

FABRÍCIA COSTA MONTENEGRO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DE SAPOGENINAS
ESTEROIDAIAS EM FIBROBLASTOS DA LINHAGEM L929
EXPRESSANDO PERMANENTEMENTE O CANAL PARA POTÁSSIO
K_v1.3**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA
“PROF. DELBY FERNANDES DE MEDEIROS”
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS
E SINTÉTICOS BIOATIVOS**

João Pessoa – PB

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FABRÍCIA COSTA MONTENEGRO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DE SAPOGENINAS
ESTEROIDAIAS EM FIBROBLASTOS DA LINHAGEM L929
EXPRESSANDO PERMANENTEMENTE O CANAL PARA POTÁSSIO
K_v1.3**

Dissertação apresentada ao Programa do Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros” da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para a obtenção do título de MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de concentração: FARMACOLOGIA

Orientador: Prof. Dr. Demetrius Antonio Machado de Araújo

Co-orientador: Prof. Dr. Jader dos Santos Cruz

João Pessoa – PB

2006

FABRÍCIA COSTA MONTENEGRO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DE SAPOGENINAS
ESTEROIDAIS EM FIBROBLASTOS DA LINHAGEM L929
EXPRESSANDO PERMANENTEMENTE O CANAL PARA POTÁSSIO
K_v1.3**

Data da defesa: 30 de novembro de 2006

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Demetrius Antonio Machado de Araújo
Universidade Federal da Paraíba
Orientador

Prof^a. Dr^a. Cláudia do Ó Pessoa
Universidade Federal do Ceará
Examinadora externa

Prof^a. Dr^a. Nadja de Azevedo Correia
Universidade Federal da Paraíba
Examinadora interna

Aos meus pais **Edneide Maria Costa Montenegro** e **Flávio de Albuquerque Montenegro**, às minhas tias **Eliane Maria Alves Costa** e **Edna Maria Alves Costa** e a minha avó **Ester Maria Alves Costa**, por todo suporte, amor e carinho que sempre me deram.

Dedico

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por ser sempre a luz que ilumina o meu caminho.

Aos meus orientadores Demetrius Antonio Machado de Araújo e Jader dos Santos Cruz, por todo apoio e suporte na minha vida acadêmica;

A minha família que sempre me apoiou e encorajou a seguir em frente;

Aos meus amigos Kellyanne dos Anjos Carvalho, Bruno C. Bellini, Andrea Cristina Barbosa Silva, Taciana Pontes Gama, Katarina Queiroga Duarte, Isabela Lima de Oliveira e Vanessa Nascimento da Silva, pela amizade verdadeira e por sempre me apoiarem nas horas mais difíceis;

Aos integrantes do Laboratório de membranas excitáveis (LAMEX/UFMG), por terem me recebido com muita alegria e ajudado nesta pesquisa científica;

À Prof^a. Márcia Piuvezam e aos integrantes do Laboratório de Imunologia (LTF/UFPB), em especial à Hermann Costa, por todo suporte técnico concedido para a realização desta pesquisa;

Aos colegas Marcos Antônio Alves de Medeiros, Aletheia Lacerda e Micheline Donato por todo apoio que me deram;

Aos professores e funcionários do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF/UFPB) e a todos aqueles que contribuíram de forma indireta para esta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro concedido durante a realização desse trabalho.

Obrigado a todos vocês de coração! Fabrícia Costa Montenegro

*“Se você fizer o que sempre fez, você terá o que sempre
teve”.*

Abraham Lincoln (1809-1865)

RESUMO

Os canais iônicos são poros protéicos e hidrofílicos que estão presentes na membrana plasmática das células dos vários tipos de organismos. O canal para potássio permite o fluxo do íon potássio através da bicamada lipídica segundo o seu gradiente eletroquímico. Este canal participa de varias funções fisiológicas que vão desde o processo de manutenção do potencial de repouso de todas as células, sejam elas excitáveis ou não, à participação em processos como, apoptose e proliferação celular. Entretanto o envolvimento dos canais para potássio nestes dois últimos processos ainda é um tema conflitante, sendo necessário, portanto, mais estudo acerca do assunto. Sapogeninas de origem vegetal têm sido largamente descritas devido a suas propriedades farmacológicas tais como: as atividades hipocolesterolemica, antidiabética, antioxidante, antialérgica e anti-HVI. Além dessas atividades, muitas destas sapogeninas induzem apoptose, considerada um dos mais importantes processos responsáveis pela morte celular em vários eventos fisiológicos. Também é sabido que algumas sapogeninas possuem ação sobre canais iônicos. Foi objetivo do nosso trabalho, verificar a ação citotóxica das sapogeninas: diosgenina, solasodina e acetato de hecogenina em fibroblastos da linhagem L929, bem como verificar a atividade destes compostos sobre o canal para potássio dependente de voltagem, $K_v1.3$, expresso permanentemente nesta linhagem celular. Para isso foi utilizado o ensaio do MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio brometo], para a avaliação da citotoxicidade, e a técnica de “whole-cell patch clamp”, para as medições das correntes de potássio. Diosgenina e solasodina causaram uma redução na viabilidade celular nas concentrações de 1; 10 e 100 μ M enquanto que o acetato de hecogenina foi citotóxico apenas na concentração de 100 μ M. A redução da viabilidade celular causada pela diosgenina e solasodina foi concentração-dependente, sendo a diosgenina ($EC_{50}=0,34 \pm 0,20 \mu$ M; $n=3$) mais citotóxica do que a solasodina ($EC_{50}=4,17 \pm 2,06 \mu$ M; $n=3$). A co-incubação de diosgenina (100 μ M) e solasodina (100 μ M) com 4-aminopiridina (4-AP, 5mM), um bloqueador de canal para potássio, não causou redução da viabilidade celular. É possível que a diosgenina e a solasodina estejam se difundindo pela membrana plasmática, pois elas apresentam uma estrutura anfifílica. A diosgenina deve estar causando morte celular por ativar uma via de sinalização desconhecida, mas que necessita do $K_v1.3$ uma vez que a co-incubação com o bloqueador deste canal, a 4-AP (5mM), resultou na perda da citotoxicidade tanto da diosgenina quanto do bloqueador. O mesmo acontece para a solasodina, o efeito citotóxico foi anulado pela co-incubação com 4-AP (5mM), além do mais, solasodina também não causou redução na corrente do $K_v1.3$. quando aplicada à face externa da membrana. Em virtude destes fatos especulamos que solasodina, assim como a diosgenina, pode estar ativando uma via de sinalização desconhecida que leva a morte dos fibroblastos L929 e esta via é dependente da ativação do $K_v1.3$. Concluimos que diosgenina e solasodina são citotóxicas para fibroblastos L929 nas concentrações de 1; 10 e 100 μ M e essa citotoxicidade é dependente de concentração. O acetato de

hecogenina é citotóxico apenas na concentração de 100 μ M e não foi dependente de concentração. Diosgenina, acetato de hecogenina e solasodina (10 μ M) não alteraram a corrente de pico do canal K_v1.3, quando aplicado a face externa da membrana.

Palavras-chaves: Diosgenina, solasodina, acetato de hecogenina, K_v1.3, fibroblasto L929

ABSTRACT

Ionic channels are protein pore that are present in cell membrane of several types of organisms. Potassium channels allow the flux of potassium ions through cell membrane according to their electrochemical gradient. This channel takes place in several physiological processes that goes to the maintenance of membrane rest potential of excitable and non excitable cells, until processes like apoptosis and cell proliferation. However, the involvement of potassium channels in processes like apoptosis and cell proliferation is still uncertain and it is necessary to develop more studies about their involvement on those processes. It has been reported that saponins have several pharmacological properties such as hypercholesterolemic, antidiabetic, antioxidant, anti-allergic, anti-inflammatory and anti-HIV activities. They also have a chemoprevention property since lots of studies, on a large range of cell lines, have been reported their ability as cell death inductors. It is also known that some saponins have effect on ionic channels. It was the objective of our study to evaluate cytotoxicity activity of diosgenin, solasodine and hecogenin acetate on fibrosarcoma L929 cell line and also evaluate their effect on voltage-gated potassium channel $K_v1.3$. These L929 cells were genetically modified to express only $K_v1.3$. To evaluate the cytotoxicity activity of saponins studied we used 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. We also used patch clamp technique, on whole-cell configuration, to measure potassium peak currents. Diosgenin and solasodine reduced cell viability at concentrations 1; 10; 100 μ M, while hecogenin acetate only reduced cell viability at 100 μ M. Diosgenin ($EC_{50}=0.34 \pm 0.20 \mu$ M; $n=3$) and solasodine ($EC_{50}=4.17 \pm 2.06 \mu$ M; $n=3$) reduced cell viability in a concentration-dependent manner, while hecogenin acetate did not. Co-incubation of diosgenin (100 μ M) and solasodine (100 μ M) with 4-Aminopyridine (4-AP, 5mM), a potassium channel blocker, did not cause cell viability reduction. Diosgenin (10 μ M), solasodine (10 μ M) and hecogenin acetate (10 μ M) had no effect on $K_v1.3$ current peak when applied to the extracellular membrane side. It's possible that diosgenin and solasodine are permeating cellular plasma membrane, due to their chemical structure, and they are activating an unknown signaling pathway that leads cell to death. However this pathway activated by diosgenin and solasodine is dependent of $K_v1.3$ activation, due to their cytotoxicity had been lost during co-incubation with 4-AP. We conclude that diosgenin and solasodine are cytotoxic at concentrations 1; 10 and 100 μ M to L929 cell line. Hecogenin acetate is cytotoxic only at 100 μ M and this cytotoxicity wasn't concentration-dependent manner like diosgenina and solasodina. Diosgenin, solasodina and hecogenin acetate didn't have effect on affect $K_v1.3$ peak current when applied to the extracellular membrane side.

Keywords: Diosgenin, solasodine, hecogenin acetate, $K_v1.3$, L929 cell line

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Protocolo utilizado no ensaio de citotoxicidade do MTT.	41
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Árvore filogenética dos canais para K⁺.	24
Figura 2: Canal para K⁺ dependente de voltagem.	25
Figura 3: Diferenças morfológicas entre a morte celular por apoptose e por necrose.	28
Figura 4: Estrutura química das sapogeninas esteroidais.	33
Figura 5: Células L929.	38
Figura 6: Estrutura química da ouabaína.	40
Figura 7: A plataforma de “Patch-clamp”.	43
Figura 8: “Whole-cell”.	44
Figura 20: Provável mecanismo de ação para a morte celular induzida pela diosgenina (—) e pela solasodina (•••) em fibroblastos L929 expressando K_v1.3.	60

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Efeito da diosgenina sobre a viabilidade de células L929.	45
Gráfico 2: Efeito da solasodina sobre a viabilidade de células L929.	46
Gráfico 3: Efeito do acetato de hecogenina sobre a viabilidade de células L929.	46
Gráfico 4: Efeito da ouabaína sobre a viabilidade de células L929.	47
Gráfico 5: Efeito do etanol sobre a viabilidade de células L929.	47
Gráfico 6: Curva dose-efeito diosgenina.	48
Gráfico 7: Curva dose-efeito solasodina.	49
Gráfico 8: Curva dose-efeito acetato de hecogenina.	49
Gráfico 9: Curva dose-efeito ouabaína.	50
Gráfico 10: Efeito da 4-AP sobre a viabilidade dos fibroblastos L929.	51
Gráfico 11: Efeito da diosgenina sobre o $K_v1.3$.	54
Gráfico 12: Efeito do acetato de hecogenina sobre o $K_v1.3$.	55
Gráfico 13: Efeito da solasodina sobre o $K_v1.3$.	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Percentual médio de inibição do crescimento de fibroblasto L929.....	53
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2TM	Dois domínios transmembranares
4TM	Quatro domínios transmembranares
4-AP	4-aminopiridina
6TM	Seis domínios transmembranares
7TM	Sete domínios transmembranares
8TM	Oito domínios transmembranares
A	Amper
AC	Acetato de hecogenina
Asp	Aspartato
BK_{Ca}	Canais para potássio de grande condutância ativados por cálcio
BTX	Batrachotoxina
Ca²⁺	Íon cálcio
CaCl₂	Cloreto de cálcio
CO₂	Dióxido de carbono
DIOS	Diosgenina
DMEM	Meio Dulbecco MEM

DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNA	Acido desoxirribonucléico
DO	Densidade óptica
EC₅₀	Concentração necessária da substância testada para se ter 50% do efeito esperado
EDTA	Ácido tetra-acético etilenodiamino
EGTA	Ácido tetra-acético etilenoglicol
E_{máx}	Efeito máximo de inibição do crescimento celular
e.p.m	Erro padrão da média
Gli	Glicina
GΩ	Gigaohm
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazineetanossulfônico
HIV	Human Immunodeficiency Virus (vírus da imunodeficiência humana)
h	Horas
K⁺	Íon potássio
kHz	Quilohertz
K_v	Canal para potássio dependente de voltagem

K_v1.3	Canal para potássio dependente de voltagem isolado de um mutante de <i>Drosophila</i> conhecido como "Shaker"
KOH	Hidróxido de potássio
M.E.	Meio extracelular
M.I.	Meio intracelular
mm	Milímetros
mM	Milimolar
ml	Mililitros
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio brometo
mV	Milivoltes
mΩ	Megaohm
nA	Nanoamper
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetro
pF	Picofaraday

pH	Potencial de hidrogênio iônico
PBS	Sistema salina tampão fosfato
r.p.m	Rotações por minutos
s	Segundos
S1	Seguimento transmembranar 1
S2	Seguimento transmembranar 2
S3	Seguimento transmembranar 3
S4	Seguimento transmembranar 4
S5	Seguimento transmembranar 5
S6	Seguimento transmembranar 6
SFB	Soro fetal bovino
SOL	Solasodina
STX	Saxitoxina
Tre	Treonina
Tir	Tirosina
TTX	Tetrodotoxina
µl	Microlitro

μM

Micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	22
1.1. O canal para potássio.....	22
1.2. O canal para potássio, apoptose e proliferação celular.....	26
1.3. O canal para potássio $K_v1.3$	30
1.4. Sapogeninas.....	31
2. JUSTIFICATIVA.....	34
3. OBJETIVO.....	35
3.1. Objetivo Geral.....	35
3.2. Objetivos específicos.....	35
4. METODOLOGIA.....	36
4.1. Lista de reagentes.....	36
4.2. Cultivo celular.....	36
4.3. Preparo das substâncias teste.....	38
4.4. Contagem do número de células viáveis.....	39
4.5. Ensaio de citotoxicidade.....	39
4.6. "Patch clamp".....	42
5. RESULTADOS.....	45
5.1. Ensaio de citotoxicidade.....	45
5.2. Experimento Eletrofisiológico.....	54
6. DISCUSSÃO.....	57

6.1. <i>Perspectivas</i>	61
7. CONCLUSÃO.....	62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

1. INTRODUÇÃO

1.1. O canal para potássio

Os canais iônicos são poros protéicos e hidrofílicos que estão presentes na bicamada lipídica de vários tipos celulares das mais variadas espécies animais e vegetais. Estes canais participam de vários eventos fisiológicos que vão desde geração do potencial de membrana à mudança de direção do *Paramecium* após uma colisão, bem como estão envolvidos em vários processos patológicos (HILLE, 2001).

