

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

GIOVANNA GUSMÃO ZENAIDE NÓBREGA

PAPEL DA TIROXINA EM RATOS SEXUALMENTE IMATUROS

Recife

1998

GIOVANNA GUSMÃO ZENAIDE NÓBREGA

PAPEL DA TIROXINA EM RATOS SEXUALMENTE IMATUROS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Teresa Jansem de Almeida Catanho

**Recife
1998**

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

N754p Nóbrega, Giovanna Gusmão Zenaide.
Papel da tiroxina em ratos sexualmente imaturos / Giovanna Gusmão
Zenaide Nóbrega. – 1998.
61 f.: il.; 30 cm.

Orientadora: Maria Teresa Jansem de Almeida Catanho.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 1998.
Inclui referências.

1. Hormônios tireoidianos. 2. Células intersticiais testiculares. 3.
Receptores do LH. I. Catanho, Maria Teresa Jansem de Almeida
(Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2016-170)

GIOVANNA GUSMÃO ZENAIDE NÓBREGA

PAPEL DA TIROXINA EM RATOS SEXUALMENTE IMATUROS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 13/11/1998

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Maria Bernadete de Souza Maia (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Silene Carneiro do Nascimento (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Emerson Araújo de Azevedo
Universidade Federal de Pernambuco

À Deus,

Senhor Jesus Cristo, cheguei ao término de uma longa caminhada. Testemunhaste a minha luta. Conheces a minha história e iluminaste os meus passos. Na minha insegurança, dava-me coragem. No meu desânimo, dava-me esperança e força para prosseguir. Só tenho a te agradecer por esta vitória e a contar com a tua presença por toda a minha vida.

Aos meus pais, **Raul Nóbrega Filho e
Violeta Gusmão Zenaide Nóbrega** (*in memoriam*),

Tenho certeza que vocês são capazes de perceber o que sinto nesta minha conquista. Sei que vocês, mesmo na ausência física, me acompanharam sempre. Sem as vossas forças, esta realização não teria sido possível. Minha maior vontade é trazê-los de volta, mas, aí vem o conforto: A morte não é o fim. O amor tem maior dimensão. O tempo não é forte o bastante para apagar as recordações, faz com que seja colhido o que vocês com amor semearam.

AGRADECIMENTOS

À **prof. Dra. Maria Teresa Jansem de Almeida Catanho**, pelos ensinamentos, atenção, apreço e dedicação

Ao **Departamento de Ciências Farmacêuticas**, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao **Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq)**, pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização desta dissertação.

Ao **Departamento de Biofísica e Radiobiologia**, pela colaboração na execução desta dissertação.

Ao **Laboratório de Biofísica Celular e Molecular**, que mesmo diante de pensamentos, objetivos e sonhos diversos, esteve sempre em grupo.

A minha avó **Marion Gusmão Zenaide**, primeira pessoa a me ensinar a desafiar as impossibilidades.

A minha avó **Júlia Guerra Nóbrega**, pelo seu exemplo de fé, dedicação a Deus e infinita caridade.

Aos meus tios **Apolônio Gusmão Zenaide, Rozane Lamenha Zenaide, Wamberto Tadeu Gusmão Zenaide, Solange Rodrigues Zenaide, Maria Helena Zenaide Barbosa**, minha irmã **Sandra Nóbrega Sobral**, meu cunhado, **Renato Sobral da Silva Neto** e minhas amigas **Hermosa Maria Soares França e Maria das Graças Nascimento**, que juntos somaram dia a dia a realização deste trabalho.

A **minha família**, pelos ensinamentos de dignidade tão necessários à formação de um verdadeiro profissional.

À **Jeferson Macena Albuquerque Júnior**, pela paciência, compreensão, e por nunca ter me deixado desistir quando os obstáculos se tornavam mais forte que o meu próprio eu.

Ao **Prof. Dr. Clovis Peppe**, pelo estímulo e confiança depositados no início da minha carreira científica.

À **Elaine Farias Neves de Barros Carvalho**, pelo nosso entendimento com os anjos, e ainda, pela colaboração e incentivo essenciais ao término deste trabalho.

À **Grace Mary Lima de Souza**, pelo auxílio e amizade concedida de uma maneira tão expansiva.

À **Antônio Augusto Jordão** , pela sua incansável boa vontade e paciência no auxílio de informática. A todos os **colegas** do Laboratório de Biofísica Celular e Molecular do Departamento de Biofísica e Radiobiologia, pelos bons e maus momentos passados juntos.

A todos os **colegas do Mestrado de Ciências Farmacêuticas**, pelas vitórias e angústias compartilhadas, e por tornarem suportáveis certos momentos conflitantes.

A **todos** que contribuíram direto ou indiretamente para a realização deste trabalho.

“Que os nossos esforços desafiem as
impossibilidades” (Charlin Chaplin)

RESUMO

Os hormônios tireoidianos são essenciais para um crescimento e desenvolvimento normal pós natal. Várias investigações têm tentado estabilizar o papel específico dos hormônios tireoidianos nas funções e desenvolvimento do trato reprodutor masculino. Os hormônios tireoidianos possivelmente exercem uma ação recíproca entre o esteróide testicular e as células de Sertoli durante o período prematuro. O presente estudo tentou avaliar o efeito da tiroxina sobre os níveis de testosterona no soro e no fluido intersticial testicular (FIT) em ratos machos. O hipertireoidismo foi induzido com a tiroxina (20 µg/kg) em ratos Wistar machos com 22 dias de idade, pesando 80g por um período de 5, 10, 15 e 20 dias de tratamento. Os grupos controles receberam solução salina 0,1 ml/100g do peso corporal, como veículo. Após cada período de tratamento, os animais foram pesados e sacrificados, para obtenção do sangue, e os testículos foram pesados, para coleta do fluido intersticial testicular (FIT). Os nossos resultados mostram que a tiroxina em ratos sexualmente prematuros, promove um aumento de testosterona, tempo-dependente. Observa-se também, que a nível testicular, no FIT, os níveis de testosterona encontram-se elevados. A tiroxina promoveu um aumento do peso corporal e testicular, modificando a função metabólica. Estudos evidenciaram que os receptores de LH e hCG é regulado em homogeneizado celular de testículo em ratos tratados com tiroxina por 20 dias. A capacidade de ligação específica foi obtida pela metodologia envolvendo a saturação de receptores do LH e hCG, aumentando a concentração de LH marcado e hCG não marcado. Outros resultados mostram que a tiroxina é capaz de alterar os níveis de receptores de LH de alta afinidade presentes em homogeneizado testicular, promovendo uma redução da capacidade de ligação específica (B_{max}), obtido através da Análise de Scatchard. Conclui-se que a tiroxina pode acelerar a formação de testosterona no lumen intersticial no processo de maturação sexual, modificando possivelmente o mecanismo intracelular das células testiculares, e que a capacidade de ligação do LH e hCG é alterada após o tratamento com tiroxina.

Palavras chave: Hormônios tireoidianos. Células intersticiais testiculares. Receptores do LH.

ABSTRACT

Thyroid hormones are essential for normal post-natal growth and development. Several investigators have attempted to establish a specific role of thyroid hormones in reproductive tract growth and function. The thyroid hormones possibly exert a reciprocal action between the testicular steroid and the Sertoli cells during the early period. The present study tried to evaluate the effect of the thyroxine over the serum levels of the testosterone and in the interstitial fluid of the testis in male rats. The hyperthyroidism was induced with the thyroxine (20 µg/kg), in Wistar male rats 22 days of age, weighing 80g for a period of 5, 10, 15 and 20 days. The control group received 0.9% saline solution as vehicle. After each treatment period, the animals were weighed and killed to obtainment of blood, and the testis was weighed to collect of testicular interstitial fluid (TIF). These results show that the thyroxine in premature rats, promote an increase of testosterone, dependent time. It is observed either an increase on testosterone level in the TIF. The thyroxine promoted an increase the corporeal and testicular weight, capable in modify a metabolic function. In the previous study the regulation of LH and hCG receptors by homogenized testicular cells of the 20 days treatment. The specific binding capacity was also obtained by LH and hCG receptors with increasing concentration LH labelled and hCG no labelled. The Scatchard analysis of the saturated curve has show that a affinity constant (K_a) is around 10^8 M^{-1} . This result demonstrated that the control present more binding specific than thyroxine which is a maximum induction of hCG receptor. These results indicate that the thyroxine is able to accelerate the formation the interstitial lumen in the process of sexual maturation, altering possibly the intra-cell mechanism of testicular cells, and the LH and hCG binding capacity is changed after the thyroxine treatment.

Key-Words: Thyroid hormones. Testicular interstitial Cells. LH receptors.

LISTA DE FIGURAS

A -Curva Representativa da determinação dos níveis de testosterona total.....	33
1 -Determinação do peso corporal em ratos do grupo controle após o tratamento com tiroxina, em 5, 10, 15 e 20 dias.....	38
2 -Determinação do peso testicular em ratos do grupo controle após o tratamento com tiroxina, em 5, 10, 15 e 20 dias.....	39
3A -Ação da tiroxina sobre o peso testicular (g)	40
3B -Determinação do índice de relação peso corporal vs peso testicular em função do tempo de tratamento.....	40
4 -Concentrações séricas de testosterona nos animais do grupo controle e após tratamento com a tiroxina em 5,10,15 e 20 dias de tratamento.....	41
5 -Concentrações de testosterona no FIT nos animais do grupo controle e após tratamento com a tiroxina em 5,10,15 e 20 dias de tratamento.....	42
6A - Análise de Scatchard da curva de saturação ¹²⁵ I-LH-receptor em homogeneizado testicular de ratos do grupo controle.....	43
6B - Análise de Scatchard da curva de saturação ¹²⁵ I-LH-receptor em homogeneizado testicular de ratos tratados com tiroxina.....	43
7A -Curva de deslocamento do complexo ¹²⁵ I-hCG - receptor pelo hCG não marcado em homogeneizado celular testicular de ratos controle jovens.....	44
7B -Curva de deslocamento do complexo ¹²⁵ I-hCG – receptor pelo hCG não marcado em homogeneizado celular testicular de ratos jovens tratados com tiroxina.....	45

ABREVIATURAS

ABP	-	Proteína Ligadora de Andrógeno
AMPc	-	Adenosina monofosfato
β EP	-	β -Endorfinas
DHT	-	Diidrotestosterona
FIT	-	Fluido Intersticial do Testículo
FSH	-	Hormônio Folículo Estimulante
GH	-	Hormônio do Crescimento
GMP	-	Guanosina Monofosfato
GnRH	-	Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
hCG	-	Gonadotropina Coriônica Humana
^{125}I	-	Iodo 125
<i>ip</i>	-	Intraperitoneal
LH	-	Hormônio Luteinizante
5-MDS	-	5-Monodeiodinases
n	-	Número de animais utilizados no experimento
PTU	-	Propiltiouracil
p	-	Valor da significância estatística
RIE	-	- Radioimunoensaio
r T ₃	-	Triiodotironina reverso
T ₃	-	Triiodotironina
T ₄	-	Tiroxina
TBG	-	Proteína Fixadora de Tiroxina
TBPA	-	Prealbumina Fixadora de Tiroxina
TTR	-	Transterrina
TRH	-	Hormônio Liberador da Tireotropina
TSH	-	Hormônio Tireotrófico
vs	-	Versus

Sumário

1-INTRODUÇÃO	15
1.1-Considerações Gerais	16
1.1.1-Controle da glândula tireóide pelo hormônio tireoestimulante (TSH)	16
1.1.2-Síntese e secreção dos hormônios tireoidianos	16
1.1.3-Transporte dos hormônios tireoidianos	18
1.1.4-Metabolização dos hormônios tireoidianos	18
1.1.5-Ações das gonadotrofinas sobre o testículo	20
1.1.6-Fisiologia endócrina da testosterona	22
1.1.7-Os Hormônios tireoidianos e o sistema reprodutor masculino	23
1.2-Considerações Gerais Sobre Receptores	24
1.2.1-Parâmetros de ligação droga-receptor	24
1.2.2-Análise de Scatchard	26
2-OBJETIVOS.	28
2.1-Objetivos Gerais	28
2.2-Objetivos Específicos	28
3-MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1.-Material	29
3.1.1-Materiais diversos	29
3.1.2-Aparelhos diversos	29
3.2-Métodos	29
3.2.1-Animais	29
3.2.2-Tratamento dos animais	30
3.2.3-Determinação do fluido intersticial testicular	31
3.2.4-Radioimunoensaio(RIE) da testosterona	33
3.2.5-Dosagem de proteínas	34
3.2.6-Homogeneização celular de testículos	34
3.2.6.1-Determinação da capacidade de ligação do LH a nível testicular	36
3.2.6.2-Análise de Scatchard	36
3.2.6.3-Curva de deslocamento	37
3.2.7-Análise Estatística	37
4-RESULTADOS	38

4.1-Efeitos da tiroxina sobre o peso corporal	38
4.2-Efeitos da tiroxina sobre o peso testicular em ratos prematuros	39
4.3-Efeito do tratamento da tiroxina sobre a concentração sérica de testosterona	41
4.4-Efeito do tratamento com a tiroxina sobre os níveis de testosterona no fluido intersticial testicular	43
4.5-Estudo de receptores de LH a nível testicular	43
4.6-Curva de deslocamento da ligação ¹²⁵ I-hCG	44
5-DISCUSSÃO	46
6-CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

A função testicular depende da integridade do eixo hipotálamo-hipofisário, onde se produzem os hormônios que mantêm suas estruturas funcionando normalmente. O hipotálamo secreta o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), responsável pela síntese e liberação do hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH) a nível hipofisário. O hipotálamo também secreta e libera o hormônio liberador da tireotrofina (TRH) e por via porta-hipofisária, ativa a síntese e liberação de TSH pela adeno-hipófise (AIZAWA et al, 1984).

Friedgood (1936) propôs a existência de um controle da função hipofisária pelo sistema neurovascular, citada por Smith (1932), onde ele mostrou a necessidade da manutenção de cerca de 30% do funcionamento da adeno-hipófise para um desempenho normal das funções sexuais no rato. Essa hipótese foi confirmada com a identificação do FSH e LH.

O hipotálamo através de modulações hormonais e sinais nervosos controlam quase toda a secreção hipofisária. Em se tratando da função do trato reprodutor essa sinalização é feita através do sistema límbico (**HALBE, WIEBE, 1983**).

Silverman (1989) demonstrou com técnica de imunocitoquímica, e com a ajuda de anticorpos anti-GnRH, fibras que chegam à hipófise posterior e à porção anterior do hipotálamo, provenientes do hipotálamo posterior. Essas fibras se projetam à regiões pertencentes ao sistema límbico.

A relação do GnRH com a reprodução foi elucidada ao encontrar esse neuropeptídeo e imunorreatividade a ele nas gônadas e hipófise (**HEDGER et al, 1990**).

Sharp et al (1983) encontraram nas células de Leydig receptores de membrana para o GnRH. Essas células são reponsáveis pela síntese de testosterona. Ainda **Sharp (1983) e Hedge (1990)** detectaram GnRH no fluido intersticial do testículo (FIT), sugerindo que o GnRH seria produzido nos túbulos seminíferos pelas células de Sertoli. Esse processo foi ainda mais demonstrado através de estudos in vitro e in vivo, comprovando a atuação do GnRH no testículo, alterando o número de receptores para LH/hCG, como também para a prolactina (**AUCLAIR et al, 1977**), sugerindo que o GnRH pode interferir na esteroidogênese da testosterona.

