

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
ENDOCRINOLOGIA

Expressão da Iodotironina Desiodase Tipo 2 no Aparelho
Reprodutor de Ratos Adultos

SIMONE MAGAGNIN WAJNER

Porto Alegre, Dezembro de 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
ENDOCRINOLOGIA

Expressão e Regulação da Iodotironina Desiodase Tipo 2 no
Aparelho Reprodutor de Ratos Adultos

SIMONE MAGAGNIN WAJNER

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia, UFRGS como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre

Orientadora: Profa. Dra. Ana Luiza Maia

Co-Orientadora: Dra. Márcia dos Santos Wagner

Porto Alegre, Dezembro de 2006

Aos meus pais pelo amor, apoio e exemplo diário de luta e perseverança.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Ana Luiza Maia, agradeço por seres esta pessoa de fibra, sempre apoiando e conduzindo com verdadeiro empenho e participação efetiva durante toda minha formação desde o período de iniciação científica; é admirável tua dedicação para a docência e pesquisa, teus ensinamentos e amizade.

A Dra. Márcia Wagner, por sua dedicação, experiência e competência nos valiosos ensinamentos das rotinas de laboratório e redação de artigos científicos, sem deixar de lado a amizade.

A Dra. Rossana Melo pelo auxílio na interpretação e discussão dos dados morfológicos.

Ao Dr. Ronald Lechan pela realização dos experimentos de hibridização *in situ*.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular, agradeço pelo agradável ambiente de trabalho, em especial à colega Clarissa Capp pela amizade inestimável e presença incondicional em todos os momentos da jornada.

Ao pessoal do Centro de Experimentação Animal do HCPA.

Ao pessoal do CREAL da UFRGS pela sempre pronta disponibilização dos animais para pesquisa.

Aos bolsistas de Iniciação Científica, em especial a acadêmica Natália Fernandes pelo auxílio nas rotinas de laboratório.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia, pela estrutura, apoio e colaboração oferecidos aos seus alunos.

Aos meus padrinhos.

À minha filha Carolina, por ser minha grande inspiração e alegria.

Ao meu marido Moacir pelo amor, carinho, apoio e por me fazer uma pessoa melhor.

Ao concluir este trabalho, reconheço a importância e o apoio de todos aqueles que estiveram ao meu lado. Gostaria de expressar minha gratidão e espero que se orgulhem por esta conquista.

Esta Dissertação de Mestrado segue o formato proposto pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia, Metabolismo e Nutrição, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo apresentada na forma de dois manuscritos sobre o tema da Dissertação:

- Artigo de revisão geral do tema;
- Artigo original referente ao trabalho de pesquisa propriamente dito; encaminhado para publicação em jornal científico de circulação internacional.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	4
JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	9
RESUMO	11

Capítulo 1

Artigo de Revisão: O Papel dos Hormônios Tireoidianos na Função Testicular	14
1.1 Resumo	15
1.2 Introdução.....	16
1.3 Mecanismos de Ação dos Hormônios Tireoidianos.....	18
1.4 Hormônios Tireoidianos e Função Testicular.....	20
1.5 Regulação das Células de Sertoli pelo Hormônio Tireoidiano	23
1.6 Esteroidogênese Testicular e Hormônio Tireoidiano.....	25
1.7 Transportadores e Receptores para Hormônio Tireoidiano no Testículo	28

1.8 Expressão das Iodotironinas Desiodases no Testículo.....	29
1.9 Conclusões	31
1.10 Referências Bibliográficas	32
1.11 Tabela 1	40
1.12 Legendas das Figuras.....	41
1.13 Figuras 1 e 2	42-43

Capítulo 2

Artigo Original: Type 2 Iodothyronine Deiodinase is highly Expressed in Germ Cells of Adult Rat Testis	45
2.1 Abstract	47
2.2 Introduction.....	48
2.3 Material and Methods.....	50
2.4 Results	55
2.5 Discussion.....	57
2.6 References	61
2.7 Figure Legends.....	66
2.8 Figures 1, 2 and 3	67-69

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Os hormônios tireoidianos são essenciais para vários processos biológicos como desenvolvimento, crescimento e metabolismo. A tiroxina (T_4), o principal produto secretado pela tireóide, funciona primariamente como um pró-hormônio para a produção do hormônio tireoidiano ativo, triiodotironina (T_3). O T_3 , que possui alta afinidade pelos receptores nucleares dos hormônios tireoidianos (TR), é responsável, virtualmente, por todos os efeitos metabólicos dessa classe de hormônios.

As reações de desiodação do T_4 , que resultam na ativação do hormônio tireoidiano, são catalisadas pela ação de duas isoenzimas denominadas iodotironinas monodesiodases. A iodotironina desiodase tipo 1 (D1) catalisa a desiodação tanto do anel fenólico quanto do anel tirosínico convertendo T_4 a T_3 , T_4 a rT_3 e T_3 e rT_3 a T_2 . A desiodase tipo 2 (D2) atua exclusivamente no anel fenólico das iodotironinas, convertendo T_4 a T_3 e rT_3 a T_2 . Do ponto de vista fisiológico o papel atribuído a D1 é fornecer T_3 para circulação periférica, enquanto a função da D2 é regular a concentração intracelular do T_3 em tecidos onde a presença desse hormônio é crítica.

Estudos recentes realizados pelo nosso grupo descreveram pela primeira vez a presença da enzima D2 no testículo de camundongos. No entanto, a expressão da D2 nas diferentes subtipos celulares do testículo, bem como sua importância para a regulação dos hormônios tireoidianos sobre a função do aparelho reprodutor

masculino, não são conhecidas.

Nesse sentido, o presente trabalho propõe:

- Avaliar a expressão e atividade da D2 nos subtipos celulares do testículo;
- Avaliar a expressão da D2 na próstata, epidídimo e vesícula seminal;
- Avaliar as alterações da expressão da D2 no aparelho reprodutor de ratos adultos hipotireoideos.

RESUMO

Classicamente o testículo tem sido descrito com um órgão não-responsivo aos hormônios tireoidianos. Entretanto, nos últimos anos, diversos estudos têm demonstrado que os hormônios tireoidianos desempenham um papel crítico para o desenvolvimento e função testicular. Trabalhos realizados pelo nosso grupo identificaram a presença da desidase tipo 2 (D2), enzima envolvida na conversão do T₄ no hormônio ativo T₃, no testículo de camundongos adultos e sua regulação pelo *status* tireoidiano. No entanto, a localização da D2 nos diferentes tipos celulares nesse órgão não foi estabelecida. O presente trabalho avaliou a expressão e atividade da D2 nas frações germinativa e somática do testículo, bem como sua atividade nos demais órgãos do aparelho reprodutor de ratos adultos. Para os ensaios de *Real Time-PCR* e determinação de atividade enzimática, os testículos de ratos controles e hipotireoideos (tratados com metimazol 0,03% por 4 semanas) foram removidos e imediatamente tratados enzimaticamente para isolamento de frações somática e germinativa. Os demais tecidos foram removidos e congelados para posterior utilização. Para os ensaios de hibridização *in situ*, os animais foram preparados, e os testículos, removidos e analisados. Os sinais de hibridização *in situ*, confirmados pela determinação dos níveis de mRNA da D2 através da técnica de *Real Time-PCR*, demonstraram a presença de transcritos da D2 em níveis significativamente maiores nas células germinativas quando comparado às células somáticas (P=0,001). A atividade enzimática da D2 nessas células

foi de $0,23 \pm 0,003$ fmol/min.mg prot. As células tubulares somáticas, bem como as células intersticiais, foram virtualmente negativas para a presença da D2. Nos demais tecidos avaliados, a atividade da D2 foi detectada apenas na próstata (0,03 fmol/min.mg prot). A indução do hipotireoidismo aumentou significativamente a atividade da D2 na fração germinativa ($p=0,03$), e também na próstata ($p=0,007$). Este trabalho demonstra, pela primeira vez, a expressão da D2 nas células germinativas do testículo adulto, sugerindo um efeito do hormônio tireoidiano sobre o processo de espermatogênese.

Palavras-chave: Tireóide, Hormônio Tireoidiano, Iodotironina Desiodase tipo 2, Aparelho Reprodutor Masculino, Testículo.

Capítulo I

O Papel dos Hormônios Tireoidianos na Função Testicular

O Papel dos Hormônios Tireoidianos na Função Testicular

Simone Magagnin Wajner , Márcia dos Santos Wagner e Ana Luiza Maia

Setor de Tireóide, Serviço de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Título abreviado: Hormônios Tireoidianos e Testículo

Palavras-chave: hormônio tireoidiano, tireóide, testículo, roedores, humanos

Correspondência: Dra. Ana Luiza Maia

Serviço de Endocrinologia

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350

CEP 90035-003 – Porto Alegre, RS, Brasil

Telefone: 55- 51- 33310207

E-mail: almaia@ufrgs.br

RESUMO

Os hormônios tireoidianos são essenciais para o crescimento, desenvolvimento e metabolismo. O pró-hormônio tiroxina (T_4) é sintetizado e secretado pela glândula tireóide junto com uma pequena quantidade do hormônio ativo, a triiodotironina (T_3). A conversão de T_4 em T_3 ocorre na periferia através da atividade das iodotironinas desidases tipo 1 e tipo 2 (D1 e D2). Os efeitos biológicos dos hormônios tireoidianos são mediados pela interação do hormônio metabolicamente ativo (T_3) com transportadores de membrana e receptores nucleares, resultando em ativação da transcrição gênica. Os hormônios tireoidianos também desempenham uma ação não-genômica, que ocorre na membrana plasmática, citoplasma e também em organelas como a mitocôndria. Classicamente as gônadas eram consideradas refratárias aos hormônios tireoidianos. Estudos recentes, no entanto, têm demonstrado que o hormônio da tireóide desempenha um papel crítico no aparelho reprodutor, não somente durante o período de desenvolvimento, mas também na vida adulta. Neste artigo apresentamos uma revisão sobre o papel desempenhado pelos hormônios tireoidianos sobre o desenvolvimento e função testicular.

INTRODUÇÃO

Os hormônios tireoidianos são produzidos na glândula tireóide em um processo que envolve o transporte ativo do iodo para dentro do folículo através do transportador transmembrana específico (NIS), sua oxidação e incorporação em resíduos tirosina na molécula de tireoglobulina [1]. Esta iodinação de tirosinas resulta em resíduos monoiodinados (MIT) e diiodinados (DIT) que são enzimaticamente ligados para formar tiroxina (T_4) e triiodotironina (T_3). A tireoglobulina iodinada que contém MIT, DIT, T_4 e T_3 é armazenada como polipeptídeo extracelular no colóide, próximo ao lúmen das células foliculares da tireóide. A liberação dos hormônios é feita através da endocitose e digestão lisossomal da tireoglobulina na célula folicular. Embora a tireóide produza preferencialmente T_4 , o principal hormônio tireoidiano circulante, é o T_3 a forma biologicamente ativa [1, 2].

