, 1988), sugerindo que os seus sítios de complexação possam conter anéis com átomos de nitrogênio na face interna do poro. Por outro lado, os sítios de ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  possuem um ou dois grupos carboxilato (éster de ácido carboxílico) e vários grupos carbonil.

## I.5. Possíveis Mecanismos de Ação do Vanádio

### I.5.1. Generalidades

O vanádio é classificado quimicamente como um elemento de transição localizado no grupo VB e no 4º período da tabela periódica, com números de oxidação que variam de +2 a +5. É o 21º elemento em abundância na crosta terrestre na concentração de 135 ppm e o 34º nas águas marinhas na razão de 2ppb.

Devido a sua grande importância industrial e pelo fato de ser um elemento essencial para certas formas de vida, as ações biológicas do vanádio ocuparam um lugar de destaque nas investigações científicas das últimas décadas. Assim, nos fluídos corporais, num pH entre 4,0 e 8,0, a forma predominante do vanádio é o íon vanadato ou metavanadato  $\text{VO}_3^-$ , com número de oxidação +5. O íon  $\text{VO}_3^-$  através de um sistema de transporte de ânions poderá entrar em determinadas células e no seu interior ser reduzido, não enzimaticamente, pela glutatona, NADH ou ascorbato, a  $\text{VO}^{2+}$ , íon vanadil, com número de oxidação +4 (NECHAY, 1984).

São conhecidas numerosas formas de vanadatos que diferem quanto a sua composição. Os que apresentam ação biológica conhecida são:  $\text{VO}_4^{3-}$  íon ortovanadato,  $\text{V}_2\text{O}_7^{4-}$

divanadato ou pirovanadato e  $\text{VO}_3^-$  metavanadato. Em solução, a conversão das formas orto, piro e meta é praticamente instantânea, assim como a formação de oligômeros  $(\text{VO}_3)_n^{-n}$ . Em concentrações milimolares e num pH neutro, as soluções de vanadato contem monômeros, dímeros, tetrâmeros e pentâmeros. O vanadato é tanto eletrônica como estruturalmente semelhante ao fosfato (CANTLEY et al., 1977). Apresentam estrutura tetraédrica em solução tendo a ligação V-O um comprimento de aproximadamente 1,66 angstrons enquanto a ligação P-O possui um comprimento de 1,55 angstrons. Devido a essa similaridade o íon  $\text{VO}_3^-$  pode substituir o fosfato em muitos sítios de ligação (NECHAY, 1984).

O íon vanadil,  $\text{VO}^{2+}$ , assemelha-se ao íon  $\text{Mg}^{2+}$  apresentando raios atômicos em torno de 0,60 angstrons e 0,65 angstrons, respectivamente. Do mesmo modo que o vanadato em relação ao fosfato, o íon vanadil poderá substituir o íon  $\text{Mg}^{2+}$  em muitos sítios celulares e bioquímicos de ação (NECHAY, 1984).

A distribuição do vanádio no corpo humano varia com o tecido e com o órgão em estudo, sendo que as maiores concentrações foram encontradas nos dentes, ossos, cabelos e unhas, admitindo-se que nos dois últimos casos as concentrações sejam sensíveis à exposição ambiental. Na

dieta diária o homem consome de 10 a 60 ug de vanádio com excreção nas fezes e urina. A excreção pela urina é cerca de 10 ug/dia (NECHAY, 1984). A concentração estimada de vanádio em tecidos de mamíferos é de 17ug/l ou 0,34 uM no sangue, 26ug/l ou 0,52uM em hemácias e 20 a 30 ug/kg de peso seco em homem adulto no fígado, baço, pâncreas e próstata (CANTLEY et al., 1977).

A importância nutricional do vanádio foi estudada em ratos por MERTZ em 1974 . Foram induzidas deficiências nesses animais, pela diminuição de vanádio na dieta, utilizando concentrações menores que 100ng/g. Foi concluído que para um desenvolvimento normal o requerimento de vanádio estaria provavelmente em torno de 500ng/g.

Fibroblastos diplóides humanos requerem 0,25ng de vanádio por mililitro de meio para crescimento clonal ótimo. O íon  $VO_3^-$  parece atuar sinergicamente com o fator de crescimento epidermal na estimulação da síntese de DNA em fibroblastos (CARPENTER, 1981).

#### I.5.2. Interação com ATPases

O principal sistema de transporte ativo em muitas células animais é a bomba que retira sódio e simultaneamente acumula potássio no interior da célula. Esse processo requer ATP e especificamente é inibido por

glicosídios cardíacos como a ouabaína. A proteína que constitui essa estrutura celular é chamada de Na-K-ATPase. A necessidade da bomba de sódio e potássio varia de um tecido para outro, dependendo da sua função. A unidade básica da enzima é um dímero  $\alpha\beta$  com o polipeptídeo  $\alpha$  atuando como unidade catalítica. Existem pelo menos três isoformas da cadeia  $\alpha$ :  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$ . As três formas possuem cerca de 85% de similaridade seqüencial com nítida diferença na região N-terminal, possuindo a isoforma  $\alpha_1$  1018 resíduos de aminoácido,  $\alpha_2$  1015 e  $\alpha_3$  1013 resíduos. As isoformas são expressas em diferentes tecidos e em diferentes estágios de desenvolvimento. Existem evidências que pelo menos cinco diferentes gens podem expressar a  $\alpha$  subunidade e que o gen da  $\beta$  subunidade pode ser transcrito por diferentes caminhos (NECHAY, 1984).

A energia para a produção do gradiente de sódio e potássio é proveniente da hidrólise do ATP a ADP e Pi. A atividade da ATPase associada com a bomba  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  é o resultado da fosforilação, dependente de sódio, do resíduo aspartil da proteína da bomba e a subsequente hidrólise, dependente de potássio, do grupo acil fosfato da enzima. A fosforilação inicial da molécula da enzima ocorre somente após a ligação de três íons sódio aos sítios do lado citoplasmático da membrana. Dessa maneira tem-se a conformação  $E_1\text{-P}$  da enzima.

Entretanto, a fosforilação inicia uma rápida transição da bomba para o estado  $E_2-P$  a partir do qual o sódio é liberado no espaço extracelular, o potássio então liga-se à estrutura  $E_2-P$  iniciando a hidrólise do acil fosfato. Isso desestabiliza  $E_2$  que espontaneamente reverte à  $E_1$ , trazendo potássio para o interior da célula (SIEGEL, 1989).

O vanádio interage com ATPases de transporte em diferentes tipos celulares. Muitos estudos tem sido dirigidos no sentido de esclarecer os possíveis mecanismos de ação inibitória do vanádio sobre essas enzimas. Considerando suas propriedades físico-químicas, seu requerimento nutricional, distribuição nos tecidos e as interações com Na-K-ATPases, CANTLEY e colaboradores, em 1978 e 1979, postularam que o vanádio é um potente regulador da bomba de sódio e potássio.

A presença da  $Na^+-K^+$ -ATPase na bicamada lipídica confere alta condutância aos canais iônicos durante a permanência do gradiente de cátions através da membrana. Quando o gradiente é desfeito, resulta uma baixa condutância nos canais iônicos. O estado de alta condutância é inibido pela ouabaína e pelo vanadato (LAST, GANTZER, TYLER, 1983).

A ação do íon  $\text{VO}_3^-$  não se limita à Na-K-ATPase, também interfere na  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, estudada em retículo endoplasmático de músculo esquelético de mamíferos, coração e eritrócitos humanos (NECHAY, 1984). O cálcio, em geral, induz a transição conformacional da enzima, de  $E_2$  à  $E_1$  estabilizando o estado  $E_1$ . O íon  $\text{VO}_3^-$  estabiliza o estado  $E_2$  e inibe a mudança conformacional induzida pelo cálcio. O  $\text{VO}_3^-$  liga-se à enzima livre de cálcio num processo que requer  $\text{Mg}^{2+}$  sendo competitivamente antagonizado por fosfato e ATP. Os ativadores da enzima  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  e calmodulina facilitam a inibição pelo  $\text{VO}_3^-$  enquanto ATP e  $\text{Ca}^{2+}$  em altas concentrações,  $5 \times 10^{-5}$  M protegem a enzima desse efeito inibitório.

A ação do vanadato na captação de cálcio foi investigada com o inibidor de canais aniônicos (4,4 diisotiocianato-2,2 dissulfônico ácido stilbeno-DIDS) por VAREKA e CARAFOLI em 1982. Em hemácias pré-incubadas com DIDS antes da adição de vanadato houve uma substancial inibição da captação de cálcio, mas não houve inibição quando o DIDS foi adicionado após o vanadato. Isso sugeriu que o vanadato pode atravessar a membrana via canal aniônico e aumentar a concentração de cálcio. Experimentos com vanádio radioativo tem mostrado que as células vermelhas realmente captam vanadato via canais aniônicos, sustentando a hipótese de que o vanádio induz um aumento da concentração cálcio pela inibição da bomba que conduz o



cálcio para o exterior da célula. Entretanto, a inibição da bomba não bloqueia totalmente a troca transmembrânica de cálcio. O influxo do íon é inibido pelo verapamil, cobalto e quinidina, indicando que o influxo é um processo mediado por carreadores. Experimentos onde o gradiente transmembrânico de potássio foi abolido ou diminuído pela adição de ionóforos ou pelo aumento da concentração de potássio no meio, sugeriram que o gradiente desse íon é importante no influxo de cálcio.

Segundo SIEMON, SCHNEIDER, FUHRMANN, em 1982, o acúmulo de cálcio pelas células vermelhas induzido pelo vanadato causa um grande efluxo de potássio, sugerindo ou a ativação dos canais de potássio sensíveis a cálcio ou que o metabólito intracelular  $VO^{2+}$ , de maneira similar ao  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  e  $Pb^{2+}$  possa abrir os canais de potássio. Ocorre, então, uma lenta circulação de cálcio através da membrana dos eritrócitos. O influxo ocorre através de canais sensíveis à verapamil, o que possivelmente é devido a uma descarga do gradiente transmembrânico de potássio, sendo que o efluxo está ligado à  $Ca^{2+}$ -ATPase sensível a ação inibitória do íon  $VO_3^-$ .

### I.5.3.Semelhanças e Diferenças entre as Ações do Íon Vanadato e Insulina

O mecanismo de ação da insulina tem sido objeto de inúmeras investigações tanto a nível bioquímico como fisiológico desde sua descoberta. O número de compostos que apresentam algumas das propriedades da insulina é extenso e estudos com esses materiais tem revelado numerosos mecanismos do metabolismo celular. O íon vanadato, recentemente, vem sendo estudado em muitos sistemas biológicos, uma vez que ele mimetiza vários efeitos celulares da insulina que variam de acordo com o tecido estudado, da concentração utilizada, enfim das condições experimentais. A química do vanadato é complexa em solução e muitos dos efeitos estudados podem ser dependentes do estado de valência. Enquanto alguns estudos revelam similaridade entre os efeitos da insulina e do vanadato, outros mostram diferenças entre as ações desses dois agentes. "In vitro", suas propriedades "insulin-like" tem sido caracterizadas em hepatócitos (TAMURA et al., 1984), adipócitos (KADOTA et al., 1987), hemácias (VARECKA, CARAFOLI, 1982), sendo muito discutido seu efeito na estimulação da atividade tirosina quinase do receptor de insulina. A ação "insulin-like" do vanadato também foi observada "in vivo". A administração oral de vanadato a ratos diabéticos deficientes em insulina diminuiu os níveis

da glicose sanguínea, e melhorou a homeostase em animais hiperinsulinêmicos, resistentes à insulina (BRICHARD, POTTIER, HENQUIN, 1989; BRICHARD, BAILEY, HENQUIN, 1990).

HEYLIGER e colaboradores em 1985 e GIL e colaboradores em 1988 estudaram o efeito do vanadato sobre os níveis de glicose sanguínea em ratos diabéticos por estreptozotocina. Observaram que a glicemia retorna a níveis normais e que o vanadato não aumenta a quantidade de insulina sérica, indicando que os tecidos alvos da insulina são também os sítios de ação do vanadato. Em músculo esquelético e em fígado de ratos diabéticos observa-se que a captação de glicose é estimulada com a conseqüente normalização da glicemia após a administração oral de vanadato (MEYERVITCH et al., 1987).

Efeitos adicionais do vanadato sobre o metabolismo de carboidratos podem estar relacionados com a redução da concentração da glicose plasmática. O vanadato normaliza a atividade glicoquinase que está ausente em fígado de animais diabéticos (GIL et al., 1988). O aumento na atividade glicoquinase é devido ao aumento de seu mRNA (MIRALPEIX et al., 1991). Além disso, o vanadato aumenta o consumo de glicose hepática através do aumento da atividade da frutose 2,6 difosfato e da 6-fosfofruto-2-quinase (PFK-2) (GIL et al., 1988). A frutose 2,6 difosfato é, na

verdade, um potente estimulador da glicólise e inibidor da gliconeogênese no fígado (PILKIS, EL-MAGHRABI, 1988). A concentração da frutose 2,6 difosfato depende do balanço entre as atividades da 6-fosfofruto-2 quinase e da frutose 2,6 bifosfatase (FBPase) que respectivamente, catalizam sua síntese e degradação (PILKIS, EL-MAGHRABI, 1988).

Em 1992 MIRALPEIX e colaboradores estudaram o efeito da administração oral de vanadato sobre a atividade hepática da PFK-2, no conteúdo de PFK-2/FBPase-2 e os níveis de seus mRNAs. Determinaram também a atividade e os níveis de mRNA da piruvato quinase tipo-L hepática (L-PK). Observaram que animais diabéticos, sujeitos a tratamento oral com vanadato durante 15 dias, tiveram restaurados os níveis de mRNAs da PFK-2/FBPase-2 e L-PK. O tempo e a efetividade do tratamento foi diferente do tratamento realizado com insulina, ou seja, o vanadato produziu um lento e progressivo aumento nos mRNAs da PFK-2/FBPase-2, não alcançando, entretanto, os mesmos valores atingidos pela administração de insulina. Essa diferenças poderão ser atribuídas às diferentes rotas de administração e mecanismos de ação do vanadato. As semelhanças nas ações da insulina e do vanadato sugerem que ambos podem atuar por uma via comum. Os trabalhos de MIRALPEIX e colaboradores mostraram que o vanadato pode também mimetizar algumas ações da insulina na expressão de gens, explicando a

recuperação de animais diabéticos após o tratamento oral com esse íon.

Os efeitos do vanadato também foram investigados em células das ilhotas pancreáticas onde o vanadato aumentou ligeiramente a liberação de insulina (ZHANG et al., 1991) e inibiu a Na-K-ATPase da membrana plasmática.

O vanadato é indicado por alguns pesquisadores como um agente que interfere na autofosforilação do receptor de insulina. A molécula de insulina liga-se à  $\alpha$  subunidade estimulando a fosforilação do resíduo de tirosina da  $\beta$  subunidade do receptor, que ativa a transfosforilação de substratos exógenos e proteínas intracelulares (DUCKWORTH et al., 1988).

Em 1992 ERIKSON, LONNROTH e SMITH estudaram o efeito do vanadato sobre a ligação da insulina na superfície celular e a sensibilidade à insulina em adipócitos de rato. Usaram células normais e tratadas com amiloride, substância que dificulta a sensibilidade à insulina nessas células. Para investigar se o vanadato podia atuar diretamente na ligação da insulina a seu receptor, realizaram experimentos com diferentes concentrações de vanadato e  $^{125}\text{I}$ -insulina. Observaram que o vanadato inibiu a

ligação da insulina de maneira dose dependente em concentração bem maior ( $>1\text{mmol/l}$ ) que a concentração capaz de produzir 50% do efeito estimulatório máximo ( $0,6\text{mmol/l}$ ). Em adipócitos normais o vanadato ( $0,6\text{mmol/l}$ ) aumenta a ligação da  $^{125}\text{I}$ -insulina, não alterando a afinidade pelo receptor. Em adipócitos tratados com amiloride apenas o vanadato apresentou efeito estimulatório, tanto na ligação como na sensibilidade ao hormônio. Aparentemente podem existir dois componentes opostos aos efeitos do vanadato sobre a ligação da insulina: 1º- a pré-incubação de adipócitos normais com 50% da concentração efetiva máxima de vanadato pode provocar a "up-regulation" dos sítios de ligação. 2º- o vanadato exerce uma ação inibitória direta na ligação da insulina, o que pode sugerir uma competição entre insulina e vanadato na  $\alpha$  subunidade do receptor ou, alternativamente, um efeito direto sobre a molécula de insulina. Apesar desses dois efeitos opostos o vanadato claramente aumenta a ligação da insulina sob condições fisiológicas.

Em contraste com os resultados encontrados por ERIKSON e colaboradores em 1992, GREEN, em 1986, sugeriu que o vanadato atua inteiramente em nível pós-receptor, uma vez que seus efeitos foram demonstrados em células onde os receptores de insulina haviam sofrido "down-regulation" ou tinham sido digeridos por tripsina.

Em 1988 DUCKWORTH e colaboradores estudando os efeitos "insulin-like" do vanadato em adipócitos isolados de rato, verificaram que esse íon estimulou a incorporação de  $[2\text{ }^3\text{H}]$  glicose de maneira dose dependente, sendo o seu efeito maior que o da insulina. Na busca de uma explicação para esse fato foi sugerido que o vanadato poderia lesar as células induzindo uma captação de glicose por mecanismos não específicos. Entretanto, o uso de citochalasin B, inibidor específico do transportador de glicose, levou a um total bloqueio do transporte de glicose, tanto o estimulado pela insulina como pelo vanadato. O efeito do vanadato foi comparado ao de outras substâncias com efeito "insulin-like" como spermidine, spermidine e vitamina K<sub>5</sub>, que produzem um efeito igual ou menor que o efeito máximo da insulina, enquanto o vanadato apresentou efeito significativamente maior que o da insulina.

Tanto o efeito da insulina como o do vanadato sobre o metabolismo de  $[^{14}\text{C}]$  glicose também foi estudado em adipócitos isolados (KADOTA et al., 1987). A produção de CO<sub>2</sub> e a incorporação de  $^{14}\text{C}$  em lipídios foi determinada e constatado que insulina e vanadato exercem ação estimulatória nos dois casos, sendo o vanadato mais efetivo que a insulina.

O íon vanadato possui efeito sobre o transporte de aminoácido neutros em músculo Soleus de ratos Wistar, conforme trabalhos realizados por MUNÓZ e colaboradores em 1992. Esse grupo de pesquisadores verificou que o vanadato estimulou o sistema A de transporte de aminoácidos havendo um aumento de 80% na captação de (<sup>14</sup>C) MeAIB e na produção de lactato. A análise cinética sobre o efeito estimulatório do vanadato na captação de (<sup>14</sup>C) MeAIB foi caracterizado por um aumento de  $V_{max}$  sem modificações de  $K_m$ . Com o objetivo de esclarecer o mecanismo de estimulação do vanadato sobre a captação de <sup>14</sup>C MeAIB e produção de lactato, foram estudadas interações entre insulina (100mM) e vanadato (8mM), concentrações que estimularam a captação de (<sup>14</sup>C) MeAIB na mesma extensão. Com o uso de gramicidina D, ionóforo que extingue o potencial de membrana, houve diminuição na captação basal e na estimulada pela insulina na ordem de 29 a 33%, enquanto a redução na incorporação do aminoácido estimulada por vanadato foi cerca de 53%. Os efeitos da insulina e vanadato não foram aditivos no transporte de (<sup>14</sup>C) MeAIB bem como no de metil glicose, mas foram aditivos na produção de lactato. Conforme descrito por KILBERG e colaboradores em 1980, o sistema A de transporte de aminoácido é pH dependente, assim, o aumento de pH tanto intra como extracelular causado pelo vanadato, produziu um aumento na captação de aminoácido, bem como na produção de lactato. MUNÓZ e colaboradores concluíram que o vanadato produz ativação do sistema A por



uma mudança do pH intracelular. Entretanto, a insulina aumenta a atividade do sistema A em músculo esquelético de rato por um mecanismo independente de síntese protéica ou gradiente eletroquímico de sódio. Essa estimulação é caracterizada por um aumento de  $V_{max}$ , podendo ser atribuído ao aumento da atividade dos carreadores do sistema A.

O íon vanadato exerce uma série de efeitos biológicos sendo alguns marcadamente "insulin-like". Alguns autores sugerem sua ação no próprio receptor de insulina e outros a consideram a nível de pós-receptor. Os eventos pós-receptor que causam alterações no metabolismo celular em resposta à insulina não são totalmente esclarecidos. Provavelmente nem todos os efeitos celulares da insulina podem ser explicados por uma simples mensagem intracelular. Então, os agentes que possuem efeito "insulin-like" a nível de pós-receptor podem promover ações intracelulares importantes por várias ações da insulina.

## **I.6. Objetivos**

O presente trabalho teve como objetivo geral investigar a ação da insulina sobre o córtex adrenal, utilizando para isso o estudo do transporte de aminoácidos neutros. Para atingir esse objetivo geral foram propostos os objetivos específicos relacionados abaixo:

- 1.** Identificar os sistemas de transporte de aminoácidos neutros presentes em córtex adrenal bovino, centrando a investigação nos sistemas A, ASC e L, que são os principais sistemas encontrados num grande número de tecidos em diferentes espécies.
- 2.** Verificar a ação da insulina sobre os sistemas de transporte identificados, uma vez que muitos sistemas mediados estão sujeitos à ação hormonal.
- 3.** Determinar os parâmetros cinéticos  $V_{\max}$  e  $K_m$  da ação da insulina na estimulação do transporte de aminoácidos neutros. Em alguns sistemas sensíveis à ação hormonal ocorrem alterações na afinidade da molécula carreadora pelo soluto transportado. Em outras situações o hormônio estimula a síntese de novas proteínas transportadoras, aumentando a capacidade máxima de transporte.

4. Caracterizar o envolvimento dos canais de cálcio dependentes de voltagem tanto com o transporte basal de aminoácidos neutros como com a ação da insulina, utilizando bloqueadores específicos para esses canais.

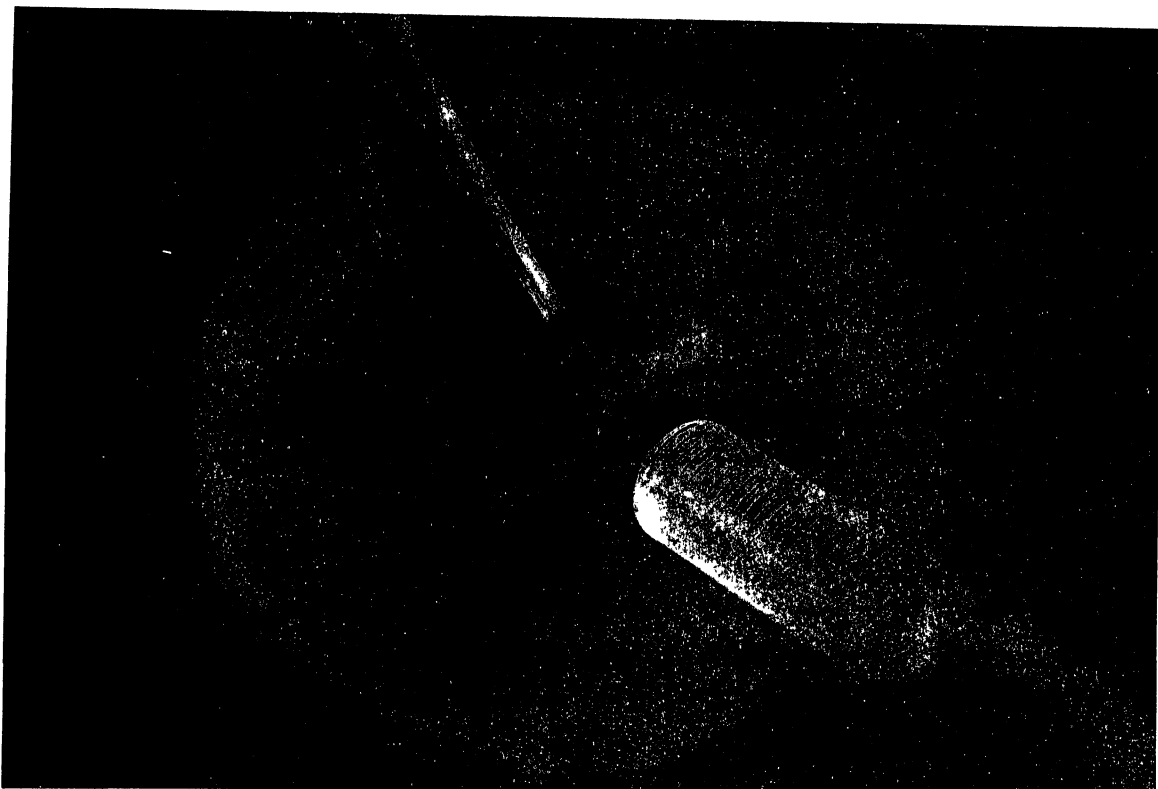
5. Comparar as ações da insulina e do vanadato de sódio sobre a captação de aminoácidos neutros, visto que o íon vanadato possui muitas ações similar a da insulina sobre diferentes atividades fisiológicas.

## **II. MATERIAL E MÉTODOS**

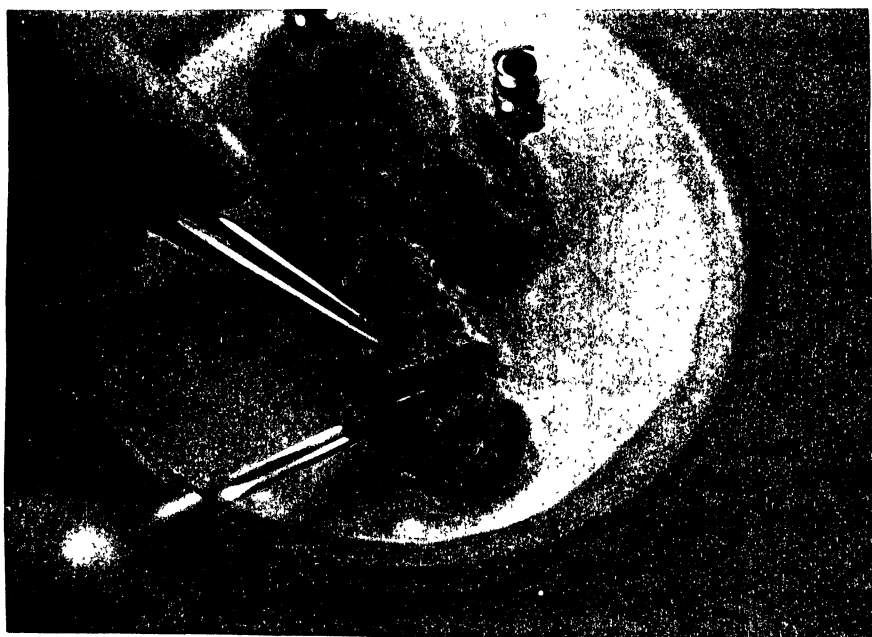
### **II.1. As Glândulas**

As glândulas adrenais bovinas foram obtidas na hora do abate dos animais no Frigorífico Líder, no município de Viamão. Imediatamente foi retirado o excesso de tecido adiposo para permitir a perfusão com tampão Krebs-Ringer-bicarbonato, pH 7,4 contendo 0,2% de glicose à temperatura de 4 °C. A perfusão foi realizada com seringa plástica de 5ml, utilizando-se para cada glândula um total de 10ml da solução tampão. Em seguida foram imersas num recipiente contendo o tampão na temperatura de 4 °C. Nesse frasco, o líquido utilizado na perfusão juntamente com o sangue começam a ser eliminados do interior da glândula. Após ser coletado um número suficiente de adrenais (4 ou 5), foram todas colocadas em outro frasco com uma nova porção do tampão a 4 °C e acondicionado num recipiente com isolamento térmico (isopor). Foram transportadas nessas condições ao laboratório o mais rapidamente possível, cerca de 45 minutos.

