

RENATA MARINO ROMANO

**INFLUÊNCIA DO HORMÔNIO TIREOIDEANO
NA ATIVIDADE DO GONADOTROFO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Tereza Nunes

Versão Original

São Paulo
2011

RESUMO

ROMANO, R. M. **Influência do hormônio tireoideano na atividade do gonadotrofo**. 2011. 128 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Problemas no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal são frequentes no hipo e no hipertireoidismo, embora pouco seja conhecido a respeito das bases moleculares destas alterações. Neste estudo foi avaliado o efeito da administração aguda e crônica na atividade do gonadotrofo em ratos Wistar tireoidectomizados aos 60 dias de idade e mantidos com tratamento de metimazol e CaCl_2 por 21 dias. Após esse período os animais receberam T3 por injeção intravenosa nas doses correspondentes a 1X, 5X ou 50X à dose fisiológica ($0,3 \mu\text{g}/100\text{g PC}$) ou salina (TX) e foram decapitados após 30 minutos. O grupo crônico recebeu a dose correspondentes a 5X por 5 dias. Ratos falso-operados foram utilizados como controle. As hipófises foram removidas e submetidas às análises de expressão do mRNA do LH e do FSH por PCR em tempo real, adenilação da cauda poli(A) do LH pelo *race PAT*, e ainda expressão protéica do LH e do FSH por *Western Blotting* e imunohistoquímica. Os testículos foram avaliados quanto à expressão do receptor de LH e de andrógenos, por PCR em tempo real e *Western Blotting*. Os epidídimos forma avaliados quanto a expressão do receptor de andrógenos pela mesma metodologia. A concentração sérica de LH e FSH foi avaliada pelo sistema Luminex, o TSH, o T3 e a testosterona foram medidas por radioimunoensaio. Os resultados foram analisados estatisticamente pela ANOVA seguida do pós-teste de Tukey HSD para grupos com tamanhos amostrais diferentes, considerando-se diferença se $p < 0,05$. A tireoidectomia elevou a concentração sérica de TSH e a administração aguda de T3 não alterou esse parâmetro. Já os animais tratados cronicamente com T3 apresentaram redução do TSH sérico. O hipotireoidismo ocasionou elevação no LH sérico, que foi reduzido após 3 horas do tratamento com T3. O hipertireoidismo acarretou diminuição do LH sérico. O mRNA do LH se elevou no hipotireoidismo e o tratamento com T3 reduziu a quantidade hipofisária. A cauda poli(A) do mRNA do LH foi reduzida no hipotireoidismo e não se alterou com os tratamentos. A proteína hipofisária foi reduzida no hipotireoidismo e se elevou com os tratamentos. Apesar do elevado LH sérico, a testosterona foi reduzida no hipotireoidismo e essa redução foi mantida nos tratamentos. O FSH sérico foi reduzido no hipotireoidismo e os tratamentos elevaram esse parâmetro ao observado no controle. O mRNA se elevou no TX e reduziu com o tratamento; a proteína estava reduzida no TX e se elevou nos tratamentos. O receptor de LH foi reduzido no TX e se elevou no tratamento, enquanto o receptor de andrógenos se comportou de forma inversa. O receptor de andrógenos

do epidídimo foi aumentado no TX e reduzido pelos tratamentos. Esses resultados sugerem que o T3 age na modulação da função do gonadotrofo e na modulação da expressão dos receptores em tecidos-alvo.

Palavras-chave: Hormônios tireoidianos. Gonadotrofinas. Glândula pituitária. Hormônios sexuais.

ABSTRACT

ROMANO, R. M. **Influence of thyroid hormone on gonadotrope activity.** 2011. 128 p. Ph. D. thesis (Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Disturbances in the activity of the hypothalamus-pituitary-gonads axis are frequent in hypo and in hyperthyroidism, although little is known about the molecular basis of these alterations. In this study we evaluated the effect of acute administration of T3 on the activity of gonadotropes in male Wistar rats that were thyroidectomized at 60 days-old and kept under treatment with methimazole and CaCl for 20 days. After this period the animals received T3 by i.v. injection at doses corresponding to 1X, 5X or 50X the physiological dose (0.3 µg/100g BW) or saline (TX), and were decapitated 30 min thereafter. Hyperthyroid rats received T3 i.p. at doses of 5X for 5 days. Sham-operated animals were used as control. The pituitaries were removed and submitted to analyses of gene expression and adenylation status of poly(A) tail of LH and FSH mRNA by real-time PCR and RACE-PAT, respectively. LH and FSH expression was evaluated by Western blotting and immunohistochemistry (IHC). The testes were evaluated for the expression of LH receptor expression and androgen receptor expression by real-time PCR and Western Blotting. The epididymis were evaluated for the androgen receptor expression by the same methodology used for the testes. The serum concentration of FSH and LH were evaluated by Luminex kit (Millipore), whereas TSH, T3 and testosterone were measured by RIA. The results were statistically analyzed by ANOVA followed by Tukey HSD *post hoc test* for unequal sample sizes, considering statistical difference at $P < 0.05$. The thyroidectomy increased the TSH, LH and reduced the FSH and testosterone serum concentration. The acute T3 administration did not change the TSH and testosterone level, but increased the FSH and decreased the LH. After the T3 treatment for 5 days, the TSH and LH serum concentration was decreased and the testosterone was below the detectable limits. The FSH serum remained increased, equal the control level. After TX, another group of rats were treated with 1X, 5X or 50X the physiological dose for 1, 2 or 3 hours before sacrifice. The LH serum concentration remains higher than TX and control group in 1 and 2 hours. The 3 hour group had a decrease in the serum level compared to TX. The FSH had an increase in the serum concentration in all times. The poly(A) tail of LH mRNA was reduced in TX and in the treatments. The protein content was reduced in TX and was elevated with treatments. The mRNA of FSH increased in TX and reduced after T3 treatment; the protein content was reduced in TX increased after treatment. The LH receptor was reduced in the treatment and reestablished in T3 treatment, while the opposite occurred

with androgen receptor. In the epididymis the expression of androgen receptor was increased in TX and was reduced in the treatments with T3. These results suggest that T3 modulates the gonadotrope function and the gene expression of receptors in tissue-target.

Key-words: Thyroid hormones. Gonadotropins. Pituitary. Sexual hormones.

Capítulo 1

CONTEXTUALIZAÇÃO E METODOLOGIA

1.1 INTRODUÇÃO

O gonadotrofo é a célula adenohipofisária responsável pela produção dos hormônios LH (hormônio luteinizante) e FSH (hormônio folículo estimulante), ou gonadotrofinas, sintetizadas e liberadas a partir de estímulo do GnRH hipotalâmico (hormônio liberador de gonadotrofinas), o qual desempenha papel exponencial no controle da reprodução. Diversos fatores podem interferir no funcionamento do eixo hipotalâmico hipofisário gonadal, sendo que alterações de reprodução significativas são observadas em indivíduos que apresentam tanto o hiper quanto o hipotireoidismo.

Apesar de algumas alterações reprodutivas ocorrerem em função de patologias tireoideanas, não se conhece o papel do hormônio tireoideano (HT) sobre a função reprodutiva no indivíduo adulto. No entanto, durante o período pré-natal, infância e pré-adolescência esse hormônio influencia uma série de mecanismos que são responsáveis pelo desenvolvimento em diversos aspectos, incluindo os relacionados à função reprodutiva. Nestes indivíduos, a expressão gonadal de receptores de HT é intensa, havendo diversos estudos que procuram elucidar os mecanismos envolvidos nesse processo. Contudo, o indivíduo adulto não apresenta quantidade expressiva de receptores de HT nas gônadas, atribuindo-lhe uma aparente insensibilidade ao hormônio.

