

**EFEITO DO 3,5,3'-TRIIODO-L-TIRONINA NAS PROTEÍNAS DOS  
FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS DE TESTÍCULOS DE RATOS  
DURANTE O DESENVOLVIMENTO SEXUAL**

ARIANE ZAMONER

Florianópolis

**2002**

**EFEITO DO 3,5,3'-TRIODO-L-TIRONINA NAS PROTEÍNAS DOS  
FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS DE TESTÍCULOS DE RATOS  
DURANTE O DESENVOLVIMENTO SEXUAL**

Dissertação Apresentada por ARIANE ZAMONER para Obtenção do Grau de Mestre em  
Farmácia

Orientadora; Profa. Dra. FÁTIMA REGINA MENA BARRETO SILVA

Florianópolis

**2002**

ZAMONER, Ariane.

Efeito do 3,5,3'-triiodo-L-tironina nas proteínas dos filamentos intermediários de testículos de ratos durante o desenvolvimento sexual/Ariane Zamoner. Florianópolis, 2002. 101p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia

1. T<sub>3</sub>. 2. Testículo. 3. Célula de Sertoli. 4. Vimentina. 5. Fosforilação.

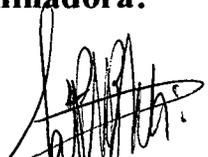
**"EFEITOS DO 3, 5, 3'-TRIIODO-L-TIRONINA NAS  
PROTEÍNAS DOS FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS DE  
TESTÍCULOS DE RATOS DURANTE O  
DESENVOLVIMENTO SEXUAL "**

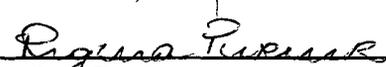
**POR**

**ARIANE ZAMONER**

**Dissertação julgada e aprovada em  
sua forma final pelo Orientador e  
membros da Banca Examinadora,  
composta pelos Professores Doutores:**

**Banca Examinadora:**

  
\_\_\_\_\_  
**Fátima Regina Mena B. Silva (BQA/CCB/UFSC – Membro Titular)**

  
\_\_\_\_\_  
**Regina Pessoa Pureur (BQA/ICBS/UFRGS– Membro Titular)**

  
\_\_\_\_\_  
**Edson Luiz da Silva (ACL/CCS/UFSC– Membro Titular)**

  
**Prof.ª Dra. Tânia Silvia Fröde**  
**Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC**

**Florianópolis, 30 de agosto de 2002.**

Dedico este trabalho aos meus pais, Ari e Carmen, que são os responsáveis por tudo o que sou, pela minha existência e meu caráter. Pelos momentos de ausência e por terem embalado meus sonhos e ideais. Seu incentivo, apoio e compreensão foram essenciais em todos os momentos. Dedico também a minha irmã, que sempre vibrou com minhas conquistas.

*Agradecimento especial*

A minha orientadora Fátima, por ter me conduzido no caminho da verdadeira ciência através de exemplos de seriedade, dedicação e objetividade. Por todas as oportunidades que me proporcionou, pela confiança, atenção, orientação dedicada e presença constante desde a iniciação científica, que foram fundamentais na elaboração deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Não é o desafio com que nos deparamos que determina quem somos e o que estamos nos tomando, mas a maneira com que respondemos ao desafio. Somos combatentes, idealistas, mas plenamente conscientes, pois o ter consciência não nos obriga a ter a teoria sobre as coisas: só nos obriga a sermos conscientes. Problemas para vencer, liberdade para provar. E, enquanto acreditarmos em nosso sonho, nada é por acaso.

(Henfil)

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais e minha irmã pelo amor e apoio incondicional.

Ao Douglas que sofreu com minhas angústias e vibrou com minhas realizações. Pela compreensão nos momentos de ausência, pela amizade, amor, apoio e companheirismo que foram importantes nessa caminhada. E a sua família que sempre me incentivou e apoiou em todos os momentos.

A Karine, com quem compartilhei alegrias, sonhos, frustrações e dificuldades. Agradeço por ter dividido comigo risos e lágrimas e pela presença constante em todos os momentos.

A Profa. Dra. Regina Pessoa Püreur, pela dedicação, valiosos ensinamentos, compreensão, oportunidades concedidas e colaboração na realização deste trabalho e no crescimento dos meus conhecimentos científicos.

A Profa. Dra. Laura e Dra. Kátia Padilha Barreto pelo incentivo, amizade, disponibilidade e atenção.

A Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa e à Profa. Dra. Rozangela Curi Pedroza pelo apoio e amizade e pela valiosa colaboração com materiais e equipamentos essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Álvaro Pacheco de Souza pela atenção, amizade, disponibilidade e apoio na impressão deste trabalho.

Às amigas Cheila e Sabrina pela amizade e pelos bons momentos de convivência.

Às colegas e amigas de laboratório Ana Paula, Eliandra, Leila, Cinira e Maria Alice pelos momentos de amizade e agradável convivência.

Às colegas e amigas do laboratório 31 da Bioquímica da UFRGS, Lúcia, Franciele, Lílian, Priscila, Samanta, Cláudia, Aline e Graziela, pela amizade e auxílio prontamente prestados durante o período em que estive em Porto Alegre.

Às irmãs e meninas da Residência Maria Imaculada de Porto Alegre por terem me recebido e hospedado com muito carinho e dedicação.

A coordenação do Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina por ter oportunizado a realização deste trabalho.

Aos professores, funcionários e colegas do Programa de Pós-graduação em Farmácia pelo apoio, colaboração e valiosa convivência a qual muito contribuiu para a minha formação.

Ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina pelas oportunidades concedidas.

Ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo apoio e colaboração científica.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná por ter oportunizado a realização dos estudos morfológicos e em especial a Profa. Dra. Viviane Mara Wöhel pela valiosa colaboração e dedicação na realização da análise morfológica.

Ao FUNPESQUISA - UFSC, CNPq, CAPES e FAPERGS - RS pelos auxílios e bolsas concedidas.

Aos inúmeros amigos e “Mestres” aqui não mencionados que muito contribuíram, de uma maneira ou outra, para a realização de uma etapa deste sonho.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....</b>	<b>xiii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>xvi</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xviii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xx</b>
<b>L INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. TESTÍCULO.....	1
I. L L Estrutura funcional dos testículos.....	1
1.2. CÉLULA DE SERTOLI.....	3
1.2.1 .Morfologia e papel na espermatogênese.....	3
1.3. HISTOFISIOLOGIA DO TESTÍCULO.....	5
1.4. HORMÔNIOS TIREOIDIANOS.....	5
1.4.1. Mecanismos de produção e secreção dos hormônios tiroidianos.....	<b>6</b>
1.4.2. Deiodinases.....	8
1.5. REGULAÇÃO DAS CÉLULAS DE SERTOLI.....	9
1.5.1.Hormônios tiroidianos e célula de Sertoli .....	9
1.6. CITOESQUELETO.....	11

1.6.1. Filamentos intermediários.....	13
1.6.2. Citoesqueleto testicular.....	15
1.6.3. Fatores que alteram o metabolismo das proteínas do citoesqueleto.....	16
1.7. FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	17
1.7.1. Proteínas quinases.....	19
1.7.1.1. Serina/ treonina quinases.....	20
1.7.1.2. Tirosina quinases.....	21
1.7.2. Proteínas fosfatases.....	21
1.8. FOSFORILAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO CITOESQUELETO.....	22
II OBJETIVOS.....	24
III.....	MATERIAIS E MÉTODOS
m.1. MATERIAIS.....	26
in. 1.1. Soluções e reagentes.....	26
in. 1.1.1. Hormônio e inibidores de protease.....	26
in. 1.1.2. Reagentes utilizados na preparação do tampão para extração de proteínas.....	26
in. 1.1.3. Substâncias para precipitação, lavagem e diluição das proteínas.....	27
m. 1.1.4. Tampão de preparação das amostras.....	28
in. 1.1.5. Padrão de peso molecular SDS-6H.....	28

II	1.1.1.6. Reagentes e soluções utilizados para as migrações eletroforéticas. ....	
II	1.1.1.7. Soluções e reagentes utilizados nos estudos com anticorpos.....	30
in.	1.1.8. Revelação da imunoreação.....	31
m.2.	EQUIPAMENTOS.....	31
m.3.	MÉTODOS.....	32
in.3.1.	Animais.....	32
in.3.2.	Modelos experimentais.....	33
in.3.2.1.	Tratamento <i>in vivo</i> com o hormônio T <sub>3</sub> .....	33
ni.3.2.2.	Tratamento <i>in vitro</i> com T <sub>3</sub> .....	33
in.3.2.3.	Obtenção das gônadas.....	34
ni.3.3.	Separação do soro para determinação das concentrações hormonais e de triacilglicerol.....	^4
ni.3.4.	Análise morfológica.....	34
in.3.5.	Incorporação <i>in vitro</i> de <sup>32</sup> P ortofosfato.....	35
II1.3.6.	Preparação da fração de proteínas do citoesqueleto insolúveis em TritonX-100.....	26
in.3.7.	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	36
ni.3.8.	Imunodeteção (“Western Blot”).....	37
in.3.9.	Procedimentos de quantificação.....	38

in.3.10. Análise estatística.....	38
rV. RESULTADOS.....	39
IV. 1. OBTENÇÃO DA FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA ENRIQUECIDA EM FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS (FI) DE TESTÍCULOS DE RATO: IMUNOCONTEÚDO E INCORPORAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE NA VIMENTINA DURANTE O DESENVOLVIMENTO SEXUAL.....	39
rV.L1. Obtenção da fração citoesquelética enriquecida em FI e imunodeteção da vimentina.....	39
IV. L2. Ontogenia da imunodeteção e da fosforilação “in vitro” da vimentina da fração citoesquelética.....	40
rV.2. EFEITOS DO TRATAMENTO <i>IN VIVO</i> COM T <sub>3</sub> EM RATOS EM TRÊS DIFERENTES FASES DO DESENVOLVIMENTO SEXUAL.....	42
TV.2.1. Índices somáticos.....	43
TV.2.2. Níveis séricos dos hormônios tireoidianos e do TSH.....	43
rv.2.3. Concentrações séricas de triacilglicerol.....	44
rv.2.4. Análise morfológica dos túbulos seminíferos.....	45
TV.2.4.1. Microscopia óptica.....	46
rV.2.4.2. Microscopia Eletrônica.....	46
IV.2.5. Imunoconteúdo e fosforilação <i>in vitro</i> da vimentina na fração citoesquelética de testículos de ratos.....	48

IV.3. EFEITO <i>IN VITRO</i> DO T <sub>3</sub> NO MUNOCONTEÚDO E NA FOSFORILAÇÃO DA VIMENTINA EM TESTÍCULOS DE RATOS EM DIFERENTES FASES DO DESENVOLVIMENTO SEXUAL.....	50
IV.3.L Curva dose-resposta do T <sub>3</sub> no imunoconteúdo da vimentina de testículos de ratos imaturos.....	59
rv.3.2. Curva dose-resposta do T <sub>3</sub> sobre a incorporação <i>in vitro</i> de na vimentina de testículos de ratos imaturos.....	5 <sup>^</sup>
rv.3.3. Efeito do tratamento <i>in vitro</i> com T <sub>3</sub> sobre o imunoconteúdo e a fosforilação <i>in vitro</i> da vimentina de testículos de rato ao longo do desenvolvimento sexual.....	53
V. DISCUSSÃO.....	56
VI. CONCLUSÕES.....	65
VI. 1. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65
VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
VIII ANEXOS.....	80

#### ARTIGO 1

Effect of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine on amino acid accumulation and membrane potential in Sertoli cells of the rat testis

#### ARTIGO 2 - Submetido para publicação

Acute effect of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine on vimentin during sexual development of rat testis. *Cell & Tissue Research*.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura I.1 Representação esquemática do sistema reprodutor masculino..... 1

Figura 1.2 Representação esquemática da estrutura celular de testículos de mamíferos..... 2

Figura 1.3 Representação do epitélio seminífero mostrando a inter-relação entre as células de Sertoli e as células germinativas..... 4

Figura 1.4 Eixo hipotálamo-hipófise-tireóide-testículo..... 7

Figura 1.5 Os três tipos de filamentos protéicos do citoesqueleto..... 12

Figura 1.6 Representação esquemática da formação de um filamento intermediário..... 14

Figura 1.7 Representação esquemática do sistema de fosforilação de proteínas e alguns dos agentes regulatórios..... 18

Figura 1.8 Representação esquemática de um sistema fosforilante..... 19

Figura II. 1 Representação esquemática da hipótese de estudo do envolvimento do T<sub>3</sub> na regulação das proteínas de filamentos intermediários das células de Sertoli de testículos de ratos..... 24

Tabela nr. 1 Composição do tampão Krebs-Hepes..... 26

Tabela in.2 Composição do tampão de alta força iônica para extração de proteínas de filamentos intermediários..... 27

Tabela III.3 Composição do tampão de preparação das amostras..... 28

Tabela III.4 Composição do gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 10%..... 28

Tabela in.5	Composição do tampão de migração para eletroforese.....	29
Tabela in.6	Composição da solução para corar o gel de eletroforese.....	29
Tabela DI.7	Composição da solução descorante forte.....	29
Tabela in.8	Composição da Solução de Secagem.....	29
Tabela III.9	Composição do TBS.....	30
Figura rv.1	Perfil eletroforético da fração citoesquelética enriquecida em Filamentos intermediários de testículos de ratos normais em gel de poliacrilamida corado com comassie blue e imunodeteção da vimentina.....	39
Figura IV.2	Imunodeteção da vimentina da fração citoesquelética enriquecida em FI de testículos de rato durante o desenvolvimento sexual.....	41
Figura rv.3	Ontogenia da incorporação <i>in vitro</i> de <sup>32</sup> P-ortofosfato na vimentina insolúvel em Triton X-100 de testículos de ratos durante o desenvolvimento sexual.....	42
Tabela rv.1.	Efeito do tratamento <i>in vivo</i> com T <sub>3</sub> no peso corporal e testicular de ratos durante o desenvolvimento sexual.....	43
Tabela IV.2.	Níveis séricos de hormônios tireoidianos e de TSH em ratos controles e tratados com T <sub>3</sub> 80 jig/kg de peso corporal durante 7 dias.....	44
Figura rV.4	Efeito do tratamento <i>in vivo</i> com hormônio T <sub>3</sub> nos níveis séricos de triacilglicerol em ratos controles e tratados.....	45
Figura rV.5	Fotomicrografia das seções coradas com hematoxilina-eosina de testículos de ratos imaturos controles e tratados <i>in vivo</i> com T <sub>3</sub> .....	46
Figura rv.6	Microscopia eletrônica de testículos de ratos imaturos controles e tratados <i>in vivo</i> com T <sub>3</sub> .....	47

Figura rv.7 Efeito do tratamento <i>in vivo</i> com o hormônio T <sub>3</sub> no imunocontéudo da vimentina insolúvel em Triton X-100 de testículo de ratos controles e tratados.....	48
Figura rV.8 Efeito do tratamento <i>in vivo</i> com T <sub>3</sub> na incorporação <i>in vitro</i> de P na vimentina de testículos de ratos imaturos, púberes e adultos.....	49
Figura rv.9 Curva dose-resposta do efeito do T <sub>3</sub> <i>in vitro</i> no imunocontéudo da vimentina de testículos de ratos de 15 dias de idade.....	51
Figura rv. 10 Curva dose-resposta do T <sub>3</sub> sobre a incorporação <i>in vitro</i> na vimentina da fração citoesquelética enriquecida em FI de testículos de ratos de 15 dias de idade.....	52
Figura IV. 11 Efeito do tratamento <i>in vitro</i> com T <sub>3</sub> em diferentes concentrações no imunocontéudo e na fosforilação da vimentina presente na fração citoesquelética enriquecida em FI de testículos de ratos imaturos.....	53
Figura rv.12 Efeito do T <sub>3</sub> <i>in vitro</i> (IliM) no imunocontéudo da vimentina em testículos de ratos.....	54
Figura rV.13 Efeito do tratamento <i>in vitro</i> com T <sub>3</sub> na incorporação <i>in vitro</i> de P na vimentina em testículos de ratos.....	55
Figura VI. 1 Representação esquemática da hipótese do mecanismo de ação do T <sub>3</sub> sobre as proteínas de filamentos intermediários de testículos de ratos....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABP	Proteína ligadora de andrógenos
ADP	Adenosina difosfato
AMPc	3',5' - Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
Ca <sup>2+</sup>	íon cálcio
D1	Deiodinase tipo 1
D2	Deiodinase tipo 2
D3	Deiodinase tipo 3
FI	Filamento intermediário
FSH	Hormônio folículo estimulante
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
GMPc	3',5' - Guanosina monofosfato cíclico
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
GTP	Guanosina trifosfato
IGF-I	Fator de crescimento semelhante a insulina
Kg	Quilograma

LH	Hormônio luteinizante
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PKCaM	Proteína quinase dependente de cálcio e calmodulina
PP1	Proteína fosfatase tipo 1
PP2A	Proteína fosfatase tipo 2 A
PP2B	Proteína fosfatase tipo 2 B
PP2C	Proteína fosfatase tipo 2 C
REL	Retículo endoplasmático liso
RER	Retículo endoplasmático rugoso
RNA	Ácido ribonucléico
RN Am	RNA mensageiro
TR	Receptor para hormônios tireoidianos
TRH	Hormônio liberador de tireotrofina
TSH	Hormônio estimulante da tireóide
Ta	Triiodotironina
Tsr	Triiodotironina reverso
T <sub>4</sub>	Tiroxina

## RESUMO

As células de Sertoli têm um importante papel no desenvolvimento e na manutenção da espermatogênese em testículos de mamíferos. A expressão de receptores funcionais para T<sub>3</sub> no testículo e a demonstração de que este hormônio afeta as funções das células de Sertoli sugerem estas células como um modelo para o estudo da regulação hormonal das proteínas do citoesqueleto. Foram descritos vários estudos sobre os efeitos dos hormônios da tireóide na proliferação e diferenciação das células de Sertoli. Entretanto, ainda não foram descritas as ações do T<sub>3</sub> especificamente no citoesqueleto testicular durante o desenvolvimento sexual de ratos. Os objetivos deste trabalho foram estudar a ontogenia da vimentina, o efeito dos tratamentos *in vivo* e *in vitro* com T<sub>3</sub> no imunoconteúdo e na incorporação *in vitro* de <sup>32</sup>P ortofosfato na vimentina em testículos de rato durante o desenvolvimento sexual, avaliar os efeitos do tratamento *in vivo* com T<sub>3</sub> nos níveis séricos dos hormônios tireoidianos, do TSH e do triacilglicerol nas fases imatura, púbere e adulta e avaliar as alterações morfológicas causadas pelo tratamento *in vivo* nos túbulos seminíferos na fase imatura. Para a ontogenia do imunoconteúdo e da fosforilação da vimentina, e para os estudos de tratamento *in vitro* foram utilizados ratos de 15, 35 e 45 dias de idade. No estudo dos efeitos *in vivo* foram utilizados ratos de 8, 28 e 38 dias de idade que foram tratados com T<sub>3</sub> 80 µg/Kg de peso corporal durante 7 dias consecutivos, até atingirem os 15, 35 e 45 dias respectivamente. No dia do experimento o sangue foi coletado para as determinações dos níveis hormonais e de triacilglicerol. O tratamento *in vivo* com o hormônio T<sub>3</sub> produziu alterações nos níveis de T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, TSH e triacilglicerol condizentes com um estado de hipertireoidismo induzido. Para análise morfológica, um testículo foi fixado para microscopia óptica e o contralateral para eletrônica. A fração citoesquelética enriquecida em filamentos intermediários foi obtida, e o imunoconteúdo e a incorporação *in vitro* de ortofosfato radioativo foram quantificados por densitometria óptica da banda correspondente à vimentina. Os estudos morfológicos apresentaram túbulos seminíferos mantendo a integridade funcional e estrutural do epitélio seminífero com lúmen tubular formado. Nas células de Sertoli de ratos tratados, observou-se aumento na quantidade de retículo endoplasmático rugoso, aparelho de Golgi mais desenvolvido e

presença de lipídeos dispersos dentro e fora das células, indicando que a célula estava com intensa atividade de síntese e processamento de proteínas e que o tratamento estimulou a maturação celular. Os resultados também demonstraram que a vimentina é expressa ao longo do desenvolvimento sexual, onde o imunocontéudo diminui da fase imatura para a púbere e volta a aumentar na idade adulta. Tanto o tratamento *in vivo* quanto *in vitro* com o hormônio promoveram aumento no imunocontéudo e na fosforilação da vimentina de testículos de ratos nas fases imatura e adulta do desenvolvimento sexual. Nos estudos do efeito *in vitro*, demonstrou-se que a dose de  $0,1 \mu\text{M}$  de  $\text{T}_3$  estimulou a fosforilação sem afetar o imunocontéudo da vimentina, enquanto a dose de  $100 \mu\text{M}$  apresentou o efeito oposto. Todavia, as doses intermediárias ( $1 \text{ nM}$  e  $10 \mu\text{M}$ ) induziram aumento na fosforilação e no imunocontéudo da vimentina insolúvel em Triton X-100. O  $\text{T}_3$  pode estar envolvido em uma variedade de processos que regulam a organização do citoesqueleto ou com os elementos envolvidos em transdução de sinais intracelulares. Nossos resultados sugerem que durante a maturação sexual, os mecanismos de regulação hormonal são importantes no equilíbrio entre polimerização e despolimerização dos filamentos intermediários de testículos de ratos. Desse modo, os mecanismos pelos quais o  $\text{T}_3$  estimula a fosforilação e o imunocontéudo da vimentina parecem envolver diretamente atividade de quinases e/ou fosfatases mediando vias de transdução de sinais.

## ABSTRACT

Sertoli cells have an important role in the development and maintenance of spermatogenesis in the mammalian testicle. The expression of functional receptors for T<sub>3</sub> in the testicle and the demonstration that this hormone affects Sertoli cell function suggests that these cells may be a suitable model to study the hormonal regulation of cytoskeletal proteins. Numerous studies have described the effects of thyroid hormones on proliferation and differentiation in Sertoli cells. However, the specific actions of T<sub>3</sub> on the cytoskeleton during sexual development in rats have not been elucidated. The objectives of this study were to investigate the ontogeny of vimentin, the effect of *in vivo* and *in vitro* treatments with T<sub>3</sub> on the immunoccontent and the *in vitro* incorporation of <sup>32</sup>P orthophosphate into vimentin in rat testicles during sexual development, to analyse the effects of *in vivo* treatment with T<sub>3</sub> on serum levels of the thyroid hormones, TSH and triacylglycerol in immature, pubertal and adult animals and to assess the morphological changes caused by the *in vivo* treatment in the seminiferous tubules in the immature animals. Rats aged 15, 35 and 45 days were used for the experiments on the ontogeny of the immunoccontent and the phosphorylation of vimentin, as well as for the studies involving *in vitro* treatment. For the *in vivo* studies rats aged 8, 28 and 38 days were treated with 80 µg T<sub>3</sub>/Kg body weight on 7 consecutive days until the animals reached 15, 35 and 45 days of age, respectively. On the day of the experiment blood was collected for the determination of hormone and triacylglycerol levels. The *in vivo* treatment with T<sub>3</sub> altered the levels of T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, TSH and triacylglycerol in keeping with a state of induced hyperthyroidism. For the morphological analysis, one testicle was fixed for light microscopy whilst the second testicle from the same animal was processed for electron microscopy. A cytoskeletal fraction enriched in intermediate filaments was obtained and the immunoccontent, together with the *in vitro* incorporation of radioactive orthophosphate, was quantified by optical densitometry of the band corresponding to vimentin. The morphological studies revealed seminiferous tubules maintaining the functional and structural integrity of the seminiferous epithelium with the formation of a tubular lumen. In the Sertoli cells of treated rats, an increase was noted in

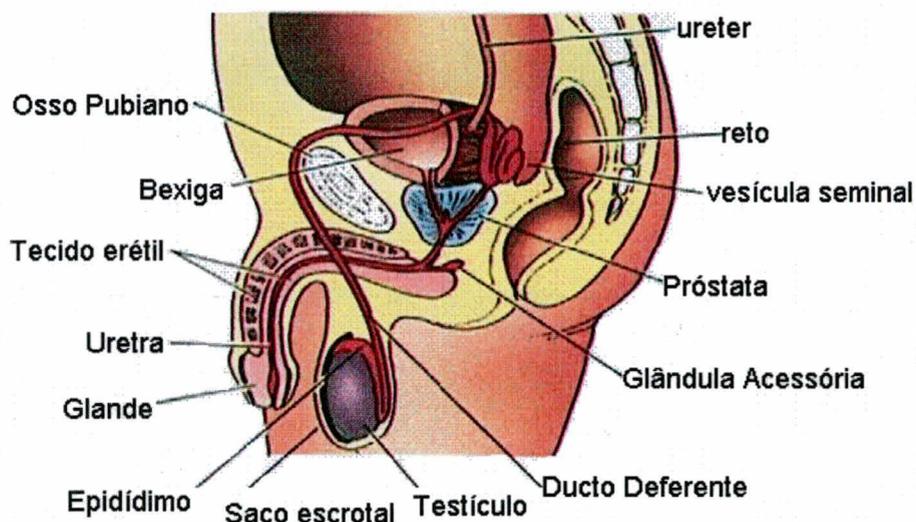
the quantity of rough endoplasmic reticulum, the Golgi apparatus was more developed and there were dispersed lipids both within and without the cells, indicating that the cell was intensively engaged in protein synthesis and processing, and that the treatment had stimulated cell maturation. The results also showed that vimentin is expressed throughout sexual development, although the immunocontent and the  $^{32}\text{P}$  incorporation into vimentin was decreased from the immature to the pubertal phase, before recovering in the adult animal. Both *in vivo* and *in vitro* hormonal treatments increased the high salt Triton insoluble vimentin immunocontent and the phosphorylation of vimentin in the testicles of rats in the immature and adult phases of sexual development. In the experiments on the *in vitro* effect, it was found that a dose of 0.1  $\mu\text{M}$   $\text{T}_3$  stimulated *in vitro*  $^{32}\text{P}$  incorporation into vimentin without affecting the immunocontent of vimentin, whilst a dose of 100  $\mu\text{M}$  had the opposite effect. Meanwhile, intermediate doses (1  $\mu\text{M}$  and 10  $\mu\text{M}$ ) induced an increase in phosphorylation and immunocontent of Triton X-100 insoluble vimentin.  $\text{T}_3$  may be involved in several processes that regulate the organisation of the cytoskeleton or with components of the intracellular signal transduction cascade. These results suggest that, during sexual maturation, hormonal regulatory mechanisms are important in the balance between polymerisation and depolymerisation of intermediate filaments in the rat testicle. Thus, the mechanisms by which  $\text{T}_3$  stimulates the phosphorylation and increases the immunocontent of vimentin appear to directly involve kinase and/or phosphatase activity in mediating signal transduction.

