

ADRIANA SILVA OLIVEIRA

**TRANSPORTE DE HORMÔNIOS TIREOIDEANOS EM HEMÁCIAS DE
PACIENTES COM HIPERTIREOIDISMO OU HIPOTIREOIDISMO PRIMÁRIO**

Tese apresentada ao Curso de
Pós-graduação em Patologia
Molecular, Faculdade de Medicina,
Universidade de Brasília,
como requisito parcial à obtenção
do título de Doutor em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni

BRASÍLIA

2009

Oliveira, Adriana Silva

Transporte de Hormônios Tireoideanos em hemácias de pacientes com hipertireoidismo ou hipotireoidismo primário / Adriana Silva Oliveira. – Brasília, 2009.

94f.: il. (algumas color.)

Orientador: Luiz Alberto Simeoni

Tese (Doutorado em Ciências) – Curso de Pós-graduação em Patologia Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília.

1.Hormônio tireoideano. 2.Transporte. 3.Hipotireoidismo.
4.Hipertireoidismo.

AGRADECIMENTOS

A cada um cabe uma especial contribuição em minha história... Obrigada!

À minha família.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni.

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves.

Aos meus amigos: Rilva (Agmar, Murilo e Isabella), Daniela, Angélica (Leandro), Gabriela (Bao, Clara e Laura), Viviane (André e Íris), Cristina Luíza, Karime (Beto), Ranieri e Rutnéia (Fernando, Bárbara e D. Lili) e Gustavo.

Às Dr.^{as} Monalisa, Adriana Lofrano, Adriana, Tatiana e Gracianne.

Ao Dr. Júlio César.

Às enfermeiras: Marlene, Eva e Ana.

Aos voluntários.

Aos pacientes.

Às Prof. Dr.^{as} Mária de Fátima, Dâmaris, Marie e Andréa.

Ao Sr. José Tavares.

À Sr.^a Maria Fernandes.

Ao Sr. Carlos.

À minha jovem amiga Alana.

Ao Padre Augustinho.

Aos amigos e intercessores da Capela N.S. Auxiliadora.

A fé me liberta da pressão que pesa sobre mim.
Assim, no meu íntimo, a fonte interior pode jorrar,
e dela brota uma grande energia para o mundo,
sem que com isso eu fique esgotado.
Pois, se não, dependo do que produzo, a vida pode brotar,
a criatividade e a fantasia podem florescer e realizar grandes coisas.

Anselm Grün

RESUMO

Os hormônios tireoideanos (HT) têm um importante efeito no crescimento, diferenciação e metabolismo celular. Eles se ligam ao receptor do hormônio tireoideano (TR), que pertence à superfamília dos receptores nucleares. Devido à localização intracelular do TR, a ação de HT requer seu transporte do compartimento extracelular para dentro das células-alvo. Tem-se tornado cada vez mais claro que o influxo e efluxo celular de HT são mediados por transportadores e também que são estereoespecíficos e dependentes de energia. Mecanismos de regulação do transporte de HT em diferentes tecidos e o impacto em doenças tireoideanas e não-tireoideanas nestes processos não estão completamente compreendidas. Pacientes hipotireoideos e hipertireoideos primários apresentam alterações na síntese e secreção de HT, mas alterações no transporte foram pouco investigadas. O influxo e efluxo foram investigados em eritrócitos de 9 pacientes hipotireoideos, 14 pacientes hipertireoideos e 9 indivíduos normais (grupo controle). O influxo de $^{125}\text{I-T}_3$ e $^{125}\text{I-T}_4$ foi significativamente diminuído em eritrócitos de pacientes hipotireoideos em 1 e 5 minutos. Nenhum aumento estatisticamente significativo, até 10 minutos de influxo, foi observado em eritrócitos de pacientes hipertireoideos comparados ao controle. O efluxo de $^{125}\text{I-T}_3$ em eritrócitos de pacientes hipotireoideos foi reduzido, e nos eritrócitos de pacientes hipertireoideos foi aumentado, quando comparados ao controle. O efluxo de $^{125}\text{I-T}_4$ foi reduzido em eritrócitos de pacientes hipotireoideos em 5 minutos, e nenhuma alteração foi observada no efluxo em eritrócitos de pacientes hipertireoideos comparado ao controle. Eutireoidismo resultante do tratamento de pacientes hipertireoideos com radioiodo (^{131}I) reduziu o influxo de $^{125}\text{I-T}_3$ e $^{125}\text{I-T}_4$ nos eritrócitos. O efluxo de $^{125}\text{I-T}_3$ foi significativamente reduzido em 30 minutos, mas não alterou o remanescente intracelular de $^{125}\text{I-T}_3$. O efluxo de $^{125}\text{I-T}_4$ foi também reduzido. Eritrócitos de pacientes hipertireoideos masculinos e femininos mostraram diferenças no transporte de HT. O influxo de $^{125}\text{I-T}_3$ em eritrócitos de pacientes hipertireoideos antes do tratamento e de controles femininos foi aumentado quando comparado ao transporte em eritrócitos de pacientes hipertireoideos e controle masculino, mas nenhuma diferença entre os gêneros foi observada em pacientes hipertireoideos após o tratamento. Resultados semelhantes foram obtidos quando $^{125}\text{I-T}_4$ foi estudado, e neste caso diferenças entre os gêneros foram mais marcantes. Os efluxos de $^{125}\text{I-T}_3$ e $^{125}\text{I-T}_4$ em eritrócitos foram reduzidos em mulheres e aumentados em homens controles e pacientes hipertireoideos após o tratamento. Tomados em conjunto, estes resultados sugerem que a disfunção tireoideana está associada com alterações no transporte de HT em eritrócitos. Entretanto, os mecanismos envolvidos nestas alterações e seu significado fisiológico necessitam ser definidos. É importante notar que estas alterações podem refletir a dinâmica do influxo e efluxo em outros tecidos, assim, pode-se sugerir que há diferenças nos sistemas de transporte de HT.

Palavras-chave: Transporte de hormônio tireoideano. Hipertireoidismo. Hipotireoidismo.

ABSTRACT

Thyroid hormones (THs) have important effects on cellular growth, differentiation and metabolism. They bind to thyroid hormone receptors (TRs), which belong to the nuclear hormone receptor superfamily. Because TRs are located intracellularly, TH action requires its transport from the extracellular compartment into target cells. It has become increasingly clear that cellular influx and also efflux of TH is mediated by transporters, and also that it is ligand-specific and energy-dependent. Mechanisms regulating TH uptake into different tissues and the impact of thyroidal and nonthyroidal diseases in this process are not fully understood. Patients with primary hypo and hyperthyroidism show abnormalities in TH synthesis and secretion, but changes in TH transport have not been investigated so far. TH influx and efflux were investigated in erythrocytes from 9 hypothyroid patients, 14 hyperthyroid patients and 9 euthyroid volunteers (controls). $^{125}\text{I-T}_3$ e $^{125}\text{I-T}_4$ influx was significantly reduced in erythrocytes from hypothyroid patients at 1 and 5 minutes, whereas a non significant increase at 10 minutes was observed in erythrocytes from hyperthyroid patients compared to controls. $^{125}\text{I-T}_3$ efflux from erythrocytes of hypothyroid patients was reduced, and that from erythrocytes of hyperthyroid patients was increased compared to controls. $^{125}\text{I-T}_4$ efflux was reduced in erythrocytes from hypothyroid patients at 5 minutes, and no change was seen in erythrocytes from hyperthyroid patients compared to controls. Euthyroidism resulting from treatment of hyperthyroid patients with radioiodine (^{131}I) reduced $^{125}\text{I-T}_3$ and $^{125}\text{I-T}_4$ influx into erythrocytes. $^{125}\text{I-T}_3$ efflux was significantly reduced at 30 minutes, but there was no change in intracellular $^{125}\text{I-T}_3$ remnant. $^{125}\text{I-T}_4$ efflux was also reduced. Erythrocytes from male and female patients showed differences in TH transport. $^{125}\text{I-T}_3$ influx into erythrocytes from female hyperthyroid patients before treatment and from female controls was increased compared to erythrocytes from hyperthyroid and control males, but no gender difference was seen between hyperthyroid patients after treatment. Similar results were obtained when $^{125}\text{I-T}_4$ was studied, and in this case gender differences were even more marked. $^{125}\text{I-T}_3$ e $^{125}\text{I-T}_4$ efflux from erythrocytes was reduced in female and increased in male controls and hyperthyroid patients. Taken together, these results suggest thyroid dysfunction is associated with changes in TH transport in erythrocytes. However, the mechanisms involved in these changes and their physiological significance remain to be defined. It is also important to note that these changes may not reflect TH uptake and efflux dynamics in other tissues, since tissue differences of the TH transport systems are suggested.

Key words: Thyroid hormone transport. Hypertiriodism. Hypotiriodism.

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

BAT	– Tecido adiposo marrom
BCH	– Ácido β -2-aminobíciclo-(2,2,1)-heptano-2-carboxílico
BSP	– Bromosulfoftaleína
cAMP	– AMP cíclico
CP	– Plexo coróide
CSF	– Fluido cerebrospinal
D1	– Desiodase tipo 1
D2	– Desiodase tipo 2
D3	– Desiodase tipo 3
DIT	– 3,5-diiodo-L-tirosina
D2KO	– Camundongos knockout desiodase tipo 2
D3KO	– Camundongos knockout desiodase tipo 3
DT ₃	– 3,5,3'-triodo-D-triiodotironina
DT ₂	– 3,5-diiodotironina
FAT	– Transportador ácido graxo translocase
GH	– Hormônio do crescimento
GH-IGF-I	– Fator de crescimento I compatível com insulina
HDL	– Lipoproteína de alta densidade
HT	– Hormônios tireoideanos
HTP	– Eixo hipotálamo-hipófise-tireóide
IRD	– Desiodação enzimática do anel interno
¹²⁵ I-T ₃	– Triiodotironina radiomarcada com ¹²⁵ I
¹²⁵ I-T ₄	– Tiroxina radiomarcada com ¹²⁵ I
LAT	– Transportador aminoácido permease/tipo T
LDL	– Lipoproteína de baixa densidade
LST-1	– Transportador fígado-específico humano
MCT	– Transportador de monocarboxilatos
MEC	– Matriz extracelular
MIT	– 3-monoiodo-L-tirosina
NCTP	– Polipeptídeos co-transportadores de taurocolato dependentes de sódio

OATP	– Polipeptídeos co-transportadores de ânions orgânicos independentes de sódio
ORD	– Desiodação enzimática do anel externo
PBS	– Tampão fosfato
P-gp	– Glicoproteína G
PTU	– Propiltiouracil
RE	– Retículo endoplasmático
rT ₃	– 3,3', 5'-triiodo-L-tironina (T ₃ -reverso)
SNC	– Sistema nervoso central
T ₂	– 3,3`-diiodo-L-tironina
T ₃	– 3,5,3'-triiodo-L-tironina (triiodotironina)
T ₃ S	– Sulfato de triiodotironina
T ₄	– 3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina (tiroxina)
TAT	– Transportador de aminoácidos tipo T
TBG	– Globulina ligante de tiroxina
Tetrac	– Ácido tetraiodotiroacético
TPO	– Tireóide peroxidase
TR	– Receptor nuclear de hormônio tireoideano
TRH	– Hormônio liberador de tireotrofina
TSH	– Hormônio estimulante da tireóide
TTR	– Transtirretina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Hormônios tireoideanos.....	11
1.2 Iodotironinas selenodesiodases.....	16
1.3 Transporte de hormônio tireoideano.....	23
1.4 Doenças da tireóide.....	42
1.4.1 Hipotireoidismo.....	43
1.4.2 Hipertireoidismo.....	45
2. OBJETIVO.....	48
2.1 Objetivo geral.....	48
2.2 Objetivos específicos.....	48
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
3.1 Reagentes.....	49
3.2 Características do campo de pesquisa.....	49
3.3 População estudada.....	49
3.4 Obtenção de hemácias.....	51
3.5 Transporte de hormônios tireoideanos.....	51
3.5.1 Estudo de influxo.....	51
3.5.1 Estudo de efluxo.....	52
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
5. RESULTADOS.....	54
5.1 Influxo de $^{125}\text{I-T}_3$ em hemácias de indivíduos do grupo controle (ctrl), pacientes hipotireoideos (hipo) e pacientes hipertireoideos (hiper).....	54
5.2 Influxo de $^{125}\text{I-T}_4$ em hemácias de indivíduos do grupo controle (ctrl), pacientes hipotireoideos (hipo) e pacientes hipertireoideos (hiper).....	55
5.3 Efluxo de $^{125}\text{I-T}_3$ em hemácias de indivíduos do grupo controle (ctrl), pacientes hipotireoideos (hipo) e pacientes hipertireoideos (hiper).....	57
5.4 Efluxo de $^{125}\text{I-T}_4$ em hemácias de indivíduos do grupo controle (ctrl), pacientes hipotireoideos (hipo) e pacientes hipertireoideos (hiper).....	59
5.5 Influxo de $^{125}\text{I-T}_3$ em hemácias de indivíduos do grupo controle (ctrl), pacientes hipertireoideos antes (pretrat) e após o tratamento (postrat).....	61
5.6 Influxo de $^{125}\text{I-T}_4$ em hemácias de indivíduos do grupo controle (ctrl),	

pacientes hipertireoideos antes (pretrat) e após o tratamento (postrat).....	63
5.7 Efluxo de $^{125}\text{I-T}_3$ em hemácias de indivíduos do grupo controle (ctrl),	
pacientes hipertireoideos antes (pretrat) e após o tratamento (postrat).....	64
5.8 Efluxo de $^{125}\text{I-T}_4$ em hemácias de indivíduos do grupo controle (ctrl),	
pacientes hipertireoideos antes (pretrat) e após o tratamento (postrat).....	64
5.9 Influxo de $^{125}\text{I-T}_3$ em hemácias de indivíduos do grupo controle e	
pacientes hipertireoideos, homens e mulheres, antes e após o tratamento.....	67
5.10 Influxo de $^{125}\text{I-T}_4$ em hemácias de indivíduos do grupo controle e	
pacientes hipertireoideos, homens e mulheres, antes e após o tratamento.....	70
5.11 Efluxo de $^{125}\text{I-T}_3$ em hemácias de indivíduos do grupo controle e	
pacientes hipertireoideos, homens e mulheres, antes e após o tratamento.....	71
5.12 Efluxo de $^{125}\text{I-T}_4$ em hemácias de indivíduos do grupo controle e	
pacientes hipertireoideos, homens e mulheres, antes e após o tratamento.....	73
6. DISCUSSÃO.....	76
7. CONCLUSÃO.....	89
8. BIBLIOGRAFIA.....	91

1. Introdução

1.1. Hormônios tireoideanos

Os hormônios tireoideanos (HT) são sintetizados pela glândula tireóide que está localizada no pescoço, na face anterior da traquéia, entre a cartilagem cricóide e o estreito supraesternal¹. Microscopicamente a tireóide apresenta folículos em forma de esferas ou ácinos, cada um composto por uma única camada de células em torno do lúmen preenchido com colóide, constituído principalmente por tiroglobulina (glicoproteína de 660 kDa)².

A captação de iodeto plasmático pela glândula tireóide é a primeira etapa da síntese de HT quando, então, incorpora-se aos resíduos de tirosina para em seguida unir-se ao núcleo tirosil da tiroglobulina formando as iodotirosinas (3-monoiodo-L-tirosina [MIT] e 3,5-diiodo-L-tirosina [DIT]). A síntese de tiroxina (T_4) exige a fusão de duas moléculas de DIT para que seja produzida a estrutura definitiva com dois anéis iodados, enquanto a síntese de triiodotironina (T_3) dá-se com a junção de MIT e DIT³.

Os hormônios tireoideanos, ligados às tiroglobulinas, permanecem armazenados no colóide e, quando requisitados, são liberados como iodotironinas hormonalmente ativas⁴. A glândula tireóide contém grandes quantidades de HT armazenados que, desta forma, independente da necessidade de síntese imediata, podem ser secretados mais rapidamente quando exigido, o que geralmente ocorre após bruscas alterações hormonais².

A glândula tireóide produz predominantemente o pró-hormônio T_4 , juntamente com uma pequena quantidade de T_3 - o hormônio bioativo. A maioria do T_3 é produzida por desiodação enzimática do anel externo (ORD) de T_4 , em tecidos periféricos. Alternativamente, desiodação do anel interno (IRD) de T_4 produz o metabólito 3,3',5'-triiodotironina (T_3 reverso [rT_3]), que não tem atividade biológica determinada. O restante do T_4 é metabolizado por diferentes vias identificadas por conjugação do grupo hidroxilfenólico ao sulfato ou ao ácido glicurônico. Estas reações permitem aumento da solubilidade dos substratos e, deste modo, facilitam a depuração biliar ou excreção urinária^{3,5}.

O T_3 é metabolizado, em sua maior parte, por IRD e o rT_3 por ORD produzindo, nos dois casos, o metabólito 3,3'-diiodotironina (T_2). Assim, ORD é considerada um via de ativação e IRD de inativação. A bioviabilidade de HT é

determinada, desta forma, por vários fatores, incluindo a secreção tireoideana de T_4 e T_3 , a conversão de T_4 em T_3 por ORD e a inativação de T_4 e T_3 por IRD⁶.

Após sua formação o HT é, por fim, liberado da glândula tireoideana por endocitose permitindo sua passagem do colóide para o lúmen folicular, processo que é estimulado pelo hormônio estimulante da tireóide (TSH). As vesículas formadas fusionam-se aos lisossomos e a proteólise é catalisada pela catepsina. O T_4 e o T_3 são, então, liberados no interior das células da tireóide e por ação do TSH em receptores celulares atingem a circulação como pró-hormônio ou como T_3 ³.

A taxa de produção de T_4 exclusivamente produzida pela tireóide é de 80 a 100 mg (100 a 130 nmoles) por dia. Aproximadamente 10% de T_4 é degradada por dia e cerca de 80% é desiodada, metade para formação de T_3 e a outra metade para formar rT_3 . O restante pode ser conjugado, desaminado e decarboxilado formando o ácido tetraiodotiroacético (Tetrac) ou ainda, clivado entre os dois anéis. A conversão de T_4 em T_3 em outros tecidos, que não a glândula tireóide, leva a um aumento em sua atividade biológica e é regulada, de modo que a produção de T_3 possa mudar independente de alterações na função hipófise-tireóide. A produção de T_3 é de 30 a 40 mg (45 a 60 nmoles) por dia, embora a produção extratireoidal seja de cerca de 50 mg (75 nmoles), a maioria dos quais é intracelular. O T_3 é degradado, principalmente, por desiodação, muito mais rapidamente do que T_4 , em torno de 75%, já o rT_3 é produzido de 30 a 40 mg (45 a 60 nmoles) por dia, quase totalmente por desiodação extratireoidal de T_4 e é degradado ainda mais rapidamente do que o T_3 , principalmente por desiodação⁷.

Desta forma, as transformações metabólicas do HT nos tecidos periféricos determinam seu potencial biológico e regulação de seus efeitos celulares^{3,5}. Uma grande variedade de iodotironinas e dos derivados metabólicos circulam no plasma. As concentrações de T_4 e T_3 são constantes nos tecidos e podem variar de acordo com a concentração destes livres no plasma. Entretanto, a concentração de T_3 livre em diferentes tecidos varia de acordo com a quantidade de hormônio transportado e a atividade das desiodases no tecido. Em humanos com função tireoideana normal, a maior parte do T_3 circulante é derivada dos tecidos periféricos por monodesiodação de T_4 . Como resultado, o impacto do HT plasmático nos tecidos-alvo não é o mesmo em todos os tecidos. No fígado e no rim, por exemplo, a saturação do receptor do hormônio tireoideano (TR) é, normalmente, de aproximadamente 50% e no sistema nervoso central (SNC) de 95%.

Adicionalmente, no tecido adiposo marrom (BAT) os níveis de atividade de D2 e ocupação de TR são dinâmicos e alteram de acordo com os requerimentos do tecido. Em animais a temperatura ambiente a saturação do receptor é aproximadamente 70% e aumenta para 100% durante exposição à temperatura de 4°C. Assim, diante da dinâmica do metabolismo, o índice de reposição do T₄ periférico é, normalmente, de 10% por dia e de T₃ é de 65% por dia⁸.

Mais de 99,95% de T₄ e 99,50% do T₃ presentes no soro estão associados, de maneira firme, mas reversível, a proteínas séricas de ligação (globulina ligante de tiroxina (TBG), transtirretina (TTR), albumina e lipoproteínas^{9,5}. Na circulação 75% de T₄ está associado à TBG, 5% à transtirretina (pré-albumina ligadora de T₄), 12% à albumina e 3% à lipoproteínas. Em torno de 80% de T₃ encontra-se ligado à TBG, 15% à TTR e 5% à albumina^{2,9}.

A TBG é uma glicoproteína de 54 kDa sintetizada pelo fígado e sua concentração sérica em indivíduos normais é de cerca de 1,5 mg/dL (0,27 mmol/L), sendo capaz de transportar aproximadamente 20 mg de T₄ (26 nmoles). Em torno de 1/3 de TBG presente no soro está ligado a T₄, sendo que o sítio de ligação tem uma afinidade 20 vezes maior do que para T₃¹⁰.

A proteína tetramérica TTR de 55 kDa é sintetizada também pelo fígado. Cada molécula de TTR conta com dois sítios de ligação ao T₄, no entanto, a ocupação de um destes sítios diminui a afinidade do segundo ao hormônio. A concentração sérica de TTR é de quase 25 mg/dL (4,6 mmol/L), uma quantidade que pode unir-se a 200 mg de T₄ (260 nmoles)¹⁰. A TTR, secretada pelo plexo coróide, foi identificada como uma proteína importante para a manutenção de T₄ no fluido cerebrospinal, prevenindo a perda do hormônio para o sangue¹¹. Em experimentos desenvolvidos em girinos, observou-se que as atividades de ligação do HT em proteínas plasmáticas sofrem alterações durante metamorfose, sugerindo um papel regulatório das mesmas¹².

A albumina por sua vez possui vários sítios de ligação ao T₄, sendo um sítio de ligação forte e outros mais fracos. Existem quatro isoformas de albuminas transportadoras com diferentes afinidades para T₄ e T₃. Como apenas cerca de 12% do T₄ está ligado à albumina, alterações em suas concentrações séricas têm pouco efeito sobre as concentrações de T₄⁹. A afinidade de T₃ e T₄ pela albumina é muito menor que por TBG ou TTR, mas altas concentrações destas proteínas resultam em uma taxa de ligação de até 10% destes hormônios^{3,5}. Finalmente, T₃ e T₄ podem ser

encontrados ligados a lipoproteínas, principalmente à apolipoproteína AI, um componente de lipoproteínas de alta densidade^{9,13}.

Devido à quantidade de HT presente no soro que está ligada às proteínas plasmáticas, as mudanças nas concentrações séricas destas proteínas, especialmente TBG, têm grande efeito sobre o metabolismo e concentrações de T_4 e T_3 ².

O HT está envolvido na regulação da transcrição de genes alvos⁴. O T_3 regula a expressão nuclear de genes por sua ligação a $TR\alpha$ e $TR\beta$ ¹⁴. Os TR reconhecem elementos tireoideanos específicos nos promotores dos genes-alvo e ativam ou reprimem a transcrição em resposta ao hormônio. Assim, as ações nucleares do T_3 são sensíveis aos inibidores da transcrição e tradução e têm a latência de horas ou dias⁴. Os receptores nucleares apresentam características determinantes que estão relacionadas à afinidade pelo T_3 e T_4 , aos tipos e localização dos receptores e a variabilidade de ação tecidual. O T_3 liga-se mais avidamente que o T_4 aos receptores nucleares e *in vivo* praticamente toda atividade nuclear está vinculada ao T_3 . Há, ainda, uma variação nas respostas a partir da ocupação dos receptores nucleares. Na hipófise e coração não existe uma correlação linear entre a crescente ocupação dos TR e sua conseqüente resposta, enquanto que em outros tecidos a ocupação de TR resulta em amplificação das respostas, como no fígado, na síntese de determinadas enzimas³.

A síntese e secreção dos HT pela glândula tireóide são reguladas por um sistema de controle em *feed back* que envolve o eixo hipotálamo-pituitária-tireóide (eixo HTP) e são reguladas diretamente pelo TSH⁴ (figura 1). O receptor de TSH presente na membrana plasmática corresponde a uma glicoproteína de 85 kDa. A ligação do TSH aos seus receptores ativa a adenilciclase, aumentando a formação de AMP cíclico (cAMP), que então aciona uma sequência de atividade de quinases¹⁵. Portanto, o TSH é o regulador primário da liberação e secreção de HT tendo um papel crítico no crescimento e desenvolvimento da tireóide⁴.

O TSH, por sua vez, é estimulado pelo hormônio liberador de tirotrófina (TRH), que é um tripeptídeo distribuído por toda área do hipotálamo, mas em maior quantidade nos núcleos paraventricular e eminência mediana. O TRH é metabolizado muito rapidamente, sua meia-vida plasmática é de aproximadamente três minutos. O estímulo de TRH sobre a secreção de TSH ocorre pela ativação mediada por receptor via fosfolipase C, o que estimula a mobilização de cálcio intra-

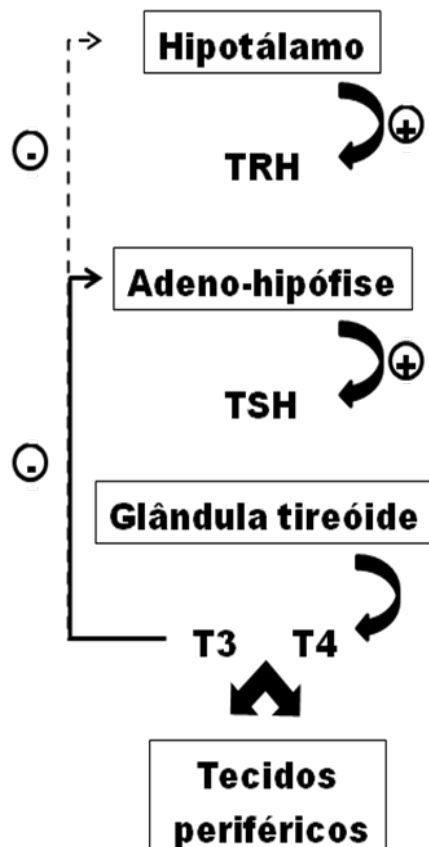


Figura 1 – Controle da síntese e secreção de hormônios tireoideanos por *feed back* positivo e negativo.

celular. A estimulação crônica de TRH também aumenta a síntese e glicosilação do TSH, aumentando desta forma a atividade biológica do TSH. A secreção de TRH é pulsátil, assim como a secreção do TSH. Contudo, fora da tireóide, em diversos outros órgãos, a regulação de T₃ e T₄ está vinculada a alterações nutricionais, hormonais e a fatores relacionados a algumas enfermidades, o que pode variar em diferentes tecidos³.

Na tireóide, o mecanismo é extremamente sensível a alterações na secreção de HT e nos tecidos periféricos. Mudanças no *status* do hormônio prevêm rápida resposta disponibilizando HT presente na circulação. Assim, fisiologicamente, o TSH produzido pelas células tirotróficas da hipófise anterior liga-se a receptores específicos nas células da tireóide e estimulam todas as etapas da síntese do T₄ e T₃, bem como sua liberação pela glândula^{3,4}.

Portanto, a síntese e a secreção do TSH são influenciadas pelos HT (*feed back* negativo) e pelo TRH (*feed back* positivo)⁴ (figura 1). Como resultado deste limitado controle na secreção de TSH, a secreção de HT é mantida dentro de limites muito estreitos. Uma exceção importante acontece quando a diminuição das

concentrações séricas de T_3 , de ocorrência em pacientes com doença não-tireoideana, evidencia pouco efeito sobre a secreção do TSH, provavelmente porque o T_4 sérico contribui mais para o conteúdo nuclear de T_3 do hipotálamo e a hipófise do que em muitos outros tecidos¹⁶.

Embora sua atividade intranuclear seja evidente e alvo de interesse de vários estudos, uma pesquisa demonstrando que alguns efeitos do HT ocorrem de maneira muito rápida e não são afetados quando tratados com inibidores de transcrição ou tradução, sugerindo que os HT podem, também, mediar ações não-genômicas¹⁴. Estas ações requerem receptores de membrana plasmática ou receptores nucleares localizados no citoplasma. O receptor de membrana plasmática está localizado na proteína integrina $\alpha V\beta 3$, onde a afinidade de ligação é maior para T_4 que T_3 ¹⁷. Os possíveis mecanismos de ação descritos em alguns tecidos e tipos de células, por exemplo, BAT, coração e pituitária, incluem a regulação dos canais iônicos, fosforilação oxidativa e transcrição de genes mitocondriais e envolvem a geração de mensageiros secundários e indução do cálcio, cAMP e cascatas de sinalização proteína quinase¹⁴. Como em estado eutireoideo os níveis de HT são estáveis, estas ações não genômicas podem contribuir para índices de transcrição basal de alguns genes e eventos celulares, como a angiogênese e proliferação de células cancerígenas¹⁷.

1.2. Iodotironinas selenodesiodases

A desiodação de T_4 a T_3 e outras iodotironinas é um componente funcional na homeostase de HT (figura 2). Reação catalisada por três enzimas, codificadas separadamente por diferentes genes, a desiodação depende de sua ocorrência na posição 5 ou 5' da molécula de iodotironina, ativando ou inativando esta classe de compostos. Assim, juntamente com mecanismos de transporte que dirigem o fluxo de HT dentro e fora da célula, as desiodases atuam como pré-receptores influenciando atividades intra- e extracelulares nos níveis e ação do hormônio¹⁸.

As três isoenzimas desiodases até então identificadas são expressas em tecidos específicos e reguladas pelo metabolismo, desta forma são capazes de controlar localmente a produção e degradação de T_4 e T_3 e de outras iodotironinas, elas agem como “porta de entrada” para o acesso de T_3 modulando localmente a viabilidade do T_4 e outras iodotironinas para posterior interação com alvos celulares

definidos¹⁹. As desiodases também modulam o *status* tireoideano nos tecidos, individualmente, em resposta à deficiência de iodo, hipotireodismo ou hipertireoidismo⁸. Alguns tipos de células, onde há ausência na capacidade para o ajuste fino no índice de ativação ou inativação de T₄ e T₃, são menos afetadas, uma vez que seu *status* poderá ser determinado pela concentração de T₃ livre no plasma. Por outro lado, em células que expressam D2 e/ou D3 as alterações na atividade destas enzimas aliviam as flutuações em T₄ e T₃ plasmático, constituindo um potente mecanismo na homeostase tireoideana²⁰.