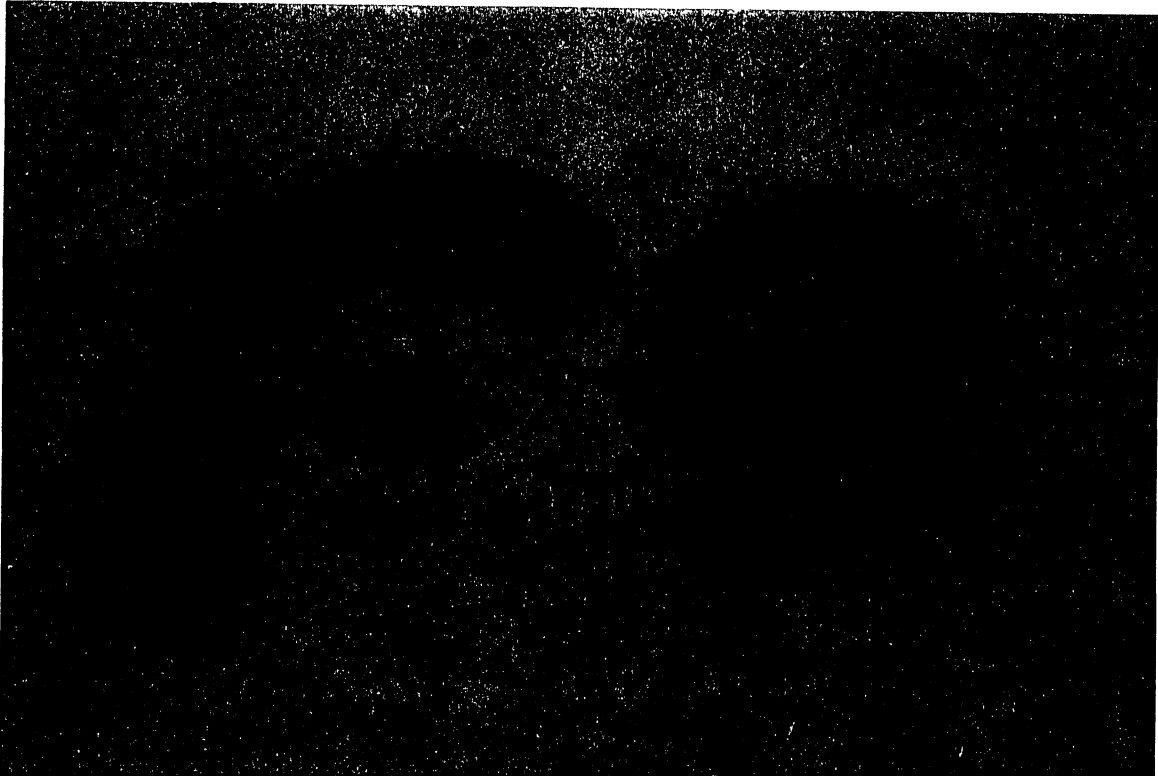
Nos experimentos em que foram utilizadas glândulas adrenais de rato, os animais eram ratos Wistar, machos, adultos, com peso entre 150 e 200g, provenientes do Biotério do Instituto de Biociências da Universidade Federal



**FIGURA II.1-** PERFUSÃO DA GLÂNDULA COM KRb-GLICOSE.



**FIGURA II.2 -** CORTE DOS "SLICES"



**FIGURA II.3** - FATIA INTEGRAL CONTENDO MEDULA E CÓRTEX E MEDULA E CÓRTEX SEPARADOS.

do Rio Grande do Sul. Alimentados com ração Purina, Nutripal (Porto Alegre, RS) e água "ad libitum" até a realização do experimento.

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e as glândulas foram removidas por incisão longitudinal dorsal.

No laboratório, as glândulas adrenais bovinas foram colocadas sobre placas de parafina geladas, recobertas com papel de filtro umedecido com tampão Krebs-Ringer-

bicarbonato-glicose. As placas de parafina foram mantidas sobre gelo durante o procedimento descrito a seguir: as glândulas eram completamente limpas do tecido adiposo e conjuntivo. Após essa limpeza eram fixas com agulhas nas placas de parafina e cortados "slices" com cerca de 0,5mm de espessura, com o auxílio de um bisturí. De cada "slice" foi retirada a medula e o córtex imerso em um recipiente contendo o tampão Krebs-Ringer-bicarbonato-glicose, gelado. Terminado esse procedimento as amostras foram rapidamente secas em papel de filtro e pesadas em balança Micronal modelo B 160. O peso aproximado de cada amostra foi de 100 mg. Após a pesagem, foram colocadas em placas de Petri, recobertas com papel de filtro embebido no tampão Krebs-Ringer-bicarbonato-glicose sobre placas de gelo, até completar o número de amostras necessário para o experimento.

No caso das glândulas adrenais de rato, as mesmas foram colocadas em placas de Petri revestidas com papel de filtro embebido em tampão Krebs-Ringer-bicarbonato, mantidas sobre placas de gelo. Foram retirados os tecidos adiposo e conjuntivo sendo feita uma incisão longitudinal em cada glândula, de acordo com WASSERMANN e colaboradores em 1989. Foram pesadas em balança Micronal modelo B 160 e mantidas nas placas sobre gelo até completar o número necessário de glândulas para o experimento.

## II.2. Meios de Incubação

Nos experimentos realizados com córtex adrenal bovino, foi utilizado tanto na perfusão da glândula, como no transporte, na preparação e na incubação, o tampão Krebs-Ringer-bicarbonato com 0,2% de glicose (KRb-glicose). O preparo do tampão foi feito a partir das seguintes soluções estoques: NaCl (18g/100ml), KCl (0,92g/100ml), CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (0,96g/100ml), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,422g/100ml), MgSO<sub>4</sub> (0,764g/100ml) e NaHCO<sub>3</sub> (5,46g/100ml). Essas soluções foram utilizadas na proporção de 2 ml de cada uma para 104 mg de glicose e levada ao volume de 52 ml com água destilada. A solução assim obtida foi gaseificada com carbogênio (mistura de 95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub> V/V) até atingir o pH 7,4, o que foi confirmado com medidor de pH DMPH-2-Digimed.

Nos experimentos com adrenais de rato, foi utilizado o tampão Krebs-Ringer-bicarbonato (KRb) preparado a partir das mesmas soluções estoques enumeradas anteriormente, porém sem a adição de glicose. Gaseificado com carbogênio e levado ao pH 7,4.

Foi utilizada também uma versão assódica do tampão KRb-glicose a partir das soluções citadas anteriormente com exceção do bicarbonato de sódio e do cloreto de sódio. No preparo desse tampão foram utilizados 2 ml das soluções



estoques mais 0,26 ml de bicarbonato de colina (4,84M) e 2 ml de cloreto de colina (42,4g/100ml), sendo o volume final completado a 52 ml com água destilada. O pH foi ajustado com carbogênio em 7,4 .

**TABELA II.1**

CONCENTRAÇÕES IÔNICAS DAS SOLUÇÕES PREPARADAS E CONCENTRAÇÕES IÔNICAS DOS LÍQUIDOS INTRA E EXTRA CELULARES.

Soluções	m Eq/l	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Cl <sup>-</sup>
Extra-celular		140-145	4-5	2,5	1,5	27	1,0	100
Intra-celular		10	145-150	2,0	4,0	8,0	65-70	5-20
KRb		146	4,7	2,5	1,2	25	1,2	127
KRb-colina		colina 146	4,7	2,5	1,2	25	1,2	127

### II.3. Substâncias Adicionadas

#### II.3.1 Não Radioativas

As soluções estoques utilizadas no preparo dos tampões foram obtidas a partir de reagentes E. Merck (Darmstadt, Alemanha).

Nos experimentos realizados em meio assódico, o bicarbonato de colina e o cloreto de colina foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, U.S.A.).

A insulina cristalina bovina foi obtida do laboratório Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemanha), preparada imediatamente antes do experimento. Utilizou-se a proporção de 1,0 mg do hormônio, pesado em balança Mettler modelo AE 163, para 100  $\mu$ l de ácido clorídrico 0,06 M e 400  $\mu$ l de água destilada. Assim obtinha-se uma solução com aproximadamente 25 UI de insulina. Em cada tubo de incubação foram adicionados 20  $\mu$ l dessa solução, o que resultou numa concentração final de  $7 \times 10^{-6}$  M ou 1,0 UI/ml.

O ácido metil aminoisobutírico não radiativo utilizado nos experimentos onde o objetivo foi bloquear os sistemas de transporte de aminoácidos ou na determinação de  $K_m$  e  $V_{max}$ , foi obtido da Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, U.S.A.).

O verapamil utilizado nos experimentos de bloqueio de canais de cálcio foi obtido de uma solução comercial de Dilacoron (Knoll, Rio de Janeiro), na concentração de 2,5 mg/ml ( $5,5 \times 10^{-3}$  M). Essa solução foi diluída para a obtenção das concentrações usadas nos experimentos. Os demais bloqueadores dos canais de cálcio, cloreto de cobalto e sulfato de níquel foram obtidos da E. Merck (Darmstadt, Alemanha).

O vanadato de sódio empregado nos experimentos que objetivaram encontrar alguma similaridade entre as ações do sal e da insulina sobre o transporte de aminoácidos, foi adquirido da Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, U.S.A.).

### II.3.2. Radioativas

Em todos os experimentos foram adicionados aminoácidos modelos não metabolizáveis que serviram como indicadores do transporte através da membrana. Assim, foram utilizados o ácido 2-metil aminoisobutírico ( $\alpha$ -[1- $^{14}$ C]MeAIB) com atividade específica de 48,4 mCi/mmol, o ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico ( $\alpha$ [3- $^{14}$ C]AIB) com atividade específica de 30 mCi/mmol e o ácido 2-amino-ciclopentano-1-carboxílico (1-[carboxil- $^{14}$ C] Cleu) com atividade específica de 48,5

mCi/mmol, todos obtidos da Du Pont NEN Products (Boston, Mass, U.S.A.).

#### **II.4. Incubação**

As amostras de córtex adrenal bovino foram colocadas individualmente em tubos plásticos contendo o tampão adequado para o experimento, na presença ou ausência de insulina. Em seguida foram pré-incubadas por 90 minutos (nos primeiros experimentos por 30 minutos) em agitador metabólico Dubnoff-Fanem, a 37 °C, em atmosfera de carbogênio (95% O<sub>2</sub> : 5% CO<sub>2</sub> V/V). Após esse período foram transferidas para outros tubos idênticos contendo 1 ml do tampão e 0,1 µCi do aminoácido modelo, iniciando-se o período de 120 minutos de incubação.

Nos experimentos onde foram usadas adrenais de rato o procedimento foi o mesmo, alterando-se apenas o tempo de incubação que passou a ser de 45 minutos.

#### **II.5. Processamento das Amostras e Expressão dos resultados**

Após o período de incubação, as amostras foram removidas do meio, secas em papel de filtro umedecido em KRb-glicose, com o objetivo de remover o excesso de

aminoácido radiativo aderido à superfície externa da amostra. Foram colocadas em tubos de vidro contendo 1,0 ml de água destilada e fechados hermeticamente. Esses tubos foram congelados a vinte graus negativos e posteriormente fervidos por 5 minutos, com o objetivo de romper a membrana celular e obter o equilíbrio entre o líquido intracelular e a água adicionada. Desse meio foram extraídas alíquotas de 25  $\mu$ l, transferidas para frascos (vials) contendo 3 ml de líquido de cintilação Aquasol 2 (Du Pont, NEN Products, Boston, MA, U.S.A.). Essas amostras representaram o meio intracelular.

Do meio de incubação que permaneceu nos frascos de plástico, foram retiradas alíquotas de 25  $\mu$ l e transferidas para frascos (vials) contendo 3 ml de líquido de cintilação. Essas amostras representaram o meio extracelular.

A radioatividade das alíquotas foi determinada em espectômetro de cintilação LKB Rack Beta modelo 1215 (LKB Produkter AB, Bromma, Suécia). A leitura de cada amostra foi realizada durante 2 minutos e expressa em contas por minuto (cpm).

Os resultados foram expressos pela relação entre a radioatividade do tecido (meio interno) e a radioatividade do meio de incubação (meio externo): Relação tecido/meio (T/M).

$$T/M = \frac{\text{cpm x ml de água tecidual}}{\text{cpm x ml de líquido de incubação}}$$

#### **II.6. Análise Estatística**

Os resultados foram expressos como a média dos diversos grupos experimentais indicando o erro padrão. As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste "t" de Student ou por análise de variância de uma ou duas vias, seguida pelo teste de raio múltiplo de Duncan (realizados em microcomputador, com a utilização do *software* SPSS). As diferenças encontradas foram consideradas significativas para "p" igual ou menor que 0,5.

#### **II.7. Grupos Experimentais**

Na determinação das condições ótimas para os experimentos de transporte de aminoácidos, em córtex adrenal bovino, foi determinado o melhor tempo de pré-incubação e o melhor tempo de incubação. Para isso

utilizou-se um tempo fixo de incubação e diferentes tempos de pré-incubação, ou um tempo fixo de pré-incubação com diferentes tempos de incubação.

A ação da insulina sobre o transporte foi observada após a determinação das condições de pré-incubação e de incubação. Também foi observado que a presença do hormônio no período de pré-incubação é fundamental para que sua ação estimulatória seja identificada. A dose de insulina utilizada foi de 1,0 UI/ml.

A presença do sistema A de transporte de aminoácidos, em córtex adrenal bovino, foi determinada através de experimentos que utilizaram como aminoácido modelo o ( $^{14}\text{C}$ )MeAIB em tampão KRb-glicose e KRb-glicose-colina. A ação da insulina no transporte de ( $^{14}\text{C}$ )MeAIB foi observada também nos dois tampões utilizados.

O transporte de ( $^{14}\text{C}$ )AIB e a presença do sistema ASC foram observados em meio contendo sódio (KRb-glicose), meio assódico (KRb-glicose-colina) e em meio saturado com 20mM de ácido metil aminoisobutírico não marcado. Nesse último caso, o aminoácido foi pesado em balança Mettler modelo AE

163, diluído em tampão KRb-glicose e o volume completado com o mesmo tampão. O efeito da insulina também foi estudado nos três meios de incubação utilizados.

Nos experimentos realizados com o objetivo de determinar  $K_m$  e  $V_{max}$ , utilizou-se o ácido metil aminoisobutírico não marcado em diferentes concentrações, preparado conforme descrito no parágrafo anterior.

A captação de cicloleucina caracterizou a presença do sistema L em córtex adrenal bovino. O transporte desse aminoácido foi estudado em KRb-glicose e KRb-glicose-colina, bem como a ação da insulina.

O envolvimento dos canais de cálcio com o transporte de aminoácidos neutros, basal ou estimulado pela insulina, foi verificado com a adição de bloqueadores desses canais ao meio de incubação. Assim foi utilizado o cobalto nas concentrações de 1,2 mM e 2,5 mM. O sal ( $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ) foi pesado em balança Mettler modelo AE 163 e diluído em KRb-glicose sem cálcio, ou seja, para esse experimento o tampão foi preparado sem a inclusão do cloreto de cálcio, com a finalidade de não alterar a osmolaridade da solução.



O níquel foi usado nas concentrações de 0,1 mM e 0,25 mM. O sal ( $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) foi pesado em balança Mettler modelo AE 163 e diluído em KRb-glicose.

O verapamil foi utilizado nas concentrações de 0,1 mM e 0,25 mM. Essas concentrações foram obtidas pela diluição com KRb-glicose, de uma solução comercial de Dilacoron 2,5 mg/ml.

Nos experimentos em que foi testada a ação do vanadato de sódio sobre o transporte de aminoácidos em córtex adrenal bovino ou em adrenal de rato, o sal ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) foi pesado em balança Mettler modelo AE 163 e diluído em tampão KRb-glicose ou KRb, para córtex bovino ou adrenal de rato, respectivamente. As concentrações utilizadas foram  $10^{-3}$  M,  $10^{-4}$  M,  $10^{-5}$  M e  $10^{-6}$  M, sendo o pH de cada solução determinado em medidor de pH Digimed DMPH-2.

Também foi testado o influxo de aminoácidos em diferentes valores de pH. Nesse caso preparou-se o tampão KRb-glicose com pH 7,4 e foram adicionadas algumas gotas de NaOH 0,1 N ou HCl 0,1 N para atingir pH 8,0 e 6,0, respectivamente.

### **III. RESULTADOS**

#### **III.1. Determinação das Condições Ótimas para a Realização de Experimentos em Transporte de Aminoácidos em Córtex Adrenal Bovino "in vitro" .**

O transporte de aminoácidos através das membranas celulares, "in vitro", é dependente de uma série de fatores como: temperatura, pH, tempo de pré-incubação e tempo de incubação. Com o objetivo de determinar as melhores condições experimentais para o estudo do transporte de aminoácidos foram realizados experimentos preliminares descritos a seguir.

##### **III.1.1. Influência do Tempo de Pré-incubação**

O melhor tempo de pré-incubação foi determinado pré-incubando-se as fatias de córtex por 30, 60, 90 e 120 minutos. Após foram incubadas por 120 minutos na presença de 0,1  $\mu$ Ci de ( $^{14}$ C) MeAIB. No tempo de 90 minutos de pré-incubação foi observado o maior índice de transporte (TAB.III.1).

**TABELA III.1**

TEMPO DE PRÉ-INCUBAÇÃO (TEMPO DE INCUBAÇÃO:120MIN.)  
CAPTAÇÃO DE (<sup>14</sup>C)MeAIB

<b>Tempo (minutos)</b>	<b>30</b>	<b>60</b>	<b>90</b>	<b>120</b>
Relação T/M	1,46 <sub>±</sub> 0,04	1,92 <sub>±</sub> 0,14*	2,88 <sub>±</sub> 0,09* **	2,43 <sub>±</sub> 0,16* **
	( 5 )	( 5 )	( 4 )	( 4 )

Os valores indicam a média  $\pm$  E.P.

( ) número de amostras

\* Diferença significativa em relação ao tempo de 30 minutos,  $p < 0,05$ .

\*\* Diferença significativa em relação ao tempo de 60 minutos,  $p < 0,05$ .

Também foi determinada a ação da insulina sobre o transporte em diferentes períodos de pré-incubação e 120 minutos de incubação, na presença de 0,1  $\mu$ Ci de (<sup>14</sup>C) MeAIB e 1,0 UI de insulina. Observou-se que o hormônio exerceu maior efeito estimulatório em 90 minutos de pré-incubação (FIG.III.1).

### III.1.2. Influência do Tempo de Incubação

Para verificar o melhor tempo de incubação, as fatias de córtex adrenal foram pré-incubadas por 90 minutos em KRb

e após, incubadas em meio contendo 0,1  $\mu\text{Ci}$  de ( $^{14}\text{C}$ ) MeAIB, por diferentes períodos de tempo: 60, 120 e 180 minutos.

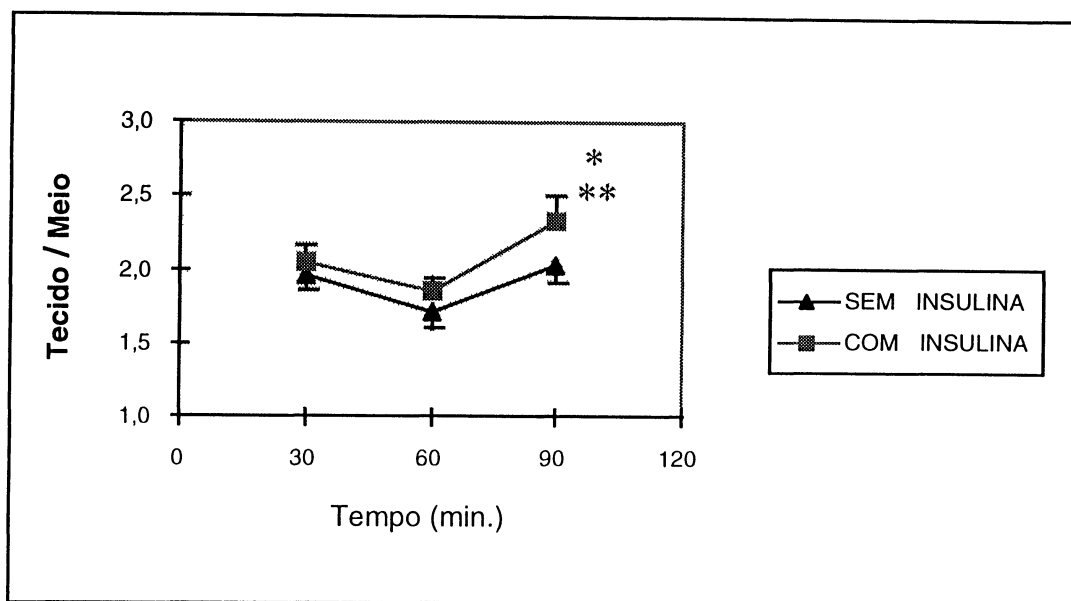


FIGURA III.1 - EFEITO DA INSULINA SOBRE A CAPTAÇÃO DE ( $^{14}\text{C}$ ) MeAIB EM DIFERENTES TEMPOS DE PRÉ-INCUBAÇÃO

Tempo de incubação: 120 min.

Os valores indicam a média  $\pm$  E.P.

Número de amostras: 4 por grupo

\*:diferença significativa em relação ao basal de 60 min.,  $p < 0,05$

\*\*diferença significativa em relação ao estimulado de 60 min.,

$p < 0,05$

Observou-se que o transporte aumentou desde os 60 minutos até aos 180 minutos. Apesar da captação continuar crescendo até aos 180 minutos o tempo considerado mais indicado foi 120 minutos. Pretendeu-se com isso preservar a integridade funcional do tecido, considerando-se o tempo de transporte

desde o abatedouro até ao laboratório e o tempo de pré-incubação (FIG. III.2).

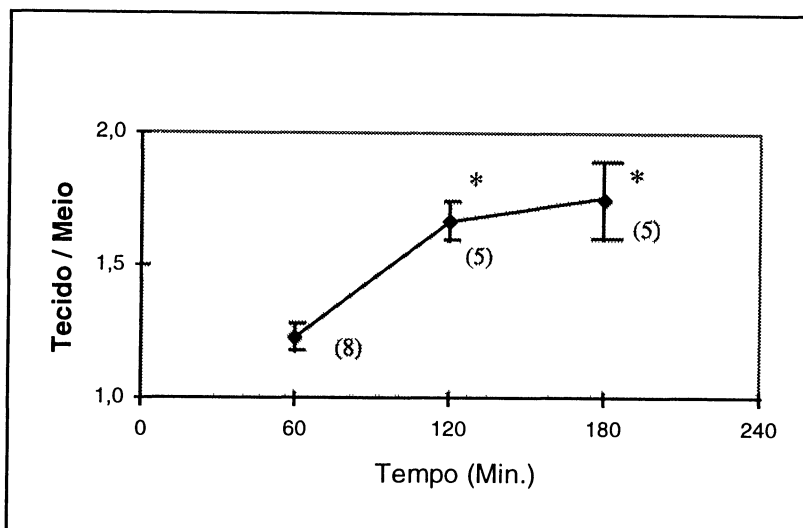


FIGURA III.2 - CAPTAÇÃO DE  $(^{14}\text{C})\text{MeAIB}$  EM DIFERENTES TEMPOS DE INCUBAÇÃO

Tempo de pré-incubação: 90 min.

Os valores indicam a média  $\pm$  E.P.

( ) : Número de amostras

\*: diferença significativa em relação aos 60 min. incubação,  $p < 0,01$

Em outro grupo experimental, as fatias de córtex adrenal foram pré-incubadas por 30 minutos em KRb e após, incubadas em meio contendo  $0,1 \mu\text{Ci}$  de  $(^{14}\text{C})\text{AIB}$  durante diferentes intervalos de tempo: 60, 120 e 180 minutos. Novamente foi observado que o melhor tempo de captação ocorreu aos 180 minutos, sendo que em todos os tempos analisados ocorreu maior percentual de transporte com 90 minutos de pré-incubação (FIG.III.3).

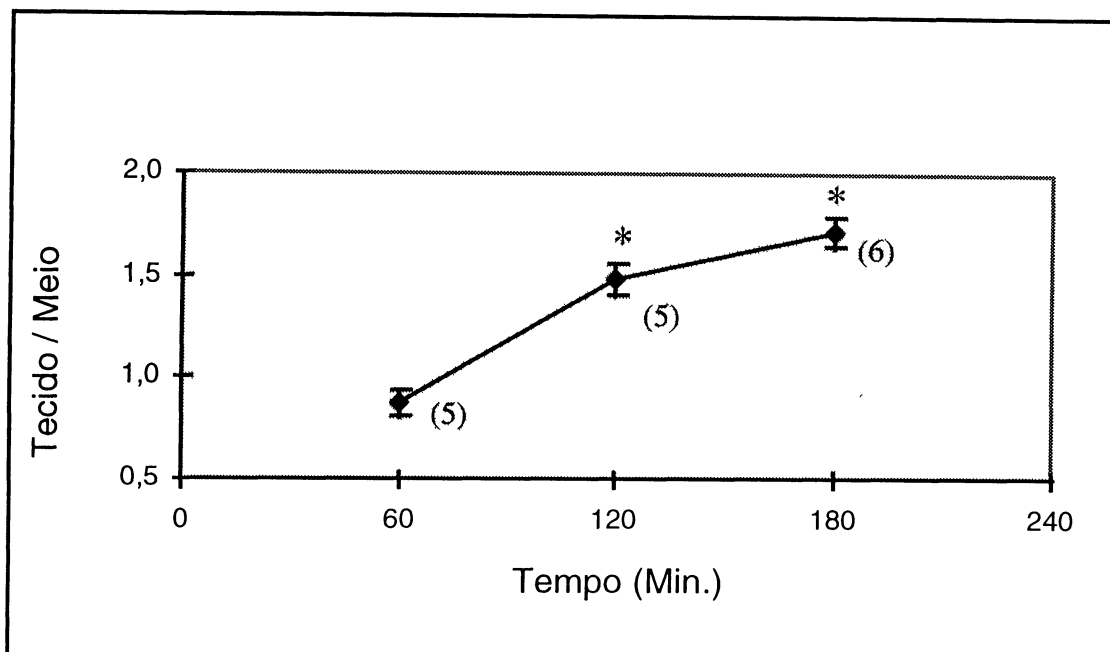


FIGURA III.3 - CAPTAÇÃO DE (<sup>14</sup>C)AIB EM DIFERENTES TEMPOS DE INCUBAÇÃO

Tempo de pré-incubação: 30 min.

Os valores indicam a média ± E.P.