## I. INTRODUÇÃO

### I.1. TESTÍCULO

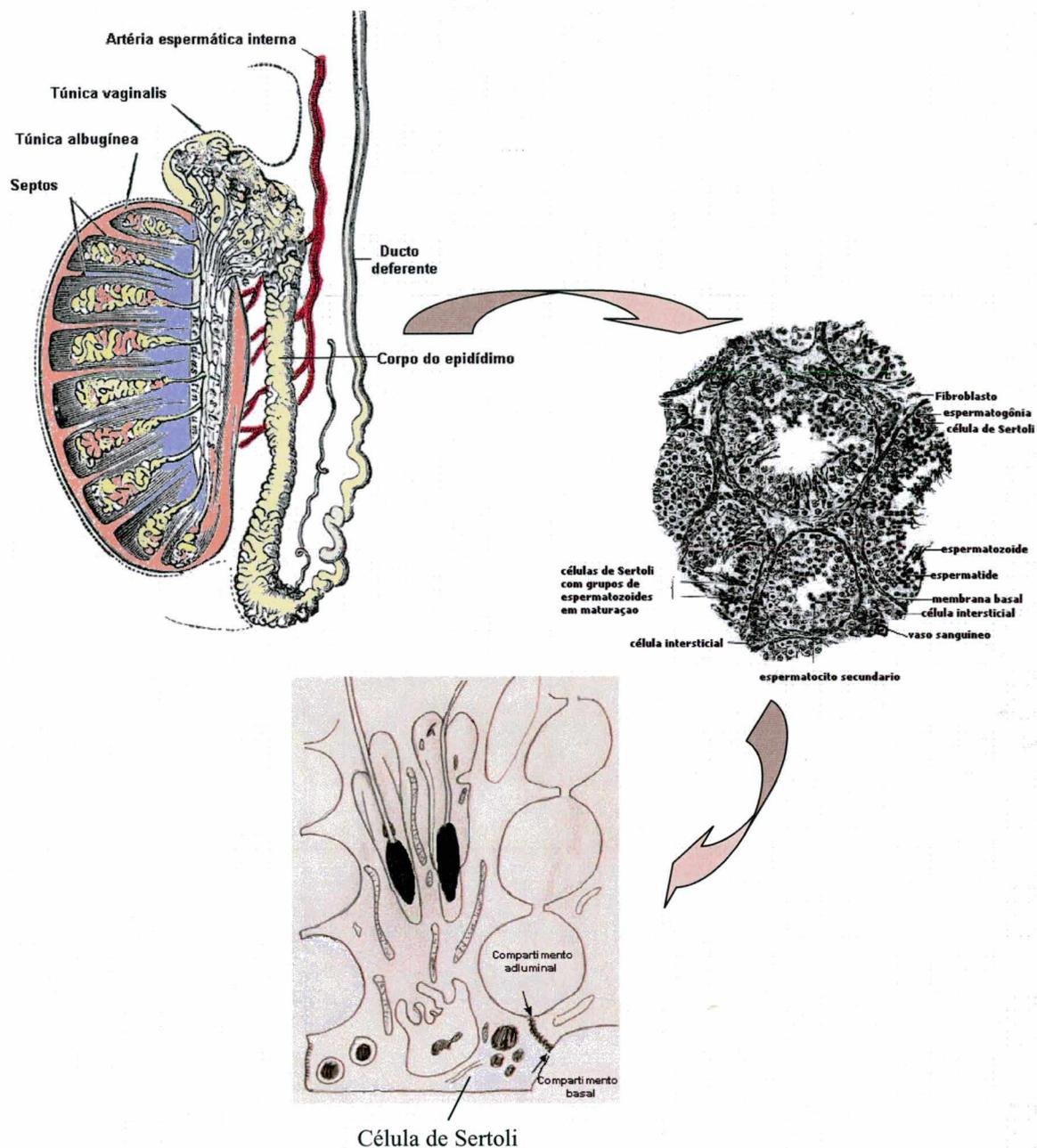
#### I.1.1. Estrutura funcional dos testículos

O sistema reprodutor masculino é formado pelo pênis, testículos, um sistema de ductos (ductos eferentes, ductos deferentes, ducto ejaculador) e pelas glândulas acessórias: vesícula seminal, próstata e glândula bulbouretral (figura I.1) (Fawcett., 1993; Ross *et al.*, 1995).



**Figura I.1.** Representação esquemática do sistema reprodutor masculino. Adaptado de Fawcett, 1993; Ross *et al.*, 1995.

Os testículos são órgãos pareados suspensos fora da cavidade abdominal no saco escrotal. Na maioria das espécies de mamíferos os testículos descem para o escroto durante a fase embrionária do desenvolvimento, onde a temperatura mais baixa proporciona um ambiente adequado para a espermatogênese. Estes órgãos produzem espermatozoides e uma variedade de hormônios esteróides e peptídicos importantes para a regulação da reprodução masculina (Fawcett, 1993).



**Figura I.2.** Representação esquemática da estrutura celular de testículos de mamíferos. Esquema reproduzido e modificado segundo Fawcett, 1993; Dym, 1983; Skinner, 1991 e Gray, 2000.

Os testículos são formados por um tecido endócrino-responsivo e requerem interações célula-célula para a manutenção e controle do crescimento e diferenciação celulares (Skinner & Griswold, 1982). Eles são compostos basicamente de duas unidades funcionais. O tecido intersticial vascularizado, constituído pelas células de Leydig, células mióides ou peritubulares, vasos sanguíneos e linfáticos, fibroblastos e macrófagos

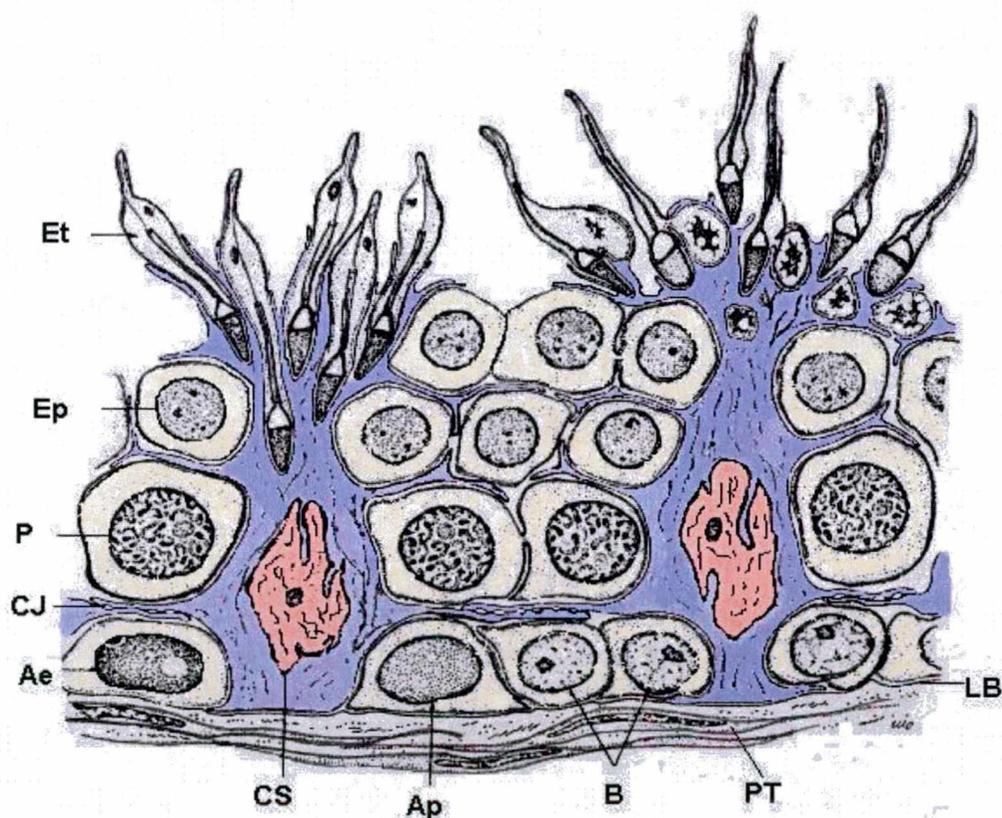
(Fawcett, 1993), sendo que a organização desse compartimento varia consideravelmente de uma espécie para outra (Steinberger & Steinberger, 1989). E os túbulos seminíferos, que em animais sexualmente maduros são formados por 2 populações de células: uma população de células com baixa taxa proliferativa, as células de Sertoli; e uma população altamente proliferativa de células germinativas que migram continuamente da periferia do túbulo para a superfície adluminal (Dym, 1983; Fawcett, 1993; Fawcett, 1991) (figura 1.2).

## 1.2. CÉLULA DE SERTOLI

### 1.2.1. Morfologia e papel na espermatogênese

As células de Sertoli são o principal componente estrutural do epitélio seminífero, desempenhando um importante papel no controle e manutenção da espermatogênese de mamíferos (Fawcett, 1991). Elas têm contorno irregular com projeções citoplasmáticas em torno das células germinativas. Elas são colunares e se estendem desde a porção basal até o lúmen do túbulo, perpendicularmente a membrana basal. O núcleo das células de Sertoli é em geral ovóide ou triangular, podendo ter algumas pregas em sua superfície e possui também um volumoso nucléolo. O estudo ao microscópio eletrônico revela a presença das organelas habituais (aparelho de Golgi, retículo endoplasmático liso e rugoso, mitocôndrias), numerosos lisossomas, microfilamentos, microtúbulos, grãos de glicogênio, gotículas de lipídeos, e diversos tipos de junções celulares entre as células de Sertoli vizinhas que delimitam o compartimento basal (Vacheret, 2000 e Fawcett, 1993). Sua estrutura foi descrita pela primeira vez pelo fisiologista italiano Enrico Sertoli, em 1865. Ela se assemelha a uma árvore e através das conexões com as células vizinhas, ela cria um microambiente controlado formando a barreira hematotesticular e fornecendo um espaço imunologicamente protegido. As ramificações citoplasmáticas Sertolianas envolvem as células germinativas e ocupam todo o interstício entre elas, facilitando o aporte de substâncias a partir do sangue e/ou sintetizadas pela Sertoli (figura 1.3) (Schlatt *et al.*, 1997, Carreau *et al.*, 1994; Fawcett, 1993).

Em ratos, as células de Sertoli se multiplicam durante os períodos fetal e pré-púbere aproximadamente até os 16 dias de idade (Steinberger & Steinberger, 1971). Observações morfológicas e histológicas demonstram que as células de Sertoli variam qualitativamente e alteram o comportamento metabólico durante os diferentes estágios do ciclo do epitélio germinativo (Fawcett, 1991). Isso garante que as associações ambientais, nutricionais e hormonais entre as células de Sertoli e germinativas são fundamentais para o desenvolvimento completo da espermatogênese. Tanto a razão quanto a duração da fase proliferativa determinam o número de células de Sertoli em testículos adultos. Já está demonstrado que cada célula de Sertoli é capaz de suportar um número limitado de células germinativas e, portanto o número de células de Sertoli determina o potencial espermatogênico máximo do testículo (Jones & Berndtson, 1986; Simorangkir *et al.*, 1997).



**Figura I.3.** Representação do epitélio seminífero mostrando a inter-relação entre as células de Sertoli e as células germinativas. Células de Sertoli (CS); células peritubulares (PT); Espermatogônias tipo A pálidas (Ap), tipo A escuras (Ae), e tipo B (B); complexo juncional (CJ); espermatócitos primários (P); espermatídeos primários (Ep); espermatídeos tardios (Et). (Dym, 1983).

### 1.3. HISTOFISIOLOGIA DO TESTÍCULO

As duas principais funções do testículo, a secreção de hormônios esteróides e a gametogênese são divididas anatomicamente, com a biossíntese de andrógenos ocorrendo nas células de Leydig e a espermatogênese nos túbulos seminíferos. A hipófise anterior participa no controle da esteroidogênese e da espermatogênese através da secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), do hormônio luteinizante (LH) e do hormônio folículo estimulante (FSH). A pituitária anterior é regulada em vários pontos pelo sistema nervoso central que modula a secreção do GnRH. A figura 1.4 resume as interações que formam o eixo hipotálamo-hipófise-testículo (Bardin & Paulsen, 1998).

A espermatogênese depende da testosterona produzida pelas células de Leydig, em resposta ao estímulo do LH e do FSH, o qual atua sobre os túbulos seminíferos, ligando-se especificamente as células de Sertoli (Steinberger & Steinberger, 1971). Além da produção de espermatozoides, a função exócrina do epitélio seminífero inclui a síntese e secreção de proteínas testiculares com funções específicas e a liberação do fluido testicular rico em potássio (Fawcett, 1993), que são importantes na manutenção da espermatogênese ativa e da transferência dos espermatozoides através do sistema de duetos excretores.

### 1.4. HORMÔNIOS TIREOIDIANOS

A glândula tireóide e seus produtos hormonais são responsáveis por efeitos fisiológicos que causam alterações em virtualmente todas as vias metabólicas e órgãos. Os hormônios da tireóide modulam o consumo de oxigênio, a taxa de metabolismo basal, e o metabolismo de lipídios, carboidratos e proteínas. Eles também alteram a razão de síntese e degradação de uma grande variedade de fatores de crescimento e hormônios (Norman & Litwack, 1997).

Os efeitos dos hormônios da tireóide podem ser divididos em 2 categorias de resposta biológica: (a) efeitos na diferenciação celular e desenvolvimento, e (b) efeito nas vias metabólicas. Essas duas ações são interconectadas, sendo que as mudanças no

crescimento e desenvolvimento são conseqüências da modulação hormonal do metabolismo.

#### 1.4.1. Mecanismos de produção e secreção dos hormônios tireoidianos

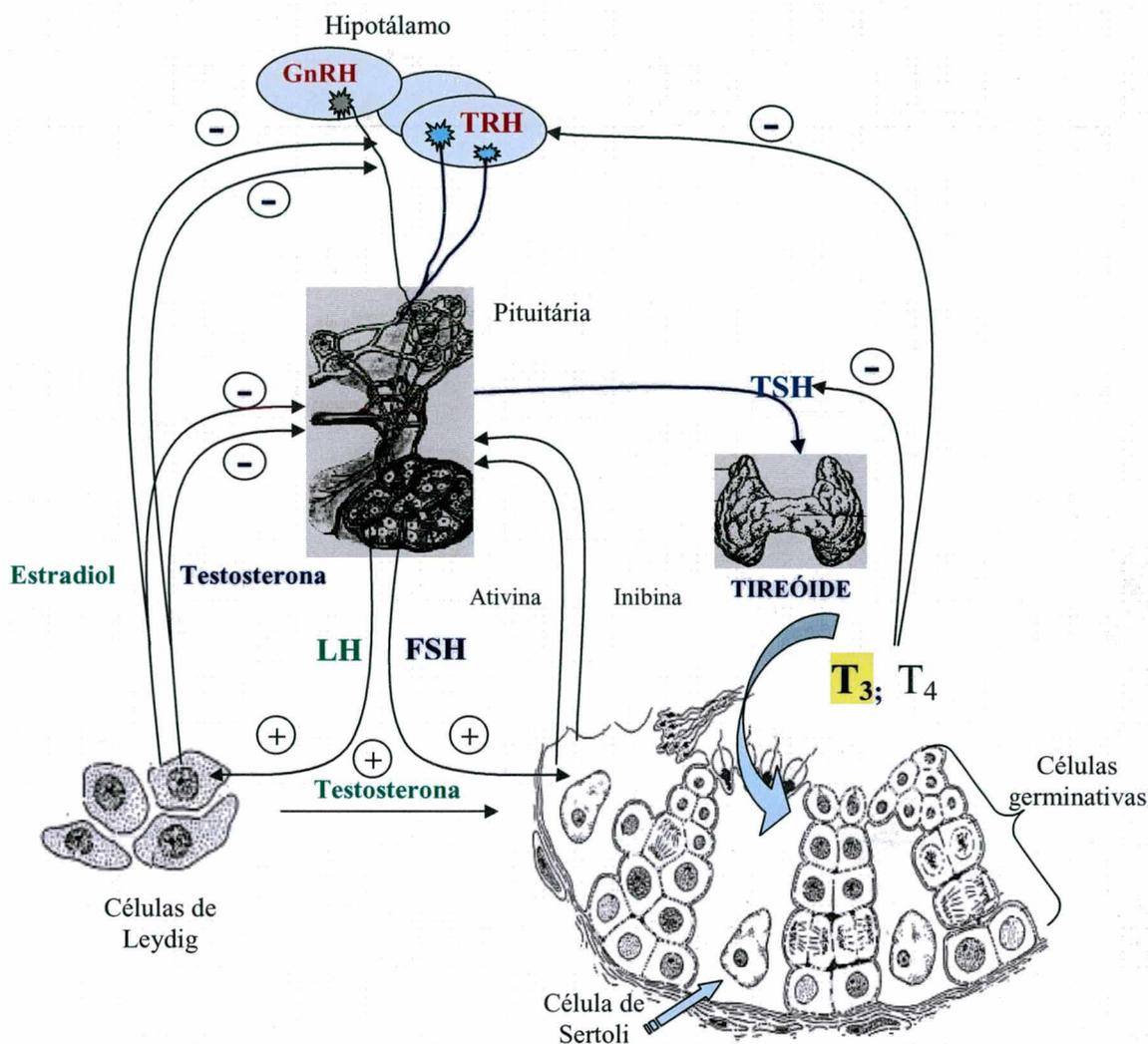
A regulação fisiológica da secreção dos hormônios da tireóide é um sistema complexo que envolve além da glândula tireóide, a participação do hipotálamo, pituitária e atividade neural (Norman & Litwack, 1997).

A produção e secreção dos hormônios tireoidianos é regulada pelo TSH da pituitária. Ele se liga ao receptor de membrana na tireóide e estimula a liberação dos hormônios tireoidianos a partir da tireoglobulina. O principal hormônio liberado é a tiroxina ( $T_4$ ), em menores concentrações a triiodotironina ( $T_3$ ), o  $T_3$  reverso ( $Tar$ ) e as tirosinas monoiodinadas. Além disso, o TSH regula a produção de  $T_3$  nos tecidos periféricos influenciando na atividade das deiodinases. O controle dos níveis hormonais também pode ser regulado durante o desenvolvimento (Norman & Litwack, 1997; Fisher, 1996).

Os níveis de TRH e TSH também são controlados por um sistema de retroalimentação negativa via  $T_3$  e  $T_4$ , que agem tanto no hipotálamo como na pituitária inibindo a produção hormonal. O  $T_4$  precisa ser convertido a  $T_3$  pela deiodinase no tecido, pois o efeito é mediado por receptores nucleares para  $T_3$  que regulam a síntese de uma proteína inibitória. O  $T_3$  também causa a redução do número de receptores para TRH. A inibição é direcionada primariamente na secreção e posteriormente na síntese de TSH (Fisher, 1996; Norman & Litwack, 1997; Van Doorn *et al.*, 1983).

Os hormônios circulam no plasma associados a proteínas de ligação. A mais importante dessas proteínas é a globulina de ligação de tiroxina (TBG), sendo que a transtirretina e a albumina desempenham um papel secundário. O  $T_4$  é distribuído nos tecidos periféricos, onde é convertido a  $T_3$  por deiodinação através da ação das deiodinases teciduais. A maior parte do  $T_3$  circulante parece ser derivada da deiodinação hepática do  $T_4$

pela deiodinase tipo 1 (Fisher, 1996). Os mecanismos de regulação da atividade da tireóide e da função testicular formam o eixo hipotálamo-hipófise-tireóide-testículo, que está representado na figura I.4.



**Figura I.4.** Eixo hipotálamo-hipófise-tireóide-testículo. O testículo está dividido funcionalmente em tecido intersticial, formado pelas células de Leydig e túbulos seminíferos. O GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas) hipotalâmico estimula a liberação de LH e FSH na hipófise. O LH liga-se a sítios de membrana específicos nas células de Leydig, desencadeando a liberação de estradiol e testosterona, e estes controlam a secreção de gonadotrofinas na hipófise por um mecanismo de retroalimentação negativa. A testosterona secretada pela Leydig liga-se a receptores citoplasmáticos na célula de Sertoli, sendo este um evento crítico para a diferenciação espermatogênica. A ligação do FSH ao receptor de membrana na célula de Sertoli também é importante para a indução da espermatogênese. A inibina, liberada pela célula de Sertoli, reduz a secreção de FSH. A atividade da tireóide está representada pelo TRH liberado por nervos hipotalâmicos que estimula a liberação de TSH pela pituitária, e esta estimula a tireóide a liberar os hormônios tireoidianos. Os hormônios T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> secretados pela tireóide regulam por um sistema de retroalimentação negativa a produção e secreção de TSH e TRH. O T<sub>3</sub> é o

hormônio biologicamente ativo e possui receptores nucleares na célula de Sertoli de testículos de mamíferos, com ação central nas primeiras fases do desenvolvimento sexual. Adaptado de Bardin & Paulsen, 1998; Norman & Litwack, 1997; Jannini *et al.*, 1999.

### 1.4.2. Deiodinases

As principais vias do metabolismo dos hormônios da tireóide são a deiodinação e a conjugação. A deiodinação é particularmente importante devido a regulação da bioatividade dos hormônios tireoidianos. Assim, o pró-hormônio  $T_4$  é convertido no hormônio bioativo  $T_3$ . A conjugação das iodotironinas envolve a sulfatação ou glicuronidação, para aumentar a hidrossolubilidade e facilitar a depuração urinária e biliar (Darras *et al.*, 1999; Hennemann & Visser, 1997).

A distribuição tecidual das deiodinases é similar em galinhas, humanos e ratos. A atividade da deiodinase tipo 1 (D1) está presente no fígado, rim e intestino, enquanto a atividade da D2 é encontrada principalmente no cérebro. A atividade da D3 é encontrada no fígado, rim, cérebro, intestino e pele (Van der Geyten *et al.*, 1997). As 3 isoenzimas deiodinases apresentam padrões de expressão distintos durante o desenvolvimento e específicos para cada tecido, funcionam com níveis de substrato ótimo individuais, são diferentemente reguladas por hormônios, citocinas, fatores naturais e fármacos (Köhrle, 1999).

Em animais, a bioatividade da D2 cerebral é marcadamente elevada pela deficiência de hormônios tireoidianos mantendo as concentrações de  $T_3$  no tecido se o  $T_4$  circulante diminuir. Uma diminuição na razão de depuração do  $T_3$  pode ser outro mecanismo para aumentar a biodisponibilidade do hormônio em cérebro de ratos hipotireoideos reduzindo a expressão de D3. A D3 catalisa a inativação do  $T_3$ , e é uma enzima importante na regulação dos níveis intracelulares locais de  $T_3$ . A atividade da D3 no cérebro é regulada pelos hormônios tireoidianos. A regulação coordenada das atividades de D2 e D3 no cérebro parecem ser importantes para manter a homeostasia das iodotironinas cerebrais (Darras *et al.*, 1999).

## 1.5. REGULAÇÃO HORMONAL DAS CÉLULAS DE SERTOLI

As células de Sertoli pelo seu envolvimento na formação da barreira sangue-testículo, controlam o ambiente onde ocorre a espermatogênese. Essas células possuem sítios de ligação para os hormônios FSH (Griswold *et al.*, 1993; Means *et al.*, 1980), testosterona (Mulder *et al.*, 1976), T<sub>3</sub> (Palmero *et al.*, 1995), vitamina A (retinol) (Skinner & Griswold, 1982; Eskild *et al.*, 1991) e 1 $\alpha$ ,25-diidroxi-vitamina D<sub>3</sub> (1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) (Majumdar *et al.*, 1994), substâncias estas que exercem efeitos moduladores importantes no processo espermatogênico. Estes hormônios regulam também aspectos do controle metabólico como o aumento do crescimento corporal relacionado com a administração de FSH e testosterona (Arslan *et al.*, 1992), tamanho e peso testiculares e mudanças na morfologia testicular (número e estrutura da célula de Sertoli).

### 1.5.1. Hormônios tireoidianos e célula de Sertoli

Alterações na atividade da tireóide estão frequentemente associadas a mudanças na função testicular (Jannini *et al.*, 1995). Entretanto, o papel fisiológico dos hormônios tireoidianos na regulação da reprodução masculina ainda é pouco estudado (Longcop, 1991).

Os efeitos bioquímicos do T<sub>3</sub> *in vivo* e *in vitro* demonstraram que as células de Sertoli são o principal alvo para os hormônios tireoidianos no testículo (Fugassa *et al.*, 1987; Palmero *et al.*, 1990; Ulisse *et al.*, 1992, Silva *et al.*, 2001). O aumento da atividade metabólica dessa célula causado por T<sub>3</sub> parece ser pré-requisito para a expansão da espermatogênese. Assim, o T<sub>3</sub> juntamente com o FSH desempenham um papel central como reguladores das primeiras fases do desenvolvimento tubular (Jannini *et al.*, 1995).

Receptores nucleares dos hormônios tireoidianos são codificados por dois protooncogenes altamente relacionados, *c-erb A* e *c-erb B*<sub>3</sub>. Esses genes codificam quatro espécies diferentes de RNAm gerando distintas isoformas de receptores para os hormônios tireoidianos (TR): TR<sub>α1</sub>, TR<sub>α2</sub>, TR<sub>β1</sub>, TR<sub>β2</sub> (Lazar, 1993). Estudos da ligação hormônio-receptor e hibridização *in situ* indicaram que a célula de Sertoli é o alvo dos

hormônios tireoidianos no testículo, com ação coincidente com a expressão dos receptores TR $\alpha$  (Jannini *et al.*, 1999). Sítios de ligação para os TR foram encontrados em testículos de ratos durante toda a fase proliferativa (Buzzard *et al.*, 2000). Entretanto, ainda que receptores para hormônios tireoidianos terem sido descritos em todas as fases do desenvolvimento sexual, receptores funcionais para T<sub>3</sub> só foram detectados na fase imatura (Fugassa *et al.*, 1987; Palmero *et al.*, 1990; Ulisse *et al.*, 1992, Jannini *et al.*, 1999).

Muitas das funções das células de Sertoli estão sob o controle dos hormônios tireoidianos. Os hormônios da tireóide estimulam o transporte de glicose, aumentam a produção de gama-glutamil transpeptidase, proteína ligadora de andrógenos (ABP) e fator de crescimento semelhante à insulina-I, inibem a atividade da aromatase e afetam o metabolismo da testosterona nas células de Sertoli (Silva *et al.*, 2002).

A diferenciação das células de Sertoli e germinativas *in utero* e a subsequente proliferação durante a fase fetal e pós-natal são eventos complexos que envolvem sinais desconhecidos para a sua inicialização e diferenciação. No rato a proliferação máxima das células de Sertoli ocorre no final da gestação e no período perinatal (Orth, 1982), coincidindo com a função fetal da tireóide (Dubois & Dussault, 1977), com a capacidade de ligação máxima do T<sub>3</sub> no testículo (Jannini *et al.*, 1990), e com a expressão da ABP induzida por FSH, produção de AMPc e atividade da aromatase (revisado por Bardin *et al.*, 1994).

Os hormônios tireoidianos desempenham um papel fundamental na regulação terminal das células de Sertoli. O T<sub>3</sub> exógeno, aplicado por um período transitório aumenta o tamanho do testículo na fase imatura. No entanto, a administração prolongada com T<sub>3</sub> *in vivo* acelera o desenvolvimento do testículo por reduzir o período proliferativo das células de Sertoli e dos gonócitos, diminuindo conseqüentemente o número de células de Sertoli por testículo, antecipando a formação do lúmen tubular, e reduzindo o peso final do testículo no adulto. Entretanto, em testículos de animais adultos, o tratamento com hormônios tireoidianos não induz alterações morfológicas, confirmando o período crítico da efetividade dos hormônios tireoidianos na fase imatura (Jannini *et al.*, 1995).

Os diferentes efeitos biológicos induzidos por T<sub>3</sub> podem provir de múltiplos sítios celulares. Sítios de ligação específicos já foram detectados na membrana plasmática, no

citosol, na mitocôndria, no envelope nuclear e no núcleo (Segai *et al*, 1989; D'Amiiento & Jannini, 1992; Jannini *et al*, 1999; Arambepola *et ai*, 1998; Kobayashi & Horiuchi, 1995; Wrutniak *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2001; Wrutniak-Cabello *et al.*, 2001).

As constantes hipóteses de trabalho sugerindo outros sítios de ação, além da ação nuclear, para os hormônios tireoidianos, já demonstraram o envolvimento do T<sub>3</sub> com a atividade da cálcio-ATPase na membrana plasmática e a evidência do papel do cálcio como primeiro mensageiro em vários tecidos de ratos (Segai *et al*, 1989; Segai, 1990). Silva e colaboradores (2001) demonstraram que o T<sub>3</sub> produz hiperpolarização imediata no potencial de membrana da célula de Sertoli e estimula a captação de aminoácidos neutros em testículos de ratos imaturos, fornecendo evidências, pela primeira vez, da ação do hormônio na membrana plasmática da célula de Sertoli.