A síntese e secreção dos hormônios tireoidianos é regulada pelo TSH através de um sistema de retroalimentação negativo que envolve o hipotálamo, hipófise e a glândula tireóide. O hormônio liberador de tireotrofina (TRH) é um hormônio secretado pelo hipotálamo e estimula os tireotrofos da hipófise a secretarem TSH (hormônio tireotrófico). Tanto a secreção do TRH quanto do TSH são reguladas pelos níveis circulantes dos hormônios tireoidianos, secretados pela tireóide em resposta ao estímulo do TSH [1].

A transformação metabólica do hormônio tireoidiano nos tecidos periféricos envolve uma série de reações enzimáticas complexas, dentre as quais a desiodação é o mecanismo para a ativação hormonal. As iodotironinas desiodases tipo 1 (D1) e tipo 2 (D2) catalizam esta reação. A iodotironina desiodase tipo I (D1) cataliza a desiodação tanto do anel fenólico quanto do anel tirosínico convertendo T_4 a T_3 , T_4 a rT_3 e T_3 e rT_3 a T_2 , enquanto a desiodase tipo 2 (D2) atua exclusivamente no anel fenólico das iodotironinas, convertendo T_4 a T_3 e rT_3 a T_2 . [3]. Apesar de compartilharem grande homologia, essas enzimas, que são proteínas integrais da membrana e possuem o raro aminoácido selenocisteína no seu sítio catalítico, são distintas com relação as suas propriedades cinéticas, especificidade pelo substrato, inibição por drogas tireostáticas, distribuição tecidual e resposta ao status tireoidiano [4, 5] (Tabela 1). Do ponto de vista fisiológico, o papel atribuído à D1 é fornecer T_3 para a circulação periférica, enquanto a função da D2 é regular a concentração intracelular do T_3 nos tecidos em que a presença desse hormônio é crítica, tais como cérebro e hipófise. Além disso, estudos recentes demonstraram que a D2 seria a principal fonte de T_3 plasmático no ser humano [6].

A atividade das desiodases é regulada por um processo complexo, e várias situações fisiopatológicas podem alterar a desiodação em um determinado tecido, tais como a variação do *status* dos hormônios tireoidianos circulantes [4]. Deste modo, no hipotireoidismo, a atividade da D1 está diminuída, enquanto a atividade da D2 está aumentada, preservando os níveis teciduais de T_3 apesar da hipotiroxinemia. Alterações opostas são observadas no hipertireoidismo. Essas mudanças parecem ser coordenadas

de forma a manter os níveis circulantes e intracelulares de T_3 dentro da faixa de normalidade.

MECANISMOS DE AÇÃO DOS HORMÔNIOS TIREOIDIANOS

Os primeiros estudos sobre captação dos hormônios tireoidianos em diferentes tecidos e células surgiram na década de 50, nos quais a translocação desses hormônios através da membrana plasmática se daria através de um processo de difusão simples [7]. Trinta anos mais tarde surgiram estudos sobre especificidade de ligação dos hormônios tireoidianos na membrana plasmática de células-alvo e também sobre um processo de transporte saturável e dependente de energia para T_4 e T_3 [8-10]. Desde então, diversos laboratórios têm confirmado a existência de sistemas transportadores específicos para os hormônios tireoidianos em diversos tecidos e diferentes espécies [11].

A captação celular de T_4 e T_3 através de sítios de alta afinidade depende de energia, temperatura e gradiente de Na^+ , com resultante translocação do hormônio pela membrana. Em sítios de baixa afinidade, no entanto, o transporte hormonal é feito através da ligação do hormônio a proteínas carreadoras específicas da membrana, independente de gradiente, temperatura ou energia [11]. Os dois tipos principais de transportadores tecido-específicos para os hormônios tireoidianos são: transportadores de ânions orgânicos e transportadores de aminoácidos tipo L [11]. Estudos recentes identificaram uma classe de transportadores aniônicos de alta afinidade para T_4 e T_3

(GSTs) na membrana plasmática das células dos ovários e também do testículo em diferentes espécies animais e em humanos, durante o desenvolvimento e também na fase adulta [12]. Em animais, a expressão destes transportadores parece ser mais intensa durante a fase adulta do que com três semanas de vida [12].

Os efeitos biológicos do T_3 que resultam em estimulação da transcrição gênica são mediados por receptores nucleares do hormônio tireoidiano, membros da superfamília de receptores esteróides. Esses receptores encontram-se ligados aos genes-alvo em regiões específicas do DNA chamadas ERTs (elementos responsivos do hormônio tireoidiano). Quando o ligante (T_3) une-se ao receptor nuclear, ocorre uma modificação conformacional, remoção de co-repressores, recrutamento de co-ativadores e proteínas acessórias e indução da transcrição gênica [1, 13] (Figura 1).

Os receptores nucleares são compostos por duas isoformas principais: $TR\alpha$ e $TR\beta$, codificados por dois genes distintos (*c-erbA α* e *c-erbA β* , respectivamente) [1, 14]. Como resultado de *splicing* alternativo existe uma heterogeneidade adicional do transcrito de mRNA que leva à codificação de nove isoformas diferentes do peptídeo ($TR\alpha_1$, α_2 , α_3 , $\Delta \alpha_1$, $\Delta \alpha_2$, β_1 , β_2 , β_3 e $\Delta \beta_3$) sendo que, dessas, apenas três contêm tanto a porção funcional do ligante quanto o domínio de ligação do DNA. As três isoformas funcionais foram identificadas como $TR\alpha_1$, $TR\beta_1$ e $TR\beta_2$ e são os receptores nucleares verdadeiros que induzem a transcrição gênica [15]. As isoformas não funcionantes do receptor podem atuar como antagonistas dominantes dos receptores verdadeiros de T_3 , mas seu papel fisiológico ainda não foi totalmente definida [16]. A regulação de cada

um dos receptores varia conforme a isoforma, o tecido e o estágio de desenvolvimento [17]. Cada uma das isoformas do receptor do hormônio tireoidiano é expressa não somente em humanos, mas também em diferentes espécies animais, observando-se grande homologia da seqüência de aminoácidos entre as espécies.

Os efeitos genômicos dos hormônios tireoidianos têm uma latência de horas a dias. Entretanto, alguns efeitos fisiológicos do T_3 ocorrem rapidamente, o que seria incompatível com a transcrição gênica. Esses efeitos não-clássicos estão associados, por exemplo, à ação direta do hormônio sobre segundos mensageiros. Essa ação pode levar à ativação de múltiplas cascatas de sinalização, tais como a ativação de quinases, o influxo de cálcio nas sinapses, efluxo nos cardiomiócitos, e polimerização da actina, o que regularia diversos processos fisiológicos, entre eles, a termogênese, a resistência vascular periférica, o inotropismo cardíaco, entre outros [18]. Na membrana plasmática, foi descrito que o hormônio tireoidiano pode ligar-se a sítios específicos, alterando o tráfego intracelular de proteínas, a atividade das quinases, a troca de íons e estrutura do citoesqueleto [19].

HORMÔNIOS TIREOIDIANOS E FUNÇÃO TESTICULAR

O papel dos hormônios tireoidianos na morfologia e função testicular tem sido discutido na literatura desde que estudos iniciais sugeriram que os testículos de animais adultos eram metabolicamente refratários aos hormônios da tireóide [20]. 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 [21-23].

A falência tireoidiana pré-puberal em homens pode ocorrer em associação com aumento do volume testicular e alterações nos hormônios sexuais [24]. Indivíduos hipotireoideos na infância e no período pré-puberal apresentam atraso na maturação sexual e macroorquidia sem virilização. Essas alterações podem ser revertidas com a reposição hormonal. O atraso na maturação sexual e desenvolvimento parecem mais graves quanto menor for a idade da falência tireoidiana [24].

Alterações morfológicas são observadas nos testículos de homens com hipotireoidismo crônico, observando-se redução do número de células de Sertoli e Leydig, redução no diâmetro tubular, edema intersticial e espessamento da membrana basal dos túbulos seminíferos [15].

Os efeitos do *status* tireoidiano sobre a qualidade do sêmen tem sido objeto de alguns estudos. Observações clínicas iniciais descreveram oligospermia e diminuição da mobilidade dos espermatozóides em homens hipertireoideos [25]. Estudos mais recentes realizados em paciente hipertireoideos também descreveram alterações significativas na densidade do esperma, acompanhadas de uma redução na mobilidade dos espermatozóides quando comparado a controles, achados que poderiam comprometer a fertilidade [21, 22]. Após a restauração do eutireoidismo, a mobilidade e densidade foram reconstituídas, mas a morfologia dos espermatozóides permaneceu afetada [22].

Jannini e colaboradores, conduzindo estudo clínico que avaliou 34 pacientes com hipertireoidismo e 14 com hipotireoidismo, ambos de início na fase adulta, demonstrou que 12,8% desses homens apresentavam deterioração da função sexual [23]. O sintoma mais referido por pacientes hipertireoideos foi ejaculação precoce, enquanto os pacientes hipotireoideos relatavam um maior número de queixas clínicas como disfunção erétil, atraso na ejaculação, perda de libido e impotência. As alterações na função sexual foram corrigidas com a restauração da função tireoidiana [23].

Modificações no *status* tireoidiano, quando ocorrem muito cedo no desenvolvimento do animal, podem afetar o funcionamento testicular [17, 26, 27]. Foi demonstrado que ratos imaturos que entravam em hipotireoidismo apresentavam um aumento relativo no peso do testículo e cauda do epidídimo, sem apresentarem alterações dos níveis séricos de testosterona e FSH [26]. Estudo mais recente confirma os achados anteriores mostrando que ratos com hipotireoidismo desde o período pós-natal apresentam não somente um declínio na capacidade de locomoção dos espermatozoides, mas também anormalidades na maturação das células germinativas no período da espermatogênese [28]. Essas alterações são corrigidas com a restauração da função tireoidiana [29]. Quanto maior o tempo de duração do hipotireoidismo no período de desenvolvimento, no qual as células testiculares mostram uma dependência maior aos hormônios tireoidianos, maior parece ser o grau de dano testicular [30]. Contudo, nenhuma alteração foi encontrada quando o hipotireoidismo foi induzido em animais adultos, o que corrobora a idéia de que possa existir uma janela específica

durante o período de desenvolvimento em que a falta do hormônio é mais nociva [26, 29] (Figura 2).

Recentemente foi demonstrado, em animais com hipotireoidismo congênito secundário a uma mutação no gene da tireoglobulina, que apesar do desenvolvimento testicular completo, que ocorreu com atraso significativo em relação aos controles, as estruturas testiculares recém-formadas entravam em rápido processo de degeneração estrutural [31]. Esses resultados sugerem que o hormônio tireoidiano parece ser essencial não somente para o desenvolvimento e maturação das células de Sertoli e células germinativas, mas também para a manutenção das estruturas testiculares durante a vida adulta do animal [31].