( ) : Número de amostras

\*:diferença significativa em relação aos 60 min.de incubação,  
p<0,01

Quando a insulina, 1,0 UI/ml, foi adicionada ao meio utilizando-se 90 minutos de pré-incubação e diferentes tempos de incubação, observou-se um acréscimo no transporte, em relação ao basal, em todos os tempos analisados (FIG.III.4).

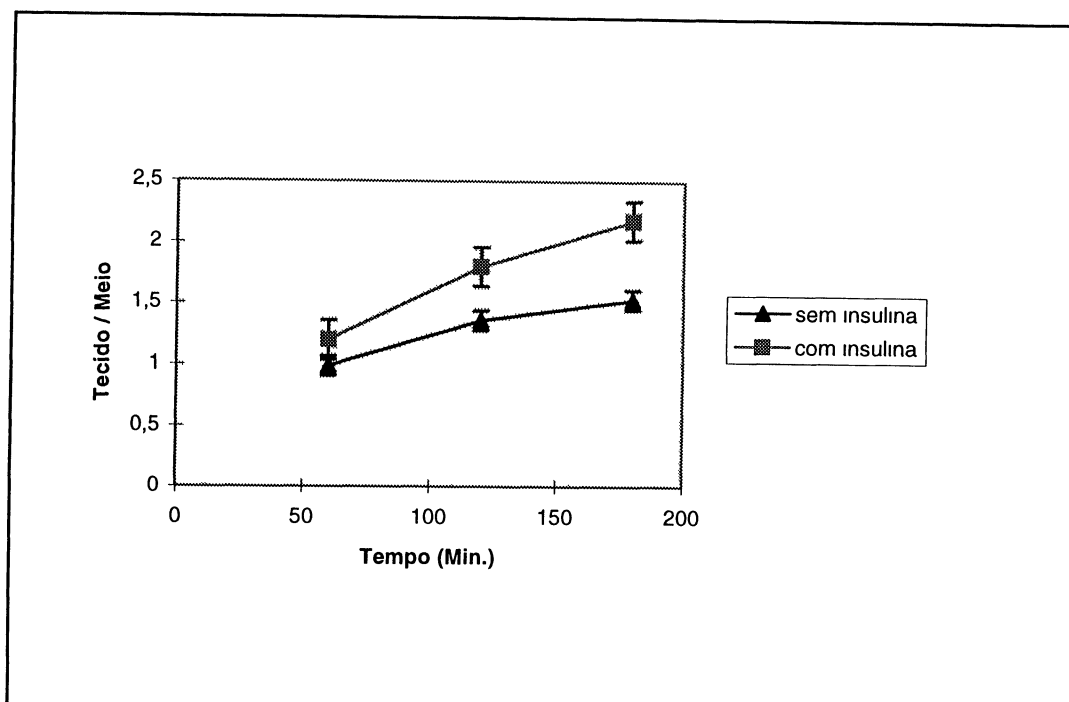


FIGURA III.4 - INFLUÊNCIA DO TEMPO DE INCUBAÇÃO SOBRE A CAPTAÇÃO DE ( $^{14}\text{C}$ )MeAIB BASAL E ESTIMULADA PELA INSULINA.

Os valores indicam a média  $\pm$  E.P.

### III.1.3. Influência do Hormônio no Período de Pré-incubação

A necessidade ou não da presença de insulina no período de pré-incubação foi determinada em experimentos com 90 minutos de pré-incubação com ou sem insulina e, 120 minutos de incubação com insulina. O aminoácido modelo foi ( $^{14}\text{C}$ )AIB.

Observou-se que a presença do hormônio na pré-incubação determinou um percentual de transporte significativamente

maior que o apresentado na ausência do hormônio (FIG.III.5).

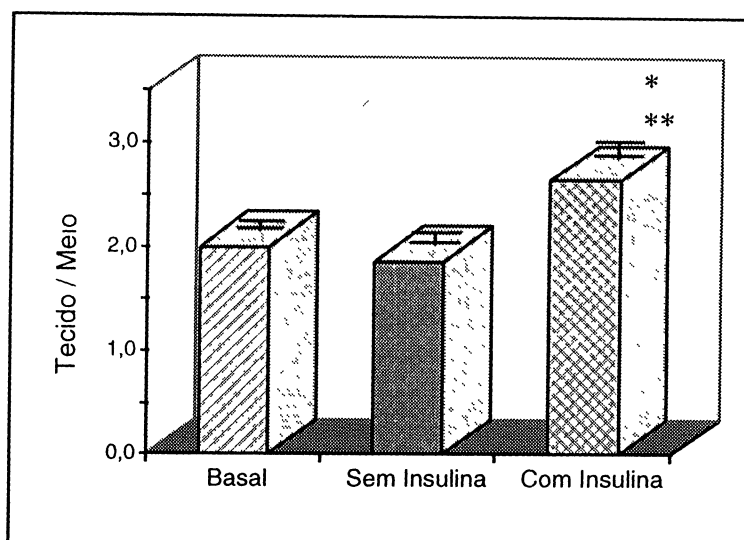


FIGURA III.5 - INFLUÊNCIA DA INSULINA NO PERÍODO DE PRÉ-INCUBAÇÃO

Tempo de pré-incubação: 90 min.

Tempo de incubação: 120 min.

Os valores indicam a média  $\pm$  E.P.

Número de amostras: 6 em cada grupo

\*:Diferença significativa em relação ao basal,  $p < 0,01$ .

\*\* : Diferença significativa em relação ao grupo sem insulina na pré-incubação,  $p < 0.01$ .

#### III.1.4. Determinação da Dose de Insulina

Fatias de córtex adrenal foram pré-incubadas por 90 minutos e incubadas por 120 minutos na presença de diferentes doses de insulina e de  $0,1 \mu\text{Ci}$  de ( $^{14}\text{C}$ ) MeAIB. A



dose escolhida para utilização nos experimentos foi 1,0 UI/ml, onde observou-se maior efeito estimulatório sobre o transporte. Estudos prévios realizados em adrenal de rato, por WASSERMANN e colaboradores em 1989 também utilizaram essa dose para atingir o melhor índice de captação (TAB.III.2).

**TABELA III.2**

EFEITO DA DOSE DE INSULINA SOBRE A CAPTAÇÃO DE ( $^{14}\text{C}$ )MeAIB.  
(TEMPO DE PRÉ-INCUBAÇÃO DE 90 MINUTOS E TEMPO DE INCUBAÇÃO DE 120 MINUTOS).

Concentração molar de insulina	Relação T/M Captação ( $^{14}\text{C}$ ) MeAIB
Sem insulina	2,06 $\pm$ 0,16 (n = 5)
0,7 x 10 <sup>-6</sup>	2,50 $\pm$ 0,20 (n = 5)
3 x 10 <sup>-6</sup>	2,58 $\pm$ 0,19 (n = 5)
7 x 10 <sup>-6</sup>	2,64 $\pm$ 0,09* (n = 5)

Os valores indicam a média  $\pm$  E.P.

( ) número de amostras

\* Diferença significativa em relação ao grupo incubado sem insulina,  $p < 0,05$ .

### III.2 Identificação dos Sistemas de Transporte de Aminoácidos Neutros Presentes no Córtex Adrenal Bovino.

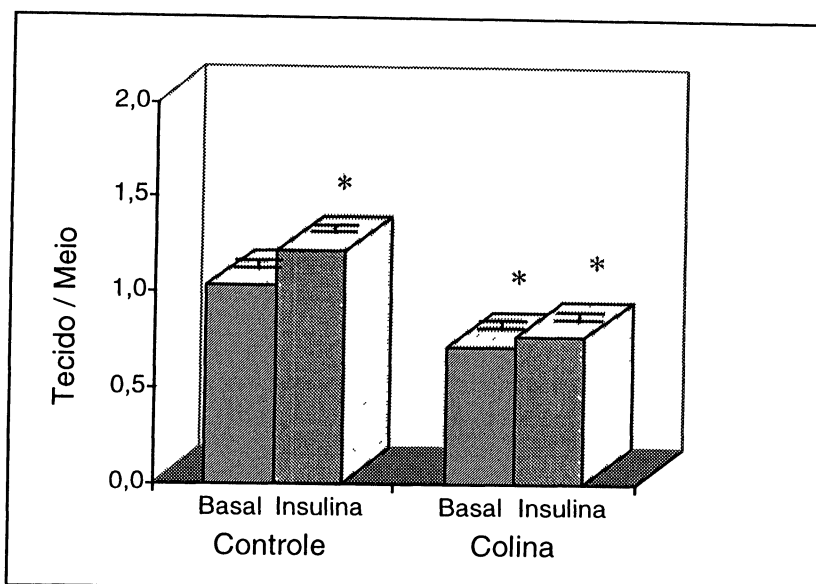
Após o estabelecimento das melhores condições experimentais para o estudo do transporte de aminoácidos

neutros em córtex adrenal bovino, seguiram-se experimentos com o objetivo de identificar esses sistemas, bem como a possível ação estimulatória da insulina sobre esse processo.

Os principais sistemas de transporte de aminoácidos neutros na maioria dos tecidos de mamíferos são os sistemas A, ASC e L (descritos no item I.2.2). Os substratos não metabolizáveis mais usados no estudo desses sistemas são o ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico, o ácido  $\alpha$ -metil aminoisobutírico e o ácido 2-aminociclopentano 1-carboxílico (cicloleucina).

### III.2.1 Efeito da Insulina sobre o transporte de ( $^{14}\text{C}$ ) MeAIB

O transporte de ( $^{14}\text{C}$ ) MeAIB e o efeito estimulatório da insulina foram observados em tampão KRb-glicose e em meio assódico (KRb-glicose-colina). Verificou-se uma significativa diminuição no transporte basal de ( $^{14}\text{C}$ ) MeAIB em meio assódico. O efeito estimulatório da insulina foi observado quando o meio de incubação continha sódio, sendo praticamente nulo em meio assódico (FIG.III.6).



**FIGURA III.6** - AÇÃO DA INSULINA SOBRE A CAPTAÇÃO DE  $(^{14}\text{C})\text{MeAIB}$  EM KRb NORMAL E KRb COLINA.

Os valores indicam a média  $\pm$  E.P.

Número de amostras: 6em cada grupo

\*:diferença significativa em relação ao basal,  $p < 0,01$ .

Não houve diferença significativa entre os grupos colina-basal e colina insulina.

### III.2.2 Efeito da Insulina sobre o Transporte de $(^{14}\text{C})\text{AIB}$

O transporte de  $(^{14}\text{C})\text{AIB}$  e a ação estimulatória da insulina foram identificados em experimentos realizados em KRb-glicose, em meio assódico (KRb-glicose-colina) e em meio saturado com 20mM de MeAIB não marcado com 30 minutos de pré-incubação e 120 minutos de incubação. Observou-se que a captação de  $(^{14}\text{C})\text{AIB}$  foi significativamente diminuída em meio assódico ou em meio saturado com MeAIB não marcado. O efeito estimulatório da insulina foi

observado no meio contendo sódio (KRb-glicose), não sendo significativo em meio assódico ou em meio saturado com MeAIB não marcado (TAB.III.3 e III.4).

**TABELA III.3**

EFEITO DA INSULINA SOBRE O TRANSPORTE DE (<sup>14</sup>C)AIB EM MEIO KRb NORMAL E MEIO ASSÓDICO (KRb - COLINA).

Incubação	KRb	KRb-colina
Basal	1,36 ± 0,02 (42)	0,79 ± 0,02** (6)
Insulina	1,83 ± 0,08* (6)	0,76 ± 0,02** (6)

Os valores indicam a média ± E.P.

( ) número de amostras

\* Diferença significativa em relação ao grupo KRb incubado sem insulina, p < 0,01

\*\* Diferença significativa entre KRb-basal e KRb-colina, basal e insulina e KRb-colina + insulina, p < 0,05 .

### III.2.3 Captação de Cicloleucina

O transporte de cicloleucina, conforme descrito no item I.2.2 ocorre preferentemente através do sistema L que é independente de sódio e não sofre regulação hormonal. A captação de cicloleucina foi observada em meio contendo

sódio e em meio assódico, com 30 minutos de pré-incubação e 120 minutos de incubação. O percentual de captação basal de cicloleucina é bem menor que o observado para aminoácidos transportados através de outros sistemas, sendo que a captação em meio assódico sofre ainda uma pequena diminuição (TAB.III.5).

**TABELA III.4**

EFEITO DA INSULINA SOBRE O TRANSPORTE DE (<sup>14</sup>C)AIB EM MEIO KRb NORMAL E MEIO SATURADO COM MeAIB NÃO MARCADO.

Incubação	KRb	KRb + MeAIB 20mM
Basal	1,36 ± 0,02 (42)	0,75 ± 0,02**. (5)
Insulina	1,83 ± 0,08* (6)	0,69 ± 0,02** (5)

Os valores indicam a média ± E.P.

( ) número de amostras

\* Diferença significativa em relação ao grupo KRb incubado sem insulina, p < 0,01

\*\* Diferença significativa entre basal sem insulina e KRb + MeAIB e KRb-insulina e KRb + MeAIB, p < 0,05.

**TAB. III. 5**

CAPTAÇÃO DE (<sup>14</sup>C)CLEU EM MEIO KRb NORMAL E MEIO ASSÓDICO (KRb-COLINA) .

Incubação	Captação de ( <sup>14</sup> C) cleu Relação T/M
KRb	0,81 ± 0,05 (6)
KRb-colina	0,64 ± 0,02 (6)

Os valores indicam a média ± E.P.

( ) número de amostras

Não houve diferença significativa entre a captação de (<sup>14</sup>C) cleu em meio sódico e assódico.

### III.3 Determinação das constantes cinéticas $K_m$ e $V_{max}$

A ação estimulatória da insulina sobre o transporte de aminoácidos neutros foi estudada por vários autores em diversos tipos celulares conforme descrito no item I.2.4.

Como foi mencionado no item I.6, um dos objetivos do presente trabalho é determinar os parâmetros cinéticos da ação da insulina sobre a captação de aminoácidos.

Para determinar a cinética do transporte foram realizados diversos experimentos iniciando-se por uma curva de captação basal de (<sup>14</sup>C)MeAIB em função do tempo de incubação. O período de pré-incubação foi diminuído para 45 minutos e os tempos de incubação variaram de zero a 180

(tabela III.6), sendo o objetivo desses experimentos determinar o tempo mínimo necessário para a captação basal. Os dados obtidos nesse experimento foram expressos através da relação tecido/meio (T/M) (Figura III.7) e através do número de nmóis de ( $^{14}\text{C}$ )MeAIB por grama de tecido até o tempo de 30 minutos (Figura III.8).

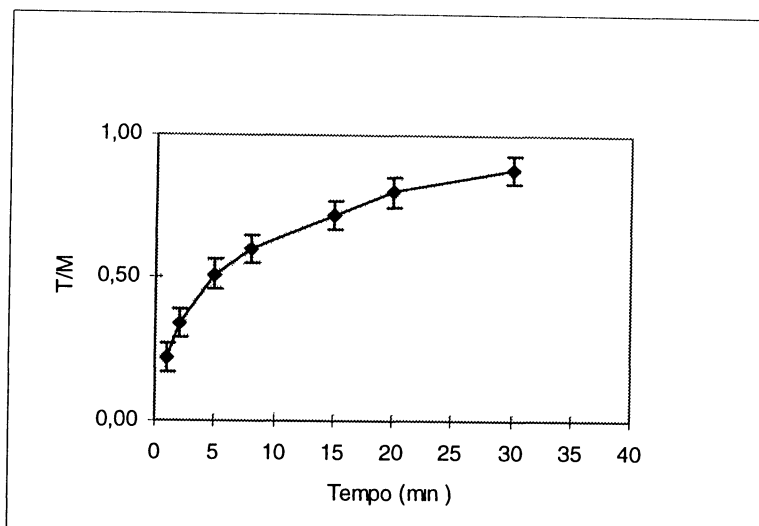
**TABELA III.6**

CAPTAÇÃO DE ( $^{14}\text{C}$ )MeAIB EM DIFERENTES TEMPOS DE INCUBAÇÃO  
(P. I. = 45 MIN.)

Tempo (min)	Captação (n mol MeAIB/g tecido)
0	0,022 ± 0,009
1	0,54 ± 0,10
2	0,74 ± 0,08
4	0,82 ± 0,05
5	1,16 ± 0,10
8	1,52 ± 0,11
15	1,70 ± 0,06
20	1,80 ± 0,16
30	2,02 ± 0,13
60	2,38 ± 0,27
90	2,57 ± 0,14
120	2,92 ± 0,14
180	3,58 ± 0,20

Os valores indicam a média ± E.P.

Número de amostras: 5 por experimento

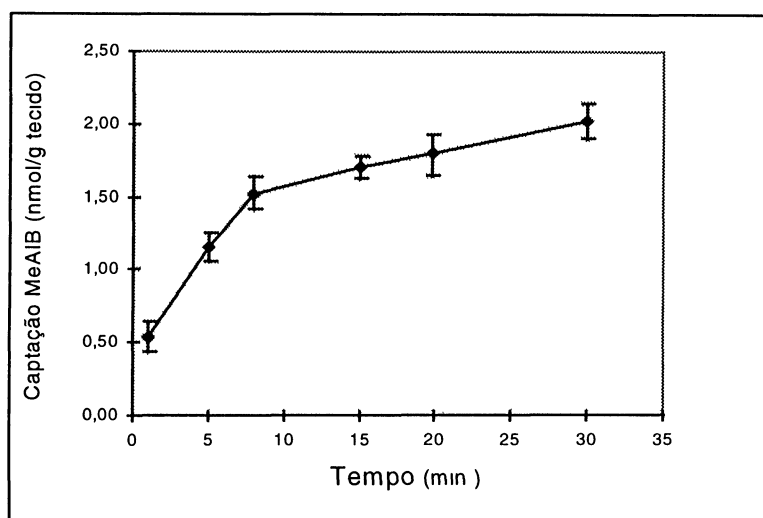


**FIGURA III.7** - CAPTAÇÃO BASAL DE ( $^{14}\text{C}$ )MeAIB EM DIFERENTES TEMPOS DE INCUBAÇÃO (RELAÇÃO T/M).

Os valores indicam a média  $\pm$  E.P.

Número de amostras: 5 em cada grupo

Tempo de pré-incubação: 45 MIN.



**FIGURA III.8** - CAPTAÇÃO DE ( $^{14}\text{C}$ )MeAIB EM DIFERENTES TEMPOS DE INCUBAÇÃO (nmol/g tecido)

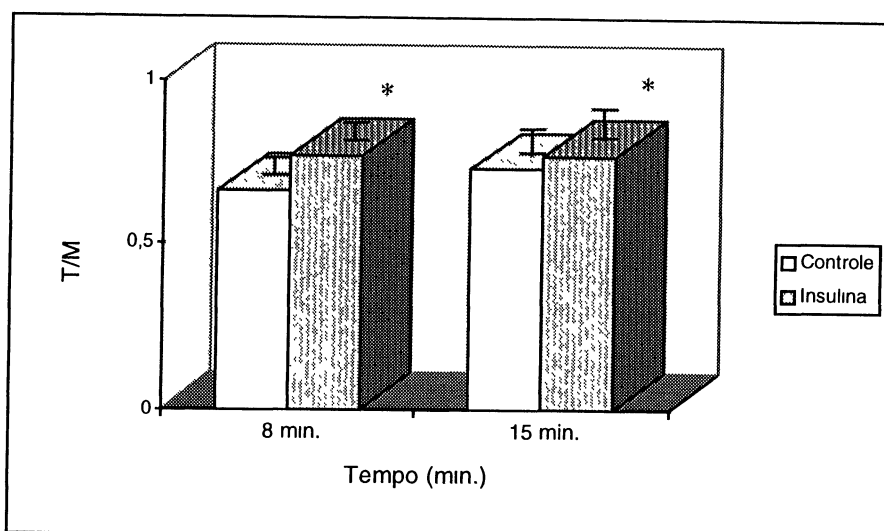
Os valores indicam a média  $\pm$  E.P.

Número de amostras: 5 em cada grupo

Tempo de pré-incubação: 45 MIN.



Considerou-se 8 minutos de incubação o melhor tempo para a determinação da velocidade inicial, observando-se que nesse tempo a insulina possui um significativo efeito estimulatório (Figura III.9). Em seguida foram realizados experimentos com 45 minutos de pré-incubação e 8 minutos de incubação na presença de 0,1  $\mu\text{Ci}$  de ( $^{14}\text{C}$ )MeAIB e concentrações crescentes do aminoácido não marcado: 0.025, 0.05, 0.1, 1.0 e 10 mM. A figura III.10 apresenta o decaimento da relação T/M a medida que aumenta a concentração de MeAIB não marcado. A captação de ( $^{14}\text{C}$  MeAIB) em nmol/mg tec. em função da concentração do aminoácido está representada na tabela III.7. Com os resultados assim obtidos foi possível determinar a velocidade inicial para cada concentração utilizada e, através do gráfico do duplo recíproco e regressão linear estimados os valores  $V_{\text{max}}$  e  $K_m$  aparentes (Tabela III.8) e figura III.11. Observou-se que os valores de  $K_m$ , basal e estimulado praticamente permaneceram os mesmos e que a velocidade máxima foi maior na presença de insulina.



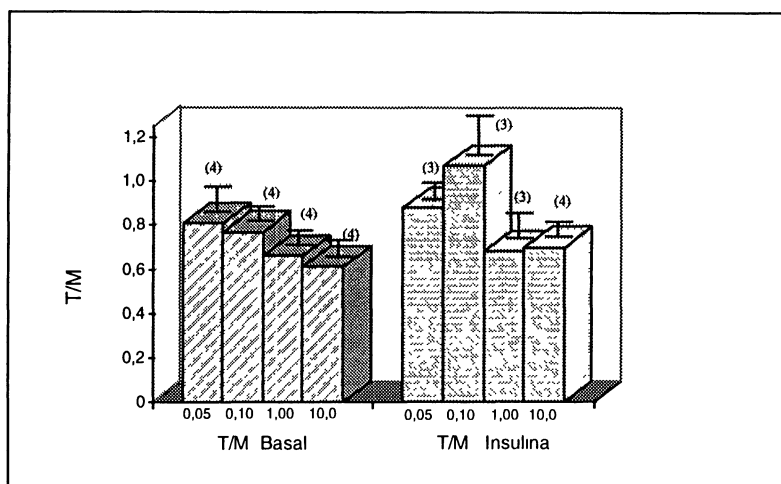
**FIGURA III.9** - AÇÃO DA INSULINA SOBRE O TRANSPORTE DE  $(^{14}\text{C})\text{MeAIB}$  NOS TEMPOS DE 8 E 15 MINUTOS.

Os valores indicam a média  $\pm$  E.P.

Número de amostras: 4 por grupo

Tempo de pré-incubação: 45 min.

\*:Diferença significativa em relação ao controle de 8 min. ( $p < 0,05$ )



**FIGURA III.10** - CAPTAÇÃO  $(^{14}\text{C})\text{MeAIB}$  EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MeAIB NÃO MARCADO NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE INSULINA.

Os valores indicam a média  $\pm$  EP.

( ):Número de amostras

Tempo de pré-incubação: 45 min.

Tempo de incubação: 8 min.

\*:Diferença significativa em relação ao controle de 8 min. ( $p < 0,05$ )

TABELA III.7  
 Captação de (<sup>14</sup>C)MeAIB em presença de diferentes  
 concentrações de MeAIB não marcado.

Concentração MeAIB (mM)	Captação de ( <sup>14</sup> C) MeAIB (nmol/mg tec)	
	Basal	Insulina
0,025	0,19 ± 0,01	0,22 ± 0,02
0,05	0,38 ± 0,03	0,47 ± 0,05
0,1	0,78 ± 0,03	0,89 ± 0,02
1	6,41 ± 0,11	7,27 ± 0,32
10	61,71 ± 5,6	68,17 ± 1,49

Os valores indicam a média ± EP.

Tempo de pré-incubação: 45 min.

Tempo de incubação: 8 min.

TABELA III.8

EFEITO DA INSULINA SOBRE AS CONSTANTES CINÉTICAS NA CAPTAÇÃO DE  
 (<sup>14</sup>C)MAIB NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO AMINOÁCIDO  
 NÃO MARCADO.

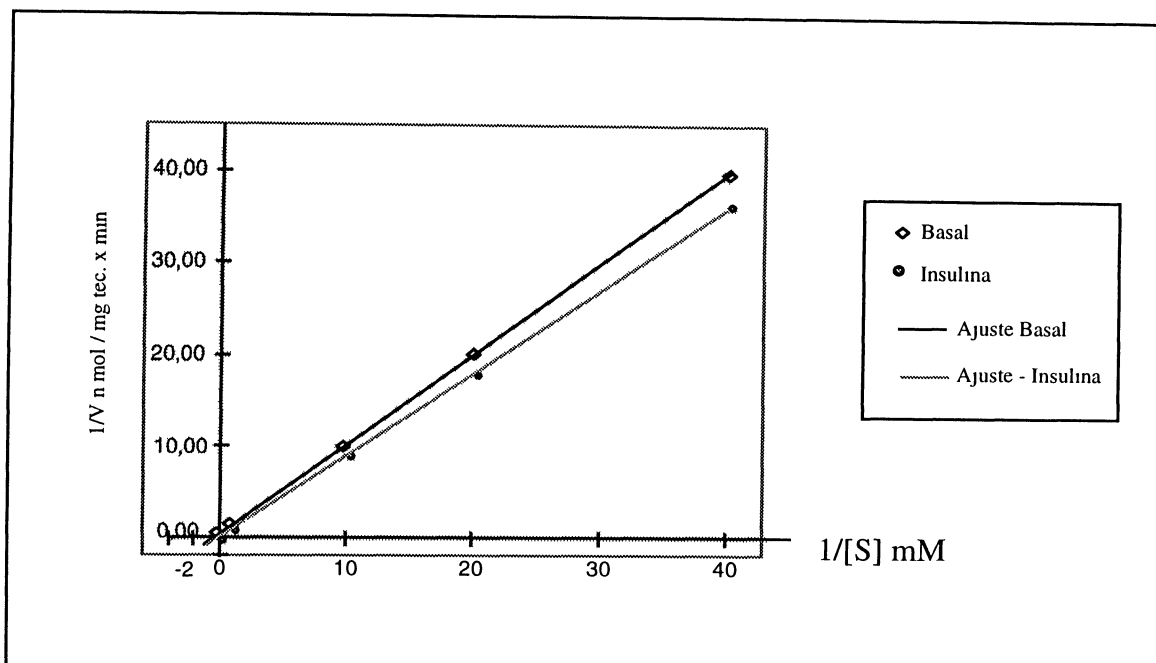
[S] mM	V (nmol / mg tec. x min.)	
	Basal	Insulina
0,025	0,025 ± 0,002 (4)	0,028 ± 0,003 (5)
0,05	0,050 ± 0,001 (3)	0,055 ± 0,001 (5)
0,1	0,100 ± 0,05 (4)	0,11 ± 0,02 (3)
1	0,820 ± 0,05 (3)	0,91 ± 0,05 (3)
10	7,700 ± 0,11 (3)	8,52 ± 0,23 (3)
V(max) (nmol/mg tec x min)	8,45	9,52
Km (mM)	8,35	8,57

Tempo de Pré-incubação: 45 minutos

Tempo de incubação: 8 minutos

Os valores indicam a média + E.P

( ) número de amostras



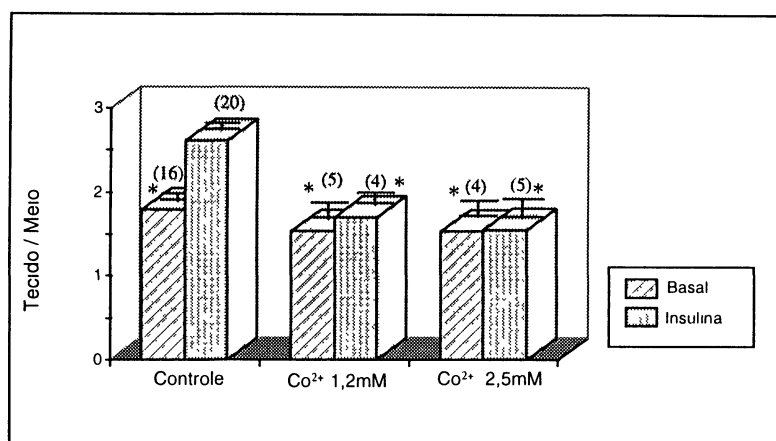
**FIGURA III.11** - GRÁFICO DE DUPLO RECÍPROCO DA CAPTAÇÃO DE  $(^{14}\text{C})\text{MeAIB}$  EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO AMINOÁCIDO NÃO MARCADO NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE INSULINA. O DUPLO RECÍPROCO FOI CALCULADO POR REGRESSÃO LINEAR.