A desiodase tipo 1 (D1) catalisa, preferencialmente, a reação de desiodação de T₄ para T₃ ou rT₃ na posição 5' (anel externo) do anel fenólico, mas também remove iodo da posição 5 (anel interno) do anel tirosil produzindo 3,3'-diiodotironina (3,3'-T₂) a partir T₃ ou rT₃^{21,22}. Este mecanismo parece ser especialmente importante na recuperação do iodo de metabólitos inativos do HT como rT₃ e T₃S²³. A D1 é uma proteína de meia-vida longa (>12 horas) e sua atividade é submetida à inativação induzida pelo substrato. Pode ser bloqueada pelo propiltiouracil (PTU) e é expressa em vários tecidos de vertebrados, predominantemente, no fígado e rim²². Em ratos estão presentes constitutivamente no fígado, rim, sistema nervoso central (SNC), pituitária, glândula tireóide, intestino e placenta. Em humanos está ausente no SNC, mas presente no fígado, rim, tireóide e pituitária^{4,8}.

A D1 é uma proteína integral de membrana que contém selenocisteína e é composta de duas subunidades homodiméricas²¹ com 12 aminoácidos no lúmen do retículo endoplasmático (RE) e um domínio transmembrana único⁸. Um estudo de Gereben et al. (2008) indica que seu sítio ativo encontra-se no citosol²². De fato, D1 é encontrada na porção basolateral na membrana plasmática de células epiteliais do córtex, tireóide, em células da glia e em células HEK-293 transfectadas expressando D1²³. Embora com resultados de estudos conflitantes em sua posição, mais recentemente foi mostrado com maior evidência que em humanos e ratos está posicionada na membrana, não como D2 que está associada ao RE, mas a sua localização subcelular não foi completamente esclarecida^{24,25}.

Assim, estudos topológicos definem que o sítio catalítico de D1 é citosólico e sua localização na membrana plasmática pode ser vista como ponto de acesso ao T₃ e T₄ circulante facilitando sua entrada e ação enzimática. Estudos com enzimas recombinantes e endógenas indicam que a reação de desiodação catalisada por D1

conta com uma sequência com dois substratos: o primeiro é o próprio hormônio - iodotironinas - e o segundo é o co-fator intracelular endógeno tiol⁸.

Desiodase 1 apresenta mecanismos de regulação de sua síntese influenciados por interações específicas como: a) HT induz ao aumento de atividade e de mRNA de D1 em ratos, camundongos e humanos²⁶; b) administração aguda de glicocorticóides em humanos e ratos diminui a circulação de T₃ a partir de T₄, indicando que há um bloqueio na conversão. Recentes dados sugerem que os glicocorticóides regulam o metabolismo de HT de maneira tecido e idade dependentes, sugerindo mecanismos mediados também por D3²²; c) apresenta atividade mais alta em ratos machos que em fêmeas, e esta diferença é eliminada com gonadectomia, embora não haja nenhum estudo sobre o seu efeito direto dos esteróides gonadais²⁷; d) tratamento de indivíduos adultos eutireoideos com hormônio do crescimento (GH) aumenta o índice na circulação de T₃ a partir de T₄, reduzindo rT₃ e T₄⁸. A terapia de substituição de GH em animais e *in vitro* (cultura de células) indica estimulação de atividade D1 hepática pelo eixo GH-IGF-I (fator de crescimento I compatível com insulina). Este mecanismo é periférico, uma vez que é encontrado também em indivíduos hipotireoideos que utilizam reposição de T₄²¹; e) O cAMP aumenta a síntese de D1²²; f) Citosinas como IL-1²⁸, IL-6^{29,30}, TNF α ^{31,32}, dentre outras, têm sido postuladas como potenciais mediadoras das alterações na função tireoideana que ocorrem em várias doenças diminuindo a atividade de D1. Entretanto, em células da pituitária de ratos, aparentemente há o efeito oposto, IL-1 estimula D1²². Na síndrome do doente eutireoideo é freqüentemente observada uma diminuição hepática na produção de T₃ pela ação de D1 que pode estar relacionada à liberação de citocinas²¹; g) deficiência de selênio diminui a atividade de D1, mas devido a uma combinação de fatores constitutivos²⁰; h) a expressão de D1 está reduzida no feto²²; i) a diminuição na concentração de T₃ pela conversão de T₄ e aumento de rT₃ em humanos obesos é um dos indicadores de que o metabolismo periférico pode ser modulado por eventos fisiológicos e patofisiológicos, o que pode ser observado, igualmente, em doenças agudas; j) a regulação da inativação/degradação de D1 está aumentada na presença do ácido iopanóico ou rT₃²⁰; k) ácido retinóico em linhagens de células tumorais (hepatocarcinoma e carcinoma folicular de tireóide) regula negativamente D1^{22,33}. Também há

acentuada diminuição ou ausência de D1 em tecidos cancerosos humanos (como carcinoma de próstata, tireóide, rim)²¹.

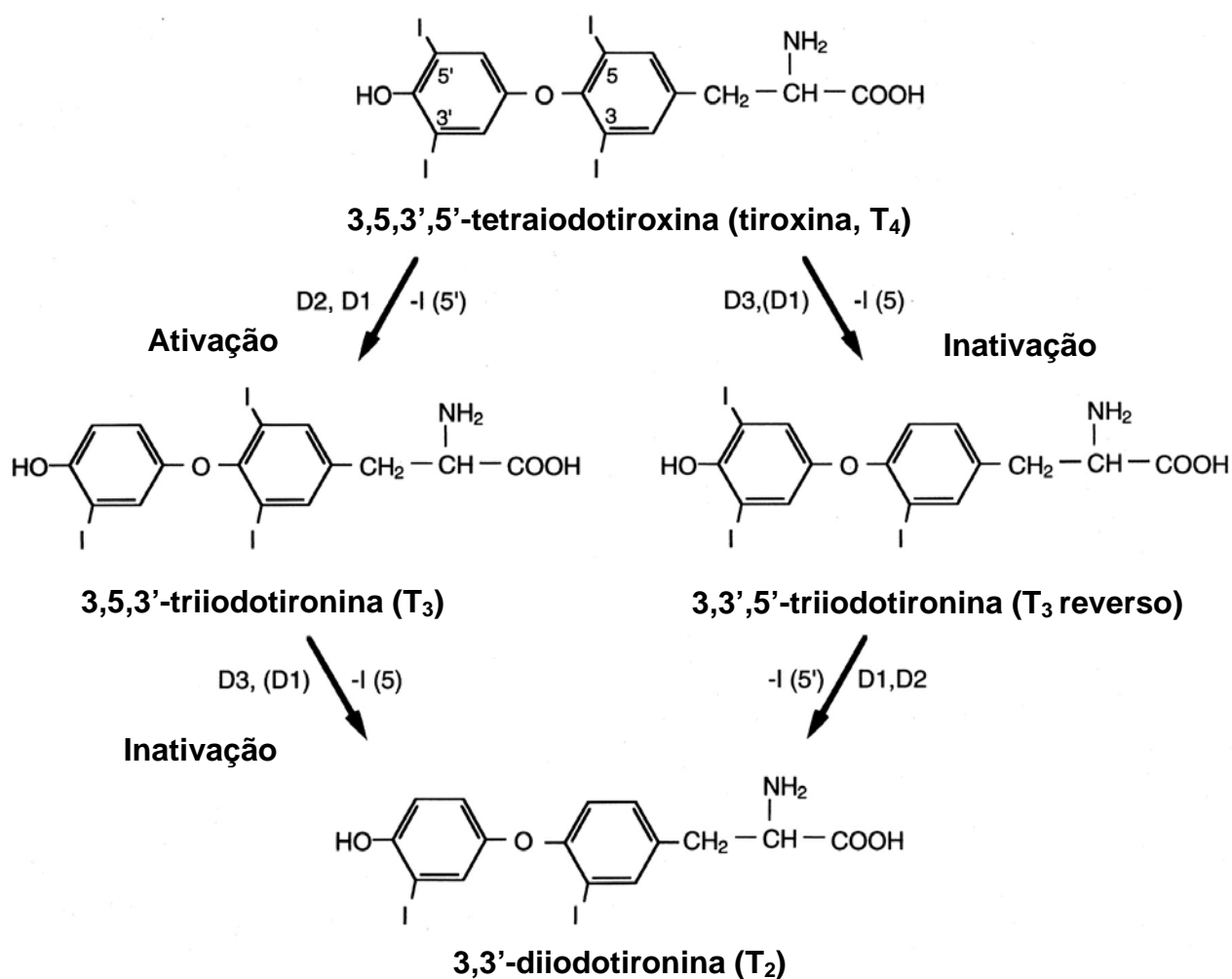


Figura 2 – Metabolismo de hormônios tireoideanos.

Há, ainda, um complexo de alterações ligadas à função de D1 que interagem mutuamente com intuito de economizar HT como o estresse, ativação do eixo adrenal-pituitária, inibição da produção e secreção de HT, alterações na distribuição e ligação em proteínas séricas, entrada no tecido e metabolismo intracelular²².

Desiodase 2 catalisa a conversão de T₄ em T₃ por remoção do iodo da posição 5' do anel tirosil e, com menor afinidade promove a conversão de rT3 em 3,3'-T₂²¹. Homodímero altamente óxido-reduzido, que controla eventos transcricionais e pós-transcricionais, tem a importante tarefa na regulação intracelular dos níveis de T₃ plasmático²². Em virtude desta característica é particularmente importante no cérebro produzindo entre 50 e 75% do T₃ nuclear no

córtex cerebral de ratos^{8,22}. Nestes animais produz T_3 principalmente para demanda local dos tecidos e células que a expressam e são responsáveis pelo maior volume quantitativo de produção do hormônio extratireoidal circulante^{21,22}. É considerada uma proteína de meia-vida curta, aproximadamente 40 minutos e, muitas vezes, é desestabilizada pelo substrato²².

A atividade de D2 foi encontrada em experimentos com membranas fracionadas, mas diferenças em sua localização subcelular não foram determinadas. Posteriormente, estudos em clonagem provaram que D2 é uma proteína residente no RE com o N-terminal localizado no lúmen e domínio catalítico no citosol²².

No músculo esquelético humano, diferente do observado em ratos, D2 disponibiliza uma provável fonte para a produção de T_3 plasmático extratireoidal³⁴. Em ratos sua atividade é predominantemente expressa na pituitária, cérebro³⁵, BAT⁴, gônadas³⁶, glândula pineal³⁷, timo³⁸ e útero gravídico³⁹ e ainda, em camundongos nas glândulas mamárias⁴⁰. Em humanos foi identificada na artéria coronária e células do músculo liso aórtico⁴¹, SNC²², tireóide^{34,42,43}, coração²², músculo esquelético²², medula espinhal⁴⁴, pituitária⁴⁴, queratinócitos⁴⁴, placenta e, de maneira menos abundante, no rim e pâncreas^{34,42,45,46}. Com exceção da tireóide de pacientes com doença de Graves e adenomas foliculares, que tem particularmente altos níveis de mRNA e de atividade de D2, os níveis na tireóide são desproporcionalmente altos na atividade de D2³⁴. Estas diferentes localizações podem explicar a disponibilidade de T_3 gerado a partir de T_4 por D2 no compartimento nuclear, um fenômeno notado em vários estudos da fisiologia desta enzima⁸.

Desiodação por D2 requer um co-fator redutor endógeno – o tiol, além do substrato, que determina uma sequência de reações que se combinam⁸. A síntese de D2 é regulada por: cAMP^{8,22}, T_4 (que diminui significativamente sua atividade, mas não os níveis de mRNA²²), rT_3 ²¹, catecolaminas⁴⁷ e glicocorticóides que afetam a expressão transcricional em tecidos cerebrais específicos²².

Conforme citado anteriormente, D1 é induzida por T_3 e T_4 e está elevada em pacientes hipertireoideos, a atividade de D2 é, ao contrário, rapidamente inativada por T_4 e rT_3 - substratos desta enzima. Estudos com ratos hipotireoideos tratados mostraram que T_3 diminui mRNA de D2 indicando que, *in vivo*, T_3 e T_4 podem exercer efeitos supressivos na atividade de D2 por mecanismos pré- e pós-translacionais, respectivamente⁴⁸. Em ratos a atividade e o mRNA de D2 estão

também aumentados em hipotireoidismo e em regiões somatosensoriais do cérebro após o nascimento, providenciando proteção contra os efeitos deletérios da insuficiente viabilidade de T_3 durante o desenvolvimento cerebral⁴⁹. A expressão de D2 em BAT está sob o controle de catecolaminas, contribuindo assim para a termogênese⁴⁷.

No cérebro, D2 pode ser a maior contribuinte para a produção local de T_3 a partir de T_4 , especialmente porque fortes indícios sugerem que a circulação periférica de T_3 não alcança o cérebro durante o desenvolvimento e também em adultos, onde o suprimento cerebral de T_3 depende de desiodação de T_4 via D2²¹.

Ainda, D2 parece estar envolvida na regulação pelo *feed back* do TSH em situação de hipotireoidismo, uma vez que altos níveis de atividade de D2 são encontradas em hipertireoidismo de origem central²¹.

É uma proteína chave no sistema homeostático de HT, já que controla a concentração intracelular de T_3 . Como sua meia-vida é muito curta pode muitas vezes estar aumentada em células expostas a substratos - T_4 e rT_3 - e quando na presença de altas concentrações de T_3 ⁵⁰. Estudos realizados em camundongos D2KO evidenciaram que, na idade adulta, estes apresentaram elevado níveis de T_4 e TSH (com T_3 normal) sugerindo que há uma resistência nos efeitos do *feed back* em T_4 no hipotálamo e/ou pituitária anterior¹⁸.

Desiodase 3 é a terceira enzima envolvida na desiodação redutiva de HT. Controla a inativação de T_4 , T_3 ou T_3 -4'-sulfato por desiodação na posição 5 do anel tirosil²¹. É a maior enzima inativante de T_3 e T_4 , já que D1 possui fraca capacidade para remover o iodo do anel interno⁵¹. Catalisa a conversão de T_4 em rT_3 e de T_3 em 3,3'- T_2 , produtos biologicamente considerados inativos⁸.

Desiodase 3 contribui para homeostase de HT por proteger os tecidos do excesso de hormônio e apresenta meia-vida longa de aproximadamente 12 horas²². Entretanto, um dos produtos desta reação enzimática, o rT_3 , é formado em quantidades semelhantes ao T_3 e circula no soro e fluido cerebrospinal, sendo considerado um bom substrato para D1 competindo com a desiodação de T_4 com implicações fisiológicas e regulatórias que não estão ainda esclarecidas²¹.

Em ratos adultos a D3 é expressa no SNC, pele, placenta, gônadas, pulmão, coração e intestino e, em neonatos, no músculo esquelético, fígado, intestino e retina^{22,36,39,52}. Em humanos foi identificada no fígado fetal, córtex cerebral, pulmão embrionário, intestino, trato urinário, placenta, pele e endotélio^{4,22}.

É uma proteína integral de membrana, tomando parte das vesículas endossomais, sugerindo que são seletivamente recicladas e voltam para a superfície celular^{22,53}. Há indicação que D3 está localizada na membrana plasmática, com sítio ativo exposto na superfície extracelular^{54,55}.

Estudo recente indica que a co-expressão de D3 com transportador MCT8 aumenta a desiodação mediada por D3 e que pacientes com hipotireoidismo têm superexpressão de D3²².

A regulação de D3 é efetivada por alguns elementos como: a) HT a regula positivamente; b) via extracelular é ativada pelo receptor-quinase²²; c) o ácido retinóico aumenta a atividade de D3⁵⁶; d) GH e glicocorticóides a regulam negativamente^{57,58}; e) TGF- β estimulam mRNA da enzima²².

Foi, ainda, mostrada a importância da desiodação de T₃ por D3 em *Xenopus laevis* transgênicos que superexpressam D3 constitutivamente. Há um retardo da pró-metamorfose, observando-se que a reabsorção de cauda e brânquias encontraram-se atrasadas ou interrompidas^{22,59}. Adicionalmente, estudos com camundongos D3KO mostraram que a primeira geração deste cruzamento apresentava problemas de fertilidade e desenvolvimento, evidenciando-se alta mortalidade. Os cruzamentos obtidos a partir da primeira geração mostraram que o desenvolvimento da tireóide foi bastante alterado, presumivelmente por superexposição do animal a excessivos níveis de HT no útero durante as duas primeiras semanas de vida perinatal. Assim, uma fase inicial do hipertireoidismo conduziu a um moderado estado de hipotireoidismo que persistiu até a fase adulta, onde anormalidades funcionais no hipotálamo, glândula pituitária e tireóide estavam presentes. Estas anormalidades no eixo da tireóide recordam-se às observações realizadas em crianças nascidas de mães com controle ineficiente de hipertireoidismo durante a gestação e, assim como em roedores após administração de doses excessivas de HT no período logo após o nascimento¹⁸.

De maneira mais contundente, a ação de D2 e D3 é observada no desenvolvimento cerebral em que diferentes regiões do cérebro contêm específicos modelos de desenvolvimento em função do tempo podendo, assim, requererem diferentes regulações na bioviabilidade de T₃, uma vez que o cérebro humano é subdividido em regiões com atividades bem definidas. Há evidências de que em várias regiões do cérebro de ratos T₃ é requisitado pelo córtex cerebral antes da

metade da gestação quando a mãe é a única fonte de T_4 e D2 possui um importante papel na bioviabilidade de T_3 , e que D3 protege regiões cerebrais do excessivo T_3 até que a diferenciação seja necessária⁶⁰.

1.3. Transporte de Hormônio Tireoideano

Como visto anteriormente, a atividade biológica dos HT é determinada pela concentração intracelular de T_3 , que por sua vez é dependente, entre outras coisas, da concentração de T_3 e T_4 na circulação, da disponibilidade de proteínas transportadoras que permitam o trânsito bidirecional - influxo e efluxo - dos HT e, finalmente, da atividade catalítica das desidases na conversão de T_4 em T_3 e em outros metabólitos (figura 3). Assim, ação e metabolismo do HT são eventos intracelulares que requerem a entrada das iodotironinas através da membrana plasmática por mecanismos de transportes específicos^{12,61,62}.

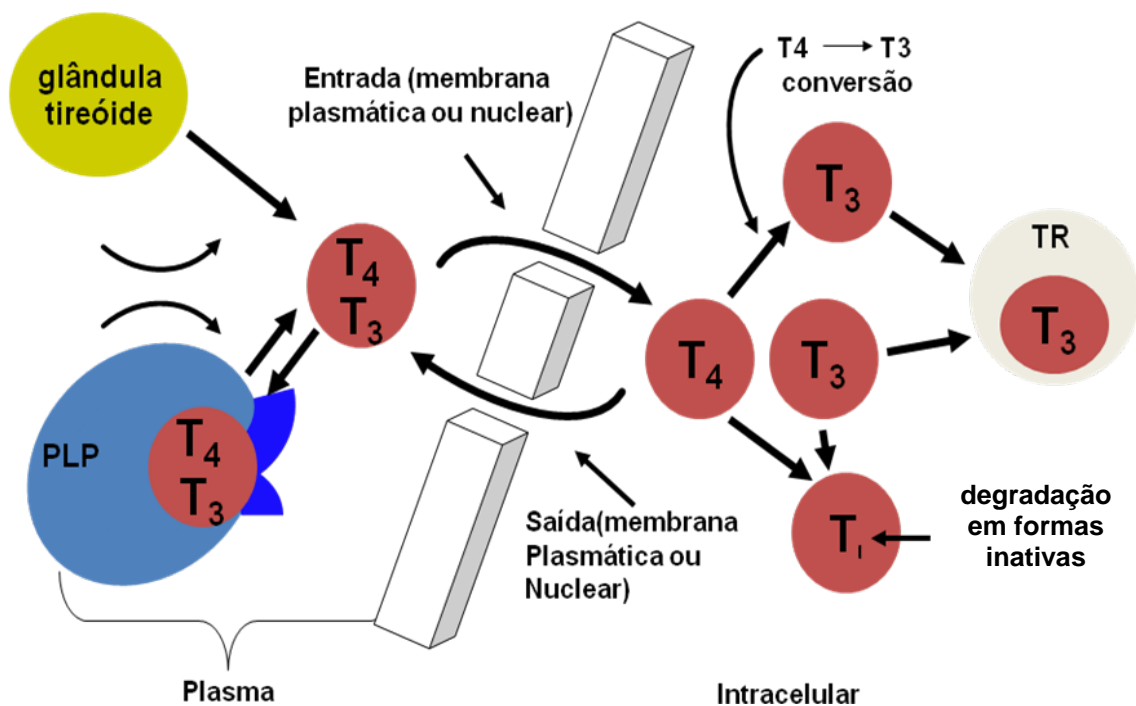


Figura 3 – Concentração intracelular de hormônios tireoideanos modulam a ação no receptor nuclear.

Há algumas décadas, devido à natureza lipofílica de sua estrutura molecular, acreditava-se que HT atingia o meio intracelular por difusão simples⁵⁵. Entretanto, em anos subsequentes, demonstrações efetivas da participação de proteínas transportadoras de membrana envolvidas na ação de entrada e saída do hormônio

das células foram realizadas. Nesta época foi ignorada a presença, na membrana celular, de superfícies polares e que HT dispõe de anéis aromáticos hidrofóbicos, iodo e cadeias laterais de alanina hidrofílica tornando o processo de difusão desfavorável, podendo impedir interações deste com a membrana plasmática^{63,64,65}. Desta maneira, foi identificada a concreta requisição de transportadores específicos, dependente de energia, para a dinâmica da entrada e saída do HT nas células⁶⁶.

Pesquisas têm mostrado *in vitro* (células de fígado de ratos e humanos e pituitária de ratos) que a inibição do transporte de T₃ nas células ocasiona uma diminuição proporcional de ligação ao receptor. Nesta condição, a entrada de HT na célula determinaria seu metabolismo - a conversão de T₄ em T₃ e/ou sua degradação – e, posteriormente, a ação biológica no TR^{21,88}.

Um dos primeiros trabalhos que avaliou o mecanismo de transporte de HT em células constatou, em cultura primária de hepatócitos de ratos, que o influxo de T₃ era mediado por carreadores e atuava de maneira dependente de energia⁶⁷. Em 1982 Docter et al mostraram que o influxo de T₃ em eritrócitos humanos envolveria apenas um processo de saturação e não dois como salientava o trabalho anterior⁶⁸.

Posteriormente, dois novos experimentos em tipos celulares diferentes, hepatócitos de ratos⁶⁹ e eritrócitos⁷⁰, preocuparam-se em avaliar o comportamento do HT extra e intracelular. Observaram dois sítios de ligação na membrana plasmática de hepatócitos para T₄, T₃ e rT₃ e que altas concentrações de T₃ eram necessárias para deslocar os ligantes T₄ ou rT₃ radiomarcados, sugerindo que T₃ ligara-se nos dois sítios, de T₄ e rT₃, embora com menor afinidade⁷⁰.

Em trabalho desenvolvido por Yamauchi et al. em 1989 foram avaliados os mecanismos de influxo de T₃ em eritrócitos humanos pelo método de purificação de proteínas, resultando na detecção de dois sítios de ligação. Um deles demonstrou ser saturável, estereoespecífico (T₃>T₄>D₃) e dependente de energia. Por outro lado, o segundo sítio não foi deslocado por T₃ não-marcado e atuou de maneira independente de energia, contabilizando 83% do total do influxo. Contudo os autores não identificaram transporte por difusão passiva⁷¹.

Diante destas evidências, ensaios de ligação de T₃ realizados em membranas plasmáticas de eritrócitos de ratos – células *ghost* – e em vesículas periféricas purificadas evidenciaram a presença de sítios de ligação de alta afinidade e estereoespecificidade, que foi inibido pelo L-triptofano, mas não foi inibido pela leucina, sugerindo um sistema de transporte tipo T. Esta mesma

afinidade foi também ratificada nas vesículas, indicando tratar-se de proteínas integrais de membrana. Quando comparados aos eritrócitos humanos foi demonstrada uma atividade de transporte pelo sistema T menos evidente. O viés foi determinado pela identificação de sítios de ligação de alta afinidade em eritrócitos humanos inibidos pelo tripotofano, que não foram detectados pelos métodos utilizados neste trabalho⁷².

Blondeau et al em 1988 entrevistam o processo de internalização de T_3 como medida para ação das desidases em cultura primária de hepatócitos de ratos. Evidenciaram que a entrada de T_3 neste tipo celular compreendia exclusivamente processos mediados por carreadores, com características de cinética de saturação e de estereoespecificidade. Processos estes que agiram primeiro como um “filtro” para posterior entrada seletiva para atividade de desidases⁷³.

Diferentemente do que foi destacado nos trabalhos anteriormente citados, em que as células selecionadas para os ensaios foram eritrócitos, a dependência de energia para o transporte em outros tecidos durante algum tempo apresentou resultados conflitantes. Transporte de T_4 mostrou-se ora dependente⁷⁴ e ora não dependente de energia⁷³. O transporte de T_4 foi bastante afetado por leves diminuições na concentração de ATP, contudo a diminuição de fonte de energia provocou menor efeito sobre o transporte de T_3 ^{75,76}. Estudos de perfusão em fígado intatos de ratos, e também de humanos, mostraram que quando o ATP hepático foi diminuído, após administração de frutose, a entrada de HT no fígado foi também reduzida, evidenciando a necessidade de energia na interiorização do hormônio⁷⁷, determinando mais uma vez a dependência de energia.

Estudos usando anticorpos monoclonais contra possíveis carreadores de proteínas demonstraram que processos de difusão não contribuíam para o processo de influxo no fígado de ratos e humano^{13,78}.

Diante das características estruturais do hormônio e a inibição do transporte de HT por compostos estruturalmente relacionados, como a amiodarona, aminoácidos aromáticos, benzodiazepínicos e agentes de contraste contendo iodo, novas pesquisas passaram então a direcionarem-se para a capacidade individual dos possíveis sistemas de transporte identificados^{79,80,81}.

Em experimentos realizados em hepatócitos de ratos foi demonstrado que T_4 e T_3 foram transportados por diferentes vias, embora eles pudessem inibir entre si a atividade de translocação através da membrana plasmática⁷⁶. Todavia, evidências

em humanos relatam maior especificidade no sistema de transporte⁸². Em contraste, Everts et al em 1994 reportaram que em pituitária de ratos T_4 e T_3 foram transportados pelo mesmo sítio⁸³.

Entretanto, atualmente há consideráveis evidências que sistemas de transporte especializados, presumivelmente proteínas de membrana, medeiam o transporte de HT através da membrana plasmática em vários tipos de células. Segundo Samson et al. (1993), o transporte de T_3 através da membrana de eritrócitos, assim como em outras células (hepatócitos e astrócitos) é saturável, estereoespecífico e inibido por alguns reagentes como em outras células (hepatócitos e astrócitos) e está intimamente relacionado ao sistema de transporte de aminoácidos aromáticos, o sistema tipo T. A demonstração, em ratos, da alta capacidade de transporte de T_3 pelos eritrócitos parece ser devido a maiores quantidades de proteínas de transporte na membrana destas células. Para confirmação desta afirmativa foi proposta uma avaliação fracionada das membranas de eritrócitos. Estas frações foram marcadas com $^{125}\text{I}-T_3$ e, em seguida, avaliadas por autoradiografia do gel de poliacrilamida-SDS, determinando que uma proteína de 45 kDa (p45) seria a responsável pela ligação de alta afinidade ao T_3 , inibida pela presença do triptofano, na membrana de eritrócitos de ratos. Entretanto, neste trabalho, a p45 não foi formalmente identificada como proteína transportadora de T_3 ⁸⁴.

Yan e Hinkle (1993) utilizando como alvo o papel fisiológico de HT na glândula pituitária anterior consideraram o estudo deste tecido para a compreensão do mecanismo de transporte do hormônio. Os resultados obtidos forneceram fortes comprovações de que o transporte de HT em células da pituitária (GH4C1) foi, em parte, mediado por carreadores. Cerca de 70% de transporte de T_3 foi saturável e que entre T_3 e T_4 , o primeiro foi mais eficiente competidor, indicando o compartilhamento pelos HT da mesma via de transporte nestas células. Estas características contrastam com vários outros experimentos em timócitos onde o sistema de transporte envolvia mecanismos com alta afinidade e especificidade para T_3 , mas não reconheciam T_4 . Em ensaios de competição notou-se que o transporte de T_3 foi inibido pela leucina, fenilalanina e cisteínas, indicando que sistema tipo L participaria do transporte de T_3 . Para melhor afirmação deste resultado encontrado, os autores utilizaram um potente inibidor do sistema L, o ácido β -2-aminobiciclo-

(2,2,1)-heptano-2-carboxílico (BCH). Nesta situação, o tratamento com BCH inibiu o transporte de T_3 . Entretanto, o influxo pelo sistema L parece não ser o único a participar do transporte de T_3 em células pituitária. Múltiplos sistemas transportadores parecem estar envolvidos no influxo, como observado em muitos outros aminoácidos⁸⁵.

Relacionado ainda ao sistema de transporte anterior, pesquisadores indicaram que o sistema L tipo 1 (LAT1) e tipo 2 (LAT2) em cultura de células é inibido por HT e melfalan, indicando que os sítios de ligação parecem apresentar-se como uma grande “bolsa” flexível que podem acomodar substratos com volumosas cadeias laterais⁸⁶.

Experimento em trutas confirmou que T_4 e T_3 entram rapidamente em células vermelhas do sangue desta espécie em dois possíveis sistemas de transporte, saturável e não saturável. O índice de influxo de T_3 foi consideravelmente maior que T_4 e algumas características deste processo, como os perfis em resposta a alguns análogos e inibidores testados, podem ser implicadas em sistemas de transporte separados para T_3 e T_4 . A ação de inibidores de transporte de membrana, como a floretina, sugere que endocitose mediada por receptores contribui para o influxo de T_3 em eritrócitos de truta, como também proposto em hepatócitos de mamíferos e trutas. Os pesquisadores postularam que se endocitose estivesse realmente envolvida com influxo do hormônio, o processo poderia ser interrompido por deficiência energética. Surpreendentemente, influxo de T_3 não foi influenciado, mas o mecanismo de endocitose não pode ser excluído completamente. O influxo de T_3 também foi inibido pelo triptofano e fenilalanina, embora de maneira menos evidente, sugerindo um sistema de transporte de aminoácidos do tipo T⁸⁷.