REGULAÇÃO DAS CÉLULAS DE SERTOLI PELO HORMÔNIO TIREOIDIANO

O número total de células de Sertoli no testículo estabelece o limite de produção de células germinativas, uma vez que é o componente somático do túbulo seminífero que proporciona estrutura e um microambiente adequado para o desenvolvimento e maturação das células germinativas. Foi descrito em roedores que as células de Sertoli possuem um período de proliferação e maturação que é fixo, não ocorrendo mais mitose ou diferenciação após esta janela de desenvolvimento [14].

Mais de uma década de pesquisas tem evidenciado o papel regulador dos hormônios tireoidianos sobre as células de Sertoli em animais [32-36]. Estudos

moleculares demonstraram que o T_3 liga-se com alta afinidade e baixa capacidade no núcleo de células de Sertoli em células cultivadas de ratos imaturos. Uma observação interessante é que a concentração de sítios de ligação nuclear para o hormônio da tireóide modifica-se durante o desenvolvimento gonadal: é máxima na vida fetal e diminui de forma gradual até virtualmente desaparecer na fase adulta [37].

O T_3 diminui a proliferação das células de Sertoli e promove sua diferenciação funcional [24, 38, 39], o que parece indicar um efeito direto do T_3 em proteínas-chave que regulam o ciclo celular nessas células [14]. Dessa forma, a atividade metabólica induzida pelo T_4 e T_3 nas células de Sertoli parece ser pré-requisito para a expansão da espermatogênese, em que o T_3 compartilharia com o FSH o papel de principal regulador das primeiras fases de desenvolvimento tubular, assim como no epidídimo [40, 41].

Animais hipotireoideos apresentam um aumento do período de proliferação das células de Sertoli [8]. Após a normalização dos níveis de hormônio tireoidiano esses animais permanecem com a população final de células de Sertoli aumentada, o que resulta em um aumento subsequente da quantidade de células germinativas e dos espermatozoides produzidos. Assim, o hipotireoidismo neonatal transitório resulta em um aumento irreversível do volume testicular no animal adulto [27, 42]. De forma inversa, o que se observa no hipertireoidismo é o encurtamento do período de divisão mitótica e a aceleração da diferenciação das células de Sertoli. O tamanho testicular diminui em função da redução no número de células de Sertoli e de células germinativas, levando a uma redução na produção de espermatozoides [14].

A patogênese das alterações observadas no aparelho reprodutor masculino em pacientes com disfunção tireoidiana permanece incerta. Infere-se, porém, que o mesmo fenômeno discutido anteriormente, observado em animais, possa ocorrer com o testículo humano em desenvolvimento, quando os efeitos do hipotireoidismo pré-puberal podem afetar a diferenciação e o desenvolvimento tubular levando a uma proliferação demasiada das células de Sertoli e células germinativas, ocasionando acúmulo das mesmas nos túbulos seminíferos. Esse processo resultaria em macroorquidia sem virilização, uma vez que os hormônios sexuais não estão alterados [24].

ESTEROIDOGÊNESE TESTICULAR E HORMÔNIO TIREOIDIANO

As células de Leydig se diferenciam no período pré-puberal. Suas precursoras são as células mesenquimais da região peritubular. O regulador primário da estrutura e função das células de Leydig no testículo pós-natal é o hormônio luteinizante (LH), produzido pelos gonadotrofos da porção anterior da hipófise [15]. À medida que as células se diferenciam, movem-se da região peritubular para o interstício central [15].

Alterações no *status* tireoídiano também parecem afetar o desenvolvimento e diferenciação das células mesenquimais em células de Leydig. O processo de diferenciação está interrompido no testículo pré-púbere em animais com hipotireoidismo, enquanto sua maturação está acelerada no hipertireoidismo. No hipotireoidismo observa-se um aumento do número de células precursoras que se

acumulam no interstício testicular e estarão aptas para diferenciação após a restauração do eutireoidismo [43]. Desse fenômeno resulta um número aumentado de células de Leydig que são, porém, menores em tamanho quando comparadas a células de animais-controle. Já no hipertireoidismo ocorre proliferação das células precursoras e aceleração da sua diferenciação em células de Leydig. Esses achados sugerem um efeito direto dos hormônios tireoidianos também sobre o desenvolvimento das células intersticiais de Leydig, possivelmente através da inibição do fator anti-mulleriano, que permite a diferenciação destas células [44].

Animais tireoidectomizados ou hipotireoideos podem apresentar níveis basais circulantes de testosterona inalterados [45] ou baixos [46], bem como uma diminuição significativa tanto dos níveis basais quanto do número de pulsos e secreção total de LH e FSH [47]. A administração do hormônio tireoidiano restabelece os níveis hormonais de testosterona [48, 49]. Alguns estudos, no entanto, mostram que, apesar da normalização dos níveis testiculares de testosterona, os níveis circulantes de LH e FSH não retornam aos níveis basais de animais controle mesmo após o restabelecimento do eutireoidismo [40]. Este efeito poderia ser secundário a um aumento relativo da quantidade de células de Leydig observado nos animais hipotireoideos durante o período da janela de desenvolvimento e diferenciação dessas células.

Alterações no *status* dos hormônios tireoidianos também parecem afetar a produção de testosterona pelas células de Leydig no testículo de ratos adultos, uma vez que o T₃ parece atuar diretamente ao nível do gonadotrofo hipofisário, alterando a

secreção dos hormônios gonadotróficos [15]. No hipotireoidismo, além do efeito direto sobre a liberação dos hormônios sexuais, foi descrito que a queda da produção de testosterona pelo testículo poderia ser resultante de uma diminuição da resposta das células intersticiais às gonadotrofinas [49]. No hipertireoidismo, parece haver uma diminuição dos receptores de LH nas células intersticiais [50].

Estudos realizados em seres humanos demonstraram que um aumento do nível circulante de T_4 gera um aumento de testosterona no testículo, enquanto os níveis séricos da testosterona livre permanecem normais [50]. A conversão periférica de andrógenos em estrógenos, bem como os níveis de progesterona, estão aumentados no hipertireoidismo, enquanto a biodisponibilidade da testosterona está diminuída nesses pacientes quando comparados a controles [50]. Homens hipotireoideos, por sua vez, apresentam níveis circulantes diminuídos de testosterona, dehidroepiandrosterona, sulfato de dehidroepiandrosterona e sulfato de pregnenolona, enquanto os níveis de gonadotrofinas não estão elevados, o que é compatível com um quadro de hipogonadismo hipogonadotrófico [51]. Todas as alterações hormonais se normalizam com a restauração dos níveis de hormônios tireoidianos [50].

TRANSPORTADORES E RECEPTORES PARA HORMÔNIO TIREOIDIANO NO TESTÍCULO

O transporte dos hormônios tireoidianos para dentro da célula se faz através de transportadores tecido-específicos. No testículo, estão presentes transportadores da família dos transportadores para ânions orgânicos (OATPs em humanos e oatps em animais). Nas células de Leydig do testículo humano adulto foram identificados OATPs para T_4 e T_3 reverso [52]. No entanto, a presença dos receptores tireoidianos nessas células ou em seus precursores não foi totalmente estabelecida. Alguns estudos demonstraram a presença da proteína do receptor tireoidiano no interstício testicular [53]. Estes resultados, porém, não foram confirmados em estudos posteriores onde apenas o transcrito de mRNA e não a proteína dos receptores nestas células foram identificados em animais adultos [54]. Outro estudo realizado em humanos e também em roedores identificou a presença de transportadores aniônicos específicos (GSTs) no testículo [12]. Em animais, esses transportadores para T_4 e T_3 estavam presentes nas células de Sertoli, nas espermatogônias e espermatócitos e nas células de Leydig durante o período de desenvolvimento e também na vida adulta, onde sua expressão parecia mais intensa [12].

Isoformas dos TR estão presentes no testículo humano e de ratos nos diferentes estágios de desenvolvimento: fetal, neonatal e adulto [17, 37]. O $TR\alpha$ parece ser a isoforma mais abundante no testículo durante o período de desenvolvimento. Estudos realizados com animais transgênicos apresentando ausência do receptor $TR\alpha$ (animais

TR α KO) ou do TR β (animais TR β KO) demonstraram a interrupção precoce da proliferação das células de Sertoli e a indução da canalização dos túbulos seminíferos, mimetizando os efeitos do hipertireoidismo em animais normais enquanto animais TR β KO não apresentavam quaisquer alterações no desenvolvimento durante alteração no status tireoidiano [14]. Esses resultados demonstram que o TR β parece não ser necessário para o desenvolvimento das células testiculares, ao mesmo tempo que confirma a importância da sinalização do receptor TR α para proliferação e maturação celular desse órgão.

Em adição aos efeitos genômicos dos hormônios tireoidianos sobre as células testiculares, esses hormônios também parecem atuar como moduladores da transdução de sinal nas células de Sertoli de animais imaturos através de mecanismos não-genômicos [19, 55].

EXPRESSÃO DAS IODOTIRONINAS DESIODASES NO TESTÍCULO

As duas iodotironinas desiodases (D1 e D2) responsáveis pela ativação hormonal já foram identificadas em órgãos do aparelho reprodutor de roedores [56]. Este estudo mostrou que ambas enzimas estavam presentes durante o período de desenvolvimento e na fase adulta, sendo que o nível de expressão da cada uma variou significativamente conforme a fase da vida do animal [56].

Recentemente, estudos realizados pelo nosso grupo demonstraram transcritos da D2 no testículo de camundongos adultos [57]. Mais importante, no entanto, foi a observação de que, apesar dos baixos níveis de transcrito da D2 no animal controle, a indução do hipotireoidismo, ainda que leve, provocou aumento significativo da atividade dessa enzima, indicando um mecanismo até então desconhecido de controle dos níveis intracelulares de T_3 no testículo em estados de deficiência do hormônio tireoidiano [57].

A presença das desidases também foi identificada em todos os lobos da próstata de animais em desenvolvimento, onde a D1 estava expressa em grande quantidade, enquanto a atividade da D2 era praticamente indetectável [58]. A atividade da D1 aumentou significativamente nos animais com hipertireoidismo e hiperprolactinemia e naqueles tratados com finasterida. Em contraste, a atividade desta enzima mostrou-se diminuída em animais castrados, mesmo com reposição hormonal de testosterona. Esses resultados sugerem que a atividade da D1 pode estar associada com a maturação/funcionamento normal da próstata em animais.