O potencial das membranas celulares fica muito próximo do potencial de equilíbrio do íon potássio (K^+). As membranas celulares encontram-se carregadas negativamente na face interna da bicamada lipídica e carregada positivamente na face externa da bicamada, quando há algum distúrbio nessa polaridade ocorre um processo conhecido como *despolarização*, geralmente isso ocorre quando há um influxo de íons carregados positivamente nas células por meio de canais iônicos, quando a polaridade é restaurada ocorre um processo conhecido como *repolarização*, que é geralmente devido ao impedimento do influxo de íons positivos e à abertura de canais para potássio dependente de voltagem levando a um efluxo deste íon seguindo o seu gradiente eletroquímico, restabelecendo o potencial de repouso da membrana plasmática. Uma das funções mais marcantes dos canais para potássio é a manutenção do potencial de membrana no repouso de todas as células, sejam elas excitáveis ou não. No entanto à medida que os estudos acerca destes canais se intensificam, novas funções são atribuídas a eles (HILLE, 2001).

Tem sido relatado que mais de 75 genes em mamíferos codificam subunidades de canais para potássio, sendo assim eles são considerados a família de canais iônicos mais diversificados (JENKISON, 2006). Todo canal para potássio tem uma região altamente conservada de aminoácidos, contendo a seguinte seqüência de resíduos de aminoácidos: Tre-X-X-Tre-X-Gli-Tir-Gli-Asp, esta seqüência, que é conhecida como “assinatura do canal” e está presente na alça P entre o segmento S5 e S6 (Fig. 2B). A seqüência Ter-X-Gli-Tir-Gli é o filtro de seletividade do canal e é repetido nas quatro subunidades principais que formam o

canal para potássio. O X das seqüências acima representa um aminoácido qualquer. A estrutura destes canais consiste de quatro subunidades protéicas denominadas de α , que em conjunto formam o poro pelo qual o K^+ flui. Estas subunidades α se encontram associadas a subunidades auxiliares β . A atividade dos canais para potássio pode ser regulada por voltagem, cálcio e por neurotransmissores bem como pela via de sinalização que eles estimulam (ALEXANDER et al, 2006).

Existem muitas formas de classificar estes canais, dessa forma, se tem a classificação quanto as suas propriedades biofísicas, farmacológicas e quanto ao gene que o codificam, dentre outras. Vamos adotar aqui a classificação segundo o número de domínio transmembranares da subunidade α . Seguindo esta classificação os canais para potássio estão classificados atualmente em cinco principais famílias: a família **2TM** (dois domínios transmembranares), **4TM** (quatro domínios transmembranares), **6TM** (seis domínios transmembranares), **7TM** (sete domínios transmembranares) e **8TM** (oito domínios transmembranares) (HILLE, 2001). Cada família possui vários subgrupos os quais podem ser visto na figura a seguir (Fig.1).

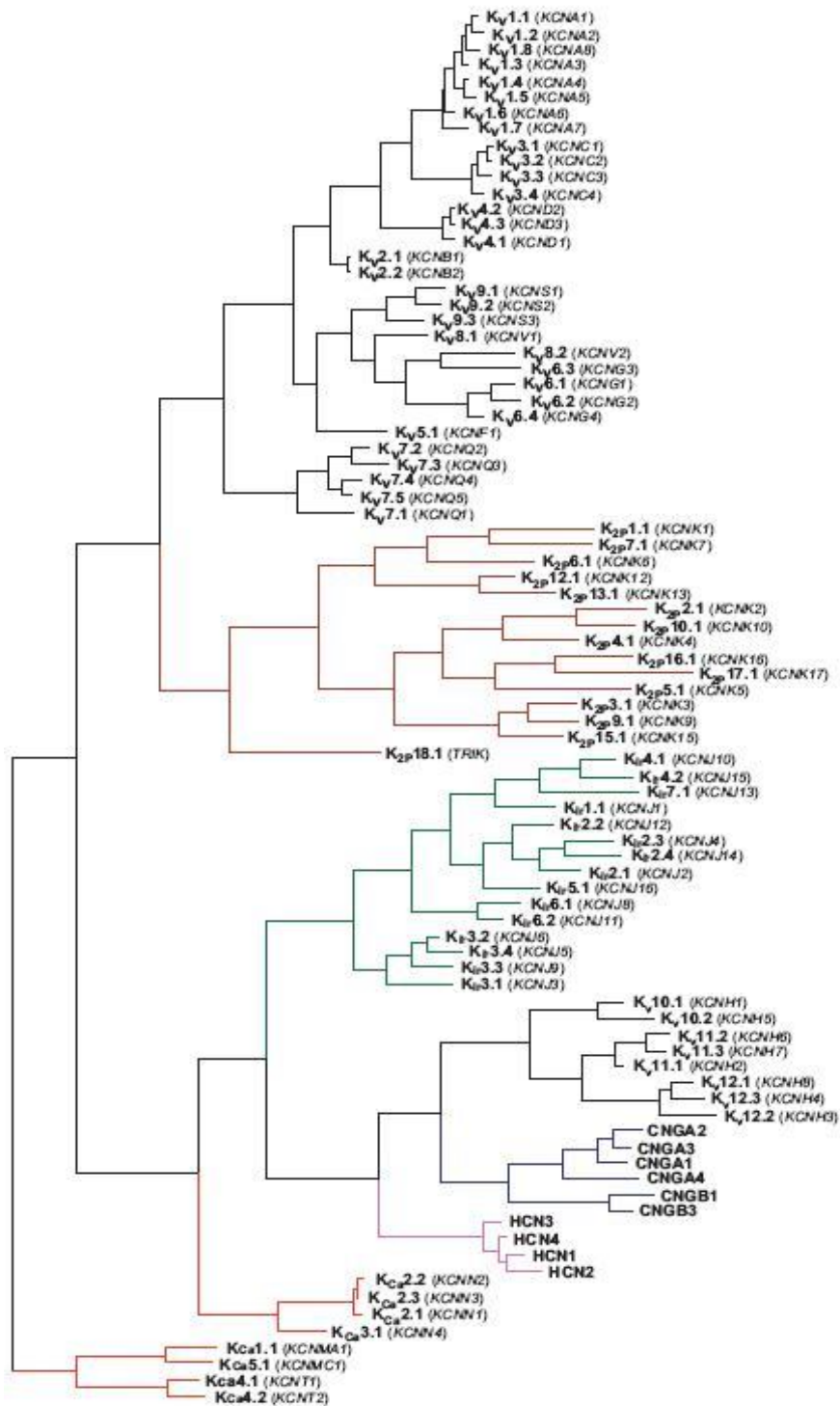


Figura 1: Árvore filogenética dos canais para K⁺. Fonte: YU & CATTERALL, 2004.

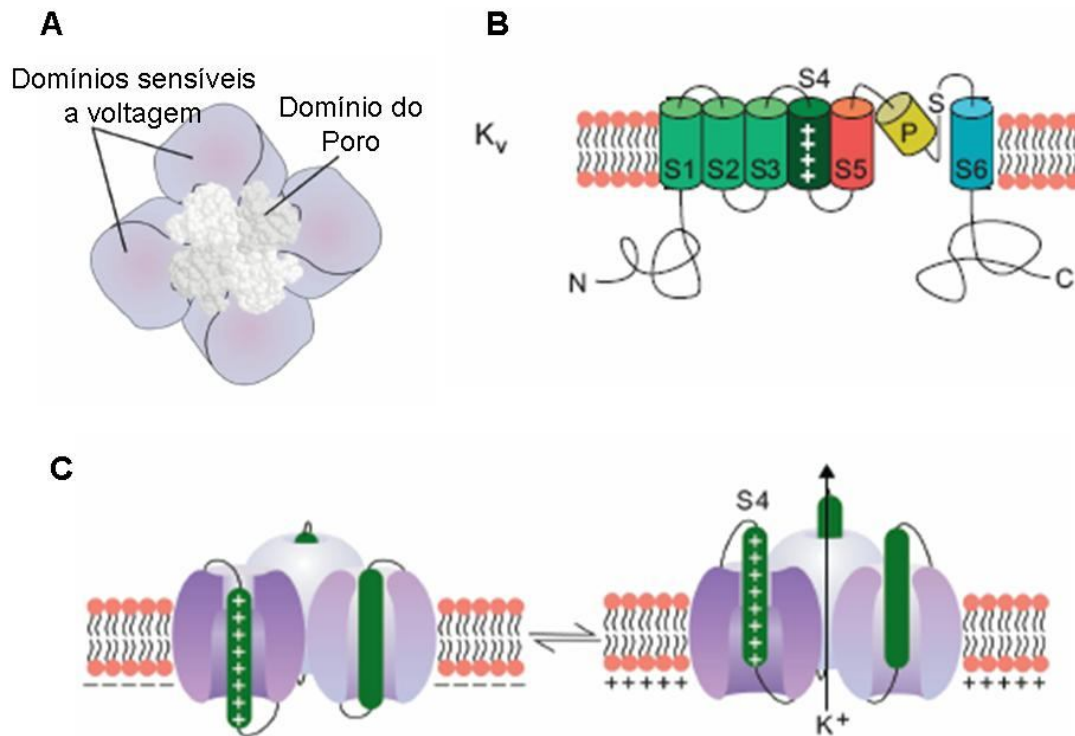


Figura 2: Canal para K^+ dependente de voltagem. A) Estrutura de um canal para potássio dependente de voltagem, mostrando a região do poro e os domínios sensores de voltagem. B) Estrutura da subunidade α com 6TM. C) deslocamento do seguimento S4, considerado o sensor de voltagem quando ocorre uma despolarização. Fonte: Modificado de

Os canais para potássio que são sensíveis a voltagem são denominados K_v . Estes canais são formados por quatro subunidades do tipo α , geralmente associada a subunidades auxiliares do tipo β . As subunidades do tipo α dos K_v possuem seis domínios transmembranares (S1-S6) e os domínios C e N terminal estão localizados na região citoplasmática. A região do poro é formada pelos seguimentos S5 e S6, enquanto que o seguimento S4 é considerado o sensor de voltagem destes canais. Este seguimento é composto por aminoácidos carregados positivamente. O deslocamento deste seguimento frente a uma mudança no potencial da membrana plasmática leva a uma mudança conformacional do canal que passa para o estado aberto (Fig. 2C) (MILLER, 2000; BURG et al., 2006). Nas células excitáveis, estes canais são responsáveis pelos processos de repolarização e *hiperpolarização* (quando o potencial de membrana atinge potenciais muito negativos, abaixo de seu

potencial de repouso). Alguns estudos também apontam para uma participação destes canais em processos como apoptose e proliferação celular (SZBÓ et al, 2004; LANG et al., 2005; BURG et al., 2006).

A associação com subunidades auxiliares do tipo β faz com que o canal se torne totalmente funcional. Esse tipo de associação também contribui para uma diversificação destes canais, uma vez que as subunidades do tipo β influenciam nas propriedades fisiológicas bem como nas propriedades farmacológicas dos canais para potássio dependente de voltagem. Por exemplo, muitos K_v podem ser regulados oxidativamente e isto pode ocorrer por meio de domínios de cisteína presente na extremidade amino-terminal das subunidades β (JENKISON, 2006).

Estudos sobre a regulação farmacológica dos K_v vêm se intensificando devido ao papel fundamental que eles desempenham na fisiologia celular. O conhecimento sobre a biofísica, estrutura e modulação da atividade destes canais, visam auxiliar no tratamento de patologias decorrentes de alteração no funcionamento dos mesmos.

1.2. O canal para potássio, apoptose e proliferação celular

A ativação de canais para K^+ dependentes de voltagem (K_v) é geralmente associada ao controle do potencial de membrana e à taxa de repolarização depois de um potencial de ação em células excitáveis, como se observa nas células cardíacas, neuronais e musculares. Contudo inúmeros estudos têm demonstrado que os K_v estão envolvidos no processo de morte celular programada, a apoptose (SZBÓ et al, 2004; LANG et al., 2005; BURG et al., 2006).

Apoptose é um termo morfológico que foi cunhado em 1974 por Kerr et. al, quando estes observaram mudanças morfológicas nas células em processo de morte que eram totalmente diferentes daqueles de células que passavam pelo processo de necrose e especularam que estas mudanças morfológicas estariam associadas a um tipo de morte espontânea (TAKEMURA et al., 2006). Hoje a apoptose, também conhecida como morte celular programada, é um mecanismo fisiológico de extrema importância para a homeostasia celular, participando de processos fisiológicos, como no desenvolvimento embrionário, em respostas do

sistema imune e na eliminação de células potencialmente prejudiciais ao tecido, além de limitar o crescimento celular desgovernado (TAKEMURA et al., 2006; BURG et al., 2006; LANG et al., 2005). Quando há algum tipo de alteração no processo de apoptose, a homeostasia celular é quebrada e se instalam quadros patológicos como doenças auto-imunes, neurodegenerativas e câncer (TAKEMURA et al., 2006; BURG et al., 2006).