Um dos poucos trabalhos determinando taxas de efluxo celular de HT, foi desenvolvido em 1996 por Ribeiro et al. Os autores investigaram o transporte de HT em células diferenciadas de hepatoma de ratos (HTC) e no mesmo tipo celular com resistência induzida à permeabilidade de ésteres de ácidos biliares (HCT-R). Estas últimas têm como característica possuírem aumento na capacidade em exportar ácidos biliares e superexpressarem várias proteínas de membrana plasmática, entre elas membros da família ABC/mdr. Foi observado que no influxo em 5 minutos de T_3 as células HTC-R apresentaram menor velocidade quando comparadas às células HTC e o acúmulo foi diminuído em HTC-R, sugerindo um aumento no efluxo.

Observaram, então, uma curva de efluxo com aspecto bi-exponencial, mostrando um rápido componente inicial e um componente lento terminal, podendo ser descrito por dois modelos: um compartimento menor, de troca rápida, podendo representar ligação à membrana plasmática, e um maior, compartimento de troca mais lento, representando a presença intracelular. Pré-incubação com T_3 e T_4 ($10^{-4}M$) foi suficiente para produzir um aumento intracelular dos hormônios em HTC-R de 30 a 70 mil vezes. Ensaio de competição evidenciaram a saída de T_3 e T_4 pelo mesmo sistema de transporte. Ponderaram a importância da temperatura sobre o mecanismo de extrusão, onde em tratamento com T_3 a $4^{\circ}C$ foi consideravelmente diminuído. A associação do verapamil não alterou o efluxo de T_3 em HTC, mas foi inibido de maneira dose-dependente em HTC-R, possivelmente mediado por ABC/mdr. Deste modo, proteínas transportadoras podem, assim como para o influxo, mediar a manutenção de HT no meio intracelular favorecendo sua ação biológica no núcleo⁸⁸.

Experimento realizado utilizando-se do sistema de expressão de proteínas transportadoras de iodotironinas de fígado de ratos em oócitos de *Xenopus laevis* explorou os mecanismos de transporte de HT. Foi observado um aumento no influxo de T_3 , T_4 e seus derivados (sulfamato e sulfato) em oócitos após injeção do mRNA de polipeptídeos co-transportadores de taurocolato dependente de sódio (NCTP) - proteína responsável pelo transporte de ácidos biliares que é expressa em hepatócitos - e de polipeptídeos co-transportadores de ânions orgânicos independente de sódio 1 (OATP1) - proteína transportadora multi-específica que é expressa no fígado, rim e cérebro de ratos - quando comparados ao influxo endógeno de iodotironinas por oócitos não alterados. Também neste experimento o influxo foi competitivamente inibido por T_4 e T_3 , sugerindo o envolvimento de transportadores comuns⁶⁴. Indicando, desta maneira, a importante atividade de NCTP e OATP1 no influxo de intermediários do metabolismo de HT⁶¹.

Em sequência, devido às identificações das pesquisas anteriores, onde o transporte de HT foi inibido por uma variedade de substâncias, entre elas aminoácidos (especialmente o triptofano), bilirrubina, conjugados de bilirrubina e várias outras drogas, Ritchie et al. (1999) propuseram nova avaliação na eficiência dos membros da família de aminoácidos permeases (LAT1, IU12/ASUR4) como proteínas transportadoras. Os autores mostraram que essas proteínas são ativas no

transporte de aminoácidos tendo características funcionais do sistema L somente quando expressas a cadeia pesada da glicoproteína 4F2 (4F2hc)⁸⁹. Utilizando-se da mesma metodologia de anteriormente citada, Friesema et al. (1999) co-expressaram IU12 e 4F2hc em oócitos de *Xenopus laevis*. Revelaram, assim que a superexpressão destas proteínas transportadoras de membrana permitiam passagem de HT (T₃ e T₄), identificando uma rota adicional neste sistema de transporte transmembrana⁹⁰. Experimentos de influxo com T₃ e triptofano evidenciaram uma inibição mútua. Os autores sugeriram, então, que o gene IU12, regulado por HT, durante o desenvolvimento de anfíbios poderia providenciar um possível mecanismo pelo qual o hormônio regularia sua própria ação e metabolismo por modulação na entrada na célula⁸⁹.

Após validação dos experimentos identificando a evidência de que 4F2hc participa efetivamente do transporte de HT em oócitos de *Xenopus laevis*, foram desenvolvidos experimentos com outras combinações heterodiméricas na mesma metodologia, consistindo de 4F2hc e LAT1, y⁺LAT1 ou y⁺LAT2 humanos e LAT2 de camundongo. Notaram que apesar do influxo de iodotironinas (T₄, T₃, rT₃ e 3,3'-T₂) não ter sido afetado pela expressão de 4F2hc com moléculas de cadeia leve, y⁺LAT1 e y⁺LAT2, a co-expressão com LAT1 resultou em acentuado aumento no influxo de leucina, fenilalanina, tirosina e triptofano (ligantes do sistema tipo L) e das diferentes tironinas (T₄>rT₃~T₃>3,3'-T₂) e a co-expressão com LAT2 evidenciou um pequeno aumento no influxo de iodotironinas, exceto a entrada de leucina que foi marcadamente aumentada. Expressão de 4F2hc ou LAT1 de forma independente não induziu ao transporte destes aminoácidos ou HT. Além disso, a presença de leucina extracelular induz a pequenos aumentos na liberação de 3,3-T₂ ou T₃ dos oócitos, sugerindo que estes podem participar de ligações fortes em sítios intracelulares⁹⁰.

Outro grupo caracterizou e identificou a distribuição tecidual de dois transportadores da família OATP, subtipos 2 e 3, isolados da retina de ratos. A expressão destas em oócitos de *Xenopus laevis* confirmou que OATP2 e OATP3 facilitaram o influxo de T₄ e T₃. Por análise de *Northern blot* foi identificado, ainda, mRNA de OATP2 no cérebro e fígado, e OATP3 também no rim⁹¹.

Embora haja identificação de proteínas de transporte que evidentemente relacionem-se à passagem de HT pela membrana celular, estas moléculas muitas vezes apresentam respostas e são distribuídas diferentemente em células de ratos

e humanos. Um estudo revelou que várias moléculas estariam envolvidas no transporte de HT em humanos. Desta forma, LST-1 expressa exclusivamente no fígado transporta T_4 e T_3 . OATP-E, expressa em tecidos periféricos, inibe competitivamente o influxo de $^{125}\text{I}-T_3$ ocasionado por T_3 , T_4 e taurocolato⁹².

A importância de transportadores de HT foi suscitada para o desenvolvimento do feto, de maneira que poderiam agir diretamente nos tecidos placentários modificando seu metabolismo, diferenciação e desenvolvimento. Há evidências que HT materno pode cruzar a placenta humana, mediado por transportadores, e agir modulando o desenvolvimento fetal antes da produção própria de HT pelo feto⁹³. A OATP-E foi indicada como relevante ao transporte de HT materno para o feto nas primeiras 12 semanas de gestação quando a glândula tireóide do feto torna-se ativa e foi detectada nos microvilosidades da membrana nos sinciotrofoblastos, no lado apical. Sua distribuição assimétrica, apical maior que basal, sugere o papel funcional no transporte de HT do sangue materno para o feto⁹⁴.

Ainda na família das OATP, Suzuki et al. (2003) isolaram, do mesmo modo, em células dos testículos, duas OATP de rato e uma de humanos hábeis em transportar T_3 e T_4 . Anteriormente, os testículos eram considerados órgãos não responsivos ao HT, devido a seu baixo consumo de oxigênio em resposta ao HT e à identificação de poucos sítios de ligação ao hormônio em ratos adultos. Entretanto, investigações revelaram que HT regula a maturação e o crescimento dos testículos, afetando especialmente as células de Sertoli e espermatogênese em ratos no período da que antecede a puberdade⁹⁵. E, em outra pesquisa, foi observado que a OATP-F encontrava-se predominantemente expressa em várias regiões cerebrais e em células de Leydig, nos testículos, e mediava preferencialmente o transporte de T_4 e rT_3 de forma independente de sódio. O T_3 e outros substratos típicos da família das OATP foram poucos ou até não transportados. Contudo, não foi observado estereoespecificidade no transporte de HT por OATP-F, mas pareceu requisitar a presença de 3'5'-iodinação dos substratos. Quando comparado às outras proteínas transportadoras até então identificadas, OATP-F tem 10 a 100 vezes mais afinidade para T_4 ⁹⁶.

A OATP14, expressa nos capilares cerebrais e plexo coróide, também pode atuar no transporte de HT. Foi demonstrado que há mediação, por esta proteína transportadora, do influxo de T_3 , T_4 e rT_3 tanto quanto de E_2 17 β G. Ensaio de

transfecção de cDNA de OATP14 em células HEK293 resultaram em acentuado aumento no influxo de T_4 e rT_3 . Contudo, foi demonstrado um viés neste experimento, células transfectadas apenas com o vetor exibiram aumento no influxo de T_3 . Os autores sugerem a presença de outro sistema de transporte específico para T_3 ou difusão passiva. Evidenciaram, além disso, que OATP14 pode ser responsável pelo transporte bidirecional de T_4 , uma vez que o efluxo também foi observado⁹⁷.

Outras proteínas da família das OATP com possíveis relações ao transporte de HT foram descritas. Entre elas, a OATP1A2, glicoproteína de 60 a 85 kDa, expressa nas células endoteliais da barreira hematoencefálica, rim, colangiócitos, pulmão e testículos; OATP1B1, glicoproteína de 84 kDa, expressa no fígado humano; OATP1B3, glicoproteína de 120 kDa, expressa no fígado humano e em células cancerosas do trato gastrointestinal; OATP1C1, proteína de 712 aminoácidos expressa em células endoteliais da barreira hematoencefálica e células de Leydig; OATP3A1, proteína de 710 aminoácidos, expressa em células germinativas testiculares, células epiteliais do plexo coróide e células de Sertoli; OATP4A1, proteína de 722 aminoácidos, expressa no rim, cérebro, coração, placenta, pulmão, fígado, músculo esquelético e pâncreas e OATP4C1, proteína de 724 aminoácidos expressa em rim humano. OATP1A2, OATP1B1 e OATP1B3 foram expressas em oócitos de *Xenopus laevis*. Houve a identificação de um mecanismo de transporte de T_3 e T_4 por OATP1A2, -1B3 e rT_3 por OATP1A2. Sugeriram que a primeira poderia desempenhar uma função biológica no transporte, principalmente de T_4 , no rim e cérebro, assumindo uma alternativa na remoção de HT de tecidos periféricos para eventual eliminação pelo fígado. A segunda parece ser responsável pelo influxo de T_4 para o parênquima e liberação de T_3 para o plasma e a terceira poderia estar também vinculada ao efluxo de T_4 no fígado. A expressão de OATP1C1 em células CHO mostrou evidente influxo de T_4 (90,4 nM), T_3 e rT_3 (127,7 nM) e em experimentos de inibição o influxo de T_4 foi inibido por LT_4 e DT_4 , mas não foi por T_2 . Sua expressão em células HEK293 evidenciou efluxo de T_4 . Expressão de OATP3A1 em CHO fez com que houvesse transporte de T_4 , podendo estar envolvida no transporte de HT para o cérebro. A expressão de OATP4A1 em óocitos e HEK293 permite o influxo, mas não o efluxo de T_4 , T_3 e rT_3 ,

onde a concentração de T_3 é de $0,9 \mu\text{M}$ e pode ser responsável pelo transporte de HT do sangue materno, pela placenta, para o feto⁹⁸.

A OATP1C1 está envolvida igualmente no transporte de $T_4\text{S}$. Sua localização em capilares cerebrais em ratos e camundongos pode indicar que esta proteína talvez tenha um papel no influxo e efluxo de iodotironinas sulfatadas através da barreira hematoencefálica, e durante o desenvolvimento embrionário $T_4\text{S}$ poderia servir como fonte de T_4 para o cérebro. Os experimentos evidenciaram que células COS transfectadas elevaram, embora de maneira não significativa, o influxo de $^{125}\text{I}-T_4$, $^{125}\text{I}-T_4\text{S}$ e $^{125}\text{I}-rT_3$, ainda que a entrada mantivesse-se inalterada de $^{125}\text{I}-T_3$ e $^{125}\text{I}-T_3\text{S}$. O transporte de $^{125}\text{I}-T_4$ e $^{125}\text{I}-T_4\text{S}$ foi saturável. Quando estas células foram transfectadas apenas com D2 ou D3 levaram a uma branda conversão de T_4 , entretanto a co-transfecção de desidases com OATP1C1 aumentou o metabolismo. O metabolismo de $T_4\text{S}$ aumentou em torno de 10 vezes quando co-transfectadas D1 e OATP1C1, sugerindo que o transportador necessariamente aumenta a viabilidade intracelular das iodotironinas⁹⁹.

Para avaliar de maneira mais adequada aos processos *in vivo*, experimentos foram realizados em células HepG2, que já havia mostrado conter algumas das enzimas metabólicas específicas do fígado e, portanto, modelo de células hepáticas humanas. Em estudos de metabolização não foi observado atividade de desidases em T_3 nestas células possivelmente devido a um deficiente processo de sulfatação do hormônio, necessário ao processo de metabolização. Contudo, foi mostrado que o influxo de T_3 e rT_3 estabilizou-se em 30 minutos. Altas concentrações de T_3 não marcado evidenciaram um sistema saturável e mediado por carreadores, indicando a presença de pontos positivos e negativos para utilização destas células como modelo para estudo de transporte de HT¹⁰⁰.

Alguns aspectos discrepantes entre experimentos ainda permanecem. Em virtude disso, um grupo de pesquisadores tentou esclarecer algumas destas questões usando dois diferentes, mas complementares, sistemas experimentais: ensaios em oócitos de *Xenopus laevis* e em cultura celular de mamíferos (células BeWo). Entre os transportadores reconhecidos até então foi selecionado o sistema L. A superexpressão do Sistema L (subunidades 4F2hc e IU12) em oócitos de *Xenopus laevis* aumentou o influxo e a evidência nuclear de HT, uma vez que a co-expressão de TR e RXR facilitou o ativação transcricional por TR. Em células BeWo

foi, também, constatado o influxo de HT e o bloqueio do sistema L inibiu a regulação transcricional por TR, e a submissão de tratamento com aminoácidos extracelulares mostrou que estes influenciaram na concentração intracelular de HT em células BeWo⁶⁴.

Após sucessivas apresentações na dinâmica da entrada de HT nas células e em decorrência do conhecimento prévio do metabolismo de ação intracelular dos hormônios, alguns estudos foram direcionados à melhor compreensão do seu processo de extrusão das células. Em cultura de hepatócitos de ratos tratada com ¹²⁵I-T₄ e ¹²⁵I-T₃ detectou-se um sistema de efluxo independente de ATP em torno de 7 a 8 minutos¹⁰¹. Em outro ensaio, quando a estas células foi acrescentado 5μM de T₃, observou-se uma inibição de aproximadamente 40%. Em eritrócitos de ratos foram evidenciadas as mesmas conclusões¹⁰².

Em análise de influxo em células FRTL-5 - células de tumor de tireóide de ratos consideradas menos permissivas ao transporte de drogas que HTC e em nível intermediário quando comparadas a HTC-R - transfectadas com o gene de resistência a várias drogas tipo 1 (mdr1), usando como controle células NHI-3T3 transfectadas e não transfectadas com mdr1, foi observado que o influxo em 5 minutos foi maior em células FRTL-5 do que nas células controle. Experimentos com a utilização do verapamil evidenciaram uma inibição do efluxo de T₃ de 72, 79 e 88% em FRTL-5, NHI-3T3/mdr1 e NHI-3T3, respectivamente. Também foi constatado que FRTL-5 exportou rapidamente T₃, sendo que apenas 8% do acumulado permaneceu nas células após 60 minutos. Inferiram, assim, que o efluxo é um processo saturável e verapamil-sensível nestas células¹⁰³. Foi também observado que o efluxo de T₃ varia consideravelmente entre os diversos tecidos, e que o transportador responsável pela entrada de T₃ é diferente do envolvido na sua saída, uma vez que o Triac inibiu a captação de T₃ sem interferir com a sua saída¹⁰⁴.

Novas investigações avaliaram o efeito do verapamil, probenecid e indometacina, substâncias que interagem com a glicoproteína-P (P-gp), polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos (OATP) e proteína resistente a várias drogas tipo 1 (mrp1), respectivamente, na transferência do T₄ do fluido cerebrospinal (CSF) para o plexo coróide (CP) e cérebro. A P-gp é uma proteína de membrana plasmática de 170 kDa, caracterizada como uma bomba de efluxo

dependente de energia, pertencente à superfamília de transportadores ATPbinding cassette (ABC), assim como a mrp1. A P-gp e mrp1 são encontradas na barreira hematoencefálica. No plexo coróide a P-gp está localizada na face apical ou subapical e mrp1 aparece no lado basolateral deste tecido. Apesar do que se conhece sobre o transporte de T₄ no CSF, pouco se conhece sobre a transferência do hormônio deste para o cérebro, uma vez que já havia-se demonstrado o influxo de T₄ mediado por carreadores do CSF para o cérebro¹⁰⁵. Pelo método de perfusão ventrículo-cisternal, associado a marcadores ¹⁴C-manitol e azul dextran, *in vivo* e incubação *in vitro* de células do CP isolado de coelhos foi observado que após 2 h, 36,9±4,6% de ¹²⁵I-T₄ foi recuperado na cisterna do CSF. A presença do verapamil aumentou a recuperação de ¹²⁵I-T₄ (51,4±2,8%) em CSF, mas os substratos de mrp1 e OATP não tiveram o mesmo efeito. No plexo coróide houve grande acúmulo de ¹²⁵I-T₄. Verapamil e probenecid aumentaram significativamente a concentração do hormônio marcado, implicando a função de P-gp e OATP, mas não de mrp1. Contraprova foi realizada com o uso de anticorpo C219 anti-Pgp em CP isolado, evidenciando um aumento no acúmulo de 80% de ¹²⁵I-T₄ e ³H-ciclosporina, sugerindo que P-gp é funcional em CP e tem um papel na remoção de T₄. Assim, estes estudos combinados indicam que P-gp pode atuar como um mecanismo homeostático local, mantendo os níveis de T₄ em CSF e que P-gp e OATP contribuem para transferência de ¹²⁵I-T₄ entre o CSF, CP e cérebro regulando, assim, sua viabilidade¹⁰⁵.

Alguns membros da família de monocarboxilatos (MCT) têm sido definidos nas duas últimas décadas como transportadores de HT. São proteínas de 426 a 565 aminoácidos e 12 domínios transmembrana. Os domínios carboxi- e aminoterminal estão localizados no interior da célula. A porção C-terminal parece ser importante para definir a especificidade ao substrato. Contudo, para expressão na membrana plasmática é necessário a requisição de proteínas ancilares (CD147). Sem atuação de CD147 as proteínas acumulam-se no RE ou aparato de Golgi. São, de maneira geral, proteínas transportadoras de lactato, piruvato e corpos cetônicos e identificadas em vários tecidos de várias espécies⁵⁵.

Todavia, o transportador monocarboxilato 8 (MCT8) é considerado ser específico para iodotironinas¹⁰⁶. MCT8 humano foi clonado em 1994, mas sua função, nesta época, não foi elucidada. Trata-se de uma proteína de 613 aminoácidos e 12 domínios transmembrana. A porção aminoterminal é enriquecida

com prolina, ácido glutâmico, serina e treonina (domínio PEST - proteínas que contém esta sequência sofrem, muitas vezes, degradação rápida). É um transportador bastante específico e ativo para transporte de HT⁶¹.

Injeção de mRNA de MCT8 em oócitos de *Xenopus laevis* induziram um aumento de 10 vezes no influxo de iodotironinas e em experimentos com HT marcados radioativamente, em menos de 4 minutos, observou-se a exaustão dos ligantes¹⁰⁶. Foi sugerido que MCT8 seria o principal transportador na entrada de HT nas células hepáticas e cardíacas em humanos⁶⁵.

Dumitrescu et al. em 2004 reportaram, pela primeira vez, as mutações no gene MCT8 localizado no cromossomo X. Neste trabalho os autores depararam-se com duas famílias com a mutação no gene, onde os homens apresentavam concentrações anormais das três iodotironinas circulantes, anormalidades neurológicas, desenvolvimento global atrasado, hipotonia central, quadriplegia espástica, movimentos distônicos, nistagmo rotatório, impedimento no olhar fixo e deficiências auditivas. As mulheres heterozigóticas apresentavam um fenótipo brando e não continham anormalidades neurológicas. Foi, desta forma, estabelecida a importância fisiológica concreta de MCT8 como transportador de HT¹⁰⁷.

Em seguida, identificou-se mais dois pacientes com deleção de gene de 2,4 Kb e 24 Kb e três com mutações *missense* em MCT8 nos sítios Ala150Val, Arg171stop e Leu397Pro¹⁰⁸ e uma mutação *missense* P537L em um paciente de 11 meses com severa hipotonia e desenvolvimento global atrasado¹⁰⁹.

A inativação de MCT8 causada por deleções ou mutações resultou em inadequado fornecimento de T₃ para o neurônio, provocando efeitos danosos na migração, diferenciação e mielinização neuronal, possivelmente causando um fenótipo psicomotor que é observado nos pacientes. Entretanto, não está excluído que MCT8 está envolvido no transporte de outros, ainda não identificados, ligantes que possam contribuir para o fenótipo observado¹¹⁰. Por observações em pacientes com mutações em MCT8 hipotetizou-se que estes transportadores desempenhariam um papel essencial no suprimento de T₃ para neurônios, que são sítio primário para ativação após sua ligação ao receptor nuclear^{111,112}. A ação de T₃ é encerrada pela atividade de D3, também expressa nos neurônios. Entretanto, neurônios não expressam D2, desidase necessária à produção local a partir da conversão de T₄. Para isto, neurônios dependem de astrócitos vizinhos, sugerindo a participação de outros transportadores⁵⁵.

A importância destes transportadores pode ser avaliada em sua atividade no cérebro. Após a liberação das células endoteliais através da barreira hematoencefálica, provavelmente mediado por OATP-14, T_4 é translocado para dentro dos astrócitos, por um transportador desconhecido, e subsequentemente convertido para T_3 pela enzima D2 que está localizada intracelularmente nestas células. Quando liberado dos astrócitos, T_3 entra nos neurônios, processo que pode ser mediado por MCT8. Assim, T_3 passa a exercer sua ação genômica por ligação ao receptor nuclear e, finalmente, é degradado por D3 a T_2 e ambos T_3 e T_2 poderão também ser liberados da célula por intermédio de MCT8^{65,114}.

Conforme anteriormente avaliado para OATP1C1, Friesema et al em 2006 também investigaram o comportamento de células co-transfectadas com MCT8 humano e desidases, além de determinar sua especificidade a ligantes. Em experimentos realizados em oócitos de *Xenopus laevis*, a injeção de mRNA de rMCT8 de ratos facilitou o transporte de HT. O influxo de T_4 foi muito maior quando comparado aos estudos em outros transportadores, especificamente OATP1, NCTP e LAT1. Já células COS e JEG63 transfectadas com MCT8 humano mostraram altos níveis de influxo de T_4 e T_3 , contudo r T_3 e T_2 pareceram não ser estimulados. Ensaio de co-transfecção com desidases demonstraram um aumento no metabolismo, apesar do aumento no influxo ter sido módico ($T_3 > T_4 > rT_3 > 3,3'-T_2$). Assim, como em OATP1C1 a desidatação das diferentes iodotironinas por D1 e D2 é fortemente facilitada por MCT8, indicando que, necessariamente, MCT8 aumenta a viabilidade intracelular destes substratos¹¹⁵.

Pacientes com mutações em MCT8 exibem níveis séricos com TSH normais, T_3 elevado e T_4 baixo. Estes pacientes não se beneficiam de terapia de reposição de T_3 e/ou T_4 porque os sintomas são causados por suprimento insuficiente de HT neuronal durante o desenvolvimento fetal¹¹⁶. Ratos KO, que mimetizam o estado humano, não têm sintomas neurológicos, mas possuem o mesmo parâmetro sorológico. Todavia, muitas vezes o influxo de T_3 nos neurônios de ratos foi parcialmente impedido em áreas específicas, indicando a existência de outros transportadores⁶⁵. Altos níveis de mRNA de MCT8 foram detectados no plexo coróide dos ventrículos laterais, no terceiro e quarto. Estudos em camundongos Pax8^{-/-}, modelo animal ideal para hipotireoidismo congênito, já que eles nascem sem a glândula tireóide funcional, mostraram que em controle Pax8^{-/-} a expressão de mRNA de D2 no cérebro é regulada positivamente e que é melhor caracterizado

no córtex cerebral. Esta alta expressão de D2 é discutida como mecanismo compensatório para preservar as concentrações de T_3 no cérebro. O influxo de T_3 não foi compensado pelas alterações nos níveis transcricionais de MCT8. Em geral, a expressão de MCT8 evidencia seu papel decisivo no transporte de T_3 dentro dos neurônios. Esta noção é muitas vezes baseada no fato de que os neurônios apresentam como alvo de ação apenas o T_3 , mas que é um sítio de metabolismo do hormônio já que contém D3¹¹⁴.

Mensurações em ensaios de efluxo de T_4 e T_3 evidenciaram rápida liberação celular de HT em células expressando MCT8 humano e células co-transfectadas com MCT8 e μ -cristalina, uma proteína de ligação intracelular com alta afinidade por iodotironinas, visando aumentar a capacidade de ligação intracelular de HT, mostraram que o efluxo de T_4 e T_3 diminuiu significativamente⁶⁵.

Transportador do aminoácido do tipo T1 (TAT1), também conhecido como MCT10 por ser um membro da família dos transportadores de monocarboxilatos, exibiu envolvimento no transporte de HT^{111,112,117}. O gene MCT10 está localizado no cromossomo 6, sendo que a estrutura deste gene é semelhante a do gene de MCT8 do cromossomo X, ambos consistem de 6 exons e 5 íntrons. A MCT10 é uma proteína de 515 aminoácidos com 12 domínios transmembrana, seu mRNA foi detectado no trato gastrointestinal, fígado, rim, músculo esquelético, placenta e, em menor expressão, no cérebro. Ensaios de transporte em células COS1 transfectadas com MCT10 mostraram que há entrada e saída de HT, mas quando comparado com MCT8, MCT10 é mais efetivo para T_3 que para T_4 . A MCT10 transporta, ainda, aminoácidos aromáticos, comportamento também diferente de MCT8, a qual atua de forma eficiente no efluxo de fenilalanina” Foi demonstrado 50% de inibição no influxo de T_3 em MCT10 na presença de 1mM de triptofano, indicando competição entre eles. Por outro lado, não foi encontrado efeito do triptofano no efluxo de T_3 . Estudo indica que o transportador MCT10 facilita a entrada de T_4 , e particularmente T_3 , favorecendo acesso a processos intracelulares¹¹⁸.

Sistemas celulares de transporte de HT poderiam também estar implicados em ações não genômicas do hormônio. Foi identificada a existência de um receptor de superfície celular para HT, que estaria interligado por uma ou mais vias de transdução de sinais seguido a eventos nucleares, com promoção de alterações

locais na função da membrana celular. A integrina $\alpha V\beta 3A$, proteína heterodimérica estrutural de membrana celular, responsável pela transdução de sinais da matriz extracelular (MEC) para a célula e vice-versa é descrita como um sítio receptor para HT. Os autores mostraram que T_4 induz a interação das integrinas com laminina, proteína da MEC. Experimentos realizados com integrinas purificadas demonstram que estas se ligam a HT radiomarcado de maneira dissociável e com alta afinidade e ensaios com células CV-1 utilizando-se de RNA de interferência contra os genes que codificam αV e $\beta 3$ ou ambas previnem a ativação de MAPK pelo HT. Existem, assim, interfaces entre as ações iniciadas na membrana por HT e eventos nucleares, já que experimentos com T_4 , agindo na superfície celular, poderiam participar do processo de ativação de TR, induzindo um estado de transcrição basal do receptor¹¹⁹.

Em conclusão, a atividade biológica de HT em células alvo é determinada pela concentração intracelular de T_3 ⁵⁵, e esta depende de um número de fatores, incluindo os níveis de circulação de T_3 e seu precursor T_4 , a atividade das desidases e a presença de transportadores na membrana plasmática, facilitando o influxo e efluxo celular de HT. Diante destas informações, e da caracterização no desenvolvimento de enfermidades a partir de mutações em MCT8, algumas condições patológicas têm sido alvo de estudos para averiguação do comportamento destes hormônios na manutenção da atividade metabólica corporal.

Ratos com hipertireoidismo e hipotireoidismo mostraram níveis de expressão alterados de OATP14 em capilares cerebrais. Proteínas e mRNA encontravam-se regulados positivamente em ratos hipotireoideos e negativamente em hipertireoideos. Concluindo-se, desta forma, que sua regulação é dependente do *status* da tireóide associado às alterações na circulação nos níveis de T_4 ⁹⁷.

O ácido graxo translocase (FAT), uma proteína integral de membrana de 88 kDa, é expresso abundantemente no tecido adiposo, músculo esquelético e coração. Ensaio em cardiomiócitos de ratos permitem a entrada de T_3 e outras iodotironinas ($T_4 \rightleftharpoons T_3 > 3,3' - T_2 > T_3 S$). O influxo de T_3 foi quase duas vezes maior quando comparado a outros transportadores NCTP e OATP1 de ratos e LAT humana, entretanto o efluxo não foi alterado por FAT¹²⁰.

A diminuição do influxo de T_4 no fígado de doentes não tireoideos e em desnutrição explicam a redução periférica de T_3 , sob estas condições. Esta

regulação negativa pode ser em decorrência do aumento na concentração de inibidores no transporte de T_4 presentes na circulação, ou da redução da energia celular que é requerida para o transporte de T_4 ou, ainda, em virtude da redução na expressão de transportadores essenciais⁶⁶. Trabalho utilizando método de perfusão em fígado de rato observou que o influxo de T_3 foi inibido em 40% após dois dias de jejum. Este transporte foi normalizado com a administração de insulina, cortisol e glicose. Este pequeno período de tempo sugere que restauração da fonte de energia foi a responsável pela normalização¹²⁷. Semelhante ao que aconteceu *in vitro*, processos de perfusão mostram que T_4 e T_3 são transportados para o interior do fígado por diferentes sistemas. Quando ratos foram tratados com amiodarona foi inibido o influxo de T_4 , mas não o de T_3 . Perfusão em fígado de ratos hipotireoideos evidenciou que o influxo de T_3 não foi diferente do fígado de ratos normais, mas houve diminuição do metabolismo. Já perfusão em fígado de ratos hipertireoideos diminuiu o influxo de T_3 associado ao metabolismo aumentado¹²¹. Estes dados apontam para um mecanismo adaptativo celular para manutenção de tecidos eutireoideos quando a suplementação de T_3 está alterada⁷⁷.

