

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

Ana Paula Zanatta

**EFEITO ESTIMULATÓRIO DA TIROXINA NO TRANSPORTE
DE AMINOÁCIDOS, CAPTAÇÃO DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$ E NA EXOCITOSE
EM CÉLULAS DE SERTOLI DE TESTÍCULOS DE RATOS
IMATUROS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof.^a Dr.^a. Fátima Regina Mena Barreto Silva

Co-orientador: Prof.^a Dr.^a. Ariane Zamoner Pacheco de Souza

Florianópolis

2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

Z27e Zanatta, Ana Paula
Efeito estimulatório da tiroxina no transporte de aminoácidos, captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ e na exocitose em células de Sertoli de testículos de ratos imaturos [dissertação] / Ana Paula Zanatta ; orientadora, Fátima Regina Mena Barreto Silva. - Florianópolis, SC, 2011.
104 p.: il., grafs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Tiroxina. 3. Testículos. 4. Aminoácidos - Transporte. 5. Integrina alfaXbeta2. 6. Sertoli, Células de. 7. Exocitose. 8. Genética animal. I. Silva, Fátima Regina Mena Barreto. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

CDU 577

Dedico esta dissertação de mestrado aos meus pais Paulo Zanatta e Cladis Ana Zanatta e à minha irmã Leila Zanatta, pelo apoio, incentivo e carinho em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Paulo e Cladis Zanatta, pelo incentivo, carinho e amor incondicional, apesar da distância, e pela oportunidade de estudar a mim proporcionada, e à minha irmã Leila Zanatta, pelo apoio e incentivo na elaboração deste trabalho e em todos os momentos da minha vida.

Ao meu noivo Gustavo Zilio Potrich, que apesar da distância, sempre me apoiou e incentivou.

À minha orientadora Prof.^a Dr^a Fátima R. M. B. Silva e co-orientadora Prof.^a Dr^a Ariane Z. P. de Souza pela confiança, pelo apoio e aprendizado.

Ao professor Dr. Carlos Peres Silva e à professora Dr^a Cláudia B. N. M. de Aguiar pela colaboração na avaliação e conclusão desta dissertação.

Às colegas do Laboratório de Hormônios & Transdução de Sinais, pelos momentos de trabalho e descontração, principalmente à prof^a Dr^a Ariane Z. P. de Souza, Leila Zanatta e Renata Gonçalves, pelo auxílio nos experimentos.

Ao departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética por conceder o uso do microscópio de fluorescência, especialmente à bióloga Chirle Ferreira pelo auxílio técnico.

Ao CNPq e Capes pelo apoio financeiro.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais
voltará ao seu tamanho original.”
Albert Ainsten

RESUMO

A atividade secretória das células de Sertoli é dependente das funções dos canais iônicos e da síntese de proteínas e é essencial para a espermatogênese. Além das ações genômicas dos hormônios tireóideos (HT), ações não-genômicas da tiroxina (T_4) e do 3,5,3'-L-triiodotironina (T_3) são relatados em testículos de ratos imaturos. O objetivo deste trabalho foi estudar o mecanismo de ação do T_4 no transporte de aminoácidos e investigar a função do receptor de integrina neste evento. Também, esclarecer se o efeito estimulatório do T_4 no transporte de aminoácidos e a captação de Ca^{2+} culminam em secreção celular. Descrevemos que o efeito estimulatório do T_4 no transporte de aminoácidos parece ser mediado por um receptor de integrina presente na membrana plasmática, já que o tetrac (inibidor da ação do T_4 na integrina), assim como o peptídeo RGD (bloqueador da ligação do T_4 ao receptor $\alpha_v\beta_3$) foram capazes de anular o efeito do hormônio. Além disso, o T_4 aumenta a captação de Ca^{2+} e o Ca^{2+} intracelular aumenta a atividade nuclear, mas esta ação genômica parece não influenciar na função secretória das células de Sertoli iniciada pela interação do T_4 ao receptor de integrina. Além do mais, o citoesqueleto e os canais de cloreto do tipo CIC-3, envolvidos na secreção celular, contribuem para as respostas rápidas das células de Sertoli que culminam na exocitose. Uma importante conclusão deste trabalho é que as vias de sinalização ativadas pela interação do T_4 ao receptor de integrina convergem para determinar respostas rápidas das células de Sertoli, como a exocitose. A compreensão do mecanismo pelo qual o T_4 promove o evento rápido de secreção celular, e independe da atividade nuclear, é um campo de investigação e pode levar à identificação de novos alvos terapêuticos.

Palavras-chave: T_4 , testículos, transporte de aminoácidos, integrina $\alpha_v\beta_3$, células de Sertoli, exocitose, mecanismo não-genômico.

ABSTRACT

Sertoli cell secretory activities are highly dependent on ion channel functions, protein synthesis and are critical to ongoing spermatogenesis. Beyond the genomic actions of thyroid hormones, also nongenomic actions of thyroxine (T_4) and 3,5,3'-L-triiodothyronine (T_3) are reported in immature rat testis. The aim of this work was to study the mechanism of action of T_4 on amino acid accumulation and to investigate the role of integrin receptor in this event. Also, to clarify if the stimulatory effect of T_4 on amino acid accumulation and on Ca^{2+} influx culminates in cell secretion. We described that the stimulatory effect of T_4 on amino acid accumulation appears to be mediated by plasma membrane integrin receptor since tetrac (an inhibitor of T_4 action at the integrin), as well as RGD peptide (blocker of T_4 binding on $\alpha_v\beta_3$ receptor) were able to nullify the hormone effect. In addition, T_4 increases Ca^{2+} uptake and Ca^{2+} from intracellular stocks augment nuclear activity, but this genomic action seems not influence Sertoli cell secretory function mediated by T_4 -integrin interaction. In addition, at least cytoskeleton and CIC-3 chloride channel, involved in cell secretion, contribute to rapid responses of Sertoli cells that culminates in exocytosis. An important conclusion of our studies is that signaling pathway activated by T_4 integrin receptor ultimately converges to determine rapid responses in Sertoli cells, exocytosis. Understanding the mechanism by which T_4 disconnect rapid cellular secretion from nuclear activity is an important field of investigation and may lead to the identification of new targets for drug discovery.

Keywords: T_4 , testis, amino acid transport, $\alpha_v\beta_3$ integrin, Sertoli cells, exocytosis, nongenomic mechanism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cascata de monodeiodinação sequencial: produção de T_3 , T_{3r} , $3,3'$ - T_2 e $3,5$ - T_2 pela deiodinação gradual do T_4	23
Figura 2 - Ilustração esquemática da estrutura das células de Sertoli adultas..	25
Figura 3 - Ilustração do mecanismo clássico de ação dos HT.....	27
Figura 4 – (A) Representação esquemática da hipótese do mecanismo de ação do T_4 na membrana plasmática das células de Sertoli de ratos imaturos. (B) Representação esquemática de ações não-genômicas dos HT propostas para outros tecidos..	31
Figura 5 - Representação esquemática do domínio de ligação dos HT no receptor de membrana integrina $\alpha_v\beta_3$ em células..	34
Figura 6 - Ilustração dos efeitos dos HT no desenvolvimento testicular em ratos..	35
Figura 7 - Hipótese de mecanismo de ação do hormônio T_4 em células de Sertoli de ratos imaturos.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS

- ASC – Sistema alanina-serina-cisteína
ATP – Adenosina trifosfato
BAPTA-AM – Ácido 1,2-bis(2-aminofenóxi)-etano-N,N,N',N'-tetraacético tetrakis (acetoximetil éster)
[¹⁴C] – Isótopo radioativo do carbono
CCDV – Canais de cálcio dependentes de voltagem
CFTR – Reguladores da condutância transmembrana da fibrose cística
CLC – Canais de cloreto dependentes de voltagem
D1 – Deiodinase tipo I
D2 – Deiodinase tipo II
D3 – Deiodinase tipo III
DIDS - 4,4'-diisotiocianatoestilbeno-2,2'-dissulfônico
DNA – Ácido desoxirribonucléico
EGTA – Ácido etilenoglicol-O-OV-bis(2-aminoetil)- NV,N,NV,NV-tetraacético
ERHT – Elementos responsivos ao hormônio tireoideo
ERK – Cinase regulada por sinal extracelular
FI – Filamentos intermediários
FSH – Hormônio foliculo-estimulante
GABA – Ácido gama-aminobutírico
HIF-1 α – Fator indutor de hipóxia 1 α
HT – Hormônios tireoideos
I_{Na} – Correntes de Na⁺
LH – Hormônio luteinizante
MAPK – Proteína serina-treonina cinase ativada por mitógeno
MeAIB – Aminoácido ácido α -(metil-amino)-isobutírico
PI-3-K – Fosfatidilinositol-3-cinase
PKA – Proteína cinase A
PKC – Proteína cinase C
PLC – Fosfolipase C
PLD – Fosfolipase D
RE – Retículo endoplasmático
RGD – Arginina-Glicina-Aspartato
RNA – Ácido ribonucléico
T₂ – 3,3'-diiodotironina
T₃ – Triiodotironina; 3,3',5-triiodo-L-tironina
T_{3r} – 3,3',5'-triiodo-L-tironina
T₄ – Tiroxina; 3,3',5,5'-tetraiodotironina
TR α – Receptor nuclear dos hormônios tireoideos tipo α
TR β – Receptor nuclear dos hormônios tireoideos tipo β

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1 Hormônios Tiroideos	21
1.2 Sistema Reprodutor Masculino	22
1.2.1 <i>Testículos e Células de Sertoli</i>	23
1.3 Mecanismos Genômicos dos Hormônios Tiroideos	26
1.4 Mecanismos Não-Genômicos dos Hormônios Tiroideos	28
1.5 Integrinas	32
1.6 Hormônios Tiroideos e Função Testicular	33
1.7 Transporte de Aminoácidos	36
1.8 Cálcio (Ca^{2+}) e canais de Ca^{2+}	37
1.9 Cloreto (Cl^-) e canais de Cl^-	38
1.10 Citoesqueleto Celular	40
1.11 Exocitose Celular	42
2. OBJETIVOS	44
2.1 Objetivo Geral	44
2.2 <i>Objetivos Específicos</i>	44
3. ARTIGO	45
3.1 Artigo submetido	45
4. DISCUSSÃO	72
5. CONCLUSÕES	76
6. PERSPECTIVAS	79
7. REFERÊNCIAS	80

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hormônios Tireoideos

Os hormônios tireoideos (HT) são essenciais para o desenvolvimento e crescimento pré e pós-natal de muitos órgãos e exercem papel essencial na diferenciação celular e regulação do metabolismo. Nos humanos, esses hormônios são importantes para o normal desenvolvimento do sistema nervoso central e dos sistemas pulmonar e cardiovascular (PATRICK, 2009), sistema reprodutor (JANNINI et al., 1995; HOLSBERGER et al., 2005) e outros órgãos.

A glândula tireóide produz os hormônios L-tiroxina (3,3',5,5'-tetraiodotironina; L-T₄), triiodotironina (3,3',5-triiodo-L-tironina; T₃) e T₃ reverso (3,3',5'-triiodo-L-tironina; T_{3r}), sendo T₄ o produto secretado em maior quantidade (KÖHRLE, 1999; MORENO et al., 2008; SCAPIN et al., 2010). Três deiodinases regulam a produção local e a disponibilidade sistêmica dos HT. Estas 3 enzimas constituem um grupo de proteínas diméricas de membrana que podem ativar ou inativar os HT, dependendo se agem nos anéis fenólicos ou tirosínicos das iodotironinas, respectivamente (KUIPER et al., 2005).

A deiodinase tipo I (D1; 5'-deiodinase) é capaz de deiodinar os anéis tirosínico (interno) e fenólico (externo) do hormônio, então ela pode converter T₄ em T₃ ou T_{3r} e pode produzir 3,3'-T₂ a partir do T₃ ou T_{3r} (Figura 1) (GEREBEN et al., 2008). Estudos mostraram que a D1 é uma proteína de membrana e que o sítio ativo encontra-se no citosol das células (TOYODA et al., 1995). Em mamíferos, é expressa na glândula tireóide, pituitária, intestino e placenta (ST GERMAIN; GALTON, 1997; BIANCO et al., 2002), particularmente em ratos, é expressa no sistema nervoso (VISSER et al., 1982; CAMPOS-BARROS et al., 1996).

A deiodinase tipo II (D2; 5'-deiodinase) cataliza a conversão de T₄ para T₃, e como a mesma age no anel fenólico, ela também converte T_{3r} em 3,3'-T₂ (Figura 1). Esta deiodinase apresenta uma função crucial na regulação dos níveis intracelulares de T₃ e é uma proteína residente no retículo endoplasmático, sendo que a porção N-terminal está localizada no lúmen do retículo e o domínio catalítico globular no citosol (BAQUI et al., 2000; CURCIO et al., 2001). D2 é expressa na glândula pituitária, cérebro, tecido adiposo marrom,

gônadas, glândula pineal e timo de ratos, e glândula mamária de camundongos (GEREBEN et al., 2008).

A terceira enzima envolvida na deiodinação das iodotironinas é a deiodinase tipo III (D3; 5-deiodinase). Esta enzima remove o iodo somente do anel tirosínico, portanto, é uma enzima inativadora dos HT e análogos (KÖHRLE, 1999). A D3 é uma proteína de membrana que contém um único domínio transmembrana entre os resíduos 16 e 41 (BAQUI et al., 2003). Esta localização favorece a função da D3 na placenta, útero e fígado fetal, bloqueando a passagem dos HT maternos para o feto (GEREBEN et al., 2008). A expressão de D3 é elevada no fígado, cérebro, gônadas, pulmões, coração, intestino e pele de embriões (BATES; ST GERMAIN; GALTON, 1999; VAN DER GEYTEN et al., 2001, 2002; KÖHRLE, 2007). Estudos mostraram que o RNA mensageiro ou as proteínas de D3 em humanos são detectadas no fígado fetal, córtex cerebral, e em estruturas epiteliais de pulmão embrionário, intestino, pele e trato urinário (HUANG et al., 2003). Os produtos resultantes da 5-deiodinação de T_4 e T_{3r} , como $3,3'$ - T_2 e $3',5'$ - T_2 apresentam baixa afinidade pelos receptores dos HT (KÖHRLE, 1999).

Enquanto os efeitos biológicos do T_3 são inicialmente mediados pela interação do hormônio com receptores nucleares, sendo estes efeitos conhecidos como efeitos nucleares e/ou genômicos, o T_4 , assim como os metabólitos T_3 reverso e T_2 , desencadeiam efeitos conhecidos como de membrana e/ou não-genômicos, através da interação destes hormônios com receptores putativos presentes na membrana plasmática.

1.2 Sistema Reprodutor Masculino

O sistema reprodutor masculino é composto pelos testículos, vias espermáticas (epidídimo, canal deferente e uretra), glândulas anexas (próstata, glândulas bulbouretrais e vesículas seminais) e pênis, os quais desempenham as seguintes funções:

- Testículos: formados por até 900 túbulos seminíferos enrolados, onde é formado o esperma;
- Vias espermáticas: permitem a maturação, circulação e liberação dos espermatozoides;
- Glândulas anexas e pênis: secretam o líquido que transporta os espermatozoides (FAWCETT, 1993).

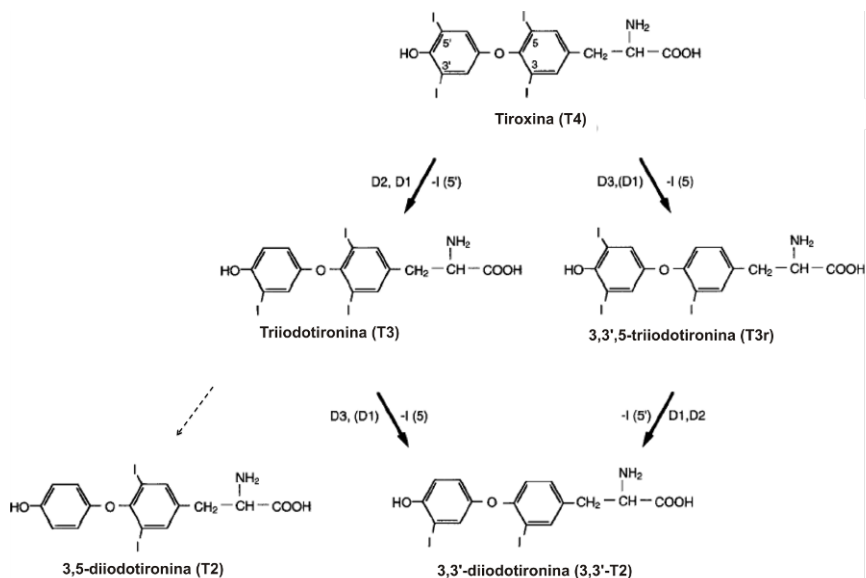


Figura 1- Cascata de monodeiodinação sequencial: produção de T₃, T_{3r}, 3,3'-T₂ e 3,5-T₂ pela deiodinação gradual do T₄. A seta pontilhada indica caminho desconhecido. Adaptado de MORENO et al., 2008.

1.2.1 Testículos e Células de Sertoli

Os testículos são órgãos pareados, ovóides, que em termos funcionais e anatômicos podem ser divididos em: tecido intersticial, formado especificamente por células de Leydig, responsáveis principalmente pela síntese de esteróides; e túbulos seminíferos que constituem um ambiente adequado para as células germinativas se desenvolverem em espermatozoides (espermatogênese) (SKINNER, 1991; FUJISAWA, 2001; SKINNER; NILSSON; BHANDARI, 2009).

O epitélio seminífero consiste de uma lâmina basal, fibras elásticas e células mióides peritubulares. Estas células, também chamadas de miofibroblastos, se situam na borda externa do epitélio seminífero e tocam a membrana basal das espermatogônias e das células de Sertoli (FAWCETT, 1993). As células mióides apresentam contrações que contribuem para o movimento dos espermatozoides e do

fluido através do lúmen dos túbulos seminíferos (JOHNSON; THOMPSON JR; VARNER, 2008).

As duas principais funções que os testículos realizam são: produção de testosterona (esteroidogênese) e formação de células germinativas (espermatogênese). Estas funções são reguladas por gonadotrofinas, o hormônio luteinizante (LH), que age na produção de testosterona nas células de Leydig e o hormônio folículo-estimulante (FSH) que regula as células de Sertoli nos túbulos seminíferos (PETERSEN; SÖDER, 2006). Além das gonadotrofinas e testosterona outros hormônios como: HT, o sistema endócrino da $1\alpha,25\text{-(OH)}_2$ -vitamina D_3 , o sistema endócrino do retinol (NORMAN; SILVA, 2001; SILVA; LEITE; WASSERMANN, 2002) e hormônios do crescimento (GH) (JEGOU; SHARPE, 1993; SHARPE, 1994), modulam funções críticas no processo espermatogênico.

Descrito em 1865 por Enrico Sertoli, as células de Sertoli são as primeiras células somáticas a se formarem nos túbulos seminíferos, servem de suporte – “*nurse cells*” - para o desenvolvimento das células germinativas e regulam o fluxo de nutrientes e fatores de crescimento para estas células através das junções ocludentes (SKINNER, 2005; PETERSEN; SÖDER, 2006).

O surgimento das células de Sertoli fetais nas gônadas primitivas define o estágio inicial do desenvolvimento embrionário do testículo. Estas células expressam o gene *sry*, que determina o sexo masculino da gônada (PETERSEN; SÖDER, 2006). Em roedores e em humanos as células de Sertoli começam a proliferar durante o desenvolvimento fetal, e durante a terceira semana pós-natal o número destas células aumenta 30 vezes. A taxa de proliferação das células de Sertoli diminui em ratos e camundongos por volta do 5º ao 15º dias pós-natal e a atividade mínima de divisão é detectada entre o 15º e 20º dia pós-natal (WALKER, 2003). Durante o 14º ao 21º dia as células de Sertoli saem do ciclo celular, sofrem mudanças morfológicas, ocorre a produção e secreção de proteínas que são requeridas pelas células germinativas e a barreira hemato-testicular é formada. Esta barreira divide os túbulos seminíferos em dois compartimentos funcionais - basal e adluminal. O compartimento basal ou exterior contém espermatogônias e espermatócitos preleptóteno/leptóteno, já o compartimento adluminal ou interior contém espermatócitos mais diferenciados e espermátides (Figura 2). Funcionalmente, a barreira hemato-testicular cria um microambiente controlado, selecionando nutrientes e fatores de diferenciação, assim como, forma um ambiente imunologicamente protegido, necessário para o desenvolvimento das

células germinativas (FRAGALE et al., 2000; PETERSEN; SÖDER, 2006; JOHNSON; THOMPSON JR; VARNER, 2008; WAGNER; WAJNER; MAIA, 2008).

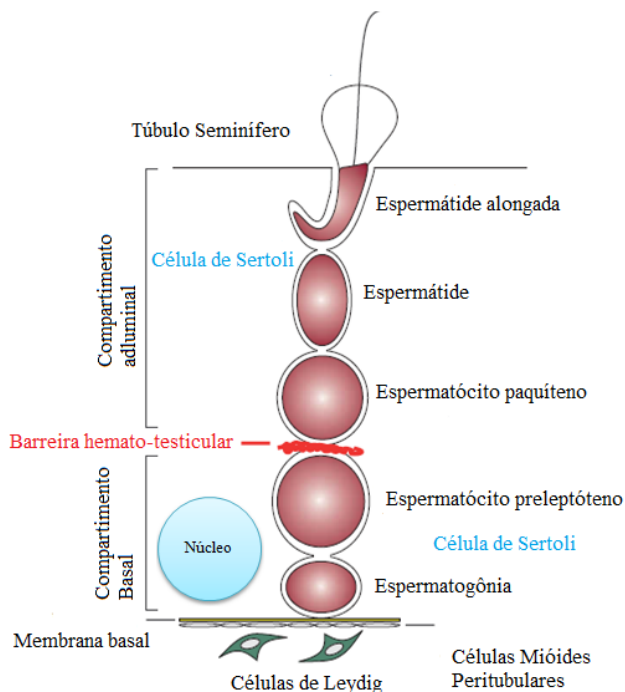


Figura 2 - Ilustração esquemática da estrutura das células de Sertoli adultas. Adaptado de CHENG; MRUK, 2010.