Diferentemente do testículo, o gonadotrofo apresenta maior abundância de receptores de HT. Entretanto, como não há elemento responsivo ao hormônio tireoideano (TRE) nas suas unidades gênicas regulatórias, parece que este não participa diretamente da produção das gonadotrofinas.

O HT é capaz de desencadear efeitos que não dependem da sua interação clássica com receptores nucleares. Respostas funcionais são observadas em alguns tipos celulares, com eventual possibilidade da ativação da transcrição gênica, quando o hormônio se liga às integrinas de membrana, ou pela ativação de bomba Na^+/K^+ ATPase, vias de fosforilação e polimerização de actina, por exemplo. Esses mecanismos são conhecidos como não genômicos e ocorrem, geralmente, num curto prazo de tempo.

Neste trabalho investigamos a possibilidade de o HT exercer algum tipo de modulação sobre o HHG, por meio do estudo da expressão dos genes do β FSH e β LH, bem como por análises moleculares, como o *real time* PCR, *Western Blotting*, perfil polissomal, e morfológica pela imunohistoquímica; da expressão dos genes dos receptores de LH, de FSH e de andrógenos testiculares, também por *real time* PCR e *Western Blotting*; da expressão do

gene do receptor de andrógenos nos epidídimos; e das concentrações séricas de LH, FSH, e testosterona.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

Nesta seção serão abordados alguns aspectos gerais da função testicular e de hormônios tireoideanos, eixo hipotalâmico hipofisário gonadal e relevância clínica da alteração tireoideana sobre o eixo HHG, ressaltando a literatura específica do tema e a justificativa do desenvolvimento do presente projeto.

1.2.1 Hormônio tireoideano

Os HTs participam de etapas críticas da diferenciação, crescimento e metabolismo. São produzidos pela glândula tireóide, que se localiza logo abaixo da laringe e é formada por dois lobos lateralizados à traquéia e unidos por um istmo. É composta histologicamente de folículos preenchidos com colóide e revestidos por células epiteliais cúbicas, que secretam no interior desses folículos. O principal constituinte do colóide é a glicoproteína tiroglobulina, que serve de matriz para a síntese de HTs, sendo um reservatório destes. Para serem secretados, esses hormônios precisam retornar ao epitélio e atingir a corrente sanguínea (GUYTON e HALL, 2005; BIANCO e KIMURA, 2008).

A glândula tireóide produz e secreta HTs sob estímulo do TSH hipofisário (Tireotrofina), sob controle do *feedback* negativo exercido pelo T3 e pelo estímulo do TRH hipotalâmico. Em humanos, a tiroxina (T4) representa cerca de 93% da sua secreção hormonal, enquanto a triiodotironina (T3) representa os 7% restantes. O T3 apresenta maior bioatividade, sendo nos tecidos o T4 convertido em T3 por ação de desidases (GUYTON e HALL, 2005; BIANCO e KIMURA, 2008).

O HT age nos tecidos alvo através da interação com TRs, que se apresentam dimerizados, especialmente com os receptores de ácido retinóico X (RXR) e acoplados ao seu elemento responsivo. No núcleo o hormônio interage com o receptor, desencadeando ou bloqueando a transcrição de diversos genes (YEN, 2001).

Mas a descoberta da interação do HT com outros sítios de ligação localizados na membrana celular e no citoplasma confere a esse hormônio a possibilidade de atuação em tecidos onde não se encontram receptores nucleares em abundância ou TRs (DAVIS et al., 2008a; 2008b; 2000).

1.2.2 Função testicular e hormônios tireoideanos

A importância da atividade gonadal masculina sobre a reprodução humana teve maior ênfase a partir do desenvolvimento de biotecnologias como a fertilização *in vitro* (FIV) e a injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI). Para essas biotecnologias, além das condições de excelência de qualidade de ovócitos, é fundamental obter concentrações adequadas de espermatozóides viáveis, que serão maturados *in vitro* para se tornarem capazes de fertilização. Essa recente maior atenção ao gameta masculino aumentou a necessidade do conhecimento andrológico e, atualmente, já se considera que cerca da metade dos problemas conjugais de reprodução se deve à disfunção masculina (PATRIZIO; SANGUINETI; SAKKAS, 2008).

A espermatogênese é o processo que envolve a multiplicação e a maturação das células espermáticas, além da produção de gametas viáveis em concentrações adequadas, que serão transportados por um sistema reprodutivo necessariamente maduro e eficiente. O sistema reprodutivo compreende as gônadas masculinas (testículos), epidídimos e órgãos acessórios, como a próstata, as glândulas bulbouretrais e as vesículas seminais. O parênquima testicular compreende os túbulos seminíferos com o epitélio germinativo, onde se realiza a espermatogênese, além das células de Sertoli. Estas envolvem as células germinativas desde a periferia até o lúmen do túbulo, formando a barreira hemato-testicular. O tecido intersticial que ocupa cerca de 5% do volume testicular total contém as células de Leydig, que são responsáveis pela produção testicular de andrógenos (KERR et al., 2006).

Os epidídimos são formados a partir da convergência dos túbulos seminíferos oriundos dos testículos. Sua principal função é promover um ambiente adequado para a maturação do espermatozóide, uma vez que sua capacidade de fertilização é extremamente baixa no ambiente testicular. Vários tipos celulares compõem os epidídimos, cuja estrutura se modifica ao longo de seu trajeto, até desembocar nos ductos deferentes. Entre as suas características secretórias, destacam-se a alta expressão e a atividade da enzima 5α redutase (que converte testosterona em dihidrotestosterona - DHT), endocitose de substâncias luminais (desprendidas durante a maturação dos espermatozóides), acidificação do meio luminal e reabsorção de água (ROBAIRE; HINTON; ORGEBIN-CRIST, 2006).

Nas glândulas acessórias são produzidos fluidos que comporão o ejaculado. A próstata destaca-se pela produção das proteínas antígeno prostático específico (PSA) e fosfatase ácida prostática (PAP). Ainda expressa grande quantidade de receptores androgênicos, sendo bastante sensível à redução das concentrações hormonais de testosterona e DHT. Nas

vesículas seminiais são produzidas e secretadas frutose, prostaglandinas e enzimas que diminuem a produção das espécies reativas de oxigênio, deletérias aos espermatozoides (RISBRIDGER e TAYLOR, 2006).

O impacto das alterações tireoideanas sobre a reprodução masculina foi assunto controverso durante muitos anos, apesar dos efeitos reconhecidos sobre outros órgãos e tecidos. Em parte, isso se deve ao fato de estudos antigos terem demonstrado que os testículos não eram metabolicamente responsivos ao hormônio tireoideano (HT) e também à baixa presença de receptores de hormônio tireoideano (TR) encontrados no órgão adulto (OPPENHEIMER et al., 1974; BARKER e KLITGAARD, 1952). Entretanto, nas duas últimas décadas, estudos conduzidos comprovaram que os HTs desempenham importante papel no desenvolvimento e na função testicular (WAGNER et al., 2008).