É também conhecida a ação de β -endorfinas (β EP) na regulação da função reprodutiva, modulado pelo eixo hipotálamo-hipófise (**Fabbri et al, 1988**). Evidências imunorreativas mostraram a presença de β EP em extratos orgânicos reprodutivos de ratos (**Sharp et al, 1980**), e demonstrações imunohistoquímicas revelam que esse peptídeo está presente nas células de

Leydig do rato adulto e fetal (SHAHA et al, 1984; Tsong et al, 1982 Shaha). A síntese das β EP foi detectada nas células de Leydig de ratos adultos, onde foi localizado a proopiomelanocortina (POMC), precursor da síntese das β EP (PINTAR et al, 1984).

1.1 Considerações Gerais

1.1.1 Controle da glândula tireóide pelo hormônio tireoestimulante (TSH).

O controle da glândula tireóide pelo TSH foi evidenciado por Lissitzky et al (1971), onde verificaram a importância do AMPc como mediador desse processo. Mais tarde, Uller et al (1977); Belfiore et al (1984) e Black e et al (1984) confirmaram a importância do TSH na secreção dos hormônios tireoidianos *In vivo*. O TSH produzido pela adenohipófise, é controlado pelas células neurosecretoras do hipotálamo, com a ajuda do TRH, o maior regulador positivo da síntese e secreção do TSH. O hormônio tireoestimulante (TSH) estimula a bomba de iodo, e a sua captura é também aumentada pelo receptor do anticorpo TSH estimulado.

Há evidências de alterações na regulação do TSH e mudanças bioquímicas compatíveis com a redução de disponibilidade dos hormônios tireoidianos em ratos (LI et al, 1980) com doenças não tireoidianas.

Os hormônios tireoidianos aceleram o metabolismo dos hormônios esteroidais e da insulina, de maneira que os estrogênios são capazes de inibir o TRH e conseqüentemente a secreção de TSH (MORLEY, 1981).

1.1.2 Síntese e secreção dos hormônios tireoidianos

A glândula tireóide, em seu processo metabólico, sintetiza e secreta alguns hormônios importantes encarregados de processos variados e complexos, participantes ativos de várias regulações endócrinas. Estes hormônios são T_3 e T_4 . A tiroxina tem a ação de aumentar o metabolismo celular através de vários mecanismos. A ação de um outro hormônio, a calcitonina, também depende do bom funcionamento da glândula tireóide (CRUZ, 1989).

Segundo Boyages (1993), na síntese dos hormônios tireoidianos, T_3 e T_4 , a glândula necessita da molécula fundamental, o iodo, introduzido no organismo no ato da alimentação (KONNO, 1994). A conversão do íon iodeto para iodato começa no estômago. A glândula tireóide além de concentrar e captar o iodo, sintetiza e estoca os hormônios tireoidianos com a

ajuda da tireoglobulina. A liberação dessa proteína está na dependência do estímulo de TSH, e a sua supressão é controlada pelos hormônios tireoidianos exógenos (**BLACK et al, 1983**).

A captação do iodo pela glândula tireóide é feita seletivamente contra um gradiente de concentração. Este gradiente é vencido mediante a existência de uma bomba de iodo que requer energia por fosforilação oxidativa, estando essa bomba vinculada à $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase (**ROTI et al, 1993**).

A tireoglobulina, principal componente do colóide, é uma proteína específica que serve como matriz na qual os hormônios tireoidianos são formados e acumulados. É uma glicoproteína sintetizada nas células tireoidianas, de peso molecular 660.000 dáltons. Contém em torno de 1% do seu peso em iodo. Estima-se que se forma cerca de 4 moléculas de tiroxina por molécula de tireoglobulina.

Foram encontrados relatos de que o estado de integridade da tireoglobulina é essencial para uma completa e perfeita síntese dos hormônios tireoidianos. A expressão do gene para a tireoglobulina é controlada pelo nível de transcrição do TSH, cujos efeitos intracelulares são mediados pelo AMP cíclico (**MEDEIROS NETO et al, 1993**).

É também possível que o sistema nervoso simpático exerça uma influência estimuladora sobre a secreção e metabolismo do hormônio tireoidiano (**MELANDER et al, 1977**).

O iodo após oxidado se organifica e é introduzido na posição 3 e 5 do grupo fenólico das tirosinas da tireoglobulina. Os resíduos tirosil se unem por uma ligação éster para formar 3,5,3'-triiidotironina (T_3) ou 3,5,3',5' tetraiodotironina (T_4). Esta reação de acoplamento é catalizada pela enzima iodinase. Os hormônios tireoidianos então formados são partes das moléculas de tireoglobulina, o monoiodotironina (MIT) e diiodotironina (DIT). Duas moléculas de DIT se juntam para formar a tiroxina, enquanto uma molécula de MIT se junta com uma de DIT para dar origem ao T_3 . Em condições normais, a concentração de T_4 formada é maior que a de T_3 .

Drogas como o metimazol, carbimazol, tiocarbamida e propiltiouracil inibem com potência a peroxidase tiroidal, sendo clinicamente usadas no controle do hipertireoidismo (**NABIL et al, 1982; ROTI et al, 1993**).

Uma série de ânions, tais como o tiocianato (SCN^-) e o perclorato (ClO_4^-) atuam como inibidores competitivos do transporte ativo de iodo, podendo até ser útil na clínica aplicada. **Panno et al (1986)** demonstraram que a ingestão excessiva de iodo pode induzir doenças da tireóide. Quando o nível de iodo é muito elevado, o aumento da concentração intraglandular do mesmo é capaz de inibir a bomba de iodo, portanto a síntese dos hormônios tireoidianos,

reduzindo a produção destes hormônios a limites normais. A inibição da síntese dos hormônios pelo iodo pode levar a um hipotireoidismo. Em contradição, uma diminuição no pool disponível de iodo aumenta a sensibilidade da bomba.

Utilizando-se iodo radioativo e medindo-se a radioatividade da glândula após a administração de perclorato de potássio, se pode detectar alterações na organificação do iodo, devido fundamentalmente a defeitos enzimáticos.

Mooij et al (1993) revidenciaram que a ingestão de iodo na dieta em ratos Wistar, influenciam não só o peso da glândula tireóide, como na produção do hormônio e na reação autoimune.

1.1.3 Transporte dos hormônios tireoidianos

Os hormônios tireoidianos são transportados no plasma na dependência das proteínas transportadoras ou globulinas fixadoras de tiroxina (TBG), e uma prealbumina fixadora de tiroxina (TBPA) (**ROBBINS et al, 1986**).

Existem também interações entre os hormônios tireoidianos e outras proteínas, incluindo as lipoproteínas, identificadas no plasma e sintetizadas pelo fígado (**BORST et al, 1983**).

A TBG é uma glicoproteína com peso molecular de 60.000 dáltons, e que circula no plasma a uma concentração de 20 mg/l e sua meia vida é de 5 dias. É a mais importante proteína no transporte plasmático dos hormônios tireoidianos, participa tanto do transporte de T₃ como de T₄ (**ROBBINS e BARTALENA, 1986**).

A TBPA tem peso molecular de 50.000 dáltons, sua meia vida é de 2 dias e fixa-se à vitamina A. Tem sido chamada de transterrina (TTR) (**MENDELL et al, 1992**). A sua afinidade pelos hormônios tireoidianos é pequena.

Os estrógenos aumentam a TBG e, como consequência os hormônios tireoidianos fixam-se mais tempo e diminuem as concentrações de T₄ e T₃ livres.

Em um primeiro momento têm-se um hipotireoidismo leve, mas logo essa carência dos hormônios tireoidianos leva a um estímulo do TSH, e posterior aumento da secreção dos hormônios. Isto é observado em uma gravidez.

1.1.4 Metabolização dos hormônios tireoidianos

O íon cálcio participa como fator indispensável no metabolismo dos hormônios tireoidianos, assim como na regulação pelo TSH. É importante na secreção de tiroxina,

induzindo a entrada de iodo na glândula tireóide, e também estimula o aumento de guanosina monofosfato (GMP). O cálcio participa como primeiro mensageiro a nível de membrana plasmática (SEGAL, 1984). Foi também ressaltado o papel do íon cálcio no estímulo da secreção de várias glândulas endócrinas. Eles verificaram a inibição à resposta do TRH no homem por um antagonista do canal de cálcio, o verapamil.

Os hormônios tireoidianos são importantes mediadores das células do crescimento e metabolismo, e em muitas espécies de mamíferos, as formas ativas são L-T₄ e L-T₃, metabólito de maior potência (DOYLE e KRAGIE, 1982).

Esses hormônios caracterizam-se pelas ações metabólicas, tendo como efeitos mais pronunciados, o aumento do consumo de oxigênio e a produção de calor, ações como estas ocorrem em todos os tecidos exceto no cérebro, gônadas e baço. Entretanto, tem-se observado que os hormônios tireoidianos em baixas doses fisiológicas promovem o estímulo da síntese de proteínas indispensáveis para o crescimento e desenvolvimento dos ossos, podendo apresentar um efeito facilitador sobre o crescimento (ALÁEZ et al, 1992). Altas doses predominam o efeito metabólico com a balança de nitrogênio negativa e diminuição da massa muscular.

Os hormônios tireoidianos apresentam outras funções a nível do metabolismo de carboidratos. No hipertireoidismo verifica-se um aumento da glicemia pós prandial, além do mais exerce uma ação lipolítica.

O metabolismo desses hormônios é mediado por muitas reações enzimáticas, incluindo conjugação, deaminação, descarboxilação oxidativa e deiodinação, sendo este último o mecanismo predominante.

O T₄ tem várias vias metabólicas os quais produzem substâncias ativas, tendo como as vias mais importantes a monodeiodinação produzida pela 3-5-3 triiodotirosina, ou seja, quando o T₃ produz deiodinação sobre o anel externo, produzindo T₃r, inativo. Esta deiodinação ocorre em vários tecidos, principalmente no fígado.

O T₃ é de 3 a 5 vezes mais ativo que o T₄. Cerca de 80 % do T₃ consumido no metabolismo, é originado da monodeiodinação do T₄ em T₃, onde esse processo soma 80% da quantidade de T₃ disponível, enquanto os 20 % restantes são secretados diretamente da glândula tireóide.

Essa transformação do T₄ em T₃ só é possível através do equilíbrio entre a ação enzimática das 5-monodeiodinases (5-MDs) tipo I e II. No entanto o T₄ é inativado em 3,3',5-triiodotironina (rT₃) pela ação da enzima 5-MD tipo III. Essa enzima existe em maior quantidade no fígado, rins e tireóide (TANG et al, 1994).

Das enzimas que participam do metabolismo dos hormônios, a 5-monodeiodinase tipo I se encontra em maior quantidade, principalmente nos rins e fígado, sendo pequena sua concentração na tireóide. Seu papel mais importante é manter o nível de T_3 plasmático, por isso mantém-se em menor quantidade no hipotireoidismo e em maior quantidade no hipertireoidismo.

Drogas como o propiltiouracil inibe a ação dessa enzima, mostrando-se útil no hipertireoidismo. O metimazol também reduz a atividade enzimática, mas mostra-se menos eficaz.

No entanto, a 5-MD tipo II é superável à ação do propiltiouracil. Esta enzima está presente em grande quantidade no cérebro e na glândula hipófise, e é responsável pela manutenção dos níveis de T_3 intracelulares constantes no Sistema Nervoso Central (SNC).

É na membrana coriônica da placenta e nas células gliais do SNC que se concentra a 5-MD tipo III, encontrada em grandes concentrações no hipertireoidismo e em baixos níveis no hipotireoidismo.

Os hormônios tireoidianos ligados às proteínas plasmáticas são inertes do ponto de vista metabólico, sendo ativo o T_4 livre correspondente a 0,03% e o T_3 livre a 0,2% do total de hormônio.

A deiodinação do T_4 na posição 5 do anel fenólico, pode ser considerado uma bioativação, diminuindo sua atividade pelos receptores hormonais tireoidianos nucleares, afinidade esta dez a vinte vezes maior para o T_3 (LARSEN e SILVA, 1986). A deiodinação do T_4 na posição 5 resulta em uma inativação, como também na formação de rT_3 com baixa afinidade para receptores hormonais tireoidianos nucleares. Além do mais, a deiodinação é uma chave na regulação da ação dos hormônios tireoidianos. Aproximadamente 80% do T_4 secretado pela glândula tireóide é deionizado em T_3 ou em rT_3 .

A deiodinação também está envolvida com a principal rota de degradação das iodotironinas. Entretanto, a deiodinação não deve ser considerada como um evento isolado do metabolismo dos hormônios tireoidianos, mas deve ser ressaltada a alta regulação, coordenada com outras reações metabólicas em muitos tecidos (HECTOR et al, 1997).

Em grupos de ratos com idades variadas, foram encontradas concentrações séricas de T_4 maior em machos do que em fêmeas, sucedendo-se o inverso com T_3 .

1.1.5 Ações das gonadotrofinas sobre o testículo

O LH constitui o hormônio fundamental para a manutenção da secreção das células de Leydig, estimulando enzimas que participam da síntese de colesterol. O LH também participa da síntese de testosterona mediante o estímulo da 1β -ol-desidrogenase, o que não descarta sua ação sobre outras enzimas. As gonadotrofinas se ligam à receptores de membrana presentes nas células de Leydig, e o estímulo do mecanismo de síntese de testosterona se dá pela formação de AMPc. A prolactina também atua sobre receptores de membranas específicos, potencializando a ação do LH. Em contradição, quando os níveis sanguíneos de prolactina estão muito altos, esta promove uma inibição da ação do LH.

O FSH atua sobre às células de Sertoli, através da ligação com receptores, estimulando - as a produzir uma proteína ligadora de andrógenos (ABP) , que tem como finalidade unir-se aos andrógenos, e permitir o transporte destes dentro do túbulo seminífero para que possam exercer seus efeitos sobre a espermatogênese. O mecanismo de síntese da ABP depois de iniciado pelo FSH pode ser mantido pela testosterona.

As células de Sertoli produzem uma substância denominada inibina, capaz de produzir a inibição da secreção de FSH, e em menor proporção de LH.

1.1.6 Fisiologia endócrina da testosterona

A testosterona é o principal andrógeno presente no soro e no fluido intersticial do testículo. O seu conteúdo varia dependendo do período do ciclo do epitélio seminífero (**FRANKEL e WRIGHT, 1979**).

A 5α -diidrotestosterona(5-DHT) está também presente no tecido dos túbulos seminíferos (**Podesta, 1974**), mas não parece ser um andrógeno ativo, enquanto a testosterona é a forma de andrógeno predominantemente ligado ao túbulo seminífero (**FRANKEL e WRIGHT, 1979**).

Em relatos feitos por **Setchel e Sharp (1981)**, é citada uma variação entre a concentração de testosterona no FIT e nos túbulos seminíferos. As concentrações de testosterona são maiores do que as concentrações da 5-DHT no rato e no touro mas estas relações não têm sido estudadas sistematicamente em outros compartimentos do fluido testicular.

A testosterona é produzida pelas células de Leydig sob a influência dos hormônio luteinizante, o qual possui uma papel essencial na regulação da espermatogênese. Em particular,

a testosterona aparece como um fator importante da espermatogênese (**MCLACHLAN et al,1994; SUN et al, 1990**).

