

Dedico este trabalho aos meus pais, Rui Menegaz e Maria de Lourdes da Silveira Menegaz, que apesar da distância, sempre estiveram presentes, me apoiando e incentivando em todos os momentos da minha vida.

Agradecimento especial

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Fátima Regina Mena Barreto Silva, pela orientação onipresente, pelos inúmeros ensinamentos, pelo incentivo à pesquisa, pela paciência, dedicação, ajuda, amizade, compreensão e pela confiança depositada em mim desde o início deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À minha co-orientadora Prof^ª. Dr^ª. Laura Difini Leite, por ter sempre contribuído no meu crescimento e amadurecimento acadêmico e pessoal, bem como em toda realização deste trabalho.

Às minhas colegas do laboratório de “Hormônios & Transduções de Sinais”, Cinira Fandaruff, Karine Volpato, Ariane Zamoner, Ana Paula Jorge, Luiza Cazarolli, Csele Van Sand e Carine Royer, por toda ajuda concedida na realização deste trabalho.

Aos meus colegas do Laboratório de Eletrofisiologia, pela colaboração, paciência, empenho e bom-humor nas pesquisas eletrofisiológicas.

Aos meus irmãos Débora Menegaz, Diogo e Daniel da Silveira Menegaz, por toda força, apoio e amizade.

À amiga e colega Cintia Lhullier, que esteve sempre presente do início ao fim deste mestrado, pela companhia, amizade, ajuda e disponibilidade em ensinar as ferramentas da pesquisa.

À amiga Rudinéia Deon, pela parceria, pelos ensinamentos de informática e por todo o apoio concedido na finalização deste trabalho.

Ao departamento de Farmacologia, especialmente ao professor Prof. Dr. João Batista Calixto, por conceder o uso do Espectrômetro de cintilação.

À CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

| | |
|--|--------------|
| LISTA DE FIGURAS..... | xi |
| LISTA DE TABELAS..... | xiii |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | xv |
| RESUMO..... | xvii |
| ABSTRACT..... | xviii |
| | |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| | |
| 1.1. SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO..... | 1 |
| 1.1.1. Testículo..... | 1 |
| 1.1.1.1. Estrutura e regulação funcional do testículo..... | 1 |
| 1.1.1.2. Eixo Hipotálamo-Hipófise-Tireóide..... | 2 |
| | |
| 1.2. CÉLULA DE SERTOLI..... | 3 |
| 1.2.1. Estrutura das células de Sertoli..... | 3 |
| 1.2.2. Regulação funcional das células de Sertoli..... | 4 |
| | |
| 1.3. HORMÔNIOS TIREOIDEOS..... | 5 |
| 1.3.1. Produção e secreção de hormônios tireoideos..... | 5 |
| 1.3.2. Hormônios tireoideos e atividade biológica..... | 5 |
| 1.3.3. Hormônios tireoideos e células de Sertoli..... | 6 |
| | |
| 1.4. MECANISMO DE AÇÃO HORMONAL..... | 6 |
| 1.4.1. Mecanismo de ação clássico de hormônios tireoideos..... | 7 |
| 1.4.2. Mecanismo de ação hormonal não-genômico de hormônios tireoideos..... | 8 |
| 1.4.2.1. Mecanismo de ação hormonal não-genômico de hormônios tireoideos e esteroides em células de sertoli..... | 12 |