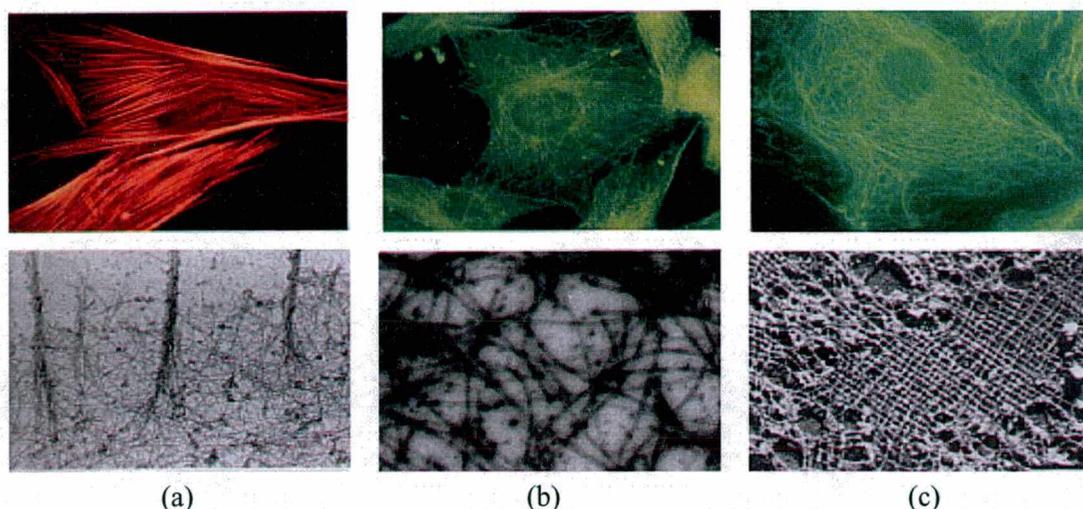
A expressão de receptores para T<sub>3</sub> no testículo e a demonstração de que o hormônio afeta a função testicular, levantam numerosas hipóteses para o estudo da dinâmica das proteínas do citoesqueleto nas células de Sertoli.

## 1.6. CITOESQUELETO

A habilidade das células eucarióticas em adotar uma variedade de formas e desenvolver movimentos coordenados e direcionados depende de uma rede complexa de filamentos protéicos que se estende por todo o citoplasma. Esta rede é denominada de citoesqueleto e é uma estrutura dinâmica que se reorganiza continuamente, sendo responsável pela mudança da forma, divisão e movimento celular. O citoesqueleto fornece a maquinaria para os movimentos intracelulares, como o transporte de organelas de uma região à outra no citoplasma e a segregação dos cromossomos durante a mitose (Elson, 1988; Ingber, 1993), e é provavelmente a única estrutura celular que liga diretamente a superfície celular ao núcleo (Janmey, 1998). As proteínas do citoesqueleto fornecem uma organização estrutural para o interior da célula, ajudando a estabelecer compeirtimentos metabólicos. Por outro lado, as proteínas do citoesqueleto formam caminhos para o

transporte intracelular, promovendo e mantendo funções celulares diferenciadas. Assim, o citoesqueleto constitui a rede central da morfologia celular (Kirkpatrick & Scott, 1999).

O citoesqueleto proporciona uma rede estrutural na qual várias organelas e eventos celulares são organizados, mas, apesar disso, ele não é uma estrutura estática (Nixon, 1998). Alterações na dinâmica do citoesqueleto tornam a célula hábil a responder a alterações do meio. As diversas atividades do citoesqueleto dependem de três tipos de filamentos protéicos: microtúbulos, filamentos intermediários e microfilamentos. Cada tipo de filamento é formado pela associação ou polimerização de monômeros específicos: microtúbulos são polímeros de tubulina; filamentos intermediários são formados por uma família de proteínas fibrosas e microfilamentos por actina monomérica (actina G). Os aspectos dinâmicos da estrutura citoesquelética são viabilizados por proteínas acessórias que se ligam às subunidades protéicas polimerizadas ou não e controlam a estabilidade dos filamentos, sua posição dentro da célula, sítios de ligação específicos ao longo dos filamentos para a associação com complexos protéicos, organelas e membrana celular (Elson, 1988; Ingber, 1993). Esta diversidade é refletida na especialização funcional, na expressão específica em cada célula e tecido e na regulação durante o desenvolvimento (Shelanski *et al.*, 1994). Os três tipos gerais de filamentos protéicos que compõem o citoesqueleto são demonstrados nas figura I.5.



**Figura I.5.** Os três tipos de filamentos protéicos do citoesqueleto. (a) agulhas de actina agrupadas formando fibras de “stress”, (b) microtúbulos irradiando do centro celular, e (c) filamentos intermediários estendendo-se em todo o citoplasma. A linha superior apresenta os filamentos marcados com imunofluorescência após tratamento com anticorpos específicos. As figuras da parte inferior mostram os filamentos visualizados por microscopia eletrônica, segundo Nelson & Cox, 2000.

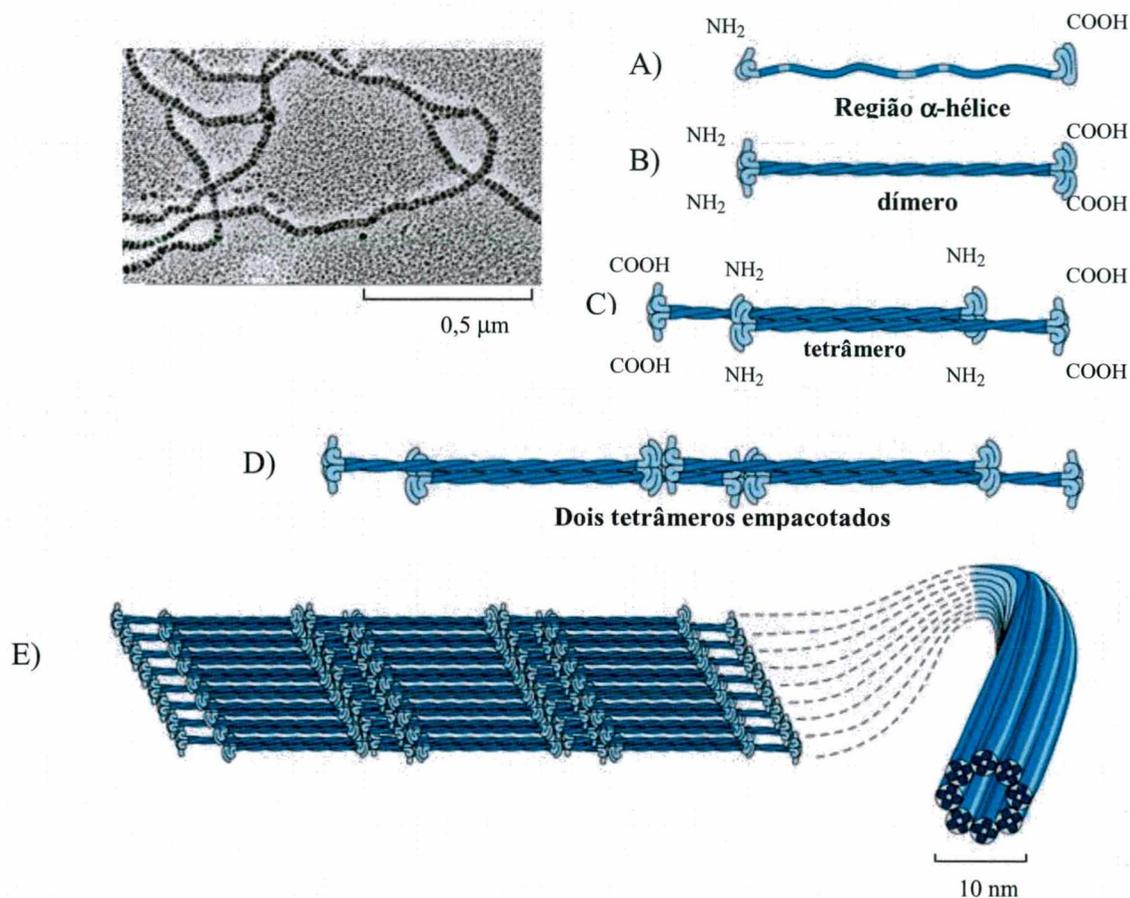
### 1.6.1. Filamentos intermediários

Os filamentos intermediários (FIs) são parte do citoesqueleto e são portanto, componentes centrais para a citoarquitetura e integridade estrutural dos tecidos (Fuchs & Cleveland, 1998). Eles representam uma das três principais classes de sistemas citoesqueléticos encontrados em células eucarióticas.

Existem 6 classes de FIs e mais de 50 diferentes produtos gênicos. O maior número das proteínas dos FIs são classificados como as queratinas tipo I e II, e a expressão é regulada durante o desenvolvimento, sendo assim, para muitos tecidos, marcadores de células epiteliais. Vimentina, desmina, proteína fibrilar glial ácida (GFAP) e periferina formam o terceiro grupo de FIs. Cada uma dessas proteínas é capaz de se ligar formando homopolímeros. As proteínas de FIs do tipo IV constituem as 3 subunidades de neurofilamentos (NF-M, NF-H e NF-L) que são heteropolímeros, assim como a  $\alpha$ -intemexina, que é um homopolímero. Os FI do tipo V estão localizados no núcleo onde polimerizam-se para formar a lâmina nuclear. A proteína do tipo VI é a nestina que ainda não foi extensivamente caracterizada (Goldman, 1999). Essas proteínas são expressas diferentemente nos tecidos. Os neurônios expressam neurofilamentos; os astrócitos expressam GFAP; células epiteliais, queratinas; células mesenquimais, vimentina e células musculares, desmina (Steinert & Roop, 1988; Treska *et al*, 1993).

Os filamentos intermediários são formados por um grupo heterogêneo de proteínas fibrosas, as quais possuem um domínio amino-terminal, um domínio carbóxi-terminal e uma região central. A porção central dos monômeros consiste de uma região em  $\alpha$ -hélice, contendo uma seqüência de 310 aminoácidos altamente conservada, determinando a homologia entre as proteínas dos filamentos intermediários. Os domínios amino e carbóxi terminais variam em tamanho e seqüência de aminoácidos nos diferentes filamentos intermediários. Para a formação dos filamentos intermediários, inicialmente as regiões  $\alpha$ -helicoidais de dois monômeros se alinham e se enrolam paralelamente formando um dímero; dois dímeros se ligam lado a lado numa conformação antiparalela para formar

um tetrâmero. Após, oito tetrâmeros enrolam-se para formar a estrutura do filamento intermediário com 10 nm de diâmetro (Steinert & Roop, 1988; Albers & Fuchs, 1992; Okabe *et al.*, 1993; Stewart, 1993) (figura I.6).



**Figura I.6.** Representação esquemática da formação de um filamento intermediário: A) monômero; B) dímero; C) tetrâmero, formado de dois dímeros dispostos antiparalelamente; D) dois tetrâmeros associados; E) filamento intermediário com 10 nm de diâmetro. Segundo Albers *et al.*, 1994.

Os FIs são estruturas dinâmicas em células vivas. Suas propriedades são reguladas por mecanismos complexos envolvendo ligações com outros elementos do citoesqueleto, como os microtúbulos e microfilamentos, através de uma família de proteínas associadas aos FIs (IFAPs), e com proteínas motoras, como as cinesinas (Chou, *et al.*, 2001 e Goldman *et al.*, 1999). Devido a alterações dinâmicas na distribuição e organização dos FIs *in vivo*, estes estão em constante movimento nas células incluindo extensão e retração que são dependentes da presença de microtúbulos intactos (Martys *et al.*, 1999). A fosforilação destas proteínas desempenha um papel no processo de troca

polímero/subunidade livre implicado em muitas das propriedades dinâmicas. A fosforilação de proteínas de FIs pode estar correlacionada também com estado organizacional do polímero em células mitóticas, e despolimerização da rede de FI (Goldman *et al.*, 1999). Além disso, durante a interfase, sugere-se que o estado de polimerização dos FIs seja regulado pelo balanço entre as atividades de quinases e fosfatases (Erickson *et al.*, 1992). Devido a suas propriedades, os FI desempenham um importante papel em muitas atividades fisiológicas normais através de mecanismos celulares de transdução de sinal (Chou *et al.*, 1997).

### *Vimentina e Citoqueratina*

Estudos bioquímicos e imunohistoquímicos demonstraram que as células expressam proteínas de FIs específicas de acordo com o tipo celular, e podem ser usadas para determinar a origem e o estado de diferenciação da linhagem celular tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Virtanen *et al.*, 1981; Franke *et al.*, 1982; Paranko *et al.*, 1986). As citoqueratinas são compostas por um grupo heterogêneo de proteínas classificadas em queratinas tipo I e tipo II, que estão presentes em combinação em vários tipos de células epiteliais (Goldman *et al.*, 1999). A vimentina é a mais comum das proteínas de filamentos intermediários. É expressa durante o desenvolvimento em células mesenquimais, tumorais e em cultura (Goto *et al.*, 1998). Ela é a única proteína de FI na qual frequentemente forma-se uma rede de FI suporte antes da expressão e polimerização das proteínas específicas do tecido diferenciado, como a desmina, periferina, e GFAP (Goldman *et al.*, 1999).

### **1.6.2. Cítoesqueleto testicular**

Os filamentos intermediários são os componentes mais estáveis do citoesqueleto, caracterizados pela especificidade tecidual e expressão transitória durante o desenvolvimento, sensibilidade à regulação hormonal, alterações no número e distribuição intracelular (Goto *et al.*, 1998; Paranko *et al.*, 1986; Sasaki *et al.*, 1998).

Nas células de Sertoli o citoesqueleto é formado por microfilamentos, filamentos intermediários e microtúbulos (Vogl, 1989; Stosiek, *et al.*, 1990; Amlani & Vogl, 1988). Essas células possuem um sistema citoesquelético bem desenvolvido que muda de acordo com os ciclos do epitélio seminífero (Tanemura *et al.*, 1994).

A célula de Sertoli modifica a forma para se adaptar às alterações de estrutura e movimento das células germinativas. Essas mudanças de forma ocorrem devido a um citoesqueleto elaborado formado por um sistema complexo envolvendo microfilamentos e filamentos intermediários, ricos em actina e vimentina, respectivamente. Isso confere alternativamente rigidez e flexibilidade celular necessária à mobilidade das células germinativas (Carreau *et al.*, 1994). Em geral, os filamentos intermediários fornecem estabilidade mecânica para as células (Lazarides *et al.*, 1980).

A vimentina é descrita como a proteína de filamento intermediário característica nas células de Sertoli em muitos mamíferos, incluindo o homem (Rodriguez *et al.*, 1999; Rogatsch *et al.*, 1996; Davidoff *et al.*, 1990; Miettinen *et al.*, 1985; Franke *et al.*, 1979). Entretanto, o significado fisiológico da vimentina nessas células é ainda desconhecido.

A expressão de receptores nucleares específicos para T<sub>3</sub> em testículos (Palmero *et al.*, 1995) e a demonstração de que este hormônio afeta diretamente as funções das células de Sertoli em ratos imaturos, no período inicial crítico do desenvolvimento testicular (Fugassa *et al.*, 1987; Palmero *et al.*, 1990; Ulisse *et al.*, 1992, Silva *et al.*, 2001), sugerem as células de Sertoli como um modelo sensível para o estudo da regulação da expressão, das funções e da estabilidade das proteínas do citoesqueleto nestas células.

### **1.6.3. Fatores que alteram o metabolismo das proteínas do citoesqueleto**

Os componentes do citoesqueleto podem ser alterados quali ou quantitativamente durante a diferenciação, o desenvolvimento e após situações de desnutrição, isquemia cerebral, exposição a substâncias tóxicas e ação hormonal (Paranko *et al.*, 1986; De-Mattos *et al.*, 1993; De-Morais *et al.*, 1996; Hall *et al.*, 1995; Spencer *et al.*, 1998). No testículo,

por exemplo, a integridade funcional dos microtúbulos é necessária para a plenitude do estímulo do FSH no transporte de aminoácidos neutros (Wasserman *et al.*, 1989).

O controle hormonal dos filamentos intermediários no testículo é pouco conhecido. Em cultura, a organização dos FIs pode ser afetada por cálcio (Spruill *et al.*, 1983a) e FSH (Spruill 1983b). As alterações observadas nos FI das células de Sertoli sugerem que há uma importante relação entre a maturação do testículo e o sistema de filamentos citoplasmáticos (Paranko *et al.*, 1986).

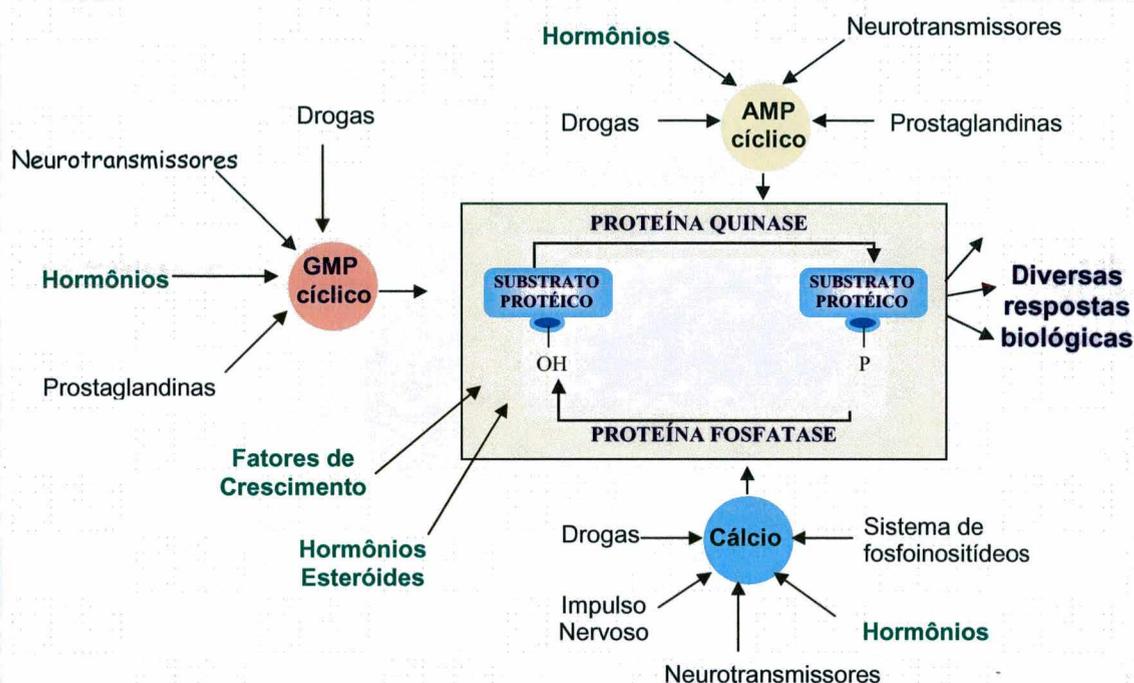
A presença simultânea de citoqueratina e vimentina nas células de Sertoli na fase fetal e no início da fase pós-natal é um fenômeno raro em células normais (Franke *et al.*, 1979; Virtanen *et al.*, 1981). Alterações qualitativas na expressão (co-expressão) de proteínas dos filamentos intermediários ocorrem durante a diferenciação, o desenvolvimento embrionário e sob condições patológicas em testículos na fase adulta. Esse fenômeno de co-expressão é fisiologicamente encontrado em vários tecidos fetais e também em patologias não reativas, degenerativas e lesões proliferativas (Rogatsch *et al.*, 1996).

Os filamentos intermediários sofrem alterações dinâmicas na organização durante diferentes estágios do ciclo celular ou durante a sinalização celular (Erickson *et al.*, 1992; Steinert & Roop, 1988) e a fosforilação é o fator chave na regulação da organização do citoesqueleto (Eriksson & Goldman, 1993).

## **1.7. FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS**

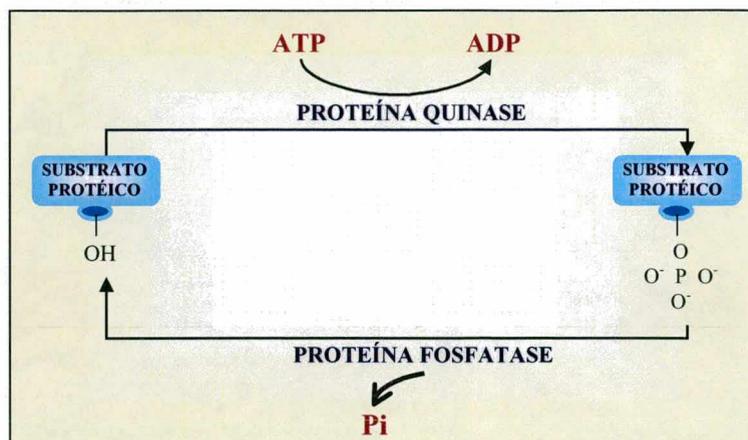
A fosforilação compreende um mecanismo molecular de fundamental importância na regulação biológica, onde diferentes tipos de sinais extracelulares produzem diversos efeitos fisiológicos regulando o estado de fosforilação de determinadas fosfoproteínas nas células-alvo. Vários sinais extracelulares, chamados de primeiros mensageiros, tais como neurotransmissores, hormônios, fatores tróficos e drogas produzem a maior parte dos efeitos fisiológicos por regulação do estado de fosforilação de fosfoproteínas em células alvo (Walaas & Greengard, 1991). Estes primeiros mensageiros

desencadeiam um mecanismo em cascata alterando os níveis intracelulares de segundos mensageiros (AMPc, GMPc,  $\text{Ca}^{++}$ , fosfolipídeos, etc) que, por sua vez, agem sobre o sistema fosforilante modificando o nível de fosforilação de substratos específicos e traduzindo-se na modulação de uma resposta fisiológica (figura I.7) (Nestler & Greengard, 1994).



**Figura I.7.** Representação esquemática do sistema de fosforilação de proteínas e alguns dos agentes regulatórios. Adaptado de Nestler & Greengard, 1994.

Os sistemas de fosforilação e desfosforilação consistem de uma proteína quinase, uma proteína fosfatase e um substrato protéico. O substrato protéico é convertido de uma forma desfosforilada à uma forma fosforilada por uma proteína quinase. Por sua vez, a forma fosforilada é convertida novamente na forma desfosforilada por uma proteína fosfatase. As proteínas quinases catalisam a transferência do grupo fosfato terminal do ATP ao grupamento hidroxila de um resíduo de aminoácido do substrato, sendo o  $\text{Mg}^{2+}$  necessário para esta reação. As proteínas fosfatases catalisam a hidrólise da ligação éster, retornando a proteína novamente ao estado não fosforilado (figura I.8) (Nestler & Greengard, 1994).



**Figura I.8.** Representação esquemática de um sistema fosforilante. A reação de fosforilação é catalisada por uma quinase que transfere o grupamento fosfato de uma molécula de ATP para o grupo hidroxila da cadeia lateral de um resíduo de serina, treonina ou tirosina do substrato protéico. A remoção do grupamento fosfato é catalisada por uma fosfatase. Adaptado de Alberts *et al.*, 1994.

### I.7.1. Proteínas quinases

As proteínas quinases são classificadas, de acordo com os resíduos de aminoácidos que fosforilam, em serina/treonina ou tirosina quinases. Um pequeno número de quinases são conhecidas como tendo função dupla de quinase por fosforilarem substratos protéicos em serina/treonina e tirosina. Aproximadamente 95% dos resíduos fosforilados são serina, 3 a 4 % treonina e menos que 1% tirosina (Nestler & Greengard, 1994).

O mecanismo de ativação mais comum às serina/treonina quinases é mediado por segundos mensageiros, tais como AMPc, GMPc,  $Ca^{++}$ , fosfolipídeos e ácido araquidônico. As tirosina quinases são frequentemente associadas a receptores e ativadas diretamente pela ligação de primeiros mensageiros (Nestler & Greengard, 1994). Além destes dois mecanismos de ativação de quinases, é descrito que a maioria das quinases estudadas apresenta sítios autofosforiláveis. Devido ao fato de os grupos fosfato serem negativamente carregados, a fosforilação de uma proteína altera a carga protéica, o que pode causar uma alteração conformacional na molécula, influenciando conseqüentemente na função (Wallas & Greengard, 1991).

### *1.7.1.1. Serina/treonina quinases*

#### *Proteína quinase dependente de AMP cíclico (PKA)*

A PKA é encontrada em todas as células eucarióticas e atua sobre uma grande variedade de substratos protéicos incluindo proteínas constituintes do citoesqueleto. A PKA, na forma inativa, consiste de um tetrâmero de duas subunidades catalíticas e duas subunidades regulatórias, com pesos moleculares de 40 kDa a 55 kDa. O AMP cíclico ativa a holoenzima ligando-se às subunidades regulatórias e promovendo a dissociação da holoenzima em subunidades regulatórias e catalíticas livres e ativas. A hidrólise do AMP cíclico pela fosfodiesterase de nucleotídeo cíclico leva à nova associação e regeneração da holoenzima inativa. Além da fosfodiesterase, a PKA pode ser regulada pela autofosforilação das subunidades regulatórias (Walaas & Greengard, 1991). A desfosforilação é catalisada pela proteína fosfatase 2B (PP2B), provocando a reestruturação da holoenzima e conseqüentemente a inatividade (Cohen, 1989).

#### *Proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina (CaMK)*

A CaMK é ativada pelo cálcio em associação com a proteína calmodulina. A CaMK do tipo II (CaMKII) apresenta ampla distribuição celular e especificidade de substrato, sendo considerada uma enzima multifuncional (Nestler & Greengard, 1994).

A CaMKH possui duas ou mais subunidades com pesos moleculares que variam de 45 a 65 kDa, cada uma com sítio de ligação para a calmodulina e com a propriedade de autofosforilação. Esta propriedade de autofosforilação gera uma atividade enzimática independente de cálcio/calmodulina, prolongando a ativação da enzima e, conseqüentemente, a duração da resposta celular. No entanto, esta forma da enzima independente de cálcio/calmodulina é revertida pela ação de proteínas fosfatases (Rostas & Dunkley, 1992; Hanson & Schulman, 1992).

### *Proteína quinase dependente de cálcio/fosfolipídios (PKC)*

A PKC é ativada pelo cálcio em associação com o diacilglicerol (DAG). Compreende uma família de isoformas que apresentam localizações subcelulares distintas e diferentes maneiras de ativação no que se refere a translocação para a membrana e quanto ao requerimento de cálcio e DAG (Walaas & Greengard, 1991). Além do DAG, ácidos graxos insaturados, e lisofosfolipídeos produzidos pelo metabolismo do ácido araquidônico também são efetivos em ativar a PKC (Nishizuka, 1992).

### *Proteína quinase dependente de GMP cíclico (PKG)*

A PKG é uma holoenzima com duas subunidades. Cada subunidade contém um domínio regulatório com dois sítios de ligação para o GMP cíclico e um domínio catalítico (Nestler & Greengard, 1994). A hidrólise do GMPc pela fosfodiesterase de nucleotídeo cíclico leva à inativação da enzima. Poucos substratos são descritos, porém, sabe-se que esta enzima é responsável pela fosforilação de um inibidor (substrato G) da proteína fosfatase do tipo 2A (PP2A) (Aswad & Greengard, 1981).

#### *1.7.1.2. Tirosina quinases*

Estas enzimas são frequentemente ligadas a receptores de membrana plasmática. A atividade das tirosina quinases é regulada pela ligação do efetor ao receptor que promove a autofosforilação dos resíduos de tirosina e, desta forma, a ativação da enzima (Walaas & Greengard, 1991).

### **1.7.2. Proteínas fosfatases**

As fosfatases, assim como as quinases, são um elemento importante nos sistemas de fosforilação protéica. Atualmente, o conhecimento a respeito das fosfatases é mais restrito do que em relação ao das quinases, entretanto, estudos indicam que muitas

respostas fisiológicas também são mediadas através da regulação de fosfatases (Naim & Shenolikar, 1992; Nestler & Greengard, 1994). As fosfatases promovem a reversibilidade da ação das quinases e assim sendo, o papel na regulação do estado de fosforilação de proteínas é cada vez mais evidente (Cohen, 1992; Hunter, 1995).

As proteínas fosfatases são classificadas como serina/treonina fosfatases ou tirosina fosfatases relacionando-as aos resíduos de aminoácidos que elas desfosforilam. Entretanto, algumas fosfatases podem atuar sobre os três resíduos de modo que pode ocorrer uma certa sobreposição de sítios desfosforiláveis (Vinadé *et al.*, 1997). As serina/treonina fosfatases são classificadas em: proteína fosfatase do tipo 1 (PPI), proteína fosfatase do tipo 2A (PP2A), proteína fosfatase do tipo 2B (PP2B) e proteína fosfatase do tipo 2C (PP2C) (Nestler & Greengard, 1994; Cohen, 1989; Strack *et al.*, 1997). As tirosinas fosfatases, específicas para resíduos de fosfotirosina, são encontradas em diversos tecidos, apresentando diferentes isoformas, mas os mecanismos através dos quais os sinais extracelulares e intracelulares regulam as atividades destas fosfatases não estão claramente estabelecidos (Walaas & Greengard, 1991).