#### **III.4 Efeito dos Bloqueadores dos Canais de Cálcio sobre o Transporte de Aminoácidos Neutros, Basal e Estimulado pela Insulina.**

O íon cálcio conforme descrito no item I.4.1 está envolvido numa série de eventos biológicos inclusive em atividades secretoras, contráteis e neurais.

Para identificar o envolvimento dos canais de cálcio presentes em córtex adrenal bovino com a captação de aminoácidos e o efeito estimulatório da insulina sobre esse fenômeno, foram realizados experimentos utilizando bloqueadores desses canais, tais como: cobalto, níquel e verapamil.

O cobalto nas concentrações de 1,2 e 2,5 mM e o níquel nas concentrações de 0,1 ou 0,25 mM provocaram uma significativa diminuição sobre o efeito estimulatório da insulina, mas um efeito menos pronunciado sobre a captação basal (FIG.III.12 e III.13).

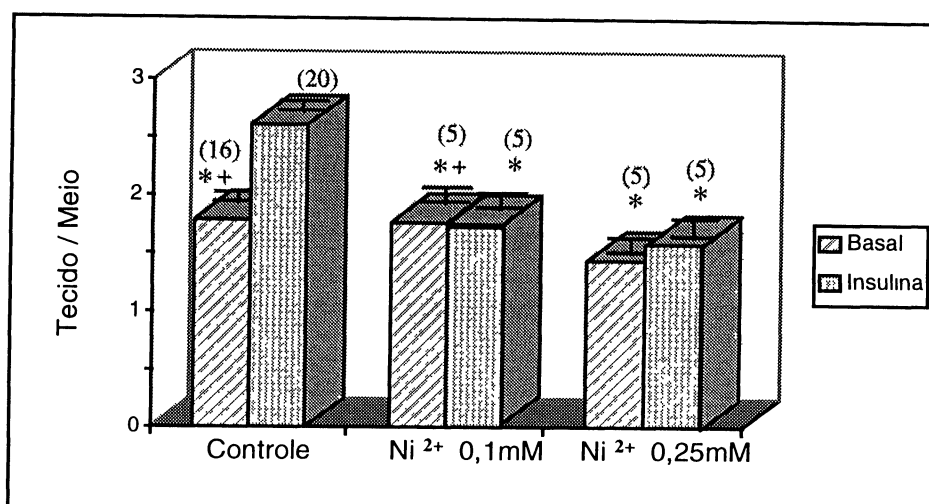


**FIGURA III.12** - EFEITO DO COBALTO SOBRE A CAPTAÇÃO DE <sup>14</sup>C)MeAIB BASAL E ESTIMULADA.

Os valores indicam a média  $\pm$  E.P.

( ) : Número de amostras

\* : diferença significativa em relação ao grupo controle incubado com insulina,  $p < 0,05$ .



**FIGURA III.13** - EFEITO DO NÍQUEL SOBRE A CAPTAÇÃO DE  $(^{14}\text{C})\text{MeAIB}$  BASAL E ESTIMULADA.

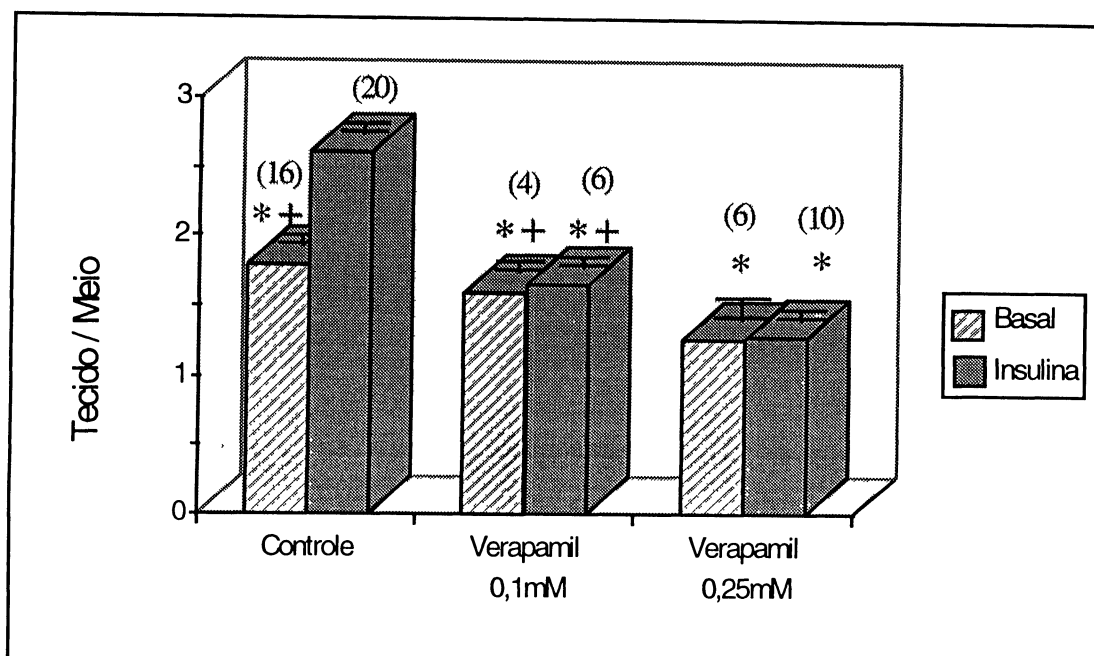
Os valores indicam a média  $\pm$  E.P.

( ):Número de amostras

\*:diferença significativa em relação ao grupo controle incubado com insulina,  $p < 0,05$ .

+: Diferença significativa em relação ao grupo controle incubado com níquel 0,25mM na presença de insulina,  $p < 0,05$ .

Nos experimentos onde foi usado verapamil na concentração de 0,1 mM não foi observada diminuição significativa na captação basal em relação ao controle, essa diferença passou a ser significativa quando a dose utilizada foi 0,25 mM. A ação estimulatória da insulina, entretanto, foi inibida tanto com 0,1 mM como com 0,25 mM de verapamil (FIG.III.14).



**FIGURA III.14** - EFEITO DO VERAPAMIL SOBRE A CAPTAÇÃO DE  $(^{14}\text{C})\text{MeAIB}$  BASAL E ESTIMULADA.

Os valores indicam a média  $\pm$  E.P.

( ) : Número de amostras

\*:Diferença significativa em relação ao grupo controle incubado com insulina,  $p < 0,05$ .

+: Diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com 0,25mM de verapamil, incubado na presença ou ausência de insulina.

### III.5 Ação do Vanadato de Sódio sobre o Transporte de Aminoácidos Neutros em Córtex Adrenal Bovino e em Adrenais de Ratos.

O vanádio é um elemento que, comprovadamente, possui ação biológica e apresenta alguns efeitos "insulin like", como por exemplo, o aumento da incorporação de  $[2\text{H}^3]\text{glicose}$

em adipócitos isolados de ratos (DUCKWORTH et al., 1988) e o restabelecimento da glicemia normal em ratos diabéticos (HEYLIGER et al., 1985; GIL et al., 1988).

O vanadato de sódio possui a propriedade de provocar alterações no pH do meio. Assim, para constatar essas alterações foram medidos os valores de pH do tampão KRb contendo diferentes concentrações molares do sal (TAB.III.9). Foi também determinada a influência do pH no transporte de (<sup>14</sup>C) MeAIB basal e estimulado pela insulina (FIG.III.15), bem como o percentual de estimulação induzido pelo hormônio (TAB.III.10).

**TABELA III.9**

INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO VANADATO DE SÓDIO SOBRE O pH DO TAMPÃO KRb

Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (M)	pH
0	7,40
10 <sup>-6</sup>	7,43 ± 0,04
10 <sup>-5</sup>	7,43 ± 0,05
10 <sup>-4</sup>	7,55 ± 0,05
10 <sup>-3</sup>	7,92 ± 0,10

Os valores indicam a média ± E.P., n = 4



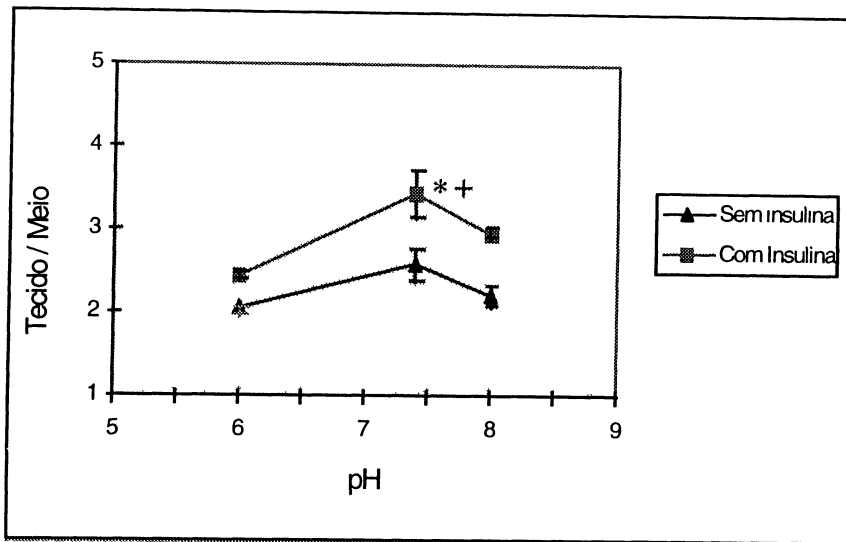
**TABELA III.10**

PERCENTUAL DE AUMENTO INDUZIDO PELA INSULINA, SOBRE O TRANSPORTE DE (<sup>14</sup>C) MeAIB EM DIFERENTES VALORES DE pH.

pH	Controle	Insulina	% aumento sobre o basal
6,0	2,05 $\pm$ 0,05	2,43 $\pm$ 0,03	18,5
7,4	2,58 $\pm$ 0,20	3,44 $\pm$ 0,28	34
8,0	2,21 $\pm$ 0,13	2,94 $\pm$ 0,08	33

Os valores indicam a média  $\pm$  E.P.; n = 5

Com o objetivo de investigar a ação do vanadato sobre o transporte de aminoácidos em córtex adrenal bovino, foram realizados experimentos com diferentes concentrações molares de vanadato de sódio. Observou-se uma inibição tanto no transporte basal como no estimulado pela insulina (FIG.III.16). Para dirimir a dúvida de que esse efeito seria espécie-específico, foram realizados experimentos, com as mesmas concentrações molares de vanadato de sódio, em glândulas adrenais de rato. Observou-se novamente, uma significativa ação inibitória do vanadato tanto sobre a captação basal de (<sup>14</sup>C) MeAIB como sobre a estimulada pela insulina (FIG.III.17).



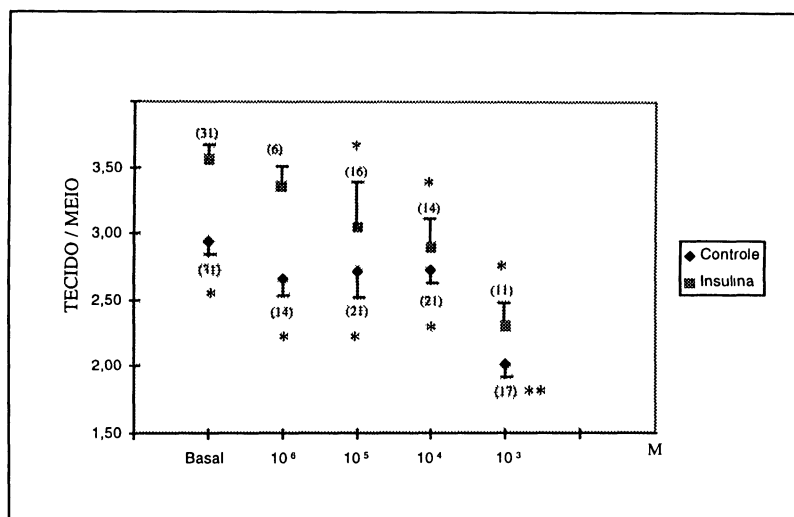
**FIGURA III.15** - INFLUÊNCIA DO pH NA CAPTAÇÃO DE  $(^{14}\text{C})\text{MeAIB}$  BASAL E ESTIMULADA.

Os valores indicam a média  $\pm$  E.P.

Número de amostras: 5 por grupo

\*:Diferença significativa em relação ao basal, incubado na ausência de insulina.

+:Diferença em relação ao pH 6,0 e 8,0 com insulina.



**FIGURA III.16** - INIBIÇÃO DA CAPTAÇÃO DE  $(^{14}\text{C})\text{MeAIB}$  BASAL E ESTIMULADA SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES MOLARES DE VENADATO DE SÓDIO, EM CÓRTEX ADRENAL BOVINO.

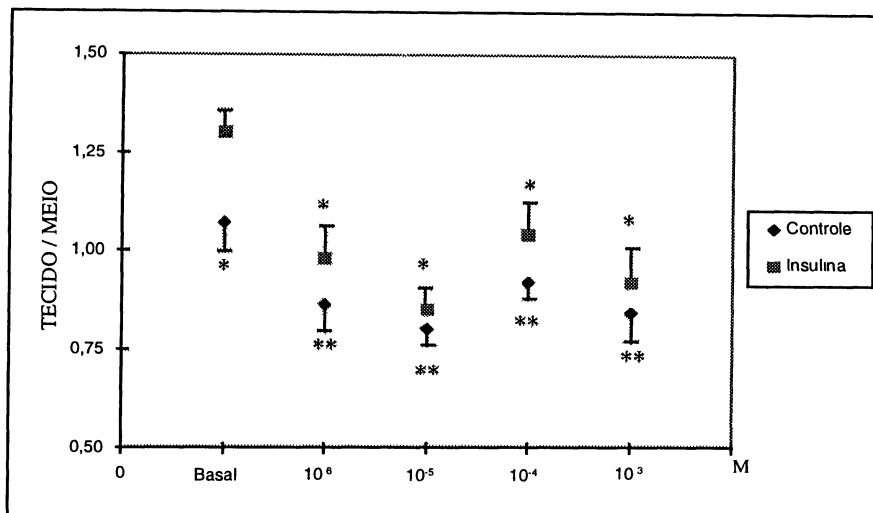
Os valores indicam a média  $\pm$  E.P.

( ): Número de amostras

\*:Diferença significativa em relação ao basal mais insulina.

\*\* :Diferença significativa em relação ao basal sem insulina,

$p < 0,05$ .



**FIGURA III.17** - INIBIÇÃO DA CAPTAÇÃO BASAL E ESTIMULADA DE  $(^{14}\text{C})\text{MeAIB}$  SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES MOLARES DE VANADATO DE SÓDIO, EM GLÂNDULAS ADRENAIS DE RATO.

Os valores indicam a média  $\pm$  E.P.

Número de amostras: 5 por grupo

\*:Diferença significativa em relação ao basal mais insulina  $p < 0,05$

\*\* :Diferença significativa em relação ao basal sem insulina,  $p < 0,05$ .

#### IV. DISCUSSÃO

O transporte de aminoácidos através da membrana plasmática é um processo de grande importância para a economia celular. Em estudo há muitas décadas por diversos grupos de pesquisadores, alguns sistemas de transporte de aminoácidos aniônicos, catiônicos e neutros encontram-se bem caracterizados em diversos tecidos e tipos celulares.

A maioria dos aminoácidos são transportados ativamente para o interior da célula. Esse transporte, em geral, apresenta uma dependência do potencial de membrana e, ainda, alguns sistemas são regulados por ação hormonal.

No presente trabalho foram caracterizados os sistemas de transporte de aminoácidos neutros presentes em córtex adrenal bovino, a ação da insulina sobre os sistemas caracterizados, as modificações induzidas pelo hormônio sobre os parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $V_{max}$ , bem como a ação do cálcio sobre o transporte basal e o estimulado pelo hormônio. O efeito do vanadato de sódio sobre a captação de aminoácidos também foi verificado, uma vez que esse agente mimetiza algumas das ações da insulina.

Inicialmente procurou-se determinar as condições ideais para os experimentos de transporte de aminoácidos em córtex adrenal bovino "in vitro", pois na literatura já existente muito pouco foi encontrado a esse respeito.

Nos primeiros experimentos (não mostrados) foi utilizado o tampão KRb sem glicose e observado que não havia captação adequada de aminoácidos, ou seja, a glândula no momento do experimento não apresentava boas condições metabólicas. Passou-se a acrescentar glicose ao tampão, e foi observado que na presença desse nutriente era possível coletar, transportar e realizar o experimento com resultados satisfatórios.

Inicialmente, considerou-se o tempo de deslocamento do abatedouro ao laboratório, cerca de no mínimo 45 minutos, como tempo de pré-incubação, por isso nos primeiros experimentos o tempo de pré-incubação foi de 30 minutos. Na realidade, durante o tempo de transporte do abatedouro até ao laboratório, as glândulas encontravam-se a uma temperatura em torno de 4°C onde a atividade metabólica é muito baixa ou praticamente nula. Quando foi realizada uma curva de pré-incubação (TAB.III.1) observou-se que a captação de aminoácidos era maior com um período de 90 minutos de

pré-incubação a 37°C, por isso esse tempo foi incorporado ao protocolo experimental.

Considerando-se trabalhos já publicados, sabe-se que em tecidos recém isolados, os receptores estão ocupados por hormônios endógenos, impedindo a ligação e ação do hormônio exógeno. A insulina, assim como outros hormônios peptídicos, está ligada a seus receptores e o complexo hormônio-receptor é internalizado e degradado. Esse processo é dependente do tempo e por isso justifica o período de pré-incubação. O período de pré-incubação foi utilizado em todos os experimentos, mesmo naqueles onde não houve o uso de insulina. Durante esse período, o tecido retoma suas atividades metabólicas, com temperatura de 37°C em tampão KRb-glicose e em atmosfera de carbogênio no interior de um incubador metabólico. Após esse período inicia-se o período de incubação, onde é adicionado o aminoácido modelo servindo como marcador do maior ou menor transporte para o interior celular. O tempo de 120 minutos foi escolhido como o mais indicado mesmo observando-se que a captação continuou aumentando até os 180 minutos (FIG.III.2). Essa escolha procurou prevenir o fato de não chegar-se ao limite vital do tecido, garantindo-se uma boa captação com as células em perfeita atividade metabólica.

As drogas testadas foram todas adicionadas tanto no período de pré-incubação como na incubação. Observou-se que a insulina não apresentou ação estimulatória efetiva sobre o transporte quando adicionada apenas no período de incubação (FIG.III.5). Essa observação não foi particularmente estudada não estando claro, por isso, o mecanismo envolvido nesse fenômeno. Poderia ser a preparação do receptor? Síntese de receptores estimulada pela presença do hormônio? Deslocamento dos receptores até a membrana ou algum outro mecanismo até então desconhecido?

A dose de insulina utilizada foi de 1,0 UI/ml de meio. Essa concentração já havia sido usada em trabalhos anteriores com adrenais de rato (WASSERMANN, FAUTH, MACHADO, 1989-b) e em zona glomerulosa de adrenal bovina (FAUTH, BARRETO, WASSERMANN, 1991). No decorrer dos experimentos verificou-se uma variação bastante acentuada do estímulo produzido pela insulina sobre o transporte de aminoácidos. Atribuiu-se essa ocorrência ao fato de trabalhar-se com animais "in natura", onde o peso, a idade, a raça, a procedência e uma série de outros fatores ambientais e nutricionais exerceram, sem dúvida, algum tipo de influência.

A existência de sítios específicos para a ligação da insulina em glândulas adrenais de ratos foi

determinada "in vivo" com a utilização de  $^{125}\text{I}$ -insulina e excesso de outros hormônios não marcados como insulina, glucagon, prolactina e hormônio de crescimento. O uso desses hormônios não marcados teve por objetivo comprovar que, nas glândulas adrenais de rato, existem sítios específicos de ligação para a insulina (MACHADO et al., 1982).

Em 1992, ITO e colaboradores caracterizaram a presença de receptores de insulina em córtex e medula adrenal bovina. A presença desses receptores na adrenal permite concluir com certa segurança que a insulina possui um efeito fisiológico sobre essa glândula, em bovinos. No presente trabalho estudou-se o efeito biológico da insulina sobre a captação de aminoácidos através dos diferentes sistemas de transporte caracterizados no córtex adrenal bovino.

O sistema A de transporte foi caracterizado através da análise dos resultados de experimentos que utilizaram como aminoácido modelo o  $(^{14}\text{C})\text{MeAIB}$ , substrato específico desse sistema. Os experimentos foram realizados em meio KRb-glicose e em meio KRb-glicose-colina, na presença de  $0,1 \mu\text{Ci}$  do aminoácido. O meio assódico foi utilizado para investigar o papel da bomba  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  sobre o transporte de aminoácidos



em córtex adrenal bovino, pois o sistema A depende da concentração de sódio assim como da energia ministrada pelo ATP (GUIDOTTI, BORGHETTI, GAZZOLA, 1978).

Os resultados apresentados na (FIG.III.6) mostram que o transporte de ( $^{14}\text{C}$ )MeAIB pelo sistema A foi estimulado pela insulina quando o sódio estava presente no meio de incubação. Em meio assódico houve um decréscimo tanto na captação basal como na estimulada pelo hormônio. De acordo com DALL'ASTA e colaboradores (1991) que estudaram a energização do sistema A em fibroblastos humanos, o cotransporte sódio/aminoácido mostra a relação de 1:1. A acumulação de ( $^{14}\text{C}$ )MeAIB é fortemente sensível a mudanças no gradiente de sódio e no potencial de membrana, indicando que o gradiente eletroquímico de sódio fornece energia para o aumento do transporte do aminoácido.

O transporte remanescente verificado na ausência de sódio, ocorreu possivelmente por intermédio do sistema L. Esse sistema transporta aminoácidos neutros em maior ou menor extensão, mesmo quando esses são substratos preferenciais de outros sistemas de transporte (GUIDOTTI, BORGHETTI, GAZZOLA, 1978).

A captação de ( $^{14}\text{C}$ ) AIB por córtex adrenal bovino foi investigada na presença de sódio , na ausência do

íon e em meio saturado com MeAIB não marcado. Os resultados mostrados nas tabelas III.3 e III.4, indicam que a captação basal foi significativamente diminuída na ausência de sódio e no meio saturado com MeAIB, anulando-se o efeito da insulina nessas condições.

O aminoácido ( $^{14}\text{C}$ )AIB é transportado através dos sistemas A e ASC, ambos dependentes de sódio (ítem I.2.2 da introdução), portanto, na ausência do íon sódio o transporte verificou-se possivelmente através do sistema L. Quando o sistema A foi bloqueado por MeAIB 20 mM o transporte deve ter ocorrido através do sistema ASC e L, confirmando que o sistema ASC está presente em muitos tipos celulares porém sua atuação é pouco expressiva (ítem I.2.2 da introdução).

Em 1977, LE CAM e FREYCHET caracterizaram os sistemas A e L em hepatócitos de rato. Utilizaram como aminoácido modelo ( $^{14}\text{C}$ )AIB e constataram que em baixas concentrações (2 a 5 mM) a acumulação desse aminoácido no interior da célula ocorre por um processo saturável, dependente de sódio, e por um processo insaturável independente de sódio. Observaram também que o influxo dependente de sódio é inibido competitivamente pelo aminoácido ( $^{14}\text{C}$ )MeAIB e alanina. O componente independente de sódio que pode representar de 20 a 30%

do total de entrada do aminoácido em baixas concentrações, possivelmente é constituído por um processo de difusão passiva ou representa a contribuição de outros sistemas de pouca afinidade. De acordo com esses autores, os resultados aqui encontrados podem sugerir que o transporte de ( $^{14}\text{C}$ )AIB, nas diferentes condições experimentais, tenha ocorrido em parte pelos sistemas A e ASC, dependentes de sódio e pelo sistema L, independente de sódio. A insulina teve uma ação estimulatória significativa quando o transporte ocorreu através do sistema A, não apresentando ação estimulatória na ausência de sódio, ou seja, quando a captação do aminoácido verificou-se pelo sistema L.

Os resultados apresentados na (TAB III.5) sugerem que a ( $^{14}\text{C}$ )cLeu é transportada preferentemente pelo sistema L, sódio independente, mas que também é transportada por sistemas dependentes de sódio, pois a captação realizada em meio assódico é menor que a verificada na presença do íon.

HEINZ e DURBIN, em 1957, estudaram o transporte de cicloleucina em hepatócitos de rato recém isolados. Sob o ponto de vista cinético, observaram que o transporte de cicloleucina pode ser dividido em três

componentes: um saturável e sensível ao sódio, um insaturável e sensível ao sódio e um terceiro insaturável e insensível ao sódio. O transporte independente de sódio é causado pela difusão por troca e por um processo dependente de energia porque induz concentrações de aminoácidos para o interior da célula (SCHULTZ, CURRAN, 1970). A captação sensível ao sódio é completamente inibida pelo ácido (<sup>14</sup>C)AIB indicando que a cicloleucina é transportada também pelo sistema A, o que foi sugerido nos experimentos realizados em córtex adrenal bovino.

No presente trabalho não foram realizados experimentos com o objetivo de testar a ação da insulina sobre o sistema L, uma vez que comprovadamente esse sistema não sofre regulação hormonal (GUIDOTTI, BORGUETTI, GAZZOLA, 1978).

É conhecido que a insulina estimula o transporte de aminoácidos em diversos tecidos e que essa ação estimulatória ocorre através de sistemas dependentes de sódio.

O aminoácido  $\alpha$  metil aminoisobutírico é o principal substrato do sistema A, podendo também ser

transportado através de outros sistemas incluindo-se o L.

LONGO e colaboradores em 1985 observaram que a insulina aumenta a atividade de transporte em cultura de fibroblastos humanos, através dos sistemas A e X<sub>c</sub> sensíveis ao hormônio. As alterações na cinética dessa atividade ocorrem através de um aumento da V<sub>max</sub> sem mudanças significativas no valor de K<sub>m</sub>.