Estudos cinéticos de HT realizados em uma mulher hipotireoidea de 60 anos em reposição de T_4 demonstraram uma diminuição na razão de equilíbrio T_3/T_4 quando comparada ao controle normal, também com reposição de T_4 , indicando uma diminuição no transporte de T_4 no fígado, podendo manter-se normal em outros tecidos. Como a cinética de transporte de T_3 não foi alterada, a inibição do transporte de T_4 dentro do fígado poderia levar a um T_3 baixo ou normal e um elevado T_4 , resultando na diminuição da razão T_3/T_4 ¹²². As bases para este estudo foram anteriormente reportadas¹²³. Descobertas similares foram observadas em um garoto de oito anos o qual possuía, adicionalmente, um elevado índice de TBG no soro, que diminuiu após tratamento com pequenas doses de T_3 . Como TBG é sintetizada no fígado e elevada no soro em hipotireoidismo, estas observações indicam a importância do processo de transporte de T_4 no fígado possivelmente regulando a atividade biológica de HT nos tecidos¹²⁴.

Em pacientes obesos, sujeitos a uma dieta restrita em calorias, foi observado inibição no influxo de T_4 e T_3 em alguns tecidos. TSH no soro destes pacientes é, geralmente, normal na restrição calórica a despeito dos baixos índices de T_3 e algumas vezes baixa concentração T_4 . Segundo os autores seria inapropriado, nesta situação, um aumento no TSH, como se poderia esperar, visto que isto

poderia resultar em secreção aumentada de T_4 pela tireóide aumentando a síntese de T_3 pelo fígado que por sua vez neutralizaria a suposta benéfica queda na produção de T_3 ¹²⁵.

Ácidos graxos esterificados, bilirrubina, indoxil sulfato e ácido graxo (furano), em pacientes renais mostram inibição no influxo de T_4 em células hepáticas^{79,126}.

Em pacientes depressivos a V_{max} no transporte de HT está significativamente diminuída em relação a indivíduos normais¹²⁷. O influxo de T_3 está aumentado em eritrócitos de pacientes não tratados com posterior normalização em relação ao grupo controle após um mês de tratamento com fluvoxamina e conseqüente remissão clínica. Portanto, a patogênese da depressão poderá estar associada a distúrbios no eixo HPT e neurotransmissão da serotonina^{128,129}.

Em 1997 Kemp e Taylor identificaram dois sistemas de transporte, o resistente (T) e o sensível (L), em vesículas de membrana sinusoidal de ratos eutireoideos, hipotireoideos (tratados com PTU) e hipertireoideos (injetados com T_3). Os autores demonstraram que $^{125}\text{I}-T_3$ associa-se à superfície das vesículas. O influxo de triptofano e T_3 não foi alterado pelo *status* tireóideo e, ainda, T_3 e T_4 inibiram o influxo de triptofano pelo sistema de transporte tipo T e foram dependentes do *status* tireoideo (hipertireoideos > eutireoideos > hipotireoideos)¹²⁹.

Trabalho em ratos tireoidectomizados, com ou sem reposição de L- T_4 , mostrou diferenças no influxo de T_3 em hemácias. Hemácias foram preparadas para ensaio de transporte a partir de grupos de ratos tireoidectomizados (hipotireoideos), tireoidectomizados tratados com doses regulares de L- T_4 (eutireoideos), tireoidectomizados tratados com altas doses de L- T_4 (hipertireoideos) e ratos apenas submetidos à cirurgia foram utilizados como controle. O influxo de $^{125}\text{I}-T_3$ foi maior no primeiro grupo, igual no segundo grupo e menor no terceiro, indicando que a cinética em eritrócitos de ratos modificou-se em resposta à falta ou excesso de HT circulantes¹³⁰.

Outro estudo avaliou o transporte de HT em adipócitos de ratos eutireoideos e hipotireoideos induzidos por tratamento com PTU. Revelou-se uma forte interação entre o sistema de transporte L na entrada de HT e triptofano em adipócitos de ratos, evidenciando que foi o maior carreador, de modo geral, de iodotironinas na membrana plasmática de adipócitos. T_4 e rT_3 foram os mais efetivos em inibir o influxo do triptofano que o próprio T_3 . A condição induzida de hipotireoidismo não afetou o transporte de triptofano. Em contraste, ocorreu uma diminuição substancial

no influxo de T_3 (48%) e, em particular, de T_4 (79%) devido à redução parcial na atividade do componente da proteína transportadora que é sensível ao BCH¹³¹. Sugerindo, neste caso e no trabalho anterior de Kemp e Taylor (1997), que no estado hipotireoideo a regulação negativa no transporte da membrana celular tenderá a reduzir catabolismo de T_4 e rT_3 ajudando a conservar o hormônio e iodo para outros tecidos. A sensibilidade em tecidos adiposos para ativação hormonal é geralmente reprimida em hipotireoideo, mas a relativa retenção na capacidade do influxo de T_3 mostrou alguma função para manter a atividade metabólica nos adipócitos. Por fim, a atividade de transporte do sistema L para aminoácidos não é regulada negativamente em hipotireoidismo, mas o é por HT¹³².

Mecanismos de transporte de HT foram avaliados também em pacientes com insuficiência renal crônica que apresentam baixos níveis séricos de T_3 com comportamento eutireoideo. A partir destas características, eritrócitos destes pacientes foram submetidos a experimentos de transporte de HT ($^{125}\text{I}-T_3$ e $^{125}\text{I}-T_4$). Foi observado que houve aumento de 50% em 1 minuto e 55% em 5 minutos no influxo de $^{125}\text{I}-T_3$ nas hemácias dos pacientes antes do tratamento de hemodiálise. Entretanto, o influxo de $^{125}\text{I}-T_4$ foi menor em 1 e 5 minutos (88 e 63%, respectivamente). O remanescente de T_3 foi 80% maior e de T_4 foi 57% menor quando comparado ao indivíduos normais. Sugerindo, desta forma, que mecanismos compensatórios de influxo e efluxo de T_3 neutralizam a disfunção tireoideana nestes pacientes¹³².

Outra consideração que pode ser relevante diz respeito à condição clínica global dos pacientes hipotireoideos e hipertireoideos. Sabidamente, estes pacientes apresentam disfunções em proteínas séricas de transporte - a reposição de TBG é diminuída em hipotireoideos e aumentada em hipertireoideos⁶⁶ - e em lipoproteínas, especialmente a HDL, que são carreadoras de uma pequena fração de HT no plasma e participam do transporte intracelular de T_4 ¹³. Hipotireoidismo induz a alterações qualitativas e quantitativas na distribuição das lipoproteínas e altera a micro-heterogenicidade do colesterol HDL¹³³. Foi documentado que lipoproteínas de baixa densidade (LDL) carregam cerca de 1% de T_4 circulante e facilitam a entrada de T_4 dentro do receptor-LDL em fibroblastos. Os autores especularam que o HT pode ser liberado das células junto ao colesterol, tornando-

se partículas enriquecidas de lipídeos facilitando seu contato com a membrana plasmática e transportadores. Lipoproteínas poderiam funcionar como armadilhas para o hormônio liberado, mantendo o gradiente de dentro para fora das células, uma vez que podem atuar dirigindo o efluxo de HT. Contrariamente ao LDL, possuem efeito oposto a TBG, TTR, HSA e HDL, prevenindo a entrada de T_4 dentro de fibroblastos de maneira dose dependente. HDL facilita ainda a saída de HT de hepatócitos¹³⁴. O efeito de HDL no transporte de HT é comparável à soma da atividade das três proteínas de ligação séricas, isto em condições fisiológicas, em condições de excesso de HDL o efeito poderia ser multiplicador.

Na tentativa de esclarecer melhor a interação de lipoproteínas com o transporte de HT, fibroblastos humanos foram pré-incubados com $^{125}\text{I}-T_4$ e posteriormente mantidos em solução de fluido intersticial com LDL (22 $\mu\text{g}/\text{mL}$). O influxo foi 40% maior nos fibroblastos tratados com fluido intersticial em relação ao controle. Em ensaios de fibroblastos com deprivação (col-) ou enriquecidos (col+) com colesterol foi evidenciado que em col- LDL aumentou o influxo de T_4 citoplasmático e nuclear em 48% e 30%, respectivamente. Em col+, HDL (280 $\mu\text{g}/\text{mL}$) inibiu a entrada de T_4 e T_3 no citoplasma. Em uma situação contrária, fibroblastos col+ foram primeiro incubados HDL e em seguida mantidos com $^{125}\text{I}-T_4$ e $^{125}\text{I}-T_3$, foi mostrado um aumento de 24% e 12%, respectivamente. Em fibroblastos com col- foi 8% ou 0% e fibroblastos controle de 15% ou 4%. Concluindo, o transporte de HT é facilitado por LDL, pela mediação do receptor-LDL ($T_4 \gg T_3$) e HDL facilita a entrada de ($T_4 > T_3$) diretamente para o núcleo. Este efeito do HDL representa difusão facilitada através da membrana celular e o efeito LDL, que requer regulação positiva de receptor-LDL, é menor para o transporte de $^{125}\text{I}-T_3$. Assim, incorre-se no fato de que lipoproteínas tornam-se alvo de HT para o transporte até o núcleo¹³⁵.

1.4. Doenças da Tireóide

A relação inversa e dinâmica entre alterações nos níveis de TSH e T_4 e T_3 séricos, determina uma supressão ou elevação hormonal. Com raras exceções, níveis de TSH normais excluem uma anormalidade primária na função da tireóide. O encontro de níveis de TSH alterados deverá seguir mensurações de HT circulantes para diagnóstico de hipertireoidismo com TSH suprimido, ou hipotireoidismo com

TSH elevado. Usualmente, a mensuração de HT livres corresponde à sua viabilidade biológica. Em geral, avaliação de T_4 livre é suficiente para confirmar tirotoxicose, ainda que de 2 a 5% dos pacientes apresentem variação apenas nos níveis de T_3 (toxicose de T_3)¹.

1.4.1. Hipotireoidismo

Hipotireoidismo é uma síndrome clínica resultante da produção ou ação biológica ineficiente dos HT¹³⁶ promovendo um efeito generalizado de retardo nos processos metabólicos³. As condições clínicas da síndrome dependem do grau e duração da deficiência de HT e, assim, afetará os tecidos em maior ou menor extensão. A manifestação durante a vida intrauterina determina os maiores danos sendo o HT fundamental no desenvolvimento cerebral do feto no primeiro trimestre de gestação¹³⁷.

Pode ser classificado como hipotireoidismo primário, onde há perda de função tireoideana; hipotireoidismo secundário, que tem como causa a origem hipofisária, pela deficiência de TSH; ou hipotireoidismo terciário, manifestado pela deficiência do TRH. Pode ainda, muito raramente, ser decorrente de uma resistência generalizada aos HT provocada por mutação nos receptores nucleares. Pode também ser dividido em congênito (deficiência no desenvolvimento da tireóide, dishormonogênese da tireóide, síndrome de Pendred, mutações no receptor de TSH, resistência ao HT), hipotireoidismo primário (tireoidite autoimune crônica (Hashimoto), pós-radioterapia de pescoço, pós-tireoidectomia e deficiência de iodo) e hipotireoidismo central (efeitos de drogas e doenças não tireoideanas)¹³⁸.

Em pacientes com hipotireoidismo primário, a diminuição na secreção de T_4 e T_3 leva à sua redução no soro, apresentando como consequência um aumento compensatório na secreção de TSH. Assim, a combinação de baixo T_4 e alto TSH confirma o diagnóstico de hipotireoidismo, indicando que pode ser devido à doença tireoideana primária^{3,5}.

A etiologia do hipotireoidismo primário pode manifestar-se como consequência da diminuição na funcionalidade do tecido tireoideano (tireoidite de Hashimoto, sub-agudas, pós-parto, de Riedel, tratamento de hipertireoidismo, agenesia e ectópica tireoideana, radioterapia de cabeça e pescoço, defeitos funcionais na biossíntese e liberação dos HT) ou por disformogênese congênita (grave deficiência de iodo, drogas). No hipotireoidismo secundário pode haver perda

de tecido funcional (tumores, traumas, deficiência vascular, infecções, doenças infiltrativas, hipofisite linfocítica crônica, lesões congênitas) ou por defeitos funcionais na biossíntese e liberação do TSH (mutações nos genes do receptor do TSH, drogas)².

As causas mais comuns de hipotireoidismo, fora a deficiência de iodo, são as doenças autoimune (tireoidite de Hashimoto) e causas iatrogênicas (posterior a tratamento de hipertireoidismo). Processos autoimunes reduzem, gradualmente, a função tireoideana. Inicialmente há uma fase de compensação quando níveis normais de HT são mantidos pela elevação de TSH¹³⁹. Em alguns casos os pacientes podem ter menos sintomas, sendo chamados hipotireoidismo subclínico. Por fim, quando o níveis de T₄ livre encontram-se suprimidos e TSH aumentados tornam os sintomas mais evidentes, usualmente com TSH >10 mU/L, e são identificados como hipotireoidismo clínico¹.

A tireoidite crônica de Hashimoto é provocada pela destruição do tecido tireoideo mediada por reação imune celular e humoral¹⁴⁰. Conforme a extensão da infiltração linfocítica, composta por células T CD4⁺ e CD8⁺ e células B, fibrose e hiperplasia glandular são definidas como forma de gotosa ou atrópica, embora sejam semelhantes quanto à patofisiologia. Células T citotóxicas podem diretamente destruir células tireoideanas e mais de 90% dos pacientes possuem altas concentrações de autoanticorpos para tiroglobulina e tireóide peroxidase¹⁴¹. A susceptibilidade à tireoidite de Hashimoto é determinada por uma combinação de fatores ambientais e genéticos. A ocorrência de preponderância feminina é devido aos efeitos dos esteróides na resposta imune, mas fatores genéticos associados ao cromossomo X são também possíveis¹.

Hipotireoidismo é relativamente comum. Em adultos apresenta prevalência em torno de 2% nas mulheres e 0,2% nos homens. Em indivíduos mais idosos, particularmente com mais de 65 anos, a prevalência estimada é de 6% e 2% em mulheres e homens, respectivamente. A forma primária representa quase 95% dos casos e é muito mais comum (de cinco a oito vezes) em mulheres que em homens^{1,3}.

Tireoidite autoimune crônica é uma doença de mulheres, especialmente as mais velhas. Entretanto, não se sabe se o risco está aumentado, neste grupo, devido à deficiência de estrogênio ou idade. Ela é também a causa mais comum em crianças de um a dois anos de idade. Está associada com vários polimorfismos nos

genes de HLA, receptores antigênicos de células T, e outras moléculas imunomodulatórias, sugerindo o papel da susceptibilidade genética¹⁴¹. Contudo, os riscos são relacionados a associações de dois ou mais fatores como diferença racial e grupos étnicos. Cerca de 20 a 30% de mulheres com tireoidite após o parto demonstram hipotireoidismo transiente e 40 a 50% têm somente a condição transiente. É mais comum em certas populações, como japoneses, provavelmente devido a fatores genéticos e exposição crônica a dieta com altas concentrações de iodo¹.

Entre os fatores associados ao risco aumentado estão a idade acima de 60 anos, gênero feminino, bócio, doença nodular tireoidiana, histórico familiar da doença, histórico de radiografia de cabeça e pescoço, doença auto-imune tireoideana e extratireoideana, drogas (lítio, amiodarona) e tabagismo. Manifesta-se, clinicamente, por pele seca, diminuição da transpiração, epiderme fina e hiperqueratose do estrato córneo, mixedema, constipação, ganho de peso, libido diminuído, fertilidade reduzida, contratilidade do miocárdio e pulso reduzido, levando a forte redução do volume e bradicardia, problemas de memória e concentração³.

As alterações clássicas do hipotireoidismo primário são níveis plasmáticos de TSH elevado e níveis plasmáticos baixos de T_4 e T_3 livres. Inicialmente observa-se apenas elevação do TSH (forma subclínica), em seguida, reduzem-se o T_4 e em uma fase posterior o T_3 . Pode haver, também, uma secreção elevada de T_3 , de modo que em pelo menos 1/3 dos pacientes os níveis de T_3 estão normais. Em hipotireoidismo secundário ou terciário (central) o TSH encontra-se baixo ou normal e T_4 livre baixo.

O tratamento consiste habitualmente na administração de levotiroxina em dose única diária¹.

1.4.2. Hipertireoidismo

Tirotoxicose é definida como um estado clínico onde há excesso de HT e que embora não seja sinônimo de hipertireoidismo, que é o resultado da excessiva função tireoideana, é a maior etiologia da tirotoxicose¹.

Hipertireoidismo primário pode ser identificado como autoimune (doença de Graves, bócio multinodular e nódulo tóxico), tireoidite transiente (pós-parto, linfocítica e pós-viral), efeitos de drogas (ingestão de tiroxina, induzida por iodo,

terapia de amiodarona), mutação em receptor TSH (por ganho de função), tirotóxicose gestacional e tumor pituitária secretando TSH¹³⁸.

Entre as diversas causas de hipertireoidismo, a doença de Graves representa a etiologia mais comum (80% dos casos). Tem origem auto-imune e sua prevalência é incerta, mas estima-se que afete 0,4 a 1% da população. Ocorre em mais de 2% de mulheres e 0,2% em homens. Seu pico de incidência se dá entre as segunda e quarta décadas de vida. Pode estar associada a outras doenças auto-imunes endócrinas e não endócrinas. A doença de Graves representa entre 60 a 80% das tirotóxicoses, mas sua prevalência varia acerca das populações¹⁴². É caracterizada por bócio difuso, tirotóxicose, orbitopatia infiltrativa e ocasionalmente dermatopatia infiltrativa. Em alguns pacientes a doença da tireóide e o fenômeno infiltrativo podem ocorrer sozinhos ou independentes³.

Na doença de Graves o hipertireoidismo ocorre na presença de alguns graus de tireoidite crônica e pode ultimamente ser substituída, em longo termo, por hipofunção tireoidiana. Doença da tireóide autoimune é caracterizada pela ocorrência no soro de anticorpos contra peroxidase tireóide (o antígeno microssomal), Tg e receptores de TSH. É caracterizada por infiltração não homogênea de linfócitos com uma ausência de destruição folicular. Os níveis de TSH no soro estão quase sempre totalmente suprimidos e os níveis de T₄ e T₃ estão mais aumentados que os níveis de T₄ e T₃. T₃ está tipicamente mais elevado que os níveis de T₄³.

Sinais e sintomas incluem perda de peso e fadiga, hiperatividade, irritabilidade, insônia, dificuldade de concentração, tremores, hiper-reflexia, taquicardia, pele quente e úmida, intolerância ao calor, alopecia, tempo de trânsito gastrointestinal diminuído, oftalmopatia, bócio difuso e mixedema pretibial. Em pacientes idosos pode haver astenia intensa, fraqueza muscular e prostração ou depressão grave³.

Cerca de 10 a 20% dos pacientes apresentam remissão espontânea e cerca de 50% tornam-se hipotireoideos após 20 a 30 anos na ausência de qualquer tratamento. Tal fato ocorre, mais provavelmente, devido a uma contínua destruição da tireóide pelo processo auto-imune. Entre os fatores predisponentes são citados os fatores genéticos, ambientais e endógenos.

A doença de Graves é tratada por redução na síntese de HT, usando drogas antitireoideas ou por redução de quantidade de tecido tireoideano com radioiodo

(¹³¹I) ou por tireoidectomia parcial. Fármacos antitireoideanos (tionamidas, como o propiltiouracil, carbimazol, matimazol) são, predominantemente, utilizados na Europa e Japão, e radioterapia na América do Norte¹⁴¹.

A avaliação bioquímica da função tireoideana é refeita entre 3 a 4 semanas após iniciado o tratamento. É realizada titulação baseada nos níveis de T₄ livre. Muitos pacientes não atingem estado eutireoideo dentro de 6 a 8 semanas após o tratamento ter sido iniciado. Os níveis de TSH permanecem muitas vezes suprimidos por vários meses e, portanto, não indicam um índice sensível da resposta ao tratamento³.

O tratamento por radioiodo causa progressiva destruição das células tireoideanas. A dosagem de ¹³¹I varia, geralmente, entre 185 MBq (5 mCi) a 555 MBq (15 mCi). Muitos pacientes progridem para hipotireoidismo em 5 a 10 anos. O risco de hipotireoidismo após tratamento com radioiodo depende da dosagem¹⁴¹.

Em razão da importância de se estabelecer critérios para a dinâmica e possíveis mecanismos no transporte de HT e que a permanência do hormônio no meio intracelular modula seu efeito no núcleo, a proposta deste trabalho é avaliar o influxo e efluxo em hemácias de indivíduos eutireoideos e compará-los a pacientes hipotireoideos e hipertireoideos vislumbrando a compreensão de possíveis alterações do transporte e projeção para o contexto de outros tecidos do organismo.

2. Objetivo

2.1. Objetivo geral

Investigar o transporte, influxo e efluxo, de $^{125}\text{I-T}_3$ e $^{125}\text{I-T}_4$ em hemácias de indivíduos saudáveis e pacientes com hipotireoidismo e hipertireoidismo.

2.2. Objetivos específicos

- Investigar o influxo e efluxo de $^{125}\text{I-T}_3$ e $^{125}\text{I-T}_4$ em hemácias de pacientes hipertireoideos antes e após tratamento, e em hemácias de pacientes hipotireoideos antes do tratamento.
- Investigar o influxo e efluxo de $^{125}\text{I-T}_3$ e $^{125}\text{I-T}_4$ em hemácias de pacientes hipertireoideos, antes e após o tratamento, separados por gênero.

3. Materiais e Métodos

3.1. Reagentes

Os hormônios marcados $^{125}\text{I-T}_3$ (3390 Ci/mmol) e $^{125}\text{I-T}_4$ (1250 Ci/mmol) foram adquiridos da Perkin Elmer, Brasil. O meio RPMI 1640 da Life Technologies (EUA) e o Soro Fetal Bovino (SFB) da GIBCO™ (EUA). Etanol absoluto foi adquirido da MERCK, Brasil e o dimetilsulfóxido (DMSO) da SIGMA, EUA.

3.2. Características do campo de pesquisa

A seleção dos pacientes foi realizada no Hospital de Base do Distrito Federal (HBDF), vinculado à Secretaria de Saúde do Distrito Federal e no Hospital Universitário de Brasília (HUB), Universidade de Brasília. A investigação laboratorial foi desenvolvida no Laboratório de Farmacologia Molecular da Faculdade de Ciências da Saúde – UnB.

3.3. População Estudada

Foram selecionados 14 pacientes com hipertireoidismo primário e 9 pacientes com hipotireoidismo primário com idade entre 20 e 60 anos e distribuição por gênero aleatória. Os pacientes tiveram o diagnóstico confirmado por dosagens séricas de TSH (valor de referência entre 0,5-4,5 mUI/L) e de T_4 livre (valor de referência entre 0,7-1,8 ng/dL), sendo que nos hipotireoideos o TSH encontrava-se acima de 20 mUI/L e T_4 livre abaixo do valor de referência para o método utilizado e pacientes mulheres não se utilizavam de terapia de reposição hormonal (quadro 1). Já os pacientes hipertireoideos apresentavam dosagens de TSH abaixo e com T_4 livre acima dos valores de referência para o método (quadro 2). Foram considerados critérios de exclusão a presença de quaisquer comorbidades ou o uso de medicações contínuas bem como etilismo crônico. O grupo controle consistiu de nove indivíduos sadios com distribuição por gênero aleatória e com idade entre 20 e 60 anos. Todos os sujeitos participantes foram voluntários e assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Quadro 1 – Dados clínicos dos pacientes hipertireoideos selecionados

Pacientes Hipertireoideos	1ª coleta - nível sérico -		Data 1ª coleta	2ª coleta - nível sérico -		Data 2ª coleta	Tratamento
	TSH	T ₄ livre		TSH	T ₄ livre		
1	<0,01	1,98	26/09/07	-	-	-	--- mCi ¹³¹ I
2	<0,01	9,40	27/09/07	2,30	1,60	02/09/08	18,6mCi ¹³¹ I/Topazol
3	<0,01	6,70	07/11/07	2,09	1,02	01/04/08	8,0mCi ¹³¹ I
4	0,01	3,95	09/11/07	-	1,40	01/04/08	19,0mCi ¹³¹ I/Levotiroxina
5	<0,01	7,80	21/09/07	-	1,30	27/05/08	--- mCi ¹³¹ I/Topazol
6	0,01	2,80	21/11/07	0,21	0,70	12/03/08	10,0mCi ¹³¹ I
7	<0,004	5,22	29/11/07	-	-	-	21,0mCi ¹³¹ I
8	0,03	5,25	05/12/07	-	-	-	10,0mCi ¹³¹ I
9	0,01	5,04	12/12/07	2,13	0,88	22/04/08	--- mCi ¹³¹ I/Levotiroxina
10	0,01	6,40	09/01/08	-	1,00	02/07/08	8,0mCi ¹³¹ I/Levotiroxina
11	<0,01	1,60	11/01/08	2,22	1,10	27/05/08	20,0mCi ¹³¹ I/Levotiroxina
12	0,01	7,10	04/03/08	0,20	0,91	27/05/08	--- mCi ¹³¹ I
13	0,01	9,30	12/03/08	-	1,60	26/08/08	17,8mCi ¹³¹ I
14	0,01	24,8 T	19/03/08	-	1,00	20/05/08	14,0mCi ¹³¹ I

Valores de referência: TSH de 0,5 a 4,5 mUI/L e T₄ livre de 0,7 a 1,8 ng/dL.

Os valores séricos do paciente 14 corresponde ao T₄ total.

Não há indicação da dose de ¹³¹I para os pacientes 1, 5, 9 e 12.

Quadro 2 – Dados clínicos dos pacientes hipotireoideos selecionados

Pacientes Hipotireoideos	1ª coleta - nível sérico -		Data 1ª coleta
	TSH	T ₄ livre	
1	28,1	0,64	06/11/07
2	27,9	0,50	15/02/08
3	111,0	0,21	15/02/08
4	20,8	0,72	26/03/08
5	24,3	0,70	16/06/08
6	27,9	0,68	28/08/08
7	25,6	0,50	01/09/08
8	67,3	0,33	11/09/08
9	300,0	0,16	12/10/08

Valores de referência: TSH de 0,5 a 4,5 mUI/L e T₄ livre de 0,7 a 1,8 ng/dL

3.4. Obtenção das hemácias

Três mililitros de amostra de sangue dos sujeitos participantes foram obtidos por venopunção e colocados em tubos contendo EDTA (BD Vacutainer System) e imediatamente colocados em gelo. As amostras foram centrifugadas (2200xg/5 min/4°C), o plasma e *buffy coat* foram removidos e o concentrado de hemácias foi lavado três vezes por ressuspensão/centrifugação com 3 mL de PBS gelado (16 g NaCl, 0,4 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄ e 0,24 g KH₂PO₄, pH 7,4). As células foram ressuspensas em até 4 mL de PBS gelado e procedida a diluição para contagem celular em Câmara de Neubauer.

3.5. Transporte de Hormônios Tireoideanos

Para análise do transporte de HT foi analisado o influxo (captação) e o efluxo (saída) de $^{125}\text{I-T}_3$ e $^{125}\text{I-T}_4$ em hemácias. O estudo de transporte de HT em hemácias vem sendo realizado há longa data, tanto em humanos quanto em animais. Trata-se de uma metodologia confiável e de fácil reprodutibilidade.

4.5.1. Estudo de Influxo: as células ($10^8/\text{mL}/\text{ensaio}$) foram incubadas a 37°C em meio RPMI 1640 contendo $^{125}\text{I-T}_3$ e $^{125}\text{I-T}_4$ (aproximadamente 200.000 cpm) e 0,01% de SFB. O influxo foi interrompido em 1, 5, 10, 30, 60, 120 e 180 minutos pela adição de 500 μL de PBS gelado e as amostras foram centrifugadas (2200xg/5min/4°C) seguida de sequência de quatro lavagens com 1 mL de PBS gelado. As células foram lisadas com 1 mL de água destilada e a radioatividade da solução determinada em Contador Gama – Perkin Elmer Wallac Wizard 1470. O esquema do experimento de influxo pode ser visto na figura 4.

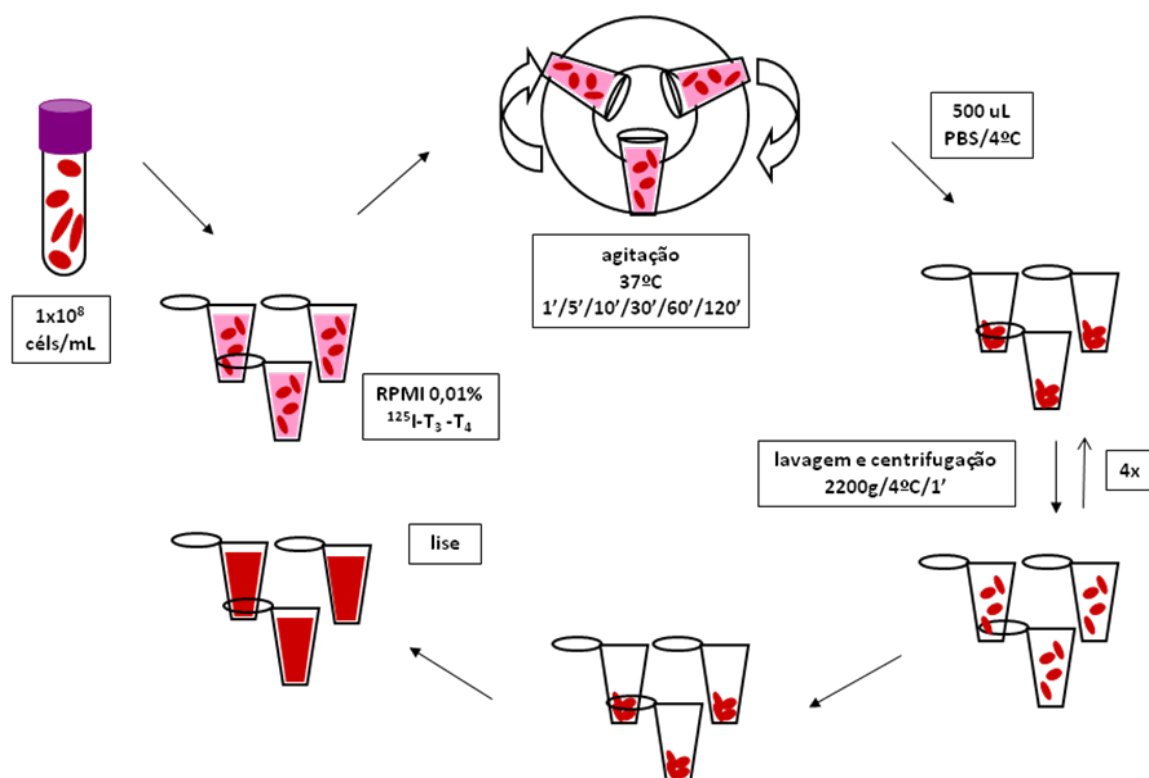


Figura 4 – Influxo em hemácias.