| | |
|--|-----------|
| 1.5. TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS..... | 13 |
| 1.5.1. Princípios do transporte através da membrana..... | 14 |
| 1.5.2. Considerações gerais do transporte de aminoácidos..... | 16 |
| 1.5.3. Sistemas de transporte de aminoácidos..... | 16 |
| 1.5.3.1. Sistema "A" de transporte de aminoácidos..... | 17 |
| 1.5.4. Regulação hormonal do transporte de aminoácidos em células de Sertoli.. | 19 |
| | |
| 1.6. ELETROFISIOLOGIA..... | 20 |
| 1.6.1. Princípios gerais sobre registros intracelulares..... | 20 |
| 1.6.2. Canais iônicos através da membrana celular..... | 21 |
| 1.6.3. Canais de potássio..... | 21 |
| 1.6.3.1. Canais de potássio dependentes da voltagem..... | 22 |
| 1.6.3.2. Canais de potássio dependentes de cálcio..... | 22 |
| 1.6.3.3. Canais de potássio dependentes de ATP..... | 23 |
| 1.6.4. Canais de cálcio..... | 23 |
| 1.6.4.1. Canais de cálcio dependentes da voltagem (CCDV) | 24 |
| | |
| 2. JUSTIFICATIVA..... | 25 |
| | |
| 3. OBJETIVOS..... | 26 |
| 3.1. Objetivo geral..... | 26 |
| 3.2. Objetivos específicos..... | 26 |
| | |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 27 |
| 4.1. Materiais..... | 27 |
| 4.1.1. Animais..... | 27 |
| 4.1.2. Soluções utilizadas..... | 27 |
| 4.1.3. Substâncias utilizadas..... | 29 |
| 4.1.3.1. Verapamil..... | 29 |
| 4.1.3.2. Tolbutamida..... | 29 |
| 4.1.3.3. Apamina..... | 29 |

| | |
|---|-----------|
| 4.1.3.4. Tetraetilamônio..... | 29 |
| 4.1.3.5. Ciclo-heximida..... | 30 |
| 4.1.3.6. Hormônios 3,5,3'-triiodo-L-tironina (T ₃) | 30 |
| 4.1.3.7. Tiroxina (T ₄) | 30 |
| 4.1.3.8. Ácido tricloroacético (TCA) | 30 |
| 4.1.3.9. Líquido de cintilação..... | 30 |
| 4.1.4. Substâncias radioativas..... | 30 |
| 4.1.4.1. Aminoácido [¹⁴ C]-MeAIB..... | 30 |
| 4.1.4.2. L-[U-(¹⁴ C) Leucina - 9[¹⁴ C]-leucina) | 31 |
| 4.2. Métodos..... | 31 |
| 4.2.1. Transporte de Aminoácidos e Síntese de Proteínas..... | 31 |
| 4.2.2.1. Transporte de aminoácidos..... | 31 |
| 4.2.2.2. Síntese de proteínas..... | 32 |
| 4.2.3. Eletrofisiologia..... | 33 |
| 4.2.3.1. Preparação dos túbulos seminíferos..... | 33 |
| 4.2.3.2. Preparação do microeletrodo..... | 33 |
| 4.2.3.3. Administração de fármacos..... | 36 |
| 4.2.4. Análise estatística..... | 36 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 37 |
| 5.1. PARTE I: TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS E SÍNTESE DE PROTEÍNAS..... | 37 |
| 5.1.1. Curva dose-resposta dos hormônios tireoideos no transporte de [¹⁴ C]-MeAIB em testículos de ratos imaturos..... | 37 |
| 5.1.2. Estudo da síntese protéica em testículos de ratos imaturos..... | 41 |
| 5.1.2.1. Curva de tempo da síntese protéica basal em testículos de ratos imaturos..... | 41 |
| 5.1.2.2. Efeito da ciclo-heximida na inibição da síntese de proteínas em testículos de ratos imaturos..... | 42 |