1.2.3 Eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal

A reprodução masculina e feminina é consequência de interações que vão desde o sistema nervoso central (hipotálamo) até as gônadas (testículos e ovários), passando pela hipófise. Este complexo mecanismo denominado de eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal sofre influência de diversos sistemas integrados.

A hipófise é formada por duas unidades morfofuncionais diferentes, a neurohipófise e a adenohipófise. A adenohipófise apresenta cinco tipos celulares principais: os somatotrofos, que representam 40 a 50% do total das células e produzem hormônio do crescimento (GH); os lactotrofos, que representam 15% do total das células e produzem prolactina (PRL); os corticotrofos, que representam 15% das células e produzem a pro-opiomelanocortina, um precursor do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH); os tireotrofos, que compreendem 5% das células e produzem o hormônio tirotrófico (TSH); e, finalmente, os gonadotrofos, que compreendem 10% das células e produzem hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH) (NUNES, 2008).

As gonadotrofinas (LH e FSH) são sintetizadas e liberadas a partir de estímulo do GnRH hipotalâmico, o qual desempenha papel fundamental no controle da reprodução. O LH e o FSH atuam na gônada masculina e feminina para a produção de espermatozoides e maturação de ovócitos, em mecanismos onde os hormônios esteróides sexuais, como a testosterona, a progesterona e o estradiol, estão diretamente envolvidos. Essa relação do sistema nervoso central com os órgãos periféricos é estabelecida pelo eixo HHG (EVERETT, 2006).

Diversos fatores podem interferir no funcionamento desse eixo; mais especificamente, observam-se alterações reprodutivas significativas em indivíduos que apresentam hiper ou hipotireoidismo (HATSUTA et al., 2004; KRASSAS, 2000; MEIKLE, 2004; TONI et al., 2005; VAN DEN BERGHE et al., 2002). Em geral, as alterações reprodutivas identificadas nessa última condição regridem após o tratamento com o HT (MEIKLE, 2004; TONI et al., 2005; WARTOFSKY et al., 2006), indicando que há algum tipo de relação entre o eixo HHG e o eixo hipotalâmico-hipofisário-tireoideano.

O LH e o FSH são glicoproteínas, assim como outro hormônio hipofisário, a tireotrofina TSH. O LH e o FSH são compostos por duas subunidades glicosiladas associadas por ligações não-covalentes, a α (comum) e a β (específica), as quais são codificadas por genes distintos, localizados em diferentes cromossomos. As subunidades α , β LH e β FSH estão expressas dentro das mesmas células (gonadotrofos bi-hormonais), embora algumas sejam capazes de secretar apenas um dos hormônios (gonadotrofos mono-hormonais). As etapas precursoras de clivagem e N-glicosilação ocorrem no retículo endoplasmático, onde a tradução dos mRNAs específicos gera os heterodímeros imaturos α/β . Ao longo do complexo de Golgi ocorre a progressiva aquisição da forma madura do hormônio, por glicosilações, dobramentos específicos e interação dos heterodímeros, que são alcançados no interior dos grânulos de secreção (BOUSFIELD et al., 2006; COUNIS et al., 2005).

As células que secretam FSH são grandes e apresentam grânulos de aproximadamente 200 μ m, retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi extensos, sendo que nestas estruturas se dá o processo de glicosilação do hormônio. As células que secretam LH apresentam grânulos secretórios menores que se acumulam em um pólo celular, próximo à periferia, e com o complexo de Golgi menos desenvolvido que nas células que secretam FSH. O FSH possui peso molecular de 34 kDa e consiste em 210 resíduos de aminoácidos, ao passo que o LH é uma proteína de peso molecular 28,5 kDa, com 204 resíduos de aminoácidos. A meia-vida plasmática do FSH humano é de aproximadamente 240 minutos e a do LH, 30 minutos (NORMAN e LITWACK, 1997).

A interação do GnRH com os receptores de membrana do gonadotrofo ativa vias de sinalização que geram cFos e cJun, fatores de transcrição que se dimerizam, atuando em genes que apresentam sítio de reconhecimento AP-1. Também ocorre a ativação de Egr-1 (proteína inicial de resposta ao crescimento 1) através da sinalização via PKC e MAPK. Essas vias de sinalização são melhor definidas para a síntese de LH, tendo em vista que os mecanismos envolvidos com a síntese de FSH ainda são pouco conhecidos (COUNIS et al., 2005).

Além de LH, o gonadotrofo hipofisário produz uma pequena quantidade endógena de GnRH, que auxilia na exocitose dos grânulos de LH pela abertura dos canais de cálcio, contribuindo para os níveis basais de secreção desse hormônio (KRSMANOVIC et al., 2000).

A relação entre HT e eixo gonadal também pode ser evidenciada em estudos desenvolvidos por Lovejoy et al. (1997), que demonstraram que, após três horas do tratamento com T3, ocorre elevação em 42% da concentração sérica de testosterona e 150% da globulina transportadora.

Ainda, há evidências de que o número de células germinativas testiculares diminui no hipotireoidismo; em contrapartida, observa-se a sua elevação durante o hipotireoidismo transitório, apesar da quantidade de espermatozóides vivos estar diminuída em ambas as situações. Nesse mesmo estudo, verifica-se a redução da atividade de enzimas testiculares, como a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, sugerindo que o hormônio tireoideano exerça regulação direta sobre a fisiologia e sistema de defesa antioxidante do testículo (SAHOO et al., 2008).

A enzima desidase do tipo 2 é expressa nos testículos de ratos adultos, mais precisamente nas espermátides alongadas, e sua atividade é induzida pelo hipotireoidismo, sugerindo que o HT possa ter efeito direto na espermatogênese de ratos adultos (WAJNER et al., 2007). A morfologia espermática é alterada no sêmen de indivíduos hipotireóides, sendo restabelecida após tratamento com o HT (KRASSAS et al., 2008). Ainda assim, é detectada a presença de TRs no epidídimo, principalmente no compartimento citoplasmático, cuja quantidade se eleva em significativa escala no hipotireoidismo (mRNA e proteína) (PAUL et al., 2008).

1.2.4 Relevância clínica da alteração da função tireoideana sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal

Os hormônios tireoideanos desempenham papel conhecido sobre a reprodução, desde a fase de desenvolvimento inicial da gônada. Durante a fase pré-púbere, os testículos são altamente influenciados pelos níveis de HTs, os quais respondem pelo crescimento e pela maturação das células testiculares. Nesse período, o hipotireoidismo leva ao hipergonadismo e à imaturidade celular, ao passo que o hipertireoidismo acarreta hipogonadismo e maturidade celular precoce em ratos (ARIYARATANE et al., 2000; CHAPIN et al., 1996), sendo que os TRs estão presentes nos testículos de ratos desde o período perinatal até a vida adulta (BUZZARD et al., 2000, JANNINI et al., 2000). Durante esse mesmo período também são

encontradas desidases nesses tecidos: enzimas que modulam a conversão do T4 a T3, e consequentemente a ação dos HT (WAGNER et al., 2003, WAJNER et al., 2007).