CONCLUSÕES

O hormônio tireoidiano parece ser importante para o testículo não somente durante o período de desenvolvimento, mas também na fase adulta. Pesquisas experimentais e em seres humanos identificaram a presença de transportadores e receptores para hormônios tireoidianos no testículo, e também da desiodase tipo 2, enzima que regula localmente a quantidade de T_3 intracelular. Alterações no *status* tireodiano parecem afetar diretamente a função testicular tanto em humanos como em animais. Este conjunto de observações sugere que os hormônios tireoidianos tenham um efeito direto não somente no desenvolvimento estrutural, mas também na manutenção da função testicular normal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev* 2001; 81: 1097-1142.
2. Friesema EC, Jansen J, Visser TJ. Thyroid hormone transporters. *Biochem Soc Trans* 2005; 33: 228-232.
3. Larsen PR, Berry MJ. Type I iodothyronine deiodinase: unexpected complexities in a simple deiodination reaction. *Thyroid* 1994; 4: 357-362.
4. Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev* 2002; 23: 38-89.
5. Bianco AC, Kim BW. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J Clin Invest* 2006; 116: 2571-2579.
6. Maia AL, Kim BW, Huang SA, Harney JW, Larsen PR. Type 2 iodothyronine deiodinase is the major source of plasma T3 in euthyroid humans. *J Clin Invest* 2005; 115: 2524-2533.
7. Robbins J, Rall JE. The interaction of thyroid hormones and protein in biological fluids. *Recent Prog Horm Res* 1957; 13: 161-202; discussion 202-168.
8. Tata JR. How specific are nuclear "receptors" for thyroid hormones? *Nature* 1975; 257: 18-23.
9. Rao GS, Eckel J, Rao ML, Breuer H. Uptake of thyroid hormone by isolated rat liver cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 73: 98-104.

10. Krenning EP, Docter R, Bernard HF, Visser TJ, Hennemann G. Active transport of triiodothyronine (T3) into isolated rat liver cells. *FEBS Lett* 1978; 91: 113-116.
11. Hennemann G, Docter R, Friesema EC, de Jong M, Krenning EP, Visser TJ. Plasma membrane transport of thyroid hormones and its role in thyroid hormone metabolism and bioavailability. *Endocr Rev* 2001; 22: 451-476.
12. Suzuki T, Onogawa T, Asano N, Mizutamari H, Mikkaichi T, Tanemoto M, Abe M, Satoh F, Unno M, Nunoki K, Suzuki M, Hishinuma T, Goto J, Shimosegawa T, Matsuno S, Ito S, Abe T. Identification and characterization of novel rat and human gonad-specific organic anion transporters. *Mol Endocrinol* 2003; 17: 1203-1215.
13. Flamant F, Gauthier K, Samarut J. Thyroid hormones signaling is getting more complex: STORMs are coming. *Mol Endocrinol* 2006.
14. Holsberger DR, Cooke PS. Understanding the role of thyroid hormone in Sertoli cell development: a mechanistic hypothesis. *Cell Tissue Res* 2005; 322: 133-140.
15. Mendis-Handagama SM, Siril Ariyaratne HB. Leydig cells, thyroid hormones and steroidogenesis. *Indian J Exp Biol* 2005; 43: 939-962.
16. O'Shea PJ, Williams GR. Insight into the physiological actions of thyroid hormone receptors from genetically modified mice. *J Endocrinol* 2002; 175: 553-570.
17. Jannini EA, 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* 1999; 22: 843-848.

18. Tsai SC, Chiao YC, Lu CC, Wang PS. Stimulation of the secretion of luteinizing hormone by ginsenoside-Rb1 in male rats. *Chin J Physiol* 2003; 46: 1-7.
19. Zamoner A, Corbelini PF, Funchal C, Menegaz D, Silva FR, Pessoa-Pureur R. Involvement of calcium-dependent mechanisms in T3-induced phosphorylation of vimentin of immature rat testis. *Life Sci* 2005; 77: 3321-3335.
20. Oppenheimer JH, Schwartz HL, Surks MI. Tissue differences in the concentration of triiodothyronine nuclear binding sites in the rat: liver, kidney, pituitary, heart, brain, spleen, and testis. *Endocrinology* 1974; 95: 897-903.
21. Krassas GE, Perros P. Thyroid disease and male reproductive function. *J Endocrinol Invest* 2003; 26: 372-380.
22. Krassas GE, Pontikides N, Deligianni V, Miras K. A prospective controlled study of the impact of hyperthyroidism on reproductive function in males. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 3667-3671.
23. Carani C, Isidori AM, Granata A, Carosa E, Maggi M, Lenzi A, Jannini EA. Multicenter study on the prevalence of sexual symptoms in male hypo- and hyperthyroid patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 6472-6479.
24. Jannini EA, Ulisse S, D'Armiento M. Thyroid hormone and male gonadal function. *Endocr Rev* 1995; 16: 443-459.
25. Clyde HR, Walsh PC, English RW. Elevated plasma testosterone and gonadotropin levels in infertile males with hyperthyroidism. *Fertil Steril* 1976; 27: 662-666.

26. Maia AL, Favaretto AL, Antunes-Rodrigues J, Iazigi N, Lamano-Carvalho TL. Spermatogenic and steroidogenic testicular function in hypothyroid pubertal rats. *Braz J Med Biol Res* 1990; 23: 625-628.
27. Palmero S, de Marchis M, Gallo G, Fugassa E. Thyroid hormone affects the development of Sertoli cell function in the rat. *J Endocrinol* 1989; 123: 105-111.
28. Weiss SR, Burns JM. The effect of acute treatment with two goitrogens on plasma thyroid hormones, testosterone and testicular morphology in adult male rats. *Comp Biochem Physiol A* 1988; 90: 449-452.
29. Jannini EA, 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* 1990; 126: 2521-2526.
30. Chowdhury AR, Gautam AK, Chatterjee BB. Thyroid-testis interrelationship during the development and sexual maturity of the rat. *Arch Androl* 1984; 13: 233-239.
31. Sakai Y, Yamashina S, Furudate S. Developmental delay and unstable state of the testes in the rdw rat with congenital hypothyroidism. *Dev Growth Differ* 2004; 46: 327-334.
32. Orth JM. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *Anat Rec* 1982; 203: 485-492.
33. Cortes D, Muller J, Skakkebaek NE. Proliferation of Sertoli cells during development of the human testis assessed by stereological methods. *Int J Androl*

- 1987; 10: 589-596.
34. Joyce KL, Porcelli J, Cooke PS. Neonatal goitrogen treatment increases adult testis size and sperm production in the mouse. *J Androl* 1993; 14: 448-455.
 35. Winters SJ, Pohl CR, Adedoyin A, Marshall GR. Effects of continuous inhibin administration on gonadotropin secretion and subunit gene expression in immature and adult male rats. *Biol Reprod* 1996; 55: 1377-1382.
 36. Sharpe RM, Walker M, Millar MR, Atanassova N, Morris K, McKinnell C, Saunders PT, Fraser HM. Effect of neonatal gonadotropin-releasing hormone antagonist administration on sertoli cell number and testicular development in the marmoset: comparison with the rat. *Biol Reprod* 2000; 62: 1685-1693.
 37. Buzzard JJ, Morrison JR, O'Bryan MK, Song Q, Wreford NG. Developmental expression of thyroid hormone receptors in the rat testis. *Biol Reprod* 2000; 62: 664-669.
 38. Cooke PS, Zhao YD, Bunick D. Triiodothyronine inhibits proliferation and stimulates differentiation of cultured neonatal Sertoli cells: possible mechanism for increased adult testis weight and sperm production induced by neonatal goitrogen treatment. *Biol Reprod* 1994; 51: 1000-1005.
 39. Arambepola NK, Bunick D, Cooke PS. Thyroid hormone and follicle-stimulating hormone regulate Mullerian-inhibiting substance messenger ribonucleic acid expression in cultured neonatal rat Sertoli cells. *Endocrinology* 1998; 139: 4489-4495.

40. El Shennawy A, Gates RJ, Russell LD. Hormonal regulation of spermatogenesis in the hypophysectomized rat: cell viability after hormonal replacement in adults after intermediate periods of hypophysectomy. *J Androl* 1998; 19: 320-334; discussion 341-322.
41. Del Rio AG, Blanco AM, Pignataro O, Niepomniszcz H, Juvenal G, Pisarev MA. High-affinity binding of T3 to epididymis nuclei. *Arch Androl* 2000; 44: 187-191.
42. Maran RR, Ravichandran K, Arunakaran J, Aruldas MM. Impact of neonatal hypothyroidism on Leydig cell number, plasma, and testicular interstitial fluid sex steroids concentration. *Endocr Res* 2001; 27: 119-141.
43. Mendis-Handagama C, Ariyaratne S. Prolonged and transient neonatal hypothyroidism on Leydig cell differentiation in the postnatal rat testis. *Arch Androl* 2004; 50: 347-357.
44. Mendis-Handagama SM, Ariyaratne HB. Effects of thyroid hormones on Leydig cells in the postnatal testis. *Histol Histopathol* 2004; 19: 985-997.
45. Cooke PS, Porcelli J, Hess RA. Induction of increased testis growth and sperm production in adult rats by neonatal administration of the goitrogen propylthiouracil (PTU): the critical period. *Biol Reprod* 1992; 46: 146-154.
46. Antony FF, Aruldas MM, Udhayakumar RC, Maran RR, Govindarajulu P. Inhibition of Leydig cell activity in vivo and in vitro in hypothyroid rats. *J Endocrinol* 1995; 144: 293-300.
47. Maia AL, Favaretto AL, Carvaho TL, Rodrigues JA, Iazigi N. Hypothyroidism

- affects pulsatile LH secretion in pubertal orchietomized rats. *Arch Physiol Biochem* 1995; 103: 516-520.
48. Buzzard JJ, Wreford NG, Morrison JR. Thyroid hormone, retinoic acid, and testosterone suppress proliferation and induce markers of differentiation in cultured rat sertoli cells. *Endocrinology* 2003; 144: 3722-3731.
 49. Chiao YC, Lee HY, Wang SW, Hwang JJ, Chien CH, Huang SW, Lu CC, Chen JJ, Tsai SC, Wang PS. Regulation of thyroid hormones on the production of testosterone in rats. *J Cell Biochem* 1999; 73: 554-562.
 50. Krassas GE, Pontikides N. Male reproductive function in relation with thyroid alterations. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2004; 18: 183-195.
 51. Donnelly P, White C. Testicular dysfunction in men with primary hypothyroidism; reversal of hypogonadotropic hypogonadism with replacement thyroxine. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2000; 52: 197-201.
 52. Pizzagalli F, Hagenbuch B, Stieger B, Klenk U, Folkers G, Meier PJ. Identification of a novel human organic anion transporting polypeptide as a high affinity thyroxine transporter. *Mol Endocrinol* 2002; 16: 2283-2296.
 53. Tagami T, Nakamura H, Sasaki S, Mori T, Yoshioka H, Yoshida H, Imura H. Immunohistochemical localization of nuclear 3,5,3'-triiodothyronine receptor proteins in rat tissues studied with antiserum against C-ERB A/T3 receptor. *Endocrinology* 1990; 127: 1727-1734.
 54. Hardy MP, Sharma RS, Arambepola NK, Sottas CM, Russell LD, Bunick D, Hess

- RA, Cooke PS. Increased proliferation of Leydig cells induced by neonatal hypothyroidism in the rat. *J Androl* 1996; 17: 231-238.
55. Menegaz D, Zamoner A, Royer C, Leite LD, Bortolotto ZA, Silva FR. Rapid responses to thyroxine in the testis: active protein synthesis-independent pathway. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 246: 128-134.
56. Bates JM, St Germain DL, Galton VA. Expression profiles of the three iodothyronine deiodinases, D1, D2, and D3, in the developing rat. *Endocrinology* 1999; 140: 844-851.
57. Wagner MS, Morimoto R, Dora JM, Benneman A, Pavan R, Maia AL. Hypothyroidism induces type 2 iodothyronine deiodinase expression in mouse heart and testis. *J Mol Endocrinol* 2003; 31: 541-550.
58. Anguiano B, Lopez A, Delgado G, Romero C, Aceves C. Deiodinase type 1 activity is expressed in the prostate of pubescent rats and is modulated by thyroid hormones, prolactin and sex hormones. *J Endocrinol* 2006; 190: 363-371.