## 1.8. FOSFORILAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO CITOESQUELETO

A fosforilação é um evento extremamente importante tanto na organização quanto na polimerização dos filamentos intermediários (Sanhai *et al.*, 1999). A fosforilação de proteínas do citoesqueleto pode modular as interações entre os componentes filamentosos, como microfilamentos, microtúbulos e filamentos intermediários (Pedrotti & Islam, 1996). A reorganização dos FIs parece ser regulada por sítios específicos de fosforilação nos resíduos de serina e treonina por diversas proteínas quinases associadas aos FIs, em estudos demonstrados *in vivo* (Pedrotti & Islam, 1996; Inagaki *et al.*, 1987; Inagaki *et al.*, 1996). O uso de anticorpos anti-sítios de fosforilação específicos das proteínas de FI é uma importante ferramenta para detectar a atividade de proteínas quinases que fosforilam a vimentina especificamente na Ser<sup>^</sup>, Ser<sup>^^</sup>, Ser<sup>^o</sup>, Ser<sup>^^</sup> e Ser<sup>\*^</sup>. Isso permite visualizar a atividade de quinases da vimentina durante a sinalização celular ou mitose, mas não se detecta durante a citocinese (Goto *et al.*, 1998).

A alteração no estado de fosforilação de uma proteína é atribuída às alterações nas atividades das proteínas quinases ou das proteínas fosfatases, ou ainda a mudanças nas propriedades da própria proteína como um substrato para distintas quinases ou fosfatases (Walaas & Greengard, 1991; Nestler & Greengard, 1994).

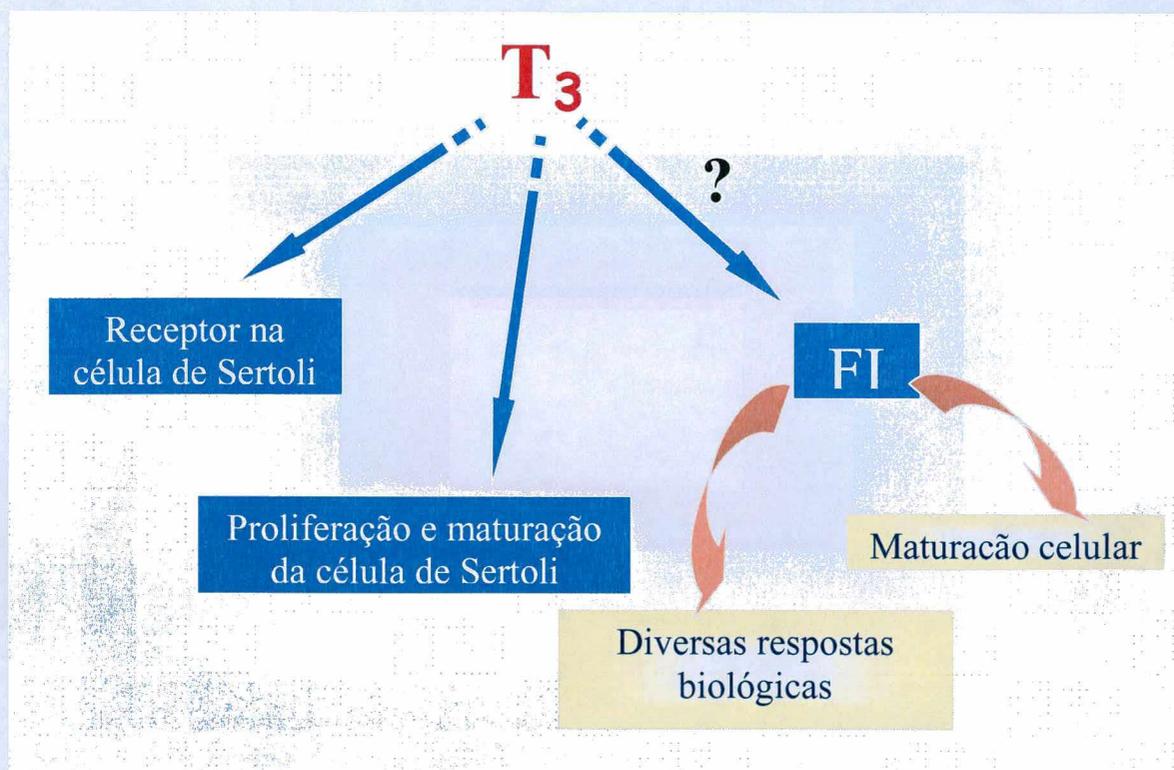
Os FIs são relativamente mais estáveis se comparados aos outros componentes do citoesqueleto como os filamentos de actina e os microtúbulos. Entretanto, intensivos estudos *in vitro* mostraram sítios de fosforilação específicos para diversas quinases, como a proteína quinase A (PKA), proteína quinase C (PKC), quinase dependente de cálcio e calmodulina II (CaMKII) e a quinase cdc 42 alterando drasticamente a estrutura desses filamentos (Inagaki *et al.*, 1987). Posteriormente, algumas dessas quinases foram identificadas *in vivo*: a quinase cdc 42 é ativada em células em mitose, a PKC é ativada da metáfase para a anáfase, e a CaMKII é ativada em resposta ao receptor mediado pela hidrólise do fosfoinositídeo. A Rho quinase também foi identificada *in vivo* como uma proteína quinase de FI que fosforila especificamente a proteína fibrilar ácida (GFAP) e a vimentina. A fosforilação da vimentina pela Rho quinase impede a formação de filamentos *in vitro* (Kosako *et al.*, 1997; Goto *et al.*, 1998).

As fosfatases também desempenham um papel importante na manutenção da integridade estrutural dos FIs nas células em interfase. A proteína fosfatase 1 (PPI) é uma fosfatase com função central no ciclo celular, que pode ser regulada por interações na subunidade catalítica com uma variedade de proteínas regulatórias. O envolvimento de PPI com a vimentina é sugerido para a integridade dos FI (Goto *et al.*, 1998; Inada *et al.*, 1999). Nas células em interfase há uma atividade balanceada entre a Rho quinase e a PPI. Isso indica que os FIs são altamente dinâmicos, e que ocorre uma troca contínua entre os FIs solúveis e os polimerizados, para estabelecer o equilíbrio (Inada *et al.*, 1999; Inagaki *et al.*, 1996). O balanço entre as atividades da Rho quinase e da PPI, parece ser essencial não só na modulação da estrutura e plasticidade dos FIs, como também na adesão célula-substrato, motilidade celular e reorganização dos filamentos de actina durante a interfase. O estudo do mecanismo molecular da ação dessas proteínas poderá esclarecer muito sobre a dinâmica dos FIs (Inada *et al.*, 1999).

## II. OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

Apoiados ao fato de que o hormônio  $T_3$  possui receptores nucleares e outros sítios de ligação nas células de Sertoli de testículos de ratos, está envolvido nos processos de proliferação e maturação destas células e que os filamentos intermediários são proteínas dinâmicas nas células que podem estar envolvidas em vias de transdução de sinais podendo ser regulados por hormônios, o objetivo geral deste trabalho foi estudar o efeito do  $T_3$  tanto *in vivo* quanto *in vitro* nas proteínas de filamentos intermediários de testículos de ratos durante o desenvolvimento sexual.



**Figura II.1.** Representação esquemática da hipótese de estudo do envolvimento do  $T_3$  na regulação das proteínas de filamentos intermediários das células de Sertoli de testículos de ratos.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Caracterizar as proteínas de filamentos intermediários em testículos de rato durante o desenvolvimento sexual.
- ✓ Estudar o perfil ontogenético do imunocontéudo e da fosforilação *in vitro* da vimentina presente na fração citoesquelética insolúvel em Triton X-100 em testículos de ratos imaturos, púberes e adultos.
- ✓ Estudar o efeito do tratamento *in vivo* com T<sub>3</sub> nos índices somáticos (pesos corporal e gonadal) e nas concentrações plasmáticas dos hormônios tireoidianos e do TSH de ratos nas diferentes fases do desenvolvimento sexual.
- ✓ Determinar as concentrações plasmáticas de triacilglicerol após o tratamento *in vivo* com T<sub>3</sub>.
- ^ Avaliar o perfil morfológico de testículos de ratos imaturos após tratamento *in vivo* com T<sub>3</sub>.
- ✓ Estudar o efeito do tratamento *in vivo* com T<sub>3</sub> no imunocontéudo e na fosforilação da vimentina presente na fração citoesquelética enriquecida em filamentos intermediários de testículos de ratos durante o desenvolvimento sexual.
- ✓ Estudar o efeito dose-resposta do T<sub>3</sub> *in vitro* no imunocontéudo e na fosforilação da vimentina presente na fração citoesquelética enriquecida em filamentos intermediários de testículos de ratos imaturos.
- ✓ Avaliar o efeito *in vitro* do T<sub>3</sub> no imunocontéudo e na fosforilação da vimentina de testículos de ratos durante o desenvolvimento sexual.

### III. MATERIAIS E MÉTODOS

#### III.1. MATERIAIS

##### III.11. Soluções e reagentes

*III.1.1.1. Hormônio 3,5,3'-triiodo-L-tironina:* utilizado para o tratamento *in vivo* dos animais e nas incubações *in vitro*; *inibidores de protease:* fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF); benzamidina; leupeptina; antipaína; quimostatina e pepstatina, adquiridos da Sigma Chemical Company, Saint Louis, M.A., USA.

*III. 1.1.2. Reagentes utilizados na preparação do tampão para extração de proteínas*

Tabela III.1. Composição do tampão Krebs-Hepes

NaCl	124 mM
KCl	4 mM
MgSO <sub>4</sub>	1,2 mM
Na-HEPES	25 mM
Glicose	12 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM
Benzamidina	1 mM
Leupeptina	1 $\mu$ M
Antipaína	0,7 $\mu$ M
Quimostatina	0,7 $\mu$ M
Pepstatina	0,7 $\mu$ M
PH	7,4

**Tabela III.2.** Composição do tampão de alta força iônica para extração de proteínas de filamentos intermediários.

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 mM
KCl	600 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
EGTA	2 mM
EDTA	1 mM
Triton X - 100	1 %
PMSF	1 mM
Benzamidina	1 mM
Leupeptina	1 μM
Antipain	0,7 μM
Quimiosstatina	0,7 μM
Pepstatina	0,7 μM
PH	7,1

Ácido Etilenoglicol-bis(P-aminoetil eter)-N,N,N',N'- tetracético (EGTA); Ácido etilenodiamino tetracético (EDTA). Os reagentes utilizados na composição do tampão foram adquiridos da Sigma Chemical Company, Saint Louis, MO., USA.

### *III. 1.1.3. Substâncias para precipitação, lavagem e diluição das proteínas*

- ✓ Ácido Tricloroacético (TCA) 10%: para precipitar as proteínas do citoesqueleto.
- ✓ Etanol Absoluto: para delipidar as proteínas após precipitação.
- ✓ Acetona: para retirar o etanol e devido a sua volatilidade, permitir que a amostra seque mais rapidamente.
- ✓ Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 1%: para diluir as proteínas, assim como fornecer-lhes carga negativa para posterior migração eletroforética.

### III. 1.1.4. Tampão de preparação das amostras

**Tabela III.3.** Composição do tampão de preparação das amostras

Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)	5 %
Tris-HCl 1,5 M	0,065 M
Glicerol	20 %
P-Mercaptoethanol	10%
pH	6,8

Pirronina Y diluída a 2,5 mg/mL foi utilizada como corante para acompanhar a migração eletroforética. Os reagentes foram provenientes da Sigma Chemical Company, Saint Louis, MO., USA.

III. 1.1.5. Padrão de peso molecular SDS-6H (Sigma Chemical Company, Saint Louis, MO., USA). Componentes: anidrase carbônica (29 KDa), ovoalbumina (45 KDa), albumina bovina (66 KDa), fosforilase b (97,4 KDa), alfa-galactosidase (116 KDa), e miosina (205 KDa).

### III.1.1.6. Reagentes e soluções utilizados para as migrações eletroforéticas

**Tabela III.4.** Composição do gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 10%.

Acrilamida '	10 %
N'N'-metileno-bis-acrilamida	0,25 %
Tris-HCl	0,75 M
SDS	0,1 %
APS	0,1 %
TEMED	0,05 %

Persulfato de amônio (APS); N,N,N',N'-Tetrametiletlenodiamina (TEMED):  
Sigma Chemical Company, Saint Louis, MO., USA.

**Tabela III.5.** Composição do tampão de migração para eletroforese:

Tris	0,125 M
Glicina	1,92 M
SDS	1 %
Água	q.s.p.

**Tabela III.6.** Composição da solução para corar o gel de eletroforese

Coomassie Blue R-250 (SIGMA)	0,10 %
Metanol	50 %
Ácido acético glacial	7 %
Água Milli-Q	q.s.p.

*Soluções para descorar e conservar o gel de eletroforese*

**Tabela III.7.** Composição da solução descorante forte

Metanol	50 %
Ácido acético glacial	10 %
Água Milli-Q	q.s.p.

**Tabela III.8.** Composição da Solução de Secagem

Metanol	50 %
Glicerol	1 %
Água Milli-Q	q.s.p.

### III. 1.1.7. Soluções e reagentes utilizados nos estudos com anticorpos

*Materiais: papel de nitrocelulose de 0,45jJm; papel Whatman*

#### *Tampões*

- ✓ Tampão de transferência: BJERUM (Bjerrum & Shafer-Nielsen, 1986)
- ✓ Solução fixadora (40% metanol e 10% ácido acético)
- ✓ TBS (tampão tris)

**Tabela III.9.** Composição do TBS

NaCl	0,5 M
Trizma	20 mM
pH	7,5

- ✓ TTBS (TBS com 0,05% de Tween 20)
- ✓ MTBS: Tampão TBS com 5% de leite mólico

#### *Anticorpos*

- ✓ Anticorpo monoclonal anti-vimentina (Clone VIM 13.2) - Sigma Chemical Company, Saint Louis, MO., USA. O anticorpo foi previamente diluído em MTBS na proporção de 1:400 para utilização nas reações de “Western Blotting”.
- ✓ Anti-IgG de camundongo contendo uma peroxidase conjugada - Sigma Chemical Company, Saint Louis, MO., USA. O anticorpo foi diluído em MTBS na proporção de 1:4000 para marcação da anti-vimentina nas reações de “Western Blotting”.

### *III.1.8. Revelação da imunoreação*

A revelação foi realizada em câmara escura, com sistema de exaustão. Utilizou-se o Kit ECL para “Western Blotting” (Amersham, Oakville, Ontario) e filme Kodak X-Omat XK1.

## **III.2. EQUIPAMENTOS**

### *Relação dos Equipamentos utilizados para realização deste trabalho*

- ✓ Medidor de pH (Modelo Digimed), para verificação e ajuste do pH de todas as soluções, calibrado no momento de uso.
- ✓ Balança Eletrônica (Sartori), para pesagem das gônadas, hormônio, sais e outras substâncias utilizadas no preparo de soluções.
- ✓ Balança Eletrônica Urano (modelo UD 6000/1-L), utilizada para pesagem dos animais.
- ✓ Ultra-centrífuga para eppendorff Sigma utilizada para extração das proteínas de filamentos intermediários de animais imaturos
- ✓ Centrífuga baby PANEM utilizada para separação do soro das amostras de sangue coletadas dos animais.
- ✓ Banho-maria do tipo Dubnoff para as incubações.
- ✓ Centrifuga eppendorf 5415 utilizada para as lavagens das proteínas precipitadas em TCA.
- ✓ Espectrofotômetro UVA<sup>visível</sup> Pharmacia - LKB - Ultrospec III utilizado para leitura da dosagem de proteínas e determinação do glicérol plasmático.

- ✓ Fonte para eletroforese do tipo GIBCO BRL Electrophoresis Power Supply (modelo 250) para fornecer voltagem e corrente elétrica para a migração das proteínas no gel de eletroforese.
- ✓ Sistema de eletrotransferência: Semi-Dry Transfer Cell, trans-Blot SD - BIO-RAD suprido por uma fonte de eletroforese Power Supply - EPS 300, Pharmacia Biotech, utilizado para fornecer voltagem e corrente elétrica para a eletrotransferência das proteínas do gel para a nitrocelulose.
- ✓ Espectrofotômetro de cintilação líquida (Departamento de Farmacologia - UFSC ou Departamento de Bioquímica - UFRGS) utilizado na contagem de radioatividade.
- ✓ Softwares: GraphPAD InStat Software Version 1.12a; Excel 2000 (Microsoft Office 2000); Opti Quant versão 02.00; Photoshop 5.0

### **III.3. MÉTODOS**

#### **III.3.1. Animais**

Foram utilizados grupos de ratos Wistar machos de 15, 35 e 45 dias de idade provenientes do biotério central da UFSC ou do Departamento de Bioquímica - UFRGS. No controle da idade foi considerado como primeiro dia de vida o dia seguinte ao do nascimento. O número de animais utilizado em cada grupo de experimentos está citado nos resultados.

Todos os animais utilizados neste trabalho foram mantidos em uma sala com sistema de exaustão e controle claro-escuro (18h às 6h escuro e das 6h às 18h claro), com ambiente climatizado a cerca de 25 °C e em gaiolas plásticas, permanecendo com as mães até o momento do desmame. Os ratos foram alimentados com ração comercial e água "ad libitum".

Todos os animais foram cuidadosamente monitorados e mantidos em concordância com as recomendações do Conselho de Medicina Veterinária (CMV) e do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), protocolo 067/CEUA/ UFSC.

### **III.3.2. Modelos experimentais**

#### *III.3.2.1. Tratamento “in vivo” com o hormônio T<sub>3</sub>*

Ratos a partir do 8º, 28º ou 38º dia de idade receberam por 7 dias o hormônio 3,5,3'-triiodo-L-tironina (T<sub>3</sub>), numa concentração de 80 M-g/Kg de peso corporal diluído em solução fisiológica (NaCl 0,9%) e injetado intraperitonealmente. Os animais controles receberam injeção intraperitoneal de solução fisiológica durante o mesmo período. O objetivo deste tratamento foi induzir o hipertireoidismo. Foi utilizado um mínimo de 5 ratos por grupo (5 para os controles, 5 para os tratados com T<sub>3</sub>). Todos os animais constituintes dos respectivos grupos foram pesados no início e no final do experimento (Van Haster *et al.*, 1993).

#### *III.3.2.2. Tratamento in vitro com T<sub>3</sub>*

Após deslocamento cervical, os testículos de ratos normais de 15, 35 e 45 dias foram rapidamente removidos, descapsulados e pesados. Foi realizada uma curva dose-resposta do hormônio para análise do imunoconteúdo e da fosforilação da vimentina proveniente de testículos de ratos de 15 dias de idade utilizando-se 0,1; 1,0; 10 e 100  $\mu$ M de T<sub>3</sub>. O tecido foi previamente pré-incubado em um banho metabólico Dubnoff, sob agitação constante à 30°C, por 15 min em tampão Krebs-Hepes pH 7,4 contendo inibidores de proteases (tabela III. 1) e glicose 5 mM, na presença ou ausência de T<sub>3</sub> (Silva *et al.*, 2001). A incubação foi realizada com 100  $\mu$ L de tampão com ou sem T<sub>3</sub> durante 30 min a 30°C. Para o tratamento *in vitro* dos ratos de 35 e 45 dias de idade, foi utilizada a concentração de 1 p.M de T<sub>3</sub>.

### III.3.2.3. Obtenção das gônadas

As gônadas foram removidas por incisão abdominal e dissecadas do epidídimo. A seguir efetuou-se a retirada da túnica albugínea. Durante o tempo de obtenção dos testículos estes foram mantidos em papel filtro embebido em solução tampão e acondicionados em placas de Petri mantidas sobre gelo (Silva *et al.*, 2001).

### III.3.3. Separação do soro para determinações das concentrações hormonais e de triacilglicerol

Os ratos controles e tratados *in vivo* com T<sub>3</sub> 80 µg/Kg de peso corporal por 7 dias foram anestesiados em câmara etérea e o sangue coletado. A amostra de sangue coletada ficou alguns minutos em temperatura ambiente até a retração do coágulo. Após, foi feita centrifugação do soro a 1.500 rotações por minuto (rpm) durante 5 minutos. Em seguida, o soro foi aspirado e armazenado a -20°C até o momento da realização das determinações hormonais e de triacilglicerol sérico.

As concentrações séricas circulantes dos hormônios triiodotironina total (TT<sub>3</sub>), triiodotironina livre (LT<sub>3</sub>), tiroxina total (TT<sub>4</sub>), tiroxina livre (LT<sub>4</sub>) e hormônio estimulante da tireóide (TSH) foram avaliadas por radioimunoensaio (CRIESP - SP) a partir de amostras de sangue coletadas no dia do experimento para ambos os grupos (Van Haaster *et al.*, 1993).

O triacilglicerol sérico dos animais controles e tratados *in vivo* com T<sub>3</sub> foi realizado utilizando-se kits da Labtest - Sistemas para Diagnósticos (Brasil).

### III.3.4. Análise Morfológica

A análise morfológica foi realizada em animais controles e tratados *in vivo* com T<sub>3</sub> na fase imatura do desenvolvimento sexual.

Após rápida remoção das gônadas, um testículo de cada animal foi fixado para microscopia óptica e o contralateral para microscopia eletrônica.

Para microscopia óptica as gônadas foram fixadas por imersão em Bouin. As gônadas foram lavadas várias vezes com álcool 70%, desidratadas em soluções crescentes de álcool (96 a 99%) e clareadas em clorofórmio. A obtenção de um bloco de parafina contendo a gônada procedeu-se pelos subseqüentes banhos de parafina 58 - 60° (Merk) por 30 minutos. Efetuaram-se, então, cortes transversais seriados de 10  $\mu$ m em micrótomo tipo Minot (Leitz). Após a montagem dos cortes em lâminas, estas foram secadas em estufas a 37 °C durante 24 horas. Este material, foi então utilizado para a realização das técnicas de Hematoxilina-eosina (HE) e ácido periódico - Schiff (PAS) (Romeis, 1928; Pearse, 1968).

Para a microscopia eletrônica, as gônadas foram fixadas em glutaraldeído 3% diluído em tampão cacodilato de sódio 0,2 M pH 7,4, durante 2 horas à 4 °C. Após, foi feita uma segunda fixação em tetróxido de ósmio a 2%, também diluído em cacodilato de sódio 0,2 M pH 7,4, por 1 hora em temperatura ambiente. As gônadas foram desidratadas com soluções crescentes de álcool etílico de 30 até 100%, e incluídas em resina spurr. Os cortes ultrafinos foram contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo (Watson, 1958; Reynolds, 1963). A observação do material e as fotografias foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM - 1200 EXII (Universidade Federal do Paraná - PR).

### III.3.5. Incorporação *in vitro* de <sup>32</sup>P-ortofosfato

Testículos de ratos de 15, 35 e 45 dias de idade foram rapidamente removidos e dissecados em placas de Petri sobre gelo. O tecido foi previamente pré-incubado em um banho metabólico Dubnoff, sob agitação constante à 30°C, por 15 min em tampão Krebs-Hepes pH 7,4, contendo inibidores de proteases e glicose 5 mM (tabela III. 1). A incubação foi realizada com 100  $\mu$ l de tampão contendo 80  $\mu$ Ci de <sup>32</sup>P ortofosfato (8 TBq/g; CNEN, São Paulo, Brasil). A reação foi parada com tampão gelado contendo NaF 150 mM, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM, Tris-HCL 50 mM com pH 6,5 e inibidores de protease. Os testículos

foram lavados 3 vezes neste tampão para remover o excesso de radioatividade (Moretto, *et al.*, 1999).

Os experimentos de incorporação *in vitro* de  $^{32}\text{P}$  ortofosfato foram realizados tanto em testículos de animais normais para o estudo ontogenético da fosforilação da vimentina, quanto em testículos de animais tratados *in vivo* e *in vitro* com hormônio em todas as fases de desenvolvimento estudadas. Para o tratamento *in vitro*, nos períodos de pré-incubação e incubação foi acrescentado o hormônio  $\text{T}_3$  nos grupos tratados.

### **III.3.6. Preparação da fração de proteínas do citoesqueleto insolúveis em Triton X-100**

A fração citoesquelética enriquecida em filamentos intermediários para os testículos de animais controles, tratados *in vivo* e *in vitro*, foi obtida em tampão de alta força iônica (KCl 600 mM) contendo 1% de Triton X-100. Os testículos foram homogeneizados e centrifugados em centrífuga refrigerada 2 vezes consecutivas com rotação de 15.800 x g por 10 min a 4 °C (Rubin *et al.*, 1992). Após a extração, as proteínas insolúveis em Triton X-100 foram precipitadas em ácido tricloroacético (TCA) 10% por 30 minutos em gelo a 4 °C e lavadas em etanol e acetona. As amostras após delipidadas foram dissolvidas em SDS 1% e posteriormente a concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951), utilizando-se a curva padrão de albumina bovina entre 5 e 40 µg em SDS 1% (Sigma Chemical). As leituras foram determinadas em 650 nm em espectrofotômetro (Pharmacia - LKB).

### **III.3.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

As amostras obtidas pelo método de extração já descrito foram diluídas a uma concentração de 3 mg/mL em um tampão contendo β-mercaptoetanol, SDS e corante pirronina, fervidas por 3 minutos em banho-maria e analisadas em SDS-PAGE 10% onde

foi feita a aplicação de 40 µg de proteínas por “poço” em eletroforese (Laemmli, 1970). Na eletroforese foi submetida também uma amostra contendo proteínas padrões, com pesos moleculares conhecidos entre 205 e 29 KDa (SDS-6H - Sigma Co.). As migrações foram em fonte do tipo GIBCO BRL - Electrophoresis Power Supply - Model 250.

Para análise do perfil eletroforético das proteínas de filamentos intermediários em SDS-PAGE, ao final da migração os géis foram corados em Coomassie Blue R-250 (SIGMA) e descorados em solução de metanol e ácido acético. Em seguida, foram embebidos em solução de secagem por 30 minutos. Posteriormente, os géis foram colocados entre duas folhas de papel celofane previamente banhadas na mesma solução e o conjunto firmemente adaptado a uma placa de vidro com auxílio de fita crepe para a secagem dos géis.

Nos experimentos de incorporação *in vitro* de  $^{32}\text{P}$ , após a migração eletroforética, os géis eram embebidos diretamente em solução de secagem e processados como descrito acima. Os géis secos eram expostos a filmes de autorradiografia X-Omat XKI por aproximadamente 72 horas a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  e posteriormente revelados.

Para os experimentos de imunodeteção, os géis eram colocados em contato com a membrana de nitrocelulose entre papéis filtro embebidos em tampão de transferência.

### **III.3.8. Imunodeteção (“Western Blot”)**

Este método foi utilizado tanto para a identificação das proteínas contidas nas frações citoesqueléticas enriquecidas em filamentos intermediários, quanto para o estudo quantitativo dos efeitos do  $\text{T}_3$  sobre estas proteínas. Após o término da corrida eletroforética as proteínas foram transferidas para papel de nitrocelulose de 0,45 fim por 1 hora a 15 V em tampão de transferência (Tris-HCl 48 mM, Glicina 39 mM, metanol 20% e SDS 0,25 %). O “blot” foi então lavado por 10 min em Tris-salina tamponado (TBS) (NaCl 0,5 M, Tris-HCl 20 mM, pH 7,5), seguido por uma incubação de 2 horas em solução

bloqueadora (TBS mais 5% de leite em pó desnatado). Depois da incubação o “blot” foi lavado 2 vezes por 5 min com TBS contendo 0,05 % de Tween-20 (TTBS), e então incubado durante a noite em solução bloqueadora contendo o anticorpo monoclonal anti-vimentina (SIGMA) na diluição de 1:400. O “blot” foi então lavado 2 vezes por 5 min com TTBS e incubado por 2 horas numa solução contendo o segundo anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase diluído 1:4000 (SIGMA). O “blot” foi novamente lavado 2 vezes por 5 min com TTBS e 2 vezes por 5 min com TBS. A reação imunológica foi revelada por luminescência utilizando o kit ECL (Amersham, Oakville, Ontario) em filme Kodak X-Omat XK1 (Paranko *et al.*, 1986). O procedimento descrito acima foi utilizado conforme adaptado de De Freitas *et al.*, 1995.

### **III.3.9. Procedimentos de quantificação**

O imunoconteúdo e a incorporação *in vitro* de  $^{32}\text{P}$  na vimentina foram quantificados por escaneamento dos filmes com scanner Hewlett-Packard ScanJet 6100 e a densidade óptica das bandas correspondentes a vimentina foi determinada com o software OptiQuant, versão 02.00 (Packard Instrument Company). Os valores obtidos para os controles foram normalizados para 100% e as alterações na porcentagem dos tratados foram calculadas individualmente nas amostras tratadas.