FEHLMANN e colaboradores em 1979 observaram que o efeito estimulatório da insulina sobre a captação de aminoácidos por hepatócitos isolados de ratos é caracterizado por um aumento de V<sub>max</sub>.

A insulina estimula a captação de (<sup>14</sup>C)MeAIB em músculo esquelético (GUMÁ et al., 1988) produzindo um aumento no valor de V<sub>max</sub> sem, entretanto, alterar o K<sub>m</sub>.

BIGORNIA e BIHLER em 1986 observaram a ação estimulatória da insulina sobre a captação de O-metil-D-glicose por células cromafínicas isoladas de adrenal bovina. Esses autores justificam as diferenças encontradas para os valores de K<sub>m</sub> (8.2, 5.2, 5.9 mM) e de V<sub>max</sub> (0.69, 1.10 e 2.24 nmol/mg proteína x min.) nos grupos experimentais, considerando que as células são

oriundas de animais que apresentam uma heterogeneidade de raça, idade, alimentação e procedência.

Nos experimentos realizados no presente trabalho, com o objetivo de determinar as constantes cinéticas do transporte de aminoácidos neutros, também encontrou-se as mesmas dificuldades descritas por BIGORNIA e BIHLER em 1986, uma vez que as glândulas provinham de animais "in natura".

Na Tabela III.6 observa-se que a captação de aminoácidos aumenta desde 1 minuto até pelo menos 180, tempo máximo analisado. Para outra série de experimentos, foi escolhido 120 minutos como tempo adequado devido à elevada captação alcançada assim como um claro efeito da insulina (Figura III.4). Para o estudo da ação da insulina sobre  $K_m$  e  $V_{max}$  escolheu-se o tempo de 8 minutos de incubação para a determinação da velocidade inicial, pois, nesse tempo observou-se um bom percentual de captação e uma efetiva ação da insulina, utilizando-se 45 minutos como período de pré-incubação adequado (Fig. III.9).

A tabela III.7 mostra o aumento da captação de ( $^{14}C$ )MeAIB basal e estimulada pela insulina, em diferentes concentrações do aminoácido não marcado. Observou-se que o transporte aumenta com a concentração. É possível supor que devido à quantidade

crescente de aminoácido oferecido, o transporte esteja ocorrendo também através de um ou mais sistemas insaturáveis. LE CAM e FREYCHET em 1977 observaram que a entrada do ácido  $\alpha$  aminoisobutírico, em hepatócitos isolados de ratos, ocorre através de um sistema saturável sensível a sódio (A) e um insaturável não sensível ao sódio (L). Essas considerações tornam aceitável a observação de que na concentração 10 mM de MeAIB a velocidade de entrada continua crescendo praticamente de maneira linear, passando de 0.80 nmol/mg tec. x min. em 1.0 mM de MeAIB para 7.70 nmol/mg tec. x min. em 10 mM do aminoácido (TAB.III.8).

Efetuada-se a regressão linear dos valores de  $1/V$  vs  $1/[S]$  determinou-se os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  aparentes. O fenômeno de transporte de aminoácidos não obedece a uma cinética tão específica como a enzimática, já que nos sistemas transportadores o reconhecimento dos aminoácidos (substrato) é imperfeito.

Na tabela III.8 observam-se os valores de  $K_m$  aparente basal e estimulado sem alterações consideráveis: 8,35 e 8,57 mM, indicando que a afinidade do aminoácido pelas proteínas transportadoras não foi alterada.

O mecanismo através do qual a insulina estimula o transporte de aminoácidos não encontra-se completamente esclarecido. Assim, em músculo esquelético a ação da insulina independe da síntese protéica "de novo" e do gradiente eletroquímico de sódio (GUMÁ et al., 1988). Entretanto, na grande maioria dos tecidos estudados a ação da insulina sobre o transporte de aminoácidos é um fenômeno dependente de sódio.

É sabido que o cálcio é um importante elemento regulatório em muitos processos celulares. Na maioria das células eucarióticas diversos sistemas de transporte de cálcio são conhecidos, mantendo o gradiente de concentração entre o cálcio intra e extracelular. Assim, o cálcio é transportado para dentro ou para fora da célula ou de organelas intracelulares por vários sistemas de bombas ligadas à membrana plasmática ou a membranas internas.

Em 1967, REUTER (SPEDDING, PAOLETTI, 1992) caracterizou correntes de cálcio em miocárdio, o que constituiu o ponto de partida para a realização das inúmeras pesquisas empreendidas com o objetivo de identificar e caracterizar os canais de cálcio. Assim, foram identificados e estudados, principalmente, os



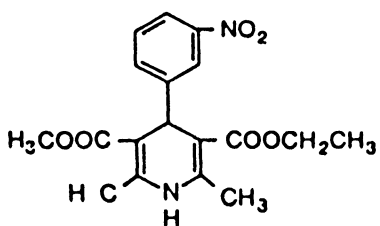
canais de cálcio dependentes de voltagem e os operados por mecanismos ligados a receptores.

Os canais de cálcio tipo "L", dependentes de voltagem, são largamente distribuídos em muitos tipos celulares, sendo sensíveis a dihidropiridinas, fenilalquilaminas e benzodiazepínicos.

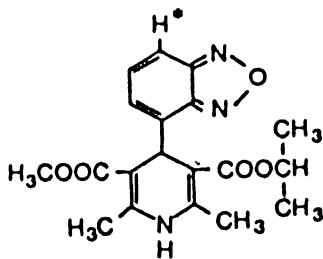
A presença dos canais de cálcio em córtex adrenal bovino foi identificada por vários grupos de pesquisadores. Assim, YANAGIBASHI, KAWAMURA, PETER, em 1990, estudaram o envolvimento dos canais de cálcio na produção de corticosteróides pelas células da zona fasciculada de adrenais de rato e bovinas. Observaram que a nifedipina e PY 108-068, inibidores dos canais de cálcio dependentes de voltagem, provocaram diminuição na produção de esteróides em células adrenais bovinas não estimuladas ou estimuladas por ACTH, potássio ou  $(\text{Bu})_2$  cAMP. Esse efeito, entretanto, não foi observado em adrenais de ratos. O BAY K8644, agente que estimula os canais de cálcio dependentes de voltagem, aumenta a síntese de esteróides e potencializa a resposta ao ACTH em células adrenais bovinas, mas não exerce efeito observável nas células fasciculadas de ratos. A evidência definitiva da presença de canais de cálcio

dependentes de voltagem, nas células fasciculadas de adrenal bovina, é dada pela ligação do [ + ]-PN 200-110 a receptores específicos para 1,4 dihidropiridina, associados aos canais de cálcio. O fato do [ + ]-PN 200-110 não ligar-se às células fasciculadas de adrenais de rato, sugere que essas células não apresentam canais de cálcio dependentes de voltagem, sensíveis à dihidropiridinas.

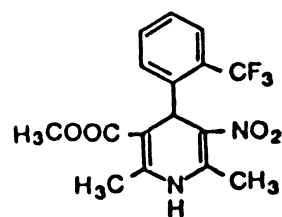
1 - 1,4 Dihidropiridinas



Nitrendipine

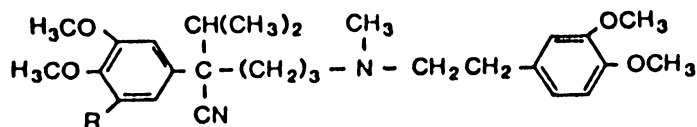


PN 200-110



Bay K 8644

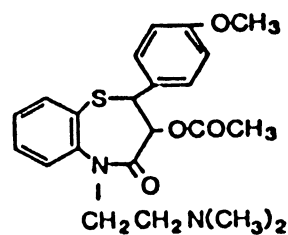
2 - Fenilalquilaminas



Verapamil  
D600

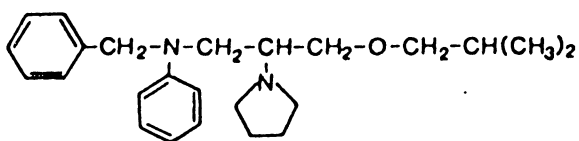
R = H  
R = OCH<sub>3</sub>

3 - Benzodiazepinas

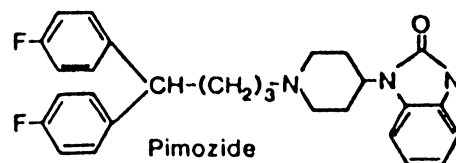


Diltiazem

4 - Bepirdil

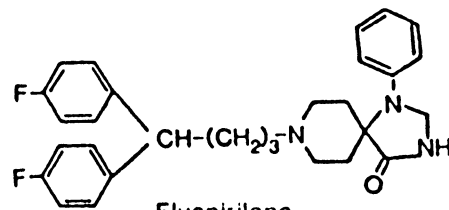
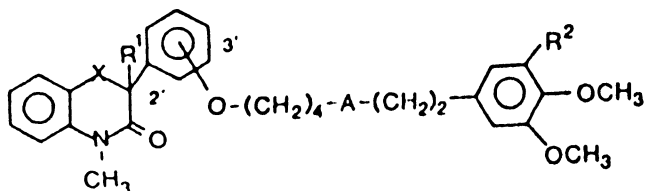


5 - Difenilbutilpiperidinas



Pimozide

6 - HOE. 166



Fluspirilene

FIGURA IV.I - ESTRUTURA DE ALGUMAS DROGAS QUE LIGAM-SE A RECEPTORES ASSOCIADOS A CANAIS DE CÁLCIO (HOSEY, LAZDUNSKI, 1988).

Em 1988, COHEN e colaboradores investigaram a presença de canais de cálcio em células dispersas de adrenal bovina e identificaram dois tipos de canais. Um, similar aos canais tipo "T" encontrados em muitas células excitáveis e outro semelhante aos canais tipo "L". Esses pesquisadores sugeriram que os canais tipo "T" possuem importante função na relação estímulo-secreção em resposta a uma alta concentração de potássio ou angiotensina II.

No presente trabalho procurou-se caracterizar o envolvimento dos canais de cálcio dependentes de voltagem presentes no córtex adrenal bovino, com o transporte de aminoácidos e a ação estimulatória da insulina sobre esse fenômeno.

Os canais de cálcio dependentes de voltagem podem ser bloqueados por metais de transição como os lantanídeos e o cádmio que são bloqueadores altamente específicos, bem como pelos metais do grupo VIII-B como ferro, cobalto e níquel que apresentam uma afinidade relativamente moderada (NACHSEN et al., 1984). Em 1991, WINEGAR e colaboradores demonstraram que os metais de transição bloqueiam a corrente de cálcio em canais sensíveis a dihidropiridinas em músculo esquelético. Demonstraram também que a cinética de bloqueio é diferente para cada íon. Assim, por exemplo, o ferro e

o cobalto produzem rápidos efeitos de bloqueio, enquanto o níquel produz esse efeito de maneira bem mais prolongada. O cobalto possui uma capacidade de ligação aos canais bem menos seletiva que o níquel.

Em 1986 e 1990, LANSMAN e colaboradores sugeriram que o limite para a entrada do íon no canal depende fundamentalmente da sua hidratação. Isso poderia explicar a lenta velocidade de entrada do níquel no poro do canal, pois esse íon desidrata-se 100 vezes mais lentamente que o ferro e o cobalto.

No trabalho aqui apresentado, os cátions metálicos usados como bloqueadores de canais de cálcio foram o cobalto e o níquel. Tanto na presença de cobalto como do níquel, a ação estimulatória da insulina foi inibida pelo bloqueador já na menor dose utilizada (Figuras III.7 e III.8). Nos experimentos realizados com o íon cobalto, a captação basal do aminoácido não foi alterada significativamente em relação ao controle em nenhuma das doses utilizadas. No caso do íon níquel, a captação basal foi significativamente diferente do controle somente na dose mais elevada (0,25 mM).

Outro bloqueador utilizado foi o verapamil. Observou-se que na presença desse bloqueador na

concentração de 0,25 mM houve uma significativa diminuição na captação de (<sup>14</sup>C)MeAIB, tanto basal como estimulada pela insulina, e na concentração de 0,1 mM a ação estimulatória da insulina foi inibida mas a captação basal não sofreu significativo decréscimo.

Os efeitos provocados pelo verapamil demonstram a presença de canais de cálcio sensíveis a DHP e fenilalquilaminas no córtex adrenal bovino, e que esses canais estão envolvidos com o transporte de aminoácidos. Em 1983, FORSET e colaboradores demonstraram que os canais de cálcio tipo "L" possuem vários receptores específicos de alta afinidade para seus efetores. Um receptor específico liga os derivados da 1,4 dihidropiridina com constante de dissociação na faixa de pM a nM. Outros receptores presentes nos canais tipo "L" ligam fenilalquilaminas, bepridil e benzodiazepínicos (HOSEY, LAZDUNSKI, 1988). As fenilalquilaminas e bepridil parece que ligam-se a um receptor comum que é distinto do receptor de dihidropiridinas (GALIZZI et al., 1986 a). Os benzodiazepínicos podem ligar-se ao receptor de fenilalquilaminas e bepridil (MURPHY et al., 1983) ou a um outro receptor que é alostericamente ligado ao receptor de fenilalquilaminas (GOLL, FERRY, GLOSSMANN, 1983). Vários laboratórios tem apresentado evidências

de que fenilalquilaminas, bepridil e benzodiazepínicos interagem competitivamente com os receptores nos canais de cálcio (MURPHY et al., 1983; GALIZZI et al., 1986-a), entretanto, o fato de que benzodiazepínicos estimulam a ligação de dihidropiridinas, enquanto fenilalquilaminas e bepridil usualmente inibem essa ligação, pode sugerir a presença de um sítio de ligação para benzodiazepínicos e outro para fenilalquilaminas e bepridil. Sítios de alta e baixa afinidade para fenilalquilaminas foram encontrados em membranas cardíacas, de músculo liso e esquelético e de cérebro (PTASIENSKI et al., 1985).

É difícil atribuir-se, sem nenhum equívoco, a medida das correntes de cálcio às categorias já classificadas, L, T, N e P. É necessário estabelecer as propriedades farmacológicas e eletrofisiológicas de cada categoria para haver um progresso no conhecimento da biologia molecular desses canais. Sem dúvida, os canais tipo "L" são os mais estudados sendo, atualmente conhecidos efetores específicos para essa categoria de canal.

De acordo com MORI e colaboradores (1993) os canais de cálcio tipo "T" são bloqueados por baixa

concentração de níquel e também por octanol sendo resistentes a dihidropiridinas e  $\omega$ -conotoxina, entretanto, COHEN e colaboradores em 1988, em estudos realizados em glomerulosa de adrenal bovina sugeriram que os canais tipo "T" são bloqueados por nitrendipina que também inibe a secreção de aldosterona estimulada por concentração elevada de potássio ou angiotensina II.

Pode-se sugerir que com o conhecimento atual, ainda não é possível identificar, por exemplo, se o bloqueador específico de um tipo de canal como as DHP ou fenilalquilaminas, não atuem em outras categorias de canais. Também é importante considerar o estado eletrofisiológico do canal no momento de interagir com o bloqueador. Efeitos produzidos pelas próprias condições experimentais ou por outros agentes como por exemplo, ação de hormônios sobre o potencial de membrana podem interferir sobre essa interação.

Do presente trabalho pode-se concluir que os canais de cálcio dependentes de voltagem presentes no córtex adrenal bovino, são inibidos por fenilalquilaminas e por cátions metálicos do grupo VII-B. Trabalhos anteriormente realizados (COHEN et al., 1988) sugeriram a presença de canais do tipo "L" e do



tipo "T" no córtex adrenal, portanto o bloqueio observado teria ocorrido nesses dois tipos de canais, de acordo com o conhecimento atual.

Ainda, considerando-se os efeitos produzidos pelos bloqueadores dos canais de cálcio dependentes de voltagem, pode-se sugerir que o transporte estimulado pela insulina está mais relacionado com os canais de cálcio que a própria captação basal do aminoácido. A ação do hormônio é alterada na presença de bloqueadores de alta e de moderada afinidade como cobalto e níquel, enquanto o transporte basal de aminoácido foi diminuído de maneira drástica somente na presença de bloqueadores de alta afinidade como o verapamil. Deve-se considerar, nesse caso, que durante a ação hormonal a função mensageira do cálcio depende de rápidas mudanças na sua concentração em sítios intracelulares específicos, para controle dos processos metabólicos dependentes dele. Esses efeitos normalmente envolvem a ativação ou inibição de enzimas reguladas por proteínas quinases dependentes de cálcio. A ação sobre a adenilato ciclase, guanilato ciclase e fosfodiesterase, durante a ação hormonal, é de grande importância pois essas enzimas são críticas no controle dinâmico dos níveis intracelulares dos nucleotídeos cíclicos que

estão diretamente envolvidos com os efeitos exercidos pelo hormônio.

Conforme descrito no ítem I.2.1. da introdução, a maioria dos aminoácidos é transportada ativamente para o interior da célula. Esse processo está ligado ao gradiente eletroquímico de sódio, estabelecido pelo transporte ativo do sódio para fora das células, o que proporciona o transporte ativo do soluto orgânico. Pode-se afirmar que em muitos tipos de células animais o principal sistema de transporte ativo é justamente, a bomba de sódio e potássio, que retira sódio e acumula potássio no interior da célula. A proteína que constitui essa estrutura celular é chamada de  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ . A energia para a produção do gradiente de sódio e potássio é proveniente da hidrólise do ATP a ADP e  $\text{P}_i$ .

O vanádio interage com ATPases de transporte em diferentes tipos celulares exercendo uma ação inibitória sobre a atividade dessas enzimas. De outro modo, sabe-se que a presença do íon vanadato é importante para o desenvolvimento de diversos eventos biológicos. Assim, exerce alguns efeitos celulares semelhantes aos da insulina.

No trabalho aqui apresentado foi estudada a ação do íon vanadato sobre o transporte de aminoácidos, uma vez que a ação da insulina sobre esse evento foi caracterizada e considerando-se que o vanadato apresenta efeitos "insulin like".

Assim, a administração oral de vanadato a ratos diabéticos deficientes em insulina diminuiu os níveis de glicose sangüínea e melhorou a homeostase em animais hiperinsulinêmicos, resistentes à insulina (BRICHARD, POTTIER, HENQUIN, 1989; BRICHARD, BAILEY HENQUIN, 1990). A ação do vanadato sobre os níveis de glicose sangüínea em ratos diabéticos por estreptozotocina foi observada por HEYLIGER e colaboradores em 1985 e GIL e colaboradores em 1988. O efeito do vanadato foi também observado sobre a liberação de insulina em ilhotas de camundongos normais (ZHANG et al., 1991). Esse íon possui efeito estimulatório sobre o transporte de aminoácidos neutros em músculo soleus de ratos Wistar (MUÑOZ et al., 1992), tendo a captação de ( $^{14}\text{C}$ ) MeAIB sofrido um acréscimo de 80% na presença do íon.

A ação do vanadato de sódio sobre o transporte de ( $^{14}\text{C}$ ) MeAIB foi testada em córtex adrenal bovino. Observou-se que o íon produziu uma ação inibitória tanto sobre a captação basal como a estimulada pela insulina. Esse resultado está em desacordo com os

resultados encontrados por MUÑOZ e colaboradores (1992) em músculo esquelético. Entretanto, GUMÁ e colaboradores em 1988 postulam que o transporte de aminoácidos neutros em músculo esquelético é independente do gradiente eletroquímico de sódio e possui características diferentes do mecanismo de transporte verificado em outros tecidos. Assim, considerando-se a ação inibitória do íon vanadato sobre as ATPases, pode-se sugerir que as alterações causadas no potencial de membrana podem ser responsáveis pelo decréscimo observado na captação de aminoácidos, uma vez que o transporte através do sistema A é dependente de energia e do gradiente eletroquímico de sódio. O efeito do vanadato poderá ser atribuído, provavelmente, a sua ligação com a  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  diminuindo a velocidade de transformação conformacional da enzima, que passa da forma  $E_2$  para a forma  $E_1$  (ítem I.2.5 da introdução).

BUSSOLATI e colaboradores (1986) demonstraram que a atividade do sistema A diminui em fibroblastos fetais humanos despolarizados pelo aumento do potássio extracelular. A atividade aumenta em células hiperpolarizadas pela adição de altas concentrações de valinomicina e baixas concentrações de potássio. O sistema ASC apresenta uma resposta similar ao sistema A

em relação às variações das concentrações de potássio e ao uso de valinomicina.

Com o objetivo de verificar se o efeito do vanadato sobre o transporte de aminoácidos pudesse ser espécie específico, foram realizados experimentos com adrenais de ratos, onde observaram-se resultados semelhantes.

O vanadato de sódio aumenta o pH do meio intra e extra celular aumentando o transporte pelos sistemas A e ASC em músculo soleus de rato. Esse aumento do pH produzido pelo vanadato foi considerado por MUÑOZ e colaboradores (1992) como o mediador do acréscimo no percentual de captação de (<sup>14</sup>C) MeAIB em músculo esquelético. O mesmo efeito, entretanto, não foi observado em glândulas adrenais de ratos ou bovinos. A captação basal de (<sup>14</sup>C)MeAIB ou a estimulada pela insulina teve o seu valor máximo no pH 7,4, observando-se menores percentuais de captação em pH 6,0 ou 8,0 (FIG.III.15).

O efeito estimulatório da insulina sobre o sistema A em músculo esquelético é rápido, caracterizado por um aumento de  $V_{max}$ , independente de síntese protéica "de novo" e independente do gradiente eletroquímico de

sódio (GUMÁ et al., 1988). Essas observações também permitem postular que a ação da insulina ocorra diretamente sobre os transportadores do sistema A ou pelo aumento de sua atividade intrínseca (independente do gradiente eletroquímico de sódio) ou em consequência de sua translocação do "pool" intracelular para a membrana plasmática, como descrito para transportadores de glicose.

A ação da insulina em tecidos adreno-corticais está relacionada com o gradiente eletroquímico de sódio (WASSERMANN FAUTH, MACHADO, 1989-b), não apresentando efeito em experimentos onde o íon sódio foi suprimido, por exemplo, na captação de ( $^{14}\text{C}$ ) MeAIB em tampão KRb-colina. Essa estimulação hormonal foi modificada na presença do íon vanadato. Em baixas concentrações  $10^{-6}$  M e  $10^{-5}$  M a ação da insulina foi inibida em adrenais de ratos enquanto em córtex adrenal bovino sofreu moderada diminuição. Somente em concentrações de  $10^{-4}$  M e  $10^{-3}$  M de vanadato de sódio, houve completa inibição em córtex adrenal bovino (Figuras III.16 e III.17). Esse efeito inibitório do vanadato sobre a ação da insulina poderá ser atribuído às modificações eletroquímicas produzidas pelo íon nas suas interações com as ATPases, tanto a  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  como a  $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$  também modificada pelo íon.

## V. CONCLUSÕES

De acordo com os procedimentos experimentais desenvolvidos no trabalho aqui apresentado foi possível chegar-se às conclusões listadas a seguir.

a - A captação de aminoácidos neutros em córtex adrenal bovino ocorre preferentemente através do sistema A, ocorrendo também, em menor proporção pelos sistemas ASC e L.

b - A insulina exerce efeito estimulatório sobre a captação de aminoácidos neutros através do sistema A dependente de sódio e de energia.

c - O aumento da atividade do transporte de aminoácidos neutros efetuado pela insulina, caracteriza-se por um aumento da  $V_{max}$  sem, entretanto, alterar a  $K_m$ .

d - A ação estimulatória da insulina está fortemente ligada ao funcionamento dos canais de cálcio dependentes de voltagem, "L" e "T" pois, quando esses canais são bloqueados, o efeito estimulatório do hormônio é abolido.

e - A captação basal de aminoácidos também apresenta-se relacionada aos canais de cálcio dependentes de

voltagem, porém de maneira menos intensa que a ação da insulina. Uma inibição significativa do transporte basal é observada somente na presença de concentrações elevadas dos bloqueadores de canais.

f - O vanadato de sódio apesar de apresentar efeitos "insulin like" como a diminuição da glicemia em ratos diabéticos por estreptozotocina, mostrou-se ineficiente em exercer ação "insulin like" no que se refere ao transporte de aminoácidos neutros em córtex adrenal bovino e em adrenais de rato. Nesse fenômeno, o vanadato de sódio apresentou uma ação contrária a da insulina. Produziu inibição tanto no transporte basal como no estimulado pelo hormônio, provavelmente atuando junto às ATPases.



## VII. ANEXO

Durante o desenvolvimento do trabalho aqui apresentado foram feitas publicações que englobam parte das investigações realizadas. As publicações estão citadas abaixo e as cópias a seguir.

FAUTH, M.G.; BARRETO, K.P.; WASSERMANN, G.F. Insulin stimulatory action on amino acid uptake in bovine adrenal cortex or glomerulosa zone. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 98A, n. 3/4, p. 513-515, 1991.

WASSERMANN, G.F.; FAUTH, M.G.; BARRETO, K.P.; GRILLO, M. L. Vanadate impairs the action of insulin on amino acid transport in the adrenal cortex of rats and cows. **Medical Science Research**, Kew, V.22, n.1, p. 27-29, Jan. 1994.

WASSERMANN, G.F.; BARRETO, K.P.; FAUTH, M.G.  $Ca^{2+}$  channels and insulin action on amino acid uptake by bovine adrenal cortex. **Medical Science Research**, Kew, V.22, n.8 p. 601-602, Aug., 1994.

## INSULIN STIMULATORY ACTION ON AMINO ACID UPTAKE IN BOVINE ADRENAL CORTEX OR GLOMERULOSA ZONE

M. G. FAUTH, K. P. BARRETO and G. F. WASSERMANN\*

Centro de Endocrinologia Experimental, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

(Received 17 July 1990)

**Abstract**—1. Insulin stimulated the [ $^{14}\text{C}$ ] methylaminoisobutyric acid and [ $^{14}\text{C}$ ] aminoisobutyric acid uptake in bovine adrenal cortex or in the glomerulosa zone through the A system.

2. Verapamil nullified the insulin stimulatory action indicating that this hormonal action is probably related to the voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels.

### INTRODUCTION

Adrenals of rats have insulin receptors (Machado *et al.*, 1982) and respond to the hormone with an increase in glucose or amino acid transport (Silva *et al.*, 1984; Wassermann *et al.*, 1989). Insulin stimulatory action of glucose transport was also reported in freshly isolated bovine adrenal chromaffin cells (Bigornia and Bihler, 1986). Transport of neutral amino acid in mammalian cells involves three major systems. The alanine preferring (A) system, specific for methylaminoisobutyric acid and the alanine, serine and cysteine-preferring (ASC) system are sodium dependent, while the A system is also pH and energy-dependent. The leucine preferring (L) system is sodium, pH and energy independent (Guidotti *et al.*, 1978). Hormonal effects on amino acid uptake appear to be restricted to system A. Insulin, estrogens and glucagon, among others, have been observed to act on this system (Lerner, 1985).

The aim of the present work was to investigate the characteristics of amino acid transport in freshly isolated bovine adrenocortical tissue. Special attention was paid to the amino acid transport system involved in the response to the action of insulin, as well as to the effect of the  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker, verapamil.

### MATERIALS AND METHODS

Fresh bovine adrenal glands were obtained from a local slaughterhouse. Adrenal glands were trimmed clean of fat and connective tissue, perfused with standard medium Krebs-Ringer bicarbonate 0.2% glucose saturated with 95%  $\text{O}_2$ :5%  $\text{CO}_2$  at 4°C and transported immersed in medium to the laboratory as fast as possible.