Em meninos com hipotireoidismo, os níveis séricos de PRL (prolactina) e TSH são elevados em função do exagerado estímulo do TRH. Embora as concentrações séricas basais de LH, FSH, estrona e estradiol sejam elevadas, a resposta das gonadotrofinas ao GnRH está atenuada. Como resultado da elevação no FSH ocorre o aumento gonadal, mas a elevada PRL inibe o efeito do LH sobre a célula de Leydig, prejudicando a produção de testosterona. Meninos com hipotireoidismo primário apresentam elevação de TSH, mas somente aqueles com hipergonadismo têm a PRL e gonadotrofinas exageradamente elevadas. Alterações estas revertidas pela terapia de reposição com hormônio tireoideano (MEIKLE, 2004).

A hiperprolactinemia pode se desenvolver em pacientes com hipotireoidismo primário por alguns mecanismos conhecidos: (a) em resposta ao estado hipotireoideo há uma descarga compensatória central hipotalâmica de TRH, resultando na estimulação da produção de PRL; (b) a eliminação da PRL da circulação sistêmica está reduzida, o que contribui ao aumento das suas concentrações; e (c) há diminuição da sensibilidade do lactotrofo ao efeito supressor da dopamina (HEKINSON et al., 2010). Em homens a hiperprolactinemia está mais frequentemente relacionada à presença de macroadenomas hipofisários (DE ROSA et al., 2003).

Entretanto, em homens com hipotireoidismo primário, raramente se observa a hiperprolactinemia (exceto nos casos em que há tumores hipofisários relatados), contrariamente ao que ocorre na mulher. A maioria dos estudos em homens com hipotireoidismo primário e hipogonadismo atesta níveis normais de LH e FSH. Porém, a administração de GnRH a esses pacientes não resulta em liberação de gonadotrofinas hipofisárias, denotando incapacidade do gonadotrofo em responder a esse estímulo (MEIKLE, 2004).

Não há relatos de que a região promotora dos genes que codificam a subunidade β específica do LH ou FSH ou ainda do GnRH apresentem TRE (MEIKLE, 2004; TONI et al., 2005). Além disso, a densidade de receptores de HT (TR) é baixa nas regiões hipotalâmicas em que os neurônios do GnRH se encontram (TONI et al., 2005), dados que sugerem que as ações dos HT sobre a hipófise e o hipotálamo ocorreriam predominantemente por modulação da estabilidade ou do processamento pós-transcricional do mRNA das gonadotrofinas ou do GnRH, levando a alterações da sua bioatividade (MEIKLE, 2004), ou ainda por *inputs* neuroendócrinos em outras regiões do sistema nervoso central, sensíveis ao hormônio tireoideano, que regulariam a síntese e/ou secreção de GnRH (TONI et al., 2005). Entretanto,

a expressão de TRs em gonadotrofos é bastante representativa, maior até do que em tireotrofos e somatotrofos, o que indica a possibilidade de regulação da função dos gonadotrofos por esse hormônio, por mecanismo ainda desconhecido, já que, como foi comentado, não há TRE na região promotora dos genes que codificam o FSH e LH (ALKEMADE et al., 2006; FLIERS et al., 2006).

Sabe-se que o mRNA do β LH se altera em resposta aos níveis de HT, e que os TRs se expressam numa variedade de outros tipos celulares da hipófise anterior, incluindo lactotrofos e somatotrofos (TONI et al., 2005). Dessa forma, é possível, ainda, que o HT atue de maneira indireta sobre os gonadotrofos, interferindo com a secreção de mediadores a partir das células vizinhas, como o peptídeo vasointestinal (VIP), cuja imunorreatividade se encontra bastante aumentada na hipófise de ratos adultos hipotireoideos. A distribuição das células VIP em torno de células de LH sugere que possa existir uma interação parácrina/justácrina entre elas (TONI et al., 2005).

Tanto em ratos castrados quanto em hipotireoideos observa-se a redução nos níveis de TRH e peptídeos derivados do prepro-TRH em regiões do sistema límbico, o que tem sido relacionado às alterações comportamentais identificadas no hipogonadismo e hipotireoidismo (PEKARY e SATTIN, 2001). Vale ressaltar que, ao contrário do que ocorre em áreas do sistema límbico, a produção de TRH em neurônios que se dirigem à eminência média hipotalâmica e que participam, portanto, do controle da secreção de TSH, encontra-se aumentada no hipotireoidismo. Embora estudos similares ainda não tenham sido desenvolvidos avaliando o papel da testosterona nos neurônios parvocelulares do núcleo paraventricular, sede dos neurônios TRHérgicos que controlam a atividade tireoideana, essa possibilidade não pode ser descartada.

Observou-se que o HT está relacionado à ativação pós-transcricional das convertases 1/3 (PC1/3), primariamente, e secundariamente da 2 (PC2), as quais atuam na conversão do pró-TRH a TRH, de modo que, com a aumento da atividade dessas enzimas em indivíduos hipotireoideos, eleva-se a produção de TRH (PERELLO et al., 2006). Essas convertases parecem atuar no processamento de outros pró-hormônios, já que: (a) camundongos knockout para PC1/3 e PC2 são pequenos devido ao processamento alterado do proGHRH; (b) camundongos knockout para PC2 apresentam distúrbios no processamento do pró-glucagon e (c) pacientes que não expressam PC1/3 apresentam vários distúrbios, entre os quais a infertilidade, o que levanta a possibilidade de que o processamento de pró-GnRH possa estar comprometido no hipotireoidismo, visto que o HT, via convertases, poderia participar desse processamento pós-transcricional.

Ações não genômicas dos hormônios tireoideanos têm sido descritas em várias células, como alterações no transporte de cálcio, sódio e glicose através da membrana plasmática e promoção da atividade de proteínas-quinases (DAREZZO et al., 2004; DAVIS et al., 2000).

Sobre astrócitos e somatotrofos, o HT atua na organização dos filamentos de F-actina, promovendo a organização do citoesqueleto. Na ausência desse hormônio, os neurônios também são incapazes de promover sinapses adequadas (SIEGRIST-KAISER et al., 1990) e os somatotrofos apresentam comprometimento da síntese e secreção de GH (GOULART-SILVA et al., 2006), por desarranjos no citoesqueleto, bem como em consequência à redução na transcrição desse gene (ação genômica).

Alterações no citoesqueleto de actina não se restringem aos somatotrofos. Observa-se que no hipotireoidismo há um desarranjo generalizado do citoesqueleto de toda a hipófise, indicando a possibilidade de os gonadotrofos serem igualmente afetados. Deste modo, é grande a possibilidade de que nessa situação haja também comprometimento da síntese e liberação dos hormônios gonadotróficos, já que para a síntese protéica há necessidade de direcionamento do mRNA ao ribossomo, bem como de fatores de alongamento que se encontrem ligados ao citoesqueleto de actina, e que, para a secreção hormonal, se faz necessária a mobilização de vesículas em direção à membrana plasmática, processos que dependem de um citoesqueleto organizado.

Com base nas evidências expostas relacionadas às funções tireoideana e gonadal, e reconhecendo a necessidade de abordagem mais detalhada desse tema ainda pouco explorado e bastante controvertido, propomos com este projeto investigar o papel do hormônio tireoideano, na regulação da expressão dos genes do β FSH e β LH, por meio de análises moleculares, como real-time PCR e *Western Blotting*, perfil polissomal, e celulares, como a imunohistoquímica; da expressão dos genes dos receptores de LH, de FSH e de andrógenos testiculares, também por *real time* PCR e *Western Blotting*; da expressão do gene do receptor de andrógenos nos epidídimos; e das concentrações séricas de LH, FSH e testosterona.