O número de células de Sertoli no testículo adulto determina o tamanho do testículo e a produção diária de espermatozóides do mesmo. Esta relação ocorre porque as células de Sertoli suportam uma quantidade fixa de células germinativas (ORTH; GUNSALUS; LAMPERTI, 1988). Somente as células de Sertoli imaturas que proliferam, então, o número final destas células é determinado antes da idade adulta. Os fatores que determinam o número de células de Sertoli podem ser genéticos, mas alguns hormônios são importantes, como o FSH, os HT e hormônio do crescimento (SHARPE, 1994, 1999).

As células de Sertoli sintetizam e secretam produtos específicos que são necessários para a sobrevivência das células germinativas. Entre estes produtos estão proteínas bioativas ou de transporte (proteína ligadora de andrógenos, transferrina e ceruloplasmina), proteases e inibidores de proteases (ativador de plasminogênio e proteína cíclica 2), componentes da matriz extracelular (colágeno tipo IV, laminina, proteoglicanos), metabólitos de energia (lactato e piruvato), fatores de crescimento, citocinas e hormônios (FUJISAWA, 2001). Outras funções desempenhadas por estas células incluem, a fagocitose de células germinativas em degeneração e corpos residuais, liberação de espermátides para a espermiacção e produção de proteínas que regulam e/ou respondem à liberação do hormônio do crescimento e que influenciam na atividade mitótica das espermatogônias (JOHNSON; THOMPSON; VARNER, 2008).

1.3 Mecanismos Genômicos dos Hormônios Tireoideos

O mecanismo clássico de ação dos HT envolve a captação de T_4 ou T_3 pelas células alvo, translocação do T_3 para o núcleo das células, ligação com o receptor nuclear de HT, transcrição gênica, produção de RNAs mensageiros específicos, tradução de proteínas e mudanças no conteúdo da célula ou secreção de produtos gênicos específicos (Figura 3) (WU; KOENING, 2000; ZHANG; LAZAR, 2000). O hormônio T_4 pode atuar através dos receptores nucleares, mas a afinidade de ligação destes receptores ao T_3 é bem maior do que ao T_4 , assim, o T_3 é o ligante natural dos receptores nucleares dos HT (DAVIS; LEONARD; DAVIS, 2008).

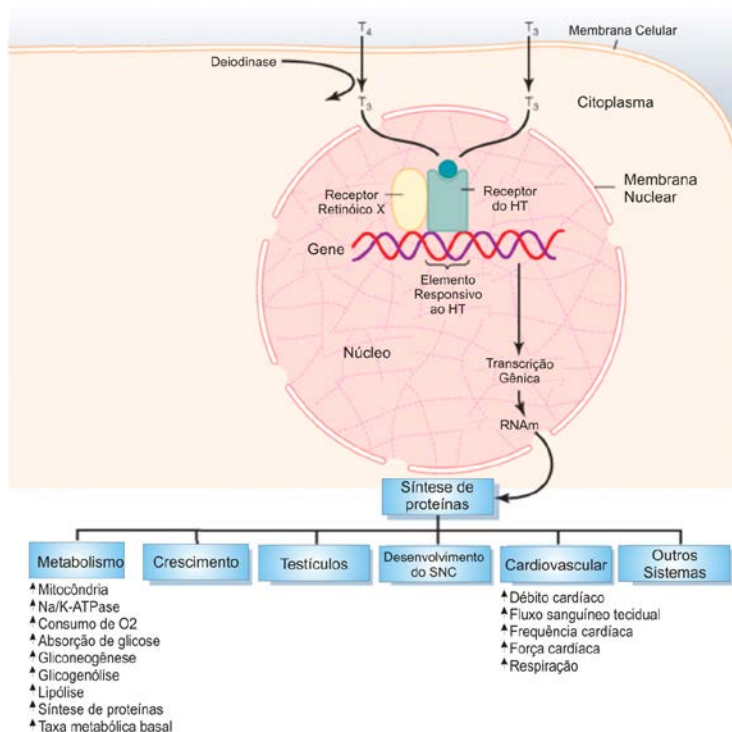


Figura 3 - Ilustração do mecanismo clássico de ação dos HT. Adaptado de GUYTON; HALL, 2006.

Os receptores nucleares dos HT pertencem a uma grande família de receptores nucleares de hormônios, que incluem hormônios esteróides, ácido retinóico, vitamina D e receptor de proliferação peroxissomal (YEN, 2001; MCKENNA; O'MALLEY, 2002) e são derivados de dois genes, designados $TR\alpha$ e $TR\beta$, localizados em dois cromossomos diferentes (CHENG; LEONARD; DAVIS, 2010). Os receptores nucleares dos HT são fatores transcricionais que regulam a expressão de genes por meio da interação com sequências específicas do DNA conhecidas como elementos responsivos ao HT (ERHTs). Estes correspondem a sequências hexaméricas de nucleotídeos, nas quais se ligam nos receptores de HT. Portanto, os efeitos biológicos induzidos por HT são mediados por estes receptores, e vários subtipos de receptores nucleares dos HT já foram descritos: $TR\alpha_1$, $TR\alpha_2$ e $TR\alpha_3$

originados do gene TR α , e TR β 1, TR β 2 e TR β 3 provenientes do gene TR β (LAZAR, 1993; WILLIAMS, 2000).

1.4 Mecanismos Não-Genômicos dos Hormônios Tireoideos

Por definição, ações não-genômicas dos HT são aquelas que iniciam na membrana plasmática ou no citoplasma e são independentes da síntese de proteínas (DAVIS; DAVIS; CODY, 2005). Estas ações, geralmente, têm um tempo de curso de segundos ou minutos e são mediadas por receptores específicos presentes na membrana plasmática ou no citoplasma de diferentes células (SILVA et al., 2002; SCAPIN et al., 2010; ZAMONER; PESSOA-PUREUR; SILVA, 2011).

Em células testiculares, os HT podem exercer diversas ações não-genômicas, incluindo o acúmulo de aminoácidos neutros (SILVA et al., 2001; VOLPATO et al., 2004; MENEGAZ et al., 2006, 2010a), fluxo de íons na membrana plasmática (ZAMONER et al., 2005; MENEGAZ et al., 2010a), hiperpolarização das células (VOLPATO et al., 2004; MENEGAZ et al., 2006), alteração na dinâmica dos filamentos intermediários do citoesqueleto (ZAMONER et al., 2005), ativação de vias de transdução de sinais (ZAMONER et al., 2007a, 2008a; MENEGAZ et al., 2010a) e captação de cálcio (MENEGAZ et al., 2010a) (Figura 4A), além da modulação dos níveis extracelulares de nucleotídeos (ZAMONER et al., 2006a). Embora existam vários relatos de ações extranucleares dos HT no sistema reprodutor masculino, o receptor de membrana envolvido nessas ações ainda não foi identificado em células testiculares (ZAMONER; PESSOA-PUREUR; SILVA, 2011).

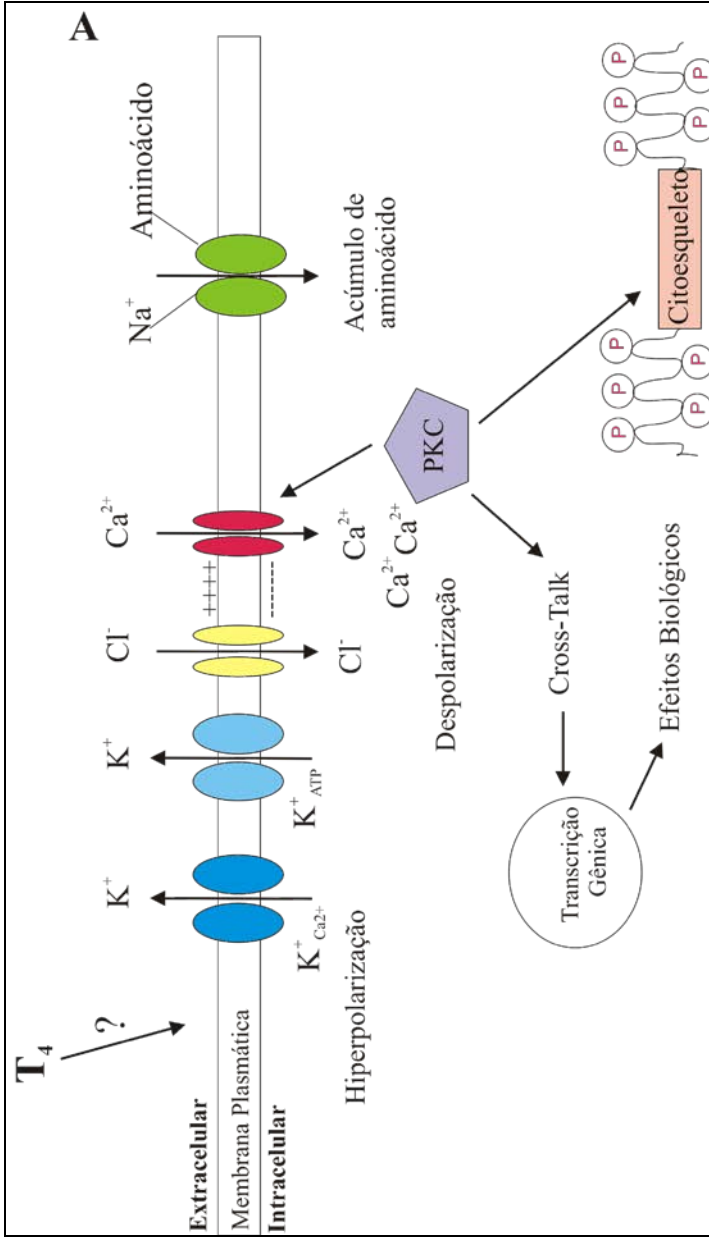
Em outros tecidos, o mecanismo de ação não-genômico envolve, por exemplo, a translocação de receptores nucleares dos HT do citoplasma para o núcleo (ZHU et al., 1998; BUNN et al., 2001), regulação do estado do citoesqueleto de actina (FARWELL et al., 2006), inserção e modulação da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase na membrana plasmática (LEI et al., 2003, 2008), regulação da expressão de genes específicos, como o fator indutor de hipóxia 1 α (HIF-1 α) (MOELLER; DUMITRESCU; REFETOFF, 2005) e ZAKI-4 α (CAO et al., 2005) (Figura 4B), além da modulação dos íons Na⁺, K⁺, Ca²⁺ e transporte de glicose, ativação da proteína cinase C (PKC), proteína cinase A (PKA) e

ERK/MAPK e regulação do metabolismo dos fosfolípidos pela ativação da fosfolipase C (PLC) e fosfolipase D (PLD) (KAVOK et al., 2001).

Uma das ações não-genômicas dos HT é a modulação da excitabilidade neuronal através de correntes de sódio (I_{Na}) (POTTHOFF; DIETZEL, 1997; HOFFMANN; DIETZEL, 2004). Concentrações de T_3 e T_4 foram efetivas em aumentar o influxo de Na^+ , resultando na amplificação da despolarização das células e também contribuindo para a ativação da Na^+ , K^+ -ATPase ou trocador Na^+/H^+ (CRAELIUS; GREEN; HARRIS, 1990). Além disso, Incerpi et al. (1999) identificaram efeitos não-genômicos do T_3 no trocador Na^+/H^+ através da ativação da via da MAPK (D'AREZZO et al., 2004), mostrados por um aumento no pH em mioblastos e por um reduzido tempo de recuperação das células depois da administração de ácido para as mesmas (INCERPI et al., 1999).

Através de mecanismos não-genômicos, estudos com células alveolares mostraram que o T_3 também pode aumentar a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase na membrana plasmática, sendo que a transdução do sinal deste hormônio para a bomba de sódio é através da ativação da MAPK (LEI et al., 2008) e PI-3-K (LEI; MARIASH; INGBAR, 2004; LEI et al., 2008).

As iodotironinas também podem influenciar, através de ações não-genômicas, na internalização de proteínas da membrana plasmática, como as deiodinases (STACHELEK et al., 2000). Além disso, estudos com microscopia confocal, mostraram que o receptor $TR\beta 1$ reside no compartimento nuclear e no citoplasma das células, e que o T_3 promove a translocação deste receptor do citoplasma para o núcleo (ZHU et al., 1998; BAUMANN et al., 2001). $TR\alpha 1$, que também reside no citoplasma, pode ser translocado do citoplasma para o núcleo em células tratadas com T_4 (GRESFIN et al., 2008; LIN et al., 2009), assim como, uma isoforma deste receptor, também encontrada no citoplasma, medeia a ação do T_4 e do T_3r no citoesqueleto de actina (CHENG; LEONARD; DAVIS, 2010).



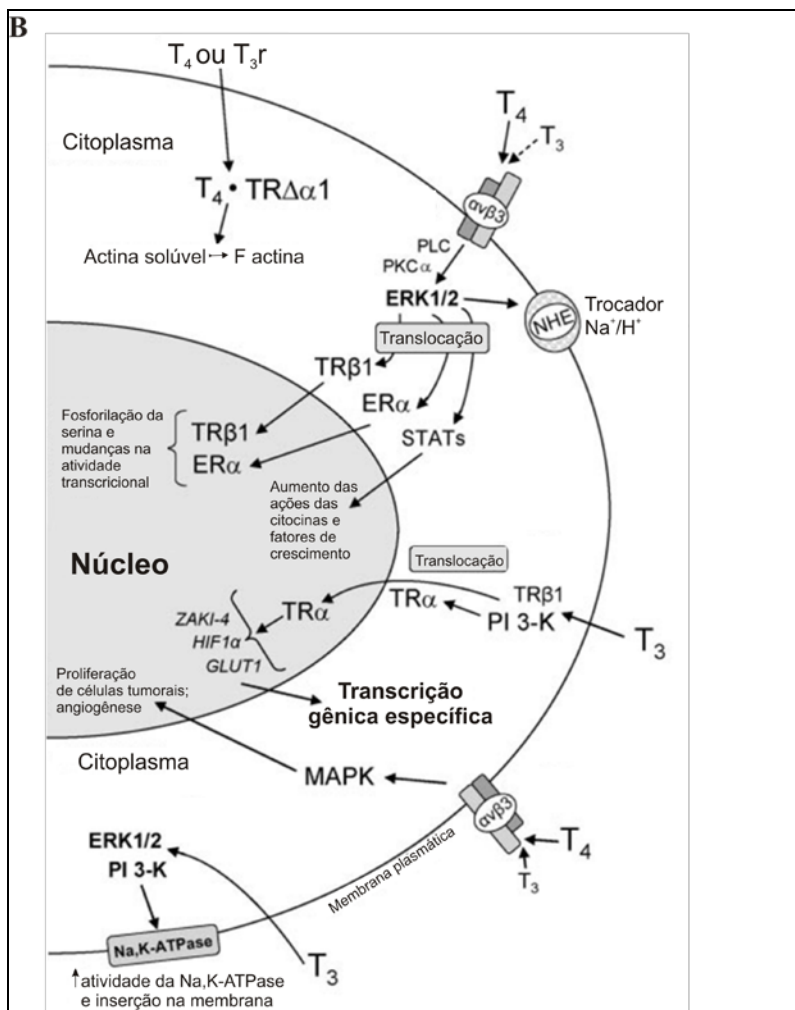


Figura 4 – (A) Representação esquemática da hipótese do mecanismo de ação do T_4 na membrana plasmática das células de Sertoli de ratos imaturos. A interação dos HT com a membrana plasmática das células promove a abertura dos canais de K^+ dependentes de ATP (K^+_{ATP}) e de canais de K^+ dependentes de Ca^{2+} ($K^+_{Ca^{2+}}$) e canais de Cl^- , provocando uma hiperpolarização. Esta hiperpolarização induz a abertura dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, e a captação de Ca^{2+} com consequente despolarização que desencadeiam o co-transporte Na^+ -aminoácido. O Ca^{2+} ativa PKC que regula a atividade dos canais iônicos e/ou promove um “cross-talk” intracelular, ativando a transcrição gênica. Adaptado de MENEGAZ et al., 2010a. (B) Representação esquemática de ações

não-genômicas dos HT propostas para outros tecidos. Adaptado de CHENG; LEONARD; DAVIS, 2010.

1.5 Integrinas

As integrinas constituem uma grande família de receptores de adesão celular e estão envolvidas nas interações célula-célula e célula-matriz (VINATIER, 1995). Estes receptores são constituídos por duas subunidades, α e β , que formam um complexo heterodimérico (ALBELDA; BUCK, 1990; HYNES, 1992). Estas subunidades contêm um grande domínio extracelular, um pequeno domínio transmembrana e um domínio carboxiterminal citoplasmático de comprimento variável (KUMAR, 1998).

Em mamíferos, são conhecidas 17 subunidades α e 8 subunidades β , e estas subunidades se combinam de diferentes maneiras e formam mais de 20 diferentes receptores (VINATIER, 1995; KUMAR, 1998).

A sinalização das integrinas contribui não somente para a adesão e migração celular, mas também regula a proliferação, sobrevivência e diferenciação das mesmas (WIESNER; LEGATE; FÄSSLER, 2005).

O receptor de superfície celular para iodotironinas, o dímero de integrina $\alpha_v\beta_3$, foi primeiramente descrito em tecidos por Bergh et al. (2005). Este receptor é uma proteína estrutural heterodimérica da membrana plasmática, que transmite sinais do interior da célula para a matriz extracelular e da matriz extracelular para a célula (BERGH et al., 2005; DAVIS; DAVIS; CODY, 2005). Esta integrina está concentrada principalmente na membrana plasmática de células endoteliais, células musculares lisas vasculares, células cancerosas (CAI; CHEN, 2006) e osteoclastos (YANG et al., 2008).

O domínio do receptor para HT é complexo e está próximo ao sítio de reconhecimento arginina-glicina-aspartato (RGD) na integrina, que é importante para as interações desta com uma variedade de proteínas da matriz extracelular e fatores de crescimento. Enquanto os domínios extracelulares da integrina interagem com diferentes ligantes, incluindo glicoproteínas da matriz (CALDERWOOD; SHATTIL; GINSBERG, 2000), os domínios intracelulares estão ligados ao citoesqueleto (PLOW et al., 2000). A afinidade de ligação do domínio

do receptor de integrina ao T_4 é suficientemente elevada para garantir a ligação deste hormônio sob condições fisiológicas (BERGH et al., 2005). Estudos realizados permitiram descrever este sítio como um receptor, pois demonstraram que a afinidade de ligação deste domínio para T_3 é menor que para T_4 , e que o sinal destes hormônios é transduzido através da via da MAPK (ERK1/2) para células endoteliais e angiogênicas (BERGH et al., 2005) e para a proliferação de células tumorais (TANG et al., 2004; BERGH et al., 2005; LIN et al., 2007).

Recentes análises sobre a farmacocinética e farmacodinâmica da ligação dos hormônios T_4 e T_3 ao receptor de integrina revelaram um domínio mais complexo, que contém dois sítios de ligação (LIN et al., 2009). Um destes sítios, o S1, liga T_3 exclusivamente e ativa Src cinase e fosfatidilinositol 3-cinase (PI-3-K), conduz o TR α do citoplasma para o núcleo e promove a transcrição do gene *HIF-1 α* , que participa do mecanismo de sobrevivência de muitas células cancerosas. O segundo sítio do receptor (S2) liga tanto T_4 quanto T_3 e ativa ERK1/2, resultando na translocação do TR β 1 do citoplasma para o núcleo (Figura 5). Um análogo desaminado do T_4 , o ácido tetraiodotiroacético (Tetrac), que desloca T_4 e T_3 do domínio do receptor, bloqueia todas estas ações em ambos os sítios da integrina (S1 e S2). Já, o peptídeo RGD, que compete parcialmente com T_4 e T_3 para se ligar ao sítio da integrina, inibe a ligação de T_3 ao sítio S1 e a ação do T_4 no sítio S2, porém não afeta a ação do T_3 na proliferação celular (LIN et al., 2009; DAVIS et al., 2009).

1.6 Hormônios Tiroideos e Função Testicular

A função dos HT no desenvolvimento e função dos testículos tem recebido muita atenção desde o relato de que os receptores nucleares de HT funcionais estavam presentes em elevadas quantidades em células de Sertoli de ratos neonatais (PALMERO et al., 1988; JANNINI et al., 1990; FRANCAVILLA et al., 1991). Estes estudos mudaram a visão clássica de que os testículos são órgãos refratários aos HT, indicando que estes hormônios poderiam ter efeitos diretos na função testicular, já que TR α 1 é expresso nas células de Sertoli durante a fase proliferativa no desenvolvimento, e também é expresso em espermatogônias e espermatócito paquíteno (BUZZARD et al., 2000).

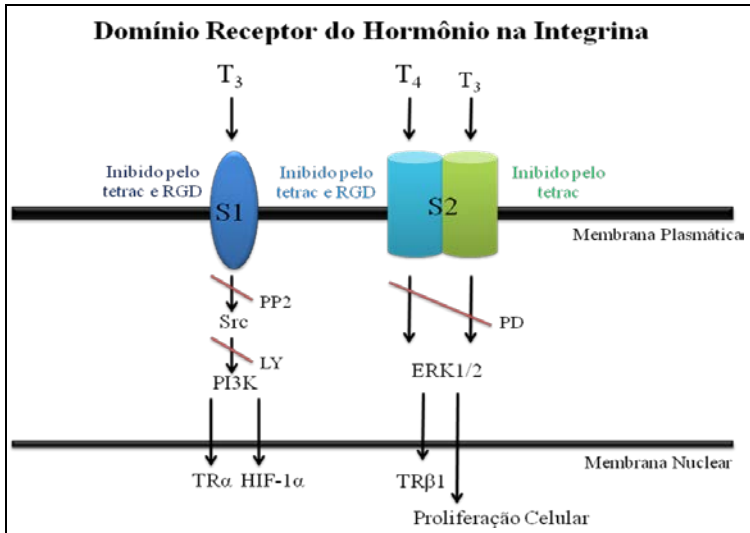


Figura 5 - Representação esquemática do domínio de ligação dos HT no receptor de membrana integrina $\alpha_v\beta_3$ em células. Adaptado de DAVIS et al., 2011.

Estudos das últimas décadas, porém, demonstraram que a disfunção da tireóide está associada não somente com anormalidades da morfologia e função testicular, mas também com diminuição da fertilidade e alterações da atividade sexual em homens (KRASSAS; PERROS, 2003; CARANI et al., 2005).