Recentemente foi localizado um sítio específico de ação da testosterona nas fases VII e VIII do ciclo de espermatogênese no rato (**O'DONNEL et al, 1994**).

Em muitos tecidos os efeitos biológicos da testosterona têm sido aumentados devido ao metabolismo em 5-DHT pela ação da enzima 5α -redutase (**O'DONNEL et al, 1996**). Ambos, a testosterona e a DHT interagem com receptor andrógeno para mediar a transcrição dependente do andrógeno.

Wilson et al (1988) citam a importância da transformação da testosterona em 5-DHT no desenvolvimento das características sexuais secundárias, devido a sua maior afinidade pelos receptores andrógenos (**ZHAI et al, 1996**).

As células de Sertoli são um importante componente dos túbulos seminíferos e estão inteiramente envolvidas com a progressão da espermatogênese (**STEINBERGER, 1979**). No rato, as células de Sertoli sofrem divisões sucessivas depois do nascimento, mas as divisões cessam aos 18-19 dias de idade, tanto *In vivo* como em cultura de tecidos. Neste período as tight junctions das células de Sertoli são formadas, criando uma barreira circulação -testículo (**TINDALL et al, 1975**). O FSH estimula os parâmetros bioquímicos nas células de Sertoli precocemente no desenvolvimento testicular pós-natal, mas sua ação diminui depois dos 20 dias de idade (**MEANS et al, 1980**). Além de responder ao FSH, as células de Sertoli são vistas como alvos de andrógenos, estimulação andrógena de RNA polimerase II, e efeitos dos andrógenos na secreção de proteínas ligadoras de andrógenos (ABP) (**LOUIS e FRITZ, 1979; SANBORN et al, 1986**).

A ABP testicular aumenta entre 18 e 60 dias de idade (**WELSH e WIEBE, 1978**). A secreção de ABP pelas células de Sertoli em cultura aumenta com a maturação dos animais doadores entre 7 e 30 dias de idade (**RICH et al, 1983**).

A capacidade das células de Sertoli em cultura de metabolizar esteróides e responder ao FSH também varia com a idade do animal doador (**WELSH e WIEBE, 1978**).

Vários estudos têm mostrado que a função das células de Sertoli é influenciada pela presença de células germinativas e células mióides peritubulares (**AILENBERG et al, 1988**).

Sanborn et al (1986) demonstraram que as diferenças nas funções das células de Sertoli *in vivo* são demonstradas *in vitro* e a informação provém da maturação, da dependência dos hormônios e outros parâmetros das células de Sertoli.

A capacidade dos testículos de sintetizar estrógeno tem sido largamente abordada (ZONDEK, 1945). Entretanto, o sítio intra-testicular de aromatização, assim como, as gonadotrofinas reguladoras da aromatização testicular ainda não estão bem definidas, mas parecem depender da idade, espécie e procedimento experimental (BENAHMED et al, 1982; NOZU et al, 1981). As células de Sertoli obtidas de ratos imaturos foram hábeis a sintetizar estrógeno quando mantidas em cultura na presença de FSH e testosterona (DORRINGTON et al, 1978). No entanto, Steinberger e Steinberger (1992), em culturas similares de células de Sertoli, demonstraram que estas foram incapazes de cristalizar a aromatização do esteróide radioativo para atividade constante específica para síntese do estradiol.

Os estrógenos têm sido mostrados como tendo um papel significativo na regulação da esteroidogênese testicular através da modulação de enzimas microssomais (17 α -hidroxilase e 17-20-desmolase) no rato adulto (NOZU et al, 1981).

1.1.7 Os Hormônios tireoidianos e o sistema reprodutor masculino

Os hormônios tireoidianos são essenciais para um desenvolvimento e crescimento pós-natal normal das funções do trato reprodutor masculino (COOKE et al, 1984).

Algumas investigações estabeleceram que o papel específico dos hormônios tireoidianos no crescimento e função do trato reprodutivo é muito significativo, porém uma deficiência sobre o desenvolvimento ou nos testículo adulto ainda não está totalmente esclarecido.

Entretanto, a tireoidectomia em ratos imaturos causa severa inibição da gametogênese e do desenvolvimento das células de Leydig (COOKE e MEISAMI, 1991).

Os hormônios tireoidianos são indispensáveis para modificar o sistema neurosecretório do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), fundamental para o ciclo reprodutivo.

O crescimento dos testículos e epidídimo com a tireoidectomia foi levemente reduzido em ratos jovens. No entanto, o papel específico dos hormônios tireoidianos na função e desenvolvimento do trato reprodutor masculino, em especial nos testículos de ratos adultos são contraditórias (COOKE e MEISAMI, 1991).

O hipotireoidismo induzido durante o período prematuro pela administração de PTU, resulta em aumento de peso testicular de ratos, como relata os trabalhos de Van Haaster et al, 1992.

Panno et al (1996) demonstraram que T_3 pode influenciar na maturação das células de Sertoli, através de regulações parácrinas entre os esteróides e as células de Sertoli, o qual envolve a manutenção completa da espermatogênese.

Van Haaster et al (1993) após administração de T_3 em ratos, desde o nascimento até o 16^o dia de vida, observaram que o tratamento reduz consideravelmente a atividade proliferativa das células de Sertoli. O peso corporal e testicular de ratos adultos são reduzidos.

De maneira que os níveis dos hormônios tireoidianos são de grande importância no processo de diferenciação celular, sendo um fator determinante do tamanho do testículo adulto.

Kirby et al (1992) idealizaram modelos verificando cinco efeitos do hipotireoidismo neonatal, observando o crescimento testicular e os níveis de gonadotropinas durante o desenvolvimento.

Samuel et al (1989) descreveram que o hipo e hipertireoidismo afeta o RNA mensageiro (RNA_m) de hormônio do crescimento (GH) e prolactina tão bem como β -TSH e uma ação sobre a regulação POMC ou sobre os níveis pré translacionais das β sub unidades das gonadotrofinas. Os níveis de T_3 aumenta o RNA_m do GH e prolactina.

Vários fatores controlam a manutenção e regulação da espermatogênese. **Cooke et al (1991)** desenvolveram como modelo o tratamento do bócio de ratos recém nascidos com PTU que resultou em aumento do tamanho dos testículo e aumento da espermatogênese.

Em ratos jovens a função tireoidiana mudou em uma maior proporção sobre os fatores endócrinos e parácrinos da função e crescimento do trato reprodutor masculino (**KIRBY at al, 1992**).

1.2 Considerações Gerais Sobre Receptores

1.2.1 Parâmetros de ligação droga-receptor

De acordo com a lei de ação das massas a velocidade de uma reação química, a uma temperatura constante é proporcional aos produtos das concentrações molares dos reagentes.



Desta forma, a velocidade de uma reação molda-se na seguinte expressão:

$$V_a = k_a \cdot [H] \cdot [R] \text{ (velocidade de associação)}$$

$V_d = k_d \cdot [HR]$ (velocidade de dissociação)

Ocorrendo o equilíbrio, teremos que $V_a = V_d$; conseqüentemente,

$$\frac{K_a}{K_d} = K_a = \frac{[HR]}{[H] \cdot [R]} \quad \text{Equação (2)}$$

onde K_a é a constante de equilíbrio de associação ou de afinidade, cuja dimensão expressa-se como o inverso de uma concentração (M^{-1}); como resultado, a afinidade do hormônio pelo receptor e conseqüentemente o percentual do complexo formado está na razão direta do valor de k_a .

Quando da reação inversa, tem-se:

$$\frac{K_d}{K_a} = K_d = \frac{[H] \cdot [R]}{[HR]} \quad \text{Equação (3)}$$

Onde K_d é a constante de equilíbrio de dissociação, expressando-se em dimensão igual a uma concentração (Molar), porém de menor intensidade quando do aumento da afinidade pelo receptor; sendo de significado operacional, visto que observou-se ocupação dos receptores hormonais em um percentual de 50 %, quando da equivalência entre concentrações do hormônio livre e a k_d . Tem-se, nestes termos, que a determinação do grau de especificidade de uma ligação entre o fármaco e seu receptor fundamenta-se nas análises das suas constantes de equilíbrio (constantes de associação e de dissociação).

Intensos estudos estabeleceram o modelo matemático para os efeitos da concentração hormonal no processo de saturação do receptor e na resposta biológica em sistema dependente de mediadores secundários (AMPC). Em base a isto, sugestões têm sido propostas para um melhor entendimento do mecanismo de atividades farmacológicas; desta forma, constata-se que a ligação do hormônio com seu receptor específico é representado por uma cinética de segunda ordem. Quando da ligação do fármaco com o receptor, haverá uma indução da síntese do mensageiro secundário (AMPC), cuja concentração estará na dependência direta do número de sítios complexados; como também, proporcional será a atividade biológica desencadeada.

Em base ao complexo fármaco-receptor formado, pode-se estudar os parâmetros físico-químico através e análises gráficas pelo método de Scatchard (Scatchard, 1949).

1.2.2- Análise de Scatchard

A curva de Scatchard é obtida através da seguinte expressão:

$$Kd = \frac{[H] \cdot [R]}{[HR]} \quad \text{Equação (4)}$$

como [Ro] refere-se a concentração total de sítios de ligação, teremos:

$$[Ro] = [HR] + [R]$$

Quando da substituição, obteremos a seguinte equação:

$$[HR] = \frac{[Ro] \cdot [H]}{kd + [H]} \quad \text{Equação (5)}$$

sendo:

[HR] = B - número de sítios receptores ligados ao hormônio

[Ro] = B_{máx} - número total de sítios receptores hormonais

[H] = F - quantidade de hormônios não ligados aos receptores.

De acordo com esses dados, a equação (5) expressa-se de forma diferente:

$$B = B_{\text{max}} \cdot \frac{F}{Kd + F} \quad \text{Equação (6)}$$

Se $F = kd$, então $\frac{1}{2} B_{\text{max}} = B$. ou seja, 50% dos sítios de ação estão ocupados.

A inovação de **Scatchard (1949)**, consiste na capacidade de representação da equação anterior em sua forma linear, fundamentando-se na seguinte dedução matemática.

$$B = B_{\text{max}} \cdot \frac{F}{Kd + F} \quad \text{Equação (7)}$$

onde: $B_{\text{max}} = B + [R]$

e que $kd = F \cdot [R]/B$

$$B/F = [R]/Kd \quad \longrightarrow \quad [R] = B_{\text{max}} - B$$

tem-se: $B/F = (B_{\text{max}} - B)/Kd$

desta forma, $B/F = -1/K_d B + B_{max}/K_d$

Em vista ao que foi descrito, k_d e B_{max} são constantes, sendo a equação representada por $y = ax + b$, onde a e b são constantes desta função linear. Consequentemente, todos os receptores serão ocupados da concentração infinita do receptor, onde b tenderá para zero e a curva é representada pela interação com o eixo das abscissas em um ponto onde a concentração dos sítios de ligação é máxima, B_{max} .

2- A linearização da equação (6), curva de Scatchard, favorece a determinação da afinidade (k_a) e da concentração total dos sítios de receptores para um dado ligante B_{max} ; visto que, em base a técnica de regressão linear, observaremos o número máximo de receptores pela extrapolação da reta, a qual interceptará com o eixo das abscissas; enquanto que, com a derivada da reta obtém-se a afinidade do receptor pelo hormônio.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho visa avaliar a influência da tiroxina (T_4) sobre a regulação do hormônio gonadal e modulação dos receptores de hCG e LH a nível testicular de ratos prematuros.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Induzir o hipertireoidismo com tiroxina em ratos;
- Prematuros sexualmente, em períodos diferentes de tratamento;
- Avaliar as alterações do peso corporal com tiroxina em ratos prematuros;
- Determinar a concentração de testosterona a nível sérico e no fluido intersticial testicular;
- Determinar a constante de afinidade (K_a) e o número de receptores de LH, e avaliar o deslocamento de hCG em homogeneizado testicular, após 20 dias de tratamento.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Materiais Diversos

- Ácido clorídrico, Vetec, Brasil
- Carbonato de sódio, Vetec, Brasil
- Citrato de sódio Tribásico P.A., Vetec, Brasil
- Cloreto de sódio, Merck, Brasil
- Clorofórmio, Merck, Brasil
- Éter Etílico P.A., Vetec, Brasil
- GammaCoat M [¹²⁵I] Testosterone Radioimmunoassay Kit, ICN
- GammaCoat M [¹²⁵I] hCG radioimmunoassay Kit, ICN
- GammaCoat M [¹²⁵I] LH radioimmunoassay Kit, ICN
- Hidróxido de sódio P.A, Vetec, Brasil
- Reativo de Follin - Reagente de Fenol, Merck, Brasil
- Sulfato de cobre II P. A., Vetec, Brasil
- Tartarato de sódio P. A., Vetec, Brasil
- Tiroxina Sódica, Aché, Brasil.
- Tris (hidroximetil) aminometano, Merck, Alemanha

3.1.2 Aparelhos diversos

- Agitador Magnético, Fisatom, Brasil
- Balança de Precisão, Mettler, Suíça
- Banho maria, Dubnoff MA093, Marconi, Brasil
- Centrífuga Refrigerada, Heraeus Christ, Germany
- Centrífuga Refrigerada, Sorvall, U.S.A.
- Contador de Cintilação Gama, Mini-Instrumentos Ltd
- Espectrofotômetro Gehaka G 3410, Brasil.

3.2 Métodos

3.2.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar jovens de 22 dias de vida, machos, pesando 80g, procedentes do biotério do Departamento de Biofísica do Centro de Ciências Biológicas da UFPE. Foram mantidos em gaiolas apropriadas em número de 05(cinco), receberam diariamente, água e alimentação do tipo ração comercial para roedores, iluminação artificial, ciclo claro e escuro de 12/12 horas, e temperatura ambiente variando de 27-30⁰C.