Tabela 1 - Características bioquímicas e fisiológicas das iodotironinas desiodases

	D1	D2
Localização	Fígado, rim, tireóide, hipófise	Hipófise, cérebro, BAT, placenta, tireóide, coração, mus. Esquelético
Papel Fisiológico	Fornece T3 p/ o plasma	Fornece T3 intracelular em tecidos específicos
Preferência pelo substrato	rT3 >> T4 > T3	T4 ≥ rT3
Sítio de desiodação	Anel interno e externo	Anel externo
Sensibilidade ao PTU	Sensível	Resistente

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da ação dos hormônios tireoidianos. Na presença de T_3 , o receptor para o hormônio tireoidiano (TR) forma um heterodímero com o receptor para o ácido retinóico (RXR) e se liga a seqüências específicas do DNA (TREs). O complexo formado por TR-RXR-TRE interage com proteínas coativadoras e correpessoras modificando a expressão gênica.

Figura 2. Efeito do hipotireoidismo sobre o testículo de ratos púberes. Testículo (A) e cauda do epidídimo (C) de animais controle. Testículo (B) e cauda do epidídimo (D) de ratos hipotireoideos. Aumento 20x [27].

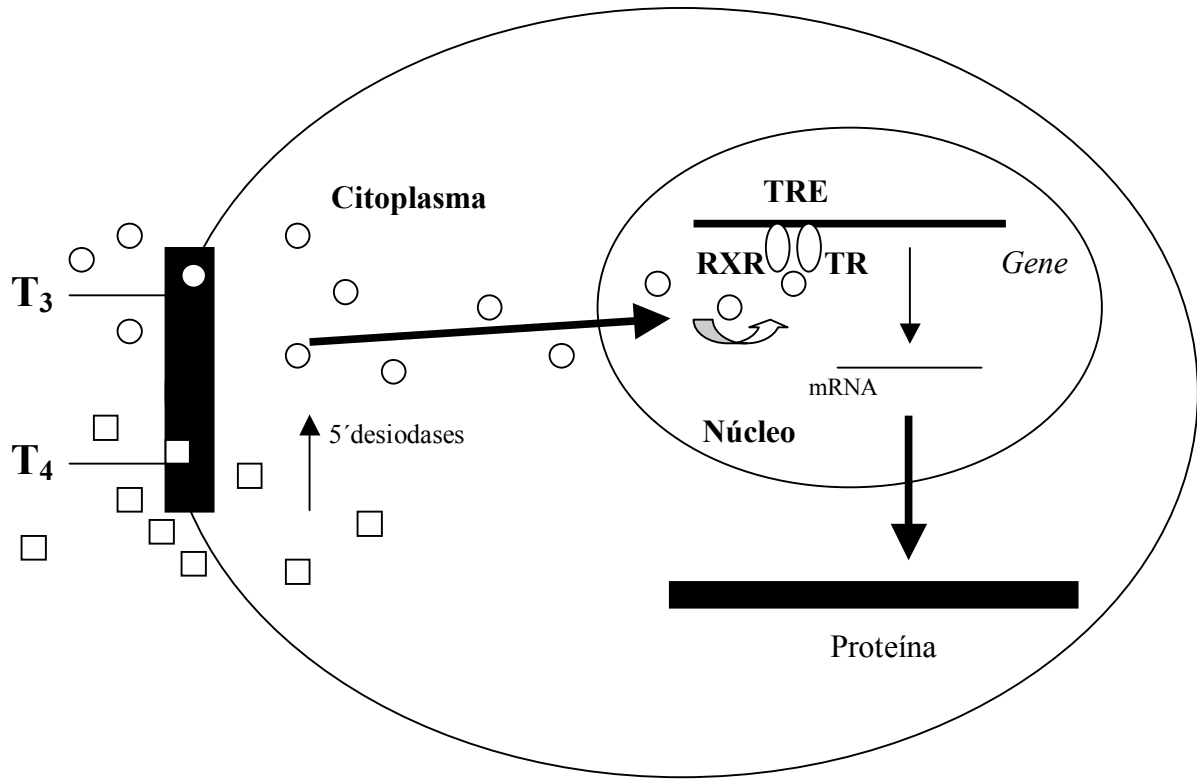


Figura 1

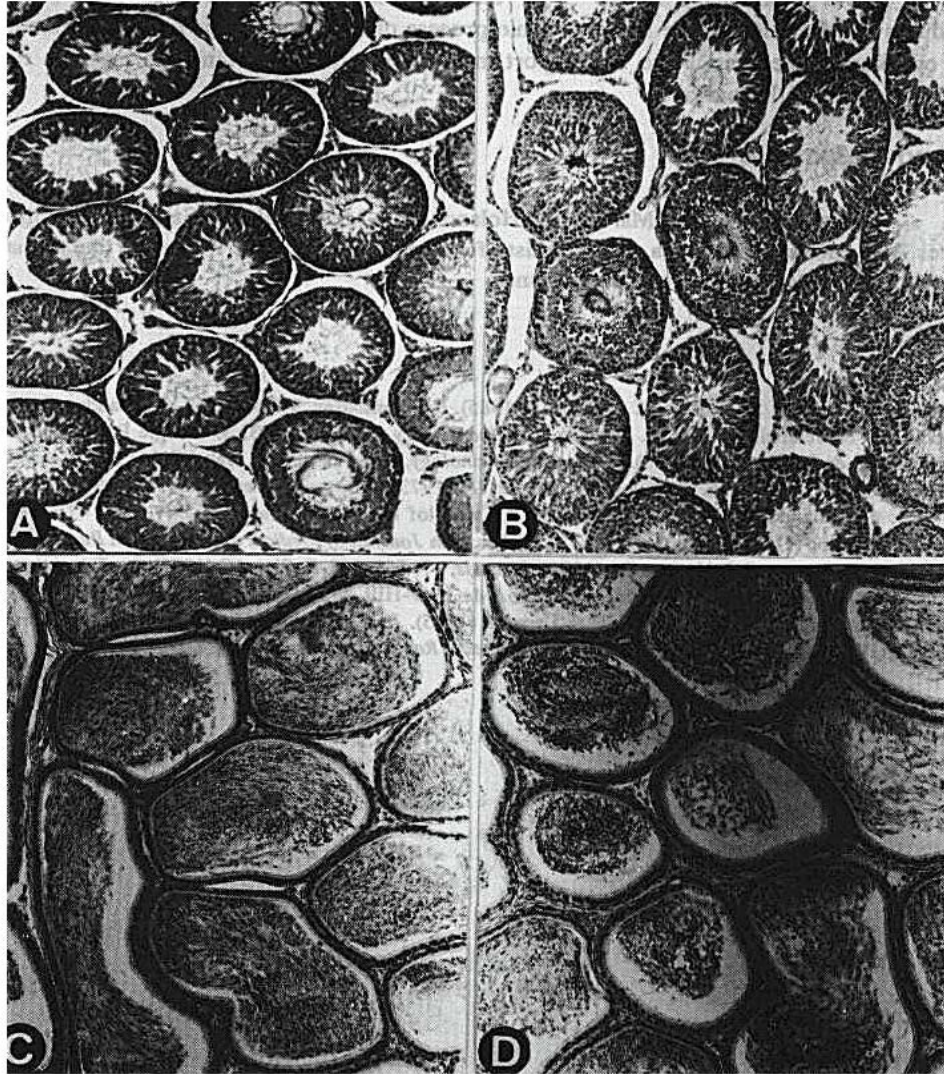


Figura 2

Capítulo II

Type 2 Iodothyronine Deiodinase is Highly Expressed in Germ Cells of Adult Rat Testis

Type 2 Iodothyronine Deiodinase is Highly Expressed in Germ Cells of Adult Rat Testis

Simone Magagnin Wajner¹, Márcia dos Santos Wagner¹, Rossana C. N. Melo², Gleydes G. Parreira³, Caba Fekete^{4,5}, Antonio C. Bianco⁶, Ronald M. Lechan⁵, and Ana Luiza Maia¹.

¹Thyroid Section, Endocrine Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil ², Laboratory of Cellular Biology, Department of Biology, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil. ³Laboratory of Cell Biology, Department of Morphology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, ⁴Department of Endocrine Neurobiology, Institute of Experimental Medicine, Hungarian Academy of Sciences, Budapest H-1083, Hungary, ⁵Division of Endocrinology, Diabetes, and Metabolism, Tufts-New England Medical Center, and ⁶Division of Endocrinology, Diabetes and Hypertension, Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, Boston, 02115, USA.

Short title: D2 expression in rat reproductive organs

Summary sentence: The thyroid hormone activating enzyme, type 2 iodothyronine deiodinase, is highly expressed in germ cell of seminiferous epithelium, suggesting a role for thyroid hormone on spermatogenesis in the adult rats.

Grant support: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and Fundo de Incentivo a Pesquisa (FIPE), Brasil.

Correspondence and Reprints: Ana Luiza Maia, M.D., Ph.D.

Setor de Tireóide, Serviço de Endocrinologia

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350.

90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: 55-51-33310207; Fax: 55-51-3332-5188; E-mail: almaia@ufrgs.br

ABSTRACT

The testis has been classically described as a thyroid hormone unresponsive tissue but recent studies indicate that these hormones might play an important role in developing testes. We have previously demonstrated that type 2 iodothyronine deiodinase (D2), a thyroid hormone activating enzyme, is expressed in adult rodent testis and that its activity is induced by hypothyroidism. Nevertheless, the precise location of D2 in testis is not known. The aim of the present work was to determine the testicular cell types in which D2 is expressed using *in situ* hybridization histochemistry and Real Time - PCR and determination of D2 activity in cell fractions isolated from adult rat testis. Our results show that D2 mRNA is present in germ cells, whereas the somatic components of seminiferous epithelium and the interstitial cells were virtually negative for this enzyme. Elongated spermatids undergoing differentiation were the predominant testicular cells positive for D2. The enzyme activity measured in germinative and somatic isolated cell fractions confirmed the *in situ* hybridization results. Our findings demonstrated that D2 is predominantly expressed in germ cells of seminiferous epithelium. These results suggest that thyroid hormone might have a direct effect on spermatogenesis in the adult rats.