4.5.2. Estudo de Efluxo: as células (10^8 /mL/ensaio) foram inicialmente pré-incubadas com $^{125}\text{I-T}_3$ e $^{125}\text{I-T}_4$ (aproximadamente 200.000 cpm) em meio RPMI 1640 contendo 0,01% de SFB por 180 minutos a 37°C . Ao final do período pré-determinado as células foram lavadas quatro vezes com PBS gelado por ressuspensão/centrifugação ($2200\text{xg}/5\text{min}/4^\circ\text{C}$) para a retirada do hormônio marcado não incorporado à célula. O efluxo inicia-se pela adição de 1 mL por microtubo de meio RPMI pré-aquecido a 37°C contendo 10% de SFB. O tubo contendo hemácias diluídas no meio é centrifugado ($2200\text{xg}/5\text{min}/4^\circ\text{C}$) e em seguida recolhido o sobrenadante. Posteriormente as hemácias são novamente ressuspensas em meio novo. Este procedimento foi realizado em 5, 15, 30 e 60 minutos de efluxo. Ao final de 60 min de efluxo o sobrenadante é recolhido, as células são lisadas com 1 mL de água destilada e a quantidade de $^{125}\text{I-T}_3$ e $^{125}\text{I-T}_4$ remanescente nas células e nos meios de efluxo são determinadas em Contador Gama – Perkin Elmer Wallac Wizard 1470. O efluxo esquematizado está representado na figura 5.

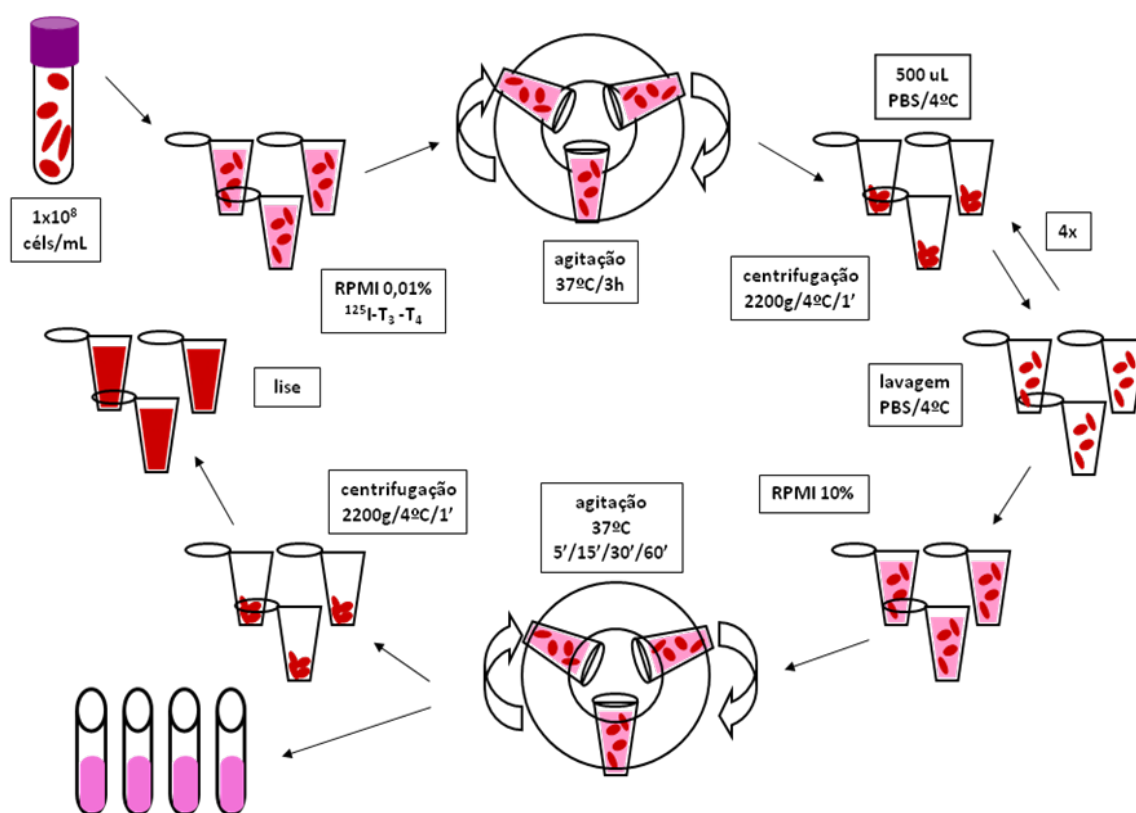


Figura 5 – Efluxo em hemácias.

4. Análise Estatística

Os dados foram submetidos a análise de variância One-Way ANOVA complementado com teste de significância Student Newman-Keuls Multiple Comparasion.

5. Resultados

Hemácias dos pacientes hipotireoideos, hipertireoideos e grupo controle selecionados foram utilizadas em ensaios de transporte - influxo e efluxo - com ^{125}I - T_3 e ^{125}I - T_4 em tempos de experimentos pré-determinados, conforme descrito em materiais e métodos.

5.1 - Influxo de ^{125}I - T_3 em hemácias de indivíduos do grupo controle (ctrl), pacientes hipotireoideos (hipo) e hipertireoideos (hiper).

Com o intuito de avaliar o mecanismo de transporte de entrada de T_3 em hemácias de pacientes hipertireoideos e hipotireoideos, foram realizados ensaios de influxo de T_3 marcado com ^{125}I nos tempos de 1, 5, 10, 30, 60 e 120 minutos. Os resultados estão mostrados no gráfico 1 e na tabela 1.

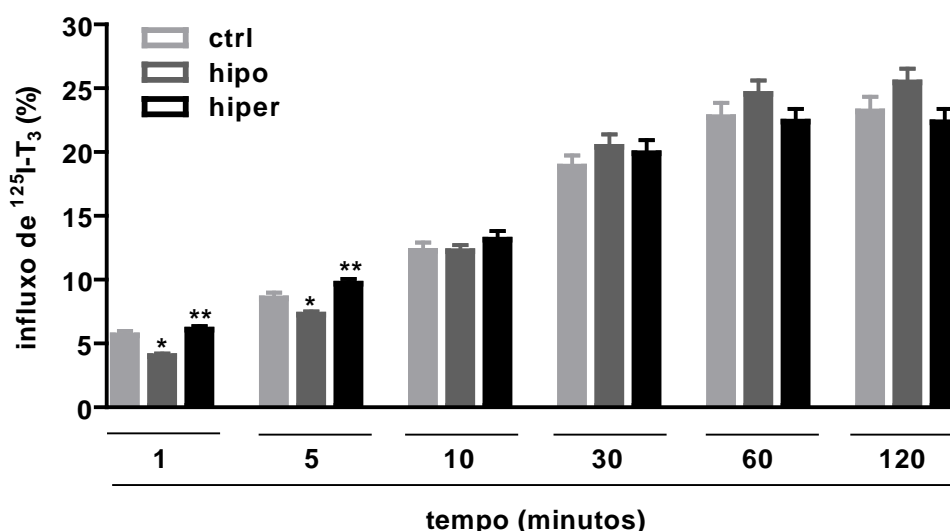


Gráfico 1 – Influxo de ^{125}I - T_3 em hemácias de indivíduos do grupo controle (ctrl) e de pacientes hipotireoideos (hipo) e hipertireoideos (hiper). O influxo foi avaliado como descrito em materiais e métodos. Os dados são apresentados como Média \pm SEM em experimentos independentes realizados em triplicatas de 9 sujeitos do grupo controle, 9 pacientes hipotireoideos e 14 pacientes hipertireoideos. * $p < 0,05$ vs ctrl, ** $p < 0,05$ vs hipo.

Apenas nos tempos de 1 e 5 min o influxo de ^{125}I - T_3 em hemácias de pacientes hipotireoideos foi estatisticamente diferente do grupo controle (4,02 \pm 0,19% e 5,63 \pm 0,35%; 7,28 \pm 0,39% e 8,54 \pm 0,23%, respectivamente). As reduções dos influxos foram de 29% e 15% respectivamente para 1 e 5 minutos. A partir de 10 min não houve diferença estatística do influxo em hemácias dos pacientes hipotireoideos e do grupo controle. Da mesma forma, não houve diferença

estatística entre o influxo em hemácias de pacientes hipertireoideos e do grupo controle em todos os tempos do ensaio. Entretanto, foi observada uma diferença entre os influxos em hemácias de pacientes hipotireoideos e hipertireoideos nos tempos de 1 e 5 minutos ($4,02\pm 0,19\%$ e $6,08\pm 0,29\%$; $7,28\pm 0,23\%$ e $9,68\pm 0,39\%$, respectivamente) (tabela 1).

Tabela 1: Porcentagens de Influxo de $^{125}\text{I-T}_3$ em hemácias de pacientes hipotireoideos (hipo) e hipertireoideos (hiper) e do grupo controle (ctrl).

Tempo (min)	Influxo (Média \pm SEM) (%)			Diferença do influxo (redução ou incremento) em relação ao controle (%)	
	Ctrl	Hipo	Hiper	Hipo	Hiper
1	5,63 \pm 0,35	4,02 \pm 0,19*	6,08 \pm 0,30**	28,6	8,0
5	8,54 \pm 0,23	7,28 \pm 0,39*	9,68 \pm 0,39**	14,8	13,3
10	12,25 \pm 0,67	12,23 \pm 0,48	13,13 \pm 0,67	0,2	7,2
30	18,86 \pm 0,88	20,41 \pm 0,98	19,92 \pm 1,02	8,2	5,6
60	22,74 \pm 1,12	24,56 \pm 1,05	22,38 \pm 1,01	8,0	1,6
120	23,19 \pm 1,15	25,47 \pm 1,08	22,35 \pm 1,04	9,8	3,6

*p<0,05 vs ctrl, **p<0,05 vs hipo

5.2 - Influxo de $^{125}\text{I-T}_4$ em hemácias de indivíduos do grupo controle (ctrl), pacientes hipotireoideos (hipo) e hipertireoideos (hiper).

Para verificar se o comportamento da entrada de T_4 nas hemácias seria o mesmo, foram realizados ensaios de influxo com T_4 marcado com ^{125}I nos tempos de 1, 5, 10, 30, 60 e 120 minutos. Os resultados estão mostrados no gráfico 2 e na tabela 2.

De maneira semelhante ao que foi observado no influxo de $^{125}\text{I-T}_3$, pode-se depreender do gráfico 2 que a porcentagem de influxo de $^{125}\text{I-T}_4$ nos tempos de 1 e 5 min nas hemácias de pacientes hipotireoideos foi estatisticamente diferente do influxo nas hemácias dos indivíduos do grupo controle ($1,88\pm 0,16\%$ e $2,93\pm 0,17\%$; $2,72\pm 0,09\%$ e $3,98\pm 0,35\%$, respectivamente). Esta diminuição do influxo traduz-se em 36 e 32% para 1 e

5 minutos, respectivamente. A partir de 10 minutos de ensaio as porcentagens de influxo foram iguais nas hemácias de pacientes hipotireoideos e do grupo controle.

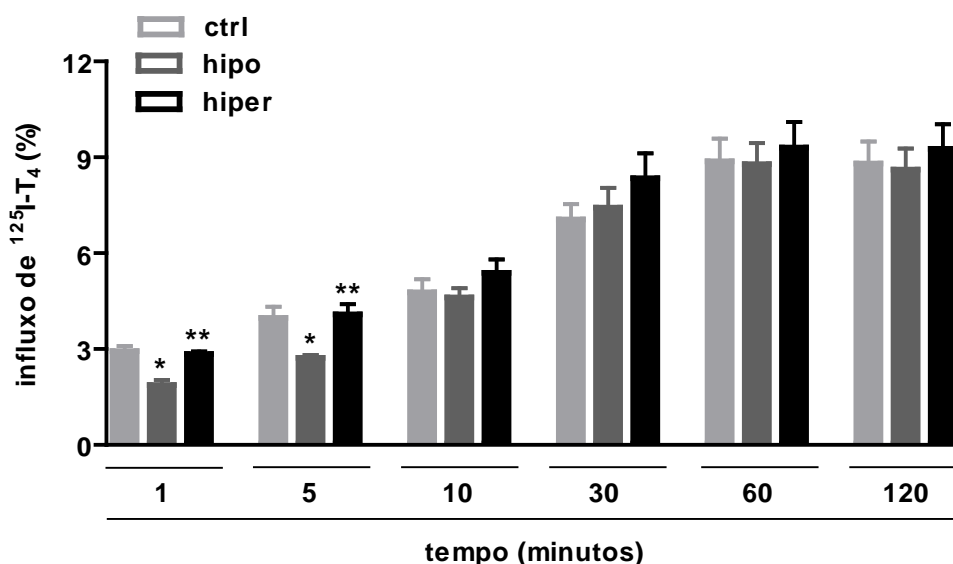


Gráfico 2 – Influxo de $^{125}\text{I-T}_4$ em hemácias de indivíduos do grupo controle (ctrl) e de pacientes hipotireoideos (hipo) e hipertireoideos (hiper). O influxo foi avaliado como descrito em materiais e métodos. Os dados são apresentados como Média \pm SEM em experimentos independentes realizados em triplicatas de 9 sujeitos controles, 9 pacientes hipotireoideos e 14 pacientes hipertireoideos. * $p < 0,05$ vs ctrl, ** $p < 0,05$ vs hipo.

Também não foram observadas diferenças estatísticas entre o influxo de $^{125}\text{I-T}_4$ nas hemácias de pacientes hipertireoideos e do grupo controle em todos os tempos do ensaio (Tabela 2). Igualmente como ocorreu no influxo de $^{125}\text{I-T}_3$, houve diferença entre a entrada de $^{125}\text{I-T}_4$ nas hemácias de pacientes hipotireoideos e hipertireoideos somente nos tempos de 1 e 5 minutos ($1,88 \pm 0,16\%$ e $2,84 \pm 0,08\%$; $2,72 \pm 0,09\%$ e $4,08 \pm 0,32\%$, respectivamente).

Interessante notar que nossos resultados indicam uma captação maior de $^{125}\text{I-T}_3$ em relação a $^{125}\text{I-T}_4$ pelas hemácias de todos os grupos. Foi observada diferença de cerca 1,9, 1,5 e 2,1 vezes, no grupo controle, pacientes hipotireoideos e hipertireoideos, respectivamente, nos primeiros minutos de ensaio. Contudo, a razão T_3/T_4 , ao final do experimento, tornou-se menos divergente, com taxas de 2,6, 2,8 e 2,4 vezes nos mesmos grupos igualmente.

Tabela 2: Porcentagens de Influxo de $^{125}\text{I-T}_4$ em hemácias de pacientes hipotireoideos (hipo) e hipertireoideos (hiper) e do grupo controle (ctrl).

Tempo (min)	Influxo (Média±SEM) (%)			Diferença do influxo (redução ou incremento) em relação ao controle (%)	
	Ctrl	Hipo	Hiper	Hipo	Hiper
1	2,93±0,17	1,88±0,16*	2,84±0,08**	35,8	3,1
5	3,98±0,35	2,72±0,09*	4,08±0,32**	31,7	2,5
10	4,77±0,41	4,57±0,29	5,39±0,42	4,2	13,0
30	7,06±0,47	7,42±0,63	8,34±0,78	5,1	18,1
60	8,88±0,71	8,79±0,66	9,31±0,80	1,0	4,8
120	8,80±0,69	8,61±0,66	9,26±0,78	2,2	5,2

*p<0,05 vs ctrl, **p<0,05 vs hipo

5.3 - Efluxo de $^{125}\text{I-T}_3$ em hemácias de indivíduos do grupo controle (ctrl), pacientes hipotireoideos (hipo) e hipertireoideos (hiper).

Para o estudo de como as hemácias dos vários grupos pesquisados exportam $^{125}\text{I-T}_3$ foram realizados ensaios de efluxo nos tempos de 5, 15, 30 e 60 minutos (gráfico 3 e tabela 3).

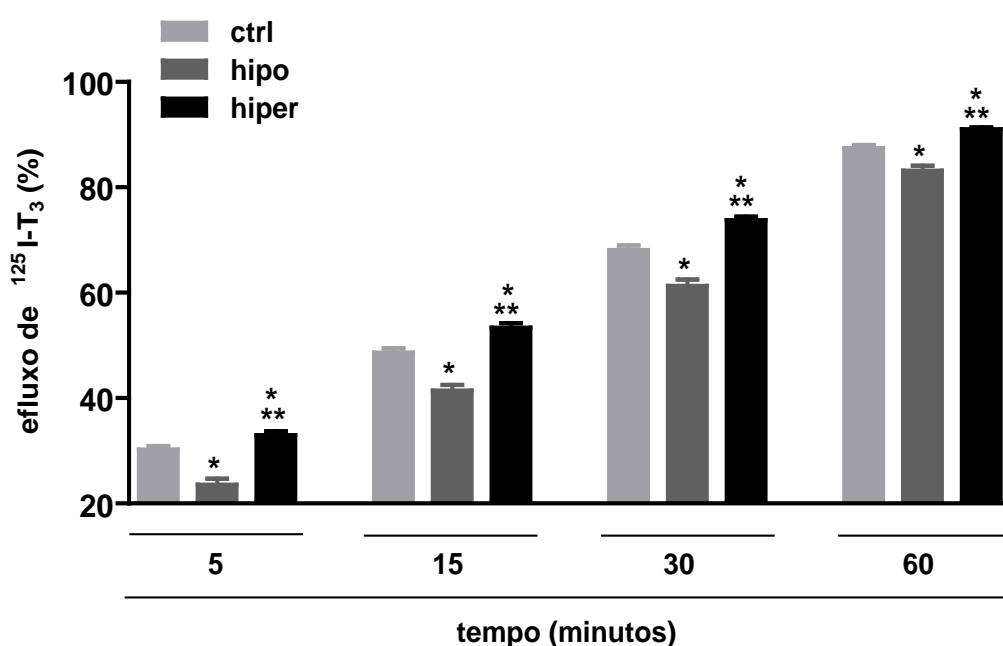


Gráfico 3 - Efluxo de $^{125}\text{I-T}_3$ em hemácias de indivíduos do grupo controle (ctrl) e de pacientes hipotireoideos (hipo) e hipertireoideos (hiper). O efluxo foi avaliado como descrito em materiais e métodos. Os dados são apresentados como Média \pm SEM em experimentos independentes realizados em triplicatas de 9 sujeitos controles, 9 pacientes hipotireoideos e 14 pacientes hipertireoideos. *p<0,05 vs ctrl, **p<0,05 vs hipo.

Como pode ser observado, houve uma menor porcentagem de saída de $^{125}\text{I-T}_3$ de hemácias dos pacientes hipotireoideos em relação à porcentagem de saída das hemácias do grupo controle em 5, 15, 30 e 60 min (23,57 \pm 1,14% e 30,25 \pm 0,63%; 41,40 \pm 1,07% e 48,61 \pm 0,83%; 61,31 \pm 1,17% e 68,09 \pm 0,89%; 83,16 \pm 0,94% e 87,41 \pm 0,60%, respectivamente). Hemácias de pacientes hipotireoideos retiveram 22%, 15%, 10% e 5% de $^{125}\text{I-T}_3$ a mais que o grupo controle em 5, 15, 30 e 60 min, respectivamente.

Já a extrusão de $^{125}\text{I-T}_3$ de hemácias dos pacientes hipertireoideos foi maior em relação à saída do hormônio das hemácias do grupo controle nos tempos de 5, 15, 30 e 60 minutos, seus valores em porcentagem de saída foram 32,96 \pm 0,75 e 30,25 \pm 0,63; 53,39 \pm 0,82 e 48,61 \pm 0,83; 73,74 \pm 0,69 e 68,09 \pm 0,89; 91,05 \pm 0,33 e 87,41 \pm 0,60, respectivamente. A diferença no incremento de saída de $^{125}\text{I-T}_3$ de hemácias dos pacientes hipertireoideos em relação ao grupo controle foram, nos tempos de 5, 15, 30 e 60 minutos, de 9%, 10%, 8% e 4%, respectivamente.

Pode-se observar também que houve diferença estatística entre a saída de $^{125}\text{I-T}_3$ de hemácias dos pacientes hipertireoideos e hipotireoideos (tabela 3).

Tabela 3: Porcentagens de Efluxo de $^{125}\text{I-T}_3$ em hemácias de pacientes hipotireoideos (hipo) e hipertireoideos (hiper) e do grupo controle (ctrl) e taxas de efluxo em relação ao controle.

Tempo (min)	Efluxo (Média \pm SEM) (%)			Diferença do efluxo (redução ou incremento) em relação ao controle (%)	
	Ctrl	Hipo	Hiper	Hipo	Hiper
5	30,25 \pm 0,63	23,57 \pm 1,14*	32,96 \pm 0,75***	22,1	9,0
15	48,61 \pm 0,83	41,40 \pm 1,07*	53,39 \pm 0,82***	14,8	9,8
30	68,09 \pm 0,89	61,31 \pm 1,17*	73,74 \pm 0,69***	10,0	8,3
60	87,41 \pm 0,60	83,16 \pm 0,94*	91,05 \pm 0,33***	4,9	4,2

*p<0,05 vs ctrl, **p<0,05 vs hipo

5.4 - Efluxo de $^{125}\text{I-T}_4$ em hemácias de indivíduos do grupo controle (ctrl), pacientes hipotireoideos (hipo) e hipertireoideos (hiper).

Com a intenção de se pesquisar o comportamento na exportação de $^{125}\text{I-T}_4$ pelas hemácias dos grupos estudados, foram realizados ensaios de efluxo nos tempos de 5, 15, 30 e 60 minutos (gráfico 4 e tabela 4).

Diferentemente do observado no efluxo de $^{125}\text{I-T}_3$, as hemácias dos pacientes hipotireoideos retiveram uma quantidade estatisticamente maior de $^{125}\text{I-T}_4$ apenas no tempo de efluxo de 5 min em relação ao grupo controle, sendo as porcentagens de efluxo as seguintes: $34,49\pm 1,94$ e $38,51\pm 0,82$, respectivamente. Esta retenção foi de 10,44%. Para os tempos de 15, 30 e 60 minutos de efluxo não houve diferença estatística, as porcentagens de efluxo nestes tempos foram, respectivamente para os pacientes hipotireoideos e do grupo controle: $56,53\pm 1,69$ e $58,39\pm 0,76$; $76,69\pm 1,10$ e $77,32\pm 0,61$; $92,60\pm 0,40$ e $92,38\pm 0,26$.

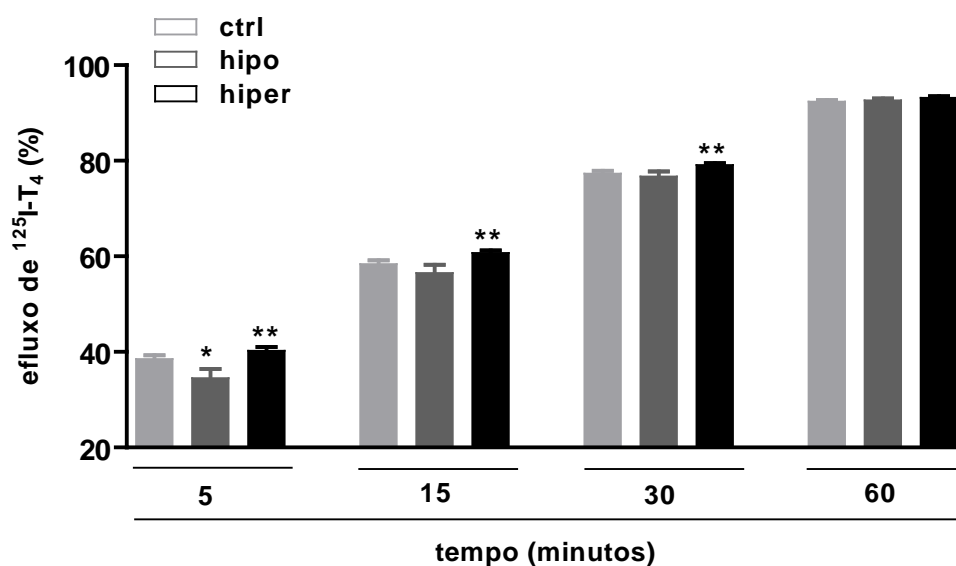


Gráfico 4 - Efluxo de $^{125}\text{I-T}_4$ em hemácias de indivíduos do grupo controle (ctrl) e de pacientes hipotireoideos (hipo) e hipertireoideos (hiper). O efluxo foi avaliado como descrito em materiais e métodos. Os dados são apresentados como Média±SEM em experimentos independentes realizados em triplicatas de 9 sujeitos controles, 9 pacientes hipotireoideos e 14 pacientes hipertireoideos. * $p<0,05$ vs ctrl, ** $p<0,05$ vs hipo.

Entretanto, o efluxo de $^{125}\text{I-T}_4$ em hemácias de pacientes hipertireoideos não apresentou diferença estatística em nenhum tempo do efluxo, seus valores em porcentagem de efluxo foram, respectivamente, para pacientes hipertireoideos e do

grupo controle em 5, 15, 30 e 60 minutos: 40,20±0,80 e 38,51±0,82; 60,68±0,55 e 58,39±0,76; 79,07±0,41 e 77,32±0,61; 93,15±0,33 e 92,38±0,26.

Tabela 4: Porcentagens de Efluxo de ¹²⁵I-T₄ em hemácias de pacientes hipotireoideos (hipo) e hipertireoideos (hiper) e do grupo controle (ctrl) e taxas de efluxo em relação ao controle.

Tempo (min)	Efluxo (Média±SEM) (%)			Diferença do efluxo (redução ou incremento) em relação ao controle (%)	
	Ctrl	Hipo	Hiper	Hipo	Hiper
5	38,51±0,82	34,49±1,94*	40,20±0,80**	10,4	4,4
15	58,39±0,76	56,53±1,69	60,68±0,55**	3,2	3,9
30	77,32±0,61	76,69±1,10	79,07±0,41**	0,8	2,3
60	92,38±0,26	92,60±0,40	93,15±0,33	0,2	0,8

*p<0,05 vs ctrl, **p<0,05 vs hipo

Uma diferença estatisticamente significativa pode ser observada entre as porcentagens de efluxo de ¹²⁵I-T₄ em hemácias de pacientes hipotireoideos e hipertireoideos nos tempos de 5, 15 e 30 minutos. Após 60 min de efluxo todas as porcentagens se igualaram.

Tomados conjuntamente, os resultados dos efluxos de ¹²⁵I-T₃ e ¹²⁵I-T₄ em hemácias de pacientes hipotireoideos e hipertireoideos e do grupo controle podem ser observados no gráfico 5, onde estão mostrados os percentuais remanescentes nas células após os 60 min de efluxo. Pode-se depreender que não houve diferença estatística no remanescente de ¹²⁵I-T₄ após os 60 min de efluxo nas hemácias dos grupos estudados (7,40±0,40%, 6,85±0,33 e 7,62±0,26%, respectivamente para hemácias de pacientes hipotireoideos, pacientes hipertireoideos e do grupo controle).

De forma contrária, houve diferença entre o remanescente de ¹²⁵I-T₃ após os 60 min de efluxo nas hemácias dos pacientes hipotireoideos (17,84±0,40%) e nas hemácias dos pacientes hipertireoideos (8,95±0,33%) em relação ao remanescente nas hemácias do grupo controle (12,59±0,26%).

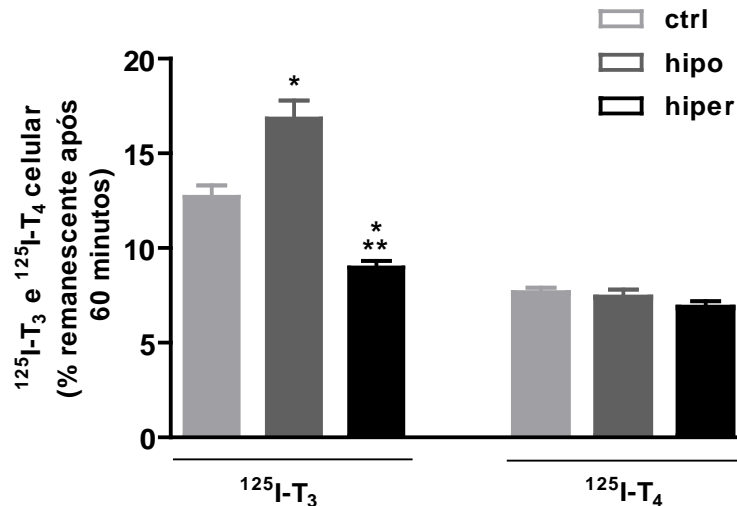


Gráfico 5 - Efluxo de $^{125}\text{I-T}_3$ e $^{125}\text{I-T}_4$ em hemácias de indivíduos do grupo controle (ctrl) e de pacientes hipotireoideos (hipo) e hipertireoideos (hiper). O efluxo foi avaliado como descrito em materiais e métodos. Os dados são apresentados como Média \pm SEM em experimentos independentes realizados em triplicatas de 9 sujeitos controles, 9 pacientes hipotireoideos e 14 pacientes hipertireoideos. *p<0,05 vs ctrl, **p<0,05 vs hipo.

Com o desenvolver dos experimentos, os pacientes hipertireoideos retornaram em condições de eutireoidismo. Perante esta disponibilidade resolveu-se avaliar o transporte sob esta nova perspectiva.

5.5 - Influxo de $^{125}\text{I-T}_3$ em hemácias de indivíduos do grupo controle (ctrl) e pacientes hipertireoideos antes (pretrat) e após o tratamento (postrat).

Inicialmente foram feitos experimentos de influxo de $^{125}\text{I-T}_3$ em hemácias de indivíduos do grupo controle e pacientes hipertireoideos após o tratamento, estes ensaios foram realizados da mesma maneira como foram realizados os ensaios de influxo nos pacientes antes do tratamento. Os tempos de influxo também foram os mesmos, 1, 5, 10, 30, 60 e 120 minutos. Os resultados estão mostrados na gráfico 6 e na tabela 5.

Como já foi comentado anteriormente, não houve diferença estatística na entrada de $^{125}\text{I-T}_3$ em hemácias de pacientes hipertireoideos antes do tratamento, entretanto, após o tratamento o influxo de $^{125}\text{I-T}_3$ diminuiu nos tempos de 1, 5 e 10 minutos, sendo os valores em porcentagem de influxo, respectivamente, para antes e após tratamento: 6,08 \pm 0,30 e 3,87 \pm 0,20; 9,68 \pm 0,39 e 7,24 \pm 0,43; 13,13 \pm 0,67 e 10,86 \pm 0,78. Estes valores de influxo também foram diferentes estatisticamente do grupo controle (5,63 \pm 0,35, 8,54 \pm 0,23 e 12,25 \pm 0,67, respectivamente para 1, 5 e 10

min). A diminuição em relação ao influxo antes do tratamento foi de 36% em 1 min, 25% em 5 min e 17% em 10 minutos.