3.2.2 Procedimento Experimental

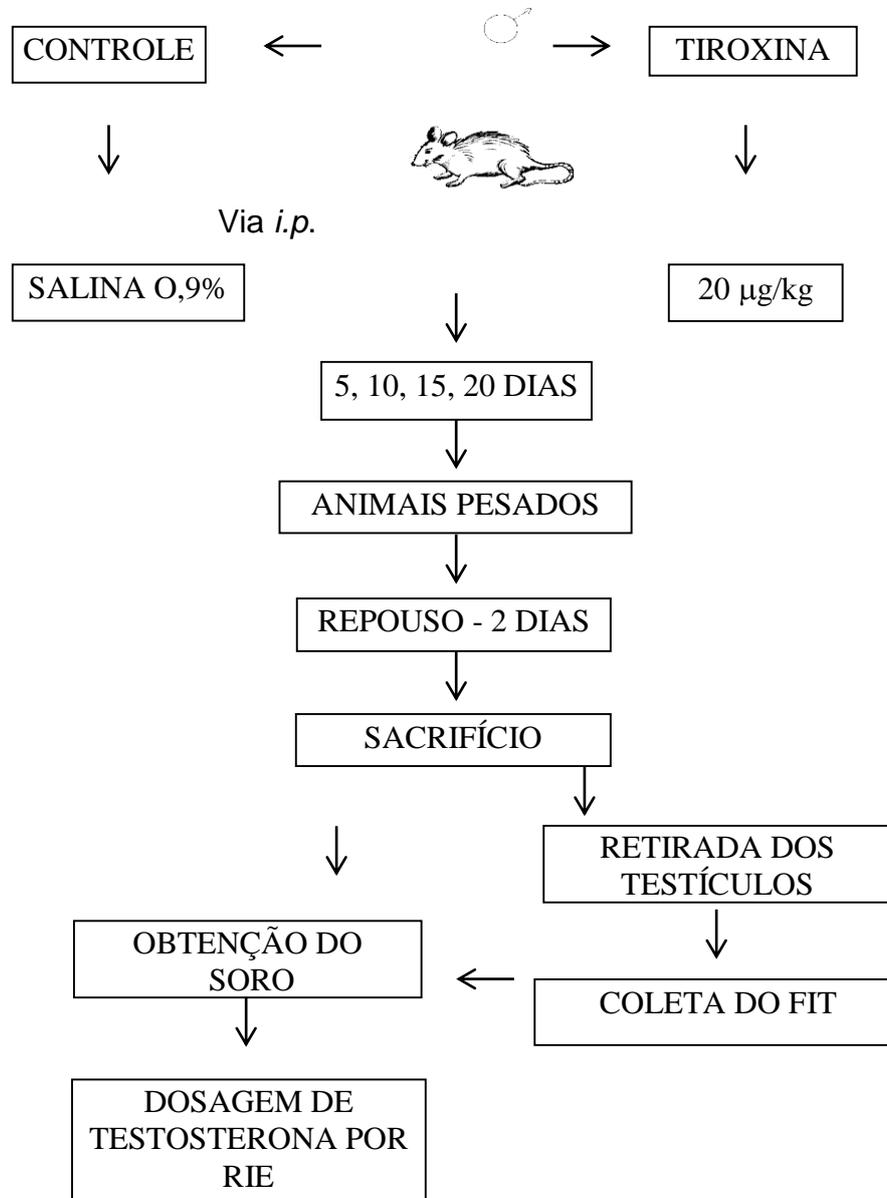
A tiroxina foi administrada em ratos machos jovens na dose de 2 μ g/100g peso corpóreo por dia, por via intraperitoneal (*ip*), com doses consecutivas durante períodos de 5,10,15 e 20 dias de tratamento. Após cada período de administração, os animais foram submetidos ao repouso por um tempo de dois dias antes do sacrifício.

Os grupos controle receberam solução salina, via *ip* e foram sacrificados dois dias depois da última dose. Os animais foram pesados diariamente a cada tratamento.

Após cada período de tratamento, os animais foram anestesiados com éter, o sangue coletado por punção cardíaca para obtenção do soro, e em seguida foram sacrificados. Os testículos foram retirados, lavados, dissecados e pesados, como observado no **Esquema 1**.

ESQUEMA 1

TRATAMENTO ANIMAL



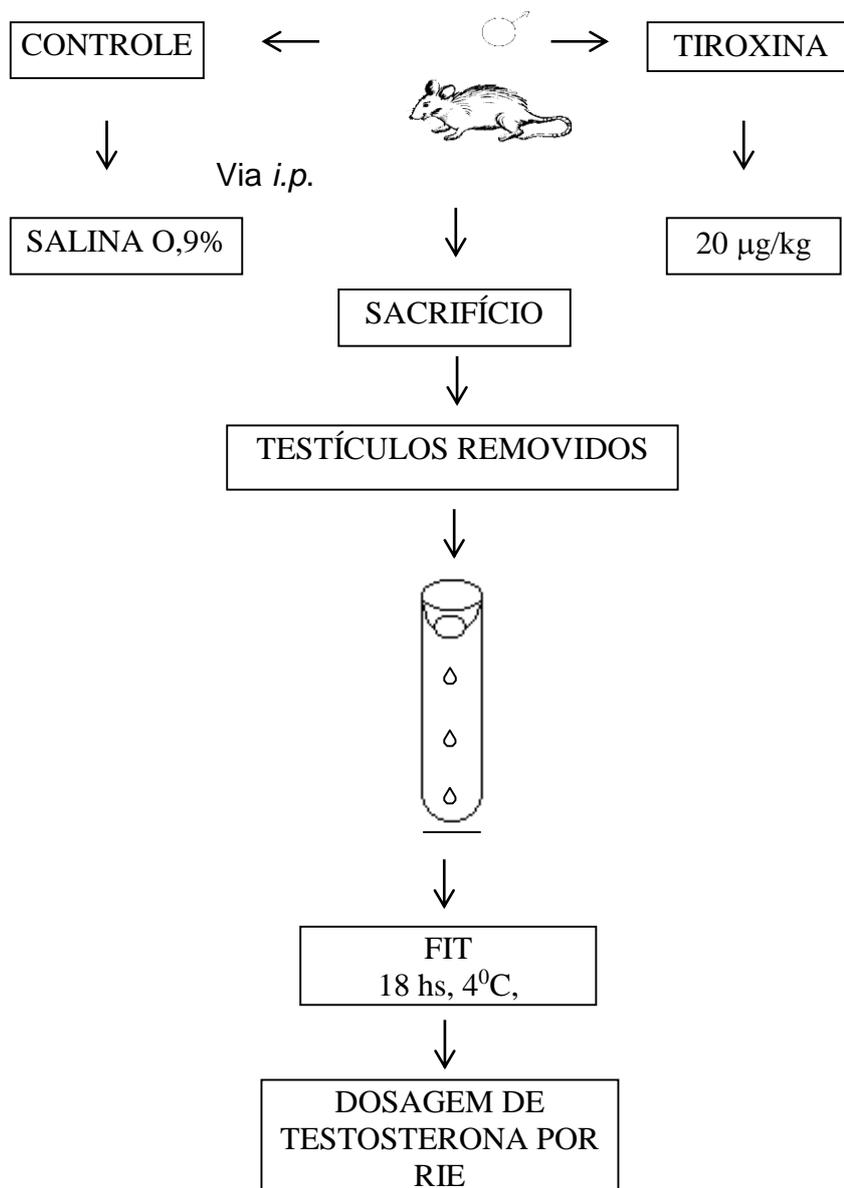
3.2.3 Determinação do Fluido Intersticial Testicular

Os testículos foram lavados com solução salina, e posteriormente dissecados e pesados. A obtenção do Fluido Intersticial Testicular (FIT) do grupo controle e tratado, foi realizado com uma incisão na porção caudal da cápsula testicular, e suspensão dos testículos em tubos de ensaio de 3 ml, onde se permite que o FIT drene por ajuda da força gravitacional, do espaço linfático intersticial para o fundo do tubo, durante 18 horas a 4⁰C para posterior determinação

da dosagem de testosterona. Foram utilizados dois tubos de ensaio por animal, um para o testículo direito, e o outro para testículo esquerdo (**Esquema 2**).

ESQUEMA 2

COLETA DO FLUIDO INTERSTICIAL TESTICULAR (FIT)



3.2.4 Determinação da Testosterona por Radioimunoensaio (RIE)

O procedimento do kit Gamma Coat M Testosterona para a determinação de testosterona, é um ensaio competitivo no qual é formado inteiramente em fase sólida; competem com traçador testosterona para um número limitado de sítios de ligação do anticorpo imobilizado na parede abaixo do tubo Gamma Coat.

Para o procedimento de dosagem de testosterona, recomenda-se o uso de reagentes deaerados e à temperatura ambiente.

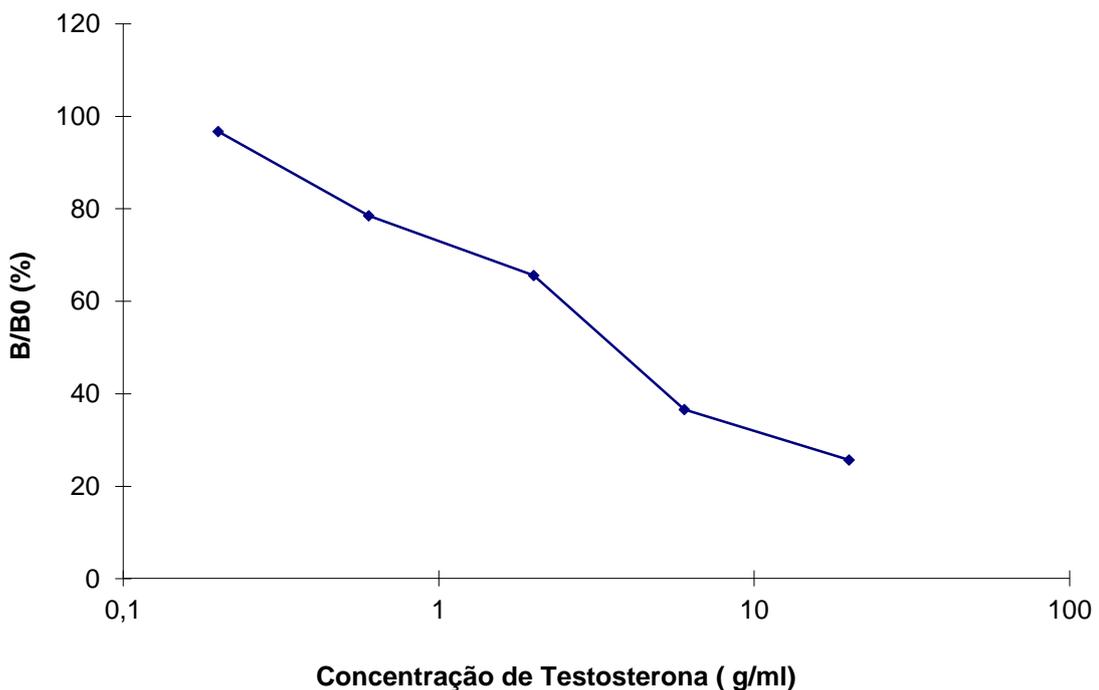
O experimento foi realizado em tubos contendo Gamma Coat Testosterona devidamente marcados e em duplicatas.

Para cada tubo foi adicionado concentrações diferentes de Testosterona da curva padrão nas concentrações de 0,2-20 ng/ml. Em seguida foi adicionado ^{125}I -testosterona com atividade específica de 1000 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}/500\text{ml}$. (**Figura A**).

A incubação foi realizada por um período de 120 minutos a 37°C em banho maria. No final da incubação, os tubos foram decantados e todo líquido removido. Após o procedimento, os tubos foram levados para o Contador de Cintilação Gama.

Os resultados foram determinados através da curva padrão por interpolação em relação com a contagem B/B_0 % em função da concentração de testosterona total (abscissa), em gráfico semilogarítmico. As amostras foram determinadas através das curvas padrões (Obregon e cols, 1978; Van Doorn e cols, 1983). (**Figura A**).

Figura A: Curva Padrão representativa da determinação dos níveis séricos de testosterona total.



3.2.5 Dosagem de proteínas

As concentrações de proteínas nos testículos foram determinadas através de dosagem protéica segundo o método de **Lowry et al (1951)**, baseado numa primeira reação de formação de complexos entre as moléculas de proteínas e os íons de cobre em meio alcalino, e Segunda reação de redução de reagentes fosfomolibdico-fosfotúngstico (reativo de Folin pelas proteínas complexadas com cobre, produzindo uma coloração azul.

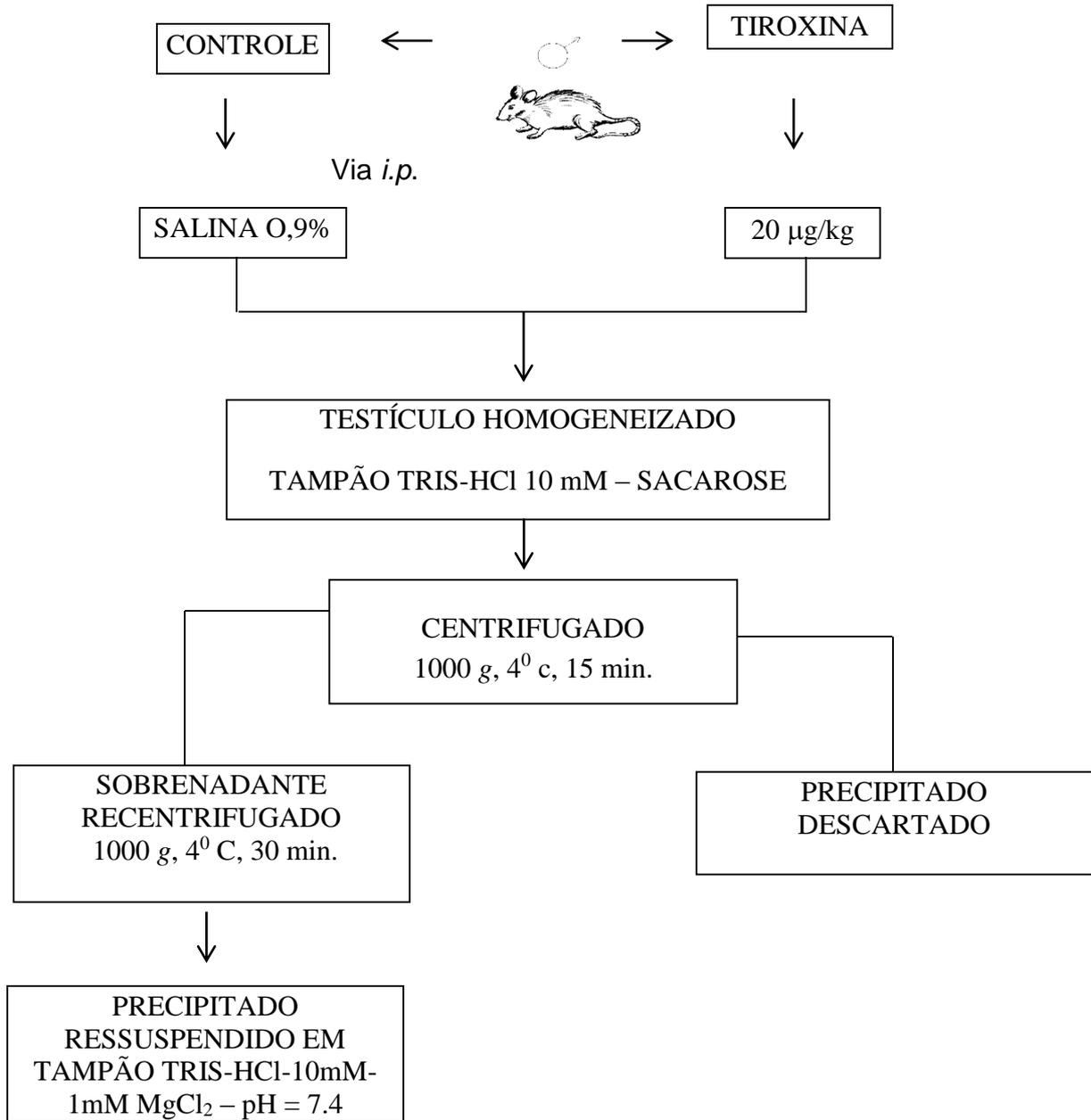
3.2.6 Homogeneização do tecido testicular

Os testículos foram homogeneizados com tampão Tris-HCl 10mM na presença de sacarose 0,3 M à temperatura de 4⁰C, pH 7,4.