Capítulo 5

CONCLUSÕES

- 1) O hipotireoidismo altera mecanismos moleculares da síntese e secreção de β LH:
 - a. elevando o conteúdo de mRNA;
 - b. reduzindo a estabilidade do mRNA por reduzir o tamanho da cauda poli(A);
 - c. reduzindo a associação do mRNA ao polissomo;
 - d. reduzindo o conteúdo protéico na hipófise observado pelo *Western Blotting* e pela imunohistoquímica;
 - e. ocasionando intensa elevação da concentração sérica.

- 2) O hipotireoidismo altera mecanismos moleculares da síntese e secreção de β FSH:
 - a. elevando o conteúdo de mRNA;
 - b. reduzindo a associação do mRNA ao polissomo;
 - c. reduzindo o conteúdo protéico na hipófise observado pelo *Western Blotting* e pela imunohistoquímica;
 - d. reduzindo a concentração sérica.

- 3) O hipotireoidismo afeta os órgãos andrógeno-dependentes:
 - a. reduzindo o peso da próstata e da vesícula seminal;
 - b. reduzindo a concentração sérica de testosterona;
 - c. alterando a morfometria dos túbulos seminíferos;
 - d. aumentando o mRNA e reduzindo a expressão protéica do receptor de LH.

- 4) O hormônio tireoideano modula a expressão de β LH:
- reduzindo o conteúdo de mRNA (aumentado pelo hipotireoidismo);
 - aumentando a associação do mRNA ao polissomo;
 - aumentando o conteúdo protéico na hipófise observado pelo *Western Blotting* e pela imunohistoquímica;
 - reduzindo a concentração sérica.
- 5) O hormônio tireoideano modula a expressão de β FSH:
- reduzindo o conteúdo de mRNA;
 - aumentando a associação do mRNA ao polissomo;
 - aumentando o conteúdo protéico na hipófise observado pelo *Western Blotting* e pela imunohistoquímica;
 - aumentando a concentração sérica.
- 6) O hormônio tireoideano modula a expressão de receptores de LH e receptores de andrógenos (AR), independente da concentração sérica de testosterona:
- reduzindo a expressão do mRNA e elevando a proteína do receptor de LH;
 - reduzindo a expressão da proteína do receptor de AR no tratamento agudo e elevando no hipertireoidismo;
 - reduzindo a expressão do mRNA em todos os segmentos do epidídimo e elevando a proteína no corpo e cauda do epidídimo do receptor de AR.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS¹

ALKEMADE, A.; FRIESEMA, E. C.; KUIPER, G. G.; WIERSINGA, W. M.; SWAAB, D. F.; VISSER, T. J.; FLIERS, E. Novel neuroanatomical pathways for thyroid hormone action in the human anterior pituitary. European Journal of Endocrinology, v. 154, n. 3, p. 491-500, 2006.

ANTONY, F. F.; ARULDHAS, M. M.; UDHAYAKUMAR, R. C.; MARAN, R. R.; GOVINDARAJULU, P. Inhibition of Leydig cell activity in vivo and in vitro in hypothyroid rats. Journal of Endocrinology, v. 144, n. 2, p. 293-300, 1995.

ARIYARATANE, H. B. S.; MENDIS-HANDAGAMA, S. M. L. C.; MASON, J. Effects of T3 on testicular interstitial cells and androgen secretory capacity of the prepubertal rat. Biology of Reproduction, v. 63, p. 493-502, 2000.

ASCOLI, M.; FANELLI, F.; SEGALOFF, D. L. The lutropin/Choriogonadotropin receptor: a 2002 perspective. Endocrine Reviews, v. 23, n. 2, p. 141-174, 2002

BAGALOPAL, V.; PARKER, R. Polysomes, P bodies and stress granules: states and fates of eukariotic mRNAs. Current Opinion in Cell Biology, v. 21, n. 3, p. 403-408, 2009.

BARKER, S. B.; KLITGAARD, H. M. Metabolism of tissues excised from thyroxineinjected rats. American Journal of Physiology, v. 170, p. 81-86, 1952.

BIANCO, A. C.; KIMURA, E. T. Fisiologia da glândula tireóide. In: AIRES, M. M. (Ed.) Fisiologia. 3. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2008. p. 812-828.

BOUSFIELD, G. R.; JIA, L.; WARD, D. N. Gonadotropins: Chemistry and Biosynthesis. In: NEIL, J. D. (Ed.). Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. 3rd. ed. Amsterdam: Ed Elsevier, 2006. p. 1581-1634.

BRADFORD, M. M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRUNI, J. F.; MARSHALL, S.; DIBBET, J. A.; MEITES, J. Effects of hyper- and hypothyroidism on serum LH and FSH levels in intact and gonadectomized male and female rats. Endocrinology, v. 97, n. 3, p. 558-563, 1975.

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação: referência: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BUCHAN, J. R.; PARKER, R. Eukariotic stress granules: the ins and outs of translation. Molecular Cell, v. 36, p. 932-941, 2009

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, n. 3, p. 664-669, 2000.

CHAPIN, R. E.; STEVENS, J. T.; HUGHES, C. L.; KELCE, W. R.; HESS, R. A.; BASTON, G. P. Endocrine modulation of reproduction. Fundamental and Applied Toxicology, v. 29, p. 1-17, 1996.

CHEN, H.; GE, R. S.; ZIRKIN, B. R. Leydig cells: From stem cells to aging. Molecular and Cellular Endocrinology, v. 306, n. 1-2, p. 9-16, 2009.

CHENEVAL, D.; KASTELIC, T.; FUERST, P.; PARKER, C. N. A Review of Methods to Monitor the Modulation of mRNA Stability : A Novel Approach to Drug Discovery and Therapeutic Intervention. Journal of Biomolecular Screening, v. 15, n. 6, p. 609-622, 2010.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical Biochemistry, v. 162, n. 1, p. 156-159, 1987.

COUNIS, R.; LAVERRIERE, J.; GARREL, G.; BLEUX, C.; COHEN-TANNOUDI, J.; LERRANT, Y.; KOTTLER, M.; MAGRE, S. Gonadotropin- releasing hormone and the control of gonadotropo function. Reproduction, Nutrition and Development, v. 45, p. 243-254, 2005.

DANZI, S.; KLEIN, I. Post-transcriptional regulation of myosin heavy chain expression in the heart by triiodothyronine. American Journal of Physiology, v. 288, p. H455-H460, 2005.

DAREZZO, S.; INCERPI, S.; FAITH, B. D.; ACCONCIA, F.; MARINO, M.; FARIAS, R. N.; DAVIS, P. J. Rapid nongenomic effects of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine on the intracellular calcium mobilization and kinase pathways. Endocrinology, v. 145, n. 12, p. 5694-5703, 2004.

DAVIS, P. J.; DAVIS, F. B.; HUNG-YUN, L. Promotion by thyroid hormone of cytoplasm-to-nucleus shuttling of thyroid hormone receptors. Steroids, v. 73, p. 1013-1017, 2008a.

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

DAVIS, P. J.; SHIH, A.; HUNG-YUN, L.; MARTINO, L. J.; DAVIS, F. B. Thyroxine promotes association of mitogen-activated protein kinase and nuclear thyroid hormone receptor (TR) and causes serine phosphorylation of TR. The Journal of Biological Chemistry, v. 275, n. 48, p. 38032-38039, 2000.