Como citado anteriormente, as células de Sertoli imaturas proliferam até o início da puberdade (WALKER, 2003), nesta fase elas cessam a divisão e começam a diferenciar para uma forma adulta não-proliferativa. Já está bem estabelecido que o número de células de Sertoli presentes na puberdade está correlacionado com o tamanho dos testículos e produção de espermatozoides na fase adulta (ORTH; GUNSALUS; LAMPERTI, 1988). A sinalização do hormônio folículo-estimulante (FSH) é um fator crítico na determinação da taxa de divisão das células de Sertoli (MEACHEM et al., 1996; KUMAR et al., 1997; DIERICH et al., 1998; GRISWOLD, 1998), e os HT determinam o período de divisão das células de Sertoli e podem estar envolvidos nas mudanças maturacionais que diminuem e/ou eliminam as respostas mitogênicas ao FSH (HOLSBERGER; COOKE, 2005).

Estudos mostraram que o hipotireoidismo não afeta o desenvolvimento testicular durante a vida fetal (HAMOULI-SAID et al., 2007), porém, quando induzido em ratos recém-nascidos, prejudica, na puberdade, o crescimento testicular, a maturação das células germinativas e a formação dos túbulos seminíferos (PALMERO et al., 1989; FRANCAVILLA et al., 1991, ZAMONER et al., 2006b). Outros relatos indicam que o hipotireoidismo, entre as fases neonatal e prepuberal, estende o período de proliferação das células de Sertoli e retarda a maturação das mesmas, resultando em um aumento no número de células de Sertoli em testículos adultos (FRANCAVILLA et al., 1991; VAN HAASTER et al., 1992; HESS et al., 1993; JOYCE et al., 1993; DE FRANÇA et al., 1995). Por outro lado, o hipertireoidismo resulta em uma interrupção precoce da proliferação das células de Sertoli e tem um efeito estimulatório sobre a maturação, resultando em uma canalização prematura dos túbulos seminíferos, diminuição na produção de espermatozoides e diminuição do tamanho dos testículos (VAN HAASTER et al., 1993; COOKE et al., 1994, PALMERO et al., 1995, ZAMONER et al., 2007b) (Figura 6).

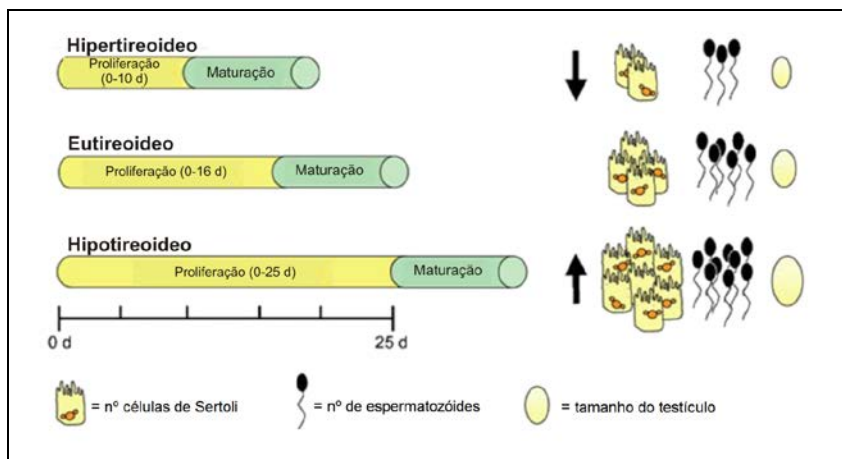


Figura 6 - Ilustração dos efeitos dos HT no desenvolvimento testicular em ratos. Adaptado de HOLSBERGER; COOKE, 2005.

Estes dados, juntamente com relatos de que TR α 1 é a isoforma predominante dos receptores dos HTs expressa em testículos adultos e em desenvolvimento, e que a expressão destes receptores no núcleo das células de Sertoli proliferativas é consistente com a função na regulação

dos processos de divisão celular (JANNINI et al., 1999, 2000; BUZZARD et al., 2000), indicam que estas células são um importante alvo dos HT.

1.7 Transporte de Aminoácidos

O transporte de aminoácidos através da membrana plasmática constitui um fenômeno básico do metabolismo celular. Através do transporte de aminoácidos, a célula é suprida destas unidades fundamentais que formam as proteínas celulares.

A regulação do transporte de aminoácidos depende do balanço entre o transporte de aminoácidos disponíveis no meio extracelular e a biossíntese de alguns aminoácidos, e também do balanço entre o uso que as células fazem destes aminoácidos na síntese protéica e no metabolismo energético (SHOTWELL et al., 1983).

O transporte de aminoácidos através da membrana é efetuado através de transportadores específicos. No entanto, aminoácidos estruturalmente semelhantes podem influenciar o transporte de outros aminoácidos. Essa influência pode ser estimulatória ou inibitória. Assim sendo, o transporte de aminoácidos neutros nas células de mamíferos envolve três principais sistemas. O sistema alanina (A) é específico para o ácido N-metilaminoisobutírico, depende do gradiente de sódio e do pH intracelular, o sistema específico para alanina, serina e cisteína (ASC) depende somente de sódio, e o sistema específico para leucina (L) é independente de sódio, pH e energia (GUIDOTTI; BORGHETTI; GAZZOLA, 1978; SILVA et al., 2002).

O sistema "A" é altamente expresso em células de mamíferos, e assim como outros transportadores, a expressão deste sistema nas células é regulada por vários fatores, incluindo hormônios, fatores de crescimento, perda de aminoácidos, progressão do ciclo celular e meio hipertônico (HÄUSSINGER; SCHLISS, 1999; SCHLISS; HÄUSSINGER, 2002). Além disso, o sistema "A" é eletrogênico e responsivo ao potencial de membrana, sendo que uma alteração no potencial de membrana pode influenciar a cinética do transportador (GECK; HEINZ, 1976).

A regulação hormonal desse sistema foi descrita nos testículos para o hormônio folículo-estimulante (FSH), retinol, isoproterenol e T₃ (SILVA et al., 2002) e mais recentemente para o T₄ (MENEGAZ et al.,

2006) e para o hormônio $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{-vitamina D}_3$ (MENEGAZ et al., 2009, 2010b).

O transporte de aminoácidos pelo sistema “A” é dirigido pelo gradiente eletroquímico de sódio (NORMAN; MANN, 1988). A remoção deste íon do meio extracelular gera um decréscimo deste tipo de transporte (BIKHASI; ABU SALBI; ITANI, 1985). O movimento de sódio para o interior da célula como co-substrato ocorre em resposta a um potencial de membrana negativo (LERNER, 1985). Este íon pode aumentar a afinidade do aminoácido com o sítio de ligação da molécula carreadora ou aumentar a velocidade da etapa de translocação, podendo em ambos os casos, provocar mudanças conformacionais na molécula carreadora.

A função dos HT depende somente do sistema “A” de transporte de aminoácidos e o análogo ácido α -(metil-amino)-isobutírico ($[^{14}\text{C}]\text{-MeAIB}$), um substrato específico para este sistema, é usado para estudos de modulação hormonal em uma variedade de células (GUIDOTTI; BORGHETTI; GAZZOLA, 1978; CRUZ-CURTE; WASSERMANN, 1985), já que o mesmo não entra no núcleo e permanece no citosol sendo quantificado no estado basal e na presença de hormônios e bloqueadores. Portanto, o ácido α -(metil-amino)-isobutírico ($[^{14}\text{C}]\text{-MeAIB}$) serve como marcador específico para o estudo de eventos de membrana, principalmente por não possuir um RNA transportador que o reconheça (GUIDOTTI; BORGHETTI; GAZZOLA, 1978).

1.8 Cálcio (Ca^{2+}) e canais de Ca^{2+}

O Ca^{2+} é um mensageiro intracelular que pode regular muitos processos biológicos em diferentes células, como secreção, contração, metabolismo, transcrição gênica, apoptose, entre outros (BERRIDGE; BOOTMAN; RODERICK, 2003; CARAFOLI, 2005). Nas células de Sertoli, o Ca^{2+} pode regular a secreção de hormônios, neurotransmissores e proteínas, e a principal via para a captação de Ca^{2+} para dentro destas células está representado pelos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (CCDV) (D’AGOSTINO; MENE; STEFANINI, 1992). Dentre os canais de Ca^{2+} expressos na membrana plasmática, os CCDV representam a principal via de entrada do íon nas

células quando submetidas a um estímulo externo, como ligação de um hormônio a receptores de membrana. Atribui-se à atividade destes canais a capacidade de converter sinais externos em eventos elétricos membranares e eventos citosólicos (CATERALL et al., 2000; CLAPHAM, 2007).

A abertura de canais de Ca^{2+} e o conseqüente aumento dos níveis do íon levam à formação de sinais elementares de Ca^{2+} que podem ativar tanto processos celulares localizados nas proximidades dos canais como ativar processos em nível global, como a ativação de outros canais e proteínas (BERRIDGE, 1998).

Em 1990, Segal demonstrou um aumento da captação de Ca^{2+} induzida por T_3 em vários tecidos, sugerindo que o aumento de Ca^{2+} é uma conseqüência da fosforilação dos canais de Ca^{2+} . Em 2001, estudos também mostraram o efeito do T_3 no acúmulo de aminoácidos em testículos de ratos imaturos (SILVA et al., 2001). Recentemente, Menegaz et al. (2010a), demonstraram que o T_4 desencadeia uma resposta rápida e transitória na captação de Ca^{2+} em células de Sertoli e, além disso, o Ca^{2+} extracelular e a atividade dos CCDV foram necessários para o transporte de aminoácidos induzida por T_4 , e este efeito foi independente da síntese de proteínas. Sendo assim, a participação de diferentes canais iônicos no mecanismo de ação dos hormônios tireoideos caracteriza a membrana plasmática como um importante microambiente, capaz de coordenar as vias de transdução de sinais destes hormônios em testículos de ratos (MENEGAZ et al., 2006, 2010a).

1.9 Cloreto (Cl^-) e canais de Cl^-

O íon cloreto (Cl^-) desempenha um papel relevante na homeostase celular em condições fisiológicas e patológicas. Apesar deste íon representar menos da metade do conteúdo aniônico celular, é o ânion de maior relevância fisiológica, já que se difunde facilmente através das membranas. Desta forma, a variação no fluxo de Cl^- está associada à regulação do volume celular, processos secretórios e a manutenção do pH celular, essencial para a manutenção da atividade enzimática (FOSKETT, 1998; AUZENNEAU et al., 2006).

O transporte de Cl^- envolve numerosas vias incluindo trocadores de ânions, co-transportadores e canais iônicos. Os trocadores

e co-transportadores permitem que a concentração do ânion seja mantida contra o gradiente termodinâmico, sendo este transporte associado a outros íons como Na^+ e K^+ . Já os canais de Cl^- permitem a passagem de correntes do íon através da membrana influenciando desta forma o potencial de membrana e o transporte de solutos (FOSKETT, 1998).

As funções dos canais de Cl^- incluem a homeostasia e regulação do volume celular, do transporte epitelial, da excitabilidade elétrica, da acidificação de compartimentos internos e externos, do ciclo celular e apoptose (JENTSCH et al., 2002). Molecularmente, três famílias de canais de cloreto foram estabelecidas até o momento: canais de cloreto dependentes de voltagem (CIC), canais reguladores da condutância transmembrana da fibrose cística (CFTR) e receptores GABA e glicina (NILIUS; DROOGMANS, 2003).

A família dos canais CIC incluem, pelo menos, nove membros já demonstrados em mamíferos (CIC-1 a CIC-7; CIC-Ka e CIC-Kb) e podem ser encontrados na membrana plasmática ou em organelas intracelulares. É relatado que o influxo de Cl^- através de canais de cloreto CIC-3 estimula a exocitose em células de mamíferos através de um mecanismo que neutraliza e previne o excesso de cargas positivas provenientes dos íons H^+ culminando na acidificação intragranular necessária para a secreção vesicular (BARG et al., 2001). Além disso, a ativação de canais de Cl^- e transportadores de Cl^- mantêm o potencial de membrana suficientemente negativo para facilitar a captação de Ca^{2+} (KERSCHBAUM et al., 1997), dessa forma o Cl^- aparece como um importante regulador de processos exocitóticos estimulados pelo Ca^{2+} (BARG et al., 2001).

No processo de exocitose ocorre a fusão da vesícula secretora na membrana plasmática e após a liberação do conteúdo vesicular, a vesícula pode ser reciclada e incorporada novamente na membrana (WIGHTMAN; HAYNES, 2004). Estudos demonstram que o estímulo rápido do influxo de Cl^- desencadeado pela 1,25D através de canais de Cl^- sensíveis ao 4,4'-diisotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfônico (DIDS), possuem um papel fundamental na atividade secretória em osteoblastos e em linhagem de células de Sertoli TM4 (ZANELLO; NORMAN, 2004; MENEGAZ et al., 2010b). Além dos canais de Cl^- o citoesqueleto celular também está envolvido nos movimentos intracelulares de vesículas e organelas, auxiliando o processo de exocitose de vesículas.

1.10 Citoesqueleto Celular

O citoesqueleto das células eucarióticas compreende uma rede de proteínas formada por microtúbulos (MT), microfilamentos de actina (MF) e filamentos intermediários (FI). O citoesqueleto não somente determina a forma celular, mas também participa na divisão e movimento das células, no transporte intracelular, estabelece e mantém a organização e integridade dos tecidos (VOGL; VAID; GUTTMAN, 2008).

Os microtúbulos são os componentes do citoesqueleto que influenciam na forma das células e fornecem vias para o transporte intracelular (VOGL; VAID; GUTTMAN, 2008). Os filamentos intermediários formam a estrutura do citoesqueleto no citoplasma de várias células eucarióticas e são altamente conservados em diferentes tipos celulares (IZAWA; INAGAKI, 2006). Estas proteínas conferem às células força mecânica e resistência à deformação, sendo que, também atuam como uma estrutura importante para a modulação e controle dos processos celulares essenciais, em especial na modulação de eventos de transdução de sinal (PARAMIO; JORCANO, 2002). Já os microfilamentos de actina, estão associados a processos fundamentais como citocinese, movimento e polaridade celular, transporte intracelular e ligação entre célula/célula e célula/substrato (DEMALI; BURRIDGE, 2003; WINDER; AYSCOUGH, 2005).

Nas células de Sertoli, os filamentos intermediários, microtúbulos e microfilamentos são abundantes e estão concentrados em regiões específicas das células. Os microfilamentos estão concentrados: (1) nas especializações ectoplásmicas (junções aderentes intercelulares relacionadas à actina), e (2) nos complexos túbulobulbares (estruturas propostas para internalizar junções antes da liberação dos espermatozoides e movimento dos espermatócitos através dos complexos de junção basal) (VOGL; VAID; GUTTMAN, 2008).

Os filamentos intermediários são os componentes do citoesqueleto mais abundantes no citoplasma das células de Sertoli. Os principais filamentos consistem de vimentina (FRANKE; GRUND; SCHIMID, 1979) e queratinas (PARANKO et al., 1986). Vimentina é frequentemente expressa durante o desenvolvimento (MENET et al., 2001) e tem sido descrita nas células de Sertoli durante os períodos fetal e pós-natal (ROMEO et al., 1995; SHOW et al., 2003, FRANKE et al., 2004), onde desempenha um papel importante nas modificações da

morfologia das células de Sertoli, nos processos juncionais, na integridade estrutural e na organização do citoplasma que ocorre durante a espermatogênese (RUSSELL; PETERSON, 1985; TANEMURA et al., 1994; SHOW et al., 2003; HE et al., 2007; WILLEMS et al., 2010).

Por outro lado, os microtúbulos do citoesqueleto são responsáveis por manter a morfologia alongada das células de Sertoli. Experimentos em testículos, utilizando desestabilizadores de microtúbulos, como colchicina e vimblastina, resultam em perda da arquitetura das células de Sertoli assim como das células germinativas (RUSSEL; MALONE; MACCURDY, 1981; VOGL; LINCK; DYM, 1983; ALLARD; JOHNSON; BOEKELHEIDE, 1993). Além da função estrutural, os microtúbulos são essenciais para o transporte intracelular de moléculas em geral.

Considerando o envolvimento do citoesqueleto no movimento celular e nos eventos de sinalização e maturação, alterações na dinâmica do citoesqueleto das células de Sertoli podem interferir no remodelamento celular, na formação da barreira hemato-testicular e conseqüentemente alterar o microambiente necessário para o desenvolvimento das células germinativas (ZAMONER; PESSOA-PUREUR; SILVA, 2011).

A maturação e função das células de Sertoli podem ser influenciadas por mecanismos celulares e moleculares sob controle de hormônios, fatores regulatórios locais, interações com células germinativas e/ou células somáticas vizinhas e também pela localização testicular (HOLSBERGER; COOKE, 2005). Já foram descritos efeitos não-genômicos do FSH e de hormônios esteróides na vimentina nas células de Sertoli (SPRUILL et al., 1983; SASAKI et al., 1998; SHOW et al., 2003). Outros estudos demonstraram que os HT modulam a fosforilação e a expressão da vimentina *in vivo* e *in vitro* em testículos e córtex cerebral através de mecanismos genômicos (ZAMONER et al., 2007a) e não genômicos (ZAMONER et al., 2005, 2006b, 2008). Além disso, estudos sugerem que o T₃ pode desempenhar funções não-genômicas importantes na reorganização do citoesqueleto, regulando a fisiologia celular em testículos de ratos imaturos (ZAMONER et al., 2005).

Em muitas células secretórias, vesículas e grânulos estão distantes da membrana plasmática, portanto, os mesmos precisam se mover até próximo à membrana plasmática para ter acesso aos sítios exocíticos (MALACOMBE; BADER; GASMAN, 2006). Em muitos tipos de células eucarióticas a actina forma uma rede dinâmica e complexa próximo à membrana plasmática, e um rápido remodelamento

desta rede de actina é crucial para o movimento das vesículas para a membrana (AUNIS; BADER, 1988; VITALE; SEWARD; TRIFARO, 1995). Estudos já mostraram que a ativação da exocitose é acompanhada por uma organização dos filamentos de actina periférica (VITALE; SEWARD; TRIFARO, 1995).

1.11 Exocitose Celular

O processo de exocitose consiste na fusão de vesículas com a membrana plasmática, permitindo a incorporação de proteínas e lipídeos na membrana e a secreção do conteúdo das vesículas das células para o meio extracelular (SALAUN; JAMES; CHAMBERLAIN, 2004). A exocitose pode ocorrer constitutivamente ou de uma maneira bem regulada. A exocitose constitutiva ocorre em todas as células e as vesículas derivam da rede do *trans*-Golgi, já a exocitose regulada ocorre em vários tipos celulares após um estímulo específico, como, por exemplo, um aumento nos níveis de Ca^{2+} intracelular (ECHARRI; MURIEL; DEL POZO, 2007).

Muitos processos envolvem exocitose, como secreção de enzimas, hormônios e anticorpos, liberação de neurotransmissores dos neurônios pré-sinápticos, fixação de proteínas integrantes da membrana, reação do acrossoma durante a fertilização, apresentação de antígeno durante a resposta imune e reciclagem dos receptores ligados à membrana plasmática. Em 1994, Parpura et al. descreveram pela primeira vez a exocitose de glutamato em astrócitos em cultura, esta liberação era dependente de Ca^{2+} e estimulada por bradicinina. Evidências morfológicas e bioquímicas também sugerem que o ATP pode ser liberado a partir de células gliais por exocitose dependente de Ca^{2+} (BAL-PRICE et al., 2002).

Entre os mais recentes efeitos não-genômicos do esteróide $1,25(OH)_2-D_3$ descritos, está o envolvimento do fluxo de íons através da membrana como parte da ativação de processos secretórios, em particular, os canais de cloro dependentes de voltagem sensíveis à $1,25(OH)_2-D_3$ desempenham um papel crucial na exocitose de células ósseas (BISWAS; ZANELLO, 2009), assim como, a $1,25(OH)_2-D_3$ potencia as correntes de cloreto acopladas ao processo de exocitose em linhagem de células TM4 imaturas (MENEGAZ et al., 2010b).

Em cultura, as células de Sertoli secretam diversas proteínas que são soro ou tecido-específicas (WRIGHT et al., 1983). Estas proteínas podem ser separadas em categorias, de acordo com as propriedades bioquímicas. A primeira categoria inclui as proteínas de transporte ou bioprotetoras, que são secretadas abundantemente e incluem a transferrina e a ceruloplasmina. A segunda categoria inclui proteases e inibidores de proteases, que são importantes nos processos de remodelamento tecidual. A terceira categoria inclui as glicoproteínas que formam a membrana basal entre as células de Sertoli e as células peritubulares. E a quarta categoria de proteínas secretadas pelas células de Sertoli inclui glicoproteínas que funcionam como fatores de crescimento ou parácrinos. E, além disso, estas células podem secretar peptídios bioativos como a prodinorfina e nutrientes ou intermediários metabólicos (GRISWOLD, 1998).

A atividade secretória das células de Sertoli é crítica para o processo de espermatogênese, e para exercer esta atividade estas células expressam uma variedade de canais iônicos envolvidos nesta função (RUSSEL; GRISWOLD, 1993, LALEVEE; PLUCIENNIK; JOFFRE, 1997; LALEVEE; JOFFRE, 1999). A regulação hormonal do fluido secretado pelas células de Sertoli envolve múltiplas vias de sinalização, incluindo segundos mensageiros e modulação da atividade de canais iônicos (AUZANNEAU et al., 2003, 2006). Entre estes canais iônicos estão os canais de cloreto da família CIC (AUZANNEAU, 2003; MENEGAZ et al., 2010b) e os canais de cloreto CFTR (BOOCKFOR et al., 1998).

Portanto, para investigar a hipótese de que o T_4 interage com o receptor de integrina para mediar respostas rápidas em células de Sertoli, foram realizados experimentos envolvendo o transporte de [^{14}C]-MeAIB, captação de $^{45}Ca^{2+}$ e incorporação de timidina ao DNA e o processo de exocitose de vesículas também foi estudado.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar o mecanismo de ação não-genômico do hormônio T_4 no efeito estimulatório no transporte de aminoácidos neutros em testículos de ratos imaturos.