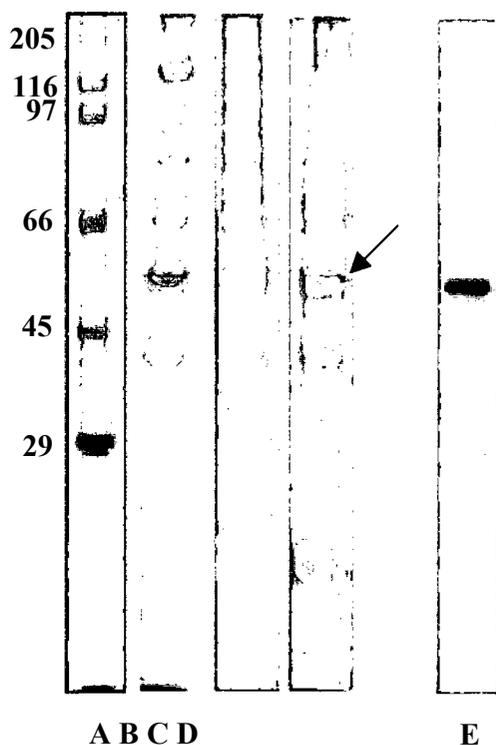
### **III.3.10. Análise estatística**

Os resultados foram estatisticamente comparados utilizando-se o teste “t” de Student, e foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. Quando apropriado, foi utilizada a análise de variância de uma e de duas vias seguida do teste de Tukey-Kramer do programa GraphPAD InStat Software Version 1.12a. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para um “p” igual ou menor que 0,05 (Snedecor & Cochran, 1973).

## IV. RESULTADOS

### IV.1. OBTENÇÃO DA FRAÇÃO CITOESQUELÉTICA ENRIQUECIDA EM FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS (FI) DE TESTÍCULOS DE RATO: IMUNOCONTEÚDO E INCORPORAÇÃO *IN VITRO* DE P NA VIMENTINA DURANTE O DESENVOLVIMENTO SEXUAL

#### IV.1.1. Obtenção da fração citoesquelética enriquecida em FI e imunodeteção da vimentina



**Figura IV.1.** Perfil eletroforético da fração citoesquelética enriquecida em filamentos intermediários de testículos de ratos normais em gel de poliacrilamida corado com comassie blue e imunodeteção da vimentina. Padrão de peso molecular SDS-6H (A); Fração citoesquelética de testículos de ratos imaturos (B), púberes (C) e adultos (D); Imunodeteção da vimentina com anticorpo monoclonal anti-vimentina (E). A seta indica a posição da vimentina no gel.

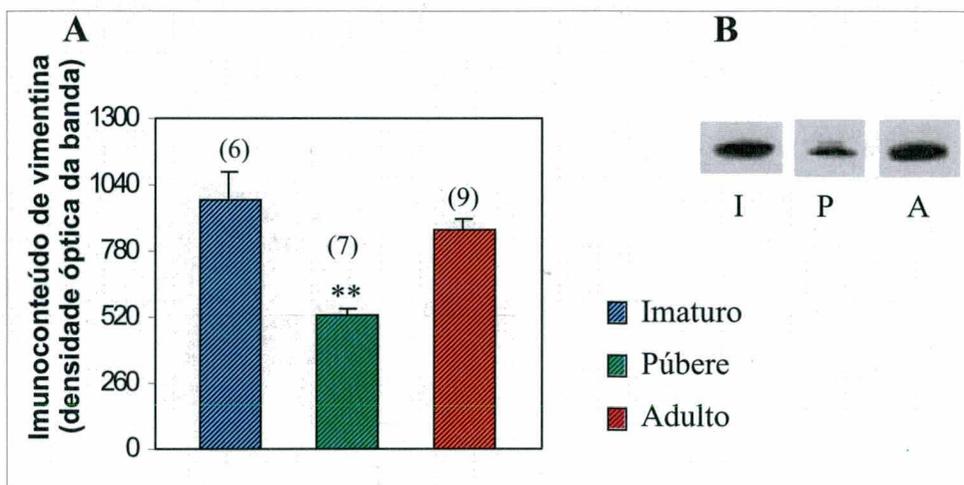
Composição do padrão de peso molecular SDS-6H: miosina (205 KDa), galactosidase (116 KDa), fosforilase b (97 KDa), albumina bovina (66 KDa), albumina de ovo (45 BCDa) e anidrase carbônica (29 KDa)

O método utilizado para extração das proteínas do citoesqueleto baseia-se na propriedade de insolubilidade na presença de Triton X-100. No entanto, a composição da fração citoesquelética insolúvel em Triton X-100 depende da composição do tampão de extração. O EGTA presente na solução tem a finalidade de quelar o cálcio liberado durante a deslipidação, e a presença de EGTA no tampão é importante para obter uma estabilização ótima das estruturas do citoesqueleto. Além disso, os inibidores de protease são críticos para evitar a ação de proteases endógenas sobre as proteínas do citoesqueleto. A fração citoesquelética obtida em tampão de alta força iônica contendo 1 % de Triton X-100 é enriquecida em FI (Carraway *et al*, 1992). Utilizando imunodeteção (“imunoblotting”) nós identificamos a vimentina presente na fração citoesquelética enriquecida em FI de testículos de ratos, como mostrado na figura IV. 1, linha E.

### **rV.1.2. Ontogenia da imunodeteção e da fosforilação “in vitro” da vimentina da fração citoesquelética**

#### **Imunoconteúdo da vimentina**

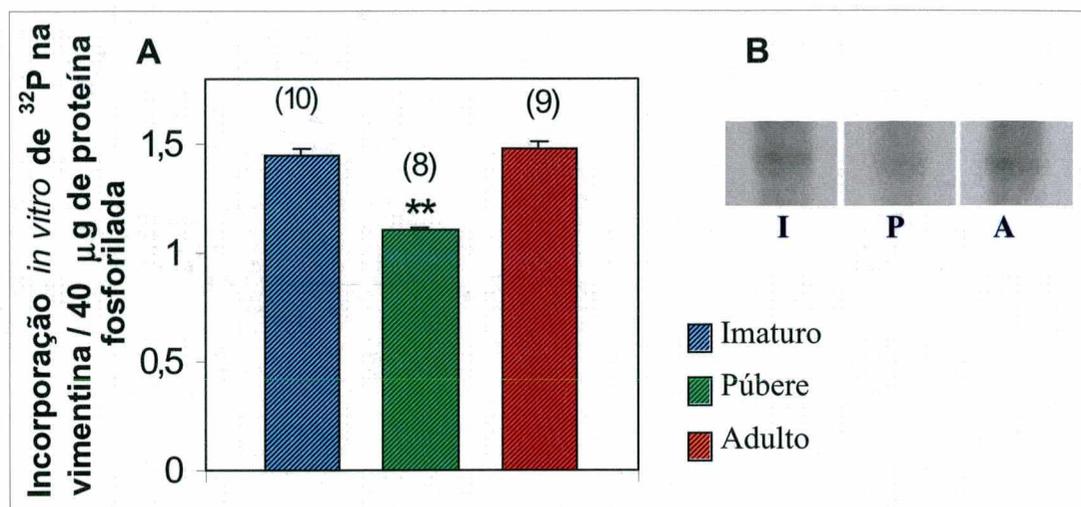
Com o objetivo de verificar o perfil ontogenético do conteúdo da vimentina insolúvel em Triton X-100 em testículos de ratos normais em 3 diferentes fases do desenvolvimento sexual, a fração citoesquelética enriquecida em filamentos intermediários foi submetida a uma eletroforese em gel de poliacrilamida e posterior imunodeteção com anticorpo monoclonal anti-vimentina. A figura IV.2 mostra que a vimentina é expressa ao longo do desenvolvimento sexual (B). Na fase imatura observa-se a maior concentração no imunoconteúdo de vimentina, que diminui significativamente na puberdade, voltando a aumentar no período adulto (A).



**Figura IV.2.** Imunodeteção da vimentina da fração citoesquelética enriquecida em FI de testículos de rato durante o desenvolvimento sexual. A) Imunoc conteúdo de vimentina insolúvel em Triton X-100 de testículos de ratos imaturos (I), púberes (P) e adultos (A). A fração citoesquelética enriquecida em FI foi incubada com anticorpo monoclonal anti-vimentina (1:400). As bandas foram quantificadas e os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. do número de ratos indicados nos parênteses. \*\*Significativo para  $p \leq 0,01$  entre as idades, como determinado pelo teste ANOVA de uma via, seguidas de teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. B) Imunorreação representativa do conteúdo de vimentina de testículos de ratos imaturos, púberes e adultos.

### Incorporação de $^{32}\text{P}$ ortofosfato na vimentina

Para estudar a fosforilação *in vitro* da vimentina de testículos de ratos durante o desenvolvimento sexual, estes foram pré-incubados por 15 min e posteriormente incubados por 30 min com  $^{32}\text{P}$  ortofosfato a  $30^\circ\text{C}$ . Após a incubação a fração citoesquelética foi extraída, analisada em SDS-PAGE e a autorradiografia foi quantificada por densitometria óptica da banda correspondente a vimentina. A incorporação *in vitro* de  $^{32}\text{P}$  na vimentina foi significativamente maior em testículos de ratos de 15 e 45 dias de idade em relação aos testículos de ratos de 35 dias de idade (Figura IV.3). Observou-se um perfil ontogenético de fosforilação *in vitro* semelhante ao encontrado para o imunoc conteúdo da vimentina, onde as fases imatura e adulta apresentaram maiores quantidades de vimentina e também maior incorporação de  $^{32}\text{P}$  em relação à fase púbere.



**Figura IV.3.** Ontogenia da incorporação *in vitro* de  $^{32}\text{P}$ -ortofosfato na vimentina insolúvel em Triton X-100 de testículos de ratos durante o desenvolvimento sexual. A) Testículos de ratos foram pré-incubados 15 min em Krebs-HEPES e incubados 30 min em presença de 80  $\mu\text{Ci}$  de  $^{32}\text{P}$ - ortofosfato a 30°C. A fração citoesquelética enriquecida em FI foi extraída e a incorporação de  $^{32}\text{P}$ -ortofosfato foi quantificada como descrito em materiais e métodos. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. do número de ratos indicados nos parênteses. \*\*Significativo entre as idades para  $p \leq 0,001$ , como determinado pelo teste ANOVA de uma via, seguido de teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. B) Autorradiografia representativa da incorporação *in vitro* de  $^{32}\text{P}$  na vimentina presente na fração citoesquelética de testículos de ratos imaturos, púberes e adultos.

#### IV.2. EFEITOS DO TRATAMENTO *IN VIVO* COM $\text{T}_3$ EM RATOS EM TRÊS DIFERENTES FASES DO DESENVOLVIMENTO SEXUAL

Os ratos receberam injeções intraperitoniais de 80  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de peso corporal de  $\text{T}_3$  uma vez ao dia durante sete dias. Após o tratamento, foram determinados os índices somáticos (pesos corporais e testiculares), as dosagens séricas dos hormônios tireoidianos e TSH, o imunocntéudo e a incorporação *in vitro* de  $^{32}\text{P}$  na vimentina proveniente de animais controles e tratados *in vivo* com  $\text{T}_3$ .

### IV.2.1. Índices somáticos

Observou-se que o tratamento promoveu um aumento na relação peso da gônada/ peso corporal apenas nos animais imaturos. O peso corporal não foi alterado pelo tratamento em nenhuma das idades estudadas (tabela IV.1).

**Tabela IV.1.** Efeito do tratamento *in vivo* com T<sub>3</sub> no peso corporal e testicular de ratos durante o desenvolvimento sexual.

	Imaturo		Púbere		Adulto	
	Controle	T <sub>3</sub>	Controle	T <sub>3</sub>	Controle	T <sub>3</sub>
Peso Corporal (g)	23,0 ± 3,5	20,0 ± 2,3	167 ± 7,76	153,6 ± 5,84	222,5 ± 10,1	205,7 ± 7,6
mg de testículo/ g de peso corporal	2,17 ± 0,03	<b>3,18 ± 0,07*</b>	4,00 ± 0,18	4,48 ± 0,3	5,47 ± 0,12	5,85 ± 0,19

Imaturos: ratos de 15 dias de idade, púberes: 35 dias, e adultos: 45 dias de idade. \*Significativo para  $p \leq 0,01$  em relação aos respectivos controles, como determinado pelo teste “*t*” de student. Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M. de experimentos realizados em triplicatas (n = 15).

### IV.2.2. Níveis séricos dos hormônios tireoidianos e do TSH

A tabela IV.2 mostra os níveis séricos dos hormônios triiodotironina total (TT<sub>3</sub>) e livre (LT<sub>3</sub>), tiroxina total (TT<sub>4</sub>) e livre (LT<sub>4</sub>) e hormônio estimulante da tireóide (TSH) de ratos controles e tratados com T<sub>3</sub> por 7 dias. Nos animais imaturos observou-se um aumento significativo nos níveis de TT<sub>3</sub> e LT<sub>3</sub> com diminuição nas concentrações de TT<sub>4</sub> e LT<sub>4</sub> e elevação do TSH após tratamento hormonal. Nos ratos púberes observou-se um perfil semelhante ao detectado nos ratos imaturos, porém com variações hormonais mais discretas, e sem, contudo alterar as concentrações de TSH. Em animais adultos observou-se um perfil diferente do encontrado nas outras idades. Nesse tratamento obteve-se níveis sérico diminuídos de LT<sub>3</sub>, TT<sub>4</sub> e LT<sub>4</sub>, sem afetar as concentrações de TT<sub>3</sub> e TSH.

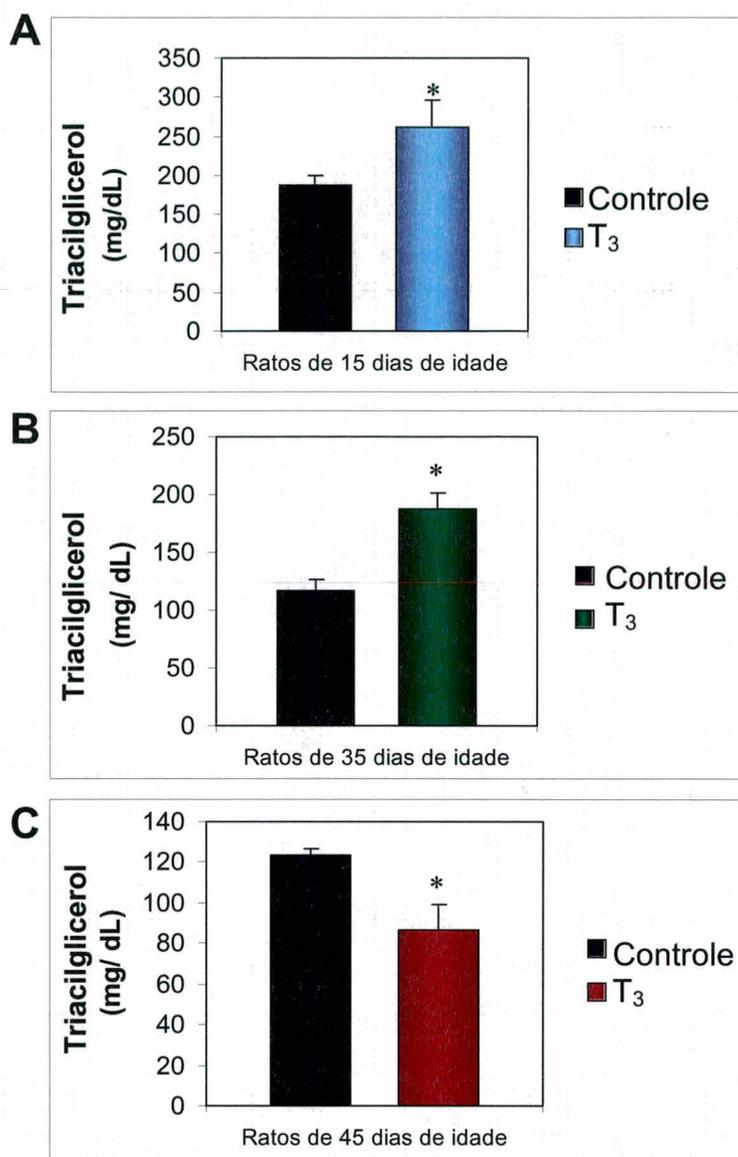
**Tabela IV.2.** Níveis séricos de hormônios tireoidianos e de TSH em ratos controles e tratados com T<sub>3</sub> 80 µg/kg de peso corporal durante 7 dias

	Imaturo		Púbere		Adulto	
	Controle	T <sub>3</sub>	Controle	T <sub>3</sub>	Controle	T <sub>3</sub>
TT <sub>3</sub> (ng/dL)	1,47 ±0,002	6,31 ±0,05*	1,47 ±0,002	2,12 ±0,006*	1,76 ±0,002	1,51 ±0,01
LT <sub>3</sub> (ng/dL)	0,73 ±0,001	5,66 ± 0,04*	0,5 ±0,001	1,31 ±0,002*	1,40 ±0,003	0,56 ± 0,004*
TT <sub>4</sub> (ng/dL)	5,6 ± 0,03	0,3 ±0,003*	5,8 ± 0,04	0,9 ± 0,001*	7,1 ±0,07	1,40 ±0,02*
LT <sub>4</sub> (ng/dL)	3,7 ±0,01	0,9 ± 0,002*	1,7 ±0,02	0,3 ±0,001*	2,5 ± 0,01	0,30 ± 0,002*
TSH (µIU/mL)	0,03 ±0,0001	0,41 ±0,001*	0,03 ±0,0002	0,05 ± 0,0003	0,03 ±0,0001	0,04 ±0,0001

Foram considerados imaturos os animais de 15 dias de idade, púberes os de 35 e adultos os de 45 dias de idade. \* Significativo em relação aos respectivos controles para  $p \leq 0,05$  como determinado pelo teste “t” de student. Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M. de experimentos realizados em triplicatas de no mínimo 10 animais em cada grupo. TT<sub>3</sub> = triiodotironina total; LT<sub>3</sub> = triiodotironina livre; TT<sub>4</sub> = tiroxina total; LT<sub>4</sub> = tiroxina livre e TSH = hormônio estimulante da tireóide.

#### IV.2.3. Concentrações séricas de triacilglicerol

Outro parâmetro analisado neste modelo experimental foi a medida do triacilglicerol sérico proveniente de animais controles e tratados *in vivo* com o hormônio T<sub>3</sub>. Os resultados apresentados na figura IV.4 mostraram que o tratamento induziu um aumento nos níveis séricos de triacilglicerol nos animais imaturos e púberes, enquanto nos animais adultos o conteúdo de triacilglicerol no soro diminuiu em relação aos respectivos controles.



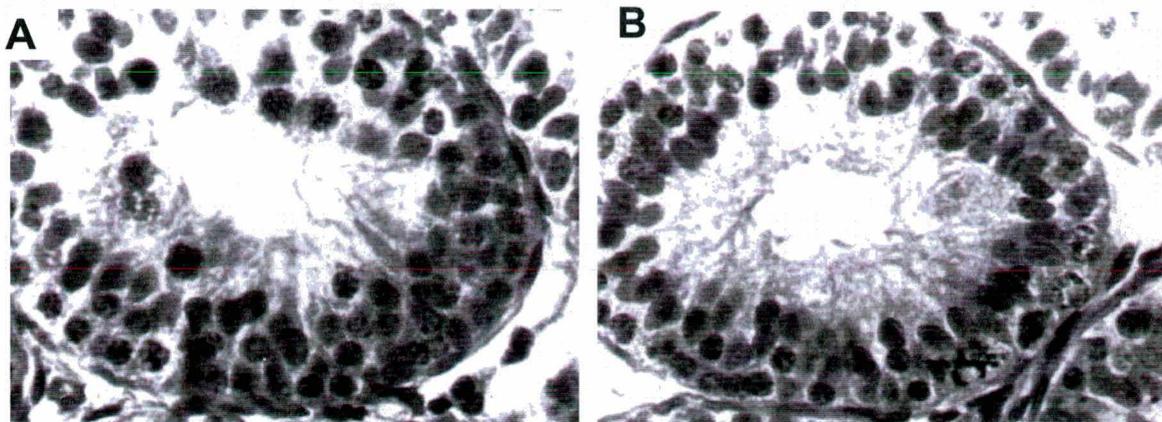
**Figura IV.4.** Efeito do tratamento *in vivo* com hormônio T<sub>3</sub> nos níveis séricos de triacilglicerol em ratos controles e tratados. A: Imaturos; B: Púberes; C: Adultos. Os resultados são a média  $\pm$  E.P.M de experimentos realizados em triplicata de 12 animais em cada grupo. \*Significativo para  $p \leq 0,05$  em relação aos respectivos controles como determinado pelo teste “*t*” de student.

#### IV.2.4. Análise morfológica dos túbulos seminíferos

Para análise morfológica foram utilizados testículos de ratos de 15 dias de idade controles e tratados com T<sub>3</sub> (80  $\mu$ g/ Kg de peso corporal durante 7 dias).

#### IV.2.4.1. Microscopia óptica

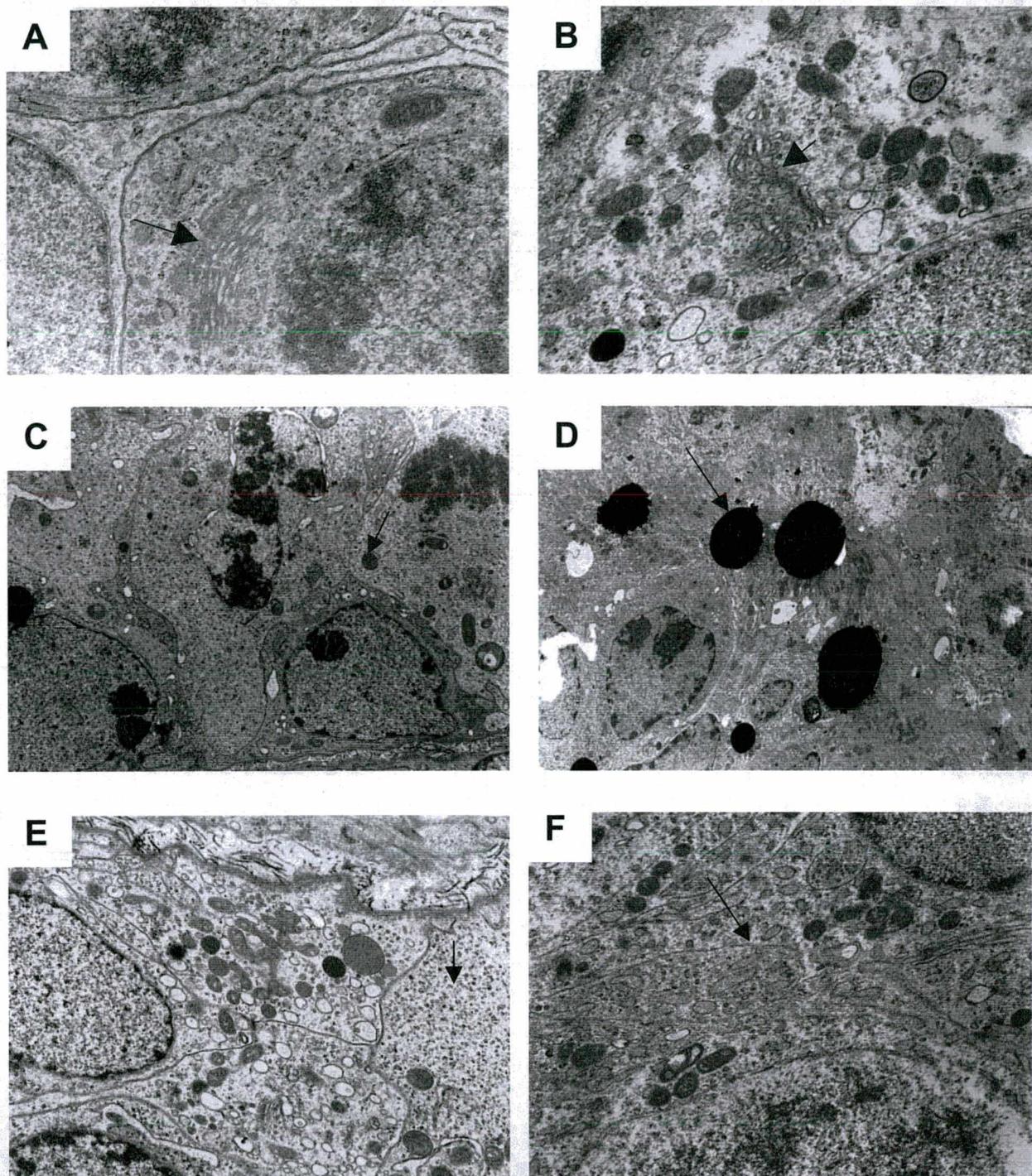
Na figura IV.5 observa-se a microscopia óptica do epitélio seminífero de ratos controles e tratados. Em ambos os grupos a população celular é semelhante. O lúmen tubular está formado, com integridade celular e estrutural e epitélio seminífero com estágios cíclicos.



**Figura IV.5.** Fotomicrografia das seções coradas com hematoxilina-eosina de testículos de ratos imaturos controles e tratados *in vivo* com T<sub>3</sub>. As células de Sertoli situam-se sobre a membrana basal e estão no compartimento basal, enquanto os espermatócitos primários, secundários e as espermátides encontram-se no compartimento adluminal. Não observou-se lise celular em nenhum dos grupos. A: Controle; B: Tratado. (Aumento 400X).

#### IV.2.4.2. Microscopia Eletrônica

As células de Sertoli podem ser reconhecidas pela forma e coloração pálida do núcleo. Nos animais controles as células de Sertoli apresentam núcleo claro, com cromatina frouxa, mitocôndrias com cristas levemente dilatadas, polirribossomos e RER. É observada também a presença de lipídeos dispersos dentro e fora das células nos túbulos seminíferos (Figura IV.6. A, C e E). Nos animais tratados observou-se diferenças marcantes em relação aos controles. O aparelho de Golgi aparece bastante desenvolvido, apresentando vesículas bem dilatadas, além de vesículas de secreção. Há também a presença de polirribossomos e RER em quantidades significativamente maiores que nos animais controles. Observaram-se também gotas de lipídeos intra e extracelulares dispersos em todo o túbulo em quantidades significativamente maiores que nos controles (Figura IV.6 B, D e F).



**Figura IV.6.** Microscopia eletrônica de testículos de ratos imaturos controles e tratados *in vivo* com  $T_3$ . Em B o aparelho de Golgi apresenta-se mais desenvolvido que em A. Na foto D está sendo mostrada a maior quantidade de gotículas de lipídeos nos túbulos de animais tratados em relação ao controle C. A fotografia F demonstra a maior concentração de polirribossomos em relação ao controle E.

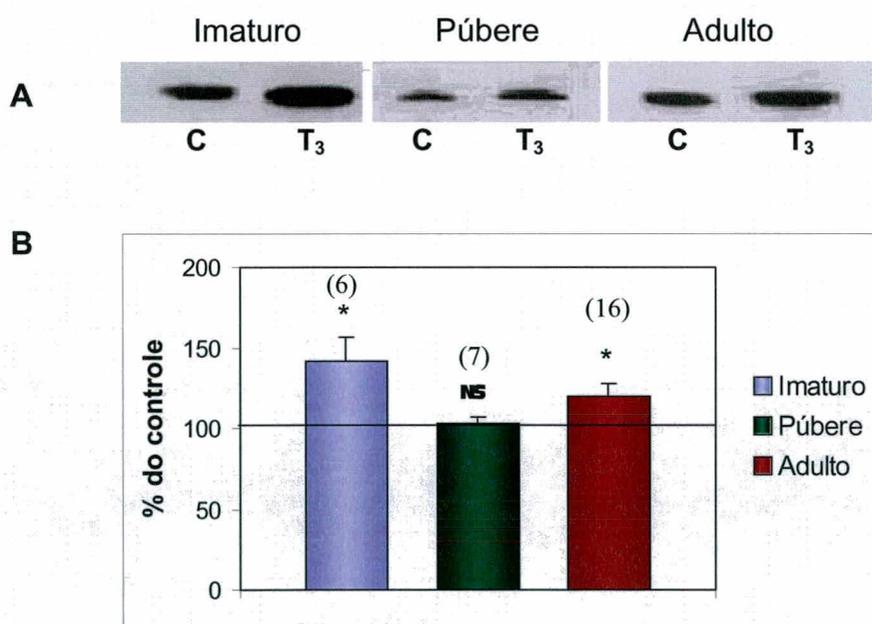
A; C; E: controles. B;D; F: tratados *in vivo* com  $T_3$

#### IV.2.5. Imunoconteúdo e fosforilação “*in vitro*” da vimentina na fração citoesquelética de testículos de ratos

Neste estudo foram analisados os efeitos do tratamento *in vivo* com  $T_3$  no imunoconteúdo e na incorporação *in vitro* de  $^{32}P$  ortofosfato na vimentina presente na fração citoesquelética insolúvel em Triton X-100 de testículos de ratos em diferentes fases do desenvolvimento sexual.