DE ROSA, M.; ZARRILLI, S.; DI SARNO, A.; MILANO, N.; GACCIONE, M.; BOGGIA, B.; LOMBARDI, G.; COLAO, A. Hyperprolactinemia in men: clinical and biochemical features and response to treatment. Endocrine, v. 20, n. 1-2, p. 75-82, 2003.

DILLMANN, W. H.; BARRY, S.; ALEXANDER, N. M. A physiological dose of triiodothyronine normalizes cardiac myosin adenosine triphosphatase activity and changes myosin isoenzyme distribution in semistarved rats. Endocrinology, v. 112, n. 6, p. 2081-2087, 1983.

EVERETT, J. W. Pituitary and Hypothalamus: Perspectives and Overview. In: NEIL, J. D. (Ed). Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. 3rd. ed. Amsterdam: Ed Elsevier, 2006. p. 1289-1307.

FEKETE, C.; LECHAN, R. M. Negative feedback regulation of hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone (TRH) synthesizing neurons: role of neuronal afferents and type 2 deiodinase. Frontiers of Neuroendocrinology, v. 28, p. 97-114, 2007.

FIRAT-KARALAR, E. N.; WELCH, M. D.. New mechanisms and functions of actin nucleation. Current Opinion in Cell Biology, v. 23, n. 1, p. 4-13, 2011.

FLIERS, E.; UNMEHOPA, U. A.; ALKEMADE, A. Functional neuroanatomy of thyroid hormone feedback in the human hypothalamus and pituitary gland. Molecular and Cellular Endocrinology, v. 251, n. 1-2, p. 1-8, 2006.

GALLIE, D. R. A tale of two termini: a functional interaction between the termini of an mRNA is a prerequisite for efficient translation initiation. Gene, v. 216, n. 1, p. 1-11, 1998.

GARRIDO-GRACIA, J. C.; GORDON, A.; AGUILAR, R.; MONTERDE, J. G.; BLANCO, A.; MULAS, J. M.; SÁNCHEZ-CRIADO, J. E. Morphological effects of oestradiol-17 β , and selective oestrogen receptor α and β agonists on luteinising hormonesecreting cells in tamoxifen-treated ovariectomised rats. Histology and Histopathology, v. 23, p. 1453-1463, 2008.

GAY, V. L. Decreased metabolism and increased serum concentrations of LH and FSH following nephrectomy of the rat: absence of short-loop regulatory mechanisms. Endocrinology, v. 95, n. 6, p. 1582-1588, 1975.

GLOSS, B.; GIANNOCCO, G.; SWANSON E. A.; MORISCOT, A. S.; CHIELLINI, G.; SCANLAN, T.; BAXTER, J. D.; DILLMANN, W. H. Different configurations of specific thyroid hormone response elements mediate opposite effects of thyroid hormone and GC-1 on gene expression. Endocrinology, v. 146, p. 4926-4933, 2005.

GOYAL, H. O.; BRADEN, T. D.; MANSOUR, M.; WILLIAMS, C. S.; KAMALELDIN, A.; SRIVASTAVA, K. K. Diethylstilbestrol-treated adult rats with altered epididymal sperm numbers and sperm motility parameters, but without alterations in sperm production and sperm morphology. Biology of Reproduction, v. 64, p. 927-934, 2001.

GOULART-SILVA, F.; GIANNOCCO, G.; SANTOS, M. F.; NUNES, M. T. Thyroid hormone induction of actin polymerization in somatotrophs of hypothyroid rats: potential repercussions in growth hormone synthesis and secretion. Endocrinology, v. 12, p. 5777-5785, 2006.

GOULART-SILVA, F.; SOUZA, P. B.; NUNES, M. T. T3 rapidly modulates TSH β mRNA stability and translational rate in the pituitary of hypothyroid rats. Molecular and Cellular Endocrinology, v. 332, n. 1-2, p. 277-282, 2010.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de fisiologia médica. 11. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

HATSUTA, M.; ABE, K.; TAMURA, K.; RYUNO, T.; WATANABE, G.; TAYA, K.; KOGO, H. Effects of hypothyroidism on the estrous cycle and reproductive hormones in mature female rat. European Journal of Pharmacology, v. 486, p. 343-348, 2004.

HEKIMSOY, Z.; KAFESÇILER, S.; GÜÇLÜ, F.; ÖZMEN, B. The prevalence of hyperprolactinaemia in overt and subclinical hypothyroidism. Endocrine Journal, v. 57, n. 12, p. 1011-1015, 2010.

IGLESIAS, P.; DÍEZ, J. J. Thyroid dysfunction and kidney disease. European Journal of Endocrinology, v. 160, n. 4, p. 503-515, 2009.

JANNINI, E. A.; CRESCENZI, A.; RUCCI, N.; SCREPONI, E.; CAROSA, E.; DEMATTEIS, A.; MACCHIA, E.; D'AMATI, G.; D'ARMIENTO, M. Ontogenetic pattern of thyroid hormone receptor expression in the human testis. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v. 85, n. 9, p. 3453-3457, 2000.

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, n. 5, p. 2521-2526, 1990

JANNINI, E. A.; ULISSE, S.; D'ARMIENTO, M. Thyroid hormone and male gonadal function. Endocrine Reviews, v. 16, n. 4, p. 443-459, 1995

JELINSKY, S. A.; TURNER, T. T.; BANG, H. J.; FINGER, J. N.; SOLARZ, M. K.; EWA WILSON, E.; BROWN, E. L.; KOPF, G. S.; JOHNSTON, D. S. The rat epididymal transcriptome: comparison of segmental gene expression in the rat and mouse epididymides. Biology of Reproduction, v. 76, p. 561-570, 2007.

JOSHI, A. S.; WOOLF, P. D. Pituitary hyperplasia secondary to primary hypothyroidism: a case report and review of the literature. Pituitary, v. 8, p. 99-103, 2005.

KERR, J. B.; LOVELAND, K. L.; O'BRYAN, M. K.; DE KRETSEK, D. M. Cytology of the testis and intrinsic control mechanisms. In: NEIL, J. D. (Ed.). Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. 3rd. ed. Amsterdam: Elsevier, 2006. p. 829-947.

KITAHARA, K.; SAKAI, Y.; HOSAKA, M.; HIRA, Y.; KAKIZAKI, H.; WATANABE, T. Effects of a depot formulation of the GnRH agonist leuprolin on the ultrastructure of male rat pituitary gonadotropes. Archives of Histology and Cytology, v. 70, n. 2, p. 79-93, 2007.

KLEIN, I.; DANZI, S. Thyroid disease and the heart. Circulation, v. 116, p. 1725-1735, 2007.

KRASSAS, G. E. Thyroid disease and female reproduction. Fertility and Sterility, v. 74, n. 6, p. 1063-1070, 2000.

KRASSAS, G. E.; PAPADOPOULOU, F.; TZIOMALOS, K.; ZEGINIADOU, T.; PONTIKIDES, N. Hypothyroidism has an adverse effect on human spermatogenesis: a prospective, controlled study. Thyroid, v. 18, n. 12, p. 1255-1259, 2008.

KRETSEK, D. M.; ATKINS, R. C.; PAULSEN, C. A. Role of the kidney in the metabolism of luteinizing hormone. Journal of Endocrinology, v. 58, n. 3, p. 425-434, 1973.