2.2 *Objetivos Específicos*

1. Comparar o efeito estimulatório do T_4 , T_3r e tetrac no transporte de aminoácidos em testículos de ratos imaturos.
2. Estudar o envolvimento do receptor de integrina no efeito estimulatório do T_4 no transporte de aminoácidos.
3. Analisar o envolvimento dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem no efeito estimulatório do T_4 na captação de Ca^{2+} .
4. Verificar o envolvimento do Ca^{2+} intra e extracelular no efeito estimulatório do T_4 na incorporação de timidina no DNA.
5. Caracterizar o envolvimento do receptor de integrina no efeito estimulatório do T_4 na incorporação de timidina no DNA.
6. Verificar o envolvimento do citoesqueleto no efeito estimulatório do hormônio T_4 no transporte de aminoácidos.
7. Caracterizar o envolvimento dos canais de Cl^- no efeito estimulatório do T_4 no transporte de aminoácidos.
8. Estudar o efeito estimulatório do T_4 no evento de excitose nas células de Sertoli.

3. ARTIGO

3.1 Artigo submetido

Periódico: *Journal of Cellular Physiology*

ZANATTA, A.P.; ZANATTA, L.; ZAMONER, A.; SILVA, F.R.M.B.
**Integrin mediates the thyroxine plasma membrane effect in
immature rat testis.**

Integrin mediates the thyroxine plasma membrane effect in immature rat testis

Ana Paula Zanatta¹, Leila Zanatta¹, Ariane Zamoner¹,
Fátima Regina Mena Barreto Silva^{1*}

¹ *Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-Santa Catarina,
Brazil*

*Corresponding author: Dr. Fátima Regina Mena Barreto Silva.
Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, UFSC.
Campus Universitário, Bairro Trindade, Cx Postal 5069, CEP: 88040-
970 - Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. e-mail:
mena@mbox1.ufsc.br, Tel/Fax: +55-48.3721.96.72

Running head: Rapid responses of thyroxine in rat testis

Keywords: Thyroxine; Integrin; MeAIB accumulation; Exocytosis;
Rat testis.

Total number of text figures and tables: 5 Figures

Contract grant sponsor: MCT and CNPq (n° 471594/2010-5),
CAPES/COFECUB (n° 554/07), FAPESC-SC (n° FCTP1518/000) and
CAPES/PPG-Biochemistry/Pharmacy.

Abstract

Sertoli cell secretory activities are highly dependent on ion channel functions, protein synthesis and are critical to ongoing spermatogenesis. Beyond the genomic actions of thyroid hormones, also nongenomic actions to thyroxine (T_4) and 3,5,3'-L-triiodothyronine (T_3) are reported in immature rat testis. The aim of this work was to study the mechanism of action of T_4 on amino acid accumulation and to investigate the role of integrin receptor in this event. Also, to clarify if the stimulatory effect of T_4 on amino acid accumulation and on Ca^{2+} influx culminates in cell secretion. We described that the stimulatory effect of T_4 on amino acid accumulation appears to be mediated by plasma membrane integrin receptor since tetrac (an inhibitor of T_4 action at the integrin), as well as RGD peptide (blocker of T_4 binding on $\alpha_v\beta_3$ receptor) were able to nullify the hormone effect. In addition, T_4 increases Ca^{2+} uptake and Ca^{2+} from intracellular stocks augment nuclear activity, but this genomic action seems not influence Sertoli cell secretory function mediated by T_4 -integrin interaction. In addition, at least cytoskeleton and CIC-3 chloride channel, involved in cell secretion, contribute to rapid responses of Sertoli cells that culminates in exocytosis. An important conclusion of our studies is that signaling pathway activated by T_4 integrin receptor ultimately converges to determine rapid responses in Sertoli cells, exocytosis. Understanding the mechanism by which T_4 disconnect rapid cellular secretion from nuclear activity is an important field of investigation and may lead to the identification of new targets for drug discovery.

Introduction

Thyroid hormones (TH) exert a broad range of effects on development, growth, cell differentiation and metabolism, but not all of these actions are due to action on nuclear transcription (Yen, 2001). The pro-hormone thyroxine, 3,5,3',5'-L-tetraiodothyronine (T_4), is synthesized only by the thyroid gland whereas 3,5,3'-L-triiodothyronine (T_3) and 3,3',5'-triiodothyronine (rT_3) are produced by both the thyroid and by deiodination of T_4 at extrathyroidal sites. The circulating T_3 is generated by pre-receptor ligand metabolism resulting from activity of the iodothyronine deiodinase enzymes D1 and D2, which convert T_4 to T_3 , by 5' monodeiodination. Diiodothyronine, or T_2 , can exist in three forms and also by oxidative deamination and decarboxylation of T_4 result in the formation of tetraiodothyroacetic acid (tetrac). Triiodothyroacetic acid (triac) can be formed from T_3 in the similar way of tetrac (Engler and Burger, 1984; Bianco et al., 2002).

TH receptors are highly expressed in neonatal Sertoli cells, indicating that the developing Sertoli cells and testis may be important TH targets. In addition, the biochemical effects of TH demonstrate that the Sertoli cell is the main direct target in the testis for TH, and that the prepuberal period is the temporal frame for its action (Jannini et al. 1999; Rao et al. 2003). Although the action of TH on Sertoli cell function has received much attention since the finding of functional T_3 receptors in immature rat testis, being almost exclusively localized in Sertoli cells (Jannini et al. 1994; 1999), the precise function of TH in the testis is unsatisfactorily defined.

The actions of TH in target tissues are predominantly mediated by specific nuclear receptors capable of binding to regulatory regions of target genes and modifying their expression (Yen et al., 2006). Nongenomic actions of TH are widely acknowledged but the specific cellular target is quite difficult to characterize since it can initiate on the plasma membrane, cytoplasm, cytoskeleton or sub-cellular organelles (Kavok et al., 2001; Silva et al., 2002; Harper and Seifert, 2008). Nongenomic responses do not require the production of new protein(s), occur in the extranuclear milieu of the cell and can culminate in the regulation of genes that do not contain a TH response-element (Kavok et al., 2001; Aranda and Pascual, 2001). These actions are regulated by specific agonists and antagonists, have a short latency and are not affected by inhibitors of transcription and translation.

In particular to T_4 , two reports from our group show that the stimulatory effect of T_4 on amino acid accumulation (a specific plasma

membrane transport system), is independent of active protein synthesis. Moreover, it was demonstrated that the immediate hyperpolarizing effect of T_4 in Sertoli cells is influenced by Ca^{2+} -activated K^+ channels (Menegaz et al., 2006). Following these finds, Menegaz et al. (2010a) demonstrated that the stimulatory effect of T_4 on Ca^{2+} uptake and on amino acid accumulation, both events initiated at the plasma membrane which strongly characterizes a nongenomic effect, are mediated by T_4 interaction with the Sertoli cell plasma membrane, opening of ATP-dependent K^+ , Ca^{2+} -dependent K^+ and Cl^- channels hyperpolarizing the cells. This hyperpolarization induces an opening of voltage-dependent Ca^{2+} channels, Ca^{2+} influxes and “depolarization” which trigger Na^+ -amino acid co-transport. The local Ca^{2+} transient activates protein kinase C (PKC) that may regulate plasma membrane ionic channel activities and/or promote intracellular “cross-talk” to ultimately modulate gene transcription or keep the ongoing secretory activity. Based on the possibility that integrin $\alpha_v\beta_3$ mediates TH to induce angiogenesis (Bergh et al., 2005), the current experiments were designed to investigate the hypothesis that T_4 interacts with integrin receptor to mediate rapid responses in Sertoli cells.

Materials and methods

Materials

L-Thyroxine (T_4), 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T_3), 3,3',5-triiodothyronine (reverse T_3 , rT_3), tetraiodothyroacetic acid (tetrac), Arg-Gly-Asp (RGD), ethyleneglycol-O-OV-bis(2-aminoethyl)-NV,N,NV,NV-tetraacetic acid (EGTA), 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetrakis (acetoxymethyl ester) (BAPTA-AM) 4, 4'-Diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS), verapamil, colchicine and quinacrine were purchased from Sigma Aldrich Chemical Company, St. Louis, MO, USA. α -[1- ^{14}C] methylaminoisobutyric acid ([^{14}C] MeAIB) (sp.act. 1.85 GBq/mmol), thymidine [methyl- ^{14}C] (sp. act. 1.7464 GBq/mmol), [^{45}Ca]CaCl₂ (sp. act. 321 KBq/mg Ca^{2+}), and Optiphase Hisafe III biodegradable liquid scintillation were purchased from PerkinElmer (Boston, USA). All other chemicals were of analytical grade.

Animals

Wistar rats bred in our animal house and maintained in an air-conditioned room (21 °C) with controlled lighting (12 h/12 h light/dark cycle) were used in this study. The suckling rats were kept with their mothers until sacrifice by cervical dislocation. Pelleted food (Nuvital, Nuvilab CR1, Curitiba, PR, Brazil) and tap water were available *ad libitum*. All the animals were carefully monitored and maintained in accordance with ethical recommendations of the Brazilian Veterinary Medicine Council and the Brazilian College of Animal Experimentation (Protocol CEUA/PP00418).

Amino acid accumulation measurements

For amino acid accumulation experiments one gonad (alternately left and right) of 11-day-old rats was used as the experimental tissue and the contralateral one was used as the control. The testes were weighed, decapsulated and pre-incubated in Krebs Ringer bicarbonate (KRb) buffer (122 mM NaCl; 3 mM KCl; 1.2 mM MgSO₄; 1.3 mM CaCl₂; 0.4 mM KH₂PO₄; 25 mM NaHCO₃) for 30 min in a Dubnoff metabolic incubator at 34 °C, pH 7.4 and gassed with O₂:CO₂ (95:5; v/v). T₄ (10⁻⁹ M), rT₃ (10⁻⁶ to 10⁻¹⁰ M), tetrac (10⁻⁹ M), RGD (5 × 10⁻⁷ M), colchicine (10⁻⁶ M) and DIDS (200 μM) were added to the pre-incubation and incubation media and the concentrations used in these assays were selected based in our previous studies (Menegaz et al., 2006, 2010b) and from other (Lin et al., 2009). T₄ was dissolved in 0.025 M NaOH-saline. This solution was further diluted to the final concentrations in KRb. The buffer was bubbled with 95% O₂-5% CO₂ up to pH 7.4. The gonads were then incubated in fresh KRb buffer for 60 min. [¹⁴C] MeAIB (3.7 kBq/mL) was added to each sample during the incubation period (Silva et al., 2001). After incubation the testes were placed in screw cap tubes containing 1 mL of distilled water. They were frozen at -20 °C in a freezer and afterwards boiled for 5 min; 25 μL aliquots of tissue and external medium were placed in scintillation fluid and counted in a Beckman beta liquid scintillation spectrometer (model LS 6500; Fullerton, California, USA) for radioactivity measurements. The results were expressed as the tissue/medium (T/M) ratio: cpm/mL tissue fluid

per cpm/mL incubation medium (Silva et al., 2001; Menegaz et al., 2006).

⁴⁵Ca²⁺ uptake

One gonad (alternately left and right) from 11-day-old rats was used as experimental tissue and the contralateral one was used as the control. The testes were decapsulated and pre-incubated in KRb buffer for 15 min in a Dubnoff metabolic incubator at 34 °C, pH 7.4 and gassed with O₂:CO₂ (95:5; v/v). The testes were then transferred to another series of wells containing fresh KRb with 0.1 µCi/mL ⁴⁵Ca²⁺ and left for 60 min. Verapamil (10⁻⁴ M) was added during last 15 min before the hormone addition and maintained during all the incubation period. Finally, T₄ was added to these ⁴⁵Ca²⁺ solutions and the tissues were incubated with 10⁻⁹ M T₄ with/without verapamil for 60 s (Menegaz et al., 2010a).

Extracellular ⁴⁵Ca²⁺ from the testis was thoroughly washed off in 127.5 mM NaCl, 4.6 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 10 mM HEPES, 11 mM Glucose, and 10 mM LaCl₃, at pH 7.4 (30 min in washing solution). The presence of La³⁺ during the washing stage was found to be essential to prevent release of the intracellular ⁴⁵Ca²⁺ (Batra and Sjögren, 1983). After La³⁺ tissue washing, testes were homogenized with 0.5 M NaOH solution; 50 µL aliquots of tissue medium were placed in scintillation fluid for counting in a Beckman coulter beta liquid scintillation spectrometer (model LS 6500; Fullerton, California, USA), and 5 µL aliquots were used for total protein quantification by Lowry method (1951). The results were expressed as pmol ⁴⁵Ca²⁺/µg of protein (Menegaz et al., 2010a).

Thymidine DNA incorporation

For experiments on DNA ¹⁴C-thymidine incorporation, testes were incubated in KRb buffer with [methyl-¹⁴C] thymidine (1 µCi/mL) in the absence (control) or presence of T₄ (10⁻⁹ M) with/without EGTA (2 mM), BAPTA-AM (5 x 10⁻⁵ M), RGD (5 x 10⁻⁷ M) or T₃ (10⁻⁶ M) for 60 min at 34 °C, pH 7.4. At the end of the incubation, cells were rinsed

twice with cold buffer to remove the unincorporated [^{14}C]-thymidine. Ice-cold trichloroacetic acid (10%) was added and the acid-insoluble material was dissolved with 0.5 M NaOH. Radioactivity was measured by liquid scintillation using a LKB rack beta liquid scintillation spectrometer (model LS 6500; Multi-Purpose Scintillation Counter-Beckman Coulter, Boston, USA). The protein concentrations were determined by Lowry method (1951) and the results were expressed as cpm/ μg of protein (Lucas et al., 2008).

Primary culture of Sertoli cells and secretory activity

Sertoli cells were obtained from 11-day-old Wistar rats. Rats were killed by decapitation, testes were removed and decapsulated. Sertoli cells were obtained by sequential enzymatic digestion as previously described by Dorrington et al. (1975). Sertoli cells were seeded at the concentration of 200 000 cells/ cm^2 in 24 wells Falcon culture plates (Deutscher, Brummath, France) and cultured for 72 h in Ham's F12/DMEM (1:1) medium supplemented with serum replacement 3 from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA), 2.2 g/L sodium bicarbonate and antibiotics (50,000 IU/L penicillin, 50 mg/L streptomycin, 50 mg/L kanamycin), fungicide (0.25 mg/L amphotericin B), Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA) in a humidified atmosphere of 5% CO_2 :95% air at 34°C. Three days after plating, residual germ cells were removed by a brief hypotonic treatment using 20 mM Tris-HCl (pH 7.2) (Galdieri et al., 1981). Cells were washed with PBS (PAN, Dutscher, Brumath, France) and fresh medium Ham's F12/DMEM (1:1) was added. On day 5 after plating cells were washed in Hank's Buffered Salt Solution (HBSS) (136.9 mM NaCl, 16.7 mM NaHCO_3 , 1.3 mM CaCl_2 , 5.4 mM KCl, 0.65 mM MgSO_4 , 0.27 mM Na_2HPO_4 , 0.44 mM KH_2PO_4 , 6.1 mM glucose). After that, the medium was changed by fresh HBSS containing 3 μM quinacrine and cells were incubated for 30 min at 34 °C. Time-course of T_4 (10^{-9} M) was carried out at 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 and 10 min based in a previous similar approach from our group (Menegaz et al., 2010b).

Exocytosis imaging in primary culture of Sertoli cell

Microscopy imaging was performed on quinacrine-loaded live Sertoli cells as described before by Menegaz et al. (2010b). Briefly, cells were washed with HBSS and loaded with 3 μM quinacrine dissolved in HBSS for 30 min at 34 °C. Sertoli cells were viewed under an Olympus BX41 fluorescence microscope using a FITC filter. Exocytosis was identified as the rapid loss of quinacrine fluorescence when released into the medium, indicating fusion of secretory vesicles with the plasma membrane with/without the hormone stimulus. Images were obtained with QColor 3C digital camera (Q-imaging) at a scanning rate of 1 image/60 s and processed with Q-capture Pro 5.1 software program (Q-imaging).

Statistical analysis

The results are means \pm S.E.M. When multiple comparisons were performed, evaluation was done using one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test. Differences were considered to be significant when $p < 0.05$.

Results

In order to follow up the studies of rapid responses to T_4 in immature rat testis, a very well characterized neutral amino acid transport system in the testis was used. The analogue α -(methyl-amino)isobutyric acid ($[^{14}\text{C}]\text{-MeAIB}$), doesn't has a tRNA inside the cells than it accumulates into the cytosol and appropriately reflects the transport through the plasma membrane. Fig. 1A shows that the stimulatory effect of T_4 (10^{-9} M) on amino acid accumulation (most potent dose of T_4 chosen from our previous report by Menegaz et al.; 2006) was totally blocked by tetrac (10^{-9} M), a thyroid hormone analogue that inhibits T_4 binding to the cell surface. In addition, any *per se* effect of tetrac was observed in the basal amino acid accumulation.

Experiments were carried out to compare the effect of rT_3 and T_4 on amino acid ($[^{14}\text{C}]\text{MeAIB}$) accumulation in immature rat testes. Fig. 1B demonstrates the dose-response curve of rT_3 at doses ranging from 10^{-10} to 10^{-6} M. The addition of 10^{-9} M of rT_3 elicited a stimulatory effect on amino acid accumulation around 136% compared

with control group. In percentage terms, 10^{-9} M rT_3 exhibited higher potency than T_4 (76% of stimulation) on amino acid accumulation. Any effect was observed at 10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-7} and 10^{-6} M to rT_3 in these experimental conditions, when compared to control group.

In additional studies, the amino acid accumulation in the presence of 5×10^{-7} M RGD (a peptide that inhibits thyroid hormone binding to integrins), separately or together with 10^{-9} M of T_4 was examined. As it was expected, T_4 stimulated significantly amino acid accumulation while RGD peptide did not affect the basal amino acid transport. In contrast, RGD was able to prevent the stimulatory effect of T_4 (Fig. 1C).

We have previously shown that T_4 increases $^{45}Ca^{2+}$ uptake immediately after 60 s of hormone exposure and that the voltage-dependent Ca^{2+} channels and ATP-dependent K^+ channels are a set point to mediate the stimulatory effect of T_4 on amino acid accumulation in immature rat testis. Based in some findings in immature rat testis we selected the optimal concentration of verapamil, EGTA and BAPTA-AM used in similar approaches previously published (Volpato et al., 2004; Menegaz et al., 2006; 2010a). In order to verify the type of Ca^{2+} channel involved in the stimulatory effect of T_4 , a L-type voltage-dependent Ca^{2+} channel (L-VDCC) blocker was used. Fig. 2 shows that the stimulatory effect T_4 was partially inhibited by verapamil, suggesting that the majority of extracellular Ca^{2+} uptake stimulated by T_4 is mediated by these channels.

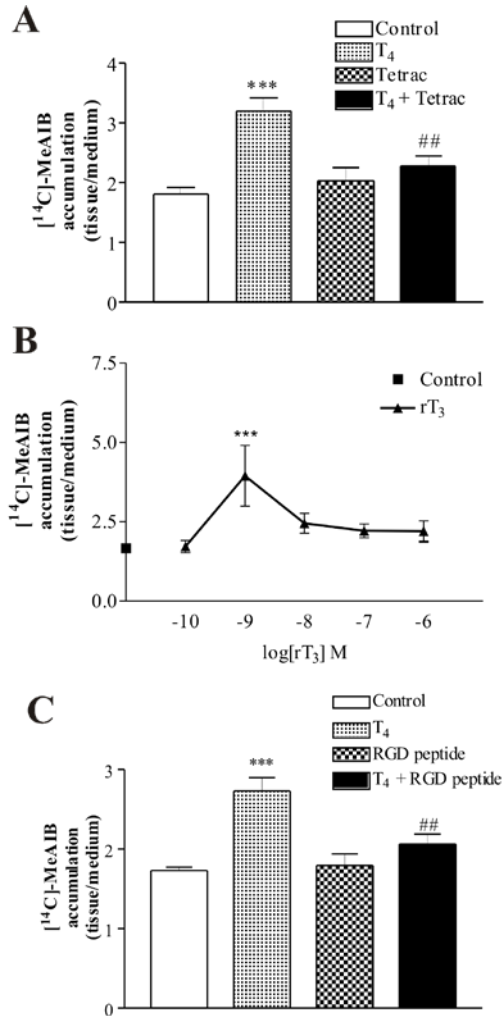


Fig. 1. (A) Influence of tetrac on stimulatory effect of T_4 on ^{14}C -MeAIB accumulation in rat testes. Means \pm S.E.M. For control, $n = 8$; tetrac (10^{-9} M), $n = 6$; T_4 (10^{-9} M), $n = 6$. *** $P < 0.001$ compared with control group; ## $p < 0.01$ compared with T_4 group. (B) Effect of rT_3 (dose-response curve) on ^{14}C -MeAIB accumulation in rat testes. Means \pm S.E.M. For control and rT_3 (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} M), $n = 4$ for each group. *** $P < 0.001$ compared with control group. (C) Effect of RGD peptide on stimulatory effect of T_4 on ^{14}C -MeAIB accumulation in rat testes. Means \pm S.E.M. For control, $n = 8$; RGD ($5 \times$

10^{-7} M), $n = 6$; T_4 (10^{-9} M), $n = 6$. *** $P < 0.001$ compared with control; ## $p < 0.01$ compared with T_4 group. Pre-incubation time: 30 min; incubation time: 60 min.

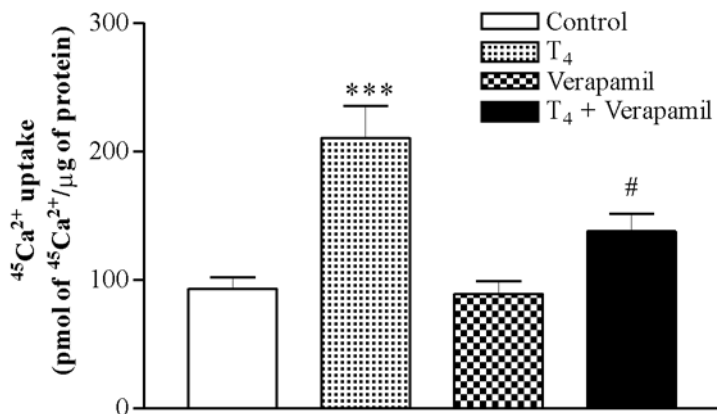


Fig. 2. Influence of voltage-dependent-calcium channels on stimulatory effect of T_4 in $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in immature rat testes. Pre-incubation: 15 min in KRB, additional pre-incubation: 60 min with $0.1 \mu\text{Ci/mL}$ of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ and incubation time: 60 s with $0.1 \mu\text{Ci/mL}$ of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ in the presence or absence of verapamil (10^{-4} M) with/without T_4 (10^{-9} M). Means \pm S.E.M. $n = 4$ for all groups. *** $P < 0.001$ compared with control group; # $p < 0.05$ compared with T_4 group.