Apoptose e necrose são dois mecanismos de morte celular distintos, tanto em termos morfológicos como funcionais. Durante o processo de apoptose, a célula encolhe, o citoplasma se condensa, tornando a célula multilobulada e depois ocorre fragmentação. Os fragmentos ficam envoltos pela membrana plasmática e passam a ser chamados de corpos apoptóticos os quais são fagocitados por macrófagos ou células vizinhas. O material nuclear também se condensa, ficando preso a membrana nuclear, a cromatina assume uma forma de ferradura de cavalo ou de lua crescente e por fim sofre fragmentação (KLAASSEN & WATKINS, 2001; TAKEMURA et al., 2006). Durante o processo de necrose, a célula e suas organelas incham e desintegram. A lise da membrana plasmática causa um processo inflamatório no local (KLAASSEN & WATKINS, 2001) (Fig. 3).

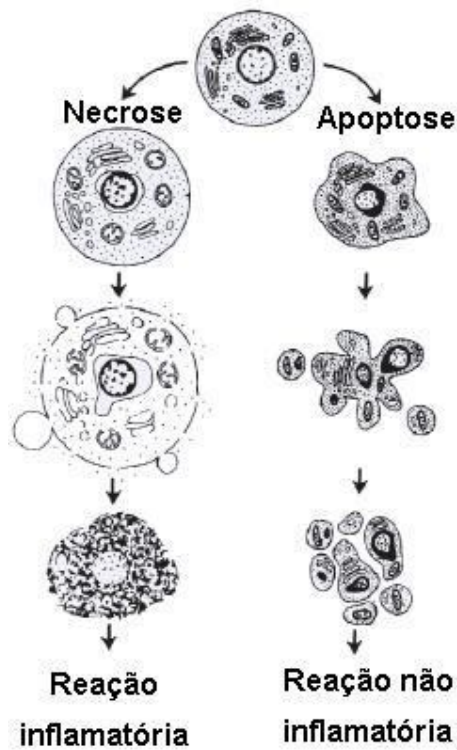


Figura 3: Diferenças morfológicas entre a morte celular por apoptose e por necrose. Fonte: Modificado de

Proliferação celular e apoptose são dois mecanismos celulares controlados por canais iônicos que atuam na sinalização destes dois processos (LANG et al., 2005; BURG et al., 2006). A proliferação celular leva ao aumento de volume da célula enquanto que a apoptose leva ao murchamento. Mudança no volume celular requer a participação de transporte iônico através da membrana, incluindo o transporte de íons cloreto (Cl^-) e potássio (K^+) (LANG et al., 2005). Ativação de canais aniônicos durante o processo de proliferação celular foi demonstrada em alguns estudos (SHEN et al., 2000; NILIUS & DROOGMANS, 2001; VARELA et al., 2004) enquanto que outros demonstraram que bloqueadores destes canais inibiram o processo de proliferação celular (SHEN et al., 2000; WONDERGEN et al., 2001; JIANG et al., 2004). Possivelmente, durante o processo de sinalização de proliferação celular é necessário um estado transiente de murchamento da célula que pode requerer a ativação de canais para Cl^- . Normalmente, o Cl^- intracelular está acima de seu equilíbrio eletroquímico e a ativação de canais para Cl^- leva a um efluxo desse íon e uma conseqüente despolarização da membrana celular, tal despolarização leva a ativação de canais para K^+ dependentes de voltagem, ocasionando uma perda de íons K^+ . Uma baixa concentração intracelular de íons K^+ pode favorecer em parte a morte celular por apoptose. A mudança de potencial de membrana ocasionada pela saída de íons K^+ , favorece a entrada de íons Ca^{2+} através dos canais para cálcio dependentes de voltagem. O Ca^{2+} intracelular pode ativar tanto mecanismos de proliferação celular como pode estimular enzimas que executam a apoptose (LANG et al., 2005).

Tanto a proliferação celular quanto apoptose, envolve em algum ponto a ativação de canais para Cl^- , canais para K^+ e canais para Ca^{2+} , bem como os seus respectivos inibidores têm se destacado por interferir em ambos os mecanismos celulares, dependendo do tipo celular, da regulação que o micro ambiente exerce sobre a célula e da condição que a célula se encontra. A decisão se a célula irá passar por um processo de proliferação ou de morte por apoptose depende da magnitude e da organização temporal da entrada de Ca^{2+} , além do estado funcional da célula (LANG et al., 2005).

O papel dos canais para potássio no processo de apoptose é ainda conflitante (LANG et al., 2006). O canal para potássio dependente de voltagem

K_v1.3 é um dos canais envolvidos no processo de apoptose mais bem caracterizado (SZABÒ et al., 2004). Em células Jurkat, uma inibição rápida deste canal leva estas células a entrarem em apoptose quando elas são tratadas com CD95 ou ceramida (BOCK et al., 2003; HOLMES et al., 1996). Já em linfócitos deficientes de K_v1.3 ou qualquer outro canal para potássio houve uma corrente compensatória de íons Cl⁻ e nenhum defeito no processo de apoptose (KONI et al., 2003). Em neurônios granulares do cerebelo de rato, tratados com 4-aminopiridina, um bloqueador clássico de canais para potássio, houve uma prevenção do processo de apoptose nestas células (HU et al., 2006).

É claramente necessário mais estudos acerca do complexo papel dos canais iônicos nos processos de apoptose e proliferação celular.

1.3. O canal para potássio $K_v1.3$

O $K_v1.3$ é um canal para K^+ sensível a voltagem, isolado de um mutante de *Drosophila* conhecido como “Shaker”. Este canal é largamente expresso no sistema imune e no sistema nervoso central (PANYI et al., 2004), mas pode ser encontrado em células renais, hepáticas e do músculo esquelético (XU et al., 2004). Vários estudos indicam que este canal está envolvido em processos de estimulação de linfócitos T, doenças auto-imunes, apoptose, regulação do volume celular e na captação de insulina (RUS et al., 2005). Devido a larga expressão desse canal no sistema imune, principalmente nos linfócitos do tipo T, a busca por inibidores específicos do canal $K_v1.3$ para uso terapêutico tem se intensificado. Inibidores do $K_v1.3$ impedem a ativação e proliferação dos linfócitos T ajudando no tratamento de doenças como a esclerose múltipla (PANYI et al., 2004; PANYI, 2005).

Este canal é um tetrâmero composto por subunidades α idênticas. Cada subunidade é composta por seis domínios transmembranares (6TM). A alça extracelular entre o seguimento S5 e S6 de cada subunidade α é responsável pela formação da região do poro. O seguimento S4, composto por aminoácidos carregados positivamente, é o sensor de voltagem deste canal (Fig. 2). O canal é ativado em potenciais de membrana entre -50mV e -60mV, com a probabilidade de abertura aumentando com a despolarização da membrana plasmática. Durante longos períodos de despolarização o canal $K_v1.3$ entra em um estado inativado de não condutância do qual se recupera em 10s mesmo em potenciais de membrana tão negativos quanto -120mV (PANYI et al., 2004; PANYI, 2005). Também tem sido relatado que as propriedades biofísicas deste canal são alteradas pelas subunidades auxiliares do tipo β (VINCENTE et al., 2005).

Os canais para potássio que fazem parte da família “Shaker”, possuem dois tipos distintos de mecanismos de inativação (PANYI, 2005): a inativação do tipo *N*, onde o canal em seu estado aberto é fechado por uma “bola” formada pela terminação amino citoplasmática (HOSHI et al., 1990) e uma inativação do tipo *P/C*. O canal $K_v1.3$ é inativado via mecanismo do tipo *P/C*, que é conhecido também por inativação do tipo lenta (PANYI et al., 2004; PANYI, 2005). A inativação do tipo *P* consiste no fechamento do portão extracelular (portão *P*) e do poro, levando o canal a um estado não condutivo (STARKUS et al, 1997), logo em seguida inicia-se a

inativação do tipo C, onde ocorre uma mudança conformacional estabilizando o estado não condutivo e os sensores de voltagem (OLCESE et al., 1997).

1.4. Sapogeninas

Sapogeninas são glicosídeos de esteróides ou de terpenos policíclicos. Os esteróides ou terpenos que fazem parte da estrutura das sapogeninas dão a elas uma característica lipofílica, enquanto que os glicosídeos conferem a elas um caráter hidrofílico (SIMÕES et al., 2004). Por conta desta estrutura anfifílica, as sapogeninas são capazes de formar complexos com esteróides, proteínas e lipídios de membrana, o que confere a essas substâncias várias propriedades biológicas, dentre as quais podemos destacar a ação das sapogeninas sobre a membrana plasmática. As sapogeninas alteram a permeabilidade da membrana plasmática bem como causam a sua destruição (SIMÕES et al., 2004). Sapogeninas de origem vegetal têm sido largamente descritas devido a suas propriedades farmacológicas. Dentre elas podemos citar as atividades hipocolesterolemica, antidiabética, antioxidante, antialérgica e anti-HVI (MELO et al., 2004). Além dessas atividades, muitas destas sapogeninas induzem apoptose, considerada um dos mais importantes processos responsáveis pela morte celular em vários eventos fisiológicos (TROUILLAS et al., 2005). As sapogeninas também são componentes importantes na ação de muitas drogas de origem vegetal, dentre elas podemos destacar aquelas que são utilizadas tradicionalmente como expectorantes (*Polygala senega* L.; *Primula veris* L. e *Herdera helix* L.) e diuréticas (*Herniaria glabra* L. e *Betula pendula* Roth), porém o seu mecanismo de ação ainda não foi elucidado (SIMÕES et al., 2004).

As sapogeninas esteroidais neutras são encontradas em monocotiledôneas principalmente nas famílias Liliaceae, Dioscoreaceae e Agavaceae. Nas dicotiledôneas, a ocorrência delas é rara sendo mais especificamente encontradas nos gêneros *Digitalis* e *Trigonella*. Já as sapogeninas esteroidais básicas são encontradas principalmente no gênero *Solanum* (SIMÕES et al., 2004).

A diosgenina (Fig. 4) é uma sapogenina esteroidal neutra (SIMÕES et al., 2004). Ela é freqüentemente encontrada em plantas do gênero *Dioscorea* e tem sido

largamente utilizada pela indústria farmacêutica na produção de hormônios esteroidais, tais como estrógeno, cortisol e aldosterona (MAKER et al., 1940). Diosgenina altera o ciclo celular, induzindo apoptose em diferentes linhagens celulares de câncer humano (MOALIC et al., 2001; LEGER et al., 2004). Além do mais, diosgenina foi o indutor de morte celular mais efetivo quando comparado a duas outras sapogeninas, o acetato de hecogenina e a tigonina, na linhagem celular de osteossarcoma humano 1547 (CORBIERE et al., 2003). Diosgenina também causou um relaxamento da artéria coronária, via sinalização da proteína quinase G e promoveu ativação dos canais para potássio de grande condutância ativado por cálcio (BK_{Ca}) de células arteriais musculares lisas (AU et al., 2004). Também ocorreu estimulação da atividade dos BK_{Ca} em células neuronais HCN1A (WANG et al., 2005).

O acetato de hecogenina (Fig. 4) é uma sapogenina esteroidal neutra encontrada em plantas do gênero *Agavae* (SIMÕES et al., 2004) e é considerado um indutor de morte celular (CORBIERE et al., 2003; TROUILLAS et al., 2005).

A solasodina (Fig. 4) é uma sapogenina esteroidal básica, encontrada em espécies do gênero *Solanum*. Este tipo de sapogenina também é conhecido como alcalóides esteroidais de origem vegetal. A maioria dos alcalóides esteroidais é tóxica, pois atuam como mecanismo de defesa de muitos organismos, a exemplo disso temos a batrachotoxina (BTX) e a veratridina que são ligantes específicos de canais para sódio e que causam despolarização das membranas neuronais e musculares. Além disso, muitos deles são teratogênicos e causam intoxicações agudas se ingeridos em doses altas (SIMÕES et al., 2004). Muitos estudos acerca da arquitetura e funcionamento dos canais iônicos vieram de estudos farmacológicos realizados com toxinas que são ligante-específicas e de alta afinidade. Estas toxinas podem ser de origem vegetal, animal ou química. A tetrodotoxina (TTX) e a saxitoxina (STX) foram ferramentas farmacológicas de grande valor nos primeiros estudos realizados com canais iônicos, ambas as toxinas são de origem animal e apresentam uma especificidade por canais para sódio dependentes de voltagem (HILLE, 2001).

As atividades farmacológicas relatadas para a solasodina são: indutor de morte celular (TROUILLAS et al., 2005), possuir efeitos antiproliferativos (LEE et al., 2004) e antifúngico (YAO et al., 2000), inibidor da atividade do receptor de

multidroga em linhagem cancerígena humana (LAVIE et al., 2001) e alteração o comportamento sexual de ratos (SCHWARZ et al., 2005).