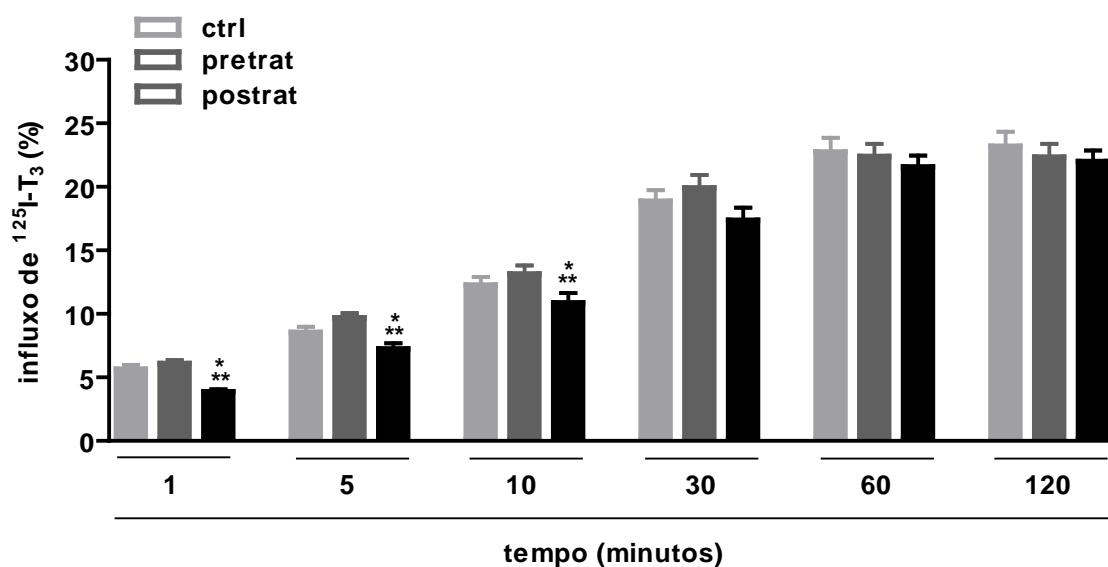


Gráfico 6 – Influxo de $^{125}\text{I-T}_3$ em hemácias de indivíduos do grupo controle (ctrl) e de pacientes hipertireoideos, antes (pretrat) e após o tratamento (postrat). O influxo foi avaliado como descrito em materiais e métodos. Os dados são apresentados como Média \pm SEM em experimentos independentes realizados em triplicatas de 9 sujeitos controles e 14 pacientes hipertireoideos. * $p < 0,05$ vs ctrl, ** $p < 0,05$ vs pretrat.

Tabela 5: Porcentagens de Influxo de $^{125}\text{I-T}_3$ em hemácias de pacientes hipertireoideos antes (pretrat) e após tratamento (postrat) e do grupo controle (ctrl)

Tempo (min)	Influxo (Média \pm SEM) (%)			Diferença do influxo (redução ou incremento) Postrat em relação a Pretrat (%)
	Ctrl	Pretrat	Postrat	Postrat
1	5,63 \pm 0,35	6,08 \pm 0,30	3,87 \pm 0,20***	36,3
5	8,54 \pm 0,23	9,68 \pm 0,39	7,24 \pm 0,43***	25,2
10	12,25 \pm 0,67	13,13 \pm 0,67	10,86 \pm 0,78***	17,3
30	18,86 \pm 0,88	19,92 \pm 1,02	17,36 \pm 0,99	12,9
60	22,74 \pm 1,12	22,38 \pm 1,01	21,57 \pm 0,90	3,6
120	23,19 \pm 1,15	22,35 \pm 1,04	22,00 \pm 0,87	1,6

* $p < 0,05$ vs ctrl, ** $p < 0,05$ vs pretrat

5.6 - Influxo de $^{125}\text{I-T}_4$ em hemácias de indivíduos do grupo controle (ctrl) e pacientes hipertireoideos antes (pretrat) e após o tratamento (postrat).

Diferentemente do influxo de $^{125}\text{I-T}_3$, o influxo de $^{125}\text{I-T}_4$ em hemácias de pacientes hipertireoideos depois do tratamento, como pode ser visto na gráfico 7, foi menor em todos os tempos do experimento, sendo estas porcentagens em 1, 5, 10, 30, 60 e 120 minutos, respectivamente, iguais a $1,79\pm 0,08$; $2,32\pm 0,13$; $3,48\pm 0,33$; $5,39\pm 0,60$; $6,7\pm 0,66$ e $6,85\pm 0,60$. As diferenças do influxo em hemácias dos pacientes hipertireoideos depois do tratamento, em relação ao grupo de pacientes hipertireoideos antes do tratamento, foram de 37%, 43%, 35%, 35%, 28% e 26% para os tempos de 1, 5, 10, 30, 60 e 120 minutos de influxo, respectivamente (tabela 6).

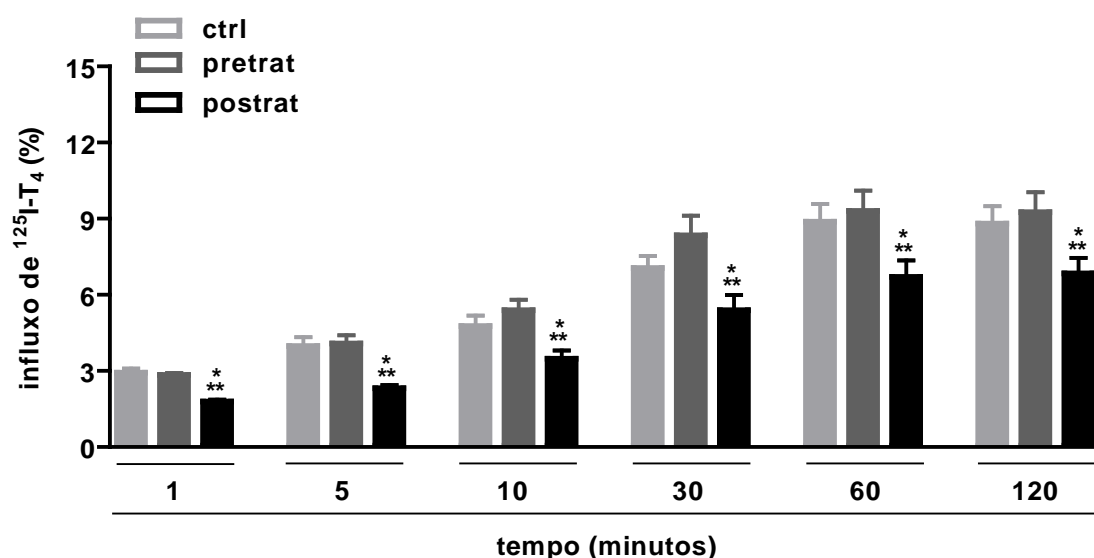


Gráfico 7 – Influxo de $^{125}\text{I-T}_4$ em hemácias de indivíduos do grupo controle (ctrl) e de pacientes hipertireoideos, antes (pretrat) e após (postrat) o tratamento. O influxo foi avaliado como descrito em materiais e métodos. Os dados são apresentados como Média \pm SEM em experimentos independentes realizados em triplicatas de 9 sujeitos controles e 14 pacientes hipertireoideos. * $p < 0,05$ vs ctrl, ** $p < 0,05$ vs pretrat.

Tabela 6: Porcentagens de Influxo de $^{125}\text{I-T}_4$ em hemácias de pacientes hipertireoideos antes (pretrat) e após tratamento (postrat) e do grupo controle (ctrl)

Tempo (min)	Influxo (Média±SEM) (%)			Diferença do influxo (redução) Postrat em relação a Pretrat (%)
	Ctrl	Pretrat	Postrat	Postrat
1	2,93±0,17	2,84±0,08	1,79±0,08***	37,0
5	3,98±0,35	4,08±0,32	2,32±0,13***	43,1
10	4,77±0,41	5,39±0,42	3,48±0,33***	35,4
30	7,06±0,47	8,34±0,78	5,39±0,60***	35,4
60	8,88±0,71	9,31±0,80	6,7±0,66***	28,0
120	8,80±0,69	9,26±0,78	6,85±0,60***	26,0

*p<0,05 vs ctrl, **p<0,05 vs pretrat

5.7 - Efluxo de $^{125}\text{I-T}_3$ em hemácias de indivíduos do grupo controle (ctrl) e pacientes hipertireoideos antes (pretrat) e após o tratamento (postrat).

Para investigar o comportamento da exportação de $^{125}\text{I-T}_3$ nas hemácias dos pacientes hipertireoideos após o tratamento, foram realizados estudos de efluxo nestas hemácias e os resultados estão mostrados no gráfico 8 e tabela 7.

Como foi visto anteriormente (gráfico 3) o efluxo de $^{125}\text{I-T}_3$ nas hemácias dos pacientes hipertireoideos antes do tratamento foi maior do que nas hemácias do grupo controle. Após o tratamento, a porcentagem de saída de $^{125}\text{I-T}_3$ foi estatisticamente menor do que nas hemácias dos pacientes antes do tratamento nos tempos de 5, 15 e 30 min ($27,31\pm 1,09$ e $32,96\pm 0,75$; $49,63\pm 1,06$ e $53,39\pm 0,82$; $71,16\pm 1,04$ e $73,74\pm 0,69$, respectivamente), igualando-se em 60 min ($90,05\pm 0,62$ e $91,05\pm 0,33$). Estas diminuições foram de 17%, 7% e 4%, respectivamente a 5, 15 e 30 min de efluxo.

5.8 - Efluxo de $^{125}\text{I-T}_4$ em hemácias de indivíduos do grupo controle (ctrl) e pacientes hipertireoideos antes (pretrat) e após o tratamento (postrat).

Complementando os estudos de transporte de HT em pacientes hipertireoideos após o tratamento, foram realizados ensaios de efluxo de $^{125}\text{I-T}_4$. Estes resultados estão mostrados no gráfico 9 e na tabela 8.

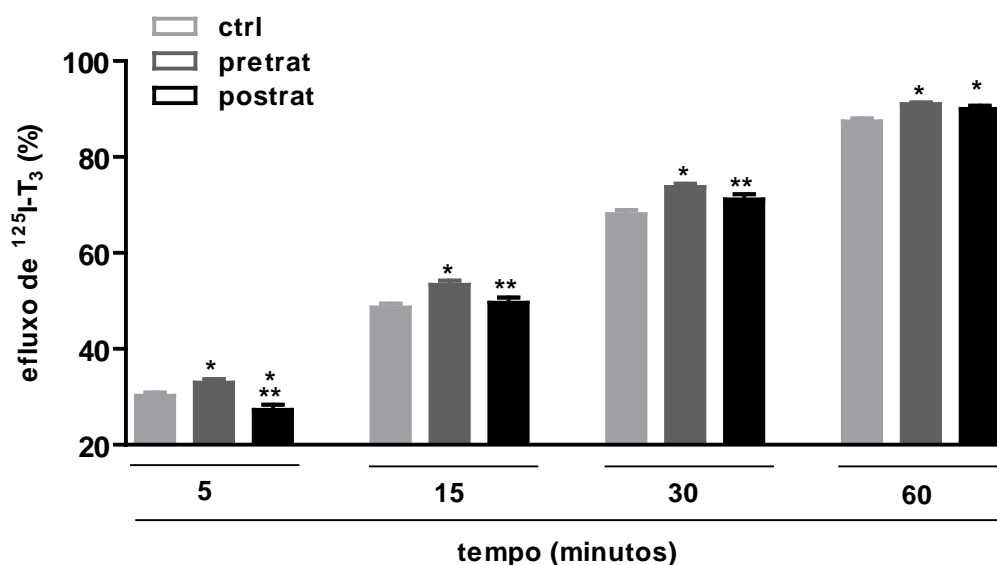


Gráfico 8 - Efluxo de $^{125}\text{I-T}_3$ em hemácias de indivíduos do grupo controle (ctrl) e de pacientes hipertireoideos, antes (pretrat) e após (postrat) o tratamento. O efluxo foi avaliado como descrito em materiais e métodos. Os dados são apresentados como Média \pm SEM em experimentos independentes realizados em triplicatas de 9 sujeitos controles e 14 pacientes hipertireoideos. * $p < 0,05$ vs ctrl, ** $p < 0,05$ vs pretrat.

Tabela 7: Porcentagens de Efluxo de $^{125}\text{I-T}_3$ em hemácias de pacientes hipertireoideos antes (pretrat) e após tratamento (postrat) e do grupo controle (ctrl).

Tempo (min)	Efluxo (Média \pm SEM) (%)			Diferença do efluxo (redução) Postrat em relação a Pretrat (%)
	Ctrl	Pretrat	Postrat	Postrat
5	30,25 \pm 0,63	32,96 \pm 0,75*	27,31 \pm 1,09***	17,1
15	48,61 \pm 0,83	53,39 \pm 0,82*	49,63 \pm 1,06**	7,0
30	68,09 \pm 0,89	73,74 \pm 0,69*	71,16 \pm 1,04**	3,5
60	87,41 \pm 0,60	91,05 \pm 0,33*	90,05 \pm 0,62*	1,1

* $p < 0,05$ vs ctrl, ** $p < 0,05$ vs pretrat

Não houve diferença estatística entre o efluxo de $^{125}\text{I-T}_4$ em hemácias de pacientes hipertireoideos e do grupo controle (gráfico 4). Porém, foi observada uma diminuição da exportação de $^{125}\text{I-T}_4$ em hemácias dos pacientes após o tratamento (gráfico 9) em relação à porcentagem de saída nas hemácias dos pacientes antes do tratamento nos tempos de 5, 15, 30 e 60 minutos (32,72 \pm 1,45 e 40,20 \pm 0,80; 54,33 \pm 1,24 e 60,68 \pm 0,55; 75,05 \pm 0,85 e 79,07 \pm 0,41; 91,77 \pm 0,30 e 93,15 \pm 0,33,

respectivamente). Estes valores foram também menores que os valores do efluxo nas hemácias dos indivíduos do grupo controle, exceto no tempo de 60 min onde não houve diferença estatística (tabela 8). As diferenças do efluxo nas hemácias dos pacientes hipertireoideos após o tratamento em relação aos pacientes antes do tratamento nos tempos de 5, 15, 30 e 60 min foram de 19%, 11%, 5% e 1,5%, respectivamente.

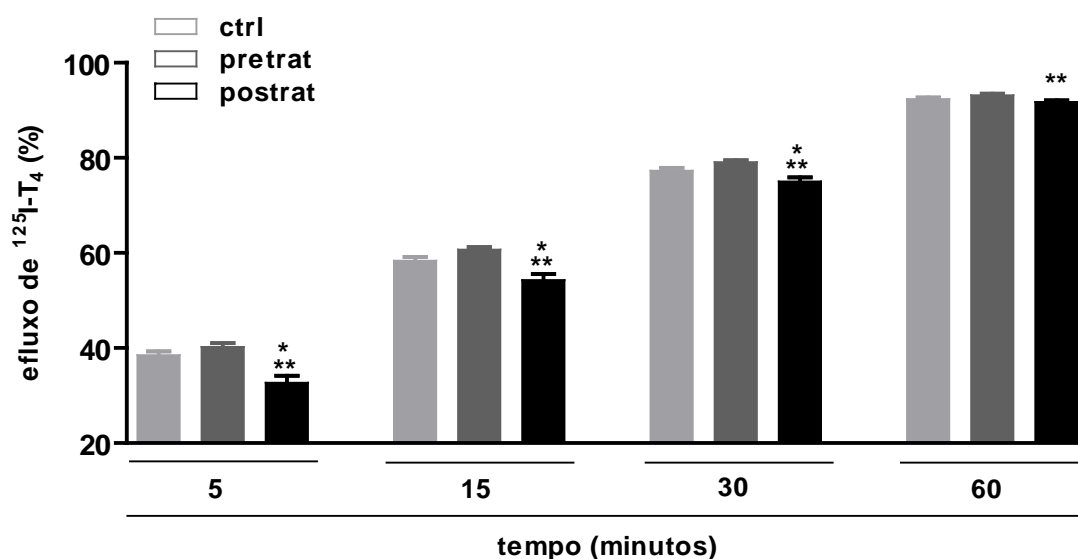


Gráfico 9 - Efluxo de $^{125}\text{I-T}_4$ em hemácias de indivíduos do grupo controle (ctrl) e de pacientes hipertireoideos, antes (pretrat) e após (postrat) o tratamento. O efluxo foi avaliado como descrito em materiais e métodos. Os dados são apresentados como Média \pm SEM em experimentos independentes realizados em triplicatas de 9 sujeitos controles e 14 pacientes hipertireoideos. * $p < 0,05$ vs ctrl, ** $p < 0,05$ vs pretrat.

Tabela 8: Porcentagens de Efluxo de $^{125}\text{I-T}_4$ em hemácias de pacientes hipertireoideos antes (pretrat) e após tratamento (postrat) e do grupo controle (ctrl)

Tempo (min)	Efluxo (Média \pm SEM) (%)			Diferença do efluxo (redução) Postrat em relação a Pretrat (%)
	Ctrl	Pretrat	Postrat	
5	38,51 \pm 0,82	40,20 \pm 0,80	32,72 \pm 1,45***	18,6
15	58,39 \pm 0,76	60,68 \pm 0,55	54,33 \pm 1,24***	10,5
30	77,32 \pm 0,61	79,07 \pm 0,41	75,05 \pm 0,85***	5,1
60	92,38 \pm 0,26	93,15 \pm 0,33	91,77 \pm 0,30**	1,5

* $p < 0,05$ vs ctrl, ** $p < 0,05$ vs pretrat

Os resultados de efluxo, tomados conjuntamente (gráfico 10), mostram que ao término dos 60 min de efluxo a quantidade de $^{125}\text{I-T}_3$ nas células é menor, tanto nos pacientes hipertireoideos antes como depois do tratamento, em relação à quantidade remanescente nas células do grupo controle. Ao contrário, a quantidade remanescente de $^{125}\text{I-T}_4$ nas hemácias dos pacientes hipertireoideos após o tratamento é maior do que o remanescente nas células dos pacientes antes do tratamento, porém, estatisticamente igual ao remanescente nas células dos indivíduos do grupo controle.

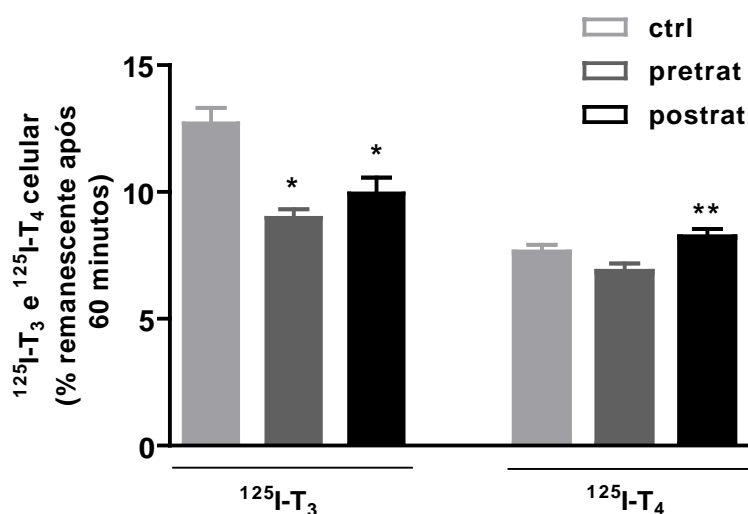


Gráfico 10 - Efluxo de $^{125}\text{I-T}_4$ em hemácias de indivíduos do grupo controle (ctrl) e de pacientes hipertireoideos, antes (pretrat) e após (postrat) o tratamento. O efluxo foi avaliado como descrito em materiais e métodos. Os dados são apresentados como Média±SEM em experimentos independentes realizados em triplicatas de 9 sujeitos controles e 14 pacientes hipertireoideos. *p<0,05 vs ctrl, **p<0,05 vs pretrat

Durante o desenvolvimento dos experimentos notou-se que no grupo de pacientes hipertireoideos havia variações entre os grupos de homens e mulheres no transporte - influxo e efluxo. Desta forma, os dados foram submetidos a uma análise em separado. A melhor forma encontrada para esta proposta foi uma avaliação particular entre pacientes e controles, homens e mulheres.

5.9 - Influxo de $^{125}\text{I-T}_3$ em hemácias de indivíduos do grupo controle e pacientes hipertireoideos, homens e mulheres, antes e após o tratamento.

Para avaliar a entrada de $^{125}\text{I-T}_3$ nas hemácias dos indivíduos do grupo controle, de pacientes hiper antes e após o tratamento, separados em grupos de homens e mulheres, foram analisados os dados separadamente e compilados no gráfico 11 e na tabela 9.

Interessante notar que, ao serem analisados separadamente, o grupo controle apresenta diferença no influxo de $^{125}\text{I-T}_3$ nas hemácias de homens e mulheres. Como pode ser observado no gráfico 11-A, em 1 minuto de influxo as hemácias de mulheres captam 22% menos $^{125}\text{I-T}_3$ do que as hemácias de homens (porcentagens de influxo $5,15\pm 0,21$ e $6,59\pm 0,9$, respectivamente). Nota-se uma velocidade de entrada de $^{125}\text{I-T}_3$ maior nas hemácias de mulheres do grupo controle, uma vez que em 5 minutos a porcentagem de influxo iguala-se ($8,51\pm 0,39$ e $8,58\pm 1,11$, respectivamente para mulheres e homens), e volta a ser diferente estatisticamente em 10 e 30 minutos, porém, com uma entrada maior nas hemácias de mulheres (30% a mais, tanto em 10 quanto em 30 min). As porcentagens de influxo para mulheres e homens em 10 e 30 minutos são, respectivamente, $13,27\pm 0,41$ e $10,22\pm 1,69$; $20,42\pm 0,75$ e $15,75\pm 1,84$; $23,77\pm 1,16$ e $20,68\pm 2,40$; $23,46\pm 1,15$ e $22,67\pm 2,69$.

Como já foi mostrado anteriormente, o influxo de $^{125}\text{I-T}_3$ em hemácias dos pacientes hipertireoideos, antes do tratamento, homens e mulheres juntos (gráfico 1) não apresentou diferença estatística. Entretanto, quando analisados separadamente, pode-se observar (gráfico 11-B) que o influxo de $^{125}\text{I-T}_3$ em hemácias das pacientes hipertireoideas é maior do que dos pacientes homens em todos os tempos de ensaio, exceto em 1 minuto no qual as porcentagens de influxo foram iguais ($6,46\pm 0,42$ e $5,57\pm 0,35$ para mulheres e homens, respectivamente). As porcentagens de influxo para mulheres e homens, em 5, 10, 30, 60 e 120 minutos foram, respectivamente: $10,50\pm 0,48$ e $8,59\pm 0,54$; $15,11\pm 0,77$ e $10,49\pm 0,87$; $23,07\pm 1,26$ e $15,72\pm 1,09$; $25,41\pm 1,23$ e $18,35\pm 1,14$; $25,23\pm 1,31$ e $18,67\pm 1,22$. O incremento de influxo nestes tempos foram de 22, 44, 47, 38 e 35%, respectivamente.

O influxo, após o tratamento, não apresentou diferença estatística entre as hemácias de homens e mulheres como pode ser observado no gráfico 11-C e nos valores na tabela 9.

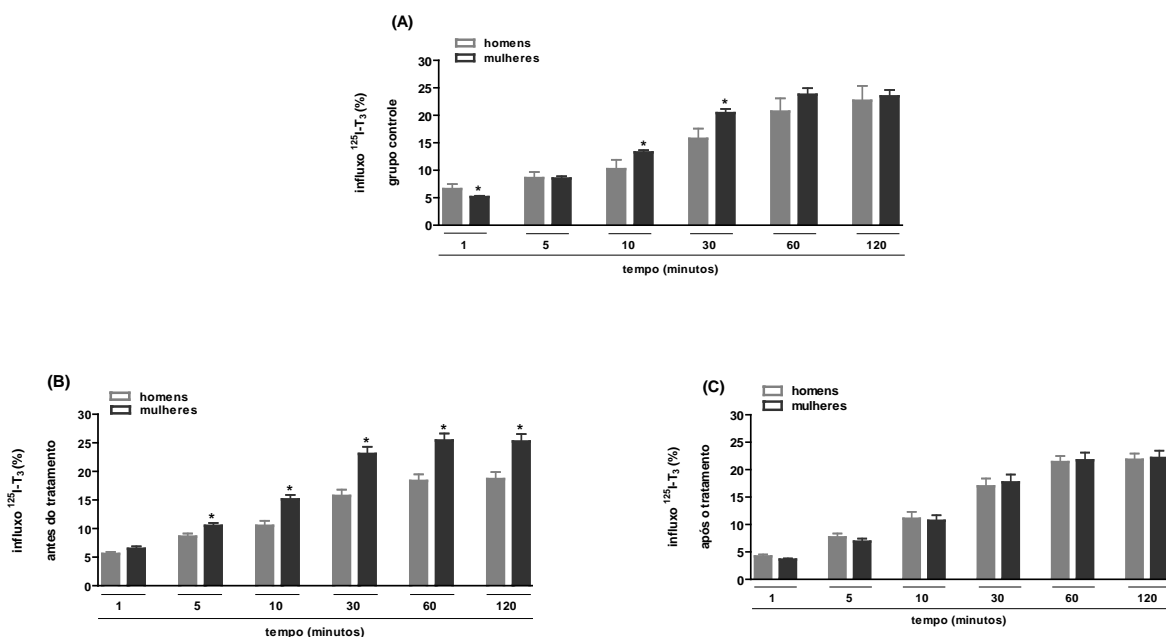


Gráfico 11 - Influxo de $^{125}\text{I-T}_3$ em hemácias de indivíduos do grupo controle (ctrl) **(A)** e de pacientes hipertireoideos, homens e mulheres, antes (pretrat) **(B)** e após (postrat) **(C)** o tratamento. O influxo foi avaliado como descrito em materiais e métodos. Os dados são apresentados como Média \pm SEM em experimentos independentes realizados em triplicatas de 9 sujeitos controles (ctrl) e 14 pacientes hipertireoideos (hiper), sendo 6 homens e 8 mulheres. * $p < 0,05$ vs homens.

Tabela 9: Porcentagens de Influxo de $^{125}\text{I-T}_3$ em hemácias de pacientes hipertireoideos, homens e mulheres, antes (pretrat) e após (postrat) o tratamento e do grupo controle (ctrl)

Tempo (min)	Influxo (Média \pm SEM) (%)					
	Ctrl		Pretrat		Postrat	
	Homens	Mulheres	Homens	Mulheres	Homens	Mulheres
1	6,59 \pm 0,91	5,15 \pm 0,21* (22)	5,57 \pm 0,35	6,46 \pm 0,42 (16)	4,20 \pm 0,35	3,60 \pm 0,22 (14)
5	8,58 \pm 1,11	8,51 \pm 0,39 (1)	8,59 \pm 0,54	10,50 \pm 0,48* (22)	7,67 \pm 0,69	6,89 \pm 0,55 (10)

10	10,22±1,69	13,27±0,41* (30)	10,49±0,87	15,11±0,77* (44)	11,07±1,24	10,68±1,01 (4)
30	15,75±1,84	20,42±0,75* (30)	15,72±1,09	23,07±1,26* (47)	16,96±1,42	17,70±1,41 (4)
60	20,68±2,40	23,77±1,16 (15)	18,35±1,14	25,41±1,23* (39)	21,39±1,10	21,72±1,40 (2)
120	22,67±2,69	23,46±1,15 (4)	18,67±1,22	25,23±1,31* (35)	21,82±1,12	22,15±1,31 (2)

*p<0,05 vs homens dentro de seus grupos. Entre parênteses a diferença (%) de redução ou incremento do influxo em relação ao grupo homens.

5.10 - Influxo de $^{125}\text{I-T}_4$ em hemácias de indivíduos do grupo controle e pacientes hipertireoideos, homens e mulheres, antes e após o tratamento.

Os dados de influxo de $^{125}\text{I-T}_4$ em hemácias dos indivíduos do grupo controle e dos pacientes hipertireoideos, antes e após o tratamento, também foram analisados separadamente em grupos de homens e mulheres. Os resultados podem ser observados no gráfico 12 e na tabela 10.

Como foi mostrado anteriormente, o influxo de $^{125}\text{I-T}_4$ não mostrou diferença estatística entre as hemácias do grupo controle e as hemácias dos pacientes hipertireoideos antes do tratamento (gráfico 2). Quando os dados foram separados por gênero, a diferença estatística mais significativa foi entre pacientes hipertireoideos, mulheres e homens, antes do tratamento (gráfico 12-B). Apenas em 1 minuto de efluxo não houve diferença estatística entre mulheres e homens na porcentagem de influxo, nos tempos seguintes esta diferença foi aumentando. As porcentagens de influxo, para mulheres e homens, nos tempos de 1, 5, 15, 30, 60 e 120 minutos foram respectivamente: 2,87±0,12 e 2,81±0,11; 4,80±0,49 e 3,12±0,22; 6,75±0,53 e 3,57±0,35; 11,11±1,01 e 4,65±0,44; 12,20±1,01 e 5,44±0,46; 11,93±1,01 e 5,70±0,49. Estas diferenças nos influxos foram de 54, 89, 139, 124 e 109% para os tempos de 5, 15, 30, 60 e 120 minutos de influxo, respectivamente.

Na separação dos dados por gênero, nos indivíduos do grupo controle, apenas em 1 minuto houve diferença estatística entre as porcentagens de influxo nas hemácias de mulheres e homens (gráfico 12-A) 2,55±0,12 e 3,70±0,30, respectivamente, esta diferença foi de 31%. Em todos os outros tempos não houve diferença estatística.

Da mesma maneira não houve diferença entre as porcentagens de influxo em hemácias de mulheres e homens hipertireoideos depois do tratamento (gráfico 12-C).