Bovine insulin crystalline, methylaminoisobutyric acid (MeAIB) choline bicarbonate and choline chloride were purchased from the Sigma Chemical Co., St Louis, MO, U.S.A.

[ $^{14}\text{C}$ ] methylaminoisobutyric acid ([ $^{14}\text{C}$ ] MeAIB, sp. act. 48.4 mCi/mmol), [ $^{14}\text{C}$ ] aminoisobutyric acid ([ $^{14}\text{C}$ ] AIB, sp. act. 30 mCi/mmol) and 1 [carboxyl- $^{14}\text{C}$ ] aminocyclopentane 1 carboxylic acid ([ $^{14}\text{C}$ ] Cleu, sp. act. 48.5 mCi/mmol) were obtained from Du Pont, NEN Products, Boston, MA., U.S.A. Samples of 100 mg of the entire cortex (0.5 mm thick) or glomerulosa zone were preincubated and incubated in Krebs-Ringer bicarbonate buffer (KRb) or sodium-free KRb, in which the sodium chloride and sodium bicarbonate were replaced by equimolar concentrations of respective choline salts, in a Dubnoff metabolic incubator.

The solution was maintained at pH 7.4 at 37°C and gassed with  $\text{O}_2$ : $\text{CO}_2$  (95:5 v/v).

The samples were preincubated for 30 min and incubated for 90 min or 120 min. At the beginning of the incubation 0.2  $\mu\text{Ci}$  [ $^{14}\text{C}$ ] MeAIB, [ $^{14}\text{C}$ ] AIB or [ $^{14}\text{C}$ ] Cleu were added to the flasks. In the same experiments (see Tables 1 and 2) MeAIB (at a final concentration of 20 mmol) was added to the incubation medium in order to block the A transport system (Kelley *et al.*, 1980a).

Insulin (1.0 IU), was added to the treated samples at the beginning of the period of incubation.

After incubation, samples were processed as previously reported (Cruz Curte and Wasserman, 1985). Aliquots (25  $\mu\text{l}$ ) of the tissue fluid or incubation medium were taken to measure the radioactivity of [ $^{14}\text{C}$ ] MeAIB, [ $^{14}\text{C}$ ] AIB or [ $^{14}\text{C}$ ] Cleu and counted in Aquasol 2 (Du Pont, NEN) in Rack Beta liquid scintillation spectrometer model 1215 (LKB-Produkter AB, Bromma, Sweden).

The counting efficiency was 85–90%. The results are expressed as the tissue/medium (T/M) ratio: cpm/ml tissue fluid per cpm/ml incubation medium. Results were compared using (a) One-way ANOVA (Tables 1, 2), (b) unpaired Student's *t* test (Tables 1 and 2, Figs 1 and 2). Post hoc tests were carried out by Duncan's multiple range test whenever suitable (Sokal and Rohlf, 1969).

### RESULTS

The uptake of [ $^{14}\text{C}$ ] AIB by bovine adrenal cortex or its glomerulosa zone is a time dependent process (Fig. 3). For the subsequent experiments time periods of 90 min (glomerulosa zone) and 120 min (entire cortex) were chosen.

In these experimental conditions, insulin ( $3 \times 10^{-6}$  M) (3) produced an increase in [ $^{14}\text{C}$ ] AIB uptake in the glomerulosa zone (Table 2) as well as

\*Requests for reprints should be addressed to: Dr Guillermo Federico Wassermann, Rua Sarmento Leite, 500, 90.049 Porto Alegre, RS, Brazil.

Table 1 *In vitro* uptake of [<sup>14</sup>C] AIB in the bovine adrenal cortex (means ± SEM)

Incubation medium	KRb	KRb + MeAIB (20 mM)	Sodium-free (KRb-choline)	Verapamil (2.5 × 10 <sup>-4</sup> M)
Basal	1.36 ± 0.02 (42)	0.75 ± 0.02† (6)	0.79 ± 0.02† (6)	1.20 ± 0.02† (6)
Insulin	1.83 ± 0.08* (6)	0.69 ± 0.02† (6)	0.76 ± 0.03† (6)	1.15 ± 0.06† (6)

Statistical analysis. (a) \*Unpaired Student's *t*-test. Significantly different from the adrenal cortex incubated without insulin,  $P < 0.01$ . (b) †One-Way ANOVA, Duncan's multiple range test revealed significant differences ( $P < 0.05$ ) between basal vs MeAIB, KRb-choline, verapamil and insulin vs MeAIB, KRb-choline, verapamil. In parentheses number of samples. Values were expressed as tissue/medium ratio

Table 2 *In vitro* uptake of [<sup>14</sup>C] AIB in the bovine adrenal glomerulosa zone (means ± SEM,  $n = 6$ )

Incubation medium	KRb	KRb + MeAIB (20 mM)	Sodium-free (KRb-choline)	Verapamil
Basal	1.51 ± 0.06	0.80 ± 0.05†	0.83 ± 0.04†	1.20 ± 0.08†
Insulin	1.76 ± 0.08*	—	—	1.43 ± 0.08†

Statistical analysis: (a) \*Unpaired Student's *t*-test. Significantly different from the adrenal glomerulosa zone incubated without insulin,  $P < 0.01$ . (b) †One-Way ANOVA. Duncan's multiple range test revealed significant differences ( $P < 0.05$ ) between basal vs MeAIB, KRb-choline, verapamil and insulin verapamil

in the entire cortex (Table 1). By blocking the A system with KRb containing 20 mM of MeAIB (specific substrate for A system), the amino acid uptake was reduced to near half of the control values. Similar results were obtained by blocking A and ASC system with the sodium-free version of KRb. In these experimental conditions the action of insulin was completely blocked.

Verapamil (2.5 × 10<sup>-4</sup> M) produced a reduction in the basal [<sup>14</sup>C] AIB transport and nullified the insulin stimulatory action (Tables 1 and 2) in the entire cortex or glomerulosa zone.

Essentially similar results were observed using [<sup>14</sup>C] MeAIB as the substrate (Figs 1 and 2), indicating also that the stimulatory action of insulin is processed through the A system.

#### DISCUSSION

Insulin stimulates the transport of [<sup>14</sup>C] MeAIB or [<sup>14</sup>C] AIB in the entire bovine adrenal cortex or in the

glomerulosa zone through the sodium and energy-dependent A system.

The uptake of [<sup>14</sup>C] Cleu was low in sodium free medium as well as in normal KRb (Na<sup>+</sup> free: 0.64 ± 0.02 and normal KRb: 0.81 ± 0.05). The results suggest that the L system is not very active in these glands. The adrenal response to the insulin indicates that this gland has receptors that recognize the hormone and that the insulin probably regulates important metabolic events.

The insulin action was also investigated in the presence of verapamil a specific blocker for voltage dependent Ca<sup>2+</sup> channels (Godfraind *et al.*, 1986). It has been reported that glucagon stimulates hepatic amino acid uptake by mobilizing cellular calcium (Kelley *et al.*, 1980b). It has also been shown that the increase in amino acid uptake produced by isoproterenol in mouse kidney cortex slices is abolished by calcium transport inhibitors (Goldstone *et al.*, 1983). At a dose of 2.5 × 10<sup>-4</sup> M, verapamil completely abolished the stimulatory action of insulin or

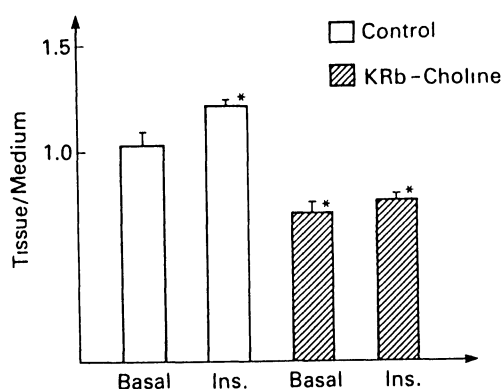


Fig. 1. Effect of insulin (3 × 10<sup>-6</sup> M) on the uptake of [<sup>14</sup>C] MeAIB in the adrenal cortex (means ± SEM,  $n = 6$ ). \*Significantly different from the basal adrenal cortex incubated without insulin,  $P < 0.01$ . No significant difference between basal choline vs insulin-choline groups.

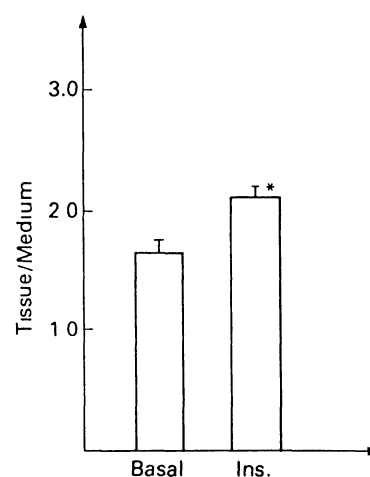


Fig. 2. Effect of insulin (3 × 10<sup>-6</sup> M) on the uptake of [<sup>14</sup>C] MeAIB in the adrenal glomerulosa zone (means ± SEM,  $n = 6$ ). \*Significantly different from the adrenal glomerulosa zone incubated without insulin,  $P < 0.01$ .

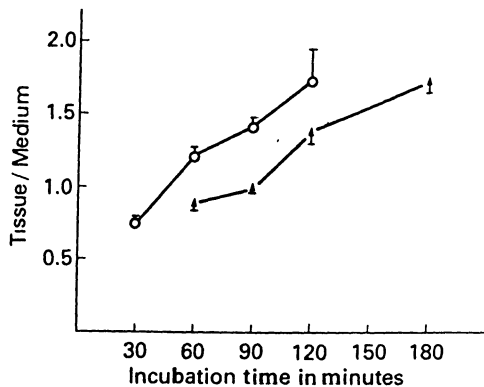


Fig. 3. Time curve of the basal [ $^{14}\text{C}$ ] AIB uptake in the entire adrenal cortex (▲) or in the glomerulosa zone (○).

amino acid transport. These results are in agreement with those of Tsang *et al.* (1983) who reported that the same dose ( $2.5 \times 10^{-4}$  M) of the drug inhibited the FSH stimulatory action on progesterone production by granulosa cells and also with those of Wassermann and Loss (1989) who found that the drug nullified the action of FSH on amino acid transport.

The results presented in this paper indicate that insulin stimulates amino acid transport in bovine adrenal cortex through the system A. This stimulatory action of insulin is related to the voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels.

**Acknowledgements**—The bovine adrenals were a gift of the Frigorífico Lider, Viamão, RS, Brazil. This work was supported in part by FINEP, CNPq, FAPERGS, CAPES and PROPEPSP-UFRGS.

#### REFERENCES

- Bigornia L. and Bihler I. (1986) 3-O-Methyl-D-glucose uptake in isolated bovine adrenal chromaffin cells *Biochim. Biophys. Acta* **885**, 335–344
- Cruz Curte A. and Wassermann G. F. (1985) Identification of amino acid transport systems stimulated by FSH in rat testes. *J. Endocrinology* **106**, 291–294.
- Godfraind J., Miller R. and Wibo M. (1986) Calcium antagonism and calcium entry blocked. *Pharmacological Reviews* **38**, 321–416.
- Goldstone A. D., Koenig H., Lu C. Y. and Trout J. J. (1983) Beta adrenergic stimulation evokes a rapid,  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent stimulation of endocytosis, hexoses and amino acid transport associated with increase  $\text{Ca}^{2+}$  fluxes in mouse kidney cortex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **114**, 913–921.
- Guidotti G. G., Borguetti A. F. and Gazzola G. C. (1978) The regulation of amino acid transport in animal cells. *Biochim. Biophys. Acta* **512**, 329–366.
- Lerner J. (1985) Review: Effects of amino acid transport processes in animal cell membranes. *Comp. Biochem. Physiol.* **81A**, 713–739.
- Kelley D. S., Schull J. D. and Potter V. R. (1980a) Hormonal regulation of amino acid transport and cAMP production in monolayer cultures of rat hepatocytes. *J. Cell Physiol.* **103**, 159–168.
- Kelley D. S., Evanson T. and Potter V. R. (1980b) Calcium-dependent hormonal regulation of amino acid transport and cyclic AMP accumulation in rat hepatocyte monolayer cultures *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 5953–5957.
- Machado V. L. A., Silva R. S. M., Marques M. and Wassermann G. F. (1982) Insulin specific uptake and action on deoxyglucose transport in rat adrenal glands. *IRCS Med. Sci.* **10**, 459–460.
- Silva R. S. M., Machado V. L. A., Marques M. and Wassermann G. F. (1984) Insulin binding sites and action in the adrenal glands from normal and streptozotocin diabetics rats. *Horm. Metabol. Res.* **16**, 77–81.
- Sokol R. R. and Rohlf S. F. (Eds) (1969) In: *Biometric* pp. 204–252, 299–342. Freeman W. H. and Co., San Francisco, U.S.A.
- Tsang B. K. and Carnegie J. A. (1983) Calcium requirement in the gonadotropic regulation of rat glomerulosa cell progesterone production. *Endocrinology* **113**, 763–769.
- Wassermann G. F., Fauth M. G. and Machado V. L. A. (1989) Insulin action on amino acid uptake by rat adrenal glands *in vitro* *Med. Sci. Res.* **17**, 675–676.
- Wassermann G. F. and Loss E. S. (1989) Effect of a calcium channel blocker, verapamil, on amino acid uptake stimulated by FSH in rat testes *Med. Sci. Res.* **17**, 779–780

# Vanadate impairs the action of insulin on amino acid transport in the adrenal cortex of rats and cows

G.F. Wassermann<sup>1</sup>, M.G. Fauth<sup>2</sup>, K.P. Barreto<sup>1</sup> and M.L. Grillo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Endocrinologia Experimental, Instituto de Biociências-UFRGS and <sup>2</sup>Instituto de Química-PUCRS, Porto Alegre-RS, Brasil

**Keywords:** Adrenal cortex, insulin, vanadate, amino acid transport.

**Introduction:** Insulin stimulates the transport of neutral amino acids in rat adrenal glands, in the entire bovine adrenal cortex and in the glomerulosa zone. This stimulation is mediated through the sodium and energy-dependent system A of amino acid transport and is related to voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels [1, 2]. Vanadate is an agent that mimics many of the effects of insulin in insulin-sensitive tissues [3]. Due to the similarities of action between vanadate and insulin, this ion has been used as a tool to gain insight into the mechanism of insulin action [3].

The chemistry of vanadate in solution is complex; in the body fluids, at pH 4–8, the predominant species will be  $\text{VO}_3^-$  (+5 oxidation state), vanadate or metavanadate.  $\text{VO}_3^-$  may enter certain cells by an anion transport system and be reduced to the  $\text{VO}^{2+}$  or vanadyl (+4 oxidation state) [4].

The aim of the present work was to analyse the action of insulin plus vanadate on amino acid transport in the adrenals of rats and cows.

**Materials and methods:** Bovine crystalline insulin was purchased from Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany), sodium orthovanadate and ouabain were from the Sigma Chemical Co., St., Louis, MO, USA and ( $^{14}\text{C}$ ) methylaminoisobutyric acid ( $^{14}\text{C}$  MeAIB sp. act. 48.4  $\mu\text{Ci mmol}^{-1}$ ) was from Du Pont, NEN Products (Boston, Mass. USA).

Fresh bovine adrenal glands were obtained from a local slaughterhouse. The glands were trimmed clean of fat and connective tissue, perfused with standard pH 7.4 Krebs-Ringer bicarbonate medium containing 0.2% glucose (KRb) saturated with  $\text{O}_2:\text{CO}_2$  (95:5 v/v) at 4°C and transported in this medium to the laboratory as quickly as possible.

Adult Wistar male rats weighing 150–200 g, bred in our animal quarters and housed in an air-conditioned room (about 24°C) with controlled lighting (lights on from 06.00 to 20.00 h), were used. Pelleted food (Purina, Nutrilab, Porto Alegre RS, Brazil) and tap water were available *ad libitum*. The animals were killed by cervical dislocation and the adrenals removed. The adrenals were then weighed and the capsule opened slightly prior to incubation. 100 mg samples of bovine cortex (0.5 mm thick) or whole rat adrenals were pre-incubated and subsequently incubated in Krebs Ringer bicarbonate buffer containing 0.2% glucose in a Dubnoff metabolic incubator at 37°C in an atmosphere of  $\text{O}_2:\text{CO}_2$  (95:5 v/v)

All samples were pre-incubated for 90 min and then incubated for 120 min (bovine adrenal) or 45 min (rat-adrenal). The experimental samples were pre-incubated and incubated with or without different concentrations of sodium vanadate (see Figures) and 1 IU of insulin in 1 mL of Krebs-Ringer bicarbonate buffer. At the beginning of the incubation, 0.1  $\mu\text{Ci}$  ( $^{14}\text{C}$ ) MeAIB was added to each flask.

After incubation the samples were rapidly removed from

the incubation medium and transferred to screw-cap tubes containing 1 mL of distilled water. They were then frozen and boiled to allow a complete equilibration of the tissue water with the suspension [2].

Aliquots (25  $\mu\text{L}$ ) of the tissue fluid or incubation medium were taken and the radioactivity of ( $^{14}\text{C}$ ) MeAIB counted in aquasol 2 (Du Pont, NEN Products, Boston, Mass, USA) using a LKB Rack Beta liquid scintillation, spectrometer model 1215 (LKB-Producter AB Bromma, Stockholm, Sweden). The counting efficiency was 85–90%. The results were expressed in terms of the tissue/medium (T/M) ratio: cpm/mL tissue fluid per cpm/mL incubation medium.

Results are expressed as means  $\pm$  SEM. Statistical evaluation was carried out using one-way and two-way ANOVA, followed by Duncan's multiple range test [5] (see figures). Differences were considered to be significant when  $p < 0.05$ .

**Results:** The action of insulin on amino acid transport in adrenal cortex of cows was altered by the presence of vanadate. Increasing the concentration of  $\text{VO}_3^-$  brought about a gradual decrease in basal and insulin-stimulated amino acid transport (Figure 1A).

The insulin stimulation of amino acid transport in the adrenal gland of rat was almost completely inhibited from the lowest concentration of vanadate used ( $10^{-6}$  M) (Figure 1B).

The addition of vanadate to the KRb buffer increased the pH values (Table 1). Vanadate concentrations of  $10^{-6}$  to  $10^{-4}$  M produced a moderate increase to pH 7.43–7.55 while  $10^{-3}$  M vanadate raised the pH to 7.92.

In an attempt to evaluate the influence of pH on amino acid transport, a study was performed on basal and insulin-stimulated amino acid transport in KRb-buffer at pH 6, 7.4 and 8. The optimum pH for amino acid transport and insulin action was 7.4. pHs of 6 and 8 decreased amino acid transport by 20% and 15% respectively (Figure 2).

The technique used for the entire adrenal cortex was also carried out on bovine glomerulosa to test the inhibitory action of ouabain (1 mM) on amino acid uptake. Strong inhibition of basal amino acid transport and total suppression of the insulin stimulatory action were observed (Table 2).

**Discussion:** The transport of neutral amino acid in mammalian cells involves three major systems. The first in the A system, specific for methylaminoisobutyric acid ( $^{14}\text{C}$ -MeAIB) and alanine, which is pH-, sodium- and energy-dependent.

Table 1 Influence of sodium vanadate concentration on pH of KRb buffer (means  $\pm$  SEM, n = 4)

$\text{Na}_2\text{VO}_4$ (M)	pH
0	7.40
$10^{-6}$	7.43 $\pm$ 0.04
$10^{-5}$	7.43 $\pm$ 0.05
$10^{-4}$	7.55 $\pm$ 0.05
$10^{-3}$	7.92 $\pm$ 0.10

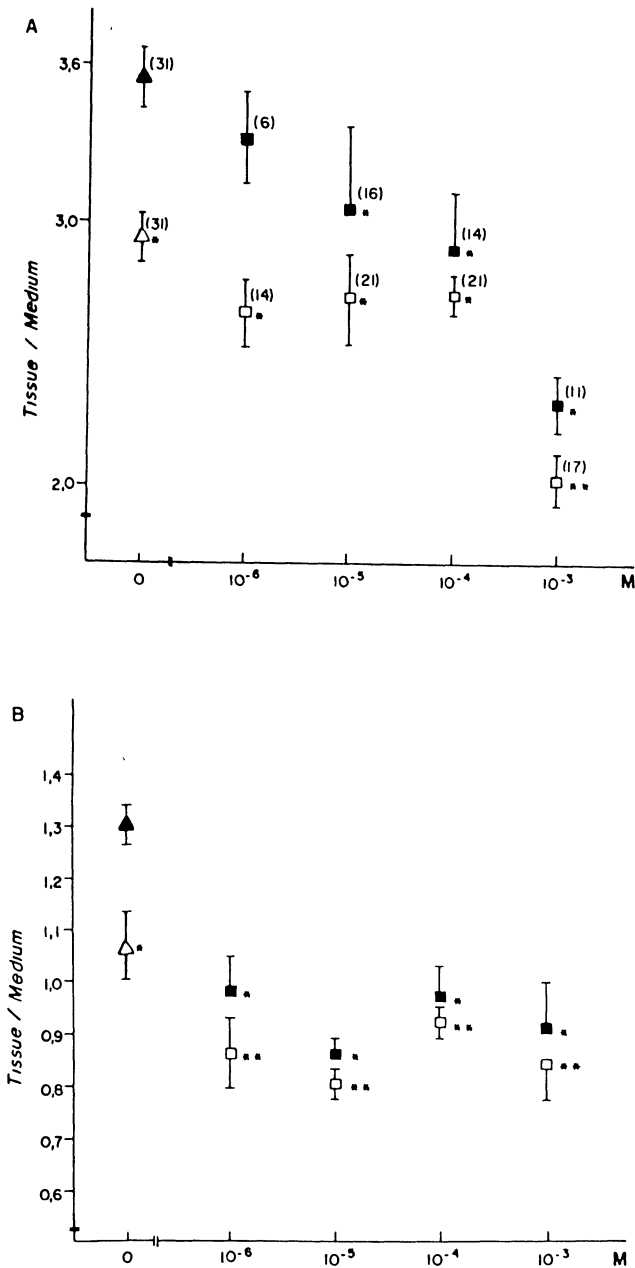


Figure 1 Inhibition of basal and insulin-stimulated ( $^{14}\text{C}$ )MeAIB uptake by different molar concentrations of vanadate (A) in bovine adrenal cortex slices (means  $\pm$  SEM; number of samples in brackets) and (B) in rat adrenal gland (means  $\pm$  SEM,  $n = 5$ ) ( $\Delta$ ) basal, ( $\blacktriangle$ ) insulin, ( $\square$ ) vanadate, ( $\blacksquare$ ) vanadate plus insulin  
\* As compared with insulin,  $p < 0.05$ ; \*\* As compared with basal without insulin,  $p < 0.05$

Table 2 Effect of ouabain (1 mM) on basal and insulin-stimulated ( $^{14}\text{C}$ )MeAIB uptake into the glomerulosa zone of bovine adrenal glands (means  $\pm$  SEM,  $n = 6$ ).

	KRb	ouabain (1 mM)
Basal	1.70 $\pm$ 0.04	0.99 $\pm$ 0.04*
Insulin	2.29 $\pm$ 0.11*	1.02 $\pm$ 0.04**

\* As compared with basal KRb,  $p < 0.01$  \*\* As compared with KRb plus insulin,  $p < 0.01$

Hormonal effects on amino acid uptake appear to be restricted to this system. The second, the sodium-dependent ASC system (alanine, serine, cysteine) and the third, the sodium-independent L system (leucine preferring), are pH- and energy-independent [6].

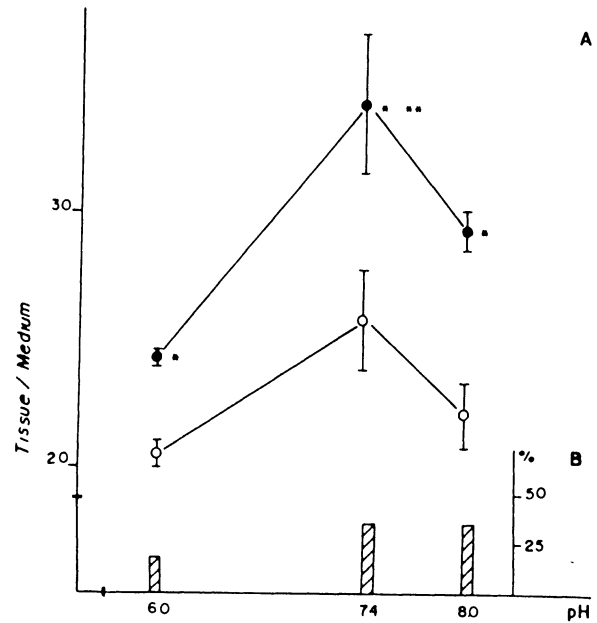


Figure 2 (A) Influence of pH on ( $^{14}\text{C}$ )MeAIB uptake into bovine adrenal cortex slices (means  $\pm$  SEM,  $n = 5$ ). ( $\circ$ ) without insulin, ( $\bullet$ ) with insulin. (B) percent stimulation of basal by insulin action.  
\* As compared with basal,  $p < 0.05$ . \*\* As compared with insulin pH 6 and 8,  $p < 0.05$ .

The stimulatory action of insulin on amino acid transport in adrenal cortex from cows [1] and rats [2] is mediated by the A system. This hormonal stimulation was modified by the presence of the ion vanadate. With low concentrations of  $10^{-6}$  and  $10^{-5}$  M, insulin action was inhibited in the rat adrenal, whereas in the cow adrenal cortex it was reduced only slightly at these concentrations. With  $10^{-4}$  and  $10^{-3}$  M vanadate there was complete inhibition of the cow adrenal. The effect of vanadate is probably due to the binding of the  $\text{VO}_3^-$  ion to  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, slowing the  $\text{E}_2\text{-E}_1$  conformational change, and so diminishing enzyme activity [7].

The specific inhibition of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPases by ouabain (1 mM) in the adrenal of cows produced a strong decrease in basal amino acid transport and total inhibition of the stimulatory action of insulin.

The actions of vanadate and ouabain on the basal and insulin-stimulated amino acid transport showed qualitative and quantitative differences. The differences in action of these drugs has already been described with regard to insulin secretion by normal mouse pancreatic islets [8].

Vanadate has a number of different effects in many tissues. A high concentration of  $\text{VO}_3^-$  ( $> 10^{-4}$  M) may inhibit (like ouabain) or stimulate (like insulin) the uptake of  $\text{K}^+$  by heart muscle cells from various species, both types of actions being associated with a positive inotropic effect [4]. In the rat hepatocyte, vanadate inhibits protein degradation, an insulin-like effect, but also activates phosphorylase and inactivates glycogen synthetase – distinctly non-insulin-like effects [9].

The  $\text{Ca}^{2+}$  intracellular concentration is regulated by the  $\text{Ca}^{2+}$  efflux, which is mediated by the  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (inhibited by vanadate); and the  $\text{Ca}^{2+}$  influx, which is regulated by the voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels.

The inhibition of the voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels by verapamil interferes with the basal transport and nullifies the stimulatory action of insulin in the amino acid transport of bovine adrenal gland.