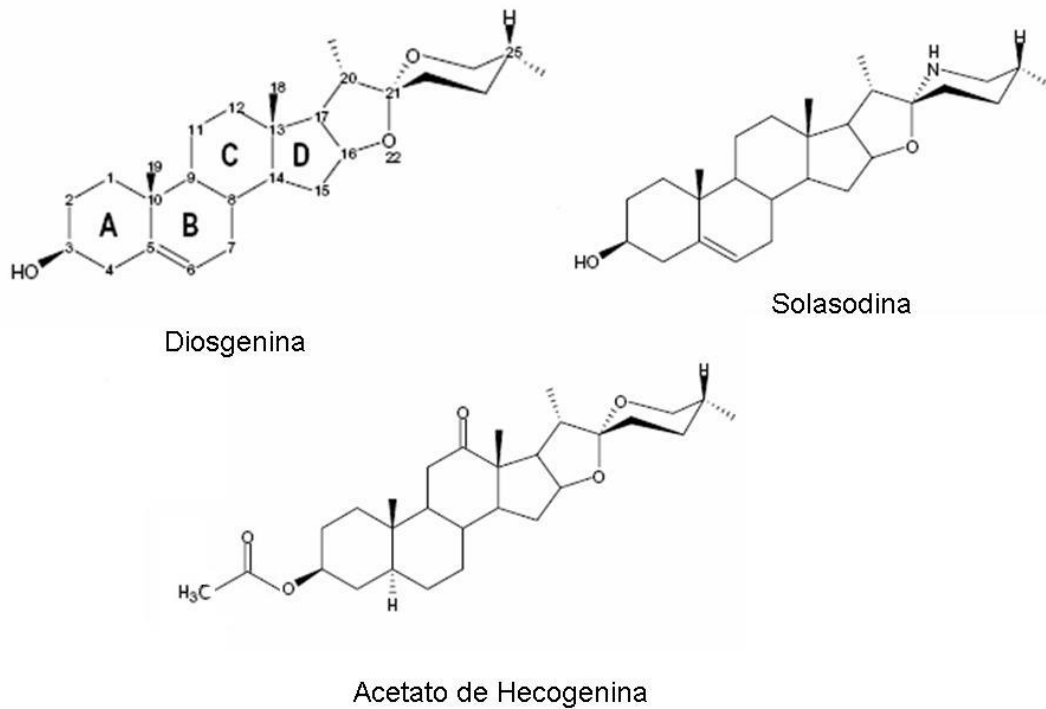


Figura 4: Estrutura química das sapogeninas esteroidais. Logo acima no canto esquerdo temos a estrutura química da Diosgenina, uma sapogenina esteroidal neutra, à direita temos a Solasodina, uma sapogenina esteroidal básica, também conhecida como alcalóide esteroidal, e abaixo o Acetato de Hecogenina. A/B/C/D representam o núcleo esteroidal destas sapogeninas.

2. JUSTIFICATIVA

O canal $K_v1.3$ é comumente expresso em células do sistema imune e está envolvido em vários processos como a estimulação de linfócitos T, doenças auto-imunes e apoptose. Não menos importante é o estudo de compostos de origem vegetal que vem contribuindo na busca de novos fármacos ou até mesmo de novas ferramentas farmacológicas, que tem sido de grande utilidade no esclarecimento acerca do funcionamento de canais iônicos. Dessa forma, foi avaliado neste trabalho o efeito citotóxico das sapogeninas: diosgenina, solasodina e acetato de hecogenina sobre a linhagem celular L929. Estes compostos são bastante conhecidos na literatura por induzirem apoptose celular sendo ainda desconhecido o seu efeito sobre essa linhagem. Também foi avaliado o efeito das mesmas sapogeninas sobre o canal $K_v1.3$ expresso permanentemente nessas células.

3. OBJETIVO

3.1. *Objetivo Geral*

Verificar a ação citotóxica das sapogeninas: diosgenina, solasodina e acetato de hecogenina em fibroblastos da linhagem L929, bem como verificar a atividade destes compostos sobre o canal $K_v1.3$ expresso permanentemente nesta linhagem celular.

3.2. *Objetivos específicos*

- 3.3.1. Verificar a citotoxicidade e a percentagem de inibição da viabilidade celular causada pela diosgenina nas células L929 por meio ensaio de citotoxicidade do MTT;
- 3.3.2. Verificar a citotoxicidade e a percentagem de inibição da viabilidade celular causada pela solasodina nas células L929 por meio ensaio de citotoxicidade do MTT;
- 3.3.3. Verificar a citotoxicidade e a percentagem de inibição da viabilidade celular causada pelo acetato de hecogenina nas células L929 por meio ensaio de citotoxicidade do MTT;
- 3.3.4. Comparar as EC_{50} das substâncias testadas;
- 3.3.5. Verificar se a diosgenina tem alguma ação sobre o $K_v1.3$ expressos nas células L929;
- 3.3.6. Verificar se a solasodina tem algum efeito sobre o $K_v1.3$ expressos nas células L929;
- 3.3.7. Verificar se o acetato de hecogenina tem algum efeito sobre o $K_v1.3$ expressos nas células L929.

4. METODOLOGIA

4.1. Lista de reagentes

- DMEM (Cultilab, Brasil);
- SFB (Cultilab, Brasil);
- Estreptomicina/Penicilina (Cultilab, Brasil);
- MTT (Amershan, EUA);
- Tripsina (Amershan, EUA);
- Azul de Tripán (P.A.);
- 4-Aminopiridina (Sigma, EUA);
- Ouabaína (Sigma, EUA);
- EDTA (Sigma, EUA);
- HEPES (Sigma, EUA);
- EGTA (Sigma, EUA);
- DMSO (Vetec, Brasil);
- NaCl (Vetec, Brasil);
- NaOH (Vetec, Brasil);
- KCl (Vetec, Brasil);
- KOH (Vetec, Brasil);
- CaCl₂ (Vetec, Brasil);
- MgCl₂ (Vetec, Brasil);
- Glicose (Vetec, Brasil).

4.2. Cultivo celular

As células L929 (Fig. 5) (CCL-1, American Type Culture Collection), são fibroblastos de ratos, que foram geneticamente modificados para expressarem permanentemente o canal para potássio dependente de voltagem K_v1.3. Esta

linhagem celular foi cedida gentilmente pelo Dr. Jader dos Santos Cruz (Instituto de Ciências Biológicas/Universidade Federal de Minas Gerais).

Estas células foram cultivadas até atingirem 90% de confluência em garrafas de cultivo celular (25cm²) estéreis, contendo meio de cultura DMEM alta glicose (Cultilab, Brasil) suplementado com HEPES 5mM, bicarbonato de sódio, antibióticos (estreptomicina e penicilina) e 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado (Cultilab, Brasil). O cultivo dessa linhagem celular foi feito em uma estufa de cultivo celular (Sanyo CO₂ Incubator, modelo COM-15A, Japão) em atmosfera de 5% de CO₂ e a uma temperatura de 37°C. Ao atingirem a confluência, as células foram soltas por tripsinização. Este processo consiste em soltar as células usando uma solução contendo: tripsina 0,25%; EDTA 0,5mM; PBS 250mM; Tripsina 0,25%; pH=7,4 ajustado com NaOH. Logo após, as células foram ressuspensas em meio de cultura e semeadas em placas de 96 poços de fundo chato estéreis para os ensaios de citotoxicidade e/ou garrafas de cultivo celular para a manutenção da cultura. Para os experimentos de eletrofisiologia as células foram semeadas em placas de Petri estéreis (40x10mm).

Todo material usado no cultivo celular foi estéril e descartável. Os descartes foram realizados em recipientes contendo água sanitária, detergente e água, sendo desprezados em um lixo biológico apropriado.



Figura 5: Células L929. Pode ser visualizar nesta foto as variações morfológicas normais destas células cultivadas em meio DMEM suplementado com SFB 10%. Aumento de 400

4.3. Preparo das substâncias teste

As sapogeninas, diosgenina, solasodina e acetato de hecogenina, utilizadas em nossos experimentos foram cedidas gentilmente pelo Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho (Laboratório de Tecnologia Farmacêutica/Universidade Federal da Paraíba). Diosgenina, solasodina, acetato de hecogenina e ouabaína foram diluídos em etanol. As soluções estoque de cada uma delas foi feita na concentração de 1mM e a partir dessa solução estoque foram feitas as diluições em meio DMEM estéril suplementado com 10% SFB. As diluições de 0,1 μ M; 1 μ M; 10 μ M e 100 μ M foram filtradas e antes de serem utilizadas nos experimentos de citotoxicidade. Para os experimentos de eletrofisiologia a diluição de 10 μ M para cada substância testada foi feita na solução de banho. Estas diluições também foram filtradas antes de serem inseridas no sistema de perfusão. O percentual de etanol nas diluições finais não passou de 10%. Para a 4-aminopiridina (4-AP) foi feita uma solução estoque de 50mM em PBS, esta solução estoque foi diluída em 10 vezes em meio DMEM estéril suplementado com 10% de SFB e filtrada antes de ser utilizada nos ensaios de citotoxicidade.

4.4. Contagem do número de células viáveis

As células L929 foram tripsinizadas e ressuspendidas em meio DMEM estéril suplementado com 10% de SFB. Foi retirada uma alíquota de 50 μ l da suspensão e esta alíquota foi diluída em 50 μ l do reagente Azul de Tripán a 1%. O reagente Azul de Tripán é excluído do citoplasma de células viáveis, ficando coradas de azul aquelas células que não estão viáveis. A contagem do número de células viáveis por ml de suspensão foi feita em uma câmara de Neubauer. O número total de células viáveis na suspensão original foi calculado da seguinte maneira: **nº de células**

viáveis $\times 10^4$ x fator de diluição/número de quadrantes contados (PERES & CURI, 2005).

4.5. Ensaio de citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade utilizado foi o ensaio do MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio brometo] (MOSMANN, 1983). Para este ensaio as células L929 foram contadas e a concentração de células foi ajustada para 1×10^5 células por poço em seguida foram semeadas em placas de 96 poços de fundo chato estéreis.

Diosgenina, solasodina e acetato de hecogenina foram adicionados aos poços em triplicata, em diferentes concentrações. As concentrações testadas para cada substância foram $0,1 \mu\text{M}$; $1 \mu\text{M}$; $10 \mu\text{M}$ e $100 \mu\text{M}$. A ouabaína (Fig. 6) foi usada como controle positivo, por ter uma estrutura química semelhante as das sapogeninas em estudo e por causar morte celular via bloqueio da Na^+/K^+ ATPase. As concentrações testadas foram: $0,1 \mu\text{M}$; $1 \mu\text{M}$; $10 \mu\text{M}$ e $100 \mu\text{M}$. O período de incubação foi de 24h, na estufa de cultivo celular. A ouabaína também foi adicionada em triplicata aos poços por 12h, após este tempo de pré-incubação foi adicionado diosgenina e solasodina $100 \mu\text{M}$ por mais 24h.

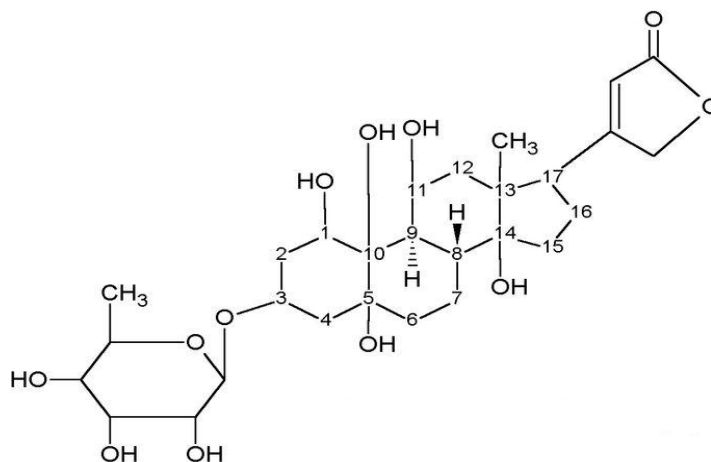


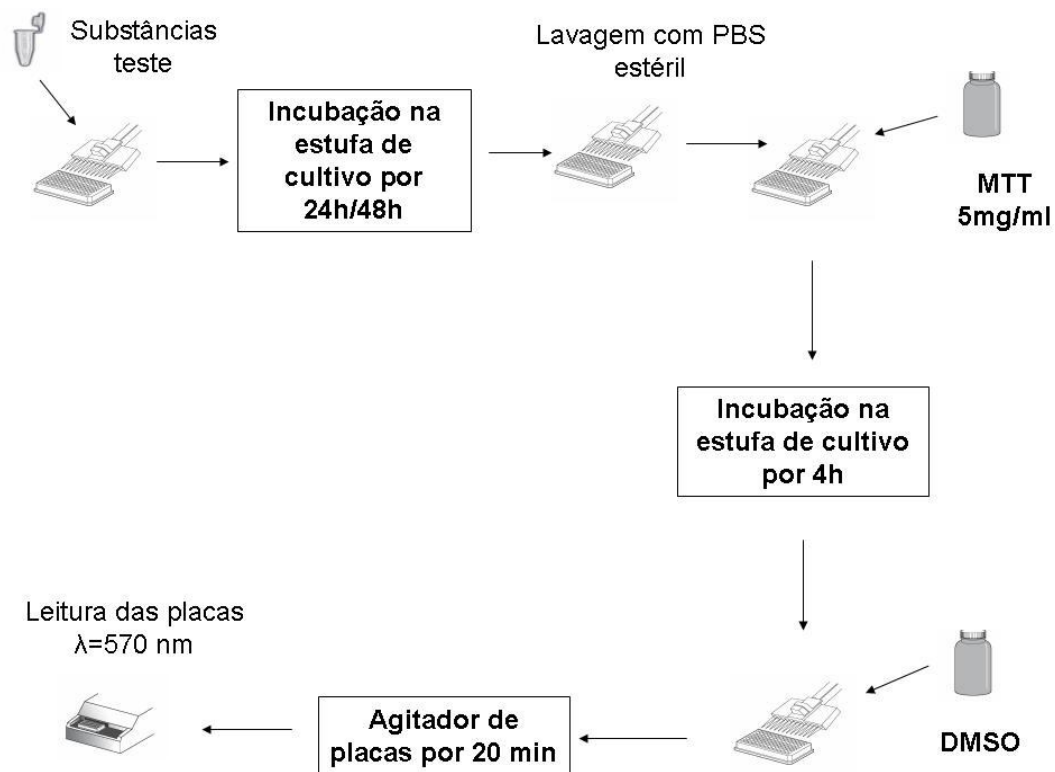
Figura 6: Estrutura química da ouabaína.

A 4-AP, um bloqueador de canais para potássio, foi testada na concentração de 5mM e o período de incubação foi de 48h, em estufa de cultivo celular. As células L929 também foram pré-incubadas com 4-AP 5mM por 24h, logo após foi adicionado diosgenina (100µM) e solasodina (100µM) em triplicatas por mais 24h.