| | |
|---|-----------|
| 5.1.2.3. Efeito dos hormônios T_4 e T_3 na síntese protéica em testículos de ratos imaturos..... | 43 |
| 5.1.3. Efeito dos hormônios tireoideos no transporte de aminoácidos na presença de ciclo-heximida..... | 46 |
| 5.1.3.1. Efeito da ciclo-heximida na ação estimulatória do hormônio T_4 (10^{-9} M) no transporte de [14 C]-MeAIB em testículos de ratos imaturos..... | 46 |
| 5.1.3.2. Efeito da ciclo-heximida na ação estimulatória do hormônio T_4 (10^{-6} M) no transporte de [14 C]-MeAIB em testículos de ratos imaturos..... | 48 |
| 5.1.3.3. Efeito da ciclo-heximida na ação estimulatória do hormônio T_3 (10^{-6} M) no transporte de [14 C]-MeAIB em testículos de ratos imaturos..... | 49 |
| 5.2. PARTE II: ELETROFISIOLOGIA..... | 52 |
| 5.2.1. Estudos eletrofisiológicos dos hormônios tireoideos no potencial de repouso de células de Sertoli..... | 52 |
| 5.2.2. Características elétricas basais das células de Sertoli..... | 52 |
| 5.2.3. Efeitos eletrofisiológicos no potencial de repouso de células de Sertoli..... | 53 |
| 5.2.4. Efeito hiperpolarizante do T_3 e do T_4 (10^{-6} M) no potencial de repouso de células de Sertoli..... | 54 |
| 5.2.5. Curva dose-resposta do hormônio T_4 no potencial de repouso de células de Sertoli..... | 56 |
| 5.3. Envolvimento dos canais de potássio no mecanismo de ação hiperpolarizante dos hormônios tireoideos..... | 57 |
| 5.3.1. Curva dose-resposta do tetraetilamonio (TEA) no potencial de repouso de células de Sertoli..... | 58 |
| 5.3.2. Efeito do TEA na ação hiperpolarizante dos hormônios T_4 e T_3 no potencial de repouso de células de Sertoli..... | 59 |
| 5.3.3. Efeito da tolbutamida na ação hiperpolarizante dos hormônios T_4 e T_3 no potencial de repouso de células de Sertoli..... | 61 |

| | |
|---|-----------|
| 5.3.4. Curva dose-resposta da apamina no potencial de repouso de células de Sertoli..... | 64 |
| 5.3.5. Efeito da apamina na ação hiperpolarizante do hormônio T ₄ no potencial de repouso de células de Sertoli..... | 64 |
| 5.4. Envolvimento dos canais de cálcio dependentes da voltagem do tipo L no mecanismo de ação hiperpolarizante do hormônio T ₃ | 66 |
| 5.4.1. Efeito do verapamil na ação hiperpolarizante do hormônio T ₃ no potencial de repouso de células de Sertoli..... | 67 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 71 |
| 7. PERSPECTIVAS..... | 72 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 73 |
| 9. ANEXOS..... | 91 |
| 9.1. Aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais (CEUA) | 91 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Representação esquemática do sistema reprodutor masculino..... | 1 |
| Figura 2 - Mecanismo de ação hormonal..... | 7 |
| Figura 3 - Disposição da câmara de perfusão e do microeletrodo para o registro intracelular..... | 35 |
| Figura 4 - Grupo de túbulos seminíferos seguros por uma tela e visualizados no microscópio invertido..... | 35 |
| Figura 5 - Efeito comparativo do T_4 e do T_3 no estímulo da captação de [^{14}C]-MeAIB em testículos de ratos imaturos..... | 39 |
| Figura 6 - Síntese protéica basal em função do tempo em testículos de ratos imaturos..... | 42 |
| Figura 7 - Efeito da ciclo-heximida na inibição da síntese de proteínas em testículos de ratos imaturos..... | 43 |
| Figura 8 - Efeito dos hormônios T_4 e T_3 na síntese protéica em testículos de ratos imaturos..... | 44 |
| Figura 9 - Efeito da ciclo-heximida na ação estimulatória do hormônio T_4 (10^{-9} M) no transporte de [^{14}C]-MeAIB em testículos de ratos imaturos..... | 47 |
| Figura 10 - Efeito da ciclo-heximida na ação estimulatória do hormônio T_4 (10^{-6} M) no transporte de [^{14}C]-MeAIB em testículos de ratos imaturos..... | 48 |
| Figura 11 - Efeito da ciclo-heximida na ação estimulatória do hormônio T_3 (10^{-6} M) no transporte de [^{14}C]-MeAIB em testículos de ratos imaturos..... | 50 |
| Figura 12 - Efeitos eletrofisiológicos no potencial de repouso de células de Sertoli..... | 53 |
| Figura 13 - Efeito hiperpolarizante do T_4 e do T_3 (10^{-6} M) no potencial de repouso de células de Sertoli..... | 55 |
| Figura 14 - Curva dose-resposta do hormônio T_4 no potencial de repouso de células de Sertoli..... | 57 |
| Figura 15 - Curva dose-resposta do TEA no potencial de repouso de células de Sertoli..... | 59 |