O homogeneizado foi então centrifugado a 1000g a 4⁰C por 15 minutos, e em seguida o precipitado foi descartado e o sobrenadante recentrifugado a 10.000g à 4⁰C por 30 minutos. O precipitado foi ressuspenso em tampão tris-HCl 10mM pH 7.4 com MgCl₂ 1Mm (**Esquema 3**).

ESQUEMA 3

HOMOGENEIZAÇÃO CELULAR DE TESTÍCULOS



3.2.6.1 Determinação da capacidade de ligação do LH a nível testicular

No estudo do receptor de LH foi utilizado ^{125}I -LH biologicamente ativo, deste modo os parâmetros de ligação droga-receptor foram determinados através da análise de Scatchard (SCATCHARD, 1949).

Todo o experimento foi realizado utilizando-se a curva de saturação, a fim de determinar, no homogeneizado celular testicular, a ligação total (Bt) de LH marcado e a ligação não específica (Bns) utilizando-se um excesso de 1000 vezes de LH frio (não marcado) para obter o deslocamento de LH marcado.

O complexo droga receptor marcado foi separado por centrifugação a 3000 g durante 15 minutos a 4°C . O sobrenadante foi aspirado e em seguida a radioatividade foi contada em contador gama (γ). Obtém-se assim, a ligação total e a ligação não específica, com isto, pode-se calcular a ligação específica que é obtida por diferença da ligação não específica da ligação total de cada quantidade utilizada de LH marcado.

3.2.6.2 Análise de Scatchard

A análise de Scatchard foi realizada através da obtenção das curvas de saturação, incubando concentrações crescentes de LH, variando de 10 a 70 pmol, em presença de concentração fixa de 3,50 mg/ml de proteína do homogeneizado celular testicular.

A reação foi realizada durante 60 minutos ao equilíbrio, a uma temperatura de 25°C , com um volume final de 500 μl da solução tampão em presença de 0,1% de B.S.A. Todo procedimento experimental foi realizado como apresentado anteriormente (Item 3.2.6).

Através das curvas de saturação foram construídas as curvas de análise de Scatchard, considerando a concentração LH não ligada ou livre (F) e a capacidade específica (B) de cada concentração utilizada. A relação na ordenada representa a ligação específica (B) sobre LH livre (F), ou seja B/F; e na abscissa, a capacidade de ligação específica (B) em fmol/mg de proteína. Com essa curva obtém-se a constante de afinidade (Ka) através da relação entre os valores de interseção da inclinação da reta na ordenada (B/F) com a abscissa (Bmax. Deste modo, o número máximo de receptores de LH é obtido através da interseção da inclinação da reta na abscissa. (Bmax).

3.2.6.3 Curva de deslocamento

O homogeneizado celular testicular foi incubado em uma concentração fixa de proteína (3,52 mg/ml) por 60 minutos com uma concentração também fixa de ^{125}I -hCG de 18 nM. As ligações específicas foram obtidas utilizando-se o hCG frio em concentrações crescentes, variando de 2 a 30 mUI/ml. A curva de deslocamento do ^{125}I -hCG representa o percentual da ligação total, em relação à ligação não específica.

3.2.7 Análise Estatística

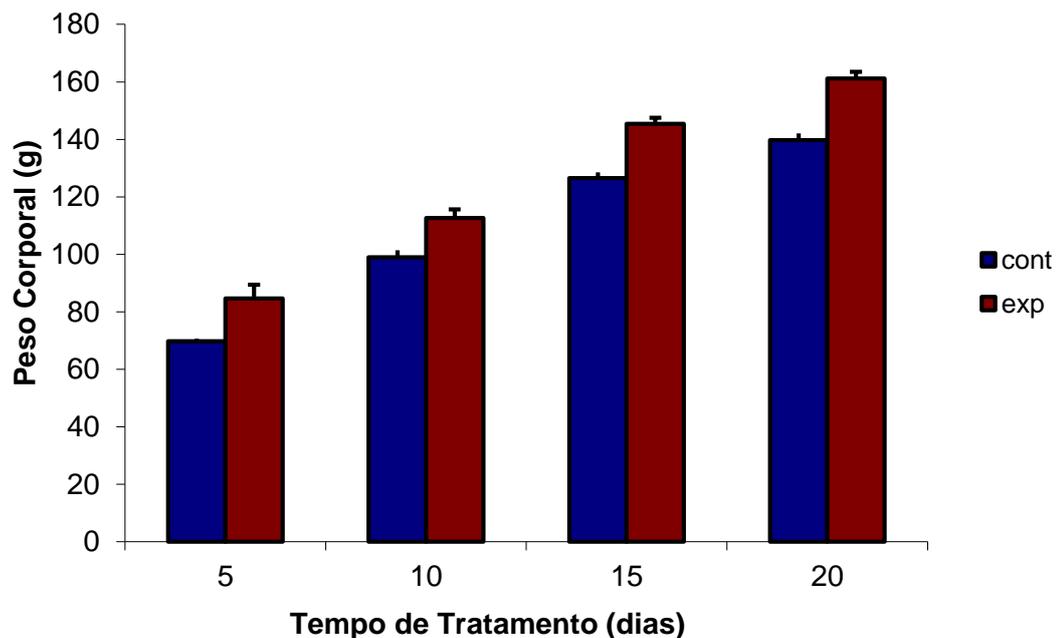
Os resultados foram expressos em média (\pm) erro padrão em cada grupo de controle e tratado. Para a análise dos resultados foi avaliado o nível de significância através do teste de Student (teste “t”), considerando-se o nível da significância de $p \leq 0,05$, para todos os grupos tratados.

4 RESULTADOS

4.1 Efeitos da tiroxina sobre o peso corporal

Pode-se observar, na **figura 1**, a variação do peso corporal entre os ratos prematuros controle e tratados com tiroxina durante os períodos de 5, 10, 15 e 20 dias. Verifica-se que a diferença do peso corporal dos tratados com tiroxina é de mais 20,27,26 e 30 % respectivamente, em relação ao percentual dos ratos controles, sendo esta diferença estatisticamente significativa.

Figura 1 - Determinação do peso corporal (g) de ratos controle e após o tratamento com a tiroxina, em 5, 10, 15 e 20 dias. Os valores dos resultados são as médias de 10 animais por grupo de experimentos realizados ($p < 0,05$).



4.2- Efeitos da tiroxina sobre o peso testicular em ratos prematuros

A **figura 2** mostra que o tratamento com tiroxina em ratos prematuros aumenta o peso testicular de mais 57 e 41,23 % em relação ao percentual controle, nos dias 15 e 20 de tratamento, respectivamente, ($p < 0,05$). Estes resultados foram determinados com o somatório dos pesos dos testículos direito e esquerdo. Entretanto, a diferença entre o peso testicular direito e esquerdo não foram observadas alterações significativas, tanto no grupo controle como no

grupo tratado. Porém, os animais tratados com tiroxina, o peso testicular apresenta uma diferença significativa sobre os valores avaliados em cada período de tratamento em relação aos pesos testiculares de animais controle, como observado na **figura 3**.

Figura 2 - Determinação do peso testicular (g) de ratos do grupo controle e após tratamento com a tiroxina, em 5, 10, 15 e 20 dias. Os resultados são as médias de 10 animais por grupo de experimentos realizados. ($p < 0,05$).

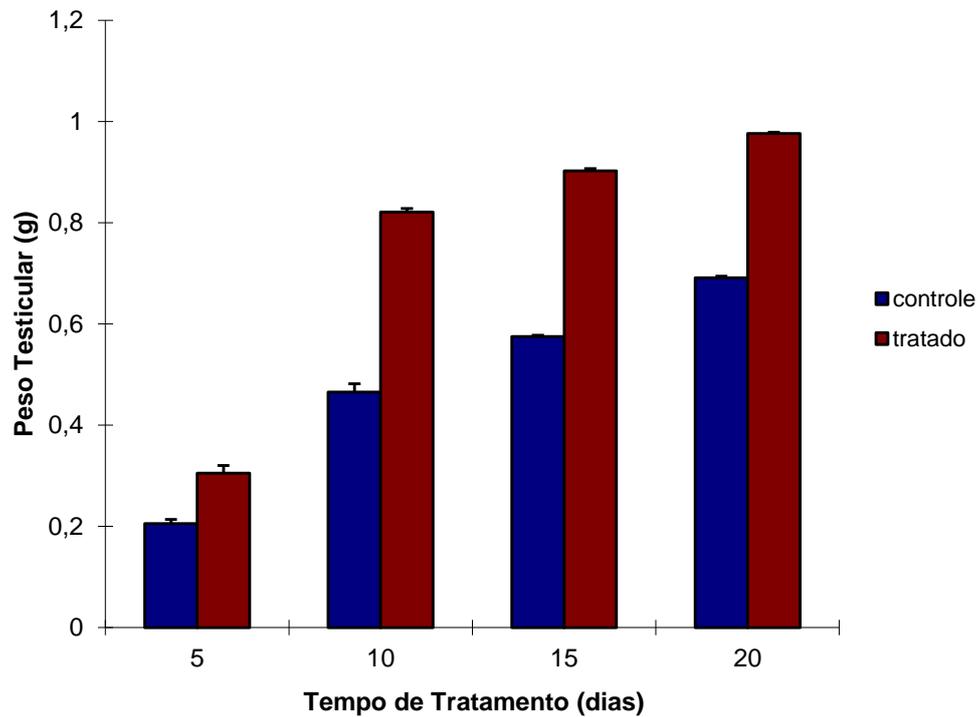


Figura 3A - A curva representa a ação da tiroxina sobre o peso testicular (g). Os valores são as diferenças das médias do peso testicular controle vs tratado (tiroxina).

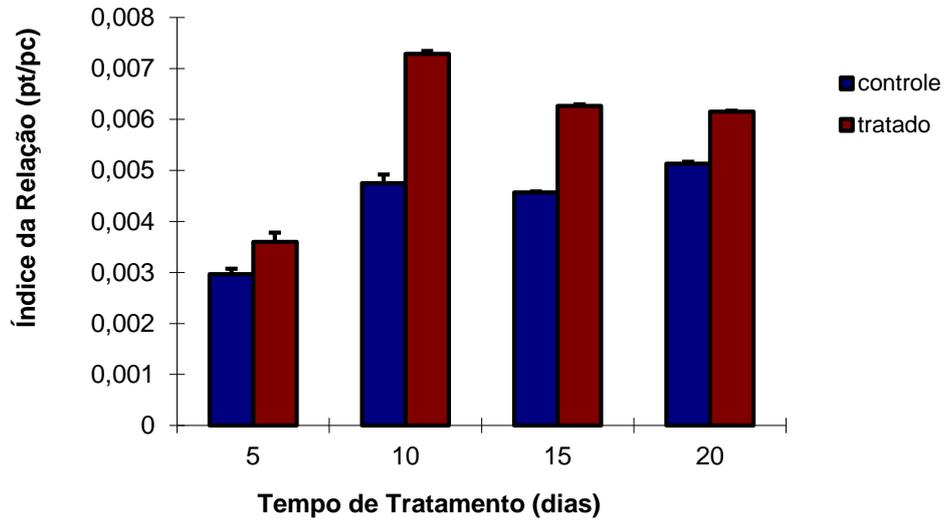
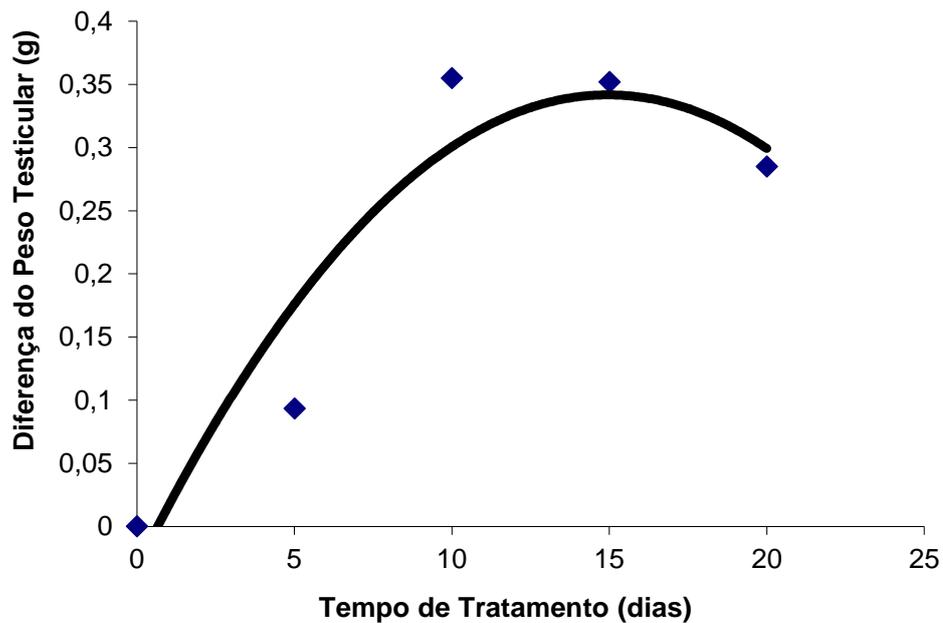


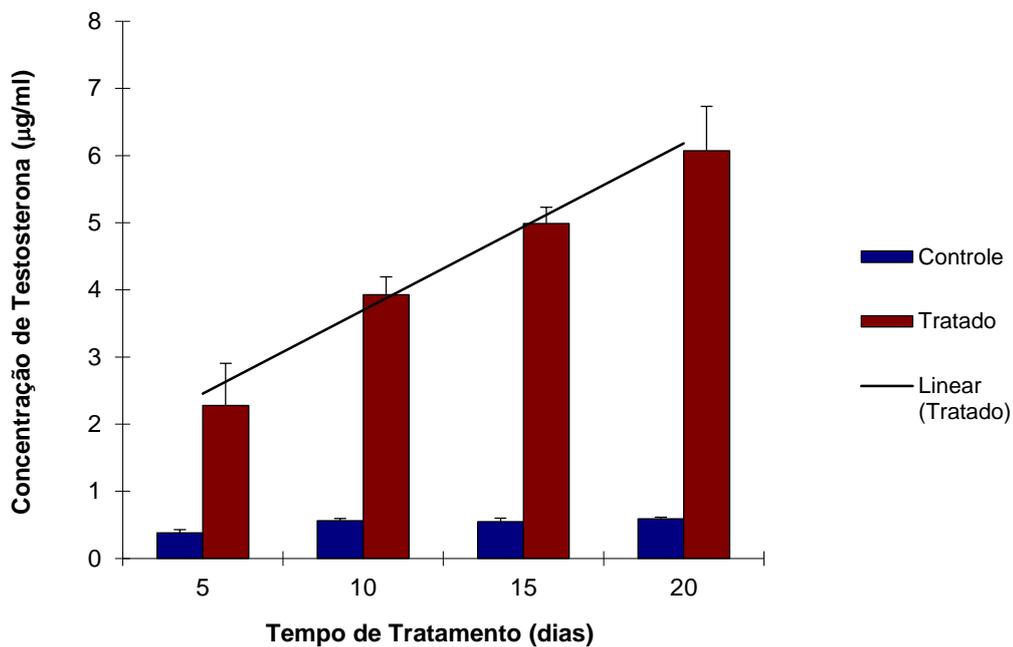
Figura 3B - Determinação do índice de relação peso corporal vs peso testicular, em função do tempo de tratamento (dias).