Ao término do período de incubação, os poços foram lavados cuidadosamente com PBS estéril e foi adicionado MTT (5mg/ml) em cada poço. Após 4h, foi adicionado DMSO (Dimetil sulfóxido) para a solubilização dos cristais de formazam. As placas foram mantidas sob leve agitação em um agitador de placas (CERTOMAT MO, B. Braun, Biotech Internacional, Alemanha) a 100 r.p.m. durante 20 minutos. Logo após, as placas foram levadas a um leitor de placas (BIO-RAD modelo 550, Japão) e a absorvância foi medida em 570nm (Esquema 1).

Foram feitas três repetições para cada experimento em dias diferentes. Os dados obtidos com os ensaios de citotoxicidade foram analisados através do teste estatístico One-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Os resultados foram expressos como a média das densidades ópticas (DO) e considerados significantes se $p < 0,05$. O programa utilizado para a análise estatística desses dados, bem como para a construção dos gráficos foi o "GraphPad Prism 4".

A percentagem de inibição da viabilidade celular causada pelas substâncias testadas foi calculada segundo a equação: $A-B/A*100$, onde **A**= a densidade óptica dos poços controles e **B**= densidade óptica dos poços experimentais. A partir destes dados obtidos também foi feita uma curva de dose-dependência e a EC_{50} de cada substância testada foi determinada pela seguinte equação: $E_{m\acute{a}x} * X / (EC_{50} + X)$, onde **E_{máx}**= efeito máximo de inibição do crescimento celular, **EC₅₀**= concentração necessária da substância testada para se ter 50% do efeito esperado e **X**= as concentrações testadas para cada substância (0,1µM; 1µM; 10µM e 100µM).



Esquema 1: Protocolo utilizado no ensaio de citotoxicidade do MTT.

4.6. "Patch clamp"

Para medição das correntes de K^+ do canal $K_v1.3$, foi utilizada a técnica de "Patch clamp" (HAMILL et al., 1981). As células L929 foram tripsinizadas, ressuspendidas e semeadas em placas de Petri estéreis (40x10mm). Após 30 minutos (período de adesão das células as placas de Petri) em estufa de cultivo celular, as placas foram levadas a um microscópio invertido (Olympicus, Japão) para medição das correntes de K^+ . Junto a este microscópio havia micromanipuladores, onde eram acopladas as micropipetas, uma para leitura de correntes e outra para a perfusão das substâncias teste. Toda esta plataforma se encontrava montado sobre uma mesa anti-vibratória e o sistema isolado por uma gaiola de Faraday. O "holder" acoplado ao micromanipulador cuja micropipeta fazia a leitura das correntes estava conectado um amplificador (EPC-9 da HEKA Instruments, Alemanha), que por sua vez encontrava-se conectado a uma placa conversora analógica digital (A/D) e esta a um computador. A taxa de conversão do sinal foi de 10kHz.

As micropipetas de vidro foram feitas em um puxador de pipetas (modelo PP-830 Narishige, Japão), utilizando-se capilares de vidro comum. A resistência de cada micropipeta variou de 1 à $3M\Omega$ (Fig. 7). Cada micropipeta continha uma solução interna cuja composição era: KCl 130mM; EGTA 5mM; HEPES 5mM; pH=7,3 ajustado com KOH. As células L929 ficavam banhadas em uma solução de banho composta por: NaCl 140mM; KCl 5mM; $MgCl_2$ 0,5mM; $CaCl_2$ 2mM; HEPES 5mM; Glicose 10mM; pH=7,3 ajustado com NaOH. As células que tiveram uma resistência de selamento inicial menor que $1G\Omega$ foram desprezadas. A configuração utilizada em todos os experimentos foi a de "whole-cell", nesta configuração, após a formação do selo de alta resistência, o gigaselo, que se forma ente as paredes de vidro do microeletrodo com a membrana plasmática, era feita uma pequena sucção que rompia o fragmento de membrana preso dentro do microeletrodo, havendo assim uma mistura da solução interna da pipeta com o conteúdo citoplasmático (Fig. 8). Diosgenina, solasodina e acetato de hecogenina a $10\mu M$ foram perfundidos no fluxo de aproximadamente 450 $\mu l/min$. O potencial de membrana foi mantido a -80mV. O protocolo de pulso utilizado foi o seguinte, era aplicado um pré-pulso de -120mV durante um segundo, para garantir que todos os canais entrassem em um estado inativado, logo em seguida era aplicado um pulso de +60mV por mais um segundo,

neste potencial os canais $K_v1.3$ são ativados. As leituras das correntes totais de K^+ foram realizadas em um computador e o programa utilizado na aquisição dos dados foi o Pulse-PulseFit (Instrutech, Alemanha). Para a análise estatística destes dados foram utilizados tanto o programa “Sigma Plot 2000” quanto o “GraphPad Prism 4”. O teste estatístico aplicado foi o “teste t de student” e os dados foram considerados estatisticamente significantes se $p < 0,05$.

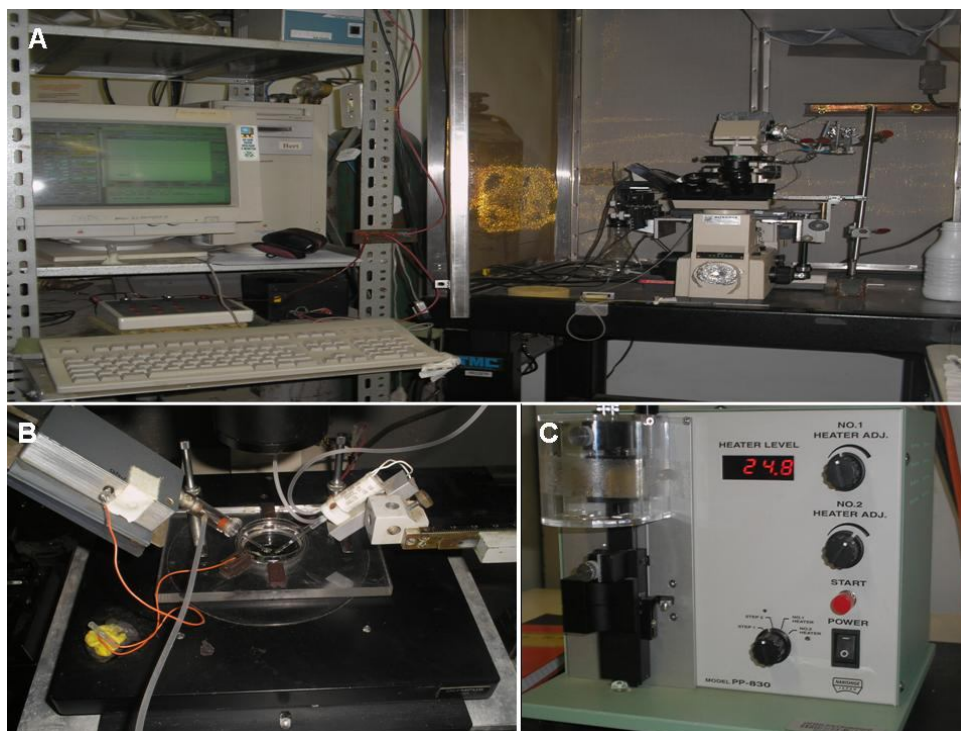


Figura 7: A plataforma de “Patch-clamp”. A) plataforma de “Patch clamp”, composta por um microscópio invertido, micromanipuladores, amplificador e computador onde eram realizadas as leituras das correntes de K^+ . O aparato estava montado sobre uma mesa anti-vibratória e o sistema isolado por uma gaiola de Faraday. B) Micropipetas de medição de correntes à esquerda e a direita

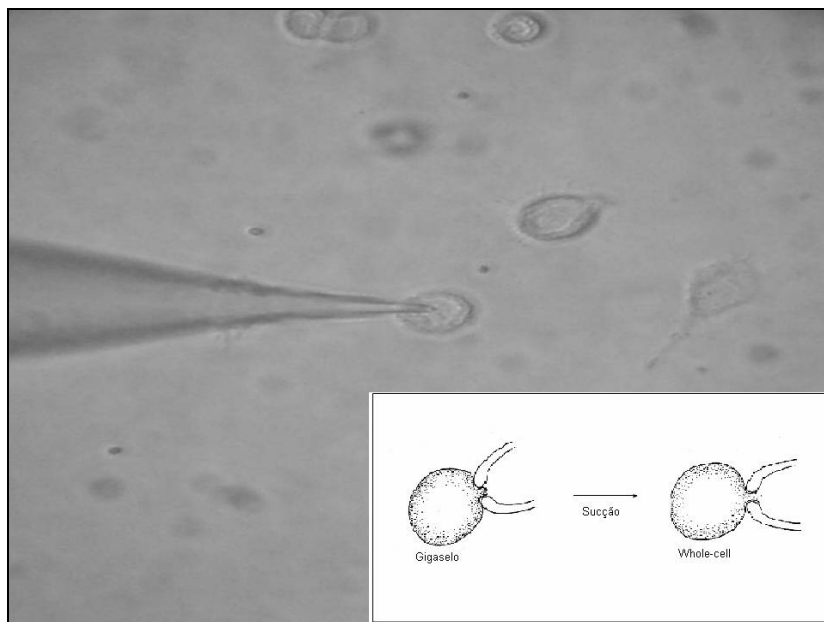


Figura 8: “Whole-cell”. Foto mostrando a configuração de “whole-cell” em células L929. Células de morfologia arredondada foram utilizadas nos experimentos. Logo abaixo pode ser visto um desenho esquemático desta configuração, após a formação do gigaselo, era feita uma pequena sucção e o fragmento de membrana rompido, logo após a solução interna da pipeta se mistura como o citoplasma. Aumento de

5. RESULTADOS

5.1. Ensaio de citotoxicidade

Diosgenina e solasodina quando incubadas por 24h, causaram uma redução significativa na viabilidade celular dos fibroblastos L929 a partir da concentração de 1 μ M (Graf. 1 e 2).

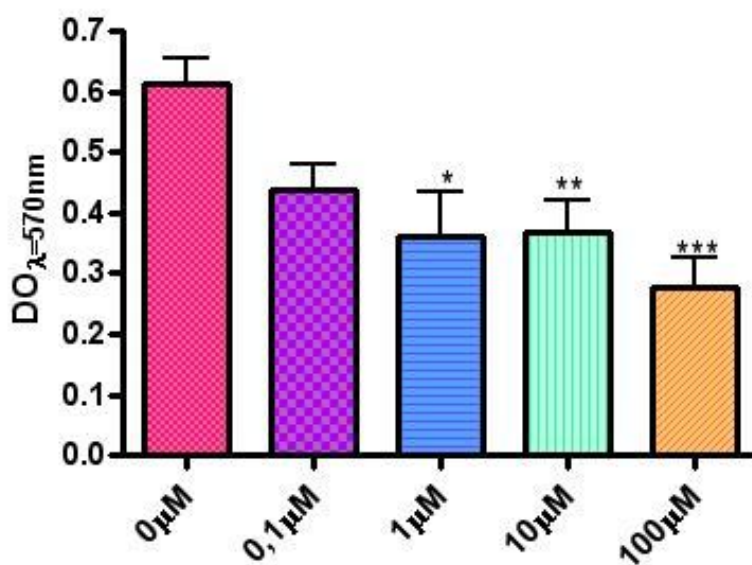


Gráfico 1: Efeito da diosgenina sobre a viabilidade de células L929. As barras representam a média das densidades ópticas \pm e.p.m de um n=3. *p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001.

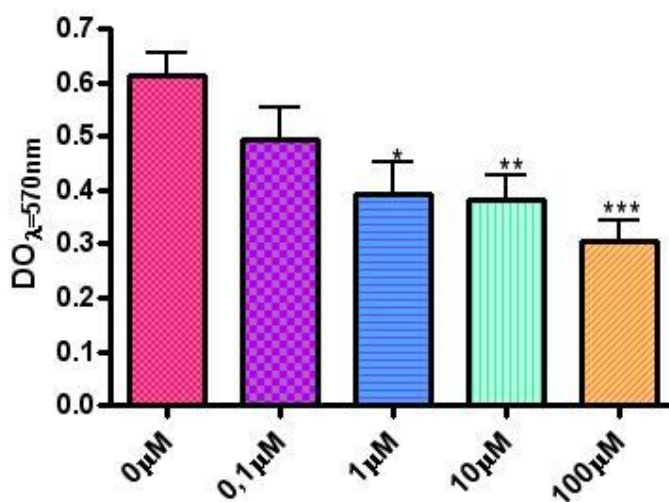


Gráfico 2: Efeito da solasodina sobre a viabilidade de células L929. As barras representam a média das densidades ópticas \pm e.p.m. de um $n=3$ * $p<0.05$; **

No entanto, o acetato de hecogenina e a ouabaína quando incubados por 24h causaram uma redução significativa na viabilidade celular dos fibroblastos L929 apenas na concentração de 100μM (Graf. 3 e 4).

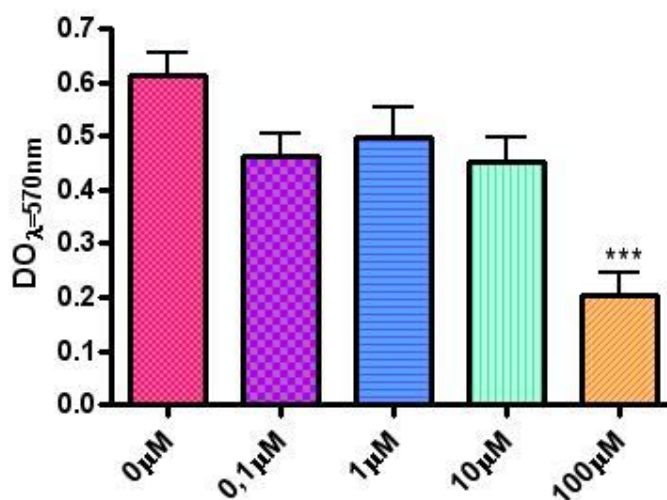


Gráfico 3: Efeito do acetato de hecogenina sobre a viabilidade de células L929. As barras representam a média das densidades ópticas \pm e.p.m. de um

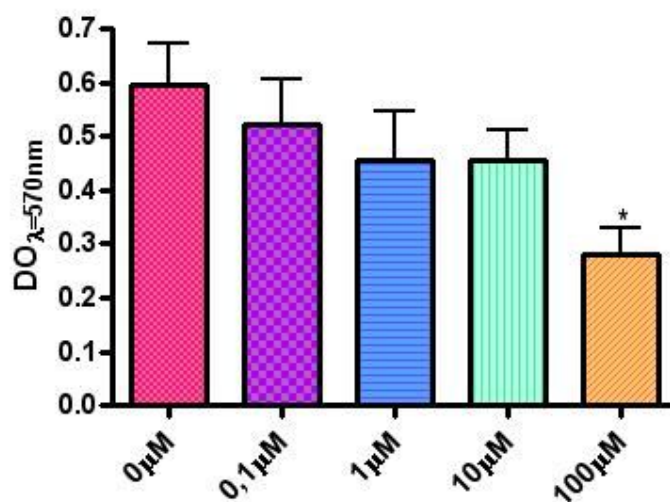


Gráfico 4: Efeito da ouabaína sobre a viabilidade de células L929. As barras representam a média das densidades ópticas \pm e.p.m de um n=3.*p<0,05.