| | |
|---|----|
| Figura 16 - Efeito do TEA na ação hiperpolarizante do hormônio T ₄ e T ₃ no potencial de repouso de células de Sertoli..... | 60 |
| Figura 17 - Efeito da tolbutamida ($2,5 \times 10^{-4}$ M) na ação hiperpolarizante do T ₃ (10^{-7} M) no potencial de repouso de células de Sertoli..... | 63 |
| Figura 18 - Curva dose-resposta da apamina no potencial de repouso de células de Sertoli..... | 65 |
| Figura 19 - Efeito da apamina (1×10^{-6} M) na ação hiperpolarizante do hormônio T ₄ no potencial de repouso de células de Sertoli..... | 66 |
| Figura 20 - Efeito do verapamil ($0,5 \times 10^{-4}$ M) na ação hiperpolarizante do T ₃ (10^{-7} M) no potencial de repouso de células de Sertoli..... | 68 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Soluções estoque para o preparo do KRb..... | 28 |
| Tabela 2 - Concentrações iônicas do KRb no líquido intra e extracelular..... | 28 |
| Tabela 3 - Curva dose-resposta do T ₄ e do T ₃ na captação de [¹⁴ C]-MeAIB em testículos de ratos imaturos..... | 38 |
| Tabela 4 - Síntese protéica basal em testículos de ratos imaturos..... | 41 |
| Tabela 5 - Efeito da ciclo-heximida na inibição da síntese de proteínas testículos de ratos imaturos..... | 43 |
| Tabela 6 - Efeito dos hormônios T ₄ e T ₃ na síntese protéica em testículos de ratos imaturos..... | 44 |
| Tabela 7 - Efeito da ciclo-heximida na ação estimulatória do hormônio T ₄ (10 ⁻⁹ M) no transporte de [¹⁴ C]-MeAIB em testículos de ratos imaturos..... | 47 |
| Tabela 8 - Efeito da ciclo-heximida na ação estimulatória do hormônio T ₄ (10 ⁻⁶ M) no transporte de [¹⁴ C]-MeAIB em testículos de ratos imaturos..... | 48 |
| Tabela 9 - Efeito da ciclo-heximida na ação estimulatória do hormônio T ₃ (10 ⁻⁶ M) no transporte de [¹⁴ C]-MeAIB em testículos de ratos imaturos..... | 50 |
| Tabela 10 - Efeito hiperpolarizante do T ₄ e do T ₃ no potencial de repouso de células de Sertoli..... | 54 |
| Tabela 11 - Curva dose-resposta do hormônio T ₄ no potencial de repouso de células de Sertoli..... | 56 |
| Tabela 12 - Curva dose-resposta do TEA no potencial de repouso de células de Sertoli..... | 58 |
| Tabela 13 - Efeito do TEA na ação hiperpolarizante do hormônio T ₄ e T ₃ no potencial de repouso de células de Sertoli..... | 60 |
| Tabela 14 - Efeito da tolbutamida (2,5 x 10 ⁻⁴ M) na ação hiperpolarizante do T ₃ (10 ⁻⁷ M) no potencial de repouso de células de Sertoli..... | 62 |
| Tabela 15 - Curva dose-resposta da apamina no potencial de repouso de células de Sertoli..... | 64 |
| Tabela 16 - Efeito da apamina (1 x 10 ⁻⁶ M) na ação hiperpolarizante do hormônio T ₄ no potencial de repouso de células de Sertoli..... | 65 |

| | |
|--|----|
| Tabela 17 - Efeito do verapamil ($0,5 \times 10^{-4}$ M) na ação hiperpolarizante do T_3 (10^{-7} M) no potencial de repouso de células de Sertoli..... | 67 |
|--|----|