4.3 Efeito do tratamento da tiroxina sobre a concentração sérica de testosterona.

A **figura 4**, relacionando o aumento da massa corpórea e testicular, em função do período de tratamento, se faz necessário verificar os níveis séricos de testosterona. Nos ratos controle os níveis séricos de testosterona não promoveram modificações significativas em função do tempo de tratamento, entretanto, a tiroxina aumentou os níveis séricos de testosterona, de maneira altamente significativa, como observado na **figura 4**. Este resultado mostra que a administração de tiroxina durante 20 dias de tratamento, os níveis séricos de testosterona encontram-se nas concentrações de 5,9 $\mu\text{g/ml}$. Observa-se um aumento linear, em relação ao tempo de tratamento, com uma regressão linear de $R^2 = 0,987$.

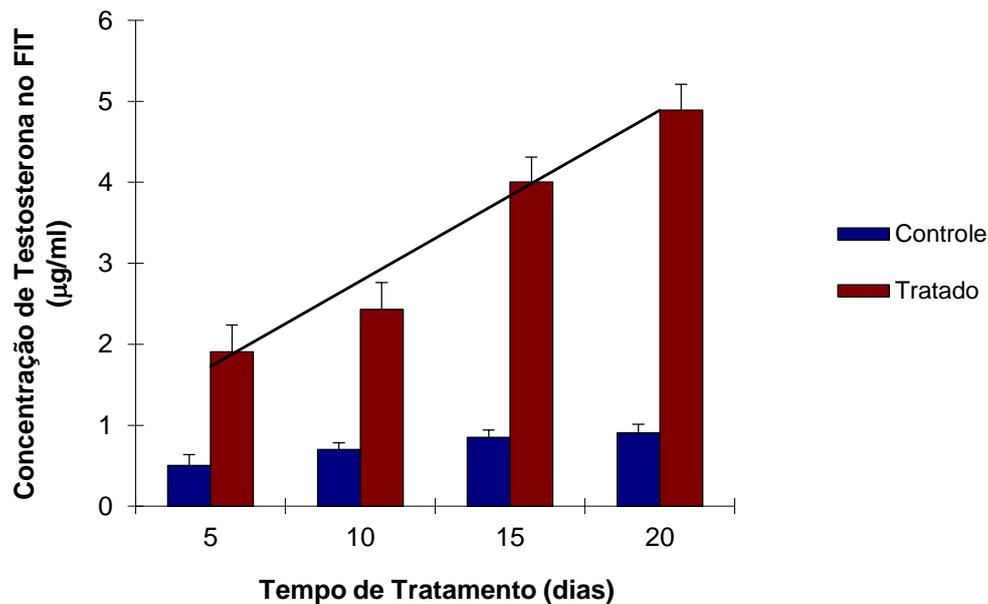
Figura 4 - Concentrações séricas de testosterona nos animais do grupo controle, e após tratamento com tiroxina, em 5, 10, 15 e 20 dias de tratamento. Os resultados são médias de 10 animais por grupo de experimentos realizados, \pm erro padrões ($p < 0,05$).



4.4 Efeito do tratamento com a tiroxina sobre os níveis de testosterona no fluido intersticial testicular

A **figura 5** mostra que a tiroxina administrada em ratos prematuros por 5, 10, 15 e 20 dias consecutivos, observa-se um aumento dos níveis de testosterona presente no fluido intersticial testicular, podendo verificar que nos ratos controle, os níveis de testosterona estão em baixas concentrações, na ordem de 0,5µg/ml, apresentando um leve aumento, observando um aumento linear nos níveis de testosterona do FIT, nos animais tratados com tiroxina.

Figura 5 – Determinação de testosterona no FIT do grupos controle e dos animais tratados com a tiroxina, em 5, 10, 15 e 20 dias de tratamento. Os valores dos resultados são as médias de 10 animais por grupo de experimentos realizados, \pm os erros padrões ($p < 0,05$).



4.5 Estudo de receptores de LH a nível testicular

As **figuras 6A e 6B**, mostram que a capacidade de ligação de ^{125}I -LH em homogeneizado celular testicular promove alterações após 20 dias de tratamento com tiroxina. Na análise de Scatchard pode-se verificar que a constante de afinidade (K_a) é da ordem de grandeza de 10^9 M^{-1} , e o número máximo de receptores (B_{max}) corresponde a 155 fmol/mg de proteína para o

controle e 112 fmol/mg de proteína na presença de tiroxina, resultados obtidos em condições de equilíbrio.

Figura 6A - Curva representativa da análise de Scatchard de saturação ^{125}I -LH-receptor em homogeneizado testicular de ratos controle.

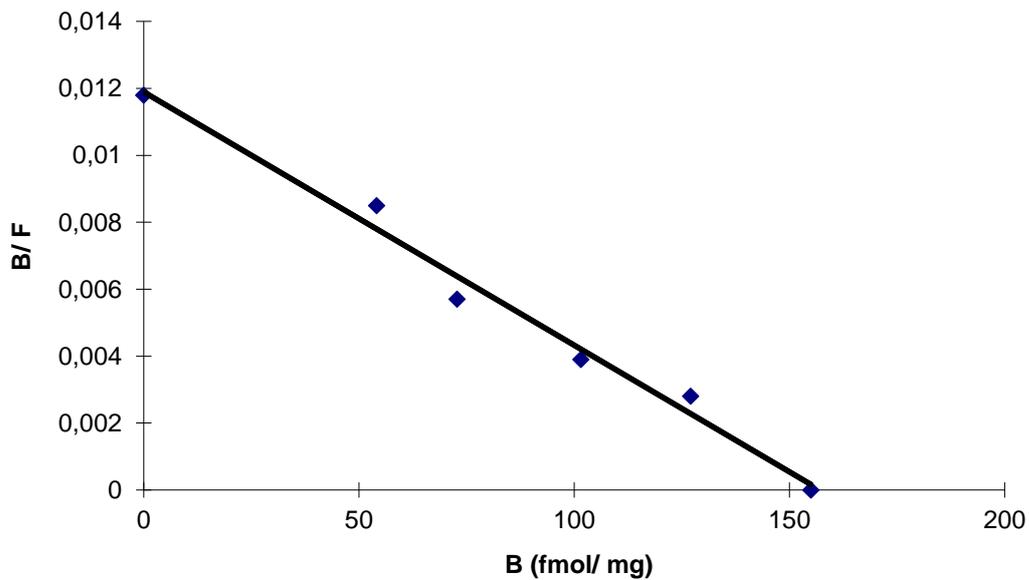
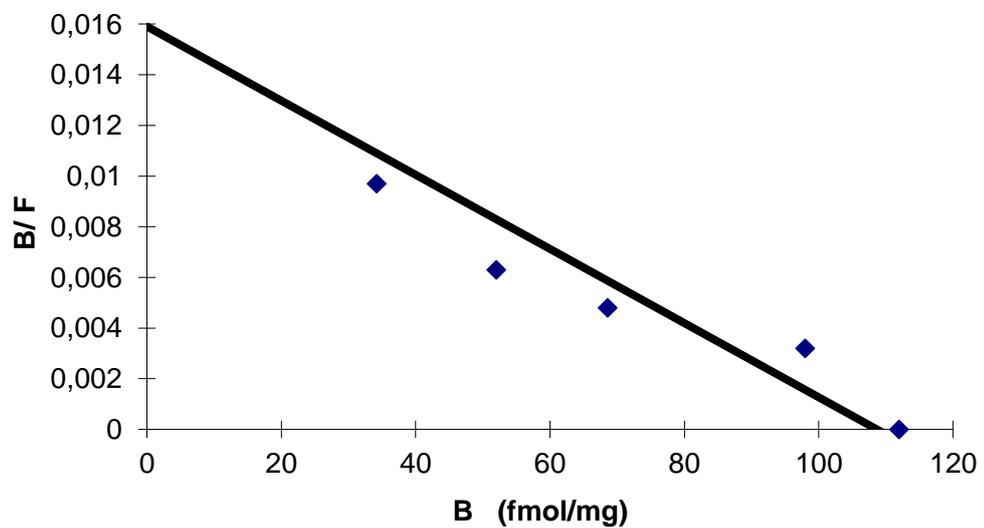


Figura 6B – Curva representativa da análise de Scatchard de saturação ^{125}I -LH-receptor em homogeneizado testicular de ratos tratados com tiroxina



4.6 Curva de Deslocamento da ligação ^{125}I - hCG

O ^{125}I - hCG é capaz de deslocar o hCG frio (não marcado) na concentração de 10^{-1} M, em receptores a nível de homogeneizado celular testicular de ratos prematuros. Os resultados indicam que a tiroxina altera o deslocamento do hCG marcado, e que 50 % da ligação específica do hormônio marcado é na ordem de 94 pMol do hCG frio, como pode ser observado na **figura 7B**. A **figura 7A** demonstra que o hCG frio, na concentração de 100 pMol desloca 19,68% da ligação total nos animais controle, não sendo observados nos animais tratados com tiroxina. Os resultados são expressos em 100 % da ligação total.

Figura 7A- Curva de deslocamento do complexo ^{125}I -hCG-receptor pelo hCG não marcado em homogeneizado celular testicular de ratos controle prematuros.

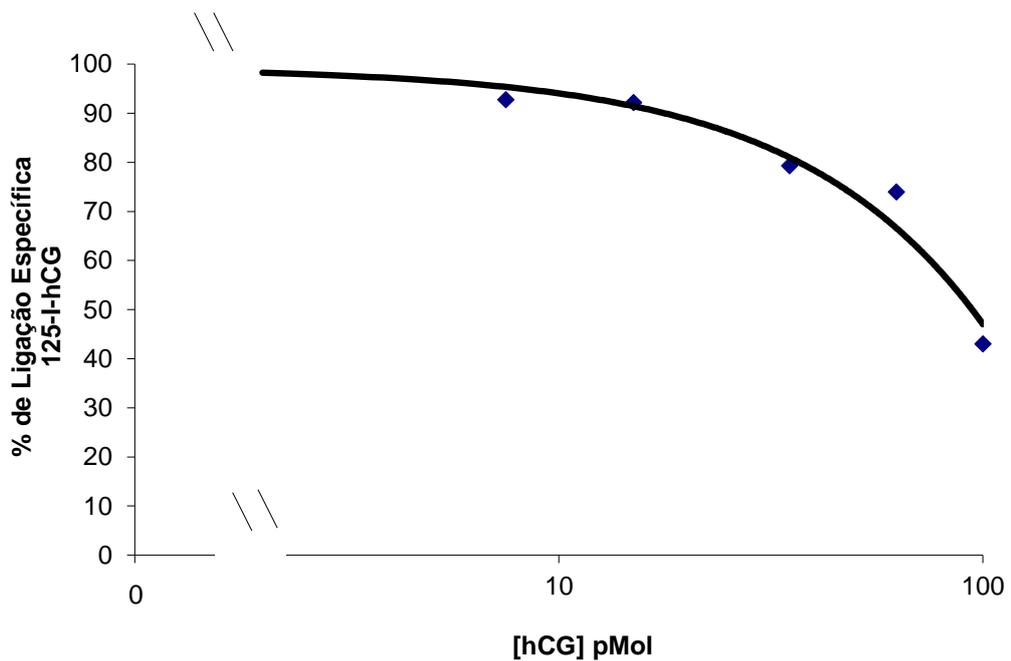
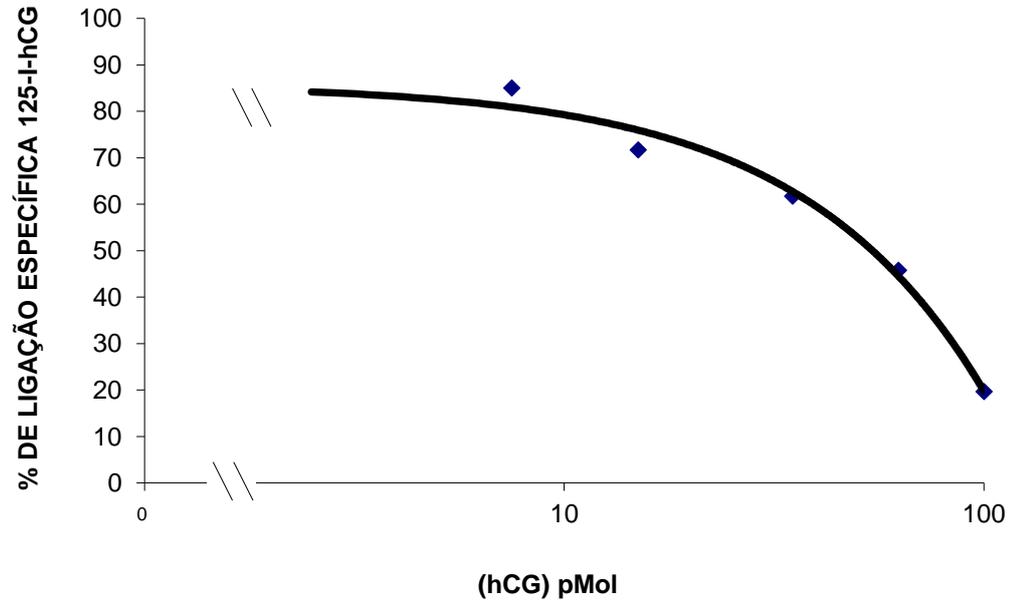


Figura 7B - Curva de deslocamento do complexo ^{125}I -hCG receptor pelo hCG não marcado em homogeneizado celular testicular de ratos tratados com tiroxina prematuros.



5 DISCUSSÃO

Nossos resultados sugerem que no tratamento com hormônio tireoídiano (tiroxina) em ratos jovens de 22 dias, machos, foram verificadas alterações metabólicas a nível do sistema reprodutor animal. Conseqüentemente, a tiroxina, no aspecto fisiológico, possivelmente não induz o hipertireoidismo em ratos normais.

Os resultados deste trabalho mostram que a tiroxina altera o peso corporal de ratos prematuros tratados por diversos períodos, como também modificando a massa testicular. Estes trabalhos estão correlatos com os de **Cooke et al (1984)**, demonstrando que o crescimento do rato começa duas semanas pós parto na dependência dos hormônios tireoídianos, de maneira que a tiroxina exógena altera o desenvolvimento corporal após os vinte e dois dias de vida. **Lima Filho (1995)**, e **Câmara (1997)** demonstraram que a tiroxina em ratos eutireoídeos, elevam os níveis de T_4 entre o segundo e quarto dia de tratamento, não induzindo o hipertireoidismo, aumentando o peso corporal de mais 12,3%. Conforme relatos de **Cook et al (1984)**, a tiroxina é capaz de induzir o hipertireoidismo, aumentando os níveis de receptores β -adrenérgicos, ou modificando o metabolismo de T_4 total em ratos. Este efeito da tiroxina pode ser explicado pela concentração dos níveis de T_4 nas primeiras semanas pós natal, e que neste período, a concentração de TSH no soro e na hipófise aumentam a níveis máximos no fim da primeira semana pós-natal, e os níveis hormonais mantêm-se elevados até o final da terceira semana pós-natal (**DUSSAULT e LABRIE, 1975**).

Dubois e Dussault (1977) afirmam que o período neonatal de ratos é caracterizado por um aumento do TRH hipotalâmico, enquanto o TSH encontra-se em níveis elevados entre o 12^o e o 24^o dias de vida, entretanto, a concentração de T_4 é elevada entre o 12^o e 22^o dias de vida.