O etanol não causou perda da viabilidade celular dos fibroblastos L929, quando incubado por 24h. O percentual máximo de etanol utilizado em nossas diluições foi de 10% (Graf. 5)

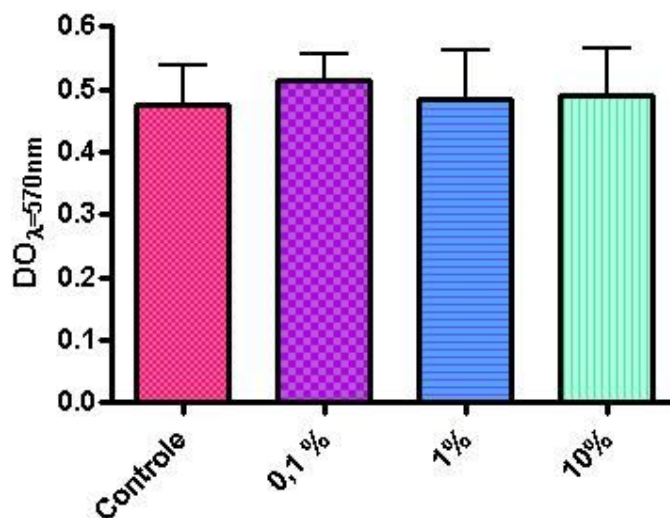


Gráfico 5: Efeito do etanol sobre a viabilidade de células L929. As barras representam a média das densidades ópticas \pm e.p.m de um n=3

Diosgenina (Graf. 6) e solasodina (Graf. 7) causaram redução da viabilidade celular dos fibroblastos L929 de maneira concentração-dependente, exceto o acetato de hecogenina (Graf. 8) e ouabaína (Graf. 9). Os valores médios para EC_{50} foram $0,34 \pm 0,20 \mu\text{M}$ para diosgenina e $4,17 \pm 2,06 \mu\text{M}$ para solasodina. Para o acetato de hecogenina e para a ouabaína não foi possível ser determinado um valor para EC_{50} . Estes valores de EC_{50} não atingiram significância estatística quando aplicado o teste “t de student”.

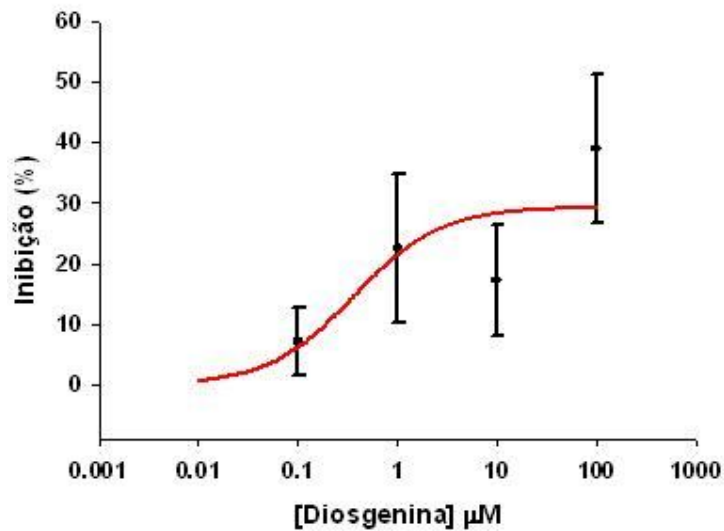


Gráfico 6: Curva dose-efeito diosgenina. Este gráfico foi construído de acordo com a seguinte equação $E_{m\acute{a}x} * X / (EC_{50} + X)$, onde $E_{m\acute{a}x}$ = efeito máximo de inibição do crescimento celular, EC_{50} = a metade da concentração necessária da substância testada para se ter 50% do efeito esperado e X = as concentrações testadas para

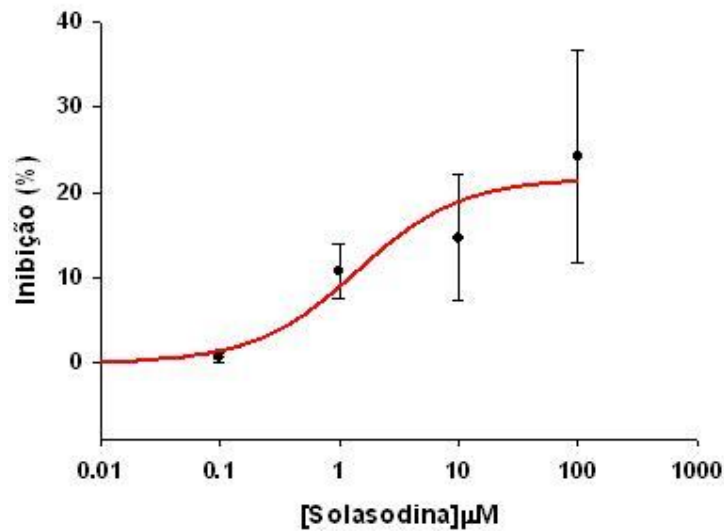


Gráfico 7: Curva dose-efeito solasodina. Este gráfico foi construído de acordo com a seguinte equação $E_{m\acute{a}x} * X / (EC_{50} + X)$, onde $E_{m\acute{a}x}$ = efeito máximo de inibição do crescimento celular, EC_{50} = a metade da concentração necessária da substância testada para se ter 50% do efeito esperado e X = as concentrações testadas para cada substância (0,1 μM; 1 μM; 10 μM e 100 μM). Os dados foram obtidos a partir de 3

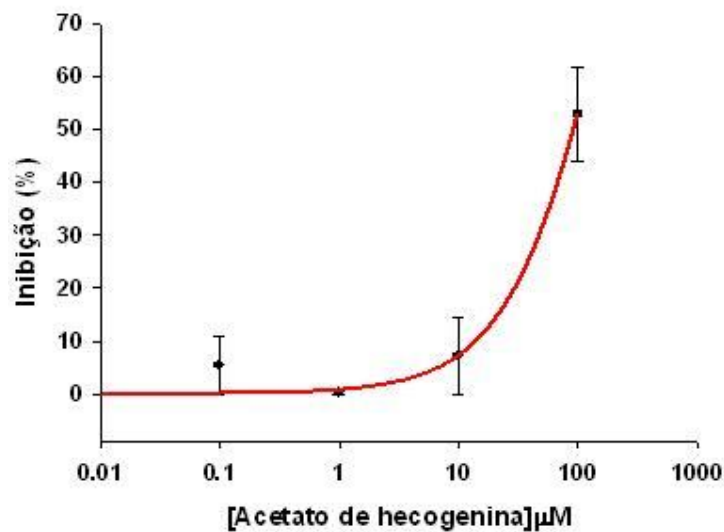


Gráfico 8: Curva dose-efeito acetato de hecogenina. Este gráfico foi construído de acordo com a seguinte equação $E_{m\acute{a}x} * X / (EC_{50} + X)$, onde $E_{m\acute{a}x}$ = efeito máximo de inibição do crescimento celular, EC_{50} = a metade da concentração necessária da substância testada para se ter 50% do efeito esperado e X = as concentrações testadas para cada substância (0,1 μM; 1 μM; 10 μM e 100 μM). Os dados foram obtidos a partir de 3

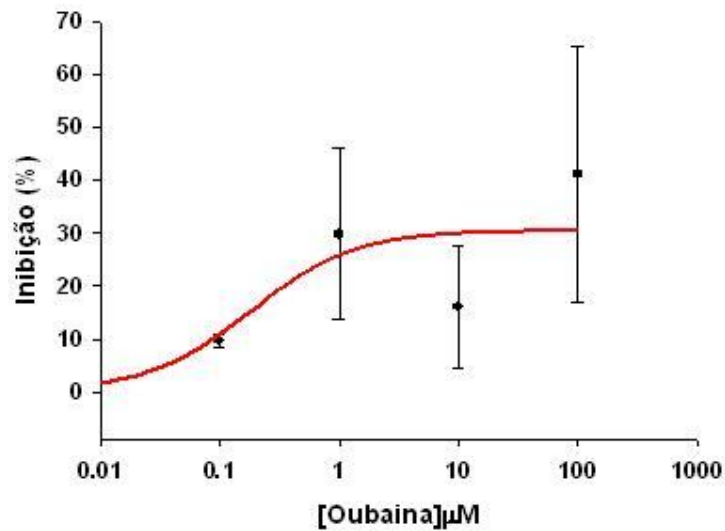


Gráfico 9: Curva dose-efeito ouabaína. Este gráfico foi construído de acordo com a seguinte equação $E_{m\acute{a}x} * X / (EC_{50} + X)$, onde $E_{m\acute{a}x}$ = efeito máximo de inibição do crescimento celular, EC_{50} = a metade da concentração necessária da substância testada para se ter 50% do efeito esperado e X = as concentrações testadas para cada substância (0,1μM; 1μM;

Quando os fibroblastos L929 foram incubados com 4-AP (5mM), um bloqueador de canal para potássio, por 48h houve uma pequena redução significativa da viabilidade celular (Graf. 10 A).

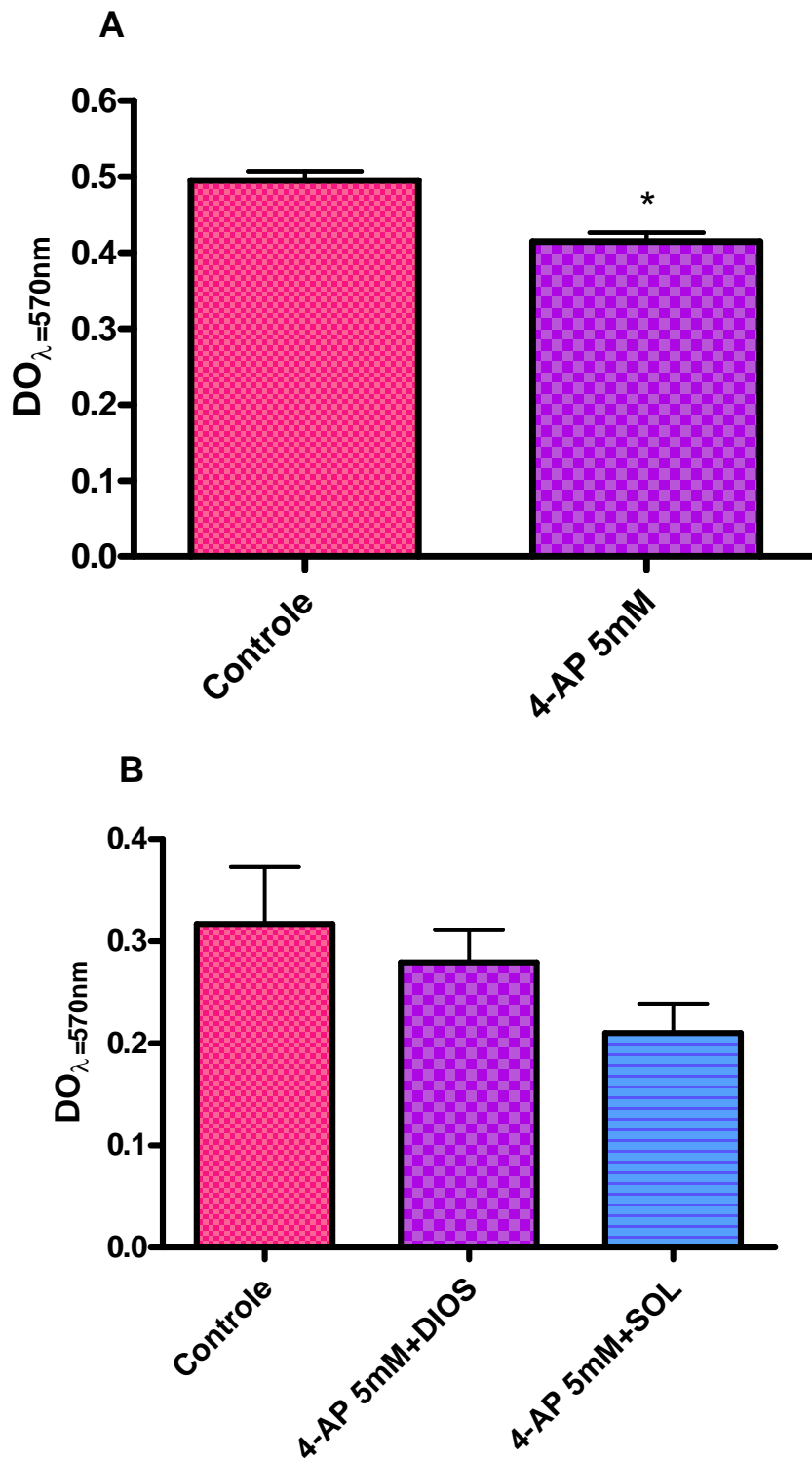


Gráfico 10: Efeito da 4-AP sobre a viabilidade dos fibroblastos L929.
 A) Redução da viabilidade celular durante a incubação com 4-AP por 48h.
 B) Co-incubação de 4-AP com diosgenina e solasodina em fibroblastos L929. As barras representam a média das densidades ópticas ± e.p.m de um n=3. DIOS=diosgenina; SOL=solasodina

Quando os fibroblastos L929 foram pré-incubados com 4-AP (5mM) por 24h e depois incubados com diosgenina (100µM) e solasodina (100µM) por mais 24h, não houve redução significativa da viabilidade celular (Graf. 10 B).