To examine the role of Ca^{2+} in T_4 -induced activation on DNA thymidine incorporation, first, testes were incubated for 60 s with $^{45}\text{Ca}^{2+}$ with/without L-VDCC blocker, verapamil. Further studies were carried out with T_4 (10^{-9} M) and T_3 (10^{-6} M) with ^{14}C -thymidine for 60 min of incubation in the presence or absence of 2 mM EGTA (Ca^{2+} chelator). EGTA alone did not alter thymidine DNA incorporation. Fig. 3A shows a significant increase on DNA thymidine incorporation in the presence of T_4 which was totally inhibited when extracellular Ca^{2+} was chelated by EGTA. Considering that TH nuclear receptors are widely recognized as modulators of gene expression and protein synthesis, and also that deiodinases are present in rat testis, the effect of T_3 , one of the products of T_4 deiodination, was also investigated in this approach. As it was expected, T_3 was able to increase DNA thymidine incorporation after 60

min of incubation in a level similar to that observed to T_4 in a physiological concentration.

Since our results pointed to a role for Ca^{2+} -dependent pathways in the thymidine DNA incorporation regulated by T_4 , we also examined intracellular Ca^{2+} involvement. To prevent the increase in cytosolic Ca^{2+} , BAPTA-AM was used at 50 μ M. When the intracellular Ca^{2+} was chelated, no change in basal DNA activity was observed, however, the stimulatory effect of T_4 (10^{-9} M) on DNA thymidine incorporation was nullified (Fig. 3B). It suggests also the existence of an intracellular Ca^{2+} -dependent pathway in the hormonal action and clearly demonstrates that Ca^{2+} is essential to T_4 stimulation on DNA activity in the testis.

The role of plasma membrane integrin $\alpha_v\beta_3$ in T_4 activation DNA thymidine incorporation in rat testis was examined by 5×10^{-7} M RGD peptide incubated for 60 min with/without of T_4 . The increased thymidine DNA incorporation by T_4 was not influenced by pre-incubation and incubation with RGD. Thymidine incorporation was unaffected in basal conditions even in the presence of RGD (Fig. 3C). These observations are consistent with the existence of a binding site for T_4 at plasma membrane integrin $\alpha_v\beta_3$ to mediates rapid responses in immature testes that not necessary culminates with classical nuclear activity to TH.

We demonstrated that tubulin network integrity is crucial for the amino acid accumulation in immature rat testis (Wassermann et al., 1992). Further, we showed that phosphorylation of vimentin is modulated by short-term effect of TH through a Ca^{2+} -dependent pathways leading to cytoskeleton reorganization (Zamoner et al., 2005). Recently, we reported the involvement of chloride channels on exocytosis in TM4 cells (Menegaz et al., 2010b). Following this context, we analyzed two different events, cytoskeleton integrity and chloride channels (ClC-3) activity on amino acid accumulation. Fig. 4A shows that 10 μ M colchicine, a network microtubule disruptor, was effective to block the stimulatory effect of T_4 on amino acid accumulation. Taking it in account, we investigated the influence of DIDS, a specific blocker of voltage-dependent Cl⁻ channels in the stimulatory effect of T_4 on amino acid accumulation (Fig. 4B). This agent also was able to disturb the stimulatory effect of T_4 on amino acid accumulation suggesting that, at least in part, the action of T_4 initiated at the plasma membrane can result in a rapid secretory activity of Sertoli cells.

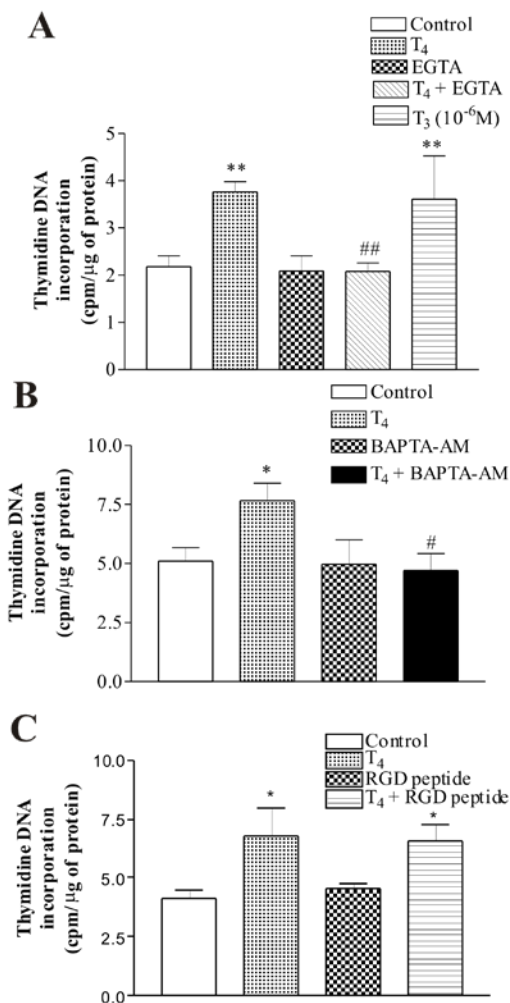


Fig. 3. (A) Influence of EGTA on stimulatory effect of T₄ in thymidine DNA incorporation in immature rat testes. Means \pm S.E.M. for control, T₄ (10⁻⁹ M), EGTA (2 mM) and T₃ (10⁻⁶ M), n= 4 for each group. ***P* < 0.01 compared with control group; ##*p* < 0.01 compared with T₄ group. (B) Effect of BAPTA-AM on stimulatory effect of T₄ in thymidine DNA incorporation in immature rat testes. Means \pm S.E.M. for control, T₄ (10⁻⁹ M), BAPTA-AM (50 μ M), n= 4 for each group. **P* < 0.05 compared with control group; #*p* < 0.05 compared with T₄ group. (C) Effect of RGD peptide on stimulatory effect of T₄ in thymidine DNA incorporation in immature rat testes. Means \pm S.E.M. for control, RGD (5

$\times 10^{-7}$ M), T_4 (10^{-9} M), $n = 5$ for each group. $*P < 0.05$ compared with control group. Pre-incubation time: 30 min; incubation time: 60 min.

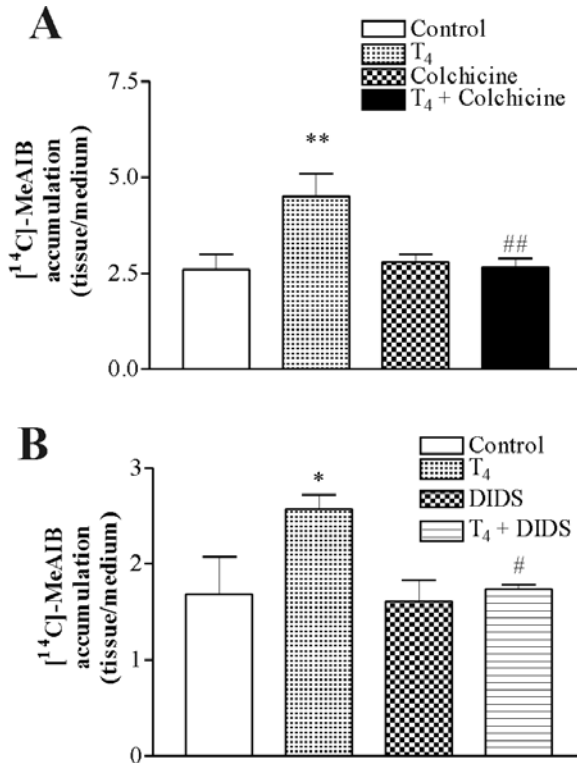


Fig. 4. (A) Effect of colchicine on stimulatory action of T_4 in $[^{14}\text{C}]\text{-MeAIB}$ accumulation in rat testes. Means \pm S.E.M. For control, $n = 4$; colchicine (10^{-6} M), $n = 5$; T_4 (10^{-9} M), $n = 5$. $**P < 0.01$ compared with control; $##p < 0.01$ compared with T_4 group. (B) Effect of DIDS on stimulatory action of T_4 in $[^{14}\text{C}]\text{-MeAIB}$ accumulation in rat testes. Means \pm S.E.M. for control, DIDS (200 μM), T_4 (10^{-9} M), $n = 4$ for each group. $*P < 0.05$ compared with control; $\#p < 0.05$ compared with T_4 group. Pre-incubation time: 30 min; incubation time: 60 min.

In order to investigate the effect of T_4 on secretory activity, rat Sertoli cells were stained with 3 μM quinacrine for 30 min. After wash,

cells were incubated with 10^{-9} M T_4 and immediately visualized under fluorescence illumination. Control group was incubated without hormone for the same period than treated group. Fig. 5 A and B represent the basal quinacrine exocytosis from 0 to 4 min in an individual Sertoli cell. Abundant fluorescent granules, distributed over cell cytoplasm, were observed at 0 min and they still remain at 4 min in control group. However, in T_4 -treated Sertoli cells no quinacrine fluorescence was detected after 4 min (Fig. 5C and D).

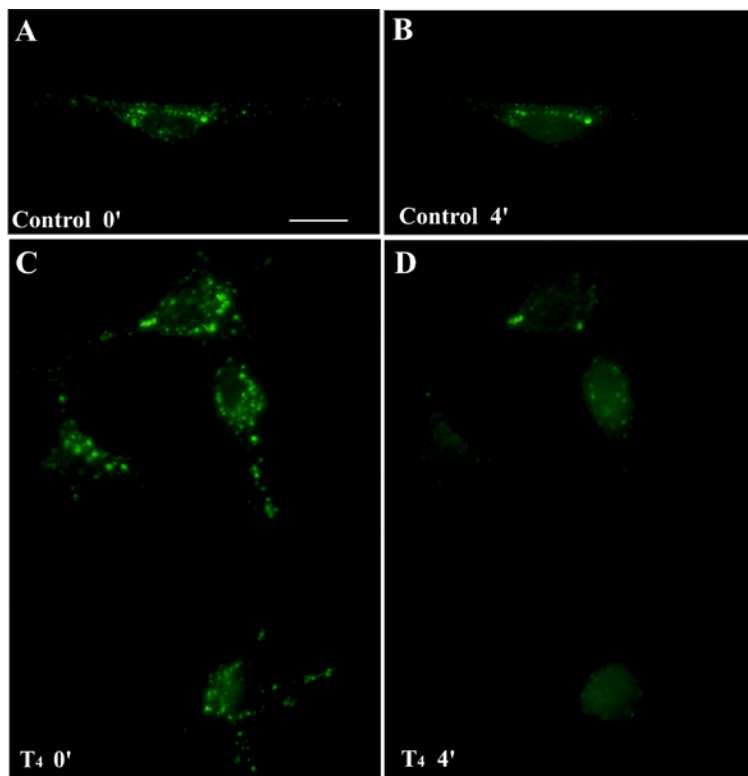


Fig. 5. Fluorescence images obtained from Sertoli cells stained with quinacrine. Quinacrine stains individual secretory vesicles in the cell cytoplasm. Sertoli cells in culture were incubated with $3 \mu\text{M}$ quinacrine for 30 min, washed and photographed under fluorescence illumination immediately (A and C) or every 1 min for 10 min of incubation either in the absence or presence of T_4 , respectively (B and D). Incubation of cells with 10^{-9} M T_4 caused fusion of

quinacrine-loaded vesicles to the plasma membrane and release of the fluorescent content into the surrounding medium, as seen by the loss of fluorescence from most vesicles located on the cell's periphery. This effect was observed after 4 min incubation period with T_4 . (A) Control, 0 min. (B) Control, 4 min. (C) T_4 , 0 min. (D) T_4 , 4 min. Experiments were performed 4 times with similar results. Bar = 10 μm .

Discussion

We have been demonstrated that beyond “classical” genomic effects of TH, T_4 acts on plasma membrane and modulates signal transduction via rapid responses in immature rat testis and Sertoli cells (Menegaz et al., 2006; 2010a). The system “A” of amino acid transport is exclusively a plasma membrane event and is regulated by FSH, retinol, 1,25(OH) $_2$ vitamin D $_3$ and also by TH (Cruz-Curte and Wassermann, 1985; Silva et al., 2002; Menegaz et al., 2009). The effect of T_4 on plasma membrane is characterized by the measurement of a specific and non-metabolic N-methylaminoisobutyric acid accumulation into the cells (Silva and Wassermann, 1999; Silva et al., 2001). Although a collection of effects reported to T_4 and/or T_3 , started at the plasma membrane level that culminates in rapid responses, there is no clear understand about direct physical interaction of TH in a specific site at plasma membrane in the testicular cells (Zamoner et al., 2011). We demonstrated that a deaminated T_4 derivative which inhibits binding and action of T_4 at the integrin receptor, blocks the stimulatory effect of T_4 in amino acid accumulation. As far as we know, it is the first demonstration of a compound able to displace and block a known plasma membrane event (amino acid transport system) stimulated by T_4 in rat testis. Similar to our results, it was demonstrated that tetrac was also able to inhibit nongenomic effect of T_4 (Bergh et al., 2005). Furthermore, several nongenomic actions of TH initiated at the plasma membrane were specifically inhibited by tetrac, an antagonist of integrin receptor-mediated nongenomic action of TH (Davis et al., 2010). Taking together, the tetrac results are therefore a probe of the involvement of integrin as a receptor to this nongenomic effect of T_4 in the testis.

Previously, we demonstrated that the nongenomic effect of T_4 on amino acid accumulation in Sertoli cells occurs through an individual mechanism and T_4 is 10 3 times more potent than T_3 (Menegaz et al., 2006). Surprisingly, rT_3 produced a significant stimulatory effect on

amino acid accumulation and was almost twice more potent than T_4 . Other groups reported the effect of rT_3 on actin polymerization (Leonard and Farwell, 1997), as well as a neuronal migration and neurite outgrowth regulated by both T_4 and rT_3 through a nongenomic mechanism (Farwell et al., 2005).

A large family of integrins is cell adhesion receptors; anchor properly cells to extracellular matrix locations and also mediate signal transduction into the cell (Calderwood et al., 2000). The tripeptide RGD (Arg-Gly-Asp), first described recognition site is a ligand for a most of α_v integrins, among them, $\alpha_v\beta_3$ (Vinatier, 1995; Kumar, 1998). A cell surface receptor for TH, $\alpha_v\beta_3$ integrin, was first described by Bergh et al. (2005). In order to analyze the role of integrin as receptor to mediate the stimulatory effect of T_4 on amino acid accumulation, we used the RGD peptide. As it can be observed, this peptide blocked 75% the stimulatory action of T_4 on amino acid accumulation. Taking into account the influence of tetrac and RGD on this membrane-initiated action of T_4 , it allows us to infer that integrin, probably $\alpha_v\beta_3$, mediates T_4 -triggered amino acid accumulation in the testis.

Rapid responses to T_4 in Sertoli cells were firstly demonstrated by the blockage of hyperpolarization induced by apamin, a specific blocker of Ca^{2+} -dependent K^+ channels (Menegaz et al., 2006). Taking it in account and a recent data reported to T_4 -induced $^{45}Ca^{2+}$ (Menegaz et al., 2010a), Fig. 2 shows that VDCCs mediate the majority of Ca^{2+} entrance stimulated by T_4 in immature rat testis. These results reinforce that the extracellular Ca^{2+} promptly participates in T_4 pathways as recently revised by Zamoner et al. (2011).

It is well-known that extracellular Ca^{2+} is a ubiquitous link able to connect an external information to a plasma membrane specific site of action and spread it's by an efficient and potent rapid signal transduction to regulate cytoskeleton organization, proteins traffic, enzymes activities, nucleus activation and a variety of cellular responses. So, further studies were carried out in order to understand if extracellular Ca^{2+} represents a T_4 -initiated plasma membrane effect that culminates in DNA activation by an intracellular cross-talk or it can quickly generate the rapid responses independently of DNA transcription.

Taking into account that T_4 and T_3 nuclear receptors are widely considered as sites of action that modulate gene expression and protein synthesis (Palmero et al., 1995; Arambepola et al., 1998; Okubo and Reddi, 2003) and, also by effectiveness of both iodothyronines on the stimulation of amino acid accumulation we used 10^{-6} M T_3 (Menegaz et al., 2006) as a positive control to thymidine DNA incorporation. Beyond

the known effect of both hormones on ^{14}C -thymidine DNA incorporation in immature rat testis, it was demonstrated that extracellular and intracellular Ca^{2+} are essential to observe the full stimulatory effect of T_4 on thymidine incorporation since as much EGTA as BAPTA-AM were able to block the hormone effect. In contrast, even in the presence of RGD, a peptide that blocks the binding of T_4 to integrin, T_4 was able to exhibit at the same magnitude thymidine DNA incorporation. Taking together the results from Fig. 3, they are in line with a variety of previous studies that demonstrated links between rapid responses mediated by plasma membrane effectors and alterations in nuclear activity (Hoffman et al., 2002; Farach-Carson and Davis, 2003; Zanatta et al., 2011). However, it is clear that the plasma membrane effect of T_4 on amino acid accumulation and rapid stimulatory effect of the hormone on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake is independent of its stimulatory action on DNA activation. In addition, from our point of view, the effect of T_4 -triggered by plasma membrane integrin seems to coordinate a rapid response not necessary connected to nuclear activity.

In order to clarify if the T_4 -induced amino acid stimulatory effect converges to cellular secretion, experiments involving cytoskeleton movement and ionic channel engaged with secretion were carried out. In this context, colchicine a microtubules disruptor and DIDS, a stilbene derivative which blocks ClC-3 outwardly rectifying chloride channels (Jentsch et al., 2002; Qu et al., 2003), were used to investigate their influence on intracellular substances or vesicles traffic on the testis. As it can be observed, both of them were able to nullify completely the stimulatory action of T_4 on amino acid accumulation. These results are in line with that demonstrated to follicle-stimulating hormone on amino acid uptake in the presence of colchicine (Wassermann et al., 1992) and more recently with the effect of $1,25(\text{OH})_2$ vitamin D_3 to increase exocytosis in TM4 sertoli cell line by ClC-3 activity (Menegaz et al., 2010b). The involvement of chloride channels in exocytosis event have been reported in a variety of endocrine tissues (Turner and Sedej, 2005; Xiaoyu et al., 2007; Menegaz et al., 2010b). In addition, it has been reported that the hormonal regulation of the secretion of Cl^- and K^+ -rich fluid by Sertoli cells is important in male reproductive processes. It involves multiple signaling pathways including a variety of second messengers and the modulation of ion channel activity (Auzanneau et al., 2006, 2008).

It seems that downstream pathways direction after T_4 -plasma membrane interaction depends on physiological demands to be accomplished. So, further studies were developed to highlight the T_4

rapid effect in this approach. Here, we found that T_4 was able to induce exocytosis in Sertoli cells in a very short-term effect compared to basal vesicular secretion from zero to 4 min. We conclude that T_4 appears to contribute as modulator of male reproductive functions at least in part by stimulating Sertoli cell secretory functions. Taken together, our results demonstrate for the first time that the effect of T_4 -initiated at plasma membrane by integrin interaction to increase amino acid accumulation is independent of nuclear activity and couple to exocytosis stimulation in immature rat Sertoli cells.

Acknowledgements

This work was supported by grants from MCT and CNPq (n° 471594/2010-5), CAPES/COFECUB n° 554/07, FAPESC-SC (n° FCTP1518/000) and CAPES/PPG-Biochemistry. APZ is registered on the Biochemistry Postgraduate Program of UFSC and is the recipient of a CNPq master fellowship (n° 553209/2009-4). We thank to department of BEG-CCB/UFSC for fluorescence microscopy facilities (FluorBEG) and to the biologist Chirle Ferreira for technical assistance.

References

- Arambepola NK, Bunick D, Cooke PS. 1998. Thyroid hormone and follicle-stimulating hormone regulate millerian-inhibiting substance messenger ribonucleic acid expression in cultured neonatal rat Sertoli cells. *Endocrinology* 139:4489–4495.
- Aranda A, Pascual A. 2001. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol. Rev.* 81:1269–1304.
- Auzanneau C, Norez C, Noël S, Jouglu C, Becq F, Vandebrouck C. 2006. Pharmacological profile of inhibition of the chloride channels activated by extracellular acid in cultured rat Sertoli cells. *Reprod Nutr Dev* 46:241-255.
- Auzanneau C, Norez C, Antigny F, Thoreau V, Jouglu C, Cantereau A, Becq F, Vandebrouck C. 2008. Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channels in cultured rat Sertoli cells regulate an acid sensing chloride. *Biochem Pharmacol* 75:476-483.
- Batra S, Sjögren C. 1983. Effect of estrogen treatment on calcium uptake by the rat uterine smooth muscle. *Life Sci* 32:315-319.
- Bergh JJ, Lin H-Y, Lansing L, Mohamed SN, Davis FB, Mousa S, Davis PJ. 2005. Integrin $\alpha v \beta 3$ contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology* 146:2864–2871.
- Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR. 2002. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev* 23:38–89.

- Calderwood DA, Shattil S, Ginsberg MH. 2000. Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. *J Biol Chem* 275:22607-22610.
- Cruz Curte A, Wassermann GF. 1985. Identification of amino acid transport systems stimulated by FSH in rat testis. *J Endocrinol* 106:291-294.
- Davis PJ, Zhou M, Davis FB, Lansing L, Mousa SA, Lin HY. 2010. Mini-review: cell surface receptor for thyroid hormone and nongenomic regulation of ion fluxes in excitable cells. *Physiol Behav* 99:237-239.
- Dorrington JH, Roller NF, Fritz IB. 1975. Effects of follicle-stimulating hormone on cultures of Sertoli cell preparations. *Mol Cell Endocrinol* 3:57-70.
- Engler D, Burger AG. 1984. The deiodination of the iodothyronines and of their derivatives in man. *Endocrine Review* 5:151-184.
- Farach-Carson MC, Davis PJ. 2003. Steroid hormone interactions with target cells: cross talk between membrane and nuclear pathways. *J Pharmacol Exp Ther* 307:839-845.
- Farwell AP, Dubord-Tomasetti SA, Pietrkowski AZ, Stachelek SJ, Leonard JL. 2005. Regulation of cerebellar neuronal migration and neurite outgrowth by thyroxine and 3,3',5'-triiodothyronine. *Brain Res Dev Brain Res* 154:121-135.
- Galdieri M, Ziparo E, Palombi F, Russo M, Stefanini M. 1981. Pure Sertoli cell cultures: a new model for the study of somatic-germ cell interactions. *J Androl* 5:249-254.