Outros efeitos observados é que a tiroxina administrada em ratas prenhas promove alterações nos níveis séricos de T_3 e T_4 dos filhotes de 25 e 30 dias de vida, mostrando que estes apresentam uma redução dos níveis séricos de T_4 total, e modificando o peso corporal de ratos de 5 a 30 dias de vida (**SILVEIRA, 1996**).

Fishier e Klein (1981) verificaram que o T_3 estimula a síntese do hormônio do crescimento durante as primeiras três semanas em ratos neonatos, o mesmo acontece com ratos adultos em doses similares. O T_3 age sobre o hormônio do crescimento (GH), TSH e receptor de T_3 , no qual atuam sobre a atividade da deiodinase durante o desenvolvimento da hipófise do rato. Imediatamente após o nascimento e durante o período pós-natal, a atividade da 5'-deiodinase

II está sob o controle dos hormônios tireoidianos, como ocorre nos animais adultos (**RODRIGUEZ GARCIA, 1995**).

O papel dos hormônios tireoidianos no crescimento da espécie animal é bastante estudada, considerando que os níveis de T_3 e T_4 teciduais são afetados por fatores fisiológicos, como estágios de desenvolvimento, idade pós-natal e sexo (**ESCOBAR e MORREALE, 1994**), e em geral, o crescimento de mamíferos jovens requer o hormônio tireoidiano. Porém, algumas evidências indicam que os ratos neonatais e prematuros não são dependentes destes hormônios para o crescimento (**GLASSCOCK e NICOLL, 1981**).

A terapia de reposição combinada de T_3 e T_4 em doses fisiológicas no animal (ratos normais), pode restaurar completamente o eutireoidismo em ratos tireoidectomizados (**ESCOBAR e MORREALE, 1996**).

Outras observações neste trabalho sugerem que a tiroxina administrada, em ratos jovens, por um período de 5-20 dias (tempo dependente), apresentam alterações a nível testicular, acarretando um aumento de níveis séricos de testosterona. Possivelmente, estas modificações podem comprometer o eixo gonadal, influenciando nos níveis de LH e de FSH, a nível hipofisário. Este resultado pode relacionar-se com os aspectos endócrinos e parácrinos, a nível celular.

Estas observações relevam o efeito da tiroxina, alterando os níveis séricos de testosterona, apresentando uma ação específica na massa testicular, e que após 10 dias de tratamento, verifica-se um aumento na relação do índice peso testicular/peso corporal, correlacionando possivelmente com a concentração de T_4 e T_3 nos tecidos. Como descreve **Schroder Van Der Elster et al (1990)**, demonstraram que o T_3 total tecidual é formado do T_3 plasmático e do T_3 produzido nos tecidos, nestas condições a conversão local ocorre no fígado, cérebro, cerebelo, tecido adiposo marron, rins, hipófise e testículos. Durante o hipotireoidismo e hipertireoidismo, o T_3 tecidual é monitorado pela conversão local.

Alguns relatos mostram que drogas antitireoidianas, como o PTU, causam um aumento de tamanho do testículo em ratos adultos (**VAN HAASTER, 1992**), no entanto, **Cooke e Meisami (1991)** observaram que o aumento do peso testicular de ratos adultos, após tratamento com PTU durante a vida neonatal, resulta em um hipotireoidismo transitório, retornando ao eutireoidismo, podendo afetar diretamente o testículo, ou causar mudanças nos níveis hipotalâmicos e hipofisários, pelo aumento da secreção de TSH.

Relatos sugeridos por **Kirby et al (1992)** verificaram que no tratamento com PTU em ratos neonatos, ocorre uma supressão das gonadotrofinas, e após a retirada do medicamento,

têm-se um processo de compensação e recuperação da função hipofisária, acelerando a função testicular. O desenvolvimento da função testicular das células de Leydig depende primariamente da secreção hipofisária do LH, e várias evidências indicam que as células de Leydig controlam localmente o mecanismo parácrino e autócrino (**ZHAI at al, 1996**).

Mais tarde foi relatado por **Majdic at al (1997)**, que em testículos de ratos existia um fator imunorreativo nas células de Leydig do tipo B inibina/activina, sugerindo a participação na regulação autócrina e parácrina nos estágios de desenvolvimento.

Os resultados deste trabalho sugerem que o consumo de T_4 pelos tecidos periféricos em ratos prematuros, pode contribuir para a ativação da enzima $5'$ -deiodinase. A redução do T_4 pode resultar no aumento da atividade da $5'$ -deiodinase, e parece ser um mecanismo mais efetivo durante o período neonato, segundo relato feito por **Obregon at al, (1984)**. Entretanto, os trabalhos de **Cheron at al (1980)** afirmam que a concentração de T_4 aumenta em ratos com deficiência de selênio somente depois da segunda semana de vida. A concentração fisiológica normal no período pós-natal aumenta 12 vezes os níveis de T_3 observados na deficiência de selênio. Estes fatos marcam uma diminuição da atividade da deiodinase tipo I no fígado e no cérebro, e na atividade da $5'$ -deiodinase tipo II nas células adiposas marrons, sugerindo que a conversão de T_4 em T_3 pelos tecidos periféricos não podem ser maiores do que a fonte de T_3 no neonato. É também possível que os níveis de T_3 sejam altos no neonato e que devido ao processo patológico estimule a $5'$ -deiodinase nas células adiposas marrons. Portanto, **Jennings at al (1984)** mostram que existe uma diferença na produção hepática de T_3 pelo fígado perfundido em ratos hipotireoideus, hipertireoideu e eutireoideus, e esta diferença na produção de T_3 resulta na diferença da taxa de conversão fracional de T_4 para T_3 , indicando que a administração de tiroxina exerce um efeito estimulatório sobre a atividade da $5'$ -deiodinase.

O relevante deste trabalho está em determinar modificações nas concentrações hormonais no FIT de ratos jovens após tratamento com tiroxina, verificando um aumento de testosterona em relação ao período de tratamento.

Hedge at al (1990) mostraram a existência de um fator estimulador da esteroidogênese em ratos adultos normais, presente no FIT, em concentrações mais elevadas do que no soro. Este fator apresenta-se aumentado após uma disfunção testicular das células de Sertoli em ratos adultos e imaturos, podendo potencializar a estimulação do hCG, produzindo testosterona pelas células de Leydig.

O propranolol aumenta os níveis de testosterona no FIT, promovendo uma diminuição da gonadotrofina coriônica (**MARTINS at al, 1996**). Entretanto, o propranolol quando

administrado em ratos adultos não modifica os níveis de T₄, permanecendo níveis normais (CÂMARA, 1997).

Setchell e Sharp (1981) mostraram que a injeção de hCG promove um aumento de testosterona no FIT, devido a permeabilidade capilar ser um fator primário para a formação do mesmo.

Outros relatos que podem ser demonstrados neste trabalho, indicam que a tiroxina, quando administrada durante 20 dias consecutivos, reduz os níveis de receptores de LH, em relação aos níveis de receptores controle. Observa-se que o tratamento com a tiroxina modifica a capacidade de ligação específica do hCG frio na concentração de 100 pMol. Isto mostra que a tiroxina promove uma sensibilidade a nível de receptores de LH.

A estimulação de hCG aumenta a quantidade de receptores de LH em sua capacidade de produzir testosterona. No entanto, altas doses de LH/hCG resulta em menos receptores de LH, bloqueando a 17-hidroxilase/C 17-20 liase em ratos adultos (**PIRJO PAKARINEU, 1990**).

Hedger at al (1990) afirmam que o LH/hCG induz uma rápida dessensitização de receptores de LH e uma menor atividade do sistema adenil ciclase em células de Leydig, *In vivo* e *In viro*.

Maines at al (1990) observaram que a capacidade de ligação específica de LH em testículo de ratos é na ordem de 63 fmoles e que o tratamento com cis-platina modifica esta capacidade de ligação.

A presença de receptores de hCG em homogeneizado testicular, apresenta uma constante de afinidade na ordem de $0,24 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, valores semelhantes ao LH, com características de especificidade e alta afinidade, resultados correlatos com os observados neste trabalho, uma vez que a constante de afinidade apresenta a mesma ordem de grandeza. (**DUFAU at al, 1973**).

Panno at al (1986) sugerem que os hormônios tireoidianos promovem uma dessensibilização de receptores estrogênicos e uma sensibilização de receptores androgênicos em células de Sertoli de animais prematuros. O efeito estimulatório de T₃ por si só sobre os receptores androgênicos podem influenciar as respostas androgênicas das células de Sertoli, durante a espermatogênese.

Palmero at al (1993) demonstraram que a administração de T₃ é capaz de reduzir os receptores estrogênicos em ratos hipotireoideus de 2 e 3 semanas de idade. Entretanto, o hipotireoidismo induzido promove uma acentuada inibição de aromatase.

Considerando o exposto, a tiroxina exógena com atividade farmacológica e biologicamente ativa promove modificações somáticas em animais prematuros, alterando os níveis de hormônios sexuais masculinos, e possivelmente é capaz de modificar o processo da espermatogênese a nível celular.

O hormônio tireoidiano T_3 facilita o processo funcional de maturação das células de Sertoli, podendo envolver a produção de estradiol, como também o número de receptores estrogênicos.

6 CONCLUSÕES

Baseados nestes resultados, podemos concluir que a tiroxina:

- Durante a fase prematura, altera o metabolismo basal.
- É capaz de modular os níveis séricos de testosterona.
- A nível celular, controla a secreção de testosterona no fluido intersticial testicular (FIT).
- Modifica a capacidade de ligação específica, tanto para receptores de LH, como para receptores de hCG.

REFERÊNCIAS

- AILENBERG, M.; TUNG, M.; PELLETIER and FRITZ. Modulation of sertoli Cell Functions in the Two-Chamber Assembly by Peritubular Cells and Extracellular Matrix. **Endocrinology**, **122** (6): 2604-2612, 1988.
- AIZAWA, T.; KOBAYASHI, M.; KOMIYA, I.; HIRAMATSU, K.; SATO, A. and YAMADA, T. Increased Sensitivity of the Thyrotroph to Thyrotropin Releasing Hormones in Rats with Hypothalamic Hypothyroidism. **Endocrinology**, **114** (1) : 8-13, 1984.
- ALÁEZ, C.; CALVO, R.; OBREGÓN, M. J. and PASCUAL-LEONE, A.M. Thyroid Hormones and 5'-Deiodinase Activity in Neonatal Undernourished Rats. **Endocrinology**, **130** (2): 773-779,1992.
- AUCLAIR, C.; KELLY, P.A.; COY, D.H.; SHALLY, A.V. and LABRIE, F. Potent Inhibitory Activit of (D-Leu-6, Des-Gly 10)LHRH Ethylamide on LH/hCH and PRL Testicular Levels in the Rat. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, **76**(3):853-862, 1977.
- BELFIORE, A.; RUNELLO, F.; SAVA, L.; LA ROSA, G. and VIGNERI, R. Thyroglobulin Release After Graded Endogenous Thyrotropin Stimulation in Man: Lack of Correlation With Thyroid Hormone Response. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.**, **59**: 974-978,1984.
- BENAHMED,M.; BERMER, M.; DUCHARME, J.R. and SAZE, J.M. Steroidogenesis of Cultured Purified Pig Leydig Cells. Secretion and Effects of Estrogens Mol. Cell. **Endocrinology**, **28**: 705, 1982.
- BLACK, E. G.; SHEPPARD, M.C. and HOFFENBERG, R. Control of Thyroglobulin Secretion from The Rat Thyroid Gland. Journal **Endocrinology**, **101**: 107-111, 1984.
- BORST, G.C.; EIL,C. and BURMAN,K.D. Euthyroid Hyperthyroxinemia. **Ann Intern. Med**, **98**, 366:1983.

BOYAGES, S. C. Clinical Review 49. Iodine Deficiency Disorders. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, **77 (3)**: 587-591, 1993.

CÂMARA, E.D. Possíveis Modulações do Propranolol Associado à Tiroxina em Tecido Cardíaco de Ratos, 1997.

CHERON, R.G.; KAPLAN, M.M. and LARSEN, P.R. Divergent Changes of Thyroxine-5'-Monodeiodination in Rat Pituitary and Liver During Maturation. **Endocrinology**, **106 (5)**: 1405-1409, 1980.

COOKE, P.S. and MEISAMI, E. Early Hypothyroidism in Rats Causes Increased Adult Testis and Reproductive Organ Size but does not Change Testosterone Levels. **Endocrinology**, **129**: 237-243, 1991.

COOKE, P.S.; YONEMURA, C.V. and CHARSES, S.N. Development of Thyroid Hormone Dependence For Growth in The Rat: a Study Involving Transplanted Fetal, Neonatal and Juvenile Tissues. *Endocrinology* 115: 2059-2064, 1984.

CRUZ, T. **Farmacologia da Tireoide**. In: *Farmacologia* (P. Silva, Ed), 3ª Edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 7d21-731, 1989.

DORRINGTON, J.H.; FRITZ, I.B. and ARMSTRONG, D.T. Control of Testicular Estrogen Synthesis. **Biol. Reprod.**, **18**: 55, 1978.

DUSSAULT, J.H. and LABRIE, F. Development of the Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis in the Neonatal Rat. **Endocrinology**, **97**: 1321-1324, 1975.

DUFAU, M.L.; CHARREAU, E.H.; and CATT, K.J. Characteristic of a Soluble Gonadotropin Receptor from the Rat Testis. **The Journal of Biological Chemistry**, **248 (20)**: 6973, 6982, 1973.

ESCOBAR-MORREALE, H.F.; OBREGON, M.J.; HERNANDEZ, A.; ESCOBAR Del REY, F. and MORREALE de ESCOBAR, G. Regulation of Iodothyronine Deiodinase

Activity as Studied in Thyroidectomized Rats Infused with Thyroxine or Triiodothyronine. **Endocrinology**, **138** (6):2559-2568, 1997.

FABBRI, A.; KNOX, G.; BUCZKO and DUFAU, M.L. β -Endorphin Production by the Fetal Leydig Cell: Regulation and Implications for Paracrine Control of Sertoli Cell Function. **Endocrinology**, **122**: 749-755, 1988.

FRIEDGOOD, H.B. Studies on Sympathetic Nervous Control of the Anterior Hypophysis with Special Reference to a Neuro-Humoral Mechanism. Symposium on Endocrine Glands, Harvard Tercent. Celebration, Reprinted in **J. Reprod. Fertil**, 10(suppl.):3-9, 1936.

GLASSCOCK, G.F. and NICOLL, C.S. Hormonal Control of Growth in the Infant Rat. Further Evidence that Neither Thyrotropin or Thyroid Hormones are Transferred via Milk to Suckling the Pups. **Endocrinology**, **102**(3): 800-805, 1983.

HALBE, H. W. **Ginecologia Endócrina**. Ed. Roca. 3.1987, pp251.

HEDGER, M.P.; ROBERTSON, D.M.; DE KRETZER, D.M. and RISBRIDGER, G.P. Quantification of Steroidogenesis-Stimulating Activity in Testicular Interstitial Fluid by an *In Vitro* Bioassay Employing Adult Rat Leydig Cells. **Endocrinology**, **127** (4): 1967-1977, 1990.

JENNINGS, A.; CRUTCHFIELD, F.L. and DRATMAN, M.B. Effect of Hypothyroidism and Hyperthyroidism on Triiodothyronine Production in Perfused Rat Liver. **Endocrinology**, **114**(3): 992-997, 1984.