##### *Imunoconteúdo da vimentina*

Como demonstrado na figura IV.7, o tratamento *in vivo* com  $T_3$  promoveu alterações no imunoconteúdo da vimentina presente na fração citoesquelética enriquecida em FI nos animais imaturos e adultos, onde houve aumento significativo no conteúdo desta proteína. Já nos animais púberes, não foram observadas alterações em relação aos respectivos controles.



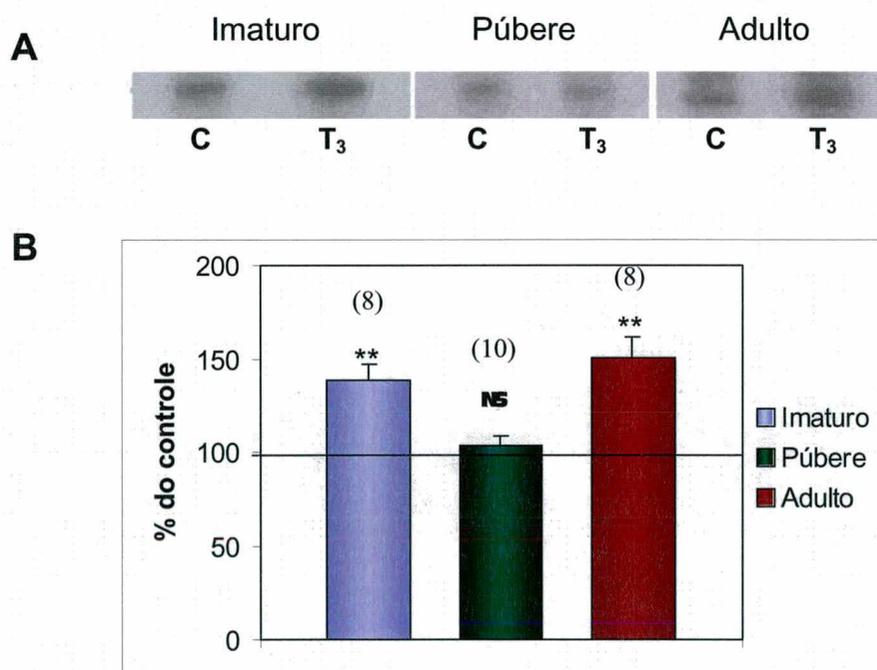
**Figura IV.7** Efeito do tratamento *in vivo* com o hormônio  $T_3$  no imunoconteúdo da vimentina insolúvel em Triton X-100 de testículo de ratos controles e tratados. A) Imunodeteção representativa do conteúdo de vimentina em testículos de ratos controles e tratados nas 3 idades. B) A vimentina insolúvel em tampão de alta força iônica foi extraída e analisada por eletroforese (40  $\mu$ g de proteína total por “poço”). Em seguida foi realizada

a imunorreação com anticorpo monoclonal anti-vimentina (1:400). As bandas da imunorreação correspondentes a vimentina foram quantificadas e os resultados são a média  $\pm$  E.P.M. expressos como porcentagem do controle do número de ratos indicados nos parênteses. \*Significativo para  $p \leq 0,05$  como determinado pelo teste ANOVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer.

(—) Controle dos respectivos grupos (100%).

### Fosforilação da vimentina

Neste estudo foram analisados os efeitos do tratamento *in vivo* com  $T_3$  na fosforilação *in vitro* da vimentina insolúvel em Triton X-100. Testículos de animais controles e tratados *in vivo* com  $T_3$  nas três fases do desenvolvimento foram dissecados do epidídimo, pré-incubados em solução Krebs-HEPES por 15 min e incubados *in vitro* na presença de 80  $\mu$ Ci de  $^{32}$ P ortofosfato. A fração citoesquelética foi obtida, separada em eletroforese e a banda correspondente a vimentina foi impressionada no filme e quantificada (figura IV.8). Nesta figura, observou-se que o tratamento estimulou a fosforilação *in vitro* da vimentina nas idades imatura e adulta, enquanto que na puberdade não foram observadas alterações significativas na fosforilação desta proteína.



**Figura IV.8.** Efeito do tratamento *in vivo* com  $T_3$  na incorporação *in vitro* de  $^{32}$ P na vimentina de testículos de ratos imaturos, púberes e adultos. A) Autorradiografia representativa da incorporação *in vitro* de  $^{32}$ P na vimentina insolúvel em Triton X-100 de

testículos de ratos controles e tratados *in vivo* com o hormônio. B) A fração citoesquelética enriquecida em FI foi extraída e a incorporação *in vitro* de  $^{32}\text{P}$  na vimentina insolúvel em Triton X-100 foi quantificada como descrito em materiais e métodos. Os resultados são a média  $\pm$  E.P.M expressos como porcentagem do controle do número de ratos indicados nos parênteses. \*\*Significativo para  $p \leq 0,002$  como determinado pelo teste ANOVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer.

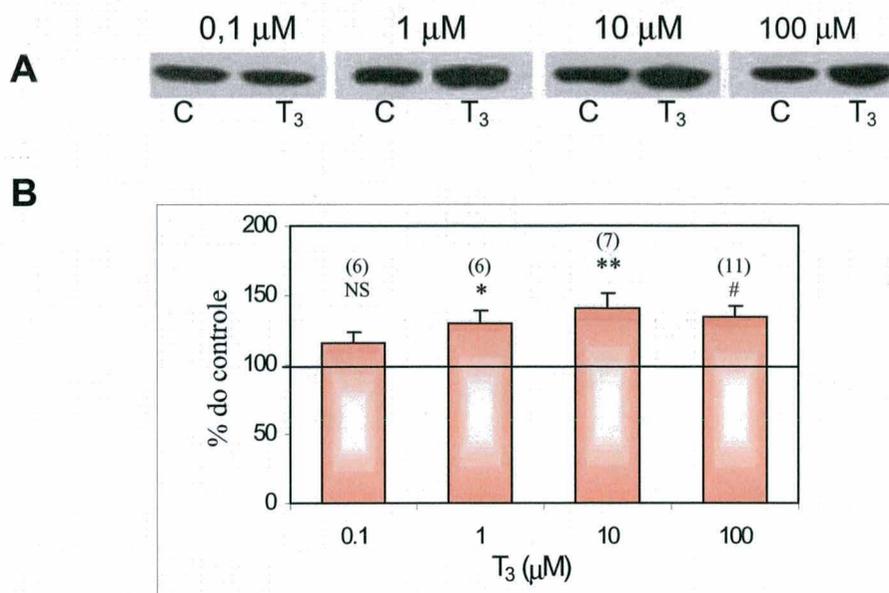
(-) Controle dos respectivos grupos (100%).

### **rV.3. EFEITO *IN VITRO* DO $T_3$ NO IMUNOCONTEÚDO E NA FOSFORILAÇÃO DA VIMENTINA EM TESTÍCULOS DE RATOS EM DIFERENTES FASES DO DESENVOLVIMENTO SEXUAL**

Antes de realizar o estudo ontogenético do efeito *in vitro* do  $T_3$  no imunocnteúdo e na incorporação de  $^{32}\text{P}$  na vimentina de testículos de ratos, foi realizada uma curva de concentração do hormônio para estes dois parâmetros em testículos de ratos na fase imatura do desenvolvimento sexual.

#### **IV.3.1. Curva dose-resposta do $T_3$ no imunocnteúdo da vimentina de testículos de ratos imaturos**

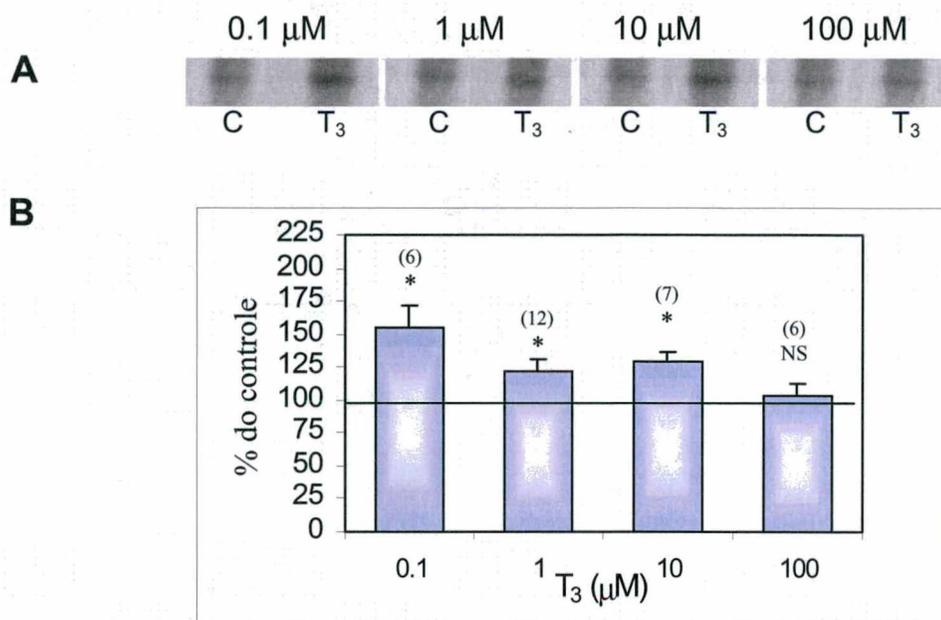
Testículos de ratos de 15 dias de idade foram pré-incubados com Krebs-HEPES em ausência ou presença de  $T_3$  em diferentes concentrações (0,1; 1; 10 e 100  $\mu\text{M}$ ) por 15 min a 30°C e posteriormente incubados por 30 minutos nas mesmas condições. A fração citoesquelética enriquecida em FI foi obtida, analisada em SDS-PAGE, seguida de imunodeteccção com anticorpo anti-vimentina. O resultado da curva de dose é demonstrado na figura IV.9 onde observa-se que a dose de 0,1  $\mu\text{M}$  de  $T_3$  não produziu alteração no imunocnteúdo da vimentina, entretanto aumentando-se a concentração para 1, 10 e 100  $\mu\text{M}$  obteve-se efeito estimulatório do hormônio no imunocnteúdo de vimentina presente na fração citoesquelética enriquecida em FI.



**Figura IV.9.** Curva dose-resposta do efeito do  $T_3$  *in vitro* no imunoc conteúdo da vimentina de testículos de ratos de 15 dias de idade. A) Curva dose-resposta representativa do efeito do  $T_3$  *in vitro* no imunoc conteúdo de vimentina insolúvel em tampão de alta força iônica (C = Controle;  $T_3$  = tratamento *in vitro* em diferentes concentrações). B) Testículos de ratos de 15 dias de idade foram pré-incubados e incubados em ausência ou presença de  $T_3$  0,1; 1; 10 e 100 mM. A vimentina foi extraída, analisada em SDS-PAGE com 40 μg de proteína por “poço”, seguida de imunorreação com anticorpo anti-vimentina (1:400). O conteúdo de vimentina foi quantificado e os resultados são a média ± E.P.M expressos como porcentagem do controle do número de ratos indicados nos parênteses. \*Significativo para  $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$  e # $p \leq 0,001$  como determinado pelo teste ANOVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. (—) Controle dos respectivos grupos (100%).

#### IV.3.2. Curva dose-resposta do $T_3$ sobre a incorporação “*in vitro*” de $^{32}P$ na vimentina de testículos de ratos imaturos

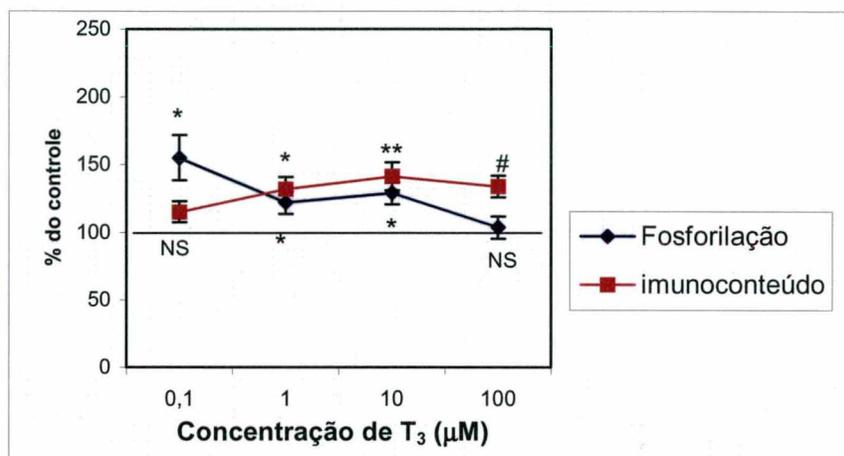
Testículos de ratos imaturos foram pré-incubados em presença ou ausência de  $T_3$  (0,1; 1; 10 e 100 μM) por 15 min a 30°C e incubados nas mesmas condições por 30 min com 80 μCi de [ $^{32}P$ ] ortofosfato. Na figura IV.10 observa-se o efeito das diferentes doses de  $T_3$  nessa incorporação, na qual as concentrações de 0,1; 1 e 10 μM aumentaram a fosforilação *in vitro* da vimentina, enquanto a dose de 100 μM não induziu qualquer alteração.



**Figura IV.10.** Curva dose-resposta do T<sub>3</sub> sobre a incorporação *in vitro* de <sup>32</sup>P na vimentina da fração citoesquelética enriquecida em FI de testículos de ratos de 15 dias de idade. A) Autorradiografia representativa da incorporação *in vitro* de <sup>32</sup>P na vimentina insolúvel em tampão de alta força iônica com 1% de Triton X-100 nas diferentes concentrações de T<sub>3</sub>. B) Testículos de ratos normais 15 dias de idade foram pré-incubados por 15 min em Krebs-HEPES e incubados por 30 min com 80  $\mu\text{Ci}$  de [<sup>32</sup>P] ortofosfato em ausência ou presença de T<sub>3</sub> nas concentrações de 0,1; 1; 10 e 100  $\mu\text{M}$ . Posteriormente foi extraída a fração citoesquelética enriquecida em filamentos intermediários, analisada em SDS-PAGE e exposta para autorradiografia. Os resultados são a média  $\pm$  E.P.M expressos como porcentagem do controle do número de ratos indicados nos parênteses. \*Significativo para  $p \leq 0,02$  como determinado pelo teste ANOVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. (—) Controle dos respectivos grupos (100%).

Comparando-se os resultados das curvas dose-resposta do tratamento *in vitro* com T<sub>3</sub> no imunoconteúdo e na fosforilação *in vitro* da vimentina observou-se que enquanto a elevação da dose produziu um estímulo no imunoconteúdo da vimentina, a incorporação *in vitro* de ortofosfato radioativo foi diminuída. Na concentração de 0,1  $\mu\text{M}$  observou-se aumento na incorporação de <sup>32</sup>P na vimentina, sem alterar o imunoconteúdo, enquanto que na dose de 100  $\mu\text{M}$  ocorreu o oposto. Assim, o aumento da incorporação de <sup>32</sup>P na vimentina está associado a uma diminuição na quantidade desta proteína presente no polímero (dose de 0,1  $\mu\text{M}$ ), visto que, o imunoconteúdo detecta a proteína polimerizada

extraída em tampão de alta força iônica em presença de 1 % de Triton X-100. Este resultado está de acordo também com o que ocorre na dose de 100  $\mu\text{M}$ , pois o aumento na fração polimerizada da vimentina (imunoconteúdo) está associado à não alteração da fosforilação. Nas concentrações intermediárias (1 e 10  $\mu\text{M}$ ) parece haver um equilíbrio entre o estímulo de imunoconteúdo e fosforilação, como pode ser visualizado na figura IV.11.



**Figura IV.11.** Efeito do tratamento *in vitro* com  $T_3$  em diferentes concentrações no imunoconteúdo e na fosforilação da vimentina presente na fração citoesquelética enriquecida em FI de testículos de ratos imaturos. Gráfico obtido a partir dos dados expressos nas figuras IV.9 e IV.10. \*Significativo para  $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$  e # $p \leq 0,001$  como determinado pelo teste ANOVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer.

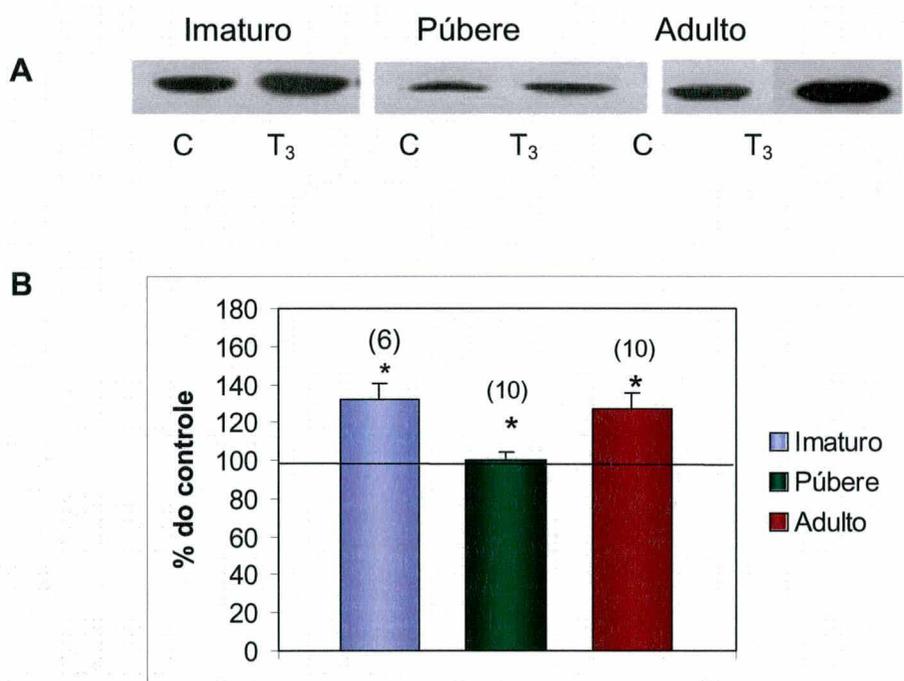
(—) Controle dos respectivos grupos (100%).

### IV.3.3. Efeito do tratamento “*in vitro*” com $T_3$ sobre o imunoconteúdo e a fosforilação “*in vitro*” da vimentina de testículos de rato ao longo do desenvolvimento sexual

Para avaliar o efeito *in vitro* do  $T_3$  no imunoconteúdo e na incorporação *in vitro* de  $^{32}\text{P}$  na vimentina presente na fração citoesquelética insolúvel em tampão de alta força iônica em presença de Triton X-100 ao longo do desenvolvimento sexual, foi utilizada a concentração hormonal de 1  $\mu\text{M}$ , que estimulou tanto o imunoconteúdo quanto a fosforilação da vimentina.

### Imunoconteúdo da vimentina

O efeito do  $T_3$  no imunoconteúdo da vimentina durante o desenvolvimento sexual é mostrado na figura IV.12. Testículos de ratos de 15, 35 e 45 dias de idade foram pré-incubados e incubados sem ou com  $T_3$  ( $1 \mu\text{M}$ ), a fração citoesquelética enriquecida em FI insolúvel em Triton X-100 foi extraída, analisada em SDS-PAGE, e a imunodeteção da vimentina foi quantificada. Os resultados indicaram que o  $T_3$  aumentou o imunoconteúdo da vimentina insolúvel em tampão de alta força iônica na fase imatura e na fase adulta. Durante a puberdade, o hormônio não produziu qualquer alteração no imunoconteúdo da vimentina.

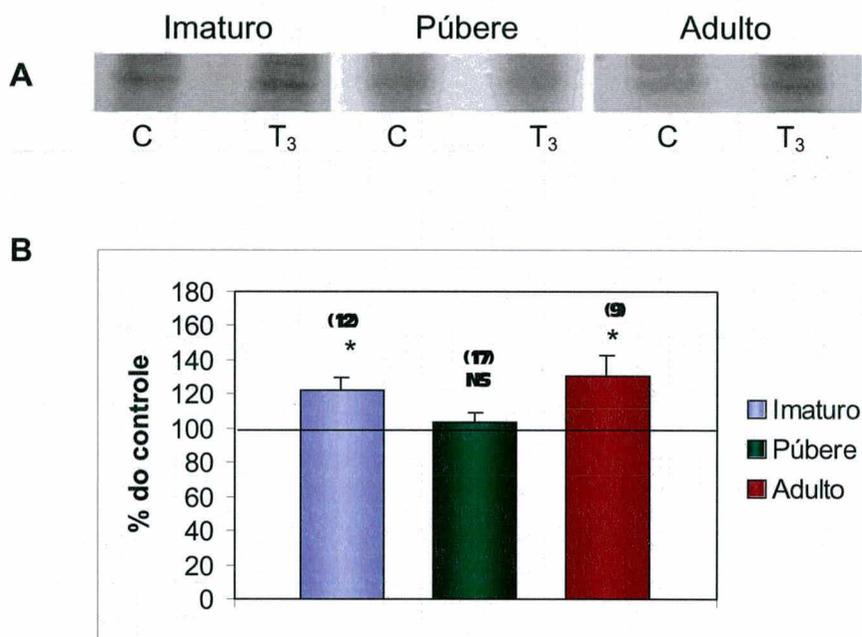


**Figura IV.12.** Efeito do  $T_3$  *in vitro* ( $1 \mu\text{M}$ ) no imunoconteúdo da vimentina em testículos de ratos. (A) Imunorreação representativa do efeito do  $T_3$  no conteúdo da vimentina nas diferentes fases do desenvolvimento sexual. (B) Testículos de ratos imaturos, púberes e adultos foram tratados *in vitro* com  $1 \mu\text{M}$  de  $T_3$ . A fração citoesquelética enriquecida em FI foi extraída, analisada em SDS-PAGE e foi realizada em imunorreação com anticorpo monoclonal anti-vimentina (1:400). Os resultados são a média  $\pm$  E.P.M expressos como porcentagem do controle do número de ratos indicado nos parênteses. \*Significativo para  $p \leq 0,02$ ; \*\* $p \leq 0,001$  como determinado pelo teste ANOVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer.

(—) Controle dos respectivos grupos (100%).

### Fosforilação da vimentina

Similarmente ao que foi encontrado para o imunocnteúdo após o tratamento *in vitro* com  $T_3$  ( $1 \mu\text{M}$ ), este hormônio estimulou a incorporação *in vitro* de  $^{32}\text{P}$  na vimentina de testículos de ratos imaturos e adultos, sem alterar a fosforilação desta proteína nos testículos de ratos púberes, como demonstrado na figura IV.13.



**Figura IV.13.** Efeito do tratamento *in vitro* ( $1 \mu\text{M}$ ) com  $T_3$  na incorporação *in vitro* de  $^{32}\text{P}$  na vimentina em testículos de ratos. A) Autoradiografia representativa da incorporação *in vitro* de  $^{32}\text{P}$  na vimentina insolúvel em Triton X-100 de testículos de ratos imaturos, púberes e adultos tratados *in vitro* com  $T_3$  ( $1 \mu\text{M}$ ). B) Os resultados são a média  $\pm$  E.P.M expressos como porcentagem do controle do número de ratos indicado nos parênteses. \*Significativo para  $p \leq 0,05$  como determinado pelo teste ANOVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. (—) Controle dos respectivos grupos (100%).

## V.DISSCUSSÃO

O mecanismo clássico de ação do T<sub>3</sub> é mediado por receptor nuclear. Entretanto, outras vias de sinais de transdução caracterizadas por respostas rápidas podem ser reguladas por T<sub>3</sub>, sugerindo que este hormônio pode interagir em uma via importante na membrana plasmática (Silva *et al.*, 2001). Os hormônios tireoidianos expressam receptores funcionais nas células de Sertoli, influenciam tanto a esteroidogênese quanto a espermatogênese, agem principalmente durante a fase imatura do desenvolvimento animal, afetam a proliferação da célula de Sertoli e a formação tubular em testículos de ratos, aumentam a síntese protéica, estimulam a captação de aminoácidos e promovem mudanças no potencial de membrana das células de Sertoli (Silva *et al.*, 2002).

Paranko *et al.* (1986), demonstraram que as células de Sertoli de testículos de rato na fase fetal e no início da vida pós-natal apresentam positividade para vimentina e citoqueratina. O desaparecimento pós-natal da citoqueratina está de acordo com a natureza epitelial modificada da célula de Sertoli. O desaparecimento da citoqueratina e a reorganização da vimentina foram observados na célula de Sertoli nas primeiras duas semanas de vida, no período onde ocorrem as principais mudanças na maturação do testículo. Entretanto, pouco se conhece sobre a regulação das proteínas de filamentos intermediários por T<sub>3</sub>. Neste estudo foram realizados experimentos de imunorreação para a vimentina e citoqueratina em três significantes fases do desenvolvimento sexual em ratos eutireoideos e tratados *in vivo* com T<sub>3</sub> (hipertireoidismo induzido) e não foi encontrada positividade para a proteína citoqueratina. Portanto, nestas condições experimentais não foi detectada a citoqueratina utilizando-se o anticorpo anti-Pan citoqueratina clone C-11 (Sigma Chemicals), que detecta as citoqueratinas 4 (59 KDa), 5 (58 KDa), 6 (56 KDa), 8 (52 KDa), 10 (56 KDa), 13 (54 KDa) e 18 (45 KDa) em nenhuma das diluições testadas (1:100, 1:200, 1:400 e 1:800). Devido a isso, procedeu-se o estudo da análise das alterações na vimentina presente na fração citoesquelética enriquecida em FIs.

Os filamentos intermediários estão envolvidos em transdução de sinal em sítios na membrana plasmática regulando atividade de GTPases, condutividade iônica, liberação intracelular de cálcio assim como fosforilação de proteínas (Janmey, 1998).

Neste trabalho, estão descritos a ontogenia do imunociteúdo e da fosforilação da vimentina de testículos de rato durante o desenvolvimento sexual e o efeito *in vivo* e *in vitro* do T<sub>3</sub> através dos modelos experimentais de tratamento *in vivo* e *in vitro* com o hormônio. Em ratos normais demonstrou-se que o imunociteúdo e a atividade do sistema fosforilante associado a vimentina insolúvel em tampão de alta força iônica são regulados durante o desenvolvimento, diminuindo do imaturo para o púbere e aumentando novamente no adulto. Este padrão de imunociteúdo e fosforilação da vimentina em testículos de ratos púberes está de acordo com mudanças nos componentes do citoesqueleto em função da idade, descritas em células de Sertoli de camundongos (Tanemura *et al.*, 1994).

Os hormônios tireoidianos são essenciais para o desenvolvimento funcional do trato reprodutivo (Palmero *et al.*, 1987). O tratamento *in vivo* com 80 ng de T<sub>3</sub>/ Kg de peso corporal durante sete dias consecutivos promoveu um aumento na relação peso da gônada/ peso corporal somente na fase imatura do desenvolvimento testicular. Durante a puberdade e a fase adulta o mesmo tratamento não causou alterações significativas nos pesos testicular e corporal. Estes resultados reforçam que a resposta hormonal é mais dependente do período do desenvolvimento sexual do animal do que da dose de T<sub>3</sub> administrada. Isso confirma o período pré-pubere como a fase crítica da ação hormonal no desenvolvimento testicular, onde coincidentemente, são descritos os sítios de ligação para T<sub>3</sub> e maior funcionalidade dos receptores para os hormônios tireoidianos analisados em vários eventos celulares (Palmero *et al.*, 1995; Janinni *et al.*, 1999).