KRSMANOVIC, L. Z.; MARTINEZ-FUENTES, A. J.; ARORA, K. K.; MORES, N.; TOMIC, M.; STOJILKOVIC, S. S.; CATT, K. J. Local regulation of gonadotroph function by pituitary gonadotropin-releasing hormone. Endocrinology, v. 141, n. 3, p. 1187-1195, 2000.

LABRIE, F. Blockade of testicular and adrenal androgens in prostate cancer treatment. Nature Reviews Urology, v. 8, p. 73-80, 2011.

LAN N.; HELLEMANS, K. G. C.; ELLIS, L.; VIAU, V.; WEINBERG, J. Role of testosterone in mediating prenatal ethanol effects on hypothalamic-pituitary-adrenal activity in male rats. Psychoneuroendocrinology, v. 34, n. 9, p. 1314-1328, 2009.

LENZI, A.; BALERCIA, G.; BELLASTELLA, A.; COLAO, A.; FABBRI, A.; FORESTA, C.; GALDIERO, M.; GANDINI, L.; KRAUSZ, C.; LOMBARDI, G.; LOMBARDO, F.; MAGGI, M.; RADICIONI, A.; SELICE, R.; SINISI, A. A.; FORTI, G. Epidemiology, diagnosis, and treatment of male hypogonadotropic hypogonadism. Journal of Endocrinological Investigation, v. 32, n. 11, p. 934-938, 2009.

LOVEJOY, J. C.; SMITH, S. R.; BRAY, G. A.;VELDHUIS, J. D.; ROOD, J. C.; TULLEY, R. Effects of experimentally induced mild hyperthyroidism on growth hormone and insulin secretion and sex steroid levels in healthy young men. Metabolism, v. 46, p. 1424-1428, 1997.

MANNA, P. R.; KERO, J.; TENA-SEMPERE, M.; PAKARINEN, P.; STOCCO, D. M.; HUHTANIEMI, I. T. Assessment of mechanisms of thyroid hormone action in mouse Leydig cells: regulation of the steroidogenic acute regulatory protein, steroidogenesis, and luteinizing hormone receptor function. Endocrinology, v. 142, n. 1, p. 319-331, 2001.

MANNA, P. R.; TENA-SEMPERE, M.; HUHTANIEMI, I. T. Molecular mechanisms of thyroid hormone-stimulated steroidogenesis in mouse leydig tumor cells. Involvement of the steroidogenic acute regulatory (StAR) protein. The Journal of Biological Chemistry, v. 274, n. 9, p. 5909-5918, 1999.

MARAN, R. R. Thyroid hormones: their role in testicular steroidogenesis. Archives of Andrology, v. 49, n. 5, p. 375-388, 2003.

MEIKLE, A. W. The interrelationships between thyroid dysfunction and hypogonadism in men and boys. Thyroid, v. 14, p. S17-S25, 2004. Sup

MIRALLES F.; VISA, N. Actin in transcription and transcription regulation. Current Opinion in Cell Biology, v. 18, n. 3, p. 261-266, 2006.

NOLAN, T.; HANDS, R. E.; BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. Nature Protocols, v.1, n.3, p. 1559-1582, 2006.

NORMAN, A. W.; LITWACK, G. Hormones. 2nd ed. California: Academic Press, 1997. 558 p.

NUNES, M. T. Fisiologia endócrina. In: AIRES, M. M. (Ed.) Fisiologia. 3. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2008. p. 917–1174.

OPPENHEIMER, J. H.; SCHWARTZ, H. L.; SURKS, M. I. Tissue differences in the concentration of triiodothyronine nuclear binding sites in the rat: liver, kidney, pituitary, heart, brain, spleen, and testis. Endocrinology, v. 95, p. 897-903, 1974

ORIDE, A.; KANASAKI, H.; PURWANA, I. N.; MUTIARA, S.; MIYAZAKI, K. Follistatin induced by thyrotropin-releasing hormone (TRH) plays no role in prolactin expression but affects gonadotropin FSHbeta expression as a paracrine factor in pituitary somatolactotroph GH3 cells. Regulatory Peptides, v. 156, p. 65-71, 2009.

O'SHAUGHNESSY, P. J.; MORRIS, I. D.; HUHTANIEMI, I.; BAKER, P.J.; ABEL, M. H. Role of androgen and gonadotrophins in the development and function of the Sertoli cells and Leydig cells: data from mutant and genetically modified mice. Molecular and Cellular Endocrinology, v. 306, n. 1-2, p. 2-8, 2009.

PATRIZIO, P; SANGUINETI, F.; SAKKAS D. Modern andrology: from semen analysis to postgenomic studies of the male gametes. Annals of the New York Academic Sciences, v. 1127, p. 59-63, 2008.

PATRÃO, M. T. C. C.; SILVA, E. J. R.; AVELLAR, M. C. W. Androgens and the male reproductive tract: an overview of classical roles and current perspectives. Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia, v. 53, n. 8, p. 934-945, 2009.

PAUL, A. L.; MUKDSI, J. H.; PELLIZAS, C. G.; MONTESINOS, M.; SILVINA GUTIÉRREZ, S.; SUSPERREGUY, S.; RIO, A.; MALDONADO, C. A.; TORRES, A. I. Thyroid hormone receptor $\alpha 1-\beta 1$ expression in epididymal epithelium from euthyroid and hypothyroid rats. Histochemistry and Cell Biology, v. 129, p. 631–642, 2008.

PEI-JU, T.; YA-HUI, H.; CHUNG-HSUAN, S.; RUEY-NAN, C.; CHI-DE, C.; WEI-JAN, C.; CHIA-SIU, W.; KWANG-HUEI, L. Direct regulation of androgen receptor-associated protein 70 by Thyroid hormone and its receptors. Endocrinology, v. 148, n. 7, p. 3485-3495, 2007.

PEKARY, A. E.; SATTIN, A. Regulation of TRH and TRH-related peptides in rat brain by thyroid and steroid hormones. Peptides, v. 22, p. 1161-1173, 2001.

PERELLO, M.; FRIEDMAN, T.; PAEZ-ESPINOSA, V.; SHEN, X.; STUART, R. C.; NILLNI, E. A. Thyroid hormones selectively regulate the posttranslational processing of prothyrotropin-releasing hormone in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. Endocrinology, v. 147, n. 6, p. 2705-2716, 2006.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Research, v. 29, n. 9, p. 2002-2007, 2001.

PORTMAN, M. A. Thyroid hormone regulation of heart metabolism. Thyroid, v. 18, n. 2, p. 217-225, 2008.

PROUD, C. G. Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery. Biochemistry Journal, v. 403, n. 2, p. 217-234, 2007.

RASMUSSEN, D. D. Chronic daily ethanol and withdrawal: 5. Diurnal effects on plasma thyroid hormone levels. Endocrine, v. 22, n. 3, p. 329-334, 2003.

RISBRIDGER, G. P.; TAYLOR, R. A. Physiology of the male accessory sex structures: the prostate gland, seminal vesicles, and bulbourethral glands. In: NEIL, J. D. (Ed). Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 2006. p. 1149-1172.

ROBAIRE, B.; HINTON, B.; ORGEBIN-CRIST, M. C. The epididymis. In: NEIL, J. D. (Ed). Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 2006. p. 1071-1148.

ROBERTSON, K. M.; O'DONNELL, L.; JONES, M. E. E.; MEACHEM, S. J.; BOON, W. C.; FISHER, C. R.; GRAVES, K. H.; MCLACHLAN, R. I.; SIMPSON, E. R. Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp19) gene. PNAS – Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 96, p. 7986-7991, 1999.