A tabela 1 mostra o percentual de inibição da viabilidade celular dos fibroblastos L929 causado por todas as substâncias testadas por meio do ensaio de citotoxicidade, redução do MTT. O percentual médio de inibição do crescimento foi calculado a partir de uma amostragem igual a três, seguindo a equação $A-B/A*100$, (ver métodos).

Tabela 1: Percentual médio de inibição da viabilidade celular dos

Diosgenina	0 μ M	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M	100 μ M
% \pm e.p.m	0	7,37 \pm 5,71	22,63 \pm 12,38	17,40 \pm 9,11	39,27 \pm 12,17

Solasodina	0 μ M	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M	100 μ M
% \pm e.p.m	0	0,58 \pm 0,58	10,80 \pm 3,20	14,65 \pm 7,36	24,25 \pm 12,41

Acetato de hecogenina	0 μ M	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M	100 μ M
% \pm e.p.m	0	5,41 \pm 5,41	0,25 \pm 0,25	7,28 \pm 7,28	52,92 \pm 8,79

Ouabaína	0 μ M	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M	100 μ M
% \pm e.p.m	0	9,74 \pm 1,21	29,84 \pm 16,18	16,12 \pm 11,50	41,13 \pm 24,05

4-AP	0 μ M	5mM
% \pm e.p.m	0	16,34 \pm 1,26

4-AP+DIOS/SOL	0 μ M	4-AP+DIOS 100 μ M	4-AP+SOL 100 μ M
---------------	-----------	-----------------------	----------------------

% ± e.p.m	0	10,30 ± 10,03	25,46 ± 17,61
-----------	---	---------------	---------------

DIOS=diosgenina; SOL=solasodina; OU=ouabaína.

5.2. Experimento Eletrofisiológico

Os fibroblastos L929 expressando permanentemente $K_v1.3$, utilizados nos experimentos para medição total da corrente de potássio tiveram um componente capacitivo lento de $22,75 \pm 2,8$ pF uma resistência em série de $6,7 \pm 0,40$ M Ω (n=10).

Como pode ser visto no Gráfico 11, diosgenina 10 μ M quando aplicada na face externa da membrana, não causou nenhum efeito na corrente de pico do $K_v1.3$. Acetato de hecogenina 10 μ M aplicado a face externa da membrana também não causou nenhum efeito sobre as correntes de pico do $K_v1.3$ (Graf. 12). A solasodina 10 μ M também não causou redução da corrente de pico do $K_v1.3$ (Graf. 13).

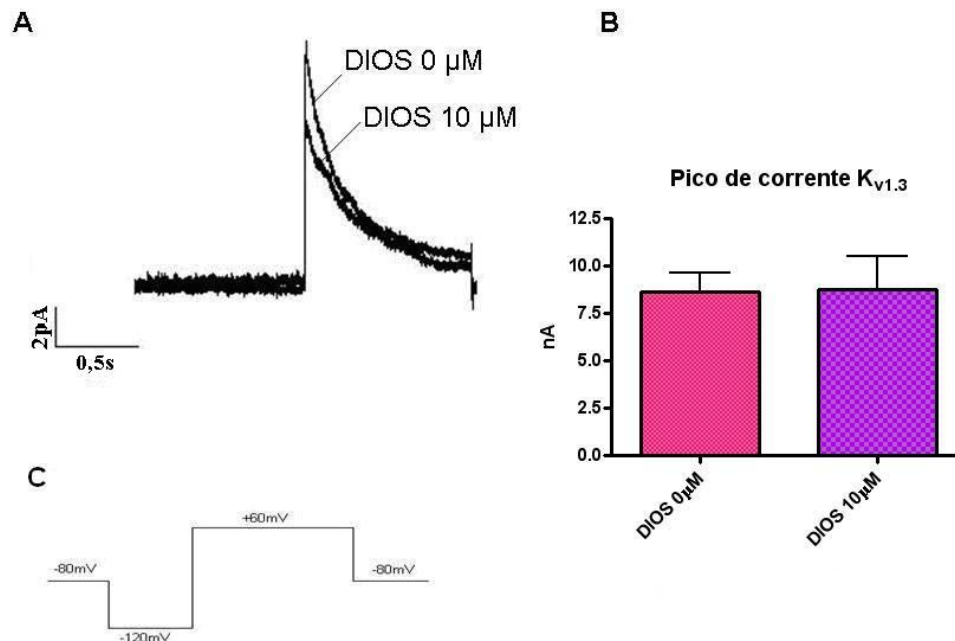


Gráfico 11: Efeito da diosgenina sobre o $K_v1.3$. A) Registro da corrente total de potássio em fibroblastos L929 antes e após a aplicação de diosgenina 10 μ M. C) Desenho do protocolo de pulso aplicado durante o teste. B) Média das correntes de pico \pm e.p.m na presença e ausência de

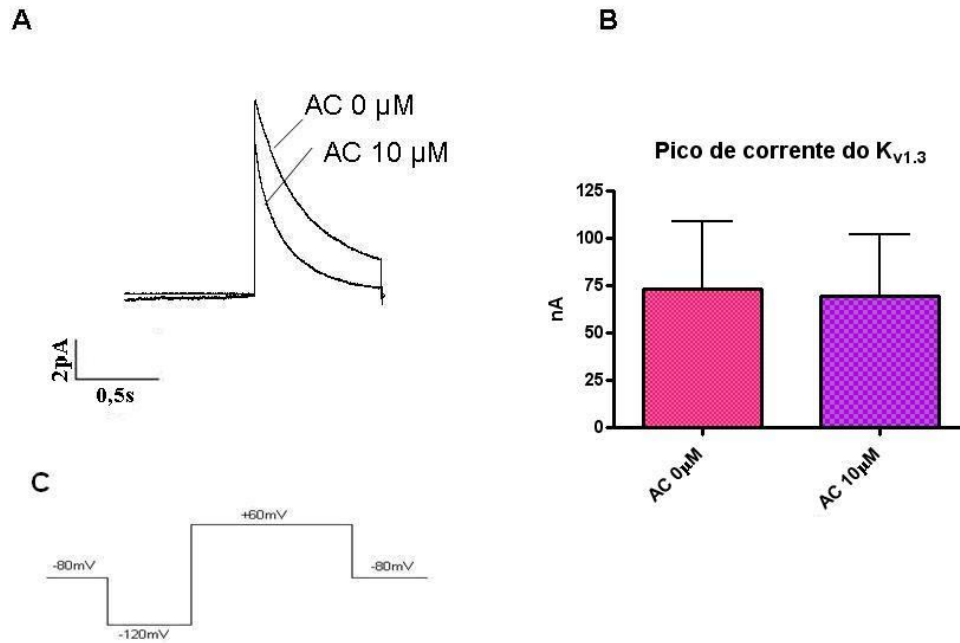


Gráfico 12: Efeito do acetato de hecogenina sobre o $K_{v1.3}$. A) Registro da corrente total de potássio em fibroblastos L929 antes e após a aplicação do acetato de hecogenina 10 μ M. C) Desenho do protocolo de pulso aplicado durante o teste. B) Média das correntes de pico \pm e.p.m na presença e ausência

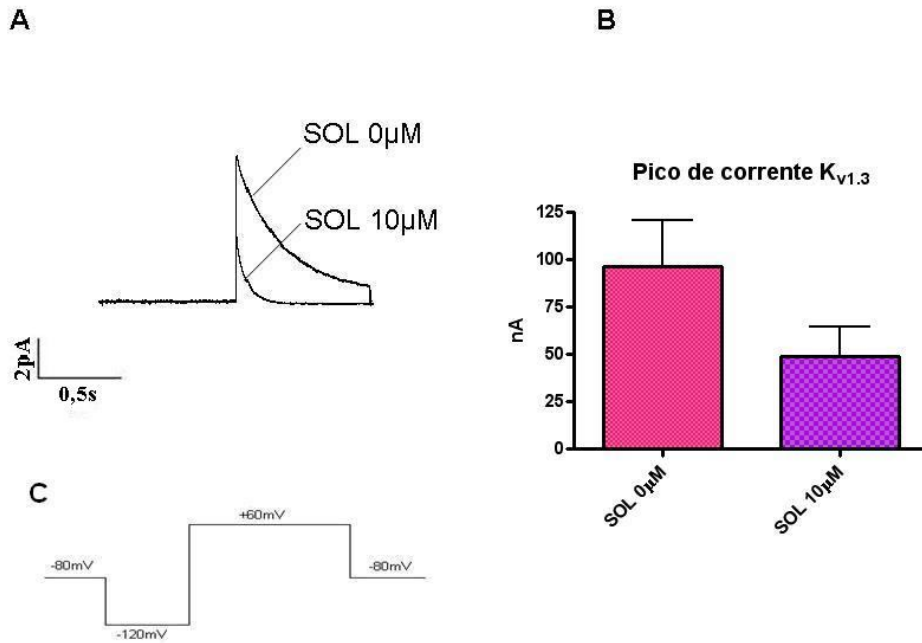


Gráfico 13: Efeito da solasodina sobre o Kv1.3. A) Registro da corrente total de potássio em fibroblastos L929 antes e após a aplicação de solasodina 10µM. C) Desenho do protocolo de pulso aplicado durante o teste. B) Média das correntes de pico ± e.p.m na presença e ausência de solasodina 10µM,

6. DISCUSSÃO

O ensaio de citotoxicidade do MTT é baseado na habilidade da desidrogenase mitocondrial de células viáveis em quebrar os anéis de tetrazólio, que dão uma cor amarela clara ao MTT, e formar cristais de formazan, que têm uma cor azul escura. Os cristais de formazan são excitados, ficando aderido a membranas celulares de células metabolicamente viáveis (LIU et al., 1997). Estes cristais são solubilizados na presença de detergente e o número de células vivas é proporcional ao formazan formado. Sendo assim, podemos dizer que as sapogeninas esteroidais testadas (diosgenina, solasodina e acetato de hecogenina) são citotóxicas para fibroblastos L929, pois causaram uma redução da viabilidade celular. Reafirmando os dados da literatura sobre estas substâncias serem indutoras de morte celular em outras linhagens celulares (LAVIE et al., 2001; MOALIC et al., 2001; CORBIERE et al., 2003; LEGER et al., 2004; TROUILLAS et al., 2005). A ouabaína (Fig. 6) é um glicosídeo cardiotônico, cuja estrutura química se assemelha à das sapogeninas (Fig. 4) aqui estudadas. Este glicosídeo cardiotônico é usado na terapêutica em baixíssimas concentrações e seu mecanismo de ação consiste no bloqueio da Na^+/K^+ ATPase, sendo o seu uso em altas concentrações letal (SCHEINER-BORIS & SCHONER, 2001; SIMÕES et al., 2004). Porém, nenhum dado a cerca de sua citotoxicidade sobre fibroblastos da linhagem L929 havia sido reportado e em nossos estudos a ouabaína foi citotóxica para esta linhagem celular. Mesmo a ouabaína e as demais sapogeninas aqui estudadas possuindo uma estrutura química semelhante, elas não seguiram um mesmo padrão de citotoxicidade, o que é um indício que elas estejam agindo por mecanismos de ação distintos.

No entanto, diosgenina e solasodina causaram uma redução da viabilidade celular de maneira concentração-dependente, enquanto que o acetato de hecogenina não agiu desta maneira. A diosgenina demonstrou ser a mais citotóxica das substâncias testadas, pois necessita de uma baixa concentração para que exerça 50% redução da viabilidade celular e isto é refletido pelo baixo EC_{50} calculado para esta substância que foi igual $0,34 \pm 0,20 \mu\text{M}$. Após a diosgenina a substância mais citotóxica foi solasodina com um $\text{EC}_{50}=4,17 \pm 2,06$. Não foi possível determinar um valor de EC_{50} para a ouabaína e para o acetato de hecogenina, uma vez que

estes compostos não causaram redução da viabilidade celular de maneira concentração-dependente.

Vários estudos têm apontado para uma participação dos canais para potássio dependente de voltagem (K_v) no processo de morte celular. Dentre eles o $K_v1.3$ tem sido o mais estudado. Mas, a forma como os K_v estão envolvidos nesse processo ainda é controversa, sendo necessário mais estudos acerca do assunto (SZBÓ et al, 2004; LANG et al., 2005; BURG et al., 2006). Para avaliar se o $K_v1.3$ estava envolvido na redução da viabilidade celular de fibroblastos L929 expressando este canal permanentemente, estas células foram co-incubadas com as sapogeninas mais citotóxicas (diosgenina e solasodina) e com um bloqueador para o $K_v1.3$, a 4-AP (5mM), por 48h.

A 4-AP (5mM), um bloqueador clássico para canal de potássio, ao ser incubada com as células L929 por um período de 48h causou uma redução da viabilidade celular das mesmas, mas ao ser co-incubada com as sapogeninas diosgenina (100 μ M) e solasodina (100 μ M) não houve perda da viabilidade celular.

Frente aos dados obtidos nos ensaios de citotoxicidade ainda verificamos se estas sapogeninas possuíam alguma ação direta sobre o canal $K_v1.3$. Para isto, utilizamos a técnica de "Patch-clamp", na configuração de "whole-cell" para medição das correntes totais de potássio. Diosgenina (10 μ M) e solasodina (10 μ M) causaram redução significativa da viabilidade celular no ensaio citotóxico do MTT, além de ser uma concentração bem superior ao EC_{50} de cada substância. Por estes motivos, esta concentração foi aplicada à face externa da membrana. Diosgenina (10 μ M) e solasodina (10 μ M) não tiveram efeito na corrente de pico do $K_v1.3$. Já o acetato de hecogenina 10 μ M, que não foi uma concentração citotóxica no ensaio de redução do MTT, também não teve efeito na corrente de pico do $K_v1.3$.