INTRODUCTION

Thyroid hormone is essential for normal development, growth, cell differentiation and metabolism in developing and adult vertebrates [1]. To exert its biological activity, thyroxine (T_4), the main secretory product of thyroid gland, must be outer ring deiodinated to generate 3,5,3' triiodothyronine (T_3), the active hormone. The iodothyronine deiodinases types I (D1) and II (D2) catalyze this reaction [2]. D1 and D2 are distinguished by their kinetic properties, substrate specificity, inhibition by thyrostatic drugs such as 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU), tissue distribution and response to thyroid status [3]. D1 is present mainly in thyroid gland, pituitary, liver, and kidney being an important source of circulating plasma T_3 in vertebrates. In contrast, D2 seems to play a critical role in generating the adequate intracellular concentration of T_3 in specialized tissues such as the anterior pituitary, central nervous system, and brown adipose tissue (BAT). Recent studies suggest that D2 also contribute for a significant fraction of plasma T_3 in rodents and humans [4-6]. Although several factors such as cold, fasting, and hormones influence deiodinases activities, their main regulator is thyroid status. Hypothyroidism results in an increase on D2 activity. Opposite changes are noted in hyperthyroidism [7].

The testis was considered for years to be a thyroid hormone unresponsive organ, a concept based on data showing minimal levels of testicular thyroid hormone receptors (TR) and lack of thyroid hormone effects on oxygen consumption on adult rat testes [8]. However, clinical reports and experimental studies performed in the last decades have

indicated that thyroid hormones might have critical effects on this organ, especially during development [9, 10]. Abnormalities on reproductive hormone production, ejaculated volume, sperm motility and structural morphology on rat and human testes have been associated with altered thyroid hormone status [11, 12].

Indeed, several experimental evidences support the concept that thyroid hormones are important for testicular development and function. The ontogenic pattern of expression of the various TR subtypes on human and rat testes has been studied. TR α 1 isoform was shown to be present on testis throughout development, from fetal life to adulthood, being maximally expressed in the perinatal period in both species [12-14]. Recently, a detailed testis morphological analysis was performed on *rdw* rats, which present congenital hypothyroidism due to missense mutation of the thyroglobulin gene [10]. The *rdw* testis requires a longer time to develop and, shortly after full maturation the normal structure began to degenerate, indicating that the thyroid hormone play a role in developing and maintaining normal testicular function. Moreover, the determination of the expression profile of the deiodinases demonstrated that D2, a T4-activating enzyme, is present in rat testis from fetal to adult life [15] and that testis D2 activity is highly sensitive to hypothyroidism [16]. Nevertheless, the exact cellular localization of D2 expression in this organ remains unclear, further suggesting a need for tight regulation of T₃ levels in this organ.

The present study was undertaken to further analyze the D2 expression in adult rat testis. We aimed to determine in which testicular cell subtypes the enzyme is

expressed using a combination of *in situ* hybridization and D2 activity in somatic and germ cell fractions. D2 expression in other tissues of male reproductive system of rats was also evaluated.

MATERIAL AND METHODS

Animals

The experiments were performed on male Wistar rats 100-120 days old, housed under conditions of controlled lighting and temperature, fed a commercial diet and water was available *ad libitum*. Rats were made hypothyroid by administering 0.03% methimazole (MMI; Biolab, SP, Brazil) in drinking water for 4 weeks to reduce their plasma T₄ levels. Control rats received regular drinking water. *ad libitum*. Euthanasia was performed in a CO₂ chamber and tissues were rapidly removed, frozen in liquid nitrogen and stored at -70 °C for subsequent D2 activity determination. For isolation of cell fractions, testes were removed, decapsulated and immediately used. All animals were carefully monitored and maintained in accordance with ethical recommendations of the Brazilian Veterinary Medicine Council and the Brazilian College of Animal Experimentation.

***In situ* hybridization histochemistry**

Male adult rats were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg body weight IP), blood was taken from the inferior vena cava and the animals were immediately perfused transcardially with 20 ml of 0.01 M PBS, pH 7.4, containing 15.000 U/L of heparin sulfate followed by 150 ml of 4% paraformaldehyde in PBS. The testes were removed, post-fixed by immersion in the same fixative for 2 h at room temperature (RT) and then cryoprotected in 20% sucrose in PBS at 4°C overnight. The testes were then placed in a cryo mold, covered with OCT (Tissue Tek) and snap frozen on dry ice. Serial 14- μ m thick coronal sections were cut on a cryostat (Leica CM3050 S, Leica Microsystems GmbH, Nussloch, Germany) and adhered to Superfrost/Plus glass slides (Fisher Scientific, Pittsburg, PA, USA). The tissue sections were desiccated overnight at 42°C and stored at -80°C until prepared for *in situ* hybridization histochemistry.

Methods for double-labeling *in situ* hybridization have been described in detail elsewhere [17, 18]. Tissue sections were hybridized with an 800-base-pair single-strand [³⁵S]-UTP-labeled cRNA probe complementary to the entire coding region of the rat *Dio2* gene. Briefly, the hybridization was performed under plastic coverslips in a buffer containing 50% formamide, 2 X standard sodium citrate (2 x SSC), 10% dextran sulfate, 0,5% sodium docecyl sulfate, 250 μ g/ml denatured salmon sperm DNA and 6 X 10⁵ cpm of radiolabeled probe for 16 h at 56°C. Slides were dipped into Kodak NTB2 autoradiography emulsion (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA) and the radiograms developed after 6 days of exposure at 4°C. After being cleared in graded solutions of

ethanol and Histosol (National Diagnostics, Atlanta, GA, USA), the sections were stained or not with haematoxylin and eosin, coverslipped in Histomount (National Diagnostic) and the radiograms visualized and photographed under bright or dark-field illumination with a Zeiss III (Carl Zeiss Inc, Thornwood, NY, USA) or Provis AX-70 Olympus (Olympus America Inc., Lake Success, NY, USA) microscope.

Isolation of cell types

Testicular cell types were prepared as previously described [19]. Briefly, testes were removed, decapsulated and enzymatically digested with 30 ml of trypsin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and 250 μ l of DNase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) for 15 min at 37 °C. This homogenate was centrifuged for 5 min at 400x g and the pellet was washed with 1% soybean trypsin inhibitor (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) in complete Hanks balanced salt solution (HBSS). Cells were then centrifuged for 5 min at 400x g and the pellet was collected and incubated with 20 ml of collagenase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) for 20 min at 37 °C. This homogenate was centrifuged for 5 min at 400x g and the pellet was resuspended with HBSS and filtered in a 100 μ m-diameter nylon mesh (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) in order to separate germ from somatic cells. Cell types were immediately used for the enzymatic assay as described below.

Real-time PCR analysis

RNA was reverse-transcribed with the SuperScript Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Invitrogen, Corp) using 3 µg of total RNA and 100 ng of random hexamers. Reactions for the quantification of target mRNAs were performed in an ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Warrington, UK) using the SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and cyclophilin as a housekeeping internal control. Samples were run in duplicate. The cycle conditions were 94 °C x 5 min (Hot Start), 40 cycles of 94 °C x 30 sec; 58 °C x 30 sec; 72 °C x 45 sec and a final 5 min extension period. Initially, standard curves representing 5-point serial dilution of mixed cDNAs of the control and experimental groups were analyzed and used as calibrators to determine the relative quantification of product generated in the exponential phase of the amplification curve. Comparable efficiency was observed presenting r^2 greater than 0.99. Sample quantification was calculated by the standard curve and corrected by the internal control cyclophilin in all experiments. Oligonucleotides for rat D2 and cyclophilin, respectively, were as follows: (5'-TTCTCCAAGTGCCTCTTCCTG-3' and 5'-CCCATCAGCGGTCTTCTCC-3'); (5'-GCCGATGACGAGCCCTTG-3' and 5'-TGCCGCCAGTGCCATTATG-3').

Deiodinase assay

D2 assay was performed as previously described [16]. Tissue samples were homogenized and sonicated on ice in buffer containing 1 x PE (0.1M potassium phosphate and 1 mM EDTA), 0.25 M sucrose and 10 mM dithiothreitol (DTT; Invitrogen, Canada), pH 6.9. The reaction mixtures containing 100-250 µg tissue proteins were incubated in a total volume of 300 µl with 100,000 cpm L - [3', 5'¹²⁵I] T₄ (Amersham, Biosciences, England, UK) purified by LH-20 sephadex column (Pharmacia, Uppsala, Sweden); 1 nM unlabeled T₄ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 20 mM DTT, and 1 mM 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) in PE buffer at 37 °C for 2 - 3 hours. Reactions were terminated by the addition of 200 µl horse serum (Invitrogen, Canada) and 100 µl 50% trichloroacetic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). After centrifugation at 12000 rpm for 3 minutes, free ¹²⁵I in the supernatant was counted with a gamma counter. Activity is expressed as femtomoles iodide generated/min.mg protein. In determining D2 activity, the percent iodide generated was multiplied by 2 because the specific activities of the labeled products were only half that of the substrate. The Km/Vmax determinations were performed with 0.25, 0.5, 1, 3, and 10 nM of unlabeled T₄. All reactions were performed in duplicates or triplicates and the experiments were repeated twice.

Statistical analysis

Data were analyzed using PRISM software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) and results are shown as means \pm SD. Four to six animals were used per group per experiment. Comparisons between two groups were performed using student's t-test. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Cellular localization of D2 transcripts in rat testis

In situ hybridization histochemistry was used to investigate the regional expression of D2 in adult rat testis. A hybridization signal with specificity for D2 mRNA was localized in the seminiferous epithelium but not in the somatic tubular and interstitial cells. Tubular longitudinal sections at bright and dark field microscopy showed an intense labeling for D2 mRNA on spermatids (Figure 1A). Tubule 1 shown in figure 1B is at stage III/IV of the spermatogenic cycle, in which elongated spermatids are localized more internally in the seminiferous epithelium. Tubule 2 (Figure 1B) is at stage VII/VIII of the cycle and a dense D2 labeling coincides with the localization of more mature elongated spermatids close to the tubule lumen. In contrast to the dense deiodinase labeling on spermatids, other spermatogenic cells located on the tubule wall (spermatogonia and spermatocytes) were virtually negative. Note that the interstitial cells (IC, Figure 1C) were virtually negative for the presence of D2 mRNA. Figure 1D

shows a higher magnification of part of a seminiferous tubule (cross section) at stage V of the cycle. Two generations of spermatids, round and elongated, characterize this stage. D2-positive elongated spermatids are localized mainly in the middle part of the tubule. In figure 2, cross-sections of seminiferous tubules at different stages of the spermatogenic cycle showed the same pattern of D2 labeling described above, appearing mainly in spermatids undergoing differentiation.

Real Time PCR Analysis

To further confirm the results obtained by *in situ* hybridization we evaluate the D2 transcript levels in germ and somatic cells isolated from rat testis also by real time PCR. In agreement with the results observed by *in situ* analysis, the levels of D2 mRNA observed in germ cells (6.13 ± 2.69 , arbitrary units) were significantly higher ($P= 0.001$) than those observed in the somatic compartment (1.32 ± 1.33 , arbitrary units). No differences on D2 expression were observed between controls and hypothyroid animals ($P=0.83$ for germ cells and $P=0.64$ for somatic cells).