Therefore, an alteration in the  $\text{Ca}^{2+}$  intracellular equilibrium produced by  $\text{VO}_3^-$  cannot be dismissed as an alternative

explanation for the mechanism of action of vanadate on amino acid transport.

Vanadate stimulates amino acid transport by the A system in soleus muscle [10]. This stimulation has been ascribed to the increase in pH values produced by this ion.

In our experimental conditions the increased pH in the incubation medium produced by sodium hydroxide or vanadate was not followed by an increase in amino acid transport (Table 1).

The peculiarities of the A transport system for neutral amino acids in striated muscle need to be considered. The effect of insulin on amino acid transport in this tissue is characterised by its independence of the sodium electrochemical gradient [10].

In conclusion, vanadate interferes with the stimulatory action of insulin on amino acid transport activity in the adrenal glands of both rats and cows. This effect is probably mediated by a disturbance in Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. At the present time other effects of vanadate cannot be disregarded due to the elusive mechanism of action of the ion.

1. Fauth, M G , Barreto, K.P. and Wassermann, G F 1991 *Comp Biochem Physiol* , 93A (3/4), 513-515
2. Wassermann, G F , Fauth, M G and Machado, V L. A 1989 *Med Sci Res* , 17, 675-676
3. Duckworth, C W , Solomon, S S and Liepnieks, J 1988 *Endocrinology*, 122, 2285-2289
4. Nechay, R B 1984 *Ann. Rev Pharmacol Toxicol.*, 24, 501-524
5. Sokal, R R and Rohlf, S F (eds) 1969. In: *Biometrics*, pp 204-252, 299-342 WH, Freeman, and Company, San Francisco
6. Guidotti, G G , Borguetti, A C and Gazzola, G C. 1978. *Biochem. Biophys Acta*, 515, 329-366
7. Beaugé, L A and Dipolo, R 1979 *Biochem Biophys Acta*, 551, 220-223
8. Zang, A , Gao, Z Y , Guilon, P. *et al* 1991 *J Biol. Chem.*, 266, 21649-21656
9. Bosch, F , Arino, J., Gomes-Fraese, A.M. *et al* 1986. *J. Biol Chem* , 262, 1-2
10. Munoz, P , Palacia, M., Camps, M *et al*. 1992. *J. Biol Chem.*, 267, 10381-10388

The authors are indebted to Mrs Laura Leite for correcting the manuscripts. The bovine adrenals were a gift from the Frigorífico Lider, Viamão, RS, Brasil. This work was supported by grants from Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul, Pró-Reitoria de Pesquisa, UFRGS, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil, Financiadora e Estudos e Projetos, Brasil and CAPES, Ministério de Educação, Brasil

Reprint requests to: Dr Guillermo Federico Wassermann, Rua Sarmiento Leite, 500, CEP 90050-170 Porto Alegre, Brasil

Paper received 10th August, 1993; amended 22nd October, 1993.

# Ca<sup>2+</sup> channels and insulin action on amino acid uptake by bovine adrenal cortex

G.F. Wassermann<sup>1</sup>, K.P. Barreto<sup>1</sup> and M.G. Fauth<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Endocrinologia Experimental, Instituto de Biociências-UFRGS, <sup>2</sup>Instituto de Química PUCRS Porto-Alegre-RS, Brasil

**Keywords:** Adrenal cortex, insulin, amino acid transport, Ca<sup>2+</sup> channels.

**Introduction:** Insulin stimulates amino acid uptake in the cortex and glomerulosa zone at the bovine adrenal gland. This hormonal action occurs through the A system of amino acid transport, which is Na<sup>+</sup> and energy-dependent [1].

In Sertoli cells the stimulatory action of FSH on amino acid transport is related to voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels, particularly the T-type channels [2].

The aim of the present work was to investigate the role of Ca<sup>2+</sup> channels in the stimulatory action of insulin on amino acid transport in bovine adrenal cortex. Furthermore, the most appropriate pre-incubation and incubation times for the detection of this phenomenon were also investigated.

**Materials and methods:** Fresh bovine adrenal glands were obtained from a local slaughterhouse, trimmed clean of fat and connective tissue, perfused with standard medium Krebs-Ringer bicarbonate plus 0.2% glucose saturated with CO<sub>2</sub>: O<sub>2</sub> (5:95 v/v) at 4°C and transported, immersed in medium, to the laboratory as quickly as possible.

Crystalline bovine insulin was purchased from Biobrás, Montes Claros, Minas Gerais, Brazil. [1-<sup>14</sup>C] Methylaminoisobutyric acid ([<sup>14</sup>C] MeAIB) sp. act. 48.4 mCi mmol<sup>-1</sup>) was obtained from Du Pont, NEN Products, Boston, Mass., USA. Verapamil, nickel sulfate and cobalt chloride were purchased from the Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA.

Samples of 100 mg of the entire cortex (slices of 0.5 mm thick) were pre-incubated and incubated for different times (see Figure 1) in Krebs-Ringer bicarbonate buffer (KRB) in a Dubnoff metabolic incubator. The solution was maintained at pH 7.4 and 37°C and gassed with O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (95:5 v/v). At the beginning of the incubation 0.2 µCi [<sup>14</sup>C] MeAIB was added to the flasks. Insulin (1 IU) and Ca<sup>2+</sup> channel blockers, verapamil, Ni<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup> (see Figure 3 for concentrations) were added to the treated samples at the beginning of the pre-incubation period.

After incubation, samples were processed as previously reported [3]. Aliquots (25 µL) of the tissue fluid or incubation medium were taken to measure the radioactivity of [<sup>14</sup>C] MeAIB and counted in Aquasol 2 (Du Pont, NEN) in Rack Beta liquid scintillation spectrometer model 1215 (LKB-Produkter Ab, Bromma, Sweden).

The counting efficiency was 85-90%. The results were expressed as the tissue/medium (T/M) ratio: cpm mL<sup>-1</sup> tissue fluid per cpm/mL incubation medium. Results were compared using: one-way and two-way ANOVA. *Post-hoc* tests were carried out by Duncan's multiple range test whenever suitable [4].

**Results:** Figure 1 shows the various pre-incubation times tested at the beginning of the experiments. The optimum pre-incubation time was 90 min (1A) and the optimum incubation time was 120 min (1B). When incubation with

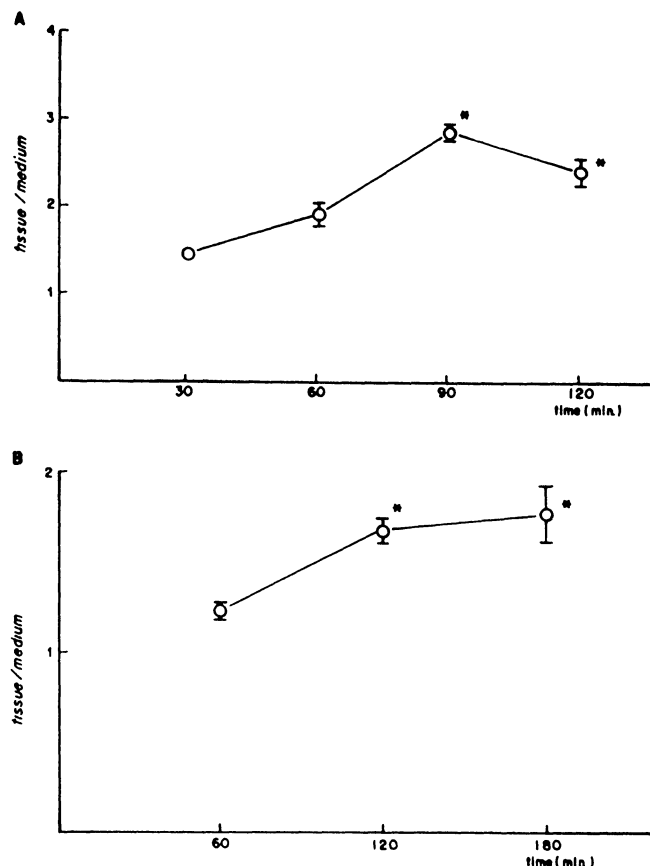


Figure 1: Influence of pre-incubation (A) and incubation (B) times on [<sup>14</sup>C] MeAIB uptake into bovine adrenal cortex slices. A: \*As compared to 30 min, p < 0.05. B: \*As compared to 60 min, p < 0.05 (one-way ANOVA).

insulin was preceded by pre-incubation without hormone, the action of the insulin was not detected (see Figure 2).

When calcium channels were blocked by competitive inhibition with Co<sup>2+</sup> (1, 2 × 10<sup>-9</sup>M), the stimulatory action of insulin on amino acid transport was abolished (see Figure 3).

Verapamil produced a dose-dependent decrease in both basal and insulin-stimulated amino acid uptake. A dose of a 1 × 10<sup>-4</sup>M verapamil nullified the stimulatory action of insulin on amino acid transport. The blockage of Ca<sup>2+</sup> channels sensitive to Ni<sup>2+</sup> produced a dose-dependent decrease in basal amino acid uptake and total inhibition of the insulin action (see Figure 3).

**Discussion:** Under our *in vitro* experimental conditions the insulin stimulation of [<sup>14</sup>C] MeAIB uptake in bovine adrenal cortex was a time-dependent phenomenon, for both pre-incubation and incubation periods (Figures 1A and 1B). When using a pre-incubation period free of exogenous insulin, no significant increase in [<sup>14</sup>C] MeAIB uptake was observed (Figure 2).



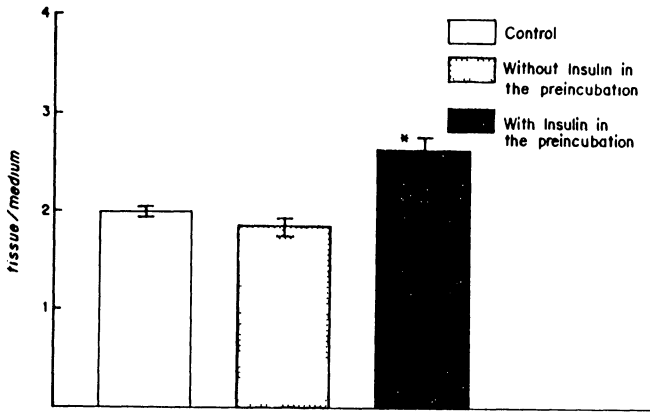


Figure 2: Effect of pre-incubation on the action of insulin on [ $^{14}\text{C}$ ] MeAIB uptake into bovine adrenal cortex slices.  
\*As compared to control,  $p < 0.05$  (one-way ANOVA).

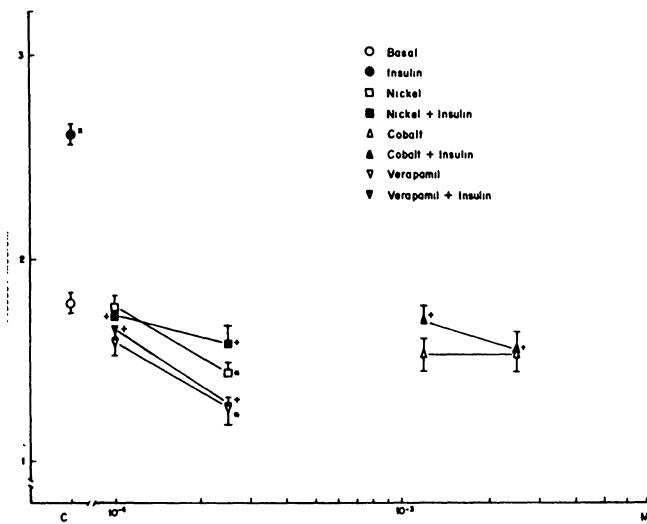


Figure 3: Inhibition of basal and insulin-stimulated [ $^{14}\text{C}$ ] MeAIB uptake by  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocking agents.  
\*As compared to basal,  $p < 0.05$ . +As compared to insulin,  $p < 0.05$  (two-way ANOVA).

The blockage of  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the bovine adrenal cortex cells either by  $\text{Co}^{2+}$  ( $1.2 \times 10^{-9}\text{M}$ ), verapamil ( $1 \times 10^{-4}\text{M}$ ) or  $\text{Ni}^{2+}$  ( $1 \times 10^{-4}\text{M}$ ) nullified the stimulatory action of insulin on the [ $^{14}\text{C}$ ] MeAIB uptake (Figure 3).

The action of verapamil, a specific blocker of voltage-dependent calcium channels (VDCC) [5], indicates that

these channels are involved in the action of insulin on amino acid transport.

These data are in accordance with the results of Schiffrin *et al.* [6] who demonstrated the effect of verapamil on the response of isolated rat adrenal glomerulosa cells to angiotensin II. Also they are in agreement with the data of Loss and Wassermann [7], which described the blocking effect of verapamil on FSH action on amino acid uptake in rat Sertoli cell enriched testes.

According to Spedding and Paoletti [8],  $\text{Ni}^{2+}$  has some selectivity to T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels as compared with  $\text{Cd}^{2+}$ . Since there is no highly selective blocker for T-channels,  $\text{Ni}^{2+}$  is usually used as a specific blocker of the T-type VDCC.

Suzuki *et al.* [9] reported that  $\text{Ni}^{2+}$  ( $1 \times 10^{-4}\text{M}$ ) blocked T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels and suppressed the TRH-induced sustained [ $\text{Ca}^{2+}$ ] increase in GH3 single cell.

Wasserman *et al.* [2] reported that the blocking of the T-type  $\text{Ca}^{2+}$  nullified the stimulatory action of FSH on amino acid transport in Sertoli cell enriched testes of rats.

Inhibition of the T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels with  $\text{Ni}^{2+}$  in the present paper caused a dose-dependent decrease in basal amino acid uptake and a total inhibition of the stimulatory action of insulin on [ $^{14}\text{C}$ ] MeAIB transport in bovine adrenal cortex.

In summary, insulin stimulates amino acid transport in bovine adrenal cortex cells by a mechanism associated with the VDCC, particularly the T-type.

1. Fauth, M.G., Barreto, K.P. and Wassermann, G.F. 1991. *Comp. Biochem Physiol.*, 93A 3/4, 513–515
2. Wassermann, G.F., Monti Bloch, L., Grillo, M.L. *et al.* 1992. *Horm. Metabol. Res.*, 24, 276–279
3. Cruz Curte, A. and Wassermann, G.F. 1985. *Endocrinology*, 106, 291–294
4. Sokal, R.R. and Rohlf, S.F. (eds) 1969. In: *Biometrics*, pp. 204–252, 299–342. W.H. Freeman & Co., San Francisco
5. Godfraind, J., Miller, R. and Wibo, M. 1986. *Pharmacol. Rev.*, 38, 321–416
6. Schiffrin, E.L., Lis, M. and Gutkowska, J. *et al.* 1981. *Am. J. Physiol.*, 245, E42–E46
7. Loss, E.S. and Wassermann, G.F. 1989. *Med. Sci. Res.*, 17, 779–780
8. Spedding, M. and Paoletti, R. 1992. *Pharmacol. Rev.*, 44, 3, 363–376
9. Suzuki, N., Kudo, Y., Takagi, H. *et al.* 1990. *J. Cell Physiol.*, 144, 62–68

The bovine adrenals were a gift from the Frigorífico Lider, Viamão, RS, Brasil. This work was supported in part by Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul, Pró-Reitoria de Pesquisa-UFRGS, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-Brasil, Financiadora de Estudos e Projetos-Brasil and CAPES-Ministério de Educação-Brasil.

Reprint requests to: Dr Guillermo Federico Wassermann, Rua Sarmento Leite, 500 CEP: 90050-170 Porto Alegre, RS Brazil.

Paper received: 21st April, 1994; amended 26th May, 1994.

## **VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- AGUILERA, G.; CATT, K. J. Participation of voltage-dependent calcium channels in the regulation of adrenal glomerulosa function by angiotensin II and potassium. **Endocrinology**, Baltimore, v.118, p. 112-118, 1986.
- AKEDO, H.; CHRISTENSEN, H. N. Nature of insulin action on amino acid uptake by the isolated diaphragm. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 237, n. 1, p. 118-122, Jan. 1962.
- ASCHER, P.; NOWAK, L. Calcium permeability of the channels activated by N-methyl-D-aspartate (NMDA) in isolated mouse central neurones. **The Journal of Physiology London**, Cambridge, v. 377, p. 47, Aug. 1986.
- BALOCCO, C.; BOGÉ, G.; ROCHE, H. Neutral amino acid transport by marine fish intestine: role of the side chain. **Journal of Comparative Physiology B**, Heidelberg, v. 163, n. 4, p. 340-347, July 1993.
- BANNAI, S.; KITAMURA, E. Transport interaction of L-cystine and L-glutamate in human diploid fibroblast in culture. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 255, n. 6, p. 2372-2376, Mar. 1980.
- BEAN, B. P.; STUREK, M.; PUGA, A. et al. Calcium channels in muscle cells isolated from rat arteries: modulation dihydropyridine drugs. **Circulation Research**, Dallas, v. 59, n. 2, p. 229-235, 1986.
- BENHAM, C. D.; TSIEN, R. W. A novel receptor-operated  $Ca^{2+}$  permeable activated by ATP in smooth muscle. **Nature**, London, v. 328, n. 6127, p. 275-278, July 1987.
- BEST and TAYLOR. In: **As Bases Fisiológicas da Prática Médica** 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1989, Cap.54, p. 714-727.
- \_\_\_\_\_. In: **As Bases Fisiológicas da Prática Médica** 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1989, Cap. 51, p.684-692.

- BIANCO, A. C. Introdução à Fisiologia endócrina. In: Margarida de Mello Aires (org.). **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991, Cap.55, p. 651-678.
- BIGORNIA, L.; BIHLER, I. 3-O-Methyl-D-glucose uptake in isolated bovine adrenal chromaffin cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 885, p. 335-344, 1986.
- BIRON, R.; BURGER, A.; CLINET, A. et al. Thyroid hormone and the energetics of active sodium-potassium transport in mammalian skeletal muscles. **The Journal of Physiology London**, Cambridge, v. 297, p. 47-60, Dec. 1979.
- BKAILY, G.; SPERELAKIS, N. Injection of protein inhibitor into cultured heart cells blocks calcium slow channels. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 246, p. H-630 H-634, 1984.
- BLACK, V. H.; ROBBINS, E.; McNAMARA, N.; HUIIMA, T. A correlated thin-section and freeze-fracture analysis of guinea pig adrenocortical cells. **American Journal of Anatomy**, Philadelphia, v. 156, n. 4, p. 453-504, Dec. 1979.
- BOGÉ, G.; RIGAL, A. A chloride requirement for Na - dependent amino acid transport by brush border membrane vesicles isolated from the intestine of a mediterranean teleost (*Boops salpa*). **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 649, n. 2, p. 455-461, Dec. 1981.
- BOGÉ, G.; RIGAL, A.; PÉRÈS, G. Analysis of two chloride requirement for Na<sup>+</sup>- dependent glucose and amino acid transport by intestinal brush border membrane vesicles of fish. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 729, n. 2, p. 209-218, Apr. 1983.
- BOGÉ, G.; ROCHE, H.; PÉRÈS, G. Role of chloride ions glycine transport in a sea fish the bass (*Dicentrarchus labrax*). **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 820, n. 1, p. 122-130, Oct. 1985.
- BOLTON, T. B. Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 59, n. 3, p. 606-718, July 1979.
- BORLE, A. B. Control, modulation and regulation of cell calcium. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, Berlin, v. 90, p. 13-153, 1981.

- BRICHARD, S. M.; BAILEY, J. C.; HENQUIN, J. C. Marked improvement of glucose homeostasis in diabetic ob/ob mice given oral vanadate. **Diabetes**, Alexandria, v. 39, n. 11, p.1326-1332, Nov. 1990.
- BRICHARD, S. M.; POTTIER, A. M.; HENQUIN, J. C. Long term improvement of glucose homeostasis by vanadate in obese hyperinsulinemic fa/fa rats. **Endocrinology**, Baltimore, v. 125, n. 5, p. 2510-2516, Nov. 1989.
- BROWN, J. H.; BROWN S. L. Agonists differentiate muscarinic receptors that inhibit cyclic AMP formation from those that stimulate phosphoinositide metabolism. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 259, n. 6, p. 3777-3781, Mar. 1984.
- BUSSOLATI, O.; LARIS, P. C.; LONGO, N. et al. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 854, n. 3, p. 240-250, 1986.
- BUSSOLATI, O.; LARIS, P. C.; ROTOLI, B. M. et al. Transport system ASC for neutral amino acid. An electroneutral sodium amino acid cotransport sensitive to the membrane potential. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 267, n. 12, p. 8330-8335, Apr. 1992.
- CANTLEY JR., L. C.; JOSEPHSON, L.; WARNER, R. et al. Vanadate is a potent (Na, K)-ATPase inhibitor found in ATP derived from muscle. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 252, n. 21, p. 7421-7423, Nov. 1977.
- CAPPONI, A. M.; LEW, P. D. ; JORNOT, L. et al. Correlation between cytosolic free Ca<sup>2+</sup> and aldosterone production in bovine adrenal glomerulosa cells. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 259, n. 14, p. 8863-8869, 1984.
- CARAFOLI, E. Calcium channels: Molecular pharmacology, structure and regulation. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 56, p. 395-433, 1987.
- CARPENTER, G. Vanadate epidermal growth factor and the stimulation of DNA synthesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Duluth, v. 102, p. 1115-1121, 1981.
- CATT, K. J. Molecular mechanisms of hormonal action: Control of target cell function by peptide, steroid, and

- thyroid hormones. In: FELIG, P.; BAXTER, J.D.; BROADUS, A.E.; FROHMAN, L.A. **Endocrinology and metabolism**, 2<sup>o</sup> ed., McGraw-Hill Book Company, 1987, Cap.5, p.82-165.
- CHEATHAM, B.; KAHN, C. R. Cysteine 647 in the insulin receptor is required for normal covalent interaction between  $\alpha$  and  $\beta$  subunits and signal transduction. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 267, n. 10, p. 7108-7115, Apr. 1992.
- CHEITLIN, R.; BUCKLEY, D. I.; RAMACHANDRAN, J. The role of extracellular calcium in corticotropin - stimulated steroidogenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 260, p. 5323, 1985.
- CHRISTENSEN, H. N. Organic ion transport during seven decades. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 779, n. 3, p. 255-269, Sept. 1984.
- CHRISTENSEN, H. N. Some transport lessons taught by the organic solute. **Perspectives in Biology and Medicine**, Chicago, v. 10, p. 471-494, 1967.
- CHRISTENSEN, H. N.; HANDLOGTEN, M. E. Role of system Gly in glycine transport in monolayer cultures of liver cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Duluth, v. 98, N. 1, p. 102-107, Jan. 1981.
- COHEN, C. J.; MCCARTHY, R. T.; BARRET, P. Q. et al.  $Ca^{2+}$  channels in adrenal glomerulosa cells:  $K^+$  and angiotensin II increase T-type Ca channel current. **Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.**, Washington, v. 85, p. 2412-2416, 1988.
- CRUZ CURTE, A.; WASSERMANN, G. F. Identificacion of amino acid transport systems stumulated by FSH in rat testes. **The Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 106, n. 3, p. 291-294, Sept. 1985.
- CUATRECASAS, P.; DESBUQUOIS, B.; KRUG, F. Insulin-receptor interactions in liver cell membranes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Dututh v. 44, p. 333-339, 1971.
- CZECH, M.P. The nature and regulation of the insulin receptor: structure and function. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 47, p. 357-381, 1985.

- DALL'ASTA, V.; BUSSOLATI, O.; GUIDOTTI, G. G.; et al. Energization of amino acid uptake by system A in cultured human fibroblasts. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 266, n. 3, p. 1591-1596, Jan. 1991.
- DELICADO, E. G.; MIRAS PORTUGAL, M. T. Glucose transporters in isolated chromaffin cells. **Biochemical Journal**, London, v. 243, n. 2, p. 541-547, Apr. 1987.
- DEMEYTS, P.; GU, J. R.; SHYMKO, R. M. et al. **Mol. Endocrinology**, Baltimore, v. 4, p. 409-416, 1990.
- DUCKWORTH, W. C.; SOLOMON, S. S.; LIEPNIEKS, J. et al. Insulin-like effects of vanadate in isolated rat adipocytes. **Endocrinology**, Baltimore, v. 122, n. 5, p. 2285-2289, May, 1988.
- DURROUX, T.; GALLO-PAYET, N.; PAYET, MD. Three components of the calcium current in cultured glomerulosa cells from rat adrenal gland. **Journal of Physiology**, Cambridge, v. 404, p. 713, 1988.
- ELSAS, L. J.; WHEELER, F. B.; DANNER, D. J. et al. Amino acid transport by aggregates of cultured chicken heart cells. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 250, n. 24, p. 9381-9390, Dec. 1975.
- ENJALBERT, A.; SLADACEK, F.; GUILLON, G. et al. Angiotensin II and dopamine modulate both cAMP and inositol phosphate production in anterior pituitary cells. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 261, p. 4071-4075, 1986.
- ERIKSON, J. W.; LONNROTH, P.; SMITH, U. Vanadate increases cell surface insulin binding and improves insulin sensitivity in both normal and insulin-resistant rat adipocytes. **Diabetologia**, Heidelberg, v. 35, n. 6, p. 510-516, June, 1992.
- FEHLMANN, M.; LE CAM, A.; FREYCHET, P. Insulin and glucagon stimulation of amino acid transport in isolated rat hepatocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 254, n. 20, p. 10431-10437, Oct. 1979.
- FLECKENSTEIN, A. apud SPEDDING, M.; PAOLETTI, R. Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying channels function

- pharmacology. **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v. 44, n. 3, p. 363-376, 1992.
- FLOCKERZI, V.; OEKEN, H. J.; HOFMAN, F. et al. Purified dihydropyridine-binding site from skeletal muscle T tubules is a functional calcium channel. **Nature**, London, v. 323, n. 6083, p. 66-68, Sept. 1986.
- FUKUSHIMA, Y.; HAGIWARA, S. Currents carried by monovalent cations through calcium channels in neoplastic B lymphocytes. **Journal of Physiology**, Cambridge, v. 358, p. 255-284, 1985.
- GALIZZI, J. P.; BORSOTTO, M.; BARHANIN, J. et al. Characterization and photoaffinity labeling of receptor sites for the  $Ca^{2+}$  channel inhibitors d-cis-Diltiazem, (=/-) Bepridil, Desmethoxy-verapamil and (+)PN 200-100 in skeletal muscle transverse tubule membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 261, n. 3, p. 1393-1397, Jan. 1986-a.
- GAZZOLA, G. C.; DALL'ASTA, V.; GUIDOTTI, G. G. Adaptive regulation of amino acid transport in cultured human fibroblasts. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 256, N. 7, P. 3191-3198, Apr. 1981.
- \_\_\_\_\_. The transport of neutral amino acid in cultured human fibroblasts. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 255, n. 3, p. 929-936, Feb. 1980.
- GETTY, R. **Anatomia dos animais domésticos**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1981.
- GIL, J. et al. Insulin-like effects of vanadate on glucokinase activity and fructose 2,6-bisphosphate levels in the liver of diabetic rats. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 263, n. 4, p. 1868-1871, Feb. 1988.
- GIMBLE, G. M.; WAISMAN, D. M.; GUITIN, M. et al. Studies of the  $Ca^{2+}$  transport mechanism of human erythrocyte inside-out membrane vesicles. Evidence of the development of the positive interior membrane potential. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 257, n. 18, p. 10781-10788, Sept. 1982.