Segundo Cohen e colaboradores (1989), a administração de L-T<sub>3</sub> em crianças em doses suprafisiológicas promove aumento nos níveis de T<sub>3</sub> com diminuição das concentrações de T<sub>4</sub>. A captação excessiva de iodo pode bloquear a biossíntese de hormônios tireoidianos inibindo as enzimas envolvidas no processo biossintético, resultando em secreção reduzida de T<sub>4</sub> (Fisher, 1996). O modelo experimental do tratamento *in vivo* com T<sub>3</sub> produziu alterações nas concentrações séricas dos hormônios

tireoidianos similar ao esperado em um estado hipertireoideo induzido por T<sub>3</sub> exógeno em animais imaturos e púberes.

Entretanto, nos animais adultos a mesma dose e tempo de tratamento apresentou diminuição dos níveis hormonais sem alterações no TSH. A maturidade dos animais é um dos fatores que caracteriza filtração na atividade das deiodinases, já que, em ratos os níveis de hormônios da tireóide são diminuídos sem, no entanto, alterar os níveis circulantes de TSH. A regulação da secreção de TSH pelos hormônios tireoidianos é demonstrada como sendo mais dependente da concentração de T<sub>3</sub> na pituitária do que das concentrações de T<sub>3</sub> circulantes. Isso é resultado de um aumento na atividade das deiodinases na adenohipófise onde a conversão de T<sub>4</sub> a T<sub>3</sub> é mais eficiente e preserva o controle da secreção de TSH inalterado (Donda & Lemarchand-Béraud, 1989). É importante salientar que a atividade das deiodinases é tecido-específica e é regulada durante a maturação e em disfunções da tireóide, onde pode ocorrer um mecanismo adaptativo, por exemplo, em presença de baixas concentrações de T<sub>3</sub> e conseqüentemente não alterar os níveis plasmáticos de TSH (Donda & Lemarchand-Béraud, 1989). No sistema nervoso central a atividade da deiodinase tipo 2 é aumentada no hipotireoidismo para manter as concentrações de T<sub>3</sub> normais nesse tecido (Darras *et al.*, 1999). Muitos casos também já foram reportados onde a ingestão de excesso de hormônios tireoidianos estava associada com a diminuição das concentrações desses hormônios, e ocasionalmente em níveis normais, onde às vezes os sintomas eram mais severos (Cohen *et al.*, 1989).

O tratamento *in vivo* com T<sub>3</sub> causou um aumento nas concentrações séricas de triacilglicerol nos animais tratados imaturos e púberes em relação aos controles. Segundo Norman & Litwack (1997), o aumento geral do metabolismo basal promovido pelos hormônios tireoidianos, promove um aumento na mobilização lipídica provavelmente para suprir as necessidades de substrato. Nos animais adultos observou-se uma diminuição do triacilglicerol sérico, que pode estar relacionada ao fato das concentrações hormonais apresentarem-se diminuídas nessa idade, já que o efeito dos hormônios tireoidianos nos níveis de lípideos é atribuído as concentrações circulantes do hormônio.

A célula de Sertoli prolifera principalmente na fase fetal e no início da vida pós-natal. Muitos estudos têm demonstrado que os hormônios tireoidianos estão envolvidos e

podem ser os principais fatores que regulam o período de proliferação e a maturação da célula de Sertoli (Majdic *et al.*, 1998; Cooke & Meisami, 1991; Hess *et al.*, 1993). O hipotireoidismo durante a fase neonatal em ratos prolonga o período de proliferação da célula de Sertoli e causa aumento do testículo na fase adulta (Majdic *et al.*, 1998). Além disso, os receptores para hormônios tireoidianos são encontrados em grande quantidade na fase imatura do desenvolvimento sexual (Jannini *et al.*, 1990; Jannini *et al.*, 1994; Jannini *et al.*, 1999). Isso sugere um possível efeito direto dos hormônios tireoidianos no testículo nas primeiras semanas de vida. A partir disso, a análise morfológica foi realizada nos animais controles e tratados *in vivo* com T<sub>3</sub> na fase imatura do desenvolvimento sexual.

A análise morfológica apresentou túbulos seminíferos em estágios cíclicos do epitélio seminífero com o lúmen tubular formado em ambos os grupos estudados, o que indica que o tratamento não promoveu alterações estruturais significativas no epitélio germinativo. Segundo Van Haaster *et al.* (1993), injeções de T<sub>3</sub> durante a vida pós-natal causam o cessamento da proliferação da célula de Sertoli aos 12 dias de idade, enquanto que nos animais normais isso ocorre aos 18 dias de idade. Além disso, o T<sub>3</sub> promove a formação do lúmen tubular que reflete a secreção do fluido testicular e a maturação das células de Sertoli (Russel *et al.*, 1989; Van Haaster *et al.*, 1993).

Nos estudos com microscopia eletrônica observou-se que o tratamento *in vivo* com T<sub>3</sub> 80 µg/Kg de peso corporal durante sete dias apresentou o aparelho de Golgi das células de Sertoli bastante desenvolvido, com vesículas dilatadas, além de vesículas de secreção, refletindo um processamento das proteínas celulares altamente ativo. Foi observada também a presença de polirribossomos e retículo endoplasmático rugoso (RER) em quantidades maiores que nos animais controles. Esses resultados indicam que as células estavam em intensa atividade de síntese e processamento de proteínas. Isso corrobora em parte com os resultados obtidos no aumento das proteínas de filamentos intermediários nos animais submetidos ao tratamento *in vivo* com T<sub>3</sub>, além de indicar que a dose hormonal e o tempo de tratamento não causaram degeneração celular, nem toxicidade ao tecido. Nos túbulos seminíferos dos animais tratados observou-se maior quantidade de gotas de lipídeos dentro e fora das células. Segundo Francavilla *et al.* (1991) e Russel *et al.* (1989), a presença de gotas de lipídeos e o aparecimento do lúmen nos túbulos seminíferos são marcadores da maturação das células de Sertoli em ratos. Os resultados obtidos da análise

morfológica apresentando alterações nos lipídeos, aparelho de Golgi, RER e polirribossomos nas células de Sertoli de ratos tratados estão de acordo com a sugestão de que os hormônios tireoidianos agem diretamente nessa célula e influenciam a maturação (Madjic *et al.*, 1998; Russel *et al.*, 1989; Van Haaster *et ai*, 1993; Palmero *et ai*, 1995).

Além dos estudos morfológicos, foram estudadas as alterações na vimentina presente na fração citoesquelética enriquecida em filamentos intermediários insolúveis em Triton X-100 de testículos de ratos, durante o desenvolvimento sexual. O citoesqueleto regula a mecânica celular, e muitas funções associadas a organelas. As propriedades físicas e químicas do citoesqueleto sugerem que eles podem estar envolvidos na maneira como as informações são transmitidas de regiões da membrana plasmática para estruturas localizadas no citoplasma ou no núcleo da célula (Janmey, 1998).

Neste trabalho encontrou-se um aumento no imunoconteúdo da vimentina insolúvel em Triton X-100 de testículos de ratos imaturos e adultos tratados *in vivo* com T<sub>3</sub> 80 [O-g/Kg de peso corporal durante sete dias consecutivos enquanto nos púberes, não houve diferenças em relação aos controles. Esses resultados indicam que o tratamento *in vivo* com o hormônio interfere com os mecanismos que regulam a formação do filamento de vimentina de acordo com o período de desenvolvimento sexual estudado. Isso também enfatiza a alta sensibilidade dos constituintes do citoesqueleto às alterações hormonais provocadas pelo tratamento *in vivo* com T<sub>3</sub> além de sugerir que estes efeitos podem ser controlados diferentemente durante o desenvolvimento. Os mecanismos responsáveis pelo aumento no imunoconteúdo da vimentina nas fases imatura e adulta são desconhecidos. Muitos fatores regulatórios podem estar envolvidos como um efeito direto na expressão da vimentina causando alterações em atividades enzimáticas envolvendo estímulo da síntese de filamentos intermediários ou diminuição na degradação protéica. Outra possibilidade pode estar relacionada a uma alteração no estado de fosforilação da proteína. É descrito que a fosforilação de filamentos intermediários é inversamente proporcional a capacidade de polimerização. Segundo Lima e colaboradores (1998), em cultura de astrócitos tratada com T<sub>3</sub> observou-se um aumento na expressão de proteínas de FI. *In vivo*, o tratamento com hormônios tireoidianos acelera a transição da vimentina para a GFAP (Paul *et al.*, 1999). Assim, os hormônios tireoidianos afetam a organização dos FI de astrócitos que podem tanto proliferar quanto diferenciarem-se em resposta ao tratamento com T<sub>3</sub>.

A fosforilação compreende um mecanismo molecular de fundamental importância na regulação biológica. A dinâmica entre polimerização e despolimerização das proteínas de FI é regulada por fosforilação, sendo esta uma ferramenta importante para estudar mecanismos envolvidos na regulação dessas proteínas na célula. Assim, para verificar o efeito da fosforilação no aumento da vimentina insolúvel foram realizados os experimentos de incorporação *in vitro* de  $^{32}\text{P}$  ortofosfato na fração citoesquelética insolúvel em Triton X-100 enriquecida em FI de testículos de ratos tratados *in vivo* com  $\text{T}_3$  durante o desenvolvimento sexual. Observou-se um aumento na incorporação de fosfato radioativo na vimentina da fração protéica em testículos de animais imaturos e adultos tratados *in vivo* com  $\text{T}_3$  sem alterar o perfil de fosforilação nos animais púberes. Em astrócitos, os hormônios tireoidianos são responsáveis pelas atividades de síntese protéica e maturação celular associadas à expressão de uma variante fosforilada da vimentina. A fosforilação da vimentina regulada por  $\text{T}_3$  pode determinar a organização intracelular e maturação morfológica de astrócitos de ratos normais e hipotireoideos (Paul *et al.*, 1999). Assim, o aumento da vimentina pode também estar associado a um aumento da forma fosforilada nos períodos de desenvolvimento estudados.

Além disso, o estudo do efeito *in vitro* do  $\text{T}_3$  com incubação *in vitro* demonstrou que quando testículos de ratos foram incubados com 1 p,M de  $\text{T}_3$ , o imunoconteúdo e a fosforilação da vimentina estavam aumentados em testículos de ratos imaturos, inalterados nos púberes e aumentados novamente nos adultos. Isso confirma que o  $\text{T}_3$  desempenha um papel importante na dinâmica do citoesqueleto das células testiculares sendo regulado durante o desenvolvimento e este efeito é dependente da dose, como demonstrado nos estudos *in vitro* (0,1; 1; 10 e 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{T}_3$ ).

Por outro lado, é interessante notar que o tratamento *in vitro* dos testículos de ratos imaturos com diferentes doses de  $\text{T}_3$  induziu efeitos diferentes no imunoconteúdo e na fosforilação *in vitro*. Os resultados demonstraram que a dose de 0,1  $\mu\text{M}$  de  $\text{T}_3$  estimulou significativamente a incorporação *in vitro* de fosfato radioativo na vimentina da fração citoesquelética sem afetar o imunoconteúdo, enquanto a dose de 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{T}_3$  apresentou o efeito oposto. Todavia, as doses intermediárias (1 ou 10  $\mu\text{M}$ ) induziram um aumento na fosforilação *in vitro* assim como no imunoconteúdo da vimentina insolúvel em Triton X-100.

É descrito que a dinâmica do citoesqueleto está diretamente implicada na sobrevivência, diferenciação e proliferação celular. Sinais extracelulares, hormônios e drogas são capazes de induzir as principais alterações na estrutura do citoesqueleto regulando o comportamento celular. Há também muitas evidências indicando a fosforilação de proteínas do citoesqueleto como um importante mediador de sinais de transdução intracelular (Inada *et ai*, 1999).

Observando o efeito *in vitro* do hormônio, parece improvável que o aumento do imunocontéudo da vimentina em testículos de ratos imaturos e adultos esteja relacionado a síntese ou degradação protéica, devido aos ensaios hormonais serem realizados em um curto período e a adição de inibidores de protease ao meio de incubação.

Como o equilíbrio dinâmico entre polimerização e despolimerização das proteínas de FI é regulado por fosforilação tanto *in vivo* quanto *in vitro*, foram analisados os efeitos do T<sub>3</sub> *in vivo* e *in vitro* na fosforilação da vimentina presente na fração citoesquelética enriquecida em FI. Os resultados mostraram que o T<sub>3</sub> induziu a atividade do sistema fosforilante associada com a vimentina em testículos de ratos imaturos e adultos sem afetar esse sistema em testículos púberes em ambos os tratamentos estudados. Estes resultados analisados em conjunto sugerem que durante o desenvolvimento sexual, os mecanismos de regulação hormonal alteram o equilíbrio de polimerização/despolimerização das proteínas de filamentos intermediários nas células testiculares, provavelmente mediando mecanismos de fosforilação e desfosforilação. Isso indica que os filamentos intermediários são altamente dinâmicos, e que contínuas trocas de subunidades de proteínas ocorrem no filamento entre as subunidades solúveis e o filamento polimerizado, atingindo um estado de equilíbrio estável (Inada *et al*, 1999). Entretanto, o mecanismo exato pelo qual esse equilíbrio é rompido pelos tratamentos *in vivo* e *in vitro* com T<sub>3</sub> em testículos de ratos imaturos e púberes ainda precisam ser esclarecidos.

Esses resultados de alterações nos filamentos intermediários em testículos de ratos sugerem os hormônios tireoidianos como moduladores da expressão e/ ou dinâmica desses filamentos nos períodos imaturo e adulto do desenvolvimento sexual.

Recentemente, Jannini e colaboradores (1999) descreveram que há uma ontogenia funcional significativa de várias isoformas de receptores para hormônios

tireoidianos em testículos de rato em desenvolvimento. Esses dados corroboram com os resultados de imunoconteúdo e fosforilação da vimentina regulados por T<sub>3</sub> durante a maturação sexual dos testículos de rato. Nos animais adultos, para o tratamento *in vivo* o efeito pode ser atribuído a um efeito hormonal direto via pituitária. Para o tratamento *in vitro* com T<sub>3</sub>, deve-se excluir essa hipótese de efeito direto no sistema reprodutivo na vida adulta via glândula pituitária (Kirb *et al.*, 1997; Majdic *et al.*, 1998), devido à ação hormonal ocorrer em um período curto de incubação e às condições serem *in vitro*.

O efeito estimulatório do T<sub>3</sub> no imunoconteúdo da vimentina foi acompanhado por um aumento na incorporação *in vitro* de <sup>32</sup>P ortofosfato na vimentina polimerizada. Isso sugere que a fosforilação pode aumentar a estabilidade da vimentina nesse tecido. Aparentemente, esses resultados discordam de trabalhos que descreveram a fosforilação e a desfosforilação como mecanismos regulatórios da polimerização *in vitro* da vimentina (Inagaki *et al.*, 1987). Os autores descrevem que os filamentos de vimentina reconstituídos *in vitro* desestabilizam quando fosforilados por proteína quinase A ou quinase C purificadas. Entretanto, foi descrito por Goto *et al.* (1998) que os sítios de fosforilação responsáveis pela despolimerização da vimentina e outras proteínas de filamentos intermediários estão localizados na extremidade N terminal da subunidade, sugerindo que a fosforilação deste domínio desempenha um papel importante na polimerização da vimentina. Nossa abordagem experimental não nos permite saber se as alterações de fosforilação *in vitro* produzidas pelos modelos experimentais alteram a fosforilação de sítios no C terminal ou no N terminal da vimentina. Todavia, os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com os resultados de Paul *et al.* (1999), que demonstrou que os hormônios tireoidianos aumentam a expressão de formas fosforiladas da vimentina em cultura primária de astrócito de cérebro de ratos, relacionando estes dados com a maturação celular. Maiores investigações serão necessárias para identificar os sítios de fosforilação regulados por T<sub>3</sub> tanto no tratamento *in vivo* por sete dias consecutivos, quanto no tratamento *in vitro*, para que se possa atribuir algumas das diferenças entre esses resultados e aqueles descritos por Goto *et al.* (1998) a diferentes sítios de fosforilação nas subunidades de vimentina.

Estudos *in vitro* revelaram que a fosforilação de proteínas de filamentos intermediários pode ser mediada por diversas quinases, como a proteína quinase A,

proteína quinase C, quinase CaM II e quinase cdc 42. Em estudos preliminares, a atividade da Rho-quinase também induz alterações na estrutura dos filamentos intermediários (Goto *et al.*, 1998). Porém, as quinases de FI que agem *in vivo* ainda não foram identificadas. Identificar essas proteínas quinases envolvidas na fosforilação *in vivo* dos FI também seria de grande importância para se compreender como a reorganização celular dos FI é regulada.

Os nossos resultados demonstraram um perfil dinâmico da vimentina da fração citoesquelética de testículos de ratos subordinado a resposta hormonal com T<sub>3</sub> durante a maturação sexual, enfatizando o complexo envolvimento dos mecanismos de fosforilação neste processo. Entretanto, maiores pesquisas são necessárias para esclarecer os mecanismos deste evento. Presume-se que interferências neste sistema poderiam provavelmente auxiliar num melhor entendimento das ações do T<sub>3</sub> nas células testiculares normais, e podem contribuir, ao menos em parte, para o esclarecimento das disfunções celulares que ocorrem em pacientes com hipo e/ou hipertireoidismo.

O significado funcional da fosforilação dos filamentos intermediários foi revisado por Inagaki *et al.* (1996) e Ku *et al.* (1996). A fosforilação das proteínas de FI aumenta drasticamente durante a mitose em muitas células. Outras funções regulatórias incluem desestabilização e reorganização do filamento, solubilidade, localização em domínios celulares específicos, associação com outras proteínas citoplasmáticas ou associadas a membrana, proteção contra 'stress' fisiológico e mediação de funções celulares específicas (Paul *et al.*, 1999). Consistente com estes dados, os resultados deste estudo sugerem que os hormônios tireoidianos tanto *in vivo* quanto *in vitro* são fatores regulatórios da dinâmica da vimentina insolúvel em Triton X-100 de testículos de ratos e que a fosforilação desempenha um papel fundamental na organização da estrutura do citoesqueleto, podendo ser essencial no processo de maturação celular da célula de Sertoli, assim como ser importante nos processos reprodutivos.

## VI. CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que:

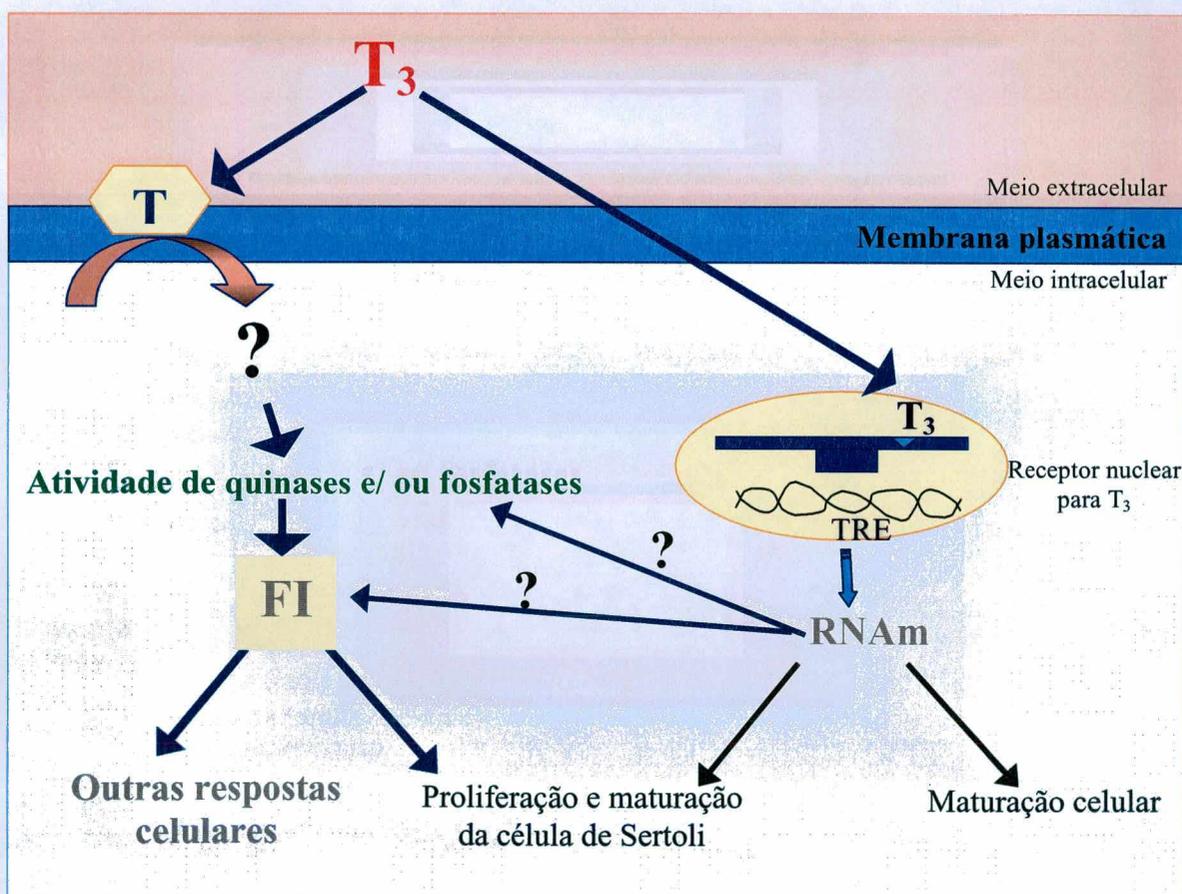
- A vimentina, uma proteína de filamentos intermediários, é expressa em testículos de ratos em todas as fases do desenvolvimento sexual, apresentando alterações quantitativas durante as diferentes fases de maturação.
- O tratamento *in vivo* com o hormônio T<sub>3</sub> produz alterações nos níveis de T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, TSH e triacilglicerol condizentes com um estado de hipertireoidismo induzido.
- O tratamento *in vivo* com T<sub>3</sub> estimula a atividade de síntese e processamento de proteínas nas células de Sertoli e acelera o processo de maturação sexual em túbulos seminíferos de ratos imaturos.
- A dinâmica do equilíbrio entre a fosforilação e o imunoc conteúdo da vimentina de testículos de ratos imaturos é regulada por T<sub>3</sub>.
- O imunoc conteúdo e a fosforilação da vimentina são marcadamente sensíveis às alterações hormonais induzidas por T<sub>3</sub> de forma regulada durante as diferentes fases do desenvolvimento sexual.

### VI.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Substâncias esteróides ou esteróide-relacionadas têm como mecanismo de ação clássico a modulação da expressão gênica e da síntese protéica. Entretanto, ações não genômicas dos esteróides foram demonstradas em diversas espécies e tecidos (Silva *et al.*, 2002).

Muitas questões ainda precisam ser esclarecidas para se conhecer os mecanismos de ação rápida para substâncias esteróide-relacionadas. Recentes avanços consideram que o mesmo ligante hormonal (peptídico ou lipídico) pode ativar concomitantemente ou consecutivamente um receptor associado à membrana e um receptor genômico nuclear clássico (Silva *et al.*, 2002).

Desse modo, a hipótese para o mecanismo de ação do  $T_3$  sobre a vimentina é de que nas células de Sertoli, o  $T_3$  possa influenciar a proliferação e a maturação celular via receptores nucleares modulando a transcrição gênica de diversas proteínas e/ou enzimas envolvidas neste processo, assim como possa agir em sítios de ligação na membrana plasmática ativando vias rápidas de transdução de sinais e modulando a atividade de quinases e/ou fosfatases, que regulam a estrutura, a organização e a funcionalidade dos filamentos intermediários podendo este evento estar também envolvido nos processos de proliferação e maturação celular (figura VI.1).



**Figura VI.1.** Representação esquemática da hipótese do mecanismo de ação do  $T_3$  sobre as proteínas de filamentos intermediários de testículos de ratos. FI = filamentos intermediários;  $\text{T}$  = sítio de ligação para  $T_3$ .

A comunicação entre sistemas de sinalização celulares parece ser um princípio comum que habilita as células a integrar múltiplos sinais do ambiente (Gschwind *et al.*, 2001). Essa comunicação cruzada entre diversas vias de sinalização estimula um novo conceito de transdução e comunicação celular aumentando a capacidade e enriquecendo a variedade de ações hormonais.

O conhecimento dos sítios de ação do T<sub>3</sub> e vias de sinalização podem fornecer futuramente sítios de intervenção terapêutica em prol da fertilidade ou da contracepção. Além disso, estudos adicionais e o desenvolvimento de análogos do T<sub>3</sub> podem revelar ações seletivas contribuindo para o desenvolvimento de novas drogas.

## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERS, K.; FUCHS, E. The molecular biology of intermediate filament proteins. *International Review of Cytology*, v. 134, p.243-279, 1992.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. The cytoskeleton. In: ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J; RAFF, M.; ROBERTS, K. and WATSON, J.D. (eds). *Molecular Biology of the cell*. 3.ed. New York: Garland Publishing, 1994, p.787-847.

AMLANI, S.; VOGL, A.W. Changes in the distribution of microtubules and intermediate filaments in mammalian Sertoli cells during spermatogenesis. *Anatomical Record*, v.220, p.143-160, 1988.

ARAMBEPOLA NK, BUNICK D.; COOKE PS. Thyroid hormone and follicle-stimulating hormone regulate Müllerian-inhibiting substance messenger ribonucleic acid expression in cultured neonatal rat Sertoli cells. *Endocrinology*, v.139, p.4489-4495, 1998.

ARSLAN, M.; WEINBAUER, G.F.; SCHLATT, S.; SHAHAB, M.; NIESCHLAG, E. FSH and testosterone, alone or in combination, initiate testicular growth and increase the number of spermatogonia and Sertoli cells in a juvenile non-human primate (*Macaca Mulatta*). *Journal of Endocrinology*, v.136, p.235-243, 1992.

ASWAD, D.W.; GREENGARD, P.A. Specific substrate from rabbit cerebellum from guanosine 3',5' monophosphate dependent protein kinase II. Kinetic studies on its phosphorylation by guanosine 3',5'-monophosphate-dependent and adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinases. *Journal of Biological Chemistry*, v.256, p.3494-3500, 1981.

BARDIN, C.W.; CHENG, C.Y. MUSTOW, N.A.; GUNSALUS, G.L. The Sertoli cell. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. (eds). *The Physiology of Reproduction*, 2.ed, New York: Raven Press, 1994, p.1291-1332.

BARDIN, W.; PAULSEN, A. The Testes. In: WILSON, J.D.; FOSTER, D.W. *Williams: Textbook of Endocrinology*. 9.ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1998, 1848p.

BJERRUM, O. J.; SHAFER-NIELSEN, C. Buffer system and transfer parameters of semidry electroblotting with an horizontal apparatus. In: DUNN, M. J. *Electrophoresis*, v. 86, Weinheim. VHC Publishers, 1986, p.315.

BUZZARD, JJ; MORRISON, J.R.; O BRYAN, M.K.; SONG, Q.; WREFORD, N.G. Developmental expression of thyroid hormone receptors in the rat testis. *Biology of Reproduction*, v.62, p.664-9, 2000.

CARRAWAY, K.L.; CARRAWAY, C.A.C. An Ultrastructure approach to understanding the cytoskeleton. IN: RICKWOOD, D.; HAMES, B.D. (eds). *The cytoskeleton: A practical Approach*, New York; Oxford University Press, 1992, p. 23-45.

CARREAU, S.; FOUCAULT, P.; DROSDOESKY, M.A. La cellule de Sertoli: Aspects fonctionnels comparés chez le rat, le porc et rhomme. *Annals d'Endocrinologie*, v.55, p.203-220, 1994.

CHOU, Y-H.; HELFAND, B.T.; GOLDMAN, R.D. New horizons in cytoskeletal dynamics: transport of intermediate filaments along microtubule tracks. *Current Opinion in CellBiology*, v.13, p.106-109, 2001.

CHOU, Y-H.; SKALLI, O.; GOLDMAN, R.D. Intermediate Filaments and cytoplasmic networking new connections and more functions. *Current Opinion in Cell Biology*, v.9, p.49-53, 1997.

COHEN, J.H.in.; INGBAR, S.H.; BRAVERMAN, L.E. Thyrotoxicosis due to ingestion of excess thyroid hormone. *Endocrine Reviews*, v.10, p.113-123, 1989.

COHEN, P. The structure and regulation of protein phosphatases. *Annual Review of Biochemistry*, v.58, p.453-508, 1989.

COHEN, P. Signal integration at the levei of protein kinases, protein phosphatases and their substrates. *Trends in Biochemical Sciences*, v.17, p.408-413, 1992.

COOKE, P.S.; MEISAMI, E. Early hypothyroidism in rats causes increased adult testis and reproductive organ size but does not change testosterone leveis. *Endocrinology*, v. 129, p.237-243, 1991.