D2 activity in separated testicular cell types and other tissues

Based on the results obtained with *in situ* hybridization histochemistry, we evaluated D2 activity in two separated testicular somatic and germinative enriched cell types. D2 activity was almost exclusively detected in the germ cell compartment (0.23 ± 0.003 fmol/min.mg prot) when compared to that observed in the somatic cells ($0.02 \pm$

0.013 fmol/min.mg prot), confirming the D2 expression profile obtained by *in situ* hybridization. The 5' deiodination activity in germ cells was further characterized by kinetic studies and showed a typical K_m (T_4) for D2 (1.1nM) and V_{max} of 0.63 fmol T_4 /min.mg protein (Figure 3A). In addition, enzyme activity was completely abolished by 100 μ M iopanoic acid or 100nM unlabeled T_4 . A significant increase in D2 activity levels (~ 2-fold) was observed in germ cells of hypothyroid rats, whereas no change occurred in the somatic fraction.

D2 expression was also evaluated in other tissues of the adult reproductive system. D2 activity was readily detected in prostate in euthyroid rats and increased several fold in hypothyroid animals ($P < 0.001$). D2 activity was undetectable in epididymus, PBS washed-seminal vesicle and spermatozoa (Figure 3B).

DISCUSSION

This study demonstrated for the first time that D2 expression is highly concentrated in the germ cells of seminiferous epithelium of adult rat testis. By *in situ* hybridization histochemistry, using a probe complementary to the coding sequence of rD2mRNA, we have shown that *Dio2* transcripts are localized almost exclusively in spermatids undergoing maturation. D2 hybridization signal is virtually absent in Sertoli cells, which form the somatic component of seminiferous epithelium, and interstitial cells. D2 activity measured in isolated somatic and germinative cell fractions confirmed

the hybridization results. In the other tissues of male reproductive tract evaluated, D2 expression was only detected in prostate.

It is now an established fact that thyroid hormone is involved on rat testicular development affecting especially Sertoli cells and spermatogenesis in pre-pubertal stage [20], when the highest levels of TR α 1 isoform are present in testis [12]. Experimentally induced neonatal hypothyroidism has been shown to lengthen the proliferative period of Sertoli cells, resulting in a significant increase in adult testis size and a concomitant increase in sperm production [20]. Conversely, hyperthyroidism leads to early cessation of Sertoli cell proliferation, a decrease in testis size, and decreased sperm production. Although thyroid hormones are well described modulators of the developing testis their role in the adult organ is still undefined [20] mainly due to the low levels of TR α 1 isoform present at this stage. However, as recently reported in the *rdw* rats with congenital hypothyroidism, thyroid hormone seems to be important not only for testicular development but also to the maintenance of testicular structure after full maturation [10].

We and others have previously shown that D2 is expressed in adult mice and rat testis, and that its activity was significantly induced by hypothyroidism [15, 16]. Here, we further demonstrated by in situ hybridization histochemistry and enzymatic assays that D2 expression is cell type-specific. Elongated spermatids at different stages of maturation were the predominant germ cell positive for D2, whereas other germ cells, i.e. spermatogonia, spermatocytes and round spermatids, were negative for D2. These

findings were further confirmed by real time-PCR analysis.

In mammals, spermatogenesis is a complex process in which stem cells, the spermatogonia, go through a differentiation step followed by subsequent divisions and differentiation into mature spermatozoa [21]. Based on the acrosomal system method, germ cells are arranged in fourteen well-defined cellular associations or stages that constitute the seminiferous epithelial cycle [21]. It is interesting to note that TR α 1, one of the functional TR isoforms, and transporters known to facilitate cellular thyroid hormone uptake, have been described as present in germ cells not only in adult rats but also in humans [12, 13, 22]. Despite numerous studies directed at elucidating the hormonal control of spermatogenesis, there is still a debate as to which hormones are involved and at which sites they promote cell maturation and progression to the next stage of spermatogenic cycle [23]. Since the biological effects induced by thyroid hormones are mediated by specific nuclear receptors, it is possible that the intracellular D2-generated T₃ may induce spermatids differentiation playing a role in their maturation process.

Another interesting finding was that both Sertoli cells, which provide a structural and physiological framework for the development of germ cells, and interstitial cells were negative for D2. The absence of TR isoform expression in Sertoli cells nuclei in the adult testis [12] supports the view that the two initial post-natal weeks, the period with the highest levels of TR α 1 expression in cell nuclei, are the critical period for thyroid hormone effects on Sertoli cells [20]. These observations taken together seem to indicate

a possible direct effect of thyroid hormones on the spermatogenesis in the adult rat testis. It is important to emphasize that although the major regulators of the spermatogenesis are FSH and testosterone acting through Sertoli cells, various other hormones, growth factors, and paracrine factors may also be involved on the regulation of mammalian spermatogenesis [24].

Mice lacking the Dio2 (Dio2 ^{-/-}) gene appear to have normal reproductive function [25]. The most likely explanation is that the normal circulating thyroid hormone levels observed in these animals would be adequate to allow tissue development and function [26]. On the other hand, it may not be correct to assume that what has been detected for D2 in rat testis is valid for mice, warranting further studies in these animals.

In conclusion, in this study we demonstrated that D2 expression is highly concentrated in testicular germ cells, whereas other cells of the seminiferous epithelium are negative for this enzyme. These results suggest that thyroid hormone might have a direct effect on spermatogenesis in the adult rat testis.

REFERENCES

1. Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev* 2001; 81: 1097-1142.
2. Larsen PR, Berry MJ. Type I iodothyronine deiodinase: unexpected complexities in a simple deiodination reaction. *Thyroid* 1994; 4: 357-362.
3. Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev* 2002; 23: 38-89.
4. Maia AL, Kim BW, Huang SA, Harney JW, Larsen PR. Type 2 iodothyronine deiodinase is the major source of plasma T3 in euthyroid humans. *J Clin Invest* 2005; 115: 2524-2533.
5. Streckfuss F, Hamann I, Schomburg L, Michaelis M, Sapin R, Klein MO, Kohrle J, Schweizer U. Hepatic deiodinase activity is dispensable for the maintenance of normal circulating thyroid hormone levels in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 337: 739-745.
6. Schneider MJ, Fiering SN, Thai B, Wu SY, St Germain E, Parlow AF, St Germain DL, Galton VA. Targeted disruption of the type 1 selenodeiodinase gene (Dio1) results in marked changes in thyroid hormone economy in mice. *Endocrinology* 2006; 147: 580-589.
7. Visser TJ, Docter R, Krenning EP, Hennemann G. Regulation of thyroid hormone

- bioactivity. *J Endocrinol Invest* 1986; 9 Suppl 4: 17-26.
8. Oppenheimer JH, Schwartz HL, Surks MI. Tissue differences in the concentration of triiodothyronine nuclear binding sites in the rat: liver, kidney, pituitary, heart, brain, spleen, and testis. *Endocrinology* 1974; 95: 897-903.
 9. Jannini EA, Ulisse S, D'Armiento M. Thyroid hormone and male gonadal function. *Endocr Rev* 1995; 16: 443-459.
 10. Sakai Y, Yamashina S, Furudate S. Developmental delay and unstable state of the testes in the rdw rat with congenital hypothyroidism. *Dev Growth Differ* 2004; 46: 327-334.
 11. Carani C, Isidori AM, Granata A, Carosa E, Maggi M, Lenzi A, Jannini EA. Multicenter study on the prevalence of sexual symptoms in male hypo- and hyperthyroid patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 6472-6479.
 12. Buzzard JJ, Morrison JR, O'Bryan MK, Song Q, Wreford NG. Developmental expression of thyroid hormone receptors in the rat testis. *Biol Reprod* 2000; 62: 664-669.
 13. Jannini EA, Crescenzi A, Rucci N, Screponi E, Carosa E, de Matteis A, Macchia E, d'Amati G, D'Armiento M. Ontogenetic pattern of thyroid hormone receptor expression in the human testis. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 3453-3457.
 14. Canale D, Agostini M, Giorgilli G, Caglieresi C, Scartabelli G, Nardini V, Jannini EA, Martino E, Pinchera A, Macchia E. Thyroid hormone receptors in neonatal, prepubertal, and adult rat testis. *J Androl* 2001; 22: 284-288.

15. Bates JM, St Germain DL, Galton VA. Expression profiles of the three iodothyronine deiodinases, D1, D2, and D3, in the developing rat. *Endocrinology* 1999; 140: 844-851.
16. Wagner MS, Morimoto R, Dora JM, Benneman A, Pavan R, Maia AL. Hypothyroidism induces type 2 iodothyronine deiodinase expression in mouse heart and testis. *J Mol Endocrinol* 2003; 31: 541-550.
17. Tu HM, Kim SW, Salvatore D, Bartha T, Legradi G, Larsen PR, Lechan RM. Regional distribution of type 2 thyroxine deiodinase messenger ribonucleic acid in rat hypothalamus and pituitary and its regulation by thyroid hormone. *Endocrinology* 1997; 138: 3359-3368.
18. Kakucska I, Rand W, Lechan RM. Thyrotropin-releasing hormone gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus is dependent upon feedback regulation by both triiodothyronine and thyroxine. *Endocrinology* 1992; 130: 2845-2850.
19. Gelain DP, de Souza LF, Bernard EA. Extracellular purines from cells of seminiferous tubules. *Mol Cell Biochem* 2003; 245: 1-9.
20. Holsberger DR, Cooke PS. Understanding the role of thyroid hormone in Sertoli cell development: a mechanistic hypothesis. *Cell Tissue Res* 2005; 322: 133-140.
21. Russell LD ER, Sinha Hikim AP, Clegg ED. Histological and histopathological evaluation of the testis. Clearwater, Fla: Cache River Press 1990.
22. Suzuki T, Onogawa T, Asano N, Mizutamari H, Mikkaichi T, Tanemoto M, Abe

- M, Satoh F, Unno M, Nunoki K, Suzuki M, Hishinuma T, Goto J, Shimosegawa T, Matsuno S, Ito S, Abe T. Identification and characterization of novel rat and human gonad-specific organic anion transporters. *Mol Endocrinol* 2003; 17: 1203-1215.
23. El Shennawy A, Gates RJ, Russell LD. Hormonal regulation of spermatogenesis in the hypophysectomized rat: cell viability after hormonal replacement in adults after intermediate periods of hypophysectomy. *J Androl* 1998; 19: 320-334; discussion 341-322.
24. Sharpe R. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil E, Neil JD (eds). *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press; 1994.
25. St Germain DL, Hernandez A, Schneider MJ, Galton VA. Insights into the role of deiodinases from studies of genetically modified animals. *Thyroid* 2005; 15: 905-916.
26. de Jesus LA, Carvalho SD, Ribeiro MO, Schneider M, Kim SW, Harney JW, Larsen PR, Bianco AC. The type 2 iodothyronine deiodinase is essential for adaptive thermogenesis in brown adipose tissue. *J Clin Invest* 2001; 108: 1379-1385.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. *In situ* hybridization histochemistry autoradiograms of type 2 iodothyronine deiodinase (D2) in rat seminiferous epithelium. Dark (**A**) and bright (**B**) field microscopy show identical fields of part of the seminiferous epithelium (longitudinal sections) with intense labeling for D2 mRNA in spermatids. Tubule 1 is on stage III/IV of the cycle, in which spermatids are in process of elongation and localized more internally in the tube wall. Tubule 2 is on stage VII/VIII of the cycle. **C**. Higher magnification of part of tubule 2 showing interstitial cells (IC) negative for D2 mRNA and intense D2 labeling in elongated spermatids close to the lumen. A negligible background can be observed. In **D**, a high magnification of a cross-section of seminiferous tubule in stage V of the cycle shows D2-positive spermatids localized in the middle of the tubule. Note that spermatogonia (SG) are negative. Scale bar, 15 μm (A, B); 6 μm (C); 10 μm (D).