- GODFRAIND, T.; MILLER, R., WIBO, M. Calcium antagonism and calcium entry blockade. **Pharmacological Review**, Baltimore, v. 38, n. 4, p. 321-416, Dec. 1986.
- GOLDFINE, I. A. The insulin receptor: Molecular biology and transmembrane signaling. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v. 8, n. 3, p. 235-255, Aug. 1987.
- GOLDFINE, I. D. Interaction of insulin, polypeptide hormones, and factors with intracellular membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 650, n. 1, p. 53-67, June 1981.
- GOLL, A.; FERRY, D. R.; GLOSSMANN, H. Target size analysis of skeletal muscle  $Ca^{2+}$  channels. **Febs Letters**, Amsterdam, v. 157, n. 1, p. 63-69, June 1983.
- GOODMAN, R. L. et al. In: **Fisiologia Endócrina Clínica**, 1. ed. Rio de Janeiro: Interlivros, 1988. Cap. 1, p. 3-32.
- \_\_\_\_\_. In: **Fisiologia Endócrina Clínica**, 1. ed. Rio de Janeiro: Interlivros, 1988. Cap. 12, p. 249-278.
- GREEN, A. The insulin-like effect of sodium vanadate on adipocyte glucose transport is mediated at a post insulin-receptor level. **Biochemical Journal**, London, v. 238, n. 3, p. 663-669, Sept. 1986.
- GRIMA, M.; SCHATZ, J.; SPACH, M. O. et al. Antianginal arylalkilamines and sodium channels: [H]-batrachotoxin-A 20 alphabenzate and [H]-tetracaine binding. **British Journal of Pharmacology**, [London], v. 89, p. 641-646, 1986.
- GUIDOTTI, G. G.; BORGHETTI, A. F.; GAZZOLA, G. C. et al. Insulin regulation of amino acid transport in mesenchymal cells from avian and mammalian tissues. **The Biochemical Journal**, London, v. 160, n. 2, p. 281-286, Nov. 1976.
- GUIDOTTI, G. G.; BORGHETTI, A. F.; GAZZOLA, G. C. The regulation of amino acid transport in animal cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 515, n. 4, p. 329-366, [Nov.?] 1978.
- GUMÁ, A.; TESTAR, X.; PALACÍN, M. et al. Insulin-stimulated  $\alpha$ -(methyl)aminoisobutyric acid uptake in skeletal muscle. **The Biochemical Journal**, London, v. 253, n. 3, p. 625-629, Aug. 1988.



- HAENSLER, G. Differential effect of verapamil on excitation - contraction coupling in smooth muscle and on excitation-secretion coupling in adrenergic nerve terminals. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 180, n. 3, p. 672-682, Mar. 1972.
- HALL, PF.; OSAWA, S.; THOMASON, CL. A role for calmodulin in the regulation of steroidogenesis. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 90, p. 402, 1981.
- HANDLOGTEN, M. E.; KILBERG, M. S.; CHRISTENSEN, H. N. Incomplete correspondence between repressive and substrate action by amino acid on transport systems A and N in monolayer rat hepatocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 257, n. 1, p. 345-348, Jan. 1982.
- HEINZ, L. J.; DURBIN, R. P. Studies of chloride transport in the gastric mucosa of the frog. **Journal of General Physiology**, New York, v. 41, n. 1, p. 101-117, Sept. 1957.
- HESCHELER, J.; ROSENTHAL, W.; HINSCH, K.; Angiotensin II induced stimulation of voltage-dependent  $Ca^{2+}$  current in an adrenocortical cell line. **EMBO Journal**, Eynsham, v. 7, p. 619-624, 1988.
- HEYLIGER, C. E.; TAHILIANI, A. G.; MCNEILL, J. H. Effect of vanadate on elevated blood glucose and depressed cardiac performance of diabetic rats. **Science**, Washington, v. 227, n. 4693, p. 1474-1477, Mar. 1985.
- HILLMAN, D.; CHEN, S.; AUNG, T. T. et al. Localisation of P-type calcium channels in the central nervous system. **Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.**, Washington, v. 88, n. 16, p. 7076-7080, Aug. 1991.
- HIRNING, L. D.; McCLESKEY, E. W.; OLIVERA, B. M. et al. Dominant role of N-type  $Ca^{2+}$  channels in evoked release of norepinephrine from sympathetic neurons. **Science**, v. 239, p. 57-60, 1988.
- HOSEY, M. M.; LAZDUNSKI, M. Calcium channels: Molecular pharmacology, structure and regulation. **Journal of Membrane Biology**, New York, v. 104, p. 81-105, 1988.

- IRWIN, B.; KAEZMAREK, K. Receptors and transduction mechanisms II. Indirectly coupled receptor/ions channel systems. In: **The Neuron**, 1<sup>st</sup> ed., Oxford: Oxford University Press, 1991, p. 219-245.
- ITO, Y.; YASUDA, K.; TAKEDA, N. Characterization of insulin receptors in bovine adrenal cortex and medulla. **Endocrinologica Japonica**, Tokyo, v. 39, n. 2, p. 217-222, Apr. 1992.
- JACOBS, S.; KULL JR, F.C.; EARP, H.S. et al. Somatomedin-C stimulates the phosphorylation of the  $\beta$ -subunit of its own receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 258, n. 14, p. 8581, July 1983.
- KADOTA, S.; FANTUS, G.; DERAGNON, G. et al. Peroxide(s) of vanadium: a novel and potent insulin-mimetic agent which activates the insulin receptor kinase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Duluth, n. 147, p. 259, 1987.
- KAHN, C. R.; WHITE, M. F.; SHOELSEN, S. E. et al. The insulin receptor and its substrate: Molecular determinants of early events in insulin action. **Recent Progress in Hormone Research**, Orlando, v. 48, p. 291-339, 1993.
- KILBERG, M. S.; HANDLOGTEN, M. E.; CHRISTENSEN, H. N. Characteristics of an amino acid transport system in rat liver for glutamine, asparagine, histidine and closely related analogs. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 255, n. 9, p. 4011-4019, May 1980.
- KOJIMA, I.; KOJIMA, K.; RASMUSSEN, H. Characteristics of angiotensin II,  $K^+$  and ACTH induced calcium influx in adrenal glomerulosa cells. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 260, N. 16 p. 9171, Aug. 1985.
- KOJIMA, I.; OGATA, E. Direct demonstration of adrenocorticotropin-induced changes in cytoplasmic free calcium with aequorin in adrenal glomerulosa cells. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 261, p. 9832, 1986.
- KOJIMA, I.; SHIBATA, H.; OGATA, E. Pertussis toxin blocks angiotensin II-induced calcium influx but not inositol triphosphate production in adrenal glomerulosa cell. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 204, p. 347-351, 1986.

- KOJIMA, K.; KOJIMA, I.; RASMUSSEN, H. Dihydropyridine calcium agonist and antagonist effects on aldosterone secretion. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 247, p. E645-E650, 1984.
- LANSMAN, J. B. Blockade of current through single calcium channels by trivalent lanthanide cations. Effect of ionic radius on the rates of ion entry and exit. **Journal of General Physiology**, New York, v. 95, p. 679-696, 1990.
- LANSMAN, L. B.; HESS, P.; TSIEN R. W. Blockade of current through single calcium channels by Cd, Mg and Ca. Voltage and concentration dependence of calcium entry into the pore. **Journal of General Physiology**, New York, v. 88, p. 321-347, 1986.
- LAST, T. A.; GANTZER, M. L.; TYLER, C. D. Ion-gated channel induced in planar bilayers by incorporation of (Na,K)-ATPase. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 258, n. 4, p. 2399-2404, Feb. 1983.
- LE CAM, A.; FREYCHET, P. Neutral amino acid transport. Characterization on the A and L systems in isolated rat hepatocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 252, n. 1, p. 148-156, Jan. 1977.
- LEONARD, J. P.; NARGEOT, J.; SMUTCH, T.P. et al. Ca channels induced in Xenopus oocytes by rat brain mRNA. **The Journal of Neuroscience**, New York, v. 7, p. 875-881, 1987.
- LERNER, J. Review of amino acid transport process in animal cells and tissues. **University of Maine at Orono Press**, Orono, 1978.
- LEVITAN, I. B.; KAEZMAREK, K. In: **The Neuron**. ed. Oxford: Oxford University Press, 1991. Cap. 10, p. 219-245.
- LI, Z.; PARK, D.; LA BELLA, F. S. Adrenocorticotropin (1-10) and (11-24) promote adrenal steroidogenesis by different mechanisms. **Endocrinology**, Baltimore, v. 125, p. 592, 1989.

- LIENHARD, G. E. Regulation of cellular membrane transport by the exocytotic ansertion and endocytic retrieval of transporters. **Trends in Biochemistry Science**, v. 8, n. 4, p. 125-227, Apr. 1983.
- LIN, J. W.; RUDY, B.; LLINAS, R. Funnel-web spider venom and a toxin fraction block calcium current expressed from rat brain mRNA in *Xenopus* oocytes. **Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.**, Washington, v. 87, n. 12, p. 4538-4542, June 1990.
- LLINAS, R. R.; SUGIMORI, M.; CHERKSEY, B. Voltage-dependent calcium condutances in mammalian neurons: The P channel. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 560, p. 103-111, 1989-b.
- LONGO, N.; FRANCHI-GAZZOLA, R.; BUSSOLATI, O. et al. Effect of insulin on the activity of amino acid transport systems in cultured human fibroblasts. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 844, n. 2, p. 216-223, Feb. 1985.
- LOUTZENHISER, R.; VAN BREEMAN, C. The mechanism of activation of isolated rabbit aorta by the PGH2 analogue V 44069. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 241, n. 3, p. C 243-C 249, Nov. 1992.
- MACHADO, V. L. A.; SILVA, R. S. M.; MARQUES, M. et al. Insulin specific uptake and action on deoxiglucose transport in adrenal glands. **IRCS Medical Science**, n.10, p.459-460, 1982.
- MACHADO, V. L. A.; WASSERMANN, G. F.; MARQUES, M. *In vitro* effect of insulin on the uptake of glucose and  $\alpha$ -aminoisobutyric acid in thyroid gland of the turtle (*Chrysemys dorbigni*). **General and Comparative Endocrinology**, Duluth, v.82, n. 1, p. 8-13, Apr. 1991.
- MARTIN, R. B. Nickel ion binding to amino acid and peptides. In **Metal Ions in Biological Systems**. V. 23. Ni-ckel and Its Role in Biology. H. Sigel (ed) Marcel Dekker Inc., New York. 123-164, 1988.
- MATTHEWS, E. K. Membrane potential measurements in cells of adrenal gland. **The Journal of Physiology**, Cambridge, v. 189, n.1, p. 139-148, Mar. 1967.

- McDONALD, L. E. **Reproducción y endocrinología veterinarias**, 2ª ed. México, Interamericana, 1978. p. 125-173.
- McDONALD, R. A.; GELEHRTER, T. D. Glicocorticoid inhibition of amino acid transport in rat hepatoma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Dututh v. 78, p. 1304-1310, 1977.
- MEANS, A. R.; DEDMAN, J. R. Calmodulin an intracelular calcium receptor. **Nature**, London, v. 285, n. 5760, p. 73-77, May 1980.
- MERTZ, W. The newer essencial trace elements, chomium, tin, vanadium, nikel and silicon. **Proceedigs of the Nutrition Society**, Cambridge, v. 33, p. 307-313, 1974.
- MEYEROVITCH, J. et al. Oral administration of vanadate normalizes blood glucose levels in streptozotocin-treated rats. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 262, n. 14, p. 6658-6662, Apr.1987.
- MIGLIORINI, R. H. As glândulas adrenais In: Margarida de Mello Aires(Org.) **Fisiologia**, 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991, Cap.59, p. 706-715.
- MILLER, R. J. Multiple calcium channels and neuronal function. **Science**, Washington, v. 235, n. 4784, p. 46-52, Jan. 1987-a.
- MIRALPEIX et al. Oral administration of vanadate to diabetic rats restores liver 6-phosphofructo-2-kinase contents and mRNA. **Diabetologia**, Heidelberg, v. 35, n. 3, p. 243-348, Mar. 1992.
- MIRALPEIX, M. et al. Vanadate induction of L-type pyruvate kinase mRNA in adult rat hepatocytes in primary culture. **Diabetes**, Alexandria, v. 40, n. 4, p. 462-464, Apr. 1991.
- MORI, Y.; FRIEDRICH, T.; KIM, M. S. et alli. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel. **Nature**, London, v. 350, n. 6317, p. 398-402, Apr. 1991.
- MORI, Y.; NIIDOME, T.; FUJITA, Y. et al. Molecular diversity of voltage-dependent calcium channel. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 707, p.87-108, Dec. 1993.

- MUNCK, L.; MUNCK, B. G. Chloride-dependence of amino acid transport in rabbit ileum. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1027, p. 17-20, 1990.
- MUÑOZ, P.; GUMÀ, A.; CAMPS, M. et al. Vanadate stimulates system A amino acid transport activity in skeletal muscle. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 267, n. 15, p. 10381-10388, May 1992.
- MURPHY, K. M. M.; GOULD, R.J.; LARGENT, B. L. et al. A unitary mechanism of calcium antagonist drug action. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, Washington, v.80, n. 3, p. 860-864, Feb. 1983.
- NACHSEN, D. Selectivity of the Ca binding site in synaptosome Ca channels. **Journal of General Physiology**, **83**: 941-967, 1984.
- NADZIEJKO, C. E., REICHBERG, S. B. Inhibition of sodium-independent amino acid transport by dexamethasone in rat hepatoma cells. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 259, n. 1, p. 394-398, Jan. 1984.
- NARAHASHI, T.; TSUNNO, YOSHII, M. Characterization of types of calcium channels in mouse neuroblastoma cells. **Journal of Physiology**, **383**: 231-249, 1987.
- NECHAY, B. R. Mechanisms of action of Vanadium. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 24, p. 501-524, 1984.
- NIGGLI, V.; SIGEL, E.; CARAFOLI, E. The purified  $\text{Ca}^{2+}$  pump of human erythrocyte membranes catalyzes and electroneutral  $\text{Ca}^{2+}$ -H<sup>+</sup>-exchange in reconstituted liposomal systems. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 257, n. 5, p. 2350-2356, Mar. 1982.
- OLEFSKI, J. M.; JEN, P.; REAVEN, G. M. Insulin binding to isolated human adipocytes. **Diabetes**, Alexandria, v. 23, n. 7, p. 565-571, July 1974.
- ORTH, N. D.; KOVACS, J. W.; DEBOLD, C. R., The Adrenal Cortex. In: **Williams Textbook of Endocrinology**. 8<sup>a</sup> ed., Philadelphia: Saunders, 1992. p. 489-619.
- OSTERIEDER, W.; BRUM, G.; HESCHELER, J. et al. Injection of subunits of cyclic AMP-dependent protein kinase into cardiac myocytes modulates  $\text{Ca}^{2+}$  current. **Nature**, London, v. 298, n. 5874, p. 576-578, Aug. 1982.

- PAYET, D.M.; BENABDERRAIK; GALLO-PAYET, N. Excitation-secretion coupling: Ionic currents in glomerulosa cells: Effects of adrenocorticotropin and K<sup>+</sup> channels blockers. **Endocrinology**, Baltimore, v. 121, n. 3, p. 875-882, Sept. 1987.
- PENHOAT, A.; CHATELAIN, P. G.; JAILLARD C. et al. Characterization of insulin-like growth factor I and insulin receptors on cultured bovine adrenal fasciculata cells. Role of these peptides on adrenal cell function. **Endocrinology**, Baltimore, v. 122, n. 6, p. 2518-2526, June 1988.
- PILKIS, S. J.; EL-MAGHRABI, M. R. Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. **Annual Reviews of Biochemistry**, Palo Alto, v. 57, p. 755-783, 1988.
- PIRAS, M. M.; BINDSTEIN, E.; PIRAS, R. Regulation of glycogen metabolism in the adrenal gland.IV. The effect of insulin on glycogen synthetase, phosphorilase and related metabolites. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Duluth, v. 154, n. 1, p. 263-269, Jan. 1973.
- POPESKO, P. **Atlas de Anatomia Topográfica dos Animais Domésticos**. V.II, São Paulo, Editora Manole, 1985, p. 61.
- PRENTKI, M.; CRETTEZ, M.; JEANRENAUD, B. Role of microtubules in insulin and glucagon stimulation of amino acid transport in isolated rat hepatocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 256, n. 9, p. 4336-4340, May 1981.
- PTASIENSKI, J.; McMAHON, K. K.; HOSEY, M. M. High and low affinity states of the dihydropyridine and phenylalkylamine receptors on the cardiac calcium channel and their interconversion by divalent cations. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Dututh, v. 129, n. 3, p. 910-917, June 1985.
- RAFAELOFF, R.; PATEL, P.; YIP, C. et al. Mutation of the high cysteine region of the human insulin receptor  $\alpha$  subunit increases insulin receptor binding affinity and transmembrane signaling. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 264, n. 27, p. 15900-15904, Sept. 1989.

- RASMUSSEN, H.; BARRET, P. Q. Calcium messenger system: An integrated view. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 64, n. 3, p. 938-984, July 1984.
- RAWN, J. D. In: **Biochemistry**, North Carolina: Neil Patterson Publishers, 1989. Cap. 15, p. 385-420.
- RAWN, J.D. In: **Biochemistry**, North Carolina, Neil Patterson Publishers 1989. Cap.31, p. 1023-1048.
- REGAN, L. J.; SAH, B. W. Y.; BEAN, B. P.  $Ca^{2+}$  channels in rat central and peripheral neurons: high threshold current resistant to dihydropyridine blockers and W-conotoxin. **Neuron**, v. 6, p. 269-280, 1991.
- REUTER, H. Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs. **Nature**, London, v. 301, n. 5901, p. 569-574, Feb. 1983.
- RIGGS, T. R.; PAN, M. W. Transport of amino acids into the oestrogen-primed uterus. **The Biochemical Journal**, London, v. 128, n. 1. p. 19-27, June 1972.
- ROSENTHAL, W.; HESCHELER, J.; HINSCH, K. D. et al. Cyclic AMP independent dual regulation of voltage-dependent  $Ca^{2+}$  currents by LHRH and somatostatin in a pituitary cell line. **EMBO Journal**, Eynsham, v. 7, p. 1627-1633, 1988.
- SCHULTZ, G.; ROSENTHAL, W.; HESCHELER, J. Role of G protein in calcium channel modulation. **Annual Review of Physiology**, v. 52, p. 275-292, 1990.
- SCHULTZ, S. C.; CURRAN, P. F. Coupled transport of sodium and organic solutes. **Physical Reviews**, v.50, n.4, p. 637-718, 1970.
- SCHULZ, I. Messenger role of calcium in function of pancreatic acinar cells. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 239, n. 5, p. G335-G347, Nov. 1980.
- SEGAL, J.; Schwartz, H.; Gordon, A. The effect of triiodothyronine on 2-deoxy-D-[1- $^3H$ ] glucose in cultured chick embryo heart cells. **Endocrinology**, Baltimore, v.101, pg 143, 1977
- SHEPHERD, R. M.; FRASER, R.; KENYON, C. J. Membrane permeability to  $K^+$  and the control of aldosterone synthesis: effects of valinomycin and cromakalin in bovine adrenocortical cells. **Journal of Molecular**



- Endocrinology**, Baltimore, Bristol, V. 9, N. 2, P. 165-173, Oct. 1992.
- SHOTWELL, A. M.; MATTES, P. M.; JAYME, D. W. et al. Regulation of amino acid transport system L in chinese hamsters ovary cells. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 257, n. 6, p. 2974-2980, Mar. 1982.
- SIEGEL, G. Membrane transport: In **Basic Neurochemistry**. 4<sup>a</sup> ed. New York: Raven Press, 1989. p. 64-67.
- SIEMON, H.; SCHNEIDER, H.; FUHRMANN, G. F. Vanadium increases selective K-permeability in human erythrocytes. **Toxicology**, Limerick, v. 22, p. 271-278, 1982.
- SIMONIAN, M. H.; GILL, G. N. Regulation of deoxyribonucleic acid synthesis in bovine adrenocortical cells in culture. **Endocrinology**, Baltimore, v. 104, n. 3, p. 588-595, June 1979.
- SIMONIAN, M.H.; WHITE, M.L.; GILL, G.N. Growth and function of cultured bovine adrenocortical cells in a serum-free defined medium. **Endocrinology**, Baltimore, v. 111, n. 3, p. 919-927, Oct. 1982.
- SMALLWOOD, J.; WAISMAN, D. M.; LAFRENIERE, D. et al. Evidence that the erythrocyte calcium pump catalyzes a  $Ca^{2+}$  - H<sup>+</sup> - exchange. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 258, n. 18, p. 11092-11097, Sept. 1983.
- SMUTCH, T. P.; LEONARD, J. P.; GILBERT, M. M. et al. Rat brain expresses an heterogenous family of calcium channels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, Washington, v. 87, n. 9, p. 3391-3395, May 1990.
- SPEEDING, M.; PAOLETTI, R. Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying channels function pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 44, n. 3, p. 363-376, Sept. 1992 .
- TABARES, L.; LOPEZ-BARNEO, J. Calcium actions potentials in cultured adrenocortical cells. **Pflügers Archives**, Heidelberg, v. 407, p. 163, 1986.
- TAKADA, A., BANNAI, S. Transport of cystine in isolated rat hepatocytes in primary culture. **The Journal of**

- Biological Chemistry**, Baltimore, v. 259, n. 4, p. 2441-2445, Feb. 1984.
- TAMURA, S.; BROWN, T. A.; WHIPPLE, J. H. et al. A Novel Mechanism for the Insulin-like effects of vanadate on glycogen synthase in rat adipocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 259, n. 4, p. 6650-6658, May, 1984.
- TAN, K.; TASKJIAN, A. H. Jr. Receptor-mediated release of plasma membrane-associated calcium and stimulation of calcium uptake by thysotropic-releasing hormone in pituitary cells in culture. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 256, n. 17, p. 8994-9002, Sept. 1981.
- TSIEN, R. W.; LIPSCOMBE, D.; MADISON, D. V. et al. Multiple types of neuronal calcium channels and their sletive modulation. **Trends in Neurosciences**, Cambridge, v. 11, p. 431-437, 1988.
- TURIN, L.; WARNER, A. E. Intracellular pH in early Xenopus embryos: its effect on current flow between bastomeres. **The Journal of Physiology**, Cambridge, v. 300, p. 489-504, Mar. 1980.
- USADEL, H.; BORNSTEIN, S. R.; EHRHART-BORNSTEIN, M. et al. Gap junctions in the adrenal cortex. **Hormone Metabolic Research**, v. 25, n. 12, p. 653-654, Dec. 1993.
- VADGAMA, J. V.; CHRISTENSEN, H. N. Comparison of system N in fetal hepatocytes and in related cell lines. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 258, n. 10, p. 6422-6429, May 1983.
- VARECKA, L.; CARAFOLI, E. Vanadate-induced moviments of  $Ca^{2+}$  and  $K^{+}$  in human red blood cells. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 257, n. 13, p. 7414-7421, July, 1982.
- VIDAVER, G. A.; ROMAIN, L. F.; HAUROVITZ, F. Some studies on the specificity of amino acid entry routes in pige on erythrocytes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Duluth, v. 107, n. 1, p. 82-87, July 1964.
- WASSERMANN, G. F.; FAUTH, M. G.; MACHADO, V. L. A. Insulin action on amino acid uptake by rat adrenal glands in vitro. **Medical Science Research**, Kew, v. 17, p. 675-676, 1989-b.

- WASSERMANN, G. F.; MONTI BLOCH, L.; GRILLO, M. L. et al. Biochemical factors involved in the FSH action on amino acid transport in immature rat testes. **Hormone and metabolic Research**, Stuttgart, v. 24, n. 6, p. 276-279, June 1992 -a.
- \_\_\_\_\_. Electrophysiological changes of Sertoli cells produced by the acute administration of amino acid and FSH. **Hormone and Metabolic Research**, Stuttgart, v. 24, n. 7, p. 326-328, July 1992-b.
- WASSERMANN, G. F.; MONTI BLOCH, L.; McCONNELL, L. L. et al. FSH- induced rapid hyperpolarisation followed by a  $Ca^{2+}$  channel-mediated depolarization in rat Sertoli cells. **Medical Science Research**, Kew, v. 18, p. 175-176, 1990.
- WASSERMANN, G. F.; SILVA, F. R. M. B.; GRILLO, M. L. et al. Retinol stimulates amino acid transport in Sertoli cell by a  $Ca^{2+}$  related mechanism. **Medical Science Research**, Kew, v. 21, n. 11, p. 437-438, June 1993.
- WASSERMANN, G. F.; SILVA, F. R. M. B.; GRILLO, M. L. Role of microtubules and protein synthesis on the stimulatory action of FSH on amino acid uptake in rat testes. **Medical Science Research**, Kew, v. 17, p. 737-738, 1989-a.
- WHITE, M. F.; GAZZOLA, G. C.; CHRISTENSEN, H. N. Cationic amino acid transport into cultured animal cells. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 257, n. 8, p. 4443-4449, Apr. 1982.
- WILSON, S. P.; KIRSHNER, N. Effects of ascorbic acid, bexamethasone, and insulin on the catecholamine and opioid peptide stores of cultured adrenal medullary chromaffin cells. **Journal of Neuroscience**, New York, v. 3, p. 1971-1978, 1983.
- WINEGAR, B.; LANSMAN, J. B. Voltage-dependent block by zinc of single calcium channels in mouse myotubes. **Journal of Physiology** 425: 563-578, 1990.
- WINEGAR, D. B.; KELLY, R.; LANSMAN, J. B. Block of Current through Single Calcium Channels by Fe, Co, and Ni. **Journal of General Physiology**, 97: 351-367, 1991.
- WOODCOOK, E.; McLEOD, J. Adenylate cyclase inhibition is not involved in the adrenal steroidogenic response to angiotensin II. **Endocrinology**, Baltimore, v. 119, n. 4, p. 1697-1702, Oct. 1986.

- WOODHULL, A. Ionic blockage of sodium channels in nerve. **Journal of General Physiology**, New York **61**: 687-708, 1973.
- YADEN, Y.; ULLRICH, A. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 57, p. 443-478, 1988.
- YANAGIBASHI, K.; KAWAMURA, M.; PETER, F. H. Voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels are involved in regulation of steroid by bovine but not rat fasciculata cells. **Endocrinology**, v.127, n.1, p. 311-318, 1990.
- YATANI, A.; BROWN, A. M. Time course of  $Ca^{2+}$  current after a concentration jump of isoproterenol. **Science**, v. 245, p. 71-74, 1989.
- YATANI, A.; CODINA, J.; IMOTO, Y. et al. A G protein directly regulates mammalian cardiac calcium channels. **Science**, Washington, v. 238, n. 4831, p. 1288-1292, 1987.
- YATANI, A.; IMOTO, Y.; CODINA, J. et al. The stimulatory G protein of adenylyl cyclase,  $G_s$ , also stimulates dihydropyridine-sensitive  $Ca^{2+}$  channels. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 263, n. 20, p. 9887-9895, July 1988.
- ZHANG, A.; GAO, Z. Y.; GILON, P. et al. Vanadate stimulation of insulin release in normal mouse islets. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 266, n. 32, p. 21649-21656, Nov.1991.