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---|--|
| [¹⁴ C] leucina | L – [U – (¹⁴ C)] Leucina |
| [Ca ⁺⁺] _i | cálcio intracelular |
| ABP | proteína ligadora de andrógeno |
| ADN | ácido desoxirribonucléico |
| ADP | adenosina difosfato |
| AMPc | adenosina monofosfato cíclico |
| ATP | adenosina trifosfato |
| BK | canais de K ⁺ ativados por Ca ⁺⁺ de alta condutância |
| CCDV | canais de cálcio dependentes da voltagem |
| cpm | contas por minuto |
| DAG | diacilglicerol |
| DMSO | dimetilsulfóxido |
| Em | potencial de repouso |
| FSH | hormônio folículo estimulante |
| GH | hormônio do crescimento |
| GnRH | hormônio liberador de gonadotrofinas hipotalâmico |
| IFN | interferon gama humano |
| IGF-I | fator-I de crescimento semelhante à insulina-I |
| IP ₃ | inositol trifosfato |
| K ⁺ _{Ca²⁺} | canais de potássio ativados por cálcio |
| K _{ATP} | canais de K ⁺ dependentes de ATP |
| KR-b | Krebs Ringer-bicarbonato |
| Kv | canais de K ⁺ dependentes da voltagem |
| LH | hormônio luteinizante |
| MAPK | proteína cinase ativada por mitógeno |
| MEK | proteína cinase cinase ativada por mitógeno |
| PI | fosfoinositol |
| PKA | proteína cinase A |

| | |
|-----------------|---|
| PKC | proteína cinase C |
| PLC | fosfolipase C |
| rT ₃ | 3,5',3-triiodo-L-tironina reverso |
| SNC | sistema nervoso central |
| T/M | relação tecido meio |
| T ₃ | 3,5,3'-triiodo-L-tironina |
| T ₄ | tiroxina |
| TBG | globulina de ligação de tiroxina |
| TCA | ácido tricloroacético |
| TEA | tetraetilamônio |
| TREs | elementos responsivos ao hormônio tireoideo |
| TRH | hormônio liberador de tireotrofina |
| TSH | hormônio estimulante da tireóide |
| α -AIB | ácido α-aminoisobutírico |
| α -MeAIB | ácido α -metilaminoisobutírico |

RESUMO

Os hormônios tireoideos classicamente atuam através da ligação com receptores nucleares. No entanto, estas iodotironinas também podem atuar por mecanismos não-genômicos ou extranucleares sinalizando novas vias de regulação celular. O objetivo deste estudo foi investigar o envolvimento da síntese de proteínas na ação estimulatória dos hormônios tireoideos no transporte de aminoácidos e caracterizar os canais de potássio envolvidos no efeito hiperpolarizante destes hormônios em células de Sertoli de testículos de ratos imaturos. O sistema "A" de transporte de aminoácidos e a técnica eletrofisiológica são metodologias utilizadas neste trabalho para os estudos moleculares de hormônios e fármacos em ensaios biológicos *in vitro*. Recentemente foi demonstrado que o T₃ estimula o transporte de aminoácidos e induz uma hiperpolarização no potencial de repouso de células de Sertoli de testículos de ratos imaturos. Os resultados do presente trabalho demonstraram que o T₄ (tiroxina) estimula o transporte do aminoácido neutro [¹⁴C]-MeAIB e induz uma hiperpolarização no potencial de repouso de células de Sertoli, assim como demonstrado anteriormente pelo hormônio T₃. O T₄ estimulou o transporte de [¹⁴C]-MeAIB numa faixa de concentração mil vezes menor do que o melhor estímulo observado para o T₃ e a ação estimulatória do T₄ no transporte de aminoácidos não foi alterada com a síntese protéica inibida por ciclo-heximida. Já, para o T₃, o efeito estimulatório no transporte de aminoácidos foi parcialmente inibido com a síntese protéica previamente bloqueada, sugerindo que este hormônio necessita da síntese protéica ativa para regular eficientemente esta ação. Nos estudos eletrofisiológicos, o T₄ demonstrou um efeito hiperpolarizante nas células de Sertoli menor quando comparado com o T₃. O efeito hiperpolarizante do T₃ no potencial de repouso das células de Sertoli foi totalmente inibido pelo verapamil e parcialmente inibido por tolbutamida, indicando o envolvimento de canais de cálcio dependentes da voltagem e de canais de K⁺_{ATP}, respectivamente, neste mecanismo. Na presença de TEA, o efeito hiperpolarizante do T₄ e do T₃ no potencial de repouso das células de Sertoli foi totalmente inibido, caracterizando o envolvimento de canais de K⁺ dependentes da voltagem nesse mecanismo. Na presença de apamina, o efeito hiperpolarizante do T₄ foi totalmente bloqueado, caracterizando o envolvimento de canais de K⁺ dependentes de Ca⁺⁺ neste mecanismo. Destes resultados podemos concluir que o T₄ e o T₃ estimulam o transporte de aminoácidos por mecanismos diferentes, uma vez que a ação estimulatória do T₄ no transporte de aminoácidos é mais potente e independe da síntese protéica ativa.