- Harper ME, Seifert EL. 2008. Thyroid hormone effects on mitochondrial energetic. *Thyroid* 18:145-156.
- Hoffman SJ, Vasko-Moser J, Miller WH, Lark MW, Gowen M, Stroup G. 2002. Rapid inhibition of thyroxine-induced bone resorption in the rat by an orally active vitronectin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther.* 302:205-211.
- Jannini EA, Dolci S, Ulisse S, Nikodem VM. 1994. Developmental regulation of the thyroid hormone receptor $\alpha 1$ mRNA expression in rat testis. *Mol Endocrinol* 8:89-96.
- Jannini EA, Carosa E, Rucci N, Screponi E, D'Armiento M. 1999. Ontogeny and regulation of variant thyroid hormone receptor isoforms in developing rat testis. *J Endocrinol Invest* 22:843-848.
- Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, Anselm A. 2002. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev* 82:503-568.
- Leonard JL, Farwell AP. 1997. Thyroid hormone-regulated actin polymerization in brain. *Thyroid* 7:147-151.
- Lin HY, Sun M, Tang HY, Lin C, Luidens MK, Mousa SA, Incerpi S, Drusano GL, Davis FB, Davis PJ. 2009. L-Thyroxine vs. 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and cell proliferation: activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Am J Physiol Cell Physiol* 296: C980-C991.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-267.
- Lucas TF, Siu ER, Esteves CA, Monteiro HP, Oliveira CA, Porto CS, Lazari MF. 2008. 17 β -estradiol induces the translocation of the

estrogen receptors ESR1 and ESR2 to the cell membrane, MAPK3/1 phosphorylation and proliferation of cultured immature rat Sertoli cells. *Biol Reprod* 78:101-114.

Kavok NS, Krasilnikova OA, Babenco NA. 2001. Thyroxine signal transduction in liver cells involves phospholipase C and phospholipase D activation: Genomic independent action of thyroid hormone. *Cell Biol.* 2:5-12.

Kumar CC. 1998. Signaling by integrin receptors. *Oncogene* 17:1365-1373.

Menegaz D, Zamoner A, Royer C, Leite LD, Bortolotto ZA, Silva FRMB. 2006. Rapid responses to thyroxine in the testis: active protein synthesis-independent pathway. *Mol Cell Endocrinol* 246:128-134.

Menegaz D, Rosso A, Royer C, Leite LD, Santos ARS, Silva FRMB. 2009. Role of $1\alpha,25(\text{OH})_2$ vitamin D_3 on α -[1-14C]MeAIB accumulation in immature rat testis. *Steroids* 74:264-269.

Menegaz D, Royer C, Rosso A, De Souza AZP, Santos ARS, Silva FRMB. 2010a. Rapid stimulatory effect of thyroxine on plasma membrane transport systems: Calcium uptake and neutral amino acid accumulation in immature rat testis. *Int J of Biochem Cell Biol* 42:1046-1051.

Menegaz D, Barrientos-Duran A, Kline A, Silva FRMB, Norman AW, Mizwicki MT, Zanello LP. 2010b. $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D_3 stimulation of secretion via chloride channel activation in Sertoli cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 74:264-269.

Okubo Y, Reddi AH. 2003. Thyroxine downregulates Sox9 and promotes chondrocyte hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 306:186-190.

- Palmero S, Prati M, Bolla F, Fugassa E. 1995. Tri-iodothyronine directly affects rat Sertoli cell proliferation and differentiation. *J Endocrinol* 145:355–362.
- Qu Z, Wei RW, Hartzell HC. 2003. Characterization of Ca^{2+} -activated Cl^- currents in mouse kidney inner medullary collecting duct cells. *Am J Physiol* 285:F326-F335.
- Rao JN, Liang JY, Chakraborti P, Feng P. 2003. Effect of thyroid hormone on the development and gene expression of hormone receptors in rat testes in vivo. *J Endocrinol Invest* 26:435–443.
- Silva FRMB, Wassermann GF. 1999. Kinetics of FSH stimulation of methylaminoisobutyric acid uptake in Sertoli cell in culture from testes of 15 day-old rats. *Med Sci Res* 27:627-630.
- Silva FRMB, Leite LD, Barreto KP, D'Agostini C, Zamoner A. 2001. Effect of 3,5,3'- Triiodo-L-Thyronine on amino acid accumulation and membrane potential in Sertoli cells of the rat testis. *Life Sci* 69:977-986.
- Silva FRMB, Leite LD, Wassermann GF. 2002. Rapid signal transduction in Sertoli cells. *Eur J Endocrinol* 147:425-433.
- Turner JE, Sedej S, Rupnik M. 2005. Cytosolic Cl^- ions in the regulation of secretory and endocytotic activity in melanotrophs from mouse pituitary tissue slices. *J Physiol* 566:443-453.
- Vinatier D. 1995. Integrins and reproduction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 59:71-81.
- Volpato KC, Menegaz D, Leite LD, Barreto KP, De Vilhena GE, Silva FRMB. 2004. Involvement of K^+ channels and calcium-dependent

pathways in the action of T_3 on amino acid accumulation and membrane potential in Sertoli cells of immature rat testis. *Life Sci* 23:1277-1288.

Wassermann GF, Bloch LM, Grillo ML, Silva FRMB, Loss ES, McConnell LL. 1992. Biochemical factors involved in the FSH action on amino acid transport in immature rat testes. *Horm Met Res* 24:276-279.

Xiaoyu Z, Payal B, Melissa O, Zanello LP. 2007. $1,25(OH)_2$ -Vitamin D_3 membrane initiated calcium signaling modulates exocytosis and cell survival. *J. Steroid Biochem Mol Biol* 103:457-461.

Yen PM. 2001. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev* 81:1097-1142.

Yen PM, Ando S, Feng X, Liu Y, Maruvada P, Xia X. 2006. Thyroid hormone action at the cellular, genomic and target gene levels. *Mol Cell Endocrinol* 246:121-127.

Zamoner A, Corbelini PF, Funchal C, Menegaz D, Silva FRMB, Pessoa-Pureur R. 2005. Involvement of calcium-dependent mechanisms in T_3 -induced phosphorylation of vimentin of immature rat testis. *Life Sci* 77:3321-3335.

Zamoner A, Pureur RP, Silva FRMB. 2011. Membrane-initiated actions of thyroid hormones on the male reproductive system. *Life Sci*.

Zanatta L, Bouraima-Lelong H, Delalande C, Silva F.R.M.B, Carreau S. 2011. Regulation of aromatase expression by $1\alpha,25(OH)_2$ vitamin D_3 in rat testicular cells. *Reprod Fert Develop* 23:725-735.

4. DISCUSSÃO

Já está bem estabelecido que os HT agem nas células através de mecanismo genômico e/ou através de mecanismo não-genômico. O hormônio T_4 age na membrana plasmática e modula vias de transdução de sinais através de respostas rápidas em testículos e células de Sertoli de ratos imaturos (MENEGAZ et al., 2006; 2010a). O sistema “A” de transporte de aminoácidos é exclusivamente um evento de membrana e é regulado por FSH, retinol, $1,25(OH)_2$ vitamina D_3 e também pelos HT (CRUZ-CURTE; WASSERMANN, 1985; SILVA et al., 2002; MENEGAZ et al., 2009).

Estudos realizados em testículos de ratos imaturos mostraram que os hormônios T_4 e T_3 têm um efeito estimulatório no transporte de aminoácidos neutros, sendo que o T_4 é 10^3 vezes mais potente que o T_3 (VOLPATO et al., 2004; MENEGAZ et al., 2006). No presente trabalho, mostramos que um dos metabólitos do T_4 , o T_{3r} , produziu um significativo efeito estimulatório no transporte de aminoácidos em testículos de ratos imaturos, e assim como o T_4 , o efeito do T_{3r} é 10^3 vezes mais potente que o T_3 . Trabalhos mostram que o T_4 e o T_{3r} , mas não o T_3 , aumentam rapidamente (~10-20 minutos) o conteúdo de F-actina em astrócitos (SIEGRIST-KAISER et al., 1990; FARWELL et al., 2006), assim como outros estudos mostram que o efeito do T_{3r} é semelhante ao efeito do T_4 na regulação não-genômica da atividade da deiodinase D2 e na organização dos microfilamentos em astrócitos e neurônios (LEONARD; FARWEEL, 1997; SIEGRIST-KAISER et al., 1990; FARWELL et al., 2005; FARWELL; LEONARD, 2005). Estes estudos indicam a similaridade entre T_4 e T_{3r} nas ações não-genômicas efetuadas pelos mesmos, e relatos de que o T_{3r} é a iodotironina mais abundante durante a vida fetal (ROTI et al., 1982) poderiam justificar a ação deste metabólito em testículos de ratos imaturos.

Farwell et al. (1995) sugeriram que o receptor para os HT poderia estar em uma integrina na superfície das células. Em 2005, Bergh et al. descreveram este receptor para T_4 e T_3 no dímero de integrina $\alpha_v\beta_3$, na membrana plasmática de fibroblastos. A integrina $\alpha_v\beta_3$ é expressa na superfície de diferentes tipos celulares, como em células endoteliais e células vasculares (CHEN, 2006), células tumorais (MOUSA et al., 2005), osteoblastos (SCARLETT et al., 2008) entre outras. Devido à presença desta integrina na superfície das células e

desta apresentar um sítio receptor para os HT, diversas ações destes hormônios iniciadas no receptor de integrina já foram demonstradas (BERG et al., 2005; MOUSA et al., 2005; DAVIES et al., 2006; CHEN, 2006; SCARLETT et al., 2008; LIN et al., 2009; LUIDENS et al., 2010).

O tripeptídeo RGD (*Arg-Gly-Asp*), primeiro sítio de reconhecimento descrito, é um ligante para a maioria das integrinas α_v , entre elas a integrina $\alpha_v\beta_3$ (VINATIER, 1995; KUMAR, 1998). Sendo que a ligação do T_4 e T_3 a este receptor de membrana é bloqueada pelo peptídeo RGD e por anticorpos anti-integrina, se sugere que o sítio receptor destes hormônios está próximo ou no sítio de reconhecimento RGD na integrina $\alpha_v\beta_3$. Como o análogo desaminado do T_4 , o tetrac, também impede a ligação destes hormônios ao receptor de integrina, ele pode ser usado para determinar se há participação do receptor de integrina nos efeitos dos HT iniciados na membrana plasmática (BERG et al., 2005; DAVIES et al., 2006).

Um dos objetivos deste estudo foi determinar se a integrina $\alpha_v\beta_3$ está envolvida no efeito estimulatório do T_4 no transporte de aminoácidos neutros nos testículos de ratos imaturos, porém, a presença desta integrina nas células testiculares ainda é desconhecida. Neste trabalho mostramos que a ação estimulatória do T_4 no transporte de aminoácidos foi inibida na presença do tetrac e do peptídeo RGD, sendo que este bloqueou 75% da ação do T_4 , sugerindo que a integrina $\alpha_v\beta_3$ está presente na membrana das células testiculares e que o transporte de aminoácidos estimulado por T_4 seja um efeito resultante da ligação deste hormônio à integrina.

O Ca^{2+} regula muitos processos celulares, incluindo secreção de hormônios, de neurotransmissores e de proteínas. Muitos dos efeitos não-genômicos dos HT envolvem respostas celulares mediadas por Ca^{2+} em diferentes tipos celulares (SEGAL, 1990; VOLPATO et al., 2004; ZAMONER et al., 2005, 2007a, 2008, MENEGAZ et al., 2010a), e estudos relatam a presença de canais de cálcio dependentes de voltagem (CCDV) do tipo L em células de Sertoli (D'AGOSTINO; MENE; STEFANINI, 1992; SILVA et al., 2002; ZAMONER; PESSOA-PUREUR; SILVA, 2011).

Respostas rápidas do T_4 em células de Sertoli foram primeiramente demonstradas através da hiperpolarização imediata

destas células na presença do hormônio. A caracterização de canais de K^+ dependentes de Ca^{2+} foi confirmada com a apamina, que bloqueou completamente o efeito hiperpolarizante induzido pelo hormônio (MENEGAZ et al., 2006). Considerando este evento e recentes estudos que relataram a captação de $^{45}Ca^{2+}$ induzida por T_4 , mostramos que os CCDV medeiam a maior parte da entrada de Ca^{2+} estimulado por T_4 em testículos de ratos imaturos. Estes resultados reforçam que o Ca^{2+} extracelular participa das vias de ativação do T_4 , como foi recentemente revisado por Zamoner et al., 2011.

O Ca^{2+} é capaz de ligar uma informação externa em um sítio de ação específico na membrana plasmática e repassar este sinal através da ativação de vias de transdução de sinais rápidas. Este sinal pode regular a organização do citoesqueleto, tráfego de proteínas, atividade de enzimas, ativação nuclear e uma variedade de respostas celulares. Vários estudos já foram realizados para compreender se o Ca^{2+} extracelular representa um efeito na membrana plasmática iniciado pelo T_4 com consequente ativação nuclear ou se ele pode gerar respostas rápidas independentes da transcrição gênica.

Sabendo que os receptores nucleares para T_4 e T_3 são considerados sítios de ação que modulam a expressão gênica e síntese de proteínas (PALMERO et al., 1995; ARAMBEPOLA et al., 1998; OKUBO; REDDI, 2003), usamos o T_3 (10^{-6} M) (MENEGAZ et al., 2006) como controle positivo para a incorporação de timidina ao DNA. Além do conhecido efeito de ambos os hormônios na incorporação de ^{14}C -timidina no DNA em testículos de ratos imaturos, foi demonstrado que o Ca^{2+} intra e extracelular são essenciais para o completo efeito estimulatório do T_4 na incorporação de timidina, sendo que EGTA e BAPTA-AM inibiram o efeito do hormônio. Ao contrário, na presença do peptídeo RGD, o efeito estimulatório do T_4 na incorporação de timidina não foi alterado. Os resultados mostrados na figura 3 estão de acordo com estudos prévios que mostram a ligação entre respostas rápidas mediadas por efetores na membrana plasmática e alterações na atividade nuclear (HOFFMAN et al., 2002; FARACH-CARSON; DAVIES, 2003; ZANATTA et al., 2011). No entanto, está claro que o efeito do T_4 no acúmulo de aminoácidos e o rápido efeito estimulatório do hormônio na captação de $^{45}Ca^{2+}$ é independente da ativação nuclear. Além disso, o efeito desencadeado pela ligação do T_4 à integrina presente na membrana plasmática parece ser responsável pelas respostas rápidas, mas não está conectado com a atividade nuclear.

Para esclarecer se o efeito estimulatório no transporte de aminoácidos induzido por T_4 converge para o evento de secreção celular, experimentos envolvendo o movimento do citoesqueleto e canais iônicos envolvidos com secreção foram realizados. Neste contexto, a colchicina, um inibidor da polimerização dos microtúbulos e o DIDS, um derivado do estilbeno que bloqueia os canais de Cl^- do tipo CIC-3 (JENTSCH et al., 2002; QU et al., 2003), foram usados para investigar a influência dos microtúbulos e dos canais CIC-3 no tráfego de substâncias ou vesículas intracelulares nos testículos. Como observado, ambos inibiram completamente a ação estimulatória do T_4 no acúmulo de aminoácidos. Estes resultados corroboram com o que foi demonstrado para o FSH no transporte de aminoácidos na presença de colchicina (WASSERMANN et al., 1992) e, mais recentemente, no efeito da $1,25(OH)_2$ vitamina D_3 no aumento da exocitose em linhagem de células TM4 (MENEGAZ et al., 2010b). O envolvimento dos canais de Cl^- na exocitose foi relatado em uma variedade de tecidos (TURNER; SEDEJ, 2005; XIAOYU et al., 2007; MENEGAZ et al., 2010b). Além disso, a regulação hormonal da secreção do fluido rico em Cl^- e K^+ pelas células de Sertoli é importante para os processos reprodutivos masculinos. Trata-se de múltiplas vias de sinalização incluindo uma diversidade de segundos mensageiros e a modulação da atividade de canais iônicos (AUZZANNEAU et al., 2006, 2008).

Após a interação do T_4 com a membrana plasmática, a direção das vias de sinalização depende da demanda fisiológica da célula e/ou tecido. Vários estudos foram realizados para compreender o efeito rápido do T_4 nesta abordagem. Neste trabalho vimos que este hormônio foi capaz de induzir exocitose em células de Sertoli em um tempo muito curto, comparado à secreção vesicular basal, o que corrobora com resultados mostrados por Menegaz et al. (2010b), que demonstraram que em linhagens de células TM4 o hormônio $1,25(OH)_2-D_3$, através de ações não-genômicas, estimula o processo exocítico acoplado às correntes de cloreto e fosforilação dos canais CIC-3.

5. CONCLUSÕES

Dos resultados apresentados, podemos concluir que:

O hormônio T_4 e o metabólito T_{3r} estimulam o transporte de aminoácidos, já o análogo tetrac não alterou o transporte basal, mas foi efetivo em inibir a ação do T_4 em testículos de ratos imaturos.

O receptor de integrina $\alpha_v\beta_3$ pode estar envolvido no efeito estimulatório do T_4 no transporte de aminoácidos.

O efeito estimulatório do T_4 na captação de Ca^{2+} é mediado por canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem.

O efeito estimulatório do T_4 na incorporação de timidina no DNA é dependente do Ca^{2+} intra e extracelular e independente da interação do hormônio com a integrina na membrana plasmática.

O efeito estimulatório do T_4 no transporte de aminoácidos depende da integridade dos microtúbulos do citoesqueleto celular e da atividade dos canais de Cl^- do tipo CIC-3.

O T_4 estimula a exocitose, exibindo uma rápida resposta das células de Sertoli de ratos imaturos.

Através dos resultados do presente trabalho, concluímos que o T_4 parece contribuir como modulador das funções do sistema reprodutor masculino, pelo menos em parte, estimulando as funções secretórias das células de Sertoli. Os resultados em conjunto, demonstram pela primeira vez, o efeito do T_4 iniciado na membrana plasmática pela ligação do mesmo na integrina e estimulando o transporte de aminoácidos, o qual é independente da síntese de proteínas e estimula o processo de exocitose em células de Sertoli imaturas (Figura 7).

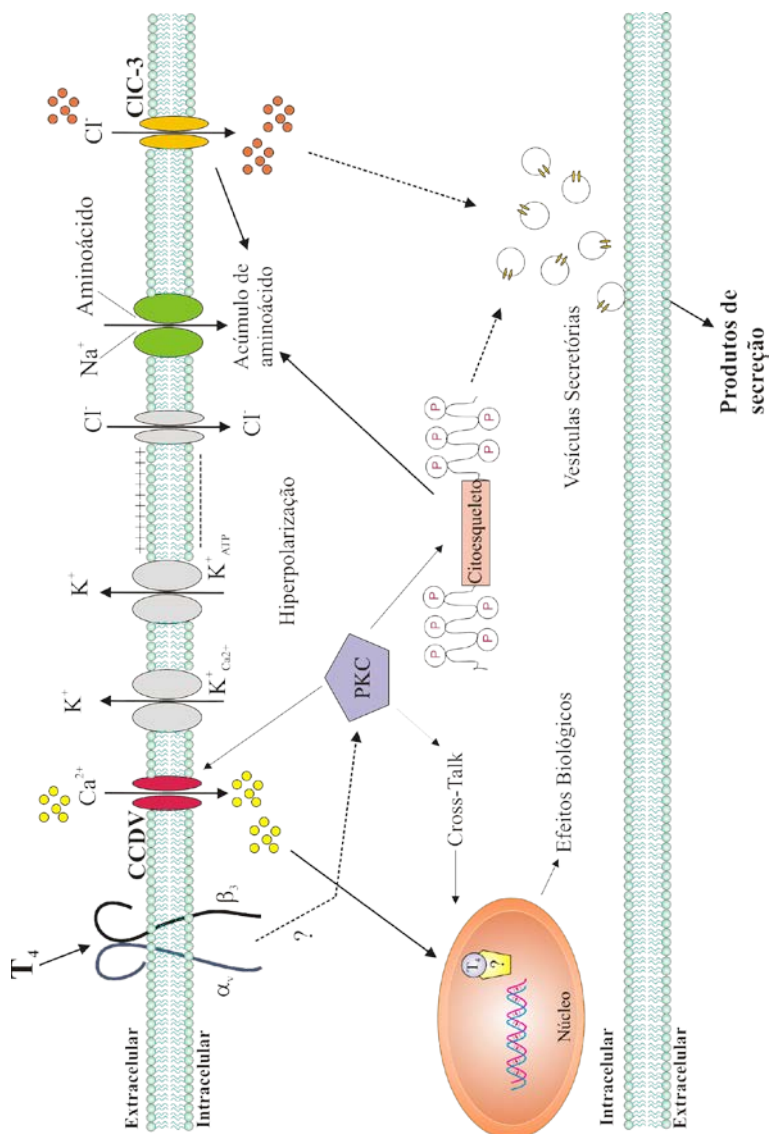


Figura 7 - Hipótese do mecanismo de ação do hormônio T_4 em células de Sertoli de ratos imaturos. A interação do hormônio T_4 com a integrina $\alpha_v\beta_3$ presente na membrana plasmática das células promove a abertura dos canais de K^+ dependentes de ATP (K^+_{ATP}) e dependentes de Ca^{2+} ($K^+_{Ca^{2+}}$) e canais de Cl^- , provocando uma hiperpolarização. Esta hiperpolarização induz a abertura dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem e a captação de Ca^{2+} com consequente

despolarização o que desencadeia o co-transporte Na^+ -aminoácido. Além disso, o Ca^{2+} participa das ações nucleares do T_4 , assim como, ativa PKC que regula a atividade dos canais iônicos e do citoesqueleto celular e/ou promove um “*cross-talk*” intracelular, ativando a transcrição gênica. Também, com o auxílio dos microtúbulos do citoesqueleto e dos canais de Cl^- do tipo CLC-3, o hormônio T_4 estimula a exocitose de vesículas através de mecanismo de ação não-genômico.

6. PERSPECTIVAS

A caracterização da integrina envolvida na interação do hormônio T_4 e/ou dos HT na membrana plasmática das células de Sertoli e o mecanismo de ação do hormônio para a alteração da atividade celular por uma via não-genômica, culminando em atividade enzimática, excitose, entre outras, ou através de inter-relações dos efeitos iniciados na membrana plasmática com a atividade nuclear (síntese de proteína, proliferação celular, etc) poderiam determinar sítios intracelulares úteis para a intervenção de substâncias exógenas (fármacos) com potencial terapêutico.