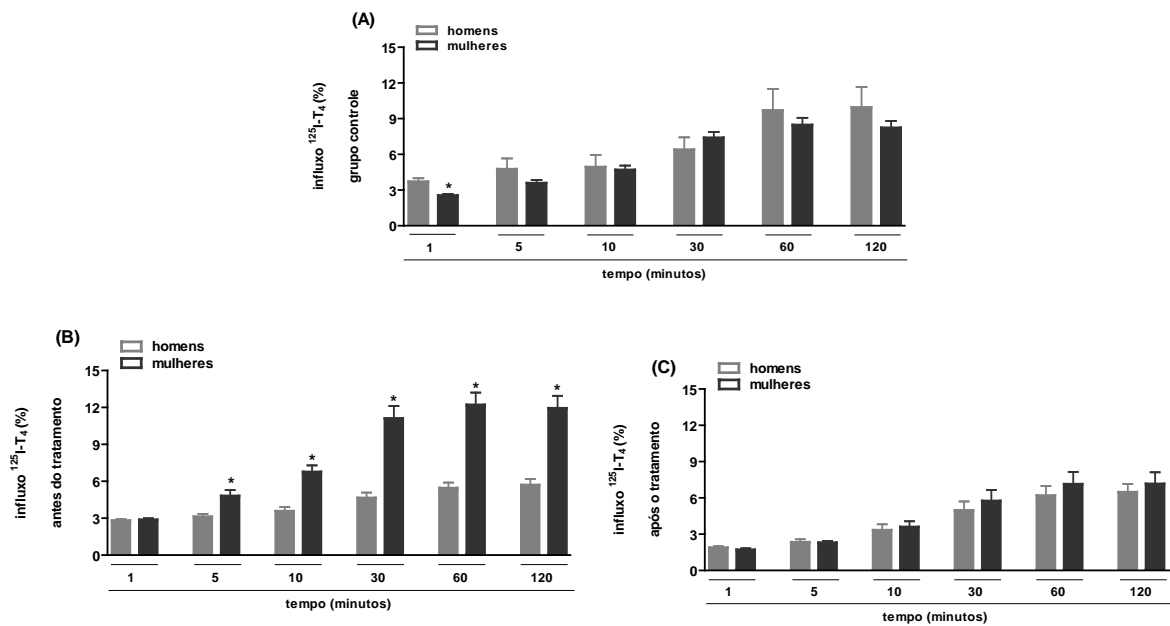


Gráfico 12 - Influxo de $^{125}\text{I-T}_4$ em hemácias de indivíduos do grupo controle (A) e de pacientes hipertireoideos, homens e mulheres, antes (B) e após (C) o tratamento. O influxo foi avaliado como descrito em materiais e métodos. Os dados são apresentados como Média \pm SEM em experimentos independentes realizados em triplicatas de 9 sujeitos controles e 14 pacientes hipertireoideos, sendo 6 homens e 8 mulheres. * $p < 0,05$ vs homens.

Tabela 10: Porcentagens de Influxo de $^{125}\text{I-T}_4$ em hemácias de pacientes hipertireoideos, homens e mulheres, antes (pretrat) e após (postrat) o tratamento e do grupo controle (ctrl).

Tempo (min)	Influxo (Média \pm SEM) (%)					
	Ctrl		Pretrat		Postrat	
	Homens	Mulheres	Homens	Mulheres	Homens	Mulheres
1	3,70 \pm 0,30	2,55 \pm 0,12* (31)	2,81 \pm 0,11	2,87 \pm 0,12 (2)	1,88 \pm 0,12	1,77 \pm 0,12 (6)
5	4,75 \pm 0,90	3,59 \pm 0,25 (24)	3,12 \pm 0,22	4,80 \pm 0,49* (54)	2,34 \pm 0,24	2,30 \pm 0,14 (2)
10	4,93 \pm 1,03	4,69 \pm 0,37 (5)	3,57 \pm 0,35	6,75 \pm 0,53* (89)	3,33 \pm 0,49	3,60 \pm 0,47 (8)
30	6,39 \pm 1,04	7,39 \pm 0,49 (16)	4,65 \pm 0,44	11,11 \pm 1,01* (139)	4,97 \pm 0,74	5,74 \pm 0,92 (16)
60	9,70 \pm 1,80	8,47 \pm 0,60 (13)	5,44 \pm 0,46	12,20 \pm 1,01* (124)	6,19 \pm 0,79	7,13 \pm 1,02 (15)
120	9,94 \pm 1,73	8,24 \pm 0,57 (17)	5,70 \pm 0,49	11,93 \pm 1,01* (109)	6,47 \pm 0,68	7,16 \pm 0,96 (11)

* $p < 0,05$ vs homens dentro de seus grupos. Entre parênteses a diferença (%) de redução ou incremento do influxo em relação ao grupo homens.

5.11 - Efluxo de $^{125}\text{I-T}_3$ em hemácias de indivíduos do grupo controle e pacientes hipertireoideos, homens e mulheres, antes e após o tratamento.

Para a caracterização completa dos resultados de transportes, agora separados por gênero, foram analisados os dados dos ensaios de efluxo de $^{125}\text{I-T}_3$ em hemácias de indivíduos do grupo controle e de pacientes hipertireoideos antes e após o tratamento, os dados podem ser observados no gráfico 13 e na tabela 11.

A separação por gênero do efluxo de $^{125}\text{I-T}_3$ em hemácias de mulheres e homens do grupo controle mostrou diferença estatística apenas nas porcentagens de efluxo em 30 e 60 minutos ($69,51 \pm 1,09$ e $65,26 \pm 1,09$; $88,53 \pm 0,64$ e $85,18 \pm 0,92$, respectivamente para mulheres e homens). Os incrementos na diferença de efluxo das mulheres em relação aos homens foram, respectivamente para 30 e 60 minutos de 7% e 4% (gráfico 13-A).

Como pode ser observado no gráfico 13-B e na tabela 13, as porcentagens de exportação de $^{125}\text{I-T}_3$ em hemácias de homens e mulheres hipertireoideos antes do tratamento foram estatisticamente iguais.

Após o tratamento, as porcentagens de efluxo nas hemácias dos pacientes mulheres e homens diferenciaram-se estatisticamente em 15, 30 e 60 minutos ($47,36 \pm 1,59$ e $52,36 \pm 1,00$; $68,44 \pm 1,41$ e $74,43 \pm 1,06$; $88,46 \pm 0,90$ e $91,96 \pm 0,54$, respectivamente) (gráfico 13-C).

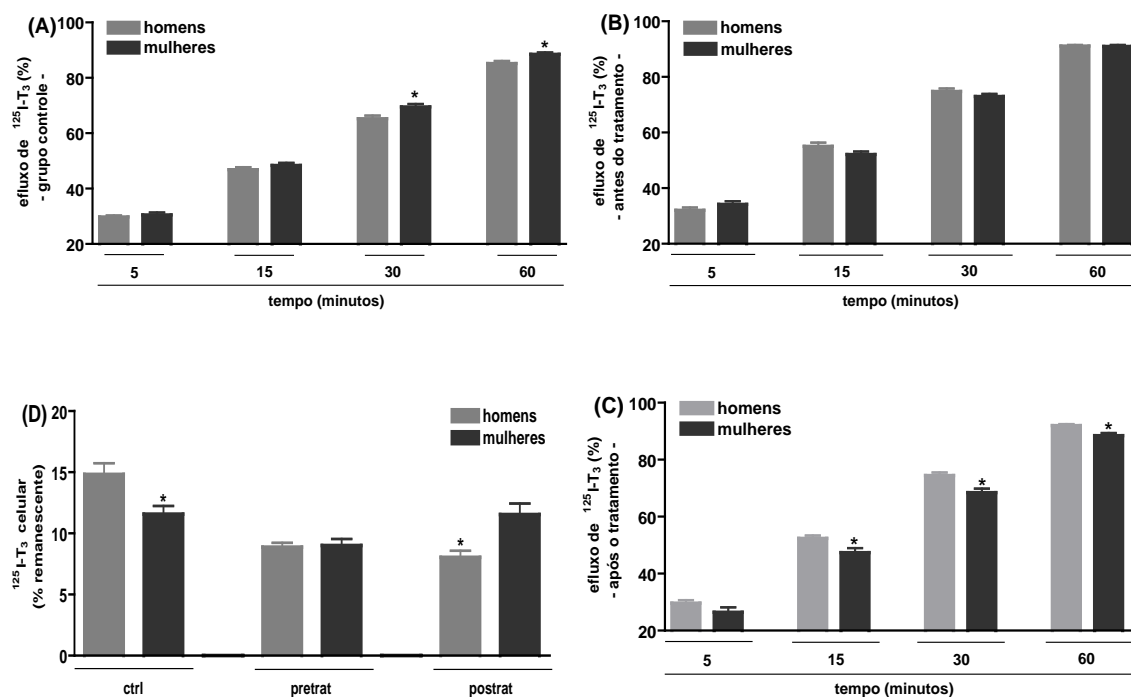


Gráfico 13 - Efluxo de $^{125}\text{I-T}_3$ em hemácias de indivíduos do grupo controle, homens e mulheres (A) e de pacientes hipertireoideos, homens e mulheres, antes (B) e após (C) o tratamento. O total remanescente após os 60 minutos de efluxo está mostrado em (D). O efluxo

foi avaliado como descrito em materiais e métodos. Os dados são apresentados como Média±SEM em experimentos independentes realizados em triplicatas de 9 sujeitos controles e 14 pacientes hipertireoideos, sendo 6 homens e 8 mulheres. *p<0,05 vs homens dentro de seus grupos.

Tabela 11: Porcentagens de Efluxo de ¹²⁵I-T₃ em hemácias de pacientes hipertireoideos, homens e mulheres, antes (pretrat) e após (postrat) o tratamento e do grupo controle (ctrl)

Tempo (min)	Efluxo (Média±SEM) (%)					
	Ctrl		Pretrat		Postrat	
	Homens	Mulheres	Homens	Mulheres	Homens	Mulheres
5	29,76±0,53	30,49±0,91 (3)	32,05±0,96	34,17±1,15 (7)	29,66±1,03	26,45±1,74 (11)
15	46,83±0,97	48,37±0,93 (3)	55,07±1,29	52,13±1,02 (5)	52,36±1,00	47,36±1,59* (10)
30	65,26±1,09	69,51±1,09* (7)	74,79±1,04	72,95±0,92 (3)	74,43±1,06	68,44±1,41* (8)
60	85,18±0,92	88,53±0,64* (4)	90,99±0,52	91,13±0,36 (0)	91,96±0,54	88,46±0,90* (4)

*p<0,05 vs homens dentro de seus grupos. Entre parênteses a diferença (%) de redução ou incremento do efluxo em relação ao grupo homens.

A porcentagem remanescente, após 60 minutos de efluxo, de ¹²⁵I-T₃ em hemácias de homens e mulheres do grupo controle foi estatisticamente diferente sendo que em mulheres a porcentagem foi menor do que em homens (4%). A porcentagem de hormônio remanescente em hemácias de pacientes homens e mulheres antes do tratamento foi estatisticamente igual.

Interessante notar que a porcentagem remanescente em hemácias de mulheres após o tratamento foi, ao contrário do controle, maior do que nas hemácias de homens (4%).

5.12 - Efluxo de ¹²⁵I-T₄ em hemácias de indivíduos do grupo controle e pacientes hipertireoideos, homens e mulheres, antes e após o tratamento.

Concluindo o estudo do transporte por gênero, foram analisados os dados do efluxo de ¹²⁵I-T₄ em hemácias de homens e mulheres do grupo controle e dos pacientes hipertireoideos antes e após o tratamento. Estes resultados podem ser observados no gráfico 14 e na tabela 12.

O gráfico 14-A mostra as porcentagens de efluxo em hemácias de homens e mulheres do grupo controle. Não houve diferença estatística entre os dois gêneros (tabela 12). Entretanto, as porcentagens de efluxo em hemácias

de pacientes mulheres antes do tratamento apresentaram diferenças estatísticas em relação ao grupo de pacientes homens (gráfico 14-B). Nos tempos de efluxo de 5 e 15 minutos as porcentagens em hemácias de mulheres foram menores do que o efluxo nos homens (37,29±0,64 e 44,09±1,13; 58,83±0,49 e 63,05±0,80, respectivamente), a seguir, em 30 minutos (78,86±0,58 e 79,36±0,57) as porcentagens de extrusão se igualaram. Ao final do efluxo, em 60 minutos, as porcentagens se inverteram, as hemácias de mulheres exportaram mais $^{125}\text{I-T}_4$ em relação ao efluxo em hemácias de homens (93,87±0,32 e 92,18±0,58, respectivamente).

Após o tratamento, o comportamento modifica-se e em 5 e 15 minutos de efluxo as porcentagens foram iguais, somente em 30 e em 60 minutos a porcentagem de exportação em mulheres foi menor do que em homens (73,43±1,31 e 76,89±0,86; 91,02±0,46 e 92,66±0,24, respectivamente).

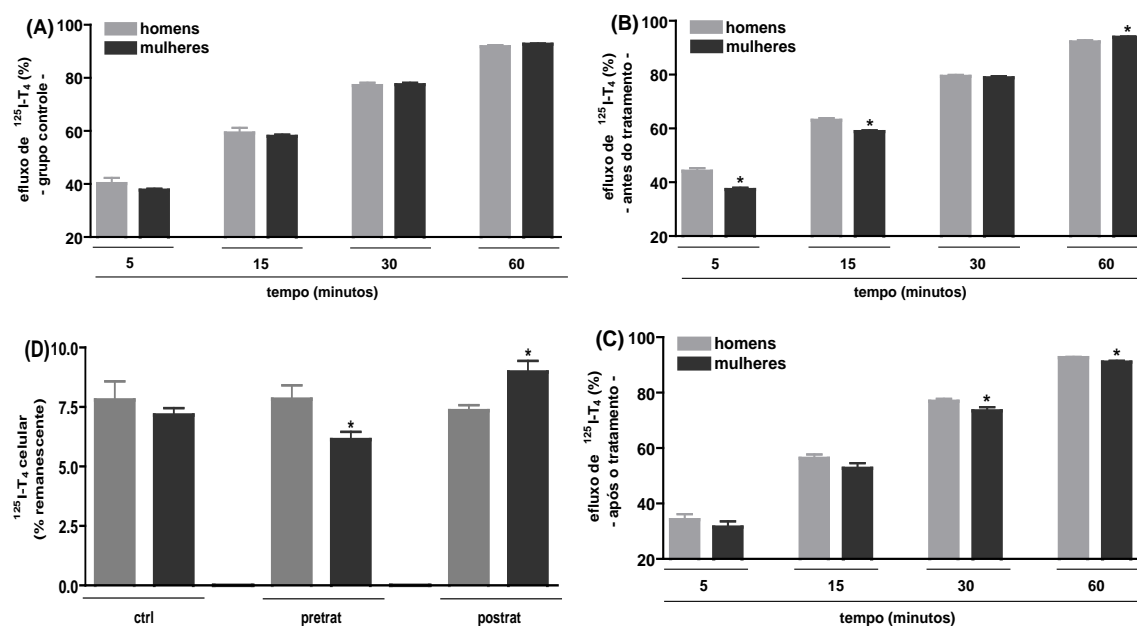


Gráfico 14 - Efluxo de $^{125}\text{I-T}_3$ em hemácias de indivíduos do grupo controle, homens e mulheres (A) e de pacientes hipertireoideos, homens e mulheres, antes (B) e após (C) o tratamento. O total remanescente após os 60 minutos de efluxo está mostrado em (D). O efluxo foi avaliado como descrito em materiais e métodos. Os dados são apresentados como Média±SEM em experimentos independentes realizados em triplicatas de 9 sujeitos controles e 14 pacientes hipertireoideos, sendo 6 homens e 8 mulheres. *p<0,05 vs homens, dentro de seus grupos.

Tabela 12: Porcentagens de Efluxo de $^{125}\text{I-T}_4$ em hemácias de pacientes hipertireoideos, homens e mulheres, antes (pretrat) e após (postrat) o tratamento e do grupo controle (ctrl).

Tempo (min)	Efluxo (Média±SEM) (%)					
	Ctrl		Pretrat		Postrat	
	Homens	Mulheres	Homens	Mulheres	Homens	Mulheres
5	40,15±2,18	37,69±0,54 (6)	44,09±1,13	37,29±0,64* (15)	34,16±2,04	31,52±2,04 (8)
15	59,24±1,89	57,97±0,68 (2)	63,05±0,80	58,83±0,49* (7)	56,28±1,42	52,70±1,90 (6)
30	77,08±1,11	77,44±0,75 (1)	79,36±0,57	78,86±0,58 (1)	76,89±0,86	73,43±1,31* (5)
60	91,78±0,56	92,68±0,33 (1)	92,18±0,58	93,87±0,32* (2)	92,66±0,24	91,02±0,46* (2)

*p<0,05 vs homens dentro de seus grupos. Entre parênteses a diferença (%) de redução ou incremento do efluxo em relação ao grupo homens.

6. Discussão

Nossos resultados apontam para diferentes sistemas de regulação nos mecanismos de transporte - influxo e efluxo - em hemácias de pacientes hipotireoideos e hipertireoideos em relação ao grupo controle e em hemácias de pacientes hipertireoideos após o tratamento com ^{131}I .

Estas diferenças podem refletir condições de mecanismos adaptativos em diferentes tecidos como, por exemplo, em situações de alteração no *status* tireoideano e nutricional. Conforme foi demonstrado em estudo de perfusão em fígado de ratos eutireoideos, hipotireoideos e hipertireoideos. Fígados de animais hipotireoideos apresentaram transporte de T_3 normal e metabolismo diminuído, enquanto que animais hipertireoideos mostraram uma diminuição do transporte e aumento no metabolismo. Quando estes animais foram submetidos a um jejum de 48 horas, o fígado de ratos hipotireoideos diminuiu o transporte e o metabolismo, enquanto que hipertireoideos não sofreram alteração destes parâmetros em relação aos eutireoideos¹⁴³.

De acordo com nossos resultados há mecanismos de entrada e saída de hormônio nas hemácias de indivíduos do grupo controle e de pacientes hipotireoideos e hipertireoideos, evidenciando que a porcentagem de influxo não corresponde simetricamente o percentual no efluxo. Estes dados estão de acordo com o estudo em eritrócitos onde foi evidenciado que o influxo de T_3 revelou, pela constante de Michaelis (K_M), dois sistemas separados, de $1,6 \times 10^{-8}\text{M}$ e $3,3 \times 10^{-6}\text{M}$ e que a concentração do hormônio foi seis vezes maior no meio intracelular em relação ao extracelular. Portanto, demonstrando a existência de ligação de T_3 à membrana plasmática e seu transporte através da mesma¹⁴⁴.

O influxo de $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ foi menor em hemácias de pacientes hipotireoideos quando comparado ao influxo nas hemácias do grupo controle (ctrl) em 1 e 5 minutos. O influxo de $^{125}\text{I}-\text{T}_3$ em hemácias de pacientes hipertireoideos não diferiu do grupo controle. Estes resultados são semelhantes ao observado em ensaios realizados em eritrócitos isolados de indivíduos com hipotireoidismo e hipertireoidismo nos quais em 1 minuto foi evidenciado diminuição e aumento, respectivamente, da velocidade máxima de entrada de T_3 quando comparada ao transporte em eritrócitos de sujeitos controle¹⁴⁵. Contudo, são discordantes do que foi mostrado em experimento realizado em eritrócitos de ratos, onde os autores demonstraram um aumento nos parâmetros cinéticos (velocidade

máxima e constante de Michaelis) no influxo em hemácias de ratos hipotireoideos e diminuição em condição de hipertireoidismo¹³⁰. Embora esta última condição represente um padrão para avaliação de hipotireoidismo e hipertireoidismo, deve-se destacar que neste artigo a alteração da função tireoideana foi procedente de ratos tireoidectomizados e/ou tratados posteriormente com altas doses de L-T₄.

Foram também identificadas importantes diferenças no mecanismo de transporte em células destas duas espécies, humanos e ratos, como a localização ou a presença de diferentes sistemas de transporte. Angel et al. (1989) reportaram a presença de sítios de ligação de T₃, específicos e de alta afinidade, na membrana de eritrócitos de ratos e humanos. Estes sítios comportavam-se como proteínas integrais de membrana em ratos, ou como periférica em humanos¹⁴⁵. Nesta mesma linha de pensamento, estudo observou, diferentemente do evidenciado em eritrócitos de ratos, que as hemácias humanas continham dois sistemas de transporte independentes de sódio: o sistema L (transportador de aminoácidos aromáticos e de aminoácidos de cadeia ramificada) e o sistema T (transportador de aminoácidos aromáticos específicos - tirosina, fenilalanina e triptofano)¹⁴⁷.

Após 10 minutos de influxo as porcentagens igualaram-se, provavelmente isto ocorra devido à influência do efluxo que é aumentado em hemácias de pacientes hipertireoideos e diminuído em hemácias de pacientes hipotireoideos.

Estudo em adipócitos isolados de ratos hipotireoideos, induzido após 28 dias de tratamento com propiltiouracil, verificou uma diminuição substancial (48%) no influxo de T₃ avaliado em 10 minutos e, em particular, de T₄ (79%) sugerindo que no estado hipotireoideo a regulação negativa no transporte da membrana celular tenderá a reduzir o catabolismo de T₄ e rT₃, ajudando a conservar o hormônio e iodo para outros tecidos¹³¹. Nossos resultados indicam, de forma semelhante, que a razão do influxo T₃/T₄ é de cerca de duas vezes, entretanto não é possível afirmar a existência de metabolismo de HT em hemácias.

Pesquisadores identificaram proteínas citosólicas implicadas no “seqüestro” intracelular de T₃^{151,153}. Segundo Eckel et al. (1979) o sistema de transporte de T₃ é realizado por um sistema de carreador saturável,

estereoespecífico e independente de sódio, deixando em destaque que o acúmulo intracelular e os movimentos rápidos transmembrana poderiam sugerir que os eritrócitos possam ter uma função importante no transporte entre diferentes órgãos¹⁵¹. A importância destas proteínas para o transporte pode ser esclarecida em um estudo em que hemácias *ghost*, células com ausência de proteínas intracitoplasmáticas (i.e. vazias), de pacientes hipotireóides e hipertireóides passaram a não diferir no acúmulo de HT, situação que anteriormente era contrária¹⁴⁴.

Por fim, foi observado que a concentração de HT intracelular poderia estar sujeita a alterações em proteínas de ligação (proteína de ligação citoplasmática ao HT (CTHBP)), possivelmente favorecendo a extrusão do hormônio. Podemos sugerir, diante disso, que proteínas citoplasmáticas de eritrócitos talvez sejam reguladas pelo *status* tireóideo^{151,153}.

Portanto, sugere-se que a condição de hipotireoidismo, hipertireoidismo e eutireoidismo mantêm, quantitativamente, a mesma condição basal de proteínas de ligação intracitoplasmática que se associam a HT. De forma que em nossos resultados, indivíduos eutireóides não apresentem nível de saturação de ligações a estas proteínas; indivíduos hipotireóides possuam poucos vínculos, provavelmente devido à quantidade de hormônio a que estão expostas as células; e indivíduos hipertireóides apresentem saturação completa. Este mecanismo pode refletir no que foi observado no efluxo, uma vez que proteínas de ligação intracitoplasmática são facilitadoras da saída do hormônio presente no interior da célula.

Da mesma maneira, como anteriormente discutido sobre proteínas citoplasmáticas, podemos aludir que as proteínas transportadoras de HT apresentem mecanismo de regulação semelhante. Assim, diante da hipótese de que hemácias possam participar ativamente na manutenção da homeostase do hormônio²⁰ e de que há regulação na expressão de transportadores de membrana, a ausência de diferença significativa entre o influxo de ¹²⁵I-T₃ em hemácias do grupo controle e pacientes hipertireóides, ainda que com tendência a elevação, possivelmente represente o transporte com a expressão máxima destas proteínas. A presença do hormônio ou outra condição sinalizadora poderia facilitar a exposição de sítios de ligação, isto está de acordo com o que foi descrito indicando que há uma influência das

concentrações de HT regulando negativamente, em hipotireoidismo, ou positivamente, em hipertireoidismo, o número de carreadores de membrana ou a relocação dos sítios de ligação¹⁵⁴.

Comportamento contrário no transporte de HT foi observado em hemácias de paciente hipotireoideos. Baixas concentrações de HT não foram capazes sequer de sensibilizar e ativar o nível basal dos transportadores da membrana celular. Nesta mesma perspectiva, foi demonstrado que o número de sítios de ligação para T₃ em membranas de eritrócitos de rato encontrava-se aumentado em duas e três vezes após incubação a 37°C e 50°C, respectivamente, durante 60 minutos e quando tratadas com inibidores de proteases este efeito foi abolido, implicando que algumas atividades proteolíticas podem estar envolvidas no aumento do número de sítios de membrana, que permaneceriam latentes¹⁵².

A diferença no transporte de HT em hemácias de pacientes hipotireoideos pode, ainda, ser compreendido pelo papel autoregulador de HT¹⁵⁵. Em hipotireoideos a diminuição no metabolismo provocada pelo déficit de hormônio pode por si desenvolver um quadro de balanço energético negativo, como já observado em casos de jejum prolongado, pacientes obesos com deprivação calórica e doenças não tireoideanas^{66,124,125}. Assim como em anfíbios, em que o gene IU12, parte integrante de uma das proteínas que transportam HT para dentro da célula, é regulada pela ação nuclear do próprio hormônio⁸⁹. Reconhecendo que a grande maioria dos autores define o processo de transferência do HT em hemácias como sendo ativo, a energia é constantemente requerida, podendo implicar que o declínio na fonte de energia é importante também para o efluxo destes pacientes.

Requisição de HT por hemácias ocorre na fase nucleada e madura para diferentes finalidades. Na fase nucleada a necessidade do hormônio está diretamente relacionada à função nuclear e, posteriormente, a célula madura requer consistentemente HT - mais T₃ que T₄ -, por algum outro motivo que não o de ligação nuclear ao TR. Pode-se sugerir que a atividade do hormônio, neste caso, seja não genômica^{4,155}. Portanto, concluí-se que toda a programação em hemácias é determinada em sua origem, no eritroblasto. Desta forma, no hipotireoidismo as células interpretam que há carência na

circulação e necessariamente é preciso mantê-lo internamente para manutenção própria.

Considerando que haja ação de desidases em eritrócitos, estes resultados podem representar que no estado hipotireoideo a regulação negativa no transporte da membrana celular tenderá a reduzir o catabolismo de T_4 e rT_3 ajudando a conservar o hormônio e iodo para outros tecidos.

A sugestão de que os eritrócitos comportem-se como transportadores de HT entre os diversos órgãos, já que o compartimento intracelular destas células em ratos apresentou maior quantidade de T_3 em relação à livre no plasma^{148,149}, permitindo que o hormônio atinja os sítios de ação de desidases para sua inativação, especialmente fígado e rim, parece ser menos viável para pacientes hipotireoideos, uma vez que o eritrócito retém T_3 . A preferência pela entrada maior de T_3 em relação a T_4 nas hemácias destes pacientes pode implicar em necessidade para atividade própria do hormônio bioativo.

Em hemácias de pacientes hipertireoideos a entrada do $^{125}\text{I}-T_3$ foi modestamente maior e a saída significativamente maior. A idéia de função transportadora, neste caso, também parece ser pouco tangível, embora permita maior saída de T_3 para o meio extracelular, a entrada não foi estatisticamente maior. No intuito de manter a homeostase e que a hemácia se comportasse, provavelmente, como um compartimento de seqüestro (armazenamento) deveria entrar mais hormônio e sair em igual proporção para que, uma vez liberada nos tecidos, pudesse sofrer atuação das desidases.

Experimento onde eritrócitos foram pré-tratados com $^{125}\text{I}-T_3$ e a suspensão resultante foi, em seguida, incubada com cultura de hepatócitos, demonstrou que há capacidade aumentada em 1,5 vezes de transferência do hormônio das hemácias para a cultura de hepatócitos, sugerindo que estes estariam envolvidos na suplementação de T_3 em células-alvo. Entretanto, quando à solução foi acrescentado plasma diluído 1:16 um aumento de 2 vezes foi verificado¹⁵⁶. Este trabalho não determinou a relação direta entre o transporte. Ressalvas devem, portanto, ser consideradas. O hormônio pode ter sido liberado na solução e posteriormente captado pelos hepatócitos e não necessariamente que o eritrócito seja um transportador entre os órgãos. A presença do plasma alterou a velocidade de transporte, implicando que talvez não seja o eritrócito responsável direto pelo transporte, mas talvez substâncias

presentes no plasma. Situação que pode ser concreta, também, *in vivo* já que a corrente sanguínea é a provedora de hormônio ligado às proteínas séricas de transporte sem o gasto de energia que é requerido para o mecanismo de transporte na entrada e saída de HT.

Podemos considerar, contudo, que há uma fina sintonia no controle do transporte de T_3 , principalmente pelo efluxo, e que a hemácia poderia, no organismo, atuar ora como mantenedora de hormônio intracelular devido às próprias necessidades em hipotireoideos e ora com extrusão aumentada em hipertireoideos devido ao excesso de hormônio circulante.

Na avaliação do transporte de $^{125}\text{I-T}_4$ o influxo foi menor em hemácias de pacientes hipotireoideos em relação ao grupo controle em 1 e 5 minutos, e em hemácias de pacientes hipertireoideos não houve diferença, embora a partir de 30 minutos foi demonstrada uma tendência por uma entrada maior do hormônio em eritrócitos de pacientes hipertireoideos. As duas situações, em hipotireoidismo e hipertireoidismo, foram igualmente observadas no influxo de $^{125}\text{I-T}_3$, mas em torno de duas vezes menor em $^{125}\text{I-T}_4$.

O comportamento de transporte no influxo tão semelhantes em T_3 e T_4 pode sugerir que a entrada dos dois hormônios seja mediada pela mesma proteína, todavia com afinidades diferentes, maior para $^{125}\text{I-T}_3$ que para $^{125}\text{I-T}_4$ ou, em outra análise, a presença de dois transportadores independentes com expressões ou afinidades também diferentes para os dois hormônios. A primeira perspectiva é plausível quando comparada ao reportado por Zhou et al. em 1990 que pesquisando o transporte em eritrócitos de ratos evidenciaram que T_4 inibiu o transporte de T_3 , sugerindo que os dois hormônios poderiam utilizar-se do mesmo sistema de transporte¹⁴⁷. Todavia, este mesmo artigo define que o transporte em células vermelhas do sangue de rato e humanos é diferente. Enquanto ratos parecem apresentar um sistema único de transporte, humanos contam com pelo menos dois sistemas de transporte, os sistemas L e T. Contudo, os transportadores L e T podem ser considerados como transportadores multiespecíficos, uma vez que transportam também aminoácidos^{72,150}. Outros autores inferiram sobre a existência de vias de “contratransporte” em células alvo que poderiam explicar as discrepâncias, em alguns estudos, do papel do sódio e ATP no influxo de HT. Em eritrócitos de ratos o sistema T mostrou propriedades de trocas assimétricas. A presença do

triptofano inibiu a saída e estimulou a entrada do T_3 , comportamento semelhante ao observado em hemácias humanas, sugerindo um carreador simples para ambos na entrada. A adição de aminoácidos aromáticos também acelerou o influxo de T_3 , como se fosse mediado pelo sistema T, apresentando como conseqüência um aumento na concentração intracelular de T_3 em relação à extracelular. Não se sabe se, *in vivo*, eritrócitos de ratos poderiam acumular suficientemente altos níveis intracelulares de aminoácidos aromáticos para manter um sustentável “contrafluxo” de T_3 . Especula-se que, se efetivo, o mecanismo indireto de “contratransporte” seria de grande importância em células-alvo¹⁵⁰. A segunda perspectiva é semelhante ao que foi apresentado por Botta et al. (1983) e Osty et al. (1988) que em experimentos de ligação com D- T_3 , D- T_4 , L- T_4 , r T_3 e ácido triiodotiroacético em hemácias de ratos evidenciaram alta estereoespecificidade, onde estes substratos fracamente inibiram a ligação de $^{125}\text{I}-T_3$ ^{70,148}.