ROLHF, F. J. tpsDig. Versão 2.10. Suny at Stony Brook: Ecology and Evolution. 2006. Disponível em: <<http://life.bio.sunysb.edu/morph>>. Acesso em: 10 dez. 2008.

ROMANO, R. M.; ROMANO, M. A.; BERNARDI, M. M.; FURTADO, P.V.; OLIVEIRA, C. A. Prepubertal exposure to commercial formulation of the herbicide glyphosate alters testosterone levels and testicular morphology. Archives of Toxicology, v. 84, n. 4, p. 309-317, 2010.

ROSONINA, E.; MANLEY, J. L. Alternative polyadenylation blooms. Developmental Cell, v. 18, p. 172-174, 2010.

SAHOO, D. K.; ROY, A.; BHANJA, S.; CHAINY, G. B. N. Hypothyroidism impairs antioxidant defence system and testicular physiology during development and maturation. General and Comparative Endocrinology, v. 156, p. 63-70, 2008.

SALLÉS, F. J.; RICHARDS, W. G.; STRICKLAND, S. Assaying the polyadenylation state of mRNAs. Methods, v. 7, n. 1, p. 38-45, 1999.

SANCHEZ-CRIADO, J.; MULAS, J. M.; BELLIDO, C.; NAVARRO, V. M.; AGUILAR, R.; GARRIDO-GRACIA, J. C.; MALAGON, M. M.; TENA-SEMPERE M.; BLANCO, A. Gonadotropin-secreting cells in ovariectomized rats treated with different oestrogen receptor ligands: a modulatory role for ER β in the gonadotrope? Journal of Endocrinology, v. 188, p. 167-177, 2006.

SERRANO-NASCIMENTO, C.; CALIL-SILVEIRA, J.; NUNES, M. T. Posttranscriptional regulation of sodium-iodide symporter mRNA expression in the rat thyroid gland by acute iodide administration. American Journal of Physiology. Cell Physiology, v. 298, n. 4, p. C893-C899, 2010.

SHEUE-YANN, C.; LEONARD, J. L.; DAVIS, P. J. Molecular aspects of thyroid hormone actions. Endocrine Reviews, v. 31, n. 2, p. 139-170, 2010.

SIEGRIST-KAISER, C.; JUGE-AUBRY, C.; TRANTER, M. P.; EKENBERGER, D. M.; LEONARD, J. L. Thyroxine-dependent modulation of actin polymerization in cultured astrocytes. The Journal of Biological Chemistry, v. 265, n. 9, p. 5296-5302, 1990.

SILVA, F. G.; GIANNOCCO, G.; LUCHESSI, A. D.; CURI, R.; NUNES, M. T. T3 acutely increases GH mRNA translation rate and GH secretion in hypothyroid rats. Molecular and Cellular Endocrinology, v. 317, n. 1-2, p. 1-7, 2010.

SOFIKITIS, N.; GIOTITSAS, N.; TSOUNAPI, P.; BALTOGIANNIS, D.; GIANNAKIS, D.; PARDALIDIS, N. Hormonal regulation of spermatogenesis. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, v. 109, n. 3-5, p. 323-330, 2008.

SORENSEN, R. L.; STOUT, L. E.; BRELJE, C.; JETTON, T. L.; MATSCHINSKY, M. Immunohistochemical evidence for the presence of glucokinase in the gonadotropes and thyrotropes of the anterior pituitary gland of rat and monkey. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, v. 55, n. 6, p. 555-566, 2007.

STATON, J. M.; THOMSON, A. M.; LEEDMAN, P. J. Hormonal regulation of mRNA stability and RNA-protein interactions in the pituitary. Journal of Molecular Endocrinology, v. 25, n. 1, p. 17-34, 2000.

STOCCO, D. M.; CLARK, B. J. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. Endocrine Reviews, v. 17, n. 3, p. 221-244, 1996.

TOHEI, A.; AKAI, M.; TOMABECHI, T.; MAMADA, M.; TAKAI, K. Adrenal and gonadal function in hypothyroid adult male rats. Journal of Endocrinology, v. 152, n. 1, p. 147-154, 1997.

TONI, R.; DELLA CASA, C.; CASTORINA, S.; COCCHI, D.; CELOTTI, F. Effects of hypothyroidism and endocrine disruptor-dependent non-thyroidal illness syndrome on the GnRH-gonadotroph axis of the adult male rat. Journal of Endocrinology Investigation, v. 28, p. 20-27, 2005. Suppl. 11.

VALENTI, S.; GUIDO, R.; FAZZUOLI, L.; BARRECA, A.; GIUSTI, M.; GIORDANO, G. Decreased steroidogenesis and cAMP production in vitro by leydig cells isolated from rats made hypothyroid during adulthood. International Journal of Andrology, v. 20, n. 5, p. 279-286, 1997.

VAN DEN BERGHE, G.; BAXTER, R. C.; WEEKERS, F.; WOUTERS, P.; BOWERS, C. Y.; IRANMANESH, A.; VELDHULS, J. D.; BOUILLON, R. The combined administration of GH-releasing peptide-2 (GHRP-2), TRH and GnRH to men with prolonged critical illness evokes superior endocrine and metabolic effects compared to treatment with GHRP-2 alone. Clinical Endocrinology, v. 56, p. 655-669, 2002.

WAGNER, M. S.; WAJNER, S. M.; MAIA, A. L. The Role of Thyroid Hormone in Testicular Development and Function. Journal of Endocrinology, v. 199, n. 3, p. 351-365, 2008.

WAJNER, S. M.; WAGNER, M. S.; MELO, R. C. N.; PARREIRA, G. G.; CHIARINI-GARCIA, H.; BIANCO, A. C.; FEKETE, C.; SANCHEZ, E.; LECHAN, R. M.; MAIA, A. L. Type 2 iodothyronine deiodinase is highly expressed in germ cells of adult rat testis. Journal of Endocrinology, v. 194, p. 47-54, 2007.

WALKER, W. H.; CHENG, J. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. Reproduction, v. 130, n. 1, p. 15-28, 2005.

WANG, L.; CHENG-LUNG, H.; CHAWN-SHANG, C. Androgen receptor corepressors: an overview. Prostate, v. 63, n. 2, p. 117-130, 2005.

WARTOFSKY, L.; VAN NOSTRAND, D.; BURMAN, K. D. Overt and subclinical hypothyroidism in women. Obstetrical and Gynecological Survey, v. 61, n. 8, p. 535-542, 2006.

WATANABE, T.; BANNO, T.; JEZIOROWSKI, T.; OHSAWA, Y.; WAGURI, S.; GRUBE, D.; UCHIYAMA, Y. Effects of sex steroids on secretory granule formation in gonadotropes of castrated male rats with respect to granin expression. Endocrinology, v. 139, n. 6, p. 2765-2773, 1998.

YEN, P. M. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. Physiological Reviews, v. 81, n. 3, p. 1097-1142, 2001.

ZHOU, W.; WANG, G.; SMALL, C. L.; LIU, Z.; WENG, C. C.; YANG, L.; GRISWOLD, M. D.; MEISTRICH, M. L. Gene expression alterations by conditional knockout of androgen receptor in adult Sertoli cells of Utp14b jsd/jsd (jsd) mice. Biology of Reproduction, v. 84, p. 400-408, 2011.