KIRBY, J. D.; JETTON, A. E.; COOKE, P. S.; HESS, R. A.; BUNICK, D.; ACKLAND, J. F.; TUREK, F.W. and SCHWARTZ, N. B. Developmental Hormonal Profiles Accompanying the Neonatal Hypothyroidism-Induced Increase in Adult Testicular Size and Sperm Production in the Rat. **Endocrinology**, **131**: 559-565, 1992.

KONNO, N.; MAKITA, H.; YURI, K.; IZUKA, N. and KAWASAKI, K. Association Between Dietary Iodine Intake and Prevalence of Subclinical Hypothyroidism in the Coastal

Regions of Japan. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.**, **78 (2)**: 393-397, 1994.

KRAGIE, L. and DOYLE, D. Benzodiazepines Inhibits Temperature-Dependent L. [¹²⁵I] Triiodothyronine Accumulation Into Human Liver, Human Neuroblast, and Rats Pituitary Cell Lines. **Endocrinology**, **130(3)**: 1211-1216, 1982.

LI, H.; PAPADOPOULOS, V.; VIDIC, B.; DYM, M. and CULTY, M. Regulation of Rat Testis Gonocyte Proliferation by Platelet-Derived Growth Factor and Estradiol: Identification of Signaling Mechanisms Involved. **Endocrinology**, **138**: 1289-1298, 1977.

LIMA FILHO, G.L. Estudo Comparativo da Regulação dos Hormônios Tireoidianos Sobre a Influência de Drogas Tireóideas e não Tireóideas em Ratos e Camundongos, 1995.

LISSITZKY, S.; FAYET, G.; GIRAND, A.; VERRIER, B. and Torresani, J. Thyrotrophin-Induced Aggregation and Reorganization into Follicles of isolated Porcine-Thyroid cells. **Eur. J. Biochem.**, **24**:88, 1971.

LOUIS, B.G. and FRITZ, J.B. Follicle-Stimulating Hormone and Testosterone Independently Increase the Production of Androgen-Binding Protein by Sertoli Cells in Culture. **Endocrinology**, **104**: 454, 1979.

MAINES, M.D.; SLUSS, P.M. and JSCAN, M. cis-Platinum-Mediated Decrease in Serum Testosterone is Associated with Depression of Luteinizing Hormone Receptors and Cytocrome P-450_{5cc} in Rat Testis. **Endocrinology**, **126(5)**: 2398-2406, 1990.

MAJDIC, G.; ALLAN, S.; MCNEILLY.; SHARPE, R.M.; EVANS, L.R.; GROOME, N.P.; and SAUNDERS, P.T.K. Testicular Expression of Inhibin and Activin Subunits and Follistatin in the Rat and Human Fetus and Neonate and During Postnatal Development in the Rat. **Endocrinology**, **138**: 2136-2147, 1997.

MCLACHLAN, R.I.; WREFORD, N.G.; MEACLIM, S.J.; DE KETSER, D.M.; ROBERTSON, D.M. Effects of Testosterone on Spermatogenic Cell Populations in the Adult Rat. **Biol. Reprod.**, **51**: 945-955, 1994.

MARTINS, M.C.C.; UDRISAR, D.P.; WANDERLEY, M.I. Propranolol Stimulates Testicular Interstitial Fluid Formation and Testosterone Secretion in Rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **29**: 1567-1571, 1996.

MEDEIROS-NETO, G.; TARGOVNIK, H.M. and VASSART, G. Defective Thyroglobulin Synthesis and Secretion Causing Goiter and Hypothyroidism. **Endocrine Reviews**, **14**(2): 165-183, 1993.

MELANDER, A.; WESTGREN, U.; ERICSON, L.E. and SUNDLER, F. Influence of the Sympathetic Nervous System on the Secretion and Metabolism of Thyroid Hormone. **Endocrinology**, **101** (4): 1228-1237, 1977.

MENDEL, C.M.; CAVALIERI, R.R. and KOHRLE, J. Thyroxine Transport and Distribution in Rats Treated With EMD 21388, a Synthetic Flavonoid That Displaces T₄ From Transthyretin. **Endocrinology**, **133**: 1525-1532, 1992.

MOOIJ, P.; DEWIT, H.J.; BLOOT, A. M.; WILDERS TRUSCHNIG, M.M. and DREXHAGE, H. A. Iodine Deficiency Induces Thyroid Autoimmune Reactivity in Wistar Rats. **Endocrinology**, **133** (3): 1197-1204, 1993.

MORLEY, J.E. Neuroendocrine Control of Thyrotropin Secretion. **Endocr. Ver**, **2**:396, 1981.
MORREALE de ESCOBAR, G.; CALVO, R.; DEL REY ESCOBAR, F. and OBREGON, M.J. Thyroid Hormone in Tissues from Fetal and Adult Rats. **Endocrinology**, **134** (6): 2410-2415, 1994.

NABIL, N. MINER, D.J. and AMATRUDA, J. M. Comments: Methimazole: An Alternative Route of Administration. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, **54** (1): 180-181, 1982.

NOZU, K.; DUFAU, M.L. and CATT. Estradiol Receptor Mediated Regulation of Steroidogenesis in Gonadotropin-desensitized Leydig Cells. **J. Biol. Chem.**, **256**: 1915, 1981.

O'DONNELL, L.; MCLACHLAN, R.I. WREFORD, N.G.; KRETSEY, D.M. and ROBERTSON, D.M. Testosterone With Drawl Promots Stage-Specific Detachment of Round Spermatids From The Rat Seminiferous Epithelium. **Biology of Reproduction**, **55**: 895 -901, 1994.

OBREGON, M.J.; SANTISTEBAN, P.; RODRIGUEZ-PEÑA, A.; PASCUAL; CARTAGENA, P.; RUIZ-MARCOS, A. LAMAS, L. ESCOBAR Del REY and MORREALE de ESCOBAR. Cerebral Hypothyroidism in the Rat with Adult-Onset Iodine Deficiency. **Endocrinology**, **115 (2)**: 614-624, 1984.

O'DONNELL, L.; STANTON, P.G.; WREFORD, N.G.; ROBERTSON, D.M. and MCLACHLAN, R.I. Inhibition of 5α -Reductase Activity Impairs the Testosterone-Dependent Restoration of Spermiogenesis in Adult Rats. **Endocrinology**, **137**: 2703-2710, 1996.

PALMERO, S.; PRATI, M.; DE MARCO, P.; TRUCCHI, P. and FUGASSA, E. Thyroid Regulation of Nuclear Tri-iodothyronine Receptors in the Developing Rat Testis. **Journal of Endocrinology**, **136**: 277-282, 1993.

PANNO, M.L.; SISCI, D.; SALERNO, M. LANZINO, M.; PEZZI, V.; MORRONE, E.G.; MAURO, L. PALMERO, S.; FUGASSA, E. and ANDÓ, S. Thyroid Hormones Modulates Androgen and Oestrogen Receptor Content in the Sertoli Cells of Peripubertal Rats. **Journal of Endocrinology**, **148**: 43-50, 1996.

PIRJO PAKARINEN, KOMMO, K.; VIHKO, VOUTILAINEN, R. and IELPO, H. Differential Response of Luteinizing Hormone Receptor and Steroidogenic Enzyme Gene Expression to Human Chorionic Gonadotropin Stimulation in the Neonatal and Adult Rat Testis. **Endocrinology**, **127 (5)**: 2469-2474, 1990.

PINTAR, J.E.; SCHACHTER, B.S.; HERMAN, A.B.; DURGERIAN, S. and KRIEGER, D.T. Characterization and Localization of Proopiomelanocortin Messenger RNA in the Adult Rat Testis. **Science**, **225**: 632, 1984.

PODESTA, E.J. and RIVAROLA, M.A. Concentration of Androgens in Whole Seminiferous Tubules and Intertitial Tissue of Rats at Different Ages of Development. **Endocrinology**, **95**: 455, 1974.

RICH, K.A.; BARDIN, C.W.; GUNSALUS, G.L. and MATHER, J.P. Age Dependent Pattern of Androgen-Binding Protein Secretion from Rat Sertoli Cells in Primary Culture. **Endocrinology**, **113**: 2284, 1983.

RODRIGUEZ-GARCIA, M.; JOLIN, T.; SANTOS, A. and PEREZ-CASTILLO, A. Effect of Perinatal Hypothyroidism on the Developmental Regulation of Rat Pituitary Growth Hormone and Thyrotropin Genes. **Endocrinology**, **136(10)**: 4339-4350, 1995.

ROBBINS, J. and BARTALENA, L. Plasma Transport of Thyroid Hormones. In: HENNEMANN, G.(Ed); Thyroid Hormone Metabolism **New York, Marcel Dekker**. P-3, 1986.

ROTI, E.; GARDINI, E.; MINELLI, R.; BIANCONI, L.; SALVI, M.; GAVARUZZI, G. and BRAVERMAN, L. E. Effects of Chronic Iodine Administration on thyroid Status in Euthyroid Subjects Previously Treated with Antithyroid Drugs for Graves Hiperthyroidism. **Endocrinology**, **76 (4)**: 928-932, 1993.

SAMUEL, M.H. WIERMAN, M.E. WANG,C. and RIDGWAY, E.C The Effect of Altered Thyroid Status on Pituitary Hormone Messenger Ribonucleic Acid Concentrations in The Rat. **Endocrinology**, **124**:2277-2282, 1989.

SANBORN, B.M. WAGLE, J.R. and GREER-EMMERT. Maturational and Hormonal Influences on Sertoli Cell Function. **Endocrinology**, **118(4)**: 1700-1707, 1986.

SCATCHARD, G. The Atraction of Proteins for Small Molecules and Ions. **Ann N. Y. Acad. Sci.** **51**: 660-672, 1949.

SCHRODER VAN DER ELST, J.P. and VAN DER HEIDE, D. Thyroxine, 3, '5 3'-Triiodothyronine, and 3, 3'5 –Triiodothyronine Concentrations in Several Tissues of the Rat:

Effects of Amiodarone and Desethylamiodarone on Thyroid Hormone Metabolism. **Endocrinology**, **127** (4), 1656-1664, 1990.

SEGAL, J. Calcium is the First Messenger for the Action of Thyroid Hormone at the Level of the Plasma Membrane: First Evidence for an Acute Effect of Thyroid Hormone on Calcium Uptake in the Heart. **Endocrinology**, **115** (1): 160-166, 1984.

SHAHA, C.; LIOTTA, A.S.; DRIEGER, D.T. and BARDIN, C.W. The Ontogeny of Immunoreactive β -Endorphin in Fetal, Neonatal and Pubertal Testes from Mouse and Hamsters. **Endocrinology**, **114**: 1584, 1984.

SHARP, R.M.; RASER, H.M. COOPER, I. and ROMERST, F.F.G. The Secretion Measurement and Function of a Testicular LHRH-Like Factor. **Ann. NY Acad. Sci**, **383**: 272-278, 1983.

SILVA, J.E. and LARSEN, P.R. Regulation of Thyroid Hormone Expression at the Receptor Levels. In: **Hannemann, G.(ed)** Thyroid Hormone Metabolism, Marcel Dekker, New York, pp 441-500, 1986.

SILVERMAN, B.L.; BETTENDORF, M. KAPLAN, S.L.; GRUOAOH, M.M. and MILLER, W. L. Regulation of Growth Homone (GH) secretion by GH-Releasing Factor, Somatostatin, and Insulin-Like Growth Factor I in Ovine Fetal and Neonatal Pituitary Cells *in vitro*. **Endocrinology**, **124**(1): 84-89, 1989.

SMITH, P.E. The Secretory Capacity of the Anterior Hypophysis as Evidence by the Effect of Partial Hypophysectomies in Rats. **Anat. Rec.**, **52**: 191-197, 1932.

STEINBERGER, E. and STEINBERGER A. Testis: Basic and Clinical Aspects. In: BALIN, H. G. **Reproductive Biology**. Excerpta Medica, Amsterdam, pp 144-267, 1992.

STEINBERGER, E.; TCHOLOKIAN, R.K. and STEINBERGER, A. Steroidogenesis in Testicular Cells. **J. Steroid Biochem.**, **11** : 185, 1979.

SUN, Y.; WREFORD, N.G.; ROBERTSON, D.M. and DE KRETZER, D.M. Quantitative Cytological Studies of Spermatogenesis in Intact and Hypophysectomized Rats: Identification of Androgen-Dependent Stages. **Endocrinology**, **127**: 1215-1223, 1990.

TANG, K.T.; BRAVERMAN, L.E. and DEVITO, W.J. Effects of Fibroblast Growth Factor on Type I 5'-Deiodinase in FRTL-5 Rat Thyroid Cells. **Endocrinology**, **135** (2): 493-500, 1994.

TINDALL, D.J.; VITALE, R. and MEANS, A.R. Androgen Binding Protein as a Biochemical Marker of Formation of the Blood Testis Barrier. **Endocrinology**, **97**: 636, 1975.

TSONG, S.D.; PHILLIPS, D.; HAHMI, N.; LIOTTA, A.S.; MARGIORIS, A.; BARDIN, C.W. and KRIEGER, D.T. ACTH and β -Endorphin Related Peptides are Present in Multiple Sites in the Reproductive Tract of the Male Rat. **Endocrinology**, **110**: 2204, 1982.

ULLER, R. P.; VAN HERLE, A. J. and CHOPIA, J. J. Thyroidal Responses to graded Doses of Bovine Thyrotropin. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, **45**: 312-3127, 1977.

VAN HAASTER, L.; DE JONG, F.H.; DE ROOIJ, DOCTER and DIRK. High Neonatal Triiodothyronine Levels Reduce the Period of Sertoli Cell Proliferation and Accelerate Tubular Lumen Formation in the Rat Testis, and Increase Serum Inhibin Levels. **Endocrinology**, **133**: 755-760, 1993.

VAN HAASTER, L.H.; DE JONG, F.H.; DOCTER, R. and DE ROOIJ, D.G. The Effect of Hypothyroidism on Sertoli Cell Proliferation and Differentiation and Hormone Levels During Testicular Development in the Rat. **Endocrinology**, **131**: 1574-1576, 1992.

WELSH, M.J. and WIEBE, J.P. Sertoli Cell Capacity to Metabolize C₁₉ Steroids: Variation With Age and the Effect of Follicle-Stimulating Hormone. **Endocrinology**, **103**: 838, 1978.

WILSON, J.D. and FOSTER, D.W. Distúrbios do Ovário e Aparelho Reprodutor Feminino. In: WILSON, J.P.; FOSTER, D.W. **Tratado de Endocrinologia**, Manole, 1:258-290, 7 ed, 1988.

WRIGHT, W.W. and FRANKEL, A.L. Endogenous Androgen Concentrations in Nucleo Isolated from Seminiferous Tubules of Mature Rat Testis. **J. Steroid, Biochem., 10:** 633, 1979.

ZHAI, J.D. LANCLOS, K. and ABNEY, T.O. Estrogen Receptor Messenger Ribonucleic Acid Changes During Leydig Cell Development. **Biology of Reproduction, 55:**782-788,.1996.

ZONDEK, B. and SULMAN, F. The Mechanisms of Action and Metabolism of Gonadotrophic Hormones in the Organism. **Vitamins and Hormones, 3:** 297-336, 1945.