7. REFERÊNCIAS

ALBELDA, S.M.; BUCK, C.A. Integrins and other cell adhesion molecules. **FASEB J**, v. 4, p. 2868-2880, 1990.

ALLARD, E.K.; JOHNSON, K.J.; BOEKELHEIDE, K. Colchicine disrupts the cytoskeleton of rat testis seminiferous epithelium in a stage-dependent manner. **Biol Reprod**, v. 48, p. 143-153, 1993.

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

AUNIS, D.; BADER, M.F. The cytoskeleton as a barrier to exocytosis in secretory cells. **J. Exp. Biol.**, v. 139, p. 253-266, 1988.

AUZANNEAU, C.; THOREAU, V.; KITZIS, A.; BECQ, F. A novel voltage-dependent chloride current activated by extracellular acidic pH in cultured rat Sertoli cells. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 19230-19236, 2003.

AUZANNEAU, C.; NOREZ, C.; NOEL, S.; JOUGLA, C.; BECQ, F.; VANDEBROUCK, C. Pharmacological profile of inhibition of the chloride channels activated by extracellular acid in cultures rat Sertoli cell. **Reprod. Nutr. Dev.**, v. 46, p. 241-255, 2006.

AUZANNEAU, C.; NOREZ, C.; ANTIGNY, F.; THOREAU, V.; JOUGLA, C.; CANTEREAU, A.; BECQ, F.; VANDEBROUCK, C. Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channels in cultured rat Sertoli cells regulate an acid sensing chloride. **Biochem Pharmacol**, v. 75, p. 476-483, 2008.

AVILA, J. Microtubule functions. **Life Sci.**, v. 50 (5), p. 327-334, 1992.

BAL-PRICE, A.; MONEER, Z.; BROWN, G.C. Nitric oxide induces rapid, calcium-dependent release of vesicular glutamate and ATP from cultured rat astrocytes. **Glia**, v. 40(3), p. 312-23, 2002.

BAQUI, M.M.; GEREBEN, B.; HARNEY, J.W.; LARSEN, P.R.; BIANCO, A.C. Distinct subcellular localization of transiently expressed types 1 and 2 iodothyronine deiodinases as determined by immunofluorescence confocal microscopy. **Endocrinology**, v. 141, p. 4309–4312, 2000.

BAQUI, M.; BOTERO, D.; GEREBEN, B.; CURCIO, C.; HARNEY, J.W.; SALVATORE, D.; SORIMACHI, K.; LARSEN, P.R.; BIANCO, A. C. Human type 3 iodothyronine selenodeiodinase is located in the plasma membrane and undergoes rapid internalization to endosomes. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 1206–1211, 2003.

BARG, S.; HUANG, P.; ELIASSON, L. Priming of insulin granules for exocytosis by granular Cl⁻ uptake and acidification. **Journal of Cell Science**, v. 114, p. 2145-2154, 2001.

BATES, J.M.; St GERMAIN, D.L.; GALTON, V.A. Expression profiles of the three iodothyronine deiodinases, D1, D2, and D3, in the developing rat. **Endocrinology**, v. 140, p. 844–851, 1999.

BATRA, S.; SJÖGREN, C. Effect of estrogen treatment on calcium uptake by the rat uterine smooth muscle. **Life Science**, v. 32, p. 315–319, 1983.

BAUMANN, C.T.; MARUVADA, P.; HAGER, G.L.; YEN, P.M. Nuclear cytoplasmic shuttling by thyroid hormone receptors. Multiple protein interactions are required for nuclear retention. **J Biol Chem**, v. 276, p. 11237-11245, 2001.

BERGH, J.J.; LIN, H.Y.; LANSING, L.; MOHAMED, S.N.; DAVIS, F.B.; MOUSA, S.; DAVIS, P.J. Integrin $\alpha_v\beta_3$ contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. **Endocrinology**, v. 146, p. 2864-2871, 2005.

BERRIDGE, M.J.; BOOTMAN, M.D.; LIPP, P. Calcium – a life and death signal. **Nature**, v. 395, p. 645-648, 1998.

BERRIDGE, M.J.; BOOTMAN, M.D.; RODERICK, H.L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. **Nature reviews - molecular cell biology**, v. 4, p. 517-529, 2003.

BIANCO, A.C.; SALVATORE, D.; GEREBEN, B.; BERRY, M.J.; LARSEN, P.R. Biochemistry, cellular and molecular biology and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. **Endocr. Rev.**, v. 23, p. 38–89, 2002.

BIKHASI, A.B.; ABU SALBI, M.N.; ITANI, J.H. Transcellular mechanisms of amino acid uptake by distal rat ileum in situ. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 80, n. 1, p. 5-9, 1985.

BUNN, C.F., HEIDIG, J.A., FREIDINGER, K.E., STANKIEWICZ, T.A., WEAVER, B.S., MCGREW, J., ALISSON, L.A. Nucleocytoplasmic shuttling of the thyroid hormone receptor α . **Mol Endocrinol**, v. 15, p. 512-533, 2001.

BUZZARD, J.J.; 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. 664-669, 2000.

CAI, W.; CHEN, X. Anti-angiogenic cancer therapy based on integrin α v β 3 antagonism. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 6, p. 407-428, 2006.

CALDERWOOD, D.A.; SHATTIL, S.J.; GINSBERG, M.H. Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. **J Biol Chem**, v. 275, p. 22607-22610, 2000.

CAMPOS-BARROS, A.; HOELL, T.; MUSA, A.; SAMPAOLO, S.; STOLTENBURG, G.; PINNA, G.; ERAVCI, M.; MEINHOLD, H.; BAUMGARTNER, A. Phenolic and tyrosyl ring iodothyronine deiodination and thyroid hormone concentrations in the human central nervous system. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 81, p. 2179–2185, 1996.

CAO, X.; KAMBE, F.; MOELLER, L.C.; REFETOFF, S.; SEO, H. Thyroid hormone induces rapid activation of Akt/protein kinase B-mammalian target of rapamycin-p70S6K cascade through phosphatidylinositol 3-kinase in human fibroblasts. **Mol Endocrinol**, v. 19, p. 102-112, 2005.

CARAFOLI, E. Calcium – a universal carrier of biological signals. **The Federation of European Biochemical Societies Journal**, v. 272, p. 1073-1089, 2005.

CARANI, C.; ISIDORI, A.M.; GRANATA, A.; CAROSA, E.; MAGGI, M.; LENZI, A.; JANNINI, E.A. Multicenter study on the prevalence of sexual symptoms in male hypo- and hyperthyroid patients. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 90, p. 6472-6479, 2005.

CATTERALL WA. Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. **Annual Review of Cell Biology**, v. 16, p. 521-555, 2000.

CHEN, X. Multimodality imaging of tumor integrin $\alpha\beta 3$ expression. **Mini Rev Med Chem**, v. 6, p. 227-234, 2006.

CHENG, C.Y.; MRUK, D.D. The biology of spermatogenesis: the past, present and future. **Phil. Trans. R. Soc. B**, v. 365, p. 1459-1453, 2010.

CHENG, S.Y., LEONARD, J.L., DAVIS, P.L. Molecular aspects of thyroid hormone actions. **Endocrine Reviews**, v. 31, p. 139-170, 2010.

CLAPHAM, D.E. Calcium signaling. **Cell**, v. 131, p. 1047-1058, 2007.

COOKE, P.S.; ZHAO, Y.D.; BUNICK, D. Triiodothyronine inhibits proliferation and stimulates differentiation on cultured neonatal Sertoli cells: possible mechanism for increased adult testis weight and sperm production induced by neonatal goitrogen treatment. **Biology of Reproduction**, v. 51, p. 1000-1005, 1994.

COOKE, P.S. Thyroid hormone and the regulation of testicular development. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p.333-341, 1996.

CRAELIUS, W.; GREEN, W.L.; HARRIS, D.R. Acute effects of thyroid hormone on sodium currents in neonatal myocytes. **Biosci Rep**, v. 10, p. 309-315, 1990.

CRUZ-CURTE, A.; WASSERMANN, G.F. Identification of amino acid transport systems stimulated by FSH in rat testes. **J. Endocrinol.**, v. 106, p. 291-294, 1985.

CURCIO, C.; BAQUI, M.M.; SALVATORE, D.; RIHN, B.H.; MOHR, S.; HARNEY, J.W.; LARSEN, P.R., BIANCO, A.C. The human type 2 iodothyronine deiodinase is a selenoprotein highly expressed in a mesothelioma cell line. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 30183–30187, 2001.

D'AGOSTINO, A.; MENE, P.; STEFANINI, M. Voltage-gated calcium channels in rat Sertoli cell. **Biology of Reproduction**, v. 46, p. 414-418, 1992.

D'AREZZO, S.; INCERPI, S.; DAVIS, F.B.; ACCONCIA, F.; MARINO, M.; FARIAS, R.N.; DAVIS, P.J. Rapid non-genomic effects of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine on the intracellular pH of L-6 myoblasts are mediated by intracellular calcium mobilization and kinase pathways. **Endocrinology**, v. 145, p. 5694-5703, 2004.

DAVIS, P.J., DAVIS, F.B., CODY, V. Membrane receptor mediating thyroid hormone action. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 16, p. 429-435, 2005.

DAVIES, F.B.; TANG, H.Y.; SHIH, A.; KEATING, T.; LANSING, L.; HERCBERGS, A.; FENSTERMAKER, R.A.; MOUSA, A.; MOUSA, S.A.; DAVIES, P.J.; LIN, H.Y. Acting via a cell surface receptor, thyroid hormone is a growth factor for glioma cells. **Cancer Res**, v. 66, p. 7270-7275, 2006.

DAVIS, P.J., LEONARD, J.L., DAVIS, F.B. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 29, p. 211-218, 2008.

DAVIS, P.J.; DAVIS, F.B.; LIN, H.Y.; MOUSA, S.A.; ZHOU, M.; LUIDENS, M.K. Translational implications of nongenomic actions of thyroid hormone initiated at its integrin receptor. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 297, p. 1238-1246, 2009.

DAVIS, J.P.; ZHOU, M.; DAVIS, F.B.; LANSING, L.; MOUSA, S.A.; LIN, H-Y. Mini-Review: Cell surface receptor for thyroid hormone and nongenomic regulation of ion fluxes in excitable cells. **Physiology & Behavior**, v. 99, p. 237-239, 2010.

DAVIS, P.J.; DAVIS, F.B.; MOUSA, S.A.; LUIDENS, M.K.; LIN, H.Y. Membrane receptor for thyroid hormone: physiologic and

pharmacologic implications. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 51, p. 99-115, 2011.

DE FRANÇA, L.R.; HESS, R.A.; COOKE, P.S.; RUSSEL, L.D. Neonatal hypothyroidism caused delayed Sertoli cell maturation in rats treated with propylthiouracil: evidence that the Sertoli cell controls testis growth. **Anatomical Record**, v. 242, p. 57-69, 1995.

DEMALI, K.A.; BURRIDGE, K. Coupling membrane protrusion and cell adhesion. **J Cell Sci**, v. 116, p. 2389-2397, 2003.

DIERICH, A.; SAIRMA, M.R.; MONACO, L.; FIMIA, G.M.; GANSMULLER, A.; LEMEUR, M.; SASSONE-CORSI, P. Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. **PANAS**, v. 95, p. 13612-13617, 1998.

ECHARRI, A.; MURIEL, O.; DEL POZO, M.A. Intracellular trafficking of raft/caveolae domains: Insights from integrin signaling. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 18, p. 627-637, 2007.

FARACH-CARSON, M.C.; DAVIS, P.J. Steroid hormone interactions with target cells: cross talk between membrane and nuclear pathways. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 307, p. 839-845, 2003.

FARWELL, A.P.; DUBORD-TOMASETTI, S.A.; PIETRZYKOWSKI, A.Z.; STACHELEK, S.J.; LEONARD, J.L. Regulation of cerebellar neuronal migration and neurite outgrowth by thyroxine and 3,3',5'-triiodothyronine. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 154, p. 121-135, 2005.

FARWELL, A.P.; LEONARD, J.L. Nongenomic actions of thyroid hormone during fetal brain development. **Curr Opin Endocrinol Metab**, v. 12, p. 17-22, 2005.

FARWELL, A.P., DUBORD-TOMASETTI, S.A., PIETRZYKOWSKI, A.Z., LEONARD, J.L. Dynamic nongenomic actions of thyroid hormone in the developing rat brain. **Endocrinology**, v. 147, p. 2567-2574, 2006.

- FAWCETT, D.W. Sistema Reprodutor Masculino. Em: **Tratado de Histologia**. 11 ed. México: Interamericana-McGraw-Hill, cap. 31, p. 802-857, 1993.
- FOSKETT K. CIC and CFTR chloride channel gating. **Annual Review of Physiology**, v. 60, p.689–717, 1998.
- FRAGALE, A.; AGUANNO S.; KEMP, M.; REEVES, M.; PRICE, K.; BEATTIE, R.; CRAIG, P.; VOLSEN, S.; SHER, E.; D'AGOSTINO, A. Identification and cellular localization of voltage-operated calcium channels in immature rat testis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 162, p. 25-33, 2000.
- FRANCAVILLA, S.; CORDESCHI, G.; PROPERZI, G.; DI CICCIO, 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 rat testis. **Journal of Endocrinology**, v. 129, p. 35-42, 1991.
- FRANKE, F.E.; PAULS, K.; REY, R.; MARKS, A.; BERGMANN, M.; STEGER, K. Differentiation markers of Sertoli cells and germ cells in fetal and early postnatal human testis. **Anatomy and Embryology**, v. 209, p. 169-177, 2004.
- FRANKE, W.W.; GRUND, C.; SCHMID, E. Intermediate-sized filaments present in Sertoli cells are of the vimentin type. **Eur J Cell Biol**, v. 19, p. 269-275, 1979.
- FUJISAWA, M. Cell-to-cell cross-talk in the testis. **Urol Res**, v. 29, p. 144-151, 2001.
- GALO, M.G.; UÑATES, L.E.; FARÍAS, R.N. Effect of membrane fatty acid composition on the action of thyroid hormone on (Ca²⁺ + Mg²⁺)-adenosine triphosphatase from rat erythrocyte. **J Biol Chem**, v. 256, p. 7113-7114, 1981.
- GECK, P.; HEINZ, E. Coupling in secondary transport. Effect of electrical potential on the kinetics of ion linked co-transport. **Acta Biochimica et Biophysica**, v. 4, n. 1, p. 49-63, 1976.

GEREGEN, B.; ZEÖLD, A.; DENTICE, M.; SALVATORE, D.; BIANCO, A.C. Activation and inactivation of thyroid hormone by deiodinases: local action with general consequences. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, p. 570-590, 2008.

GRESPIN, M.E.; BONAMY, G.M.; ROGGERO, V.R.; CAMERON, N.G.; ADAM, L.E.; ATCHISON, A.P.; FRATTO, V.M.; ALLISON, L.A. Thyroid hormone receptor $\alpha 1$ follows a cooperative CRM1/calreticulin-mediated nuclear export pathway. **J Biol Chem**, v. 283, p. 25576-25588, 2008.

GRISWOLD, M.D. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 411-416, 1998.

GUIDOTTI, G.G.; BORGUETTI, A.F.; GAZZOLA, G.C. The regulation of amino acid transport in animal cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 515, p. 329-366, 1978.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**, 11 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 1152 p, 2006.

HAMOULI-SAID, Z.; TAHARI, F.; HAMOUDI, F.; HADJ-BEKKOUCHE, F. Comparative study of the effects of pre and post natal administration of thyroid drug on testicular activity in adult rats. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 45, p. S51-S57, 2007.

HÄUSSINGER, D.; SCHLIESS, F. Osmotic induction of signaling cascades: role in regulation of cell function. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 255, p. 551-555, 1999.

HE, D.; ZHANG, D.; WEI, G.; LIN, T.; LI, X. Cytoskeleton vimentin disruption of mouse Sertoli cells injured by nitrogen mustard in vitro. **J Androl**, v. 28, p. 389-396, 2007.

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 cell numbers. **Endocrinology**, v. 132, p. 2607-2613, 1993.

HOFFMAN, S.J.; VASKO-MOSER, J.; MILLER, W.H.; LARK, M.W.; GOWEN, M.; STROUP, G. Rapid inhibition of thyroxine-induced bone

resorption in the rat by an orally active vitronectin receptor antagonist. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 302, p. 205-211, 2002.

HOFFMANN, G.; DIETZEL, I.D. Thyroid hormone regulates excitability in central neurons from postnatal rats. **Neuroscience**, v. 125, p. 369-379, 2004.

HOLSBERGER, D.R.; COOKE, P.S. Understanding the role of thyroid hormone in Sertoli cell development: a mechanistic hypothesis. **Cell and Tissue Research**, v. 322, p. 133-140, 2005.

HOLSBERGER, D.R.; KIESEWETTER, S.E.; COOKE, P.S. Regulation of neonatal Sertoli cell development by thyroid hormone receptor $\alpha 1$. **Biol Reprod**, v. 73, p. 396-403, 2005.

HUANG, S.A.; DORFMAN, D.M.; GENEST, D.R.; SALVATORE, D.; LARSEN, P.R. Type 3 iodothyronine deiodinase is highly expressed in the human uteroplacental unit and in fetal epithelium. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 88, p. 1384-1388, 2003.

HYNES, R.O. Integrins: versability, modulation and signaling in cell adhesion. **Cell**, v. 69, p. 11-25, 1992.

INCERPI, S.; LULY, P.; DE VITO, P.; FARIAS, R.N. Short-term effects of thyroid hormones on the Na/H antiport in L-6 myoblasts: high molecular specificity for 3,3,5-triiodo-L-thyronine. **Endocrinology**, v. 140, p. 683-689, 1999.

IZAWA, I.; INAGAKI, M. Regulatory mechanisms and functions of intermediate filaments: a study using site- and phosphorylation state-specific antibodies. **Cancer Sci**, v. 97, p. 167-174, 2006.

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.; ULISSE, S.; D'ARMIENTO, M. Thyroid hormone and male gonadal function. **Endocr Rev**, v. 16, p. 443-59, 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. **J. Endocrinol. Invest.**, v. 22 (11), p. 843-848, 1999.
- JANNINI, E.A.; CRESCENZI, A.; RUCCI, N.; SCREPONI, E.; CAROSA, E.; DE MATTEIS, A.; MACCHIA, E.; D'AMATI, G.; D'ARMIENTO, M. Ontogenic pattern of thyroid hormone receptor expression in the human testis. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 85, p. 3453-3457, 2000.
- JEGOU, B.; SHARPE, R.M. Paracrine mechanisms in testicular control. In **Molecular Biology of the Male Reproductive System**, p. 271-310. Ed. DM De Kretser. New York: Academic Press, 1993.
- JENTSCH, T.J.; STEIN, V.; WEINREICH, F.; ANSELM, A. Molecular structure and physiological function of chloride channels. **Physiol Rev**, v. 82, p. 503-568, 2002.
- JOHNSON L, THOMPSON DL, VARNER DD. Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 23-51, 2008.
- JOYCE, K.L.; PORCELLI, J.; COOKE, P.S. Neonatal goitrogen treatment increases adult testis size and sperm production in the mouse. **Journal of Andrology**, v. 14, p. 448-455, 1993.
- KAVOK, N.S.; KRASILNIKOVA, O.A.; BABENKO, N.A. Thyroxine signal transduction in liver cells involves phospholipase C and phospholipase D activation: genomic independent action of thyroid hormone. **BMC Cell. Biol.**, v. 2, p. 5, 2001.
- KERSCHBAUM, H.H.; NEGULESCU, P.A.; CAHALAN, M.D. Ion channels, Ca²⁺ signaling, and reporter gene expression in antigen-specific mouse T cells. **Journal of Immunology**, v. 15, p. 1628-1638, 1997.
- KÖHRLE, J. Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 1514, p. 103-119, 1999.

KÖHRLE, J. Thyroid hormone transporters in health and disease: advances in thyroid hormone deiodination. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 21, p. 173-191, 2007.

KRASSAS, G.E.; PERROS, P. Thyroid disease and male reproductive function. **J Endocrinol Invest**, v. 26, p. 372-380, 2003.

KUIPER, G.G.; KESTER, M.H.; PEETERS, R.P.; VISSER, T.J. Biochemical mechanisms of thyroid hormone deiodination. **Thyroid**, v. 15, p. 787-798, 2005.

KUMAR, C.C. Signaling by integrin receptors. **Oncogene**, v. 17, p. 1365-1373, 1988.

KUMAR, T.R.; WANG, Y.; LU, N.; MATZUK, M.M. Follicle-stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. **Nature Genetics**, v.15, p. 201-204, 1997.

LALEVEE, N.; PLUCIENNIK, F.; JOFFRE, M. Voltage-dependent calcium current with properties of T-type current in Sertoli cells from immature rat testis in primary cultures. **Biol. Reprod.**, v. 56, p. 680-687, 1997.

LALEVEE, N.; JOFFRE, M. Inhibition by cAMP of calcium-activated chloride currents in cultured Sertoli cells from immature testis. **J. Membr. Biol.**, v. 169, p. 167-174, 1999.

LANE, J.; ALLAN, V. Microtubule-based membrane movement. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1376, p. 27-55, 1998.

LAZAR, M.A. Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. **Endocr. Rev.**, v. 14, p. 184-93, 1993.

LEI, J., NOWBAR, S., MARIASH, C.N., INGBAR, D.H. Thyroid hormone stimulates Na, K-ATPase activity and its plasma membrane insertion in rat alveolar epithelial cells. **Am J Physiol**, v. 285, p. L762-L772, 2003.

LEI, J.; MARIASH, C.N.; INGBAR, D.H. 3,3,5-triiodo-L-thyronine up-regulation of Na, K-ATPase activity and cell surface expression in

alveolar epithelial cells is Src-kinase and phosphoinositide 3-kinase-dependent. **J Biol Chem**, v. 279, p. 47589-47600, 2004.

LEI, J., MARIASH, C.N., BHARGAVA, M., WATTENBERG, E.V., INGBAR, D.H. T3 increases Na, K-ATPase activity via MAPK/ERK1/2-dependent pathway in rat adult alveolar epithelial cells. **Am J Physiol**, v. 294, p. L749-L754, 2008.