Figure 2. Cross section of rat seminiferous tubules prepared for *in situ* hybridization histochemistry of type 2 iodothyronine deiodinase (D2) and stained with haematoxylin and eosin. Different stages of spermatogenesis are observed. Tubule **A** shows stage III/IV, **B** stage V, **C** stage VII and **D** stage VIII. Note that the intense D2 labeling coincides with the localization of spermatids in process of differentiation. Scale bar, 15 μm .

Figure 3. **A.** D2 kinetics from testicular germ cell samples in adult rat. Representative Lineweaver-Burk plot of T4 deiodination catalyzed by D2. Kinetic constants were calculated to be K_m 1.1 nM and V_{max} 0.63 fmol/min mg.protein. **B.** D2 activity in rat reproductive organs. Data are representative of 3 experiments.

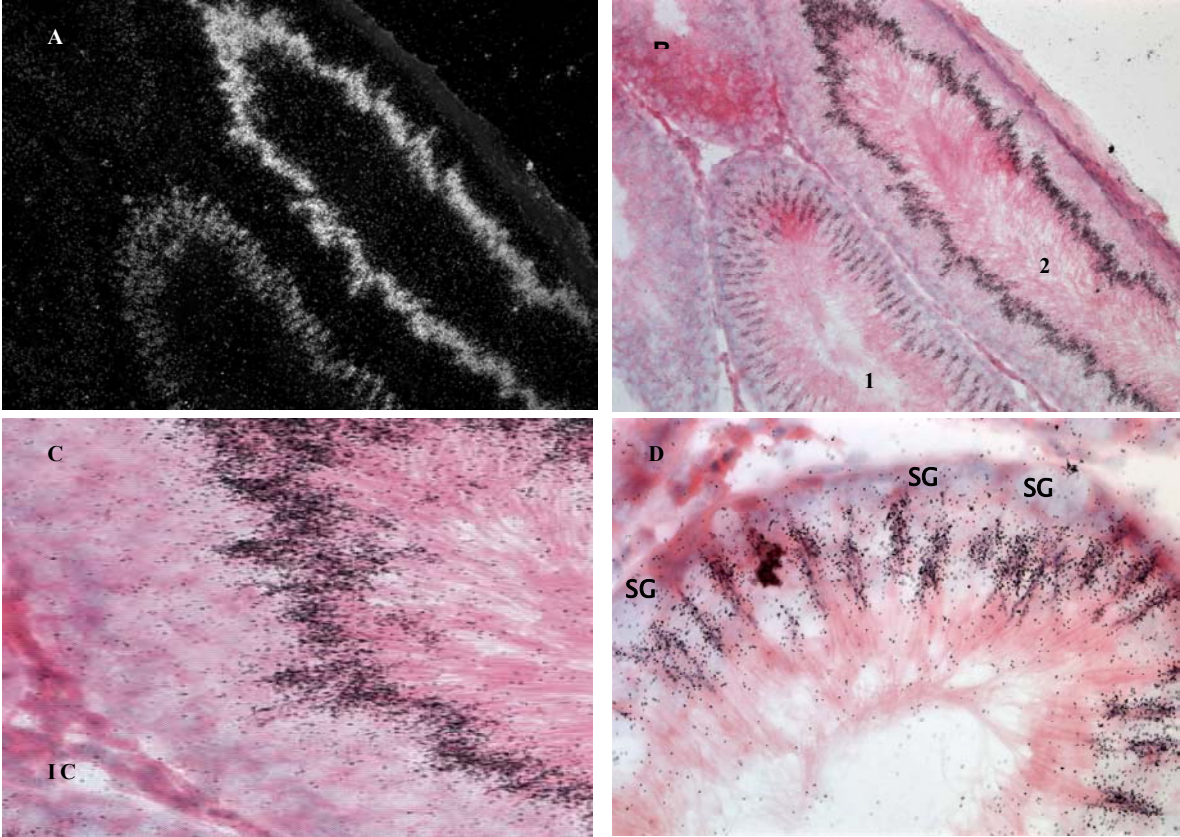


Figure 1

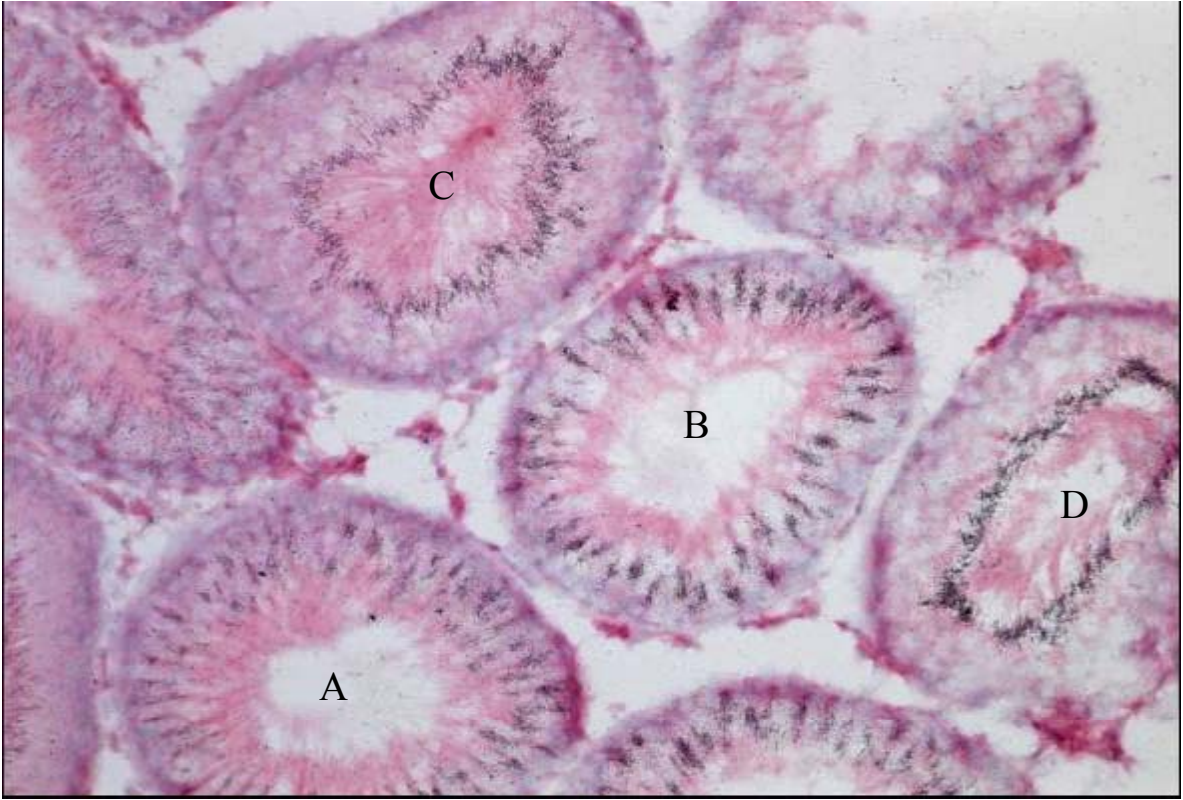


Figure 2

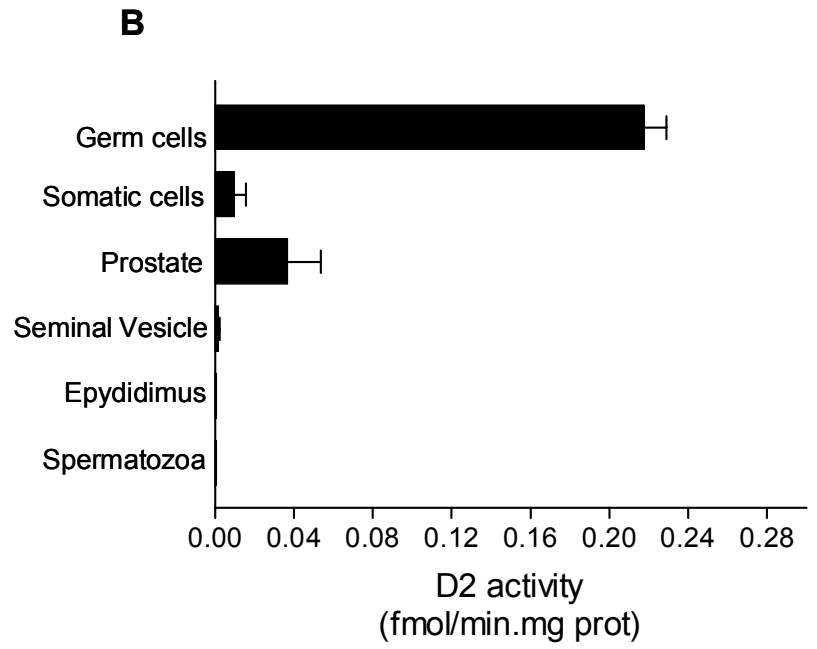
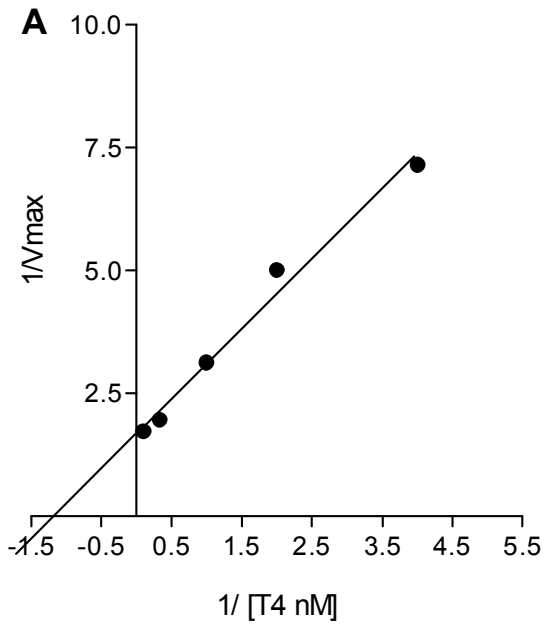


Figure 3