ABSTRACT

Study of signal transduction of thyroid hormones in the amino acid transport: non-genomic pathway

Thyroid hormones are essential for normal development, growth, cell differentiation and metabolism. Sertoli cells provide the microenvironment and cytoarchitectural support necessary for the process of spermatogenesis and have a central role in male sex determination. Thyroid hormones stimulate methylaminoisobutyric acid accumulation and change membrane potential in Sertoli cells. The aim of this study was to investigate the involvement of protein synthesis on the stimulatory action of thyroid hormones on neutral amino acid accumulation and characterize the K^+ currents involved in the hyperpolarizing effect of thyroid hormones in immature rat testes. For the amino acid uptake and protein synthesis, 11 day-old rat testes were pre-incubated and incubated in Krebs Ringer-bicarbonate (KRb) buffer at 32 °C, pH 7.4 and gassed with $O_2:CO_2$ (95:5; v/v). T_3 or T_4 (10^{-11} to 10^{-5} M) with or without cycloheximide (100 μ g/mL) were added to the pre-incubation (30 min) and incubation media (60 min) in the presence of [^{14}C]-MeAIB (3.7 kBq mL $^{-1}$). Also, rat testes were incubated with L-[U- ^{14}C] Leucine (0.1 μ Ci/mL) in KRb buffer to measure basal protein synthesis in the presence and absence of cycloheximide. Furthermore, the action of T_3 and T_4 in protein synthesis was studied. Seminiferous tubules from immature rat testes were used for the electrophysiology experiments. Intracellular recording of Sertoli cells was carried out in a chamber perfused with KRb with/ without T_4 [10^{-9} to 10^{-6} M], T_3 [10^{-6} M] and/or blockers and the membrane potential was monitored. T_4 stimulated amino acid accumulation in a dose-dependent manner (10^{-9} to 10^{-6} M) in rat testes reaching 50% of stimulus at 10^{-9} M. Also, T_4 increased protein synthesis but the stimulatory effect on amino acid accumulation was unchanged when protein synthesis was blocked. Similar stimulatory effects on amino acid accumulation (49%) and protein synthesis were observed with T_3 (10^{-6} M) but cycloheximide partially inhibited the effect of T_3 on amino acid accumulation. Both hormones elicited a hyperpolarization on Sertoli cell membrane potential which involved K^+ channels, since TEA and apamin abolished this effect. There was an involvement of extracellular Ca^{2+} in T_3 hyperpolarizing effect, since verapamil abolished this response. Tolbutamide presented evidence that the opening of K_{ATP} channels could also contribute to the Sertoli cell hyperpolarization produced by T_3 . We concluded that T_4 and T_3 stimulate amino acid accumulation by different pathways, since the action of T_4 on amino acid accumulation is independent of active protein synthesis.

Key words: Thyroid hormones; Protein synthesis; Amino acid accumulation; Ionic mechanism; Rat testis; Sertoli cells