LEONARD, J.L.; FARWELL, A.P. Thyroid hormone-regulated actin polymerization in brain. **Thyroid**, v. 7, p. 147-151, 1997.

LERNER, J. Effectors of amino acid transport processes in animal cell membranes. **Biochemistry Physiology**, v. 81, p. 713-739, 1985.

LIN, H.Y.; TANG, H.Y.; SHIH, A.; KEATING, T.; CAO, G.; DAVIS, P.J.; DAVIS, F.B. Thyroid hormone is a MAPK-dependent growth factor for thyroid cancer cells and is anti-apoptotic. **Steroid**, v. 72, p. 180-187, 2007.

LIN, H.Y.; SUN, M.; TANG, H.Y.; LIN, C.; LUIDENS, M.K.; MOUSA, S.A.; INCERPI, A.; DRUSANO, G.L.; DAVIES, F.B.; DAVIES, P.J. L-thyroxine vs. 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and cell proliferation: activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 296, p. C980-C991, 2009.

LOIOLA, E.C; VENTURA, A.L.M. Release of ATP from avian Müller glial cells in culture. **Neurochemistry International**, v. 58, p. 414-422, 2011.

LUIDENS, M.K.; MOUSA, S.A.; DAVIES, F.B.; LIN, H.Y.; DAVIES, P.J. Thyroid hormone and angiogenesis. **Vascular Pharmacology**, v. 52, p. 142-145, 2010.

MALACOMBE, M.; BADER, M.F.; GASMAN, S. Exocytosis in neuroendocrine cells: new tasks for actin. **Biochimica et biophysica Acta**, v.1773, p. 1175-1183, 2006.

FUJISAWA, M. Cell-to-Cell cross-talk in the testis. **Urol Res**, v.29, p. 144-151, 2001.

MCKENNA, N.J., O'MALLEY, B.W. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. **Cell**, v. 108, p. 465-474, 2002.

MEACHEM, S.J.; MCLACHLAN, R.I.; DE KRETZER, D.M.; ROBERTSON, D.M. WREFORD, N.G. Neonatal exposure of rats to recombinant follicle stimulating hormone increases adult Sertoli and spermatogenic cell numbers. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 36-44, 1996.

MENEGAZ, D.; ZAMONER, A; ROYER, C.; LEITE, L.D.; BORTOLOTTI, Z.A.; SILVA, F.R. Rapid responses to thyroxine in the testis: active protein synthesis-independent pathway. **Mol Cell Endocrinol**, v. 246, p. 128-134, 2006.

MENEGAZ, D.; ROSSO, A.; ROYER, C.; LEITE, L.D.; SANTOS, A.R.S.; SILVA, F.R.M.B. Role of $1\alpha,25(\text{OH})_2$ vitamin D₃ on α -[1-¹⁴C]MeAIB accumulation in immature rat testis. **Steroids**, v. 74, p. 264-269, 2009.

MENEGAZ, D.; ROYER, C.; ROSSO, A.; DE SOUZA, A.Z.P.; SANTOS, A.R.S.; SILVA, F.R.M.B. Rapid stimulatory effect of thyroxine on plasmic membrane transport systems: calcium uptake and neutral amino acid accumulation in immature rat testis. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 42, p. 1046-1051, 2010a.

MENEGAZ, D.; BARRIENTOS-DURAN, A.; KLINE, A.; SILVA, F.R.; NORMAN, A.W.; MIZWICKI, M.T.; ZANELLO, L.P. $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D₃ stimulation of secretion via chloride channel activation in Sertoli cells. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 119, p. 127-134, 2010b.

MENET, V.; GIMENEZ Y RIBOTTA, M.; CHAUVET, N.; DRIAN, M.-J.; LANNOY, J.; COLUCCI-GUYON, E.; PRIVAT, A. Inactivation of the glial fibrillary acidic protein gene, but not that of vimentin, improves neuronal survival and neurite growth by modifying adhesion molecule expression. **J Neurosci**, v. 21, p. 6147-6158, 2001.

MOELLER, L.C., DUMITRESCU, A.M., REFETOFF, S. Cytosolic action of thyroid hormone leads to induction of hypoxia-inducible

factor-1 α and glycolytic genes. **Mol Endocrinol**, v. 19, p. 2955-2963, 2005.

MORENO, M.; LANGE, P.; LOMBARDI, A.; SILVESTRI, E.; LANNI, A.; GOGLIA, F. Metabolic effects of thyroid hormone derivatives. **Thyroid**, v. 18, p. 239-253, 2008.

MOUSA, S.A.; O'CONNOR, L.J.; BERGH, J.J.; DAVIES, F.B.; SCANLAN, T.S.; DAVIES, P.J. The proangiogenic action of thyroid hormone analogue GC-1 is initiated at an integrin. **J Cardiovascular Pharmacol**, v. 46, p. 356-360, 2005.

NILIUS, B.; DROOGMANS, G. Amazing chloride channels: an overview. **Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum**, v. 177, p. 119-147, 2003.

NORMAN, P.S.; MENN, G.E. Secretagogue-induced changes in system A amino acid transport in the rat exocrine pancreas: stimulation of 2-methylaminoisobutyric acid efflux by carbachol. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1, n. 3, p. 541-546, 1988.

NORMAN, A.W.; BARRETO SILVA, F.R. Structure function studies: identification of vitamin D analogs for the ligand-binding domains of important proteins in the vitamin D endocrine system. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders**, v. 2, p. 229-238, 2001.

OKUBO, Y.; REDDI, A.H. Thyroxine downregulates Sox9 and promotes chondrocyte hypertrophy. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 306, p. 186-190, 2003.

ORTH, J.M.; GUNSALUS, G.L.; LAMPERTI, A.A. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. **Endocrinology**, v. 122, p. 787-794, 1988.

PALMERO, S.; MAGGIANI, S.; FUGASSA, E. Nuclear triiodothyronine receptors in rat Sertoli cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 58, p. 253-256, 1988.

PALMERO, S.; DE MARCHIS, M.; GALLO, G.; FUGASSA, E. Thyroid hormone affects the development of Sertoli cell function in the rat. **Journal of Endocrinology**, v. 123, p. 105-111, 1989.

PALMERO, S.; PRATI, M.; BOLLA, F.; FUGASSA, E. Tri-iodothyronine directly affects rat Sertoli cell proliferation and differentiation. **Journal of Endocrinology**, v.145, p. 355-362, 1995.

PARAMIO, J.M.; JORCANO, J.L. Beyond structure: do intermediate filaments modulate cell signalling? **Bioessays**, v. 24, p. 836-844, 2002.

PARANKO, J.; KALLAJOKI, M.; PELLINIEMI, L.J.; LEHTO, V.P.; VIRTANEM, I. Transient coexpression of cytokeratin and vimentin in differentiating rat Sertoli cells. **Dev Biol**, v. 117, p. 35-44, 1986.

PARPURA, V.; BASARSKY, T.A.; LIU, F.; JEFTINIJA, K.; JEFTINIJA, S.; HAYDON, P.G. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signaling. **Nature**, v. 30, p. 744-777, 1994.

PATRICK, L. Thyroid Disruption: Mechanisms and Clinical Implications in Human Health. **Alt Med Rev**, v.14, p. 326-346, 2009.

PETERSEN, C; SÖDER, O. The Sertoli cell – A hormonal target and “super” nurse for germ cells that determines testicular size. **Hormone Research**, v. 66, p. 153-161, 2006.

PLOW, E.F.; HASS, T.A.; ZHANG, L.; LOFTUS, J.; SMITH, J.W. Ligand binding to integrins. **J Biol Chem**, v. 275, p. 21785-21788, 2000.

POTTHOFF, O.; DIETZEL, I.D. Thyroid hormone regulates currents in cultured hippocampal neurons from postnatal rats. **Proc Biol Sci**, v. 264, p. 367-373, 1997.

QU, Z.; WEI, R.W.; HARTZELL, H.C. Characterization of Ca²⁺-activated Cl⁻ currents in mouse kidney inner medullary collecting duct cells. **Am J Physiol**, v. 285, p. F326-F335, 2003.

ROMEO, R.; CASTORINA, S.; MARCELLO, M.F. Intermediate filaments of human Sertoli cells in germinal alterations. **It J Anat Embryol**, v. 100, p. 75-81, 1995.

ROTI, E.; BRAVERMAN, L.E.; FANG, S.L.; ALEX, S.; EMERSON, C.H. Ontogenesis of placental inner ring thyroxine deiodinase and amniotic fluid 3,3',5'-triiodothyronine concentration in the rat.

Endocrinology, v. 11, p. 959–963, 1982.

RUSSELL, L.D.; MALONE, J.P.; MACCURDY, D.S. Effect of the microtubule disrupting agents, colchicine and vinblastine, on seminiferous tubule structure in the rat. **Tissue Cell**, v. 13, p. 349-367, 1981.

RUSSELL, L.D.; PETERSON, R.N. Sertoli cells junctions: morphological and functional correlates. **Int Rev Cytol**, v.194, p. 177-211, 1985.

RUSSEL, L.D.; GRISWOLD, M.D. The Sertoli cell, **Cache River Press**, Clearwater, FL, 1993.

SALAUN, C.; JAMES, D.J.; CHAMBERLAIN, L.H. Lipid rafts and the regulation of exocytosis. **Traffic**, v. 5, p. 255-264, 2004.

SASAKI, M.; YAMAMOTO, M.; ARISHIMA, K.; EGUSHI, Y. Effects of follicle-stimulating hormone on intermediate filaments and cell division of Sertoli cells of fetal rat testis in culture. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 60, p. 35–39, 1998.

SCAPIN, S., LEONI, S., SPAGNUOLO, S., FIORE, A.M., INCERPI, S. Short-term effects of thyroid hormone on the Na, K-ATPase activity of chick embryo hepatocytes during development: focus on signal transduction. **Am J Physiol**, v. 296, p. C4-C12, 2009.

SCAPIN, S., LEONI, S., SPAGNUOLO, S., GNOCCHI, D., DE VITO, P., LULY, P., PEDERSEN, J.Z., INCERPI, S. Short-term effects of thyroid hormones during development: Focus on signal transduction. **Steroids**, v. 75, p. 576-584, 2010.

SCARLETT, A.; PARSONS, M.P.; HANSON, P.L.; SIDHU, K.K.; MILLIGAN, T.P.; BURRIN, J.M. Thyroid hormone stimulation of extracellular signal-regulated kinase and cell proliferation in human osteoblast-like cells is initiated at integrin $\alpha\beta 3$. **Journal of Endocrinology**, v. 196, p. 509-517, 2008.

SCHLISS, F.; HÄUSSINGER, D. The cellular hydration state: a critical determinant for cell death and survival. **Biol Chem**, v. 383, p. 577-583, 2002.

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 thyroid hormone at the level of the plasma membrane. **Endocrinology**, v. 127, p. 17-24, 1990.

SHARPE, R.M. Fetal/Neonatal hormones and reproductive function of the male in adulthood. In *Fetal Programming: Influences on Development and disease in Later Life* pp 187–194 Eds PMS O'Brien, T Wheeler and DJP Barker. **Royal College of Obstetricians and Gynaecologists Press**, London, 1999.

SHARPE, R.M. Regulation of spermatogenesis. In **The Physiology of Reproduction**, 2nd Edn, pp. 1363-1434. Eds E Knobil and JD Neill. Raven Press, New York, 1994.

SHOTWELL, M.A.; KILBERG, M.S.; OXENDER, D.L. The regulation of neutral amino acid transport in mammalian cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 24, n. 2, p. 267-284, 1983.

SHOW, M.D.; ANWAY, M.D.; FOLMER, J.S.; ZIRKIN, B.R. Reduced intratesticular testosterone concentration alters the polymerization state of the Sertoli cell intermediate filament cytoskeleton by degradation of vimentin. **Endocrinology**, v.144, p. 5530-5536, 2003.

SIEGRIST-KAISER, C.A.; JUGE-AUBRY, C.; TRANTER, M.P.; EKENBARGER, D.M.; LEONARD, J.L. Thyroxine-dependent modulation of actin polymerization in cultured astrocytes. A novel, extranuclear action of thyroid hormone. **J Biol Chem**, v. 265, p. 5296–5302, 1990.

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 Science**. v.69, p. 977-986, 2001.

SILVA, F.R.M.B.; LEITE, L.D.; WASSERMANN, G.F. Rapid signal transduction in Sertoli cells. **European Journal of Endocrinology**, v. 147, p. 425-433, 2002.

SKINNER MK; GRISWOLD MD. Cell cell interactions in the testis. **Endocrinology Reviews**, v. 12, p. 45-68, 1991.

SKINNER, MK; NILSSON, EE; BHANDARI, RK. Cell-Cell Signaling in the Testis and Ovary. **Handbook of Cell Signaling**, v.3, ed.2, 2009.

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

ST GERMAIN, D. L.; GALTON, V. A. The deiodinase family of selenoproteins. **Thyroid**, v. 7, p. 655–668, 1997.

STACHELEK, S.J.; KOWALIK, T.F.; FARWELL, A.P.; LEONARD, J.L. Myosin V plays essential role in the thyroid hormone dependent endocytosis of type II iodothyronine 5-deiodinase. **J Biol Chem**, v. 275, p. 31701-31707, 2000.

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

TANG, H.Y.; LIN, H.Y.; ZHANG, S.; DAVIS, F.B.; DAVIS, P.J. Thyroid hormone causes mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of the nuclear estrogen receptor. **Endocrinology**, v. 145, p. 3265-3272, 2004.

TOYODA, N.; BERRY, M.J., HARNEY, J.W.; LARSEN, P.R. Topological analysis of the integral membrane protein, type I iodothyronine deiodinase (D1). **J. Biol. Chem.**, v. 270, p.12310–12318, 1995.

TURNER, J.E.; SEDEJ, S.; RUPNIK, M. Cytosolic Cl^- ions in the regulation of secretory and endocytotic activity in melanotrophs from mouse pituitary tissue slices. **J Physiol**, v. 566, p. 443-453, 2005.

VAN DER GEYTEN, S.; SEGERS, I.; GEREBEN, B.; BARTHA, T.; RUDAS, P.; LARSEN, P.R.; KUHN, E.R.; DARRAS, V.M. Transcriptional regulation of iodothyronine deiodinases during embryonic development. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 183, p. 1-9, 2001.

VAN DER GEYTEN, S.; VAN DEN EYNDE, I.; SEGERS, I.B.; KUHN, E.R.; DARRAS, V.M. Differential expression of iodothyronine deiodinases in chicken tissues during the last week of embryonic development. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 128, p. 65-73, 2002.

VAN HAASTER, L.H.; DE JONG, F.H.; DOCTER, R.; DE ROOIJ, D.G. The effect of hypothyroidism on Sertoli cell proliferation and differentiation and hormone levels during testicular development in the rat. **Endocrinology**, v. 131, p. 1574-1576, 1992.

VINATIER, D. Integrins and reproduction. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 59, p. 71-81, 1995.

VISSER, T.J.; LEONARD, J.L.; KAPLAN, M.M.; LARSEN, P.R. Kinetic evidence suggesting two mechanisms for iodothyronine 5'-deiodination in rat cerebral cortex. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 79, p. 5080-5084, 1982.

VITALE, M.L.; SEWARD, E.P.; TRIFARO, J.M. Chromaffin cell cortical actin network dynamics control the size of the release-ready vesicle pool and the initial rate of exocytosis, **Neuron**, v. 14, p. 353-363, 1995.

VOGL, A.W.; LINCK, R.W.; DYM, M. Colchicine-induced changes in the cytoskeleton of the golden-mantled ground squirrel (*Spermophilus lateralis*) Sertoli cells. **Am J Anat**, v. 168, p. 99-108, 1983.

VOGL, A.W.; VAID, K.S.; GUTTMAN, J.A. The Sertoli Cell Cytoskeleton. Em **Molecular Mechanisms in Spermatogenesis**. Ed. Landes Bioscience and Springer Science + Business Media, 2008.

VOLPATO, K.C.; MENEGAZ, D.; LEITE, L.D.; BARRETO, K.P.; DE VILHENA GARCIA, E.; SILVA, F.R.M.B. Involvement of K^+ channels and calcium-dependent pathways in the action of T_3 on amino acid accumulation and membrane potential in Sertoli cells of immature rat testis. **Life Sci**, v. 74, p. 1277-1288, 2004.

WAGNER, MS; WAJNER, SM; MAIA, AL. The role of thyroid hormone in testicular development and function. **Journal of Endocrinology**, v.199, p. 351-365, 2008.

WALKER, W.H. Molecular mechanisms controlling Sertoli cell proliferation and differentiation. **Endocrinology**, v. 144, p. 3719-3721, 2003.

WASSERMANN, G.F.; BLOCH, L.M.; GRILLO, M.L.; SILVA, F.R.M.B.; LOSS, E.S.; MCCONNELL, L.L. Biochemical factors involved in the FSH action on amino acid transport in immature rat testes. **Horm Met Res**, v. 24, p. 276-279, 1992.

WIESNER, S.; LEGATE, K.R.; FÄSSLER, R. Integrin-actin interactions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, p. 1081-1099, 2005.

WIGHTMAN, R.M.; HAYNES, C.L. Synaptic vesicles really do kiss and run. **Nature Neuroscience**, v. 7, p. 321-322, 2004.

WILLEMS, A.; BATLOUNI, S.R.; ESNAL, A.; SWINNEN, J.V.; SAUNDERS, P.T.; SHARPE, R.M.; FRANÇA, L.R.; DE GENDT, K.; VERHOEVEN, G. Selective ablation of the androgen receptor in mouse sertoli cells affects sertoli cell maturation, barrier formation and cytoskeletal development. **PLoS One**, v. 5, p. 141-168, 2010.

WILLIAMS, G.R. Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor isoforms. **Mol Cell Biol**, v. 20, p. 8329-8342, 2000.

WINDER, S.J.; AYSCOUGH, K.R. Actin-binding proteins. **J Cell Sci**, v. 118, p. 651-654, 2005.

WRIGHT, W.W.; PARVINEN, M.; MUSTO, N.A. Identification of stage specific proteins synthesized by rat seminiferous tubules. **Biol. Reprod.**, v. 29, p. 257-270, 1983.

WU, Y., KOENING, R.J. Gene regulation by thyroid hormone. **Trends Endocrinol Metabol**, v. 11, p. 207-211, 2000.

XIAOYU, Z.; PAYAL, B.; MELISSA, O.; ZANELLO, L.P. 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ membrane initiated calcium signaling modulates exocytosis and cell survival. **J. Steroid Biochem Mol Biol**, v. 103, p. 457-461, 2007.

YANG, Q.; MCHUGH, K.P.; PATNTIRAPONG, S.; GU, X.; WUNDERLICH, L.; HAUSCHKA, P.V. VEGF enhancement of osteoclast survival and bone resorption involves VEGF receptor-2 signaling and beta3-integrin. **Matrix Biol**, v. 27, p. 589-599, 2008.

YEN, P.M. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. **Physiol. Rev.**, v. 81, p. 1097-1142, 2001.

ZAMONER, A.; CORBELINI, P.F.; FUNCHAL, C.; MENEGAZ, D.; SILVA, F.R.M.B.; PESSOA-PUREUR, R. Involvement of calcium-dependent mechanisms on the action of T₃ in the in vitro phosphorylation of vimentin of immature rat testis. **Life Sci**, v. 77, p. 3321-3335, 2005.

ZAMONER, A.; BRUNO, A.N.; CASALI, E.A.; CORBELINI, P.F.; DINIZ, G.P.; BARRETO-CHAVES, M.L.; SILVA, F.R.M.B.; SARKIS, J.J.; PESSOA-PUREUR, R. Genomic-independent action of thyroid hormones on NTPDase activities in Sertoli cell cultures from congenital hypothyroid rats. **Life Sci**, v. 80, p. 51-58, 2006a.

ZAMONER, A.; FUNCHAL, C.; HEIMFARTH, L.; SILVA, F.R.; PESSOA-PUREUR, R. Short-term effects of thyroid hormones on cytoskeletal proteins are mediated by GABAergic mechanisms in slices of cerebral cortex from young rats. **Cell Mol Neurobiol**, v. 26, p. 209-224, 2006b.

ZAMONER, A.; ROYER, C.; BARRETO, K.P.; PESSOA-PUREUR, R.; SILVA, F.R.M.B. Ionic involvement and kinase activity on the mechanism of nongenomic action of thyroid hormones on ⁴⁵Ca²⁺ uptake in cerebral cortex from young rats. **Neuroscience Research**, v. 57, p. 98-103, 2007a.

ZAMONER, A.; BARRETO, K.P.; WILHELM FILHO, D.; SELL, F.; WOEHL, V.M.; GUMA, F.C.; SILVA, F.R.M.B.; PESSOA-PUREUR, R. Hyperthyroidism in the developing rat testis is associated with oxidative stress and hyperphosphorylated vimentin accumulation. **Mol Cell Endocrinol**, v. 267, p. 116–126, 2007b.

ZAMONER, A.; HEIMFARTH, L.; OLIVEIRA LOUREIRO, S.; ROYER, C.; MENA BARRETO SILVA, F.R.; PESSOA-PUREUR, R. Nongenomic actions of thyroxine modulate intermediate filament phosphorylation in cerebral cortex of rats. **Neuroscience**, v. 156, p. 640-652, 2008.

ZAMONER, A.; PESSOA-PUREUR, R.; SILVA, F.R.M.B. Membrane-initiated actions of thyroid hormones on the male reproductive system. **Life Sciences**, doi:10.1016/j.lfs.2011.04.006, 2011.

ZANATTA, L.; BOURAIMA-LELONG, H.; DELALANDE, C.; SILVA, F.R.M.B.; CARREAU, S. Regulation of aromatase expression by $1\alpha,25(\text{OH})_2$ vitamin D_3 in rat testicular cells. **Reprod Fert Develop**, v. 23, p. 725-735, 2011.

ZANELLO, L.P.; NORMAN, A.W. Rapid modulation of osteoblast ion channel responses by $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamin D_3 requires the presence of a functional vitamin D nuclear receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, p. 1589-1594, 2004.

ZHANG, J., LAZAR, M.A. The mechanism of action of thyroid hormones. **Annu. Rev. Physiol**, v. 62, p. 439-466, 2000.

ZHU, X.G., HANOVER, J.A., HAGER, G.L., CHENG, S.Y. Hormone-induced translocation of thyroid hormone receptors in living cells visualized using a receptor green fluorescent protein chimera. **J Biol Chem**, v. 273, p. 27058-27063, 1998.