Ainda podemos especular que a diosgenina e a solasodina estão se difundindo pela membrana plasmática, pois elas apresentam uma estrutura anfifílica. É sabido que, esta estrutura anfifílica das sapogeninas faz com que elas sejam capazes de formar complexos com esteróides, proteínas e lipídios de membrana, o que confere a essas substâncias uma ação direta sobre a membrana plasmática, alterando a permeabilidade e às vezes causam a destruição da mesma (SIMÕES et. al, 2004).

No caso da diosgenina é provável que, além dela se difundir pela membrana plasmática dos fibroblastos L929, ela pode estar causando morte celular por ativar

uma via de sinalização desconhecida, mas que necessita do $K_v1.3$, uma vez que a co-incubação com o bloqueador deste canal, a 4-AP (5mM), resultou na perda da citotoxicidade tanto da diosgenina quanto do bloqueador. Porém, a diosgenina não age diretamente no canal como foi verificado no ensaio eletrofisiológico (Fig. 19).

O mesmo acontece para a solasodina, o efeito citotóxico foi anulado pela co-incubação com 4-AP (5mM). Além do mais, solasodina também não causou redução na corrente do $K_v1.3$. Com isso podemos especular que a solasodina pode estar se difundido pela membrana plasmática, devido a sua estrutura química, e ativando uma via de sinalização desconhecida que leva a morte dos fibroblastos L929 e esta via, assim como acontece para a diosgenina, é dependente da ativação do $K_v1.3$ em algum ponto (Fig. 19).

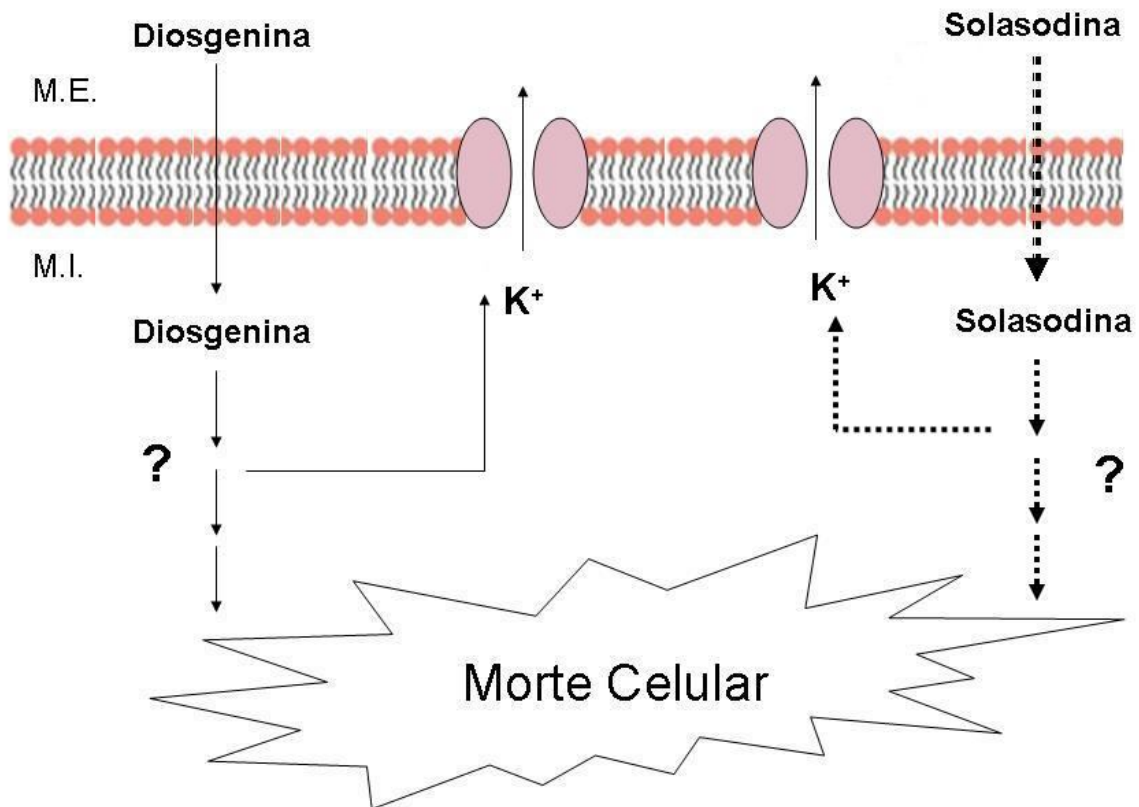


Figura 19: Provável mecanismo de ação para a morte celular induzida pela diosgenina () e pela solasodina () em fibroblastos L929 expressando Kv1.3. M.E.=meio extracelular; M.I.=Meio intracelular.

6.1. Perspectivas

As perspectivas para esse trabalho são realizar experimentos de fragmentação de DNA, pois desta forma poderemos ter uma idéia de qual é a forma de morte induzida pelas sapogeninas esteroidais em nosso modelo celular. Dessa forma poderemos saber se a morte induzida por elas é por apoptose ou se por necrose. Sendo assim, esclareceremos melhor se a participação do $K_v1.3$ é importante no processo de morte celular por apoptose, já que ao dados da literatura ainda são controversos acerca da participação dos canais para potássio dependentes de voltagem neste mecanismo. Além disso, faz se necessário estudar o comportamento do canal $K_v1.3$ quando aplicamos as sapogeninas esteroidais na face interna da membrana.

7. CONCLUSÃO

- Diosgenina é citotóxica para fibroblastos L929 nas concentrações de 1,10 e 100 μ M e essa citotoxicidade é dependente de concentração;
- A solasodina é citotóxica para fibroblastos L929 nas concentrações de 1,10 e 100 μ M e essa citotoxicidade é dependente de concentração;
- O acetato de hecogenina é citotóxico para fibroblastos L929 apenas na concentração de 100 μ M e essa citotoxicidade não é dependente de concentração;
- A ouabaína é citotóxica para fibroblastos L929 na concentração de 100 μ M e essa citotoxicidade não é dependente de concentração;
- A 4-AP (5mM) é citotóxica para fibroblastos L929;
- A diosgenina 10 μ M não alterou a corrente de pico do canal $K_v1.3$ em fibroblastos L929;
- A solasodina 10 μ M não alterou a corrente de pico do $K_v1.3$ expressos em fibroblastos L929;
- O acetato de hecogenina 10 μ M não alterou a corrente de pico do $K_v1.3$ expressos em fibroblastos L929.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AU, A. L. S. et al. Activation of iberotoxin-sensitive, Ca^{2+} -activated K^+ channels of porcine isolated left anterior descending coronary artery by diosgenin. **Eur J Pharmacol**, 502:123-133, 2004.

ALEXANDER, S. P. H.; MATHIE, A.; PETERS, J. A. Guide to receptors and channels. **Br J Pharmacol**. 2 ed., 147(Suppl.3), S1-S180, 2006.

BOCK, J. et al. Actinomycin D-induced apoptosis involves the potassium channel $\text{K}_v1.3$. **Biochem Biophys Res Commun**, 295: 526-531, 2003.

BURG, E. D.; REMILLARD, C. V.; YUAN, J. X. J. K^+ channels in apoptosis. **J Membrane Biol**, 209: 3-20, 2006.

CORBIERE, C. et al. Induction of antiploriferative effect by diosgenin through activation of p53, release of apoptosis-inducing factor (AIF) and modulation of caspase-3 activity in different human cell line. **Cell Res**, 14(3): 188-1896, 2004.

HAMILL, O. P. et al. Improved Patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. **Pflugers Arch**, 391:85-100, 1981.

HILLE, B. **Ion channels of excitable membranes**. 3 ed. Massachusetts: Sinauer Associates, INC., 2001.

HOLMES, T. C.; FADOOL, D. A.; LEVITAN, I. B. Tyrosine phosphorylation of the $\text{K}_v1.3$ potassium channel. **J Neurosci**, 16: 1581-1590, 1996.

HOSHI, T.; ZAGOTA, W. N.; ALDRICH, R. W. Biophysical and molecular mechanisms of the shaker potassium channel inactivation. **Science**, 250: 533-538, 1990.

HU, C. L. et al. 4-Aminopyridine, a K_v channel antagonist, prevents apoptosis of rat cerebellar granule neuron. **Neuropharmacol**, 51: 737-746, 2006.

JENKINSON, D. H. Potassium channels – multiplicity and challenges. **Br J Pharmacol**, 147: 563-571, 2006.

JIANG, B. et al. Suppression of cell proliferation with induction of p21 by Cl^- channel blockers in human leukemic cells. **Eur. J Pharmacol**, 488: 27-24, 2004.

KLAASSEN, C. D. & WATKINS, J. B. **Toxicologia: a ciência básica dos tóxicos de Casarett & Doull's**. 5ª ed. Portugal: McGraw-Hill Ltda., 2001.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, 26: 239-257, 1972.

KONI, P. A. et al. Compensatory anion currents in $K_v1.3$ channel deficient thymocytes. **J Biol Chem**, 278: 39443-394451, 2003.

LANG, F. Ion channels in cell proliferation and apoptotic cell death. **J Membrane Biol**, 20: 147-157, 2005.

LAVIE, Y. et al. Inhibitory effect of steroidal alkaloids on drug transient transport and multidrug resistance in human cancer cells. **Anticancer Res**, 21 (2A): 1189-1194, 2001.

LEE, K. R. et al. Glycoalkaloids and metabolites inhibit the growth of human colon (HT29) and liver (Hep62) cancer cells. **J Agric Food Chem**, 52 (10): 2832-2839, 2004.

LEGER, D. Y. et al. Diosgenin induces cell cycle arrest and apoptosis in HEL cells with increase in intracellular calcium level, activation of cPLA2 and COX-2 overexpression. **Int J Oncol**, 25 (3): 555-562, 2004.

LIU, Y. et al. Mechanism of cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. **J Neurochem**, 69 (2): 581-593, 1997.

MARKER, R. E. et al. Diosgenin. **J Am Chem Soc**, 62: 2525-2532, 1940.

MELO, P. S. et al. Cytotoxicity of the phytosterol diosgenin and its derivatives in rat cultured hepatocytes and V79 fibroblasts. **Human Exp Toxicol**, 21(5): 281-288, 2004.

MILLER, C. An overview of the potassium channel family. **Gen Biol**, 4: 0004.1-000 4.5, 2000.

MOLIAC, S. et al. A plant steroid Diosgenin, induces apoptosis, cell cycle arrest and COX activity in osteosarcoma cells. **FEBES Lett**, 506 (3): 225-230, 2001.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, 65: 55-63, 1983.

NILUS, B.; DROOGMANS, G. Ion Channels and their functional role in vascular endothelium. **Physiol Rev**, 81: 1415-1459, 2001.

OLCESE, R. et al. Correlation between charge movement and ionic current during slow inactivation in shaker K⁺ channels. **J Gen Physiol**, 110: 579-589, 1997.

PANYI, G.; VARGA, Z.; GÀSPÁR, R. Ion channels and lymphocyte activation. **Immunol Lett**, 92: 55-56, 2004.

PANYI, G. Biophysical and pharmacological aspects of K⁺ channels in lymphocytes. **EBSA**, 34: 515-529, 2005.

PERES, C. M.; CURI, R. **Como Cultivar células**. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN, 2005.

RUS, H. et al. The voltage-gated potassium channel K_v1.3 is highly expressed on inflammatory infiltrates in multiple sclerosis brain. **PNAS**, 102: 11094-11099, 2005.

SCHEINER-BOBIS, G.; SCHONER, W. A fresh facet for ouabain action. **Nature**, 7 (12):1288–1289, 2001.

SCHWARZ, A. et al. Impaired female sexual behavior of rat offspring exposed to *Solanum lycocarpum* unripe fruits during gestation and lactation: lack of hormonal and fertility alterations. **Pharmacol Biochem Behav**, 81: 928-934, 2005.

SHEN, M. R. et al. Differential expression of volume-regulated anion channels during cell cycle progression of human cervical cancer cell. **J Physiol**, 529 (2): 385-394, 2000.

SIMÕES, M. R. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre; Editora UFRGS, 2004.

STARKUS, J. G. et al. Ion conduction through C-type inactivation Shaker channels. **J Gen Physiol**, 110: 539-550, 1997.

SZBÓ, I.; ADAMS, C.; GULBINS, E. Ion channels and membrane rafts in apoptosis. **Eur J Physiol**, 448:304-312, 2004.

TAKEMURA, G.; FUJIWARA, H. Morphological aspects of apoptosis in heart diseases. **J Cell Mol Med**, 10 (1): 56-57, 2006.

TROUILLAS, P. et al. Structure–function relationship for saponin effects on cell cycle arrest and apoptosis in the human 1547 osteosarcoma cells: a molecular modelling approach of natural molecules structurally close to diosgenina. **Bioorg Med Chem**, 13: 1141-1149, 2005.

VARELA, D. et al. NAD(P)H oxidase derived H₂O₂ signals chloride channel. **J Biol Chem**. 279: 13301-13304, 2004.

VINCENTE, R. et al. Pattern of K_v beta subunit expression in macrophages depends upon proliferation and mode of activation. **J Immunol**, 174: 4736-4744, 2005.

WANG, L. D. et al. Antifungal effect of three natural products on the genetic substance of *Saccharomyces cerevisiae* GL7 and *Prototheca wickerhamii*. **Yao Xue Xue Bao**, 35 (11): 860-863, 2000.

WANG, Y. J. et al. Diosgenin, a plant-derived sapogenina, stimulates Ca²⁺-activated K⁺ currents in human cortical HCN-1A neuronal cell. **Planta Med**, 72: 1-7, 2006.

WONDERGEM, R. et al. Blocking swelling-activated chloride current inhibits mouse liver cell proliferation. **J Physiol**, 535: 661-672, 2001.

XU, J. et al. The voltage-gated potassium channel Kv1.3 regulates peripheral insulin sensitivity. **PNAS**, 101 (9): 3112-3117, 2004.

YU, F. H.; CATTERALL, W. A. The VGL-chanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. **Sci STKE**, 2004 (253): p. re15, 2004.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)