D'ARMIENTO, M.; JANNINI, E.A. Thyroid hormone action. In: TRONCONE, L.; SHAPIRO, B.; SATTA, M.A.; MONACO, F. (eds): *Thyroid disease: Basic Science, Pathology, Clinicaï and Laboratory Diagnoses*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1992, p.145-154.

DARRAS, V.M.; HUME, R.; VISSER, T.J. Regulation of thyroid hormone metabolism during fetal development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.151, p.37-47, 1999.

DAVIDOFF, M.S.; BREUCKER, H. HOLSTEIN, A.F.; SEIDL, K. Cellular architecture of the lamina própria of human seminiferous tubules. *Cell Tissue Research*, v.262, p.253-261, 1990.

DE FREITAS, M.S.; MATTOS, A.G.; CAMARGO, M.M.; WANNMACHER, C.M.D.; PUREUR, R.P. Effect of phenylalanine and a-methylphenylalanine on in vitro incorporation of <sup>32</sup>P into cytoskeletal cerebral proteins. *Neurochemistry International*, v.4, p.381-385, 1995.

DE-MATTOS, A.G.; CAMARGO, M.M.; DE-FREITAS, M; PUREUR, R.P. Malnutrition increases neurofilament subunits concentration in rat cerebellum. *Journal of Nutrition Biochemistry*, v.4, p.644-650, 1993.

DE-MORAIS, M.C. DE-FREITAS; DE-MATTOS, A.G.; SCHROEDER, N.; ZILLES, A.C.; LISBOA, C.S.F. ARTENI, A.; BARLEM, A.; SCHIERHOLT, R., ZWETSCH, G.; SOUZA, C.A.B.; PUREUR, R.P.; NETTO, C.A.; Effect of brain ischemia on intermediate filaments of rat hippocampus. *Neurochemical Research*, v.21, p.595-602, 1996.

DONDA, A.; LEMARCHAND-BÉRAUD, T. Aging alters activity of 5'-deiodinase in the adenohypophysis, thyroid gland, and liver of the male rat. *Endocrinology*, v. 124, p. 1305-1309, 1989.

DUBOIS, J.D.; DUSSAULT, J.H. Ontogenesis of thyroid hormone in neonatal rat. thyroxine (T<sub>4</sub>) and triiodothyronine (T<sub>3</sub>) production rates. *Endocrinology*, v.101, p. 435-442, 1977.

DYM, M. The male Reproductive System. In: WEISS, L. (ed). *Histology: cell and tissue biology*. 5.ed. New York: Mcmillan Press, Ch.28, 1983, p.1000-1052.

ELSON, E. L. Cellular mechanics as an indicator of cytoskeletal structural and function. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, v.17, p. 397-430, 1988.

ERICKSON, J.E.; OPAL, P.; GOLDMAN, R.D. Intermediate Filaments dynamics. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 4, p. 99-104, 1992.

ERIKSSON, J.E.; GOLDMAN, R.D. Protein phosphatase inhibitors alter cytoskeletal structure and cellular morphology. *Advance Protein Phosphatases*, v.7, p.335-337, 1993.

ESKILD, W.; REE, A.H.; LEVY, F.O.; JAHNSEN, T.; HANSSON, V. Cellular localization of mRNAs for retinoic acid receptor- $\alpha$ , cellular retinoic-binding protein, and germ cell-specific mRNAs. *Biology of Reproduction*, v.44, p.53-61, 1991.

FAWCETT, D.W. Spermatogenesis. IN: BROWDER, L.W; ERICKSON, C.A.; JEFFERY, W.R. *Developmental Biology*. 3.ed. New York: Saunders College Publishing, Ch.2, 1991. p.31.

FAWCETT, D.W. Sistema Reprodutor Masculino. Em: *Tratado de Histologia*. 1 l.ed. México: Interamericana-McGraw-Hill, cap.31, 1993, p.802-857.

FISHER, D. Physiological variations in thyroid hormones: physiological and pathological considerations. *Clinical Chemistry*, v.42, p.135-139, 1996.

FRANCAVILLA, S.; CORDESCHI, G.; PROPERZI, G.; DI CICCO, L.; JANNINI, E.A.; PALMERO, S.; FUGASSA, E.; LORAS, B.; D'ARMIENTO, M. Effect of thyroid hormone on the pre- and post-natal development of the rat testis. *Journal of Endocrinology*, p. 129, p.35-42, 1991.

FRANKE, W.W.; SCHMID, E.; SCHILLER, D.L.; WINTER, S.; JARASCH, E.D.; MOLL, R.; DENK, H; JACKSON, B.W.; ILLMENSEE, K. Differentiation-related expression of proteins of intermediate-size filaments in tissue and culture cells. *Cold Spring Harbor Symposium of Quant Biology*, v.46, p.431-453, 1982.

FRANKE, W.W.; GRUND, C.; SCHMID, E. Intermediate-sized filaments present in Sertoli cells are of the vimentin type. *European Journal of Cell Biology*, v.19, p.269-275, 1979.

FUCHS, E.; CLEVELAND, D.W. A structural scaffolding of Intermediate Filaments in health and disease. *Science*, v.279, p.514-519, 1998.

FUGASSA, E.; PALMERO, S.; GALLO, G. Triiodothyronine decreases the production of androgen-binding protein by rat Sertoli cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.143, p.241-247, 1987.

GOLDMAN, R.D.; CHOU, Y-H.; PRAHLAD, V.; YOON, M. Intermediate Filaments: dynamic processes regulating their assembly, motility, and interactions with other cytoskeletal systems. *The FASEB Journal/Supplement*, v.13, p.5261-5264, 1999.

GOTO, H.; KOSAKO, H.; TANABE, K.; YANAGIDA, M.; SAKURAI, M.; AMANO, M.; KAIBUCHI, K.; INAGAKI, M. Phosphorylation of vimentin by Rho-associated Kinase at a unique amino-terminal site that is specifically phosphorylated during cytokinesis. *Journal of Biological Chemistry*, v.19, p.11728-11736, 1998.

GRAY, H. Anatomy of the human body. In: Lewis, W. H. (ed.) Anatomy of the human body. 20.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 2000, 1396 p.

GRISWOLD, M. Actions of FSH on mammalian Sertoli cells. In: L:D: Russel and M.D. Griswold, (eds.). The Sertoli Cell. Florida: Cache River Press, p.493-508, 1993.

GSCHWIND, A.; ZWICK, E.; PRENZEL, N.; LESERER, M.; ULLRICH, A. Cell communication networks: epidermal growth factor receptor transactivation as the paradigm for interreceptor signal transmission. *Oncogene*, v.20, p.1594-1600, 2001.

HALL, E.S.; HALL, S.J.; BOEKELHEIDE, K. 2,5-hexanedione exposure alters microtubule motor distribution in adult rat testis. *Fundamental and Applied Toxicology*, V.24, p.173-182, 1995.

HANSON, P.L; SCHULMAN, H. Neuronal Ca<sup>v</sup>calmodulin-dependent protein kinases. *Annual Review of Biochemistry*, v.61, p.559-601, 1992.

HENNEMANN, G.; VISSER, T.J. Thyroid hormone synthesis, plasma membrane transport and metabolism. In: WEETMAN, A.P. and GROSSMAN, A (eds). *Handbook of Experimental Pharmacology*, v. 128, *Pharmacotherapeutics of the thyroid Gland*. New York: Springer-Verlag, p.75-117, 1997.

HESS, R.A.; COOKE, P.S.; BUNICK, D.; KIRBY, J.D. Adult testicular enlargement induced by neonatal hypothyroidism is accompanied by increased Sertoli and germ cells numbers. *Endocrinology*, v. 132, p.2607-2613, 1993.

HUNTER, T. Protein kinases and phosphatases: the Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*, v.252, p.1318-1321, 1995.

INADA, H.; TOGASHI, H.; NAKAMURA, Y.; KAIBUCHI, K.; NAGATA, K.; INAGAKI, M. Balance between activities of Rho kinase and type 1 phosphatase modulates turnover of phosphorylation and dynamics of desmin/ vimentin filaments. *Journal of Biological Chemistry*, v.274, p.34932-34939, 1999.

INAGAKI, M., NISHI, Y., NISHIZAWA, K., MATSUYAMA, M.; SATO, C. Site specific phosphorylation induces disassembly of vimentin filaments in vitro. *Nature*, v.328, p.649, 1987.

INAGAKI, M., MATSUYAMA, M., TSUJIMURA, K.; ANDO, S.; TOKUI, T.; TAKAHASHI, T. *et al.* Dynamic property of intermediate filaments: Regulation by phosphorylation. *JBiòAisayí*, v.18, p.481-487, 1996.

INGBER, D. E. Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton. *Journal of Cell Science*, v.104, p.613-627, 1993.

JANMEY, P.A. The cytoskeleton and cell signalling: Component localization and mechanical coupling. *Physiological Review*, v.78, p.763-781, 1998.

JANNINI, E.A.; OLIVIERI, M.; FRANCAVILLA, S.; GULINO, A.; ZIPARO, E.; D'ARMIENTO, M. Ontogenesis of the nuclear 3,5,3'-triiodothyronine receptor in the rat testis. *Endocrinology*, v. 126, p.2521-2526, 1990.

JANNINI, E.A.; DOLCI, S.; ULISSE, S.; NIKODEM, V.M. Developmental regulation of the thyroid hormone receptor alpha 1 mRNA expression in the rat testis. *Molecular Endocrinology*, v.8, p.89-96, 1994.

JANNINI, E.A.; ULISSE, S.; D'ARMIENTO, M. Thyroid hormone and male gonadal function. *Endocrine Reviews*, v.16, p.443-459, 1995.

JANNINI, E.A.; CAROSA, E.; RUCCI, N.; SCREPONI, E.; D'ARMIENTO, M. Ontogeny and regulation of variant thyroid hormone receptor isoforms in developing rat testis. *Journal of Endocrinological Investigation*, v.22, p.843-848, 1999.

JONES, L.; BERNDTSON, W. A quantitative study of Sertoli cell and germ cell populations as related to sexual development and ageing in the stallion. *Biology of Reproduction*, v.35, p.138-148, 1986.

KIRB, J.D.; ARAMBEPOLA, N.; PORKKA-HEISKANEN, T.; KIRB, Y.K.; RHOADS, M.L.; NITTA, H. *et al.* Neonatal hypothyroidism permanently alters follicle stimulating hormone and luteinizing hormone production in the male rat. *Endocrinology*, v. 138, p.2713-2721, 1997.

- KIRKPATRICK, L.L.; SCOTT, T.B. Cytoskeleton of Neurons and Glia. In: SIEGEL, G.J.; AGRANOFF, B.W.; ALBERTS, R.W.; FISHER, S.K.; UHLER, M.D. (eds). *Basic neurochemistry - Molecular cellular and medical aspects*. 6. ed, New York: Lippincott-Raven Publishers Philadelphia, 1999, p.155-173.
- KOBAYASHI, M.; HORIUCHI, R. Action of 3,5,3'-tri-iodothyronine on the synthesis and secretion of major plasma proteins by a human hepatoblastoma cell line (Hep G2). *Journal of Molecular Endocrinology*, v.14, p.227-235, 1995.
- KÖHRLE, J. Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.151, p.103-119, 1999.
- KOSAKO, H.; AMANO, M.; YANAGIDA, M.; TANABE, K.; NISHI, Y.; KAIBICHI, K.; INAGAKI, M. Phosphorylation of Glial Fibrillary Acidic Protein at the Same Sites by Cleavage Fructose Kinase and Rho-associated Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, v.272, p.10333-10336, 1997.
- KU, N.-O.; LIAO, J.; CHOU, C.-F.; OMARY, M.B. Implications of intermediate filament protein phosphorylation. *Cancer Metastasis Review*, v.15, p.429-444, 1996.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature*, v.227, p.680-685, 1970.
- LAZARIDES, E. Intermediate filaments: a chemically heterogeneous, developmentally regulated class of proteins. *Annual Reviews of Biochemistry*, v.51, p.219-250, 1980.
- LAZZAR, M.A. Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocrine Reviews*, v.14, p.184-193, 1993.
- LIMA, F.R.S.; GONÇALVES, N.; GOMES, F.C.A.; DE FREITAS, M.S.; MOURA-NETO, V. Thyroid hormone action on astroglial cells from distinct brain regions during development. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 16, p. 19-27, 1998.
- LONGCOP, C. The male and female reproductive systems in hypothyroidism. In *The Thyroid*, edn 6, ch. 13, p. 1052-1055. Eds. LE Braverman & RD Utiger. Philadelphia; JB Lippincott Company, 1991.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal Biological Chemistry*, v.193, p.265-267, 1951.
- MAJDIC, G.; SNOJ, T.; HORVAT, A.; MRKUN, J.; KOSEC, M.; CESTNIK, V. Higher thyroid hormone levels in neonatal life result in reduced testis volume in postpubertal bulls. *International Journal of Andrology*, v.21, p.352-357, 1998.
- MAJUNDAR, S.S.; BARTKE, A.; STUMPT, W.E. Vitamin D modulates the effects of follicle stimulating hormone on Sertoli cell function and testicular growth in Siberian Hamsters. *Life Sciences*, v.19, p.1479-1486, 1994.

MARTYS, J.L.; HO, C-L; LIEM, R.K.H.; GUNDERSEN, G.G. Intermediate Filaments in motion: Observation of intermediate filaments in cell using green fluorescent protein-vimentin. *Molecular Biology of the Cell*, v.10, p.1289-1295, 1999.

MEANS, A.R.; DEDMAN, J.R.; TASH, J.S.; TINDALL, D.J.; VAN SICKLE, M.; WELSH, M.J. Regulation of the testis Sertoli cell by follicle-stimulating hormone. *Annual Review of Physiology*, v.22, p.59-70, 1980.

MIETTINEN, M.; VIRTANEN, L; TALERMAN, A. Intermediate filament proteins in human testis and testicular germ-cell tumors. *American Journal of Pathology*, v. 120, p.402-410, 1985.

MORETTO, A.B.; MATTOS-DUTRA, A.; ARTENI, N.; MEIRELLES, R.; DE FREITAS, M.S.; NETTO, C.A.; PESSOA-PUREUR, R. Effects of neonatal cerebral hypoxia-ischemia on the in vitro phosphorylation of synapsin I in rat synaptosomes. *Neurochemical Research*, v.24, p.1263-1269, 1999.

MULDER, E.; PETERS, M.J.; VAN BEURDEN, W.M.O.; GALDIERI, M.; ROMMERTS, F.F.G.; JANSZEN, F.H.A.; VAN DER MOLEN, H.J. Androgen receptors in isolated cell preparation obtained from rat testicular tissue. *Journal of Endocrinology*, v.70, p.331-332, 1976.

NAIRN, A.C.; SHENOLIKAR, S. The role of protein phosphatase in synaptic transmission, plasticity and neuronal development. *Current Opinion in Neurobiology*, v.2, p.296-301, 1992.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Cells. In: *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3.ed. New York: Worth Publishers, p.39-52, 2000.

NESTLER, E. J.; GREENGARD, P. Protein phosphorylation and neuronal function. In: *Basic Neurochemistry*. Siegel, G.; Agranoff, B. W.; Albers, R. W.; Molinoff, P. B. eds. Raven Press. New York, p. 449-474, 1994.

NISHIZUKA, Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of PKC. *Science*, v.258, p.601-613, 1992.

NIXON, R.A. Dynamic behavior and organization of cytoskeletal proteins in neurons: reconciling old and new findings. *BioAssays*, v.20, p.798-807, 1998.

NORMAN, A.W.; LITWACK, G. Thyroid Hormones. IN: NORMAN, A.W.; LITWACK, G. (eds.). *Hormones*. 2.ed. San Diego: Academic Press, 1997, p.169-191.

OKABE, S.; MIYASAKA, H.; HIROKAWA, N. Dynamics of the neuronal intermediate filaments. *The Journal of Cell Biology*, v.121, p.375-386, 1993.

ORTH, J.M. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *Anatomical Records*, v.203, p.485-492, 1982.

- PALMERO, S.; LEONE, M.; FUGASSA, E. Hormone responsiveness of Sertoli cells during sexual maturation in the rat. *Pflügers Archives: European Journal of Physiology*, V.410, S9, 1987.
- PALMERO, S.; PRATI, M.; BARRECA, A.; MINUTO, F.; GIORDANO, G.; FUGASSA, E. Thyroid hormone stimulates the production of insulin-like growth factor I (IGF-I) by rat Sertoli cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.68, p.61-65, 1990.
- PALMERO, S.; De MARCO, P.; FUGASSA, E. Thyroid Hormone receptor mRNA expression in Sertoli cells isolated from prepuberal testis. *Journal of Molecular Endocrinology*, v.14, p.131-134, 1995.
- PARANKO, J.; KALLAJOKI, M.; PELLINFFIMI, L.J.; LEHTO, V.P.; VIRTANEM, L. Transient coexpression of cytokeratin and vimentin in differentiating rat Sertoli cells. *Developmental Biology*, v.117, p.35-44, 1986.
- PAUL, S.; GHARAMI, K.; DAS, S.; SARKAR, P.K. Thyroid hormone-induced maturation of astrocytes is associated with the expression of new variants of vimentin and their phosphorylation. *Journal of Neurochemistry*, v.73 p.1964-1972, 1999.
- PEARSE, A.G.E. *Histochemistry, theoretical and applied*. v.1, London: Churchill Livingstone, p.1759, 1968.
- PEDROTTI, B.; ISLAM, K. Dephosphorylated but not phosphorylated microtubule associated protein MAP1B binds to microtubules. *FEBS Letters*, v.388, p.131-133, 1996.
- REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate and high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, v.17, p.208-212, 1963.
- RODRÍGUEZ, A.; ROJAS, M.A.; BUSTOS-OBREGÓN, E.; URQUIETA, B.; REGADERA, J. Distribution of keratins, vimentin and actin in the testis of two South American camelids; vicuna (*Vicugna vicugna*) and Llama (*Lama glama*). An immunohistochemical study. *The Anatomical Record*, v.254, p.330-335, 1999.
- ROGATSCH, B.; JEZEK, D.; HITTMAIR, A.; MIKUZ, G.; FEICHTINGER, H. Expression of vimentin, cytokeratin, and desmin in Sertoli cells of human fetal, cryptorchid, and tumour-adjacent testicular tissue. *Virchows Archives*, v.427, p.497-502, 1996.
- ROMEIS, B. *Guia Formulário de Técnica Histológica. 11. ed.* Barcelona: Labor, 1928.
- ROSS, M.H.; ROMRELL, L.J.; KAYE, G.L. Male reproductive system. In: *Histology: A Text and Atlas*, edn 3, ch. 21. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995, p.636-676.
- ROSTAS, J. A. P.; DUNKLEY, P. R. Multiple forms and distribution of calcium/calmodulin-stimulated protein kinase II in brain. *Journal of Neurochemistry*, v.59, p.1191-1202, 1992.

RUBIN, M.A.; WANNMACHER, C.M.D.; VALENTE, G.B.; CAMARGO, M.M.; PUREUR, R.P. Diminished concentration of the NF-H subunit of neurofilaments in cerebral cortex of rats chronically treated with proline, methylmalonate and phenylalanine plus  $\alpha$ -methylphenylalanine. *Journal Inherited Metabolism Disease*, v. 15, p.252-260, 1992.

RUSSEL, L.D.; BARTKE, A.; GOH, J.C. Postnatal development of the Sertoli cell barrier, tubular lumen and the cytoskeleton of Sertoli and myoid cells in the rat, and their relationship to tubular fluid secretion and flow. *American Journal of Anatomy*, v. 184, p.179-189, 1989.

SANHAI, W.R.; ECKERT, B.S.; YEAGLE, P.L. Altering the State of phosphorylation of rat liver keratin intermediate filaments by ethanol treatment in vivo changes their structure. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1429, p.459-466, 1999.

SASAKI, M.; YAMAMOTO, M.; ARISHIMA, K.; EGUCHI, Y. Effects of follicle-stimulating hormone on intermediate filaments and cell division of Sertoli cells of fetal rat testis in culture. *Journal Veterinary Medicine Sciences*, v.1, p.35-39, 1998.

SCHLATT, S., MEINHARDT, A.; NIESCHLAG, E. Paracrine regulation of cellular interactions in the testis: factors in search of a function. *European Journal of Endocrinology*, v.137, p.107-117, 1997.

SEGAL, J.; HARDIMAN, J.; INGBAR, S.H. Stimulation of calcium-ATPase activity by 3,5,3'-tri-iodothyronine in rat thymocyte plasma membranes. *Biochemistry Journal*, v.261, p.749-754, 1989.

SEGAL, J. In vivo effect of 3,5,3'-triiodothyronine on calcium uptake in several tissues in the rat: Evidence for a physiological role for calcium as the first messenger for the prompt action of the thyroid hormone at the level of the plasma membrane. *Endocrinology*, v. 127, p.17-24, 1990.

SERTOLI, E. Deiresistema di particolari cellule ramificate nei canacoli seminiferi del testicolo umano. *II Morgani*, v.1, p.31-39, 1865.

SILVA, F.R.M.B.; LEITE, L.D.; BARRETO, K.P.; D'AGOSTINI, C.; ZAMONER, A. Effect of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine on amino acid accumulation and membrane potential in SertoU cells of the rat testis. *Life Sciences*, v.69, p.977-986, 2001.

SILVA, F.R.M.B.; LEITE, L.D.; WASSERMAN, G.F. Rapid Signal Transduction in Sertoli Cells. *European Journal of Endocrinology*, v. 147, p. 1-9, 2002

SIMORANGKIR, D.; WREFORD, N.; DE KRETZER, D. Impaired germ cell development in testes of immature rats with neonatal hypothyroidism. *Journal of Andrology*, v.18, p.186-193, 1997.

SKINNER, M.K. Cell-cell interactions in the testis. *Endocrinology Reviews*, v.12, p.45-68, 1991.

SKINNER, M.K.; GRISWOLD, M.D. Secretion of testicular transferrin by cultured Sertoli cells is regulated by hormones and retinoids. *Biology of Reproduction*, w.21, p.211-221, 1982.

SHELANSKI, M. L.; FRAPPIER, T.; GEORGGIFF, I.; TROY, C.; MELLADO, W. Cytoskeletons of central and peripheral neurons. *Journal of Neurological Sciences*, v.124, p.33-37, 1994.

SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, W.G.: *Correlation. In: Statistical Methods*. The Iowa State University Press, Ames, p.172-195, 1973.

SPENCER, V.A.; COUTTS, A.S.; SAMUEL, S.K.; MURPHY, L.C.; DAVDE, J.R. Estrogen regulates the association of intermediate filament proteins with nuclear DNA in human breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, v.273, p.29093-29097, 1998.

SPRUILL, W.A.; ZYSK, J.R.; TRES, L.L.; KIERSZENBAUM, A.L. Calcium/ calmodulin-dependent phosphorylation of vimentina in rat Sertoli cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, v.80, p.760-764, 1983a.

SPRUILL, W.A.; STEINER, A.L.; TRES, L.L.; KIERSZENBAUM, A.L. Follicle-stimulating hormone-dependent phosphorylation of vimentina in cultures of rat Sertoli cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, v.80, p.993-997, 1983b.

STEINERT, P. M.; ROOP, D. R. Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Annual Review of Biochemistry*, v.57, p.593-625, 1988.

STEINBERGER, A.; STEINBERGER, E. Replication pattern of Sertoli cells in maturing rat testis in vivo and in organ culture. *Biology of Reproduction*, v.4, p.84-87, 1971.

STEINBERGER, E.; STEINBERGER, A. Hormonal control of spermatogenesis. In: DE GROOT, L.J. (ed), Philadelphia: *Endocrinology*, v.3, 1989, p.2132-2136.

STEWART, M. Intermediate filament structure and assembly. *Current Opinion of Cell Biology*, V.5, p.3-11, 1993.

STOSIEK, P.; KASPER, M.; KARSTEN, V. Expression of cytokeratins 8 and 18 in human Sertoli cells of immature and atrophic seminiferous tubules. *Differentiation*, v.43, p.66-70, 1990.

STRACK, S.; BARBAN, M.A.; WADZINSKI, B.E.; COLBRAN, R.J. Differential inactivation of postsynaptic density-associated and soluble Ca<sup>2+</sup>/ calmodulin-dependent protein kinase II by protein phosphatase 1 and 2A. *Journal of Neurochemistry*, v.68, p.2119-2128, 1997.

TANEMURA, K.; KUROHMARU, M.; KURAMOTO, K.; MATSUMOTO, M.; HAYASHI, Y. Age-related changes in cytoskeletal components of the BDF1 mouse Sertoli cell. *Tissue and Cell*, v.26, p.447-455, 1994.

TRESKA, L.C.; ULRICH, G.; AUNIS, D. Differences in vimentina distribution in glial cells in culture revealed with an antibody against a phosphorilated epitope. *International Journal of Development Neuroscience*, v.11, p.739-753, 1993.

ULISSE, S.; JANNINI, E.A.; PEPE, M.; De MATTEIS, S.; D'ARMIENTO, M. Thyroid hormone stimulates glucose transport and GLUT1 mRNA in rat Sertoli cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.87, p.131-137, 1992.

VACHERET, N. *Histologie fonctionnelle des organes*. Lyon: Université Claude Bernard, 2000.

VAN DER GEYTEN, S.; SANDERS, J.P.; KAPTEIN, E.; DARRAS, V.M.; KÜHN, E.R.; LEONARD, J.L.; VISSER, T.J. Expression of chicken hepatic type I and type III iodothyronine deiodinases during embryonic development. *Endocrinology*, v.138, p.5144-5152, 1997.

VAN DOORN, J.; VAN DER HEIDE, D.; ROELFEMA, F. Sources and quantity of 3,5,3'-triiodothyronine in several tissues of the rat. *Journal of Clinical Investigation*, v.72, p.1778-1792, 1983.

VAN HAASTER, L.H.; DE JONG, F.H.; DOCTER, R. and DE ROOU, D.G. 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*, v.133, p.755-760, 1993.

VINADÉ, L.; GONÇALVES, C.A.; WOFCHUK, S.; GOTTFRIED, C. and RODNIGHT, R. Evidence for a role for calcium ions in the dephosphorilation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in immature hippocampal slices and in astrocyte cultures from the rat. *Developmental Brain Research*, v.104, p.11-17, 1997.

VIRTANEN, L.; LEHTO, V.-P.; LEHTONEN, E.; VARTIO, T.; STENMAN, S.; KURKI, P.; WAGER, O.; SMALL, J.V.; DAHL, D.; BADLEY, R.A. Expression of intermediate filaments in culture cells. *Journal of Cell Science*, v.50, p.45-63, 1981.

VOGL, A.W. Distribution and function of organized concentrations of actin filaments in mammalian spermatogenic cells and Sertoli cells. *International Review Cytology*, v.119, p.1-56, 1989.

WALLAS, S. L.; GREENGARD, P. Protein phosphorylation and neuronal function. *Pharmacological Reviews*, v.43, p.299-349, 1991.

WASSERMANN, G.F.; SILVA, F.R.M.B.; GRILLO, M.L. Role of microtubules and protein synthesis on the stimulatory action of FSH on amino acid uptake in rat testes. *Medical Science Research*, v.17, p.737-738, 1989.

WATSON, M.L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, v.4, p.475-478, 1958.

WRUTNIAK, C.; ROCHARD, P.; CASAS, F.; FRAYSSE, A.; CHARRIER, J.; CABELLO, G. Physiological importance of the T<sub>3</sub> mitochondrial pathway. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.839, p.93-100, 1998.

WRUTNIAK-CABELLO, C.; CASAS, F.; CABELLO, G. Thyroid hormone action in mitochondria. *Journal of Molecular Endocrinology*, v.26, p.67-77, 2001.

## ANEXOS

### ARTIGO 1.

Trabalho publicado em tema conexo durante a realização desta dissertação.

SILVA, F.R.M.B.; LEITE, L.D.; BARRETO, K.P.; D'AGOSTINI, C.; ZAMONER, A. Effect of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine on amino acid accumulation and membrane potential in Sertoli cells of the rat testis. *Life Sciences*, v.69, p. 977-986, 2001.

### ARTIGO 2.

Trabalho submetido para publicação

ZAMONER, A.; PESSOA-PUREUR, R.; SILVA, F.R.M.B. Acute effect of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine on vimentin during sexual development of rat testis. *Cell & Tissue Research*.