O efluxo de $^{125}\text{I}-T_4$ em hemácias de pacientes hipotireoideos e hipertireoideos foi igual ao grupo controle, com exceção do tempo de 5 minutos, no qual a saída do hormônio em hemácias de pacientes hipotireoideos foi menor sugerindo que, de acordo com o discutido acima, a célula interpreta como uma situação aguda equivalendo-se em seguida. Condição também cogitada por McLeese et al. (1996), onde inferiram que o influxo de T_3 e T_4 em eritrócitos de truta pode ter implicações fisiológicas para a regulação aguda e crônica no plasma⁸⁷.

Verificou-se, desta forma, que há diferença no influxo ($^{125}\text{I}-T_3$ e $^{125}\text{I}-T_4$) e efluxo ($^{125}\text{I}-T_3$) em hemácias de pacientes hipotireoideos e apenas na saída em hemácias de pacientes hipertireoideos ($^{125}\text{I}-T_3$) com maior índice de extrusão.

Ainda, em nossos ensaios, a razão de entrada entre T_3 e T_4 é de aproximadamente duas vezes nos três grupos avaliados, ou seja, a célula permite duas vezes maior entrada de T_3 que T_4 . Diante do que se sabe sobre a fisiologia dos dois hormônios T_4 é liberado pela tireóide em torno de 40 vezes mais que T_3 e sua atividade é indireta, por isso é considerado um pró-hormônio, talvez a afinidade esteja, então, relacionada à efetividade direta do T_3 .

Diante das evidências dos diferentes mecanismos de regulação no transporte e do fato de que pacientes hipertireoideos retornaram em condição

de eutireoidismo, foi avaliado se o tratamento poderia atuar corrigindo o mecanismo de transporte em eritrócitos.

Experimentos em hemácias de pacientes hipertireoideos após o tratamento evidenciaram, em 1 e 5 minutos, uma diminuição no influxo de $^{125}\text{I-T}_3$ em relação ao influxo em hemácias do grupo controle e de pacientes hipertireoideos antes do tratamento, um comportamento bastante semelhante ao transporte em hemácias de hipotireoideos. O efluxo de $^{125}\text{I-T}_3$ foi também menor após o tratamento.

No período da segunda coleta os pacientes estavam eutireoideos, ainda que a literatura discuta a chance de que em questão de anos estes pacientes desenvolverão, em sua maioria, quadro de hipotireoidismo³. Mesmo que, bioquimicamente, apresentem-se sob condição eutireoideana, os acontecimentos em nível molecular destes indivíduos tratados não foram normalizados permanecendo a questão sobre o papel de outro sinalizador que não unicamente a presença física do hormônio. A desestruturação parece ser mais ampla. Em hepatócitos o sistema de influxo está intimamente relacionado com as condições da estrutura de membrana celular, especialmente sua fluidez e adequada disposição lipídica¹⁵⁴. Em 1996, foram observados os efeitos do HT em fosfolipídeos de membrana celular de hemácias e a sua relação ao transporte de íons. Os autores constataram que em doença de Graves há alterações nos fosfolipídeos da membrana celular evidenciando um desarranjo com alteração na permeabilidade, neste caso no transporte de sódio e cálcio. Mostraram que o HT interfere na permeabilidade, quer seja de íons, mas que este quadro é possível¹⁵⁷. Outro trabalho também afirmou que há uma correlação positiva entre a ligação de T_3 na membrana de eritrócitos de ratos e as propriedades cinéticas de enzimas que interagem com a membrana mantendo ou participando indiretamente de sua fluidez¹³⁰. Existe a possibilidade de haver também outras interações na dinâmica da homeostase, que uma vez alteradas pelas condições corporais podem ocasionar distúrbios no transporte do hormônio. Foi observado que em pacientes em depressão unipolar havia um aumento no influxo de L-T_3 em hemácias que poderia ser causado por interação específica com certas moléculas de membrana e/ou por alterações nas propriedades da bicamada lipídica, nas quais os transportadores estão embebidos resultando em alteração conformacional do

sítio de ligação por interação alostérica com outras moléculas, ou como resultado da posição ou forma com que a proteína carreadora encontra-se embebida na bicamada lipídica e conseqüentemente alterando a acessibilidade ao sítio de ligação. Após o tratamento com fluvoxamina e conseqüente remissão clínica, o processo de influxo foi corrigido, sugerindo que há correlações entre a dinâmica dos componentes de membrana e outros fatores que não unicamente a disponibilidade direta do HT¹²⁸.

O influxo de ¹²⁵I-T₄ em hemácias de pacientes hipertireoideos após o tratamento foi significativamente menor em todos os tempos, valores mais baixos inclusive dos observados em pacientes hipotireoideos. Este comportamento pode ser explicado pela diferença brusca nos níveis séricos do hormônio. Considerando que, nesta situação, a interpretação dos eritrócitos pode estar relacionada aos índices de queda em valores absolutos do hormônio e não a valores relativos. Contudo, se durante a fase de eritroblasto estas células permaneceram por um período de tempo em déficit hormonal, entrando em hipotireoidismo transitório, não foi detectado em nossos experimentos.

O efluxo de ¹²⁵I-T₄ em hemácias de pacientes hipertireoideos após o tratamento não foi alterado. Entretanto, a maior evidência é que tanto na entrada como na saída de ¹²⁵I-T₄ o comportamento celular no transporte é semelhante a pacientes hipotireoideos. Como observado anteriormente, em pacientes hipotireoideos a razão entre efluxo de ¹²⁵I-T₄ e ¹²⁵I-T₃ foi de aproximadamente duas vezes, sendo que ¹²⁵I-T₄ saiu mais e o tratamento de hipertireoideos não mudou esta relação. Assim, após o tratamento estes pacientes liberam ambos os hormônios na mesma proporção, bastante semelhante à sua condição antes do tratamento. Isto pode explicar porque pacientes hipertireoideos, bioquimicamente estáveis após o tratamento, aparentemente não mostram que estejam clinicamente recuperados. A diferença observada nestes pacientes pode ser a implicação de alterações no mecanismo de transporte do hormônio nos tecidos.

Durante análise de nossos dados foi notado que pacientes apresentavam comportamentos diferentes no transporte de HT. Quando homens e mulheres foram avaliados separadamente, o grupo controle evidenciou pouca diferença, mas estatisticamente significante, no influxo de

$^{125}\text{I-T}_3$, evidenciando um aumento no influxo deste hormônio em hemácias do grupo feminino, estes resultados sugerem que homens e mulheres saudáveis possuam diferenças no influxo de HT em hemácias.

Semelhante padrão de transporte foi observado em homens e mulheres hipertireoideos antes do tratamento. Contudo, a diferença neste caso foi mais destacada, no grupo feminino a entrada de T_3 foi maior que no grupo masculino. Estas evidências podem estar associadas à maior susceptibilidade da enfermidade em mulheres. O tratamento, contudo, eliminou a diferença no transporte entre os gêneros. Outra possibilidade está relacionada às diferenças entre hormônios masculinos e femininos e suas relações com o organismo, conforme já descrito anteriormente que atividades de desidases, especialmente D1, parecem comportarem-se diferentemente em machos e fêmeas. Ratos machos apresentam aumento de atividade de D1 quando comparados às fêmeas e a gonadectomia eliminou esta diferença²².

O efluxo também foi maior em mulheres do grupo controle quando comparadas aos homens. Evento diferente foi observado em hemácias de pacientes hipertireoideas antes do tratamento que continuaram a permitir maior entrada do hormônio que homens, contudo a saída foi semelhante a dos homens. Aparentemente, a velocidade de extrusão em hemácias de pacientes hipertireoideas antes do tratamento pode ter sido maior, igualando-se aos homens.

A correção ocorrida no influxo após o tratamento não foi notada no efluxo. O efluxo foi maior em hemácias de pacientes hipertireoideos após o tratamento em relação às mulheres. Após o tratamento, as hemácias dos homens hipertireoideos retiveram menos hormônio e as hemácias das mulheres retiveram mais.

Hemácias de pacientes hipertireoideas antes do tratamento mostraram maior influxo de $^{125}\text{I-T}_4$ que homens. Surpreendentemente, as hemácias de homens praticamente não variaram em função do tempo de exposição ao hormônio. A razão ou diferença entre o influxo de $^{125}\text{I-T}_3$ e $^{125}\text{I-T}_4$, em hemácias de homens, está em torno de três a quatro vezes, enquanto que em mulheres é de aproximadamente 2,2 vezes indicando que, proporcionalmente, o influxo de $^{125}\text{I-T}_3$ foi maior em homens quando comparado ao $^{125}\text{I-T}_4$. Pode-se inferir que

exista diferenças na expressão de proteínas transportadoras em homens e mulheres para T_3 e T_4 .

Assim como no influxo de $^{125}\text{I}-T_3$, em pacientes hipertireoideos homens e mulheres após o tratamento, foi abolida a diferença entre os gêneros também na entrada de $^{125}\text{I}-T_4$. Curiosamente, o tratamento reduziu drasticamente o influxo de T_4 em hemácias de paciente hipertireoideas com pouco efeito sobre as hemácias dos pacientes hipertireoideos. Portanto, o tratamento pode ter alterado a expressão de proteínas de transporte de forma acentuada em mulheres ou ainda, pode ter alterado a presença de inibidores ou facilitadores no transporte, entre homens e mulheres.

A diferença observada no efluxo de $^{125}\text{I}-T_3$ em hemácias do grupo controle masculino e feminino não foi demonstrada no efluxo de $^{125}\text{I}-T_4$. Entretanto, o oposto foi observado em pacientes hipertireoideos antes do tratamento. Enquanto o efluxo de $^{125}\text{I}-T_3$ em hemácias foi igual em homens e mulheres o efluxo de $^{125}\text{I}-T_4$ em mulheres, inicialmente, foi maior do que em homens e, finalmente, as mulheres retiveram menos hormônio que os homens. O tratamento igualou estes parâmetros, a saída dos dois hormônios foi semelhante. Enquanto que no influxo, em nossos resultados, há uma chance maior da participação de mais de uma proteína transportadora para T_3 e T_4 , o efluxo de homens e mulheres após o tratamento pode ser realizado pela mesma proteína transportadora com diferente afinidade.

Assim, mulheres possuem uma conduta protótipo como descrito na literatura em hemácias e em outras células para $^{125}\text{I}-T_3$ e $^{125}\text{I}-T_4$ e, conforme já discutido por Holm (1989), o influxo observado estava aumentado em estado hipertireoideo e diminuído após o tratamento e ainda mulheres tinham, algumas vezes, baixo K_M , mas $V_{m\acute{a}x}$ semelhante quando comparadas aos homens¹⁴⁶.

Originalmente as diferenças entre o masculino e o feminino, de forma bastante abrangente, é hormonal. Assim, a informação que se tem é que o estrogênio compete em ligação pela TBG, então, em uma fase do ciclo hormonal feminino, poderia haver menos HT ligado à TBG e sabe-se que as proteínas de ligação plasmáticas auxiliam no transporte do hormônio, impedindo a entrada na célula¹⁵³. Entretanto, em se tratando de indivíduos saudáveis, independente destas variáveis, o controle homeostático do hormônio permanece.

É importante ressaltar que embora as hemácias possam fornecer um aspecto geral do funcionamento do transporte em condições de hipotireoidismo e hipertireoidismo, ela pode não refletir necessariamente o que acontece em todos os tecidos. Exemplo disso é o trabalho de Hennemann et al. (1993) que em estudos de pacientes com concentração plasmática de T_3 baixa e T_4 normal, o transporte de T_4 dentro do fígado estava diminuído, mas mostrava-se normal em outros tecidos não hepáticos. O transporte de T_3 não estava alterado e a atividade de desidases hepáticas estava dentro dos padrões normais. Assim, concluíram que a baixa produção de T_3 foi causada pela inibição no transporte de T_4 no fígado, mas não em outros tecidos¹⁵⁸. Enfim, hemácias poderão ser vistas como um indicador do trânsito de HT no organismo, mas não definir uma situação geral na dinâmica dos tecidos *in vivo*.

O paradigma moderno da ação do HT também reconhece que a sinalização do HT em tecidos individualmente pode ser alterado quando as concentrações hormonais no soro permanecerem normais, estabelecendo assim os conceitos de ativação ou inativação local do HT. São as iodotironinas desidases tipos 1, 2 e 3 que exercem o papel regulatório sobre a atividade do HT de maneira tecido-específica. Prova disso é que doses habituais de T_3 diminuem TSH para níveis normais em pacientes com hipotireoidismo em cerca de uma semana, mas a resposta a doses de T_4 é mais lenta o que pode também estar implicado, como visto anteriormente, com as características de transporte individualmente nos tecidos²⁰. E quando administrado cronicamente, a potência de T_3 como um inibidor da secreção de TSH é de cerca de três vezes maior do que a de T_4 . Estes resultados indicam que a produção de T_3 em diferentes tecidos é regulada de maneira diferente, e que as mudanças no *status* tireoideano periférico ou a produção do HT, representada pelos níveis circulantes, não são os únicos determinantes na disponibilidade intracelular de T_3 ²⁰.

Contudo, sabe-se que as desidases não são expressas igualmente em todos os tecidos, inclusive não há menção sobre a possibilidade de que possa estar presente em hemácias. Ainda assim, uma extrapolação de sua ação pode ser ponderada. O que se poderia esperar diante do discutido acima é que T_3 e T_4 , sendo transportados ou metabolizados pelos eritrócitos, em pacientes hipertireoideos necessariamente deveriam ser metabolizados evitando, desta

forma, sua alta concentração no plasma. Nesta condição o trabalho desenvolvido com co-expressão de desidase e proteínas transportadoras com conseqüente aumento no metabolismo de HT pode representar uma relação cooperativa direta entre as atividades enzimáticas e de transporte também nestas alterações de tireóide¹⁵⁸. A demonstração que D1 é maior em homens que em mulheres e que a gonadectomia elimina este efeito podem representar alguma informação importante para estas diferenças entre os gêneros, caso haja, realmente, esta correlação entre hormônio feminino e masculino, desidases e proteínas transportadoras em hemácias²².

D1 de pacientes hipertireoideos é um importante fator na geração extratireoidal de T_3 ou rT_3 , dado que o gene *dio1* é regulado positivamente por T_3 e *dio2* negativamente. O mRNA de D2 encontra-se elevado no cérebro de hipotireoideos e mRNA de D3 no cérebro de hipertireoideos, possivelmente como mecanismo de defesa para preservar a integridade fisiológica do órgão, produzindo T_3 ou inativando HT, respectivamente²². Em todas as regiões onde mRNA D3 encontrava-se presente, seus níveis estavam aumentados de 4 a 50 vezes da passagem do eutireoideo para o hipertireoideo, contudo não foi detectado em cérebros de ratos hipotireoideos¹⁵⁹. A atividade de D3 não aumenta na placenta de ratos hipertireoideos, diferente do que foi observado no cérebro, indicando que o gene é diferencialmente responsivo a HT em diferentes tecidos⁸. Enfim, o que pode ser aferido diante das condições deste estudo em pacientes hipertireoideos e hipotireoideos é que, geralmente, em hipotireoidismo D1 e D3 estão diminuídas e D2 está aumentada e, em hipertireoidismo D1 e D3 estão aumentadas e D2, diminuída¹⁶⁰, contudo os mecanismos de regulação, de desidases e HT, podem variar nos diferentes tecidos.

7. Conclusão

- Há diferenças na regulação do transporte em hemácias de indivíduos do grupo controle e pacientes hipotireoideos e hipertireoideos;
- O influxo de $^{125}\text{I-T}_3$ e $^{125}\text{I-T}_4$ em hemácias de pacientes hipotireoideos foi menor, em 1 e 5 minutos, quando comparado a indivíduos do grupo controle;
- O influxo de $^{125}\text{I-T}_3$ e $^{125}\text{I-T}_4$ em hemácias de pacientes hipertireoideos foi estatisticamente igual a indivíduos do grupo controle;
- O efluxo de $^{125}\text{I-T}_3$ em hemácias foi menor em pacientes hipotireoideos e maior em hipertireoideos quando comparado a indivíduos do grupo controle em todos os tempos de extrusão avaliados;
- O efluxo de $^{125}\text{I-T}_4$ em hemácias de pacientes hipotireoideos foi menor, em 5 minutos, e, estatisticamente igual em pacientes hipertireoideos quando comparado a indivíduos do grupo controle;
- O influxo de $^{125}\text{I-T}_3$ em hemácias de pacientes hipertireoideos após o tratamento foi menor, em 1, 5 e 10 minutos de ensaio, e o influxo de $^{125}\text{I-T}_4$ foi menor em todos os tempos avaliados quando comparado à condição anterior ao tratamento;
- O efluxo de $^{125}\text{I-T}_3$ em hemácias de pacientes hipertireoideos após o tratamento foi igual no remanescente, e de $^{125}\text{I-T}_4$ foi menor quando comparado à condição anterior ao tratamento;
- Mulheres e homens, do grupo controle e pacientes hipertireoideos antes do tratamento, apresentam diferenças no transporte, influxo e efluxo, de $^{125}\text{I-T}_3$ e $^{125}\text{I-T}_4$;
- O influxo de $^{125}\text{I-T}_3$ e $^{125}\text{I-T}_4$ em hemácias de mulheres hipertireoideas antes do tratamento foi maior, entre 5 e 120 minutos de experimento, quando comparado aos homens do mesmo grupo;
- O efluxo de $^{125}\text{I-T}_3$ em hemácias de mulheres hipertireoideas antes do tratamento não foi estatisticamente diferente, e o de $^{125}\text{I-T}_4$ foi menor, em 5 e 10 minutos, e maior no remanescente do experimento, quando comparado aos homens do mesmo grupo nos tempos considerados para o ensaio;

- O influxo de $^{125}\text{I-T}_3$ e $^{125}\text{I-T}_4$ em hemácias de mulheres hipertireoideas após o tratamento foi estatisticamente igual, em todos os tempos considerados para o experimento, quando comparado aos homens do mesmo grupo;
- O efluxo de $^{125}\text{I-T}_3$ e $^{125}\text{I-T}_4$ em hemácias de mulheres hipertireoideas após o tratamento foi menor, quando comparado aos homens do mesmo grupo.

8. Bibliografia

1. Kasper DL, Braunwald E, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson JL. Harrison`s Principles of Internal Medicine 16th Edition Publisher: McGraw-Hill Professional 2004.
2. Ross DS. Thyroid hormone synthesis and physiology. <http://www.uptodate.com/online/content> 2008.
3. Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR. Williams Textbook of Endocrinology Ed. W.B. Saunders Company 1998 1819 p.
4. Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiological reviews*. 2001 81(3):1097-1142.
5. Vilar L, Casttelar E, Moura E, Leal E, Machado AC, Teixeira L, Campos R. *Endocrinologia Clínica* 2^aed. Ed. Medsi 2001 939 p.
6. Visser J. Thyroid metabolism. In:Thyroid disease manager. <http://www.thyroidmanager.org> 1999.
7. Engler D, Burger AG. The deiodination of the iodothyronines and of their derivatives in man. *Endocr Rev*. 1984 55:151-7.
8. Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocrine Reviews*. 2002 23(1):38-89.
9. Benvenga S, Robbins J. Thyroid hormone efflux from monolayer cultures of human fibroblasts and hepatocytes. Effect of lipoproteins and other thyroxine transport proteins. *Endocrinology*. 1998 139(10):4311-4318.
10. Bartalena L. Recent achievements in studies on thyroid hormone-binding proteins. *Endocr Rev*. 1990 Feb;11(1):47-64.
11. Kassem NA, Deane R, Segal MB, Preston JE. Role of transthyretin in thyroxine transfer from cerebrospinal fluid to brain and choroid plexus. *Am J Physiol*. 2006 29:R1310–R1315.
12. Murata T, Yamauchi K. Low-temperature arrest of the triiodothyronine-dependent transcription in *Rana catesbiana* red blood cells. *Endocrinology*. 2005 146(1): 256-264.
13. de Jong M, Visser TJ, Bernard BF, et al. Transport and metabolism of iodothyronine in cultured human hepatocytes. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993 77:139-43.
14. Bassett JHD, Harvey CB, Williams GR. Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2003 213:1-11.

15. Magner JA. Thyroid-stimulating hormone: biosynthesis, cell biology, and bioactivity. *Endocr Rev.* 1990 May;11(2):354-85.
16. Chopra IJ. Clinical review 86: Euthyroid sick syndrome: is it a misnomer? *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 Feb;82(2):329-34.
17. Davis PJ, Leonard JL, Davis FB. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Frontiers in Neuroendocrinology.* 2007 s/n:1-8.
18. St. Germain DL, Galton VL, Hernandez AH. Defining the roles of the iodothyronine deiodinases: current concepts and challenges. *Endocrinology.* Jan 2009.
19. Köhrle J. Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family. *Mol Cell Endocrinol.* 1999 151:103-119.
20. Bianco AC, Kim BW. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *The Journal of Clinical Investigation.* 2006 116(10):2571-2579.
21. Köhrle J. The selenoenzyme family of deiodinase isozymes controls local thyroid hormone availability. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders.* 2000 1:49-58.
22. Gereben B, Zeöld A, Dentice M, Salvatore D, Bianco AC. Activation and Inactivation of thyroid hormone by deiodinases: local action with general consequences. *Cell Mol Life Sci.* 2008 65:570-590.
23. Leonard JL, Visser TJ, Leonard DM. Characterization of the subunit structure of the catalytically active type 1 iodothyronine deiodinase. *J Biol Chem.* 2000 276:2600-2607.
24. Prabakaran D, Ahima RS, Harney JW, Berry MJ, Larsen PR, Arvan P. Polarized targeting of epithelial cell proteins in thyrocytes and MDCK cells. *J Cell Sci.* 1999 112:1247-1256.
25. Baqui MM, Gereben B, Harney JW, Larsen PR, Bianco AC. Distinct subcellular localization of transiently expressed types 1 and 2 iodothyronine deiodinases as determined by immunofluorescence confocal microscopy. *Endocrinology.* 2000 141:4309-4312.
26. Berry MJ, Kates AL, Larsen PR. Thyroid hormones regulates type 1 deiodinase messenger RNA in rat liver. *Mol Endocrinol.* 1990 4:743-748.
27. Miyashita K, Murakami M, Iriuchijima T, Takeuchi T, Mori M. Regulation of rat liver type 1 iodothyronine deiodinase mRNA levels by testosterone. *Mol Cell Endocrinol.* 1995 115:161-167.
28. Pekary AE, Berg L, Santini F, Chopra I, Hershman JM. Cytokines modulate type 1 iodothyronines deiodinases mRNA levels and enzyme

- activity in FRTL-5 rat thyroid cells. *Mol Cell Endocrinol.* 1994 101:R31-R35.
29. Boelen A, Mass MAW, Lowik CWGM, Platvoet MC, Wiersinga WM. Induced illness in interleukin-6 (IL-6) knock-out mice: casual role of IL-6 in the development of the low 3,5,3'-triiodothyronine syndrome. *Endocrinology.* 1996 137:5250-5254.
 30. Stouthard JM, van der Poll T, Endert E, Bakker PJ, Veenhof CH, Sauerwein HP, Romojin JA. Effects of acute and chronic interleukin-6 administration on thyroid metabolism in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994 79:1342-1346.
 31. Chopra IJ, Sakane S, Teco GNC. A study of serum concentration of tumor necrosis factor- α in thyroidal and nonthyroidal illness. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991 72:1113-1116.
 32. Schmutzler C, Jakobs TC, Dreher I, Glaser f, Köhrle J. Regulation of type 1 5'-deiodinase (5'D1) by proinflammatory cytokines in the human hepatocarcinoma cell line HepG2. *J Endocrinol Invest.* 1998 21:2-2.
 33. Toyoda N, Zavacki AM, Maia AL, Harney JW, Larsen PR. A novel retinoid X receptor-independent thyroid hormone response element is present in the human type 1 deiodinase gene. *Mol Cell Biol.* 1995 15:5100-5112.
 34. Salvatore D, Bartha T, Harney JW, Larsen PR. Molecular biological and biochemical characterization of the human type 2 selenodeiodinase. *Endocrinology.* 1996 137:3308-3315.
 35. Visser TJ, Leonard JL, Kaplan MM, Larsen PR. Kinetic evidence suggesting two mechanisms for iodothyronine 5'-deiodination in rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1982 79:5080-5084.
 36. Battes JM, St. Germain DL, Galton VA. Expression profiles of the three iodothyronines deiodinases, D1, D2 and D3, in the developing rat. *Endocrinology.* 1999 140:844-851.
 37. Kamiya Y, Murakami M, Araki O, Hosoi Y, Ogiwara T, Mizuma H, Mori M. Pretranslational regulation of rhythmic type II iodothyronine deiodinase expression by β -adrenergic mechanism in the rat pineal gland. *Endocrinology.* 1999 140:1272-1278.
 38. Molinero P, Osuna C, Guerrero JM. Type 2 thyroxine 5'-deiodinase in the rat thymus. *J Endocrinol.* 1995 146:105-111.
 39. Galton VA, Martinez E, Hernandez A, St. Germain EA, Bates JM, St. German DL. The type 2 iodothyronine deiodinase is expressed in the rat uterus and during pregnancy. *Endocrinology.* 2001 142:2123-2128.

40. Song S, Sorimachi K, Adachi K, Oka T. Biochemical and molecular biological evidence for the presence of type II iodothyronine deiodinase in mouse mammary gland. *Mol Cell Endocrinol.* 2000 160:173-181.
41. Mizuma H, Murakami M, Mori M. Thyroid hormone activation in human vascular smooth muscle cells: expression of type II iodothyronine deiodinase. *Circ Res.* 2001 88:313-318.
42. Murakami M, Araki O, Hosoi Y, Kamiya Y, Morimura T, Ogiwara T, Mizuma H, Mori M. Expression and regulation of type II iodothyronine deiodinase in human thyroid gland. *Endocrinology.* 2001 142:2961-2967.
43. Croteau W, Davey JC, Galton VA, St. Germain DL. Cloning of the mammalian type II iodothyronine deiodinase. A selenoprotein differentially expressed and regulated in human and rat brain and other tissues. *J Clin Invest.* 1996 98:405-417.
44. Kaplan MM, Pan C, Gordon PR, Lee JK, Gilchrest BA. Human epidermal keratinocytes in culture convert thyroxine to 3,5,3'-triiodothyronine by type II iodothyronine deiodination: a novel endocrine function of the skin. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988 66:815-822.
45. Bartha T, Kim SW, Salvatore D, Gereben B, Tu HM, Harney JW, Rudas P, Larsen PR. Characterization of the 5'-flanking and 5'-untranslated regions of the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-responsive human type 2 iodothyronine deiodinase gene. *Endocrinology.* 2000 141:229-237.
46. Ima Y, Toyoda N, Maeda A, Kadobayashi T, Wang F, Kuma K, Mitsushige N, Iwasaka T. Type 2 iodothyronine deiodinase expression is upregulated by protein kinase A-dependent pathway and is downregulated by protein kinase C-dependent pathway in cultured human thyroid cells. *Thyroid.* 2001 11:899-907.
47. Silva JE. Thyroid hormone control of thermogenesis and energy balance. *Thyroid.* 1995 5:481-492.
48. Burmeister LA, Pachucki J, St. Germain DL. Thyroid hormone inhibit type 2 iodothyronine deiodinase in the rat cerebral cortex by both pre- and posttranslational mechanisms. *Endocrinology.* 1997 138:5231-5237.
49. Guadano-Ferraz A, Escamez MJ, Rausell E, Bernal J. Expression of type 2 iodothyronine deiodinase in hypothyroid rat brain indicates an important role of thyroid hormone in the desensitization of specific primary sensory systems. *J Neurosci.* 1999 19:3430-3439
50. Halperin Y, Shapiro LE, Surks MI. Down-regulation of type II L-thyroxine, 5'-monodeiodinase in cultured GC cells: different pathways of regulation by L-triiodothyronine and 3,3',5'-triiodo-L-thyronine. *Endocrinology.* 1994 135:1464-1469.

51. Moreno M, Berry MJ, Horst C, Thomas R, Goglia F, Harney JW, Larsen PR, Visser TJ. Activation and inactivation of thyroid hormone by type I iodothyronine deiodinase. *FEBS Lett.* 1994 May;344(2-3):143-6.
52. Battes JM, Spate VL, Morris JS, St. Germain DL, Galton VA. Effects do selenium deficiency on tissue selenium content, deiodinase activity, and thyroid hormone economy in the rat during development. *Endocrinology.* 2000 141:2490-2500.
53. Schoenmakers CHH, Pigmans IGAJ, Visser TJ. Investigation of type I and III iodothyronine deiodinases in rat tissues using N-bromoacetyl-iodothyronine affinity labels. *Mol Cell Endocrinol.* 1995 107:173-180.
54. Baqui M, Botero D, Gereben B, Curcio C, Harney JW, Salvatore D, Sorimachi K, Larsen PR, Bianco AC. Human type 3 iodothyronine selenodeiodinase is located in the plasma membrane and undergoes rapid internalization to endosomes. *J Biol Chem.* 2003 Jan;278(2):1206-11.
55. Jansen J, Friesema ECH, Milici C, Visser TJ. Thyroid hormone transporters in health and disease. *Thyroid.* 2005 15(8):757-768.
56. Esfandiari A, Gagelin C, Gavaret JM, Pavelka S, Lennon AM, Pierre M, Courtin F. Induction of type III-deiodinase activity in astroglial cells by retinoids. *Glia.* 1994 11:255-261.
57. Darras VM, Visser TJ, Berghman LR, Kühn ER. Ontogeny of type I and III deiodinase activities in embryonic and post-hatch chicks: relationship with changes in plasma triiodothyronine and growth hormone levels. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol.* 1992 103:131-136.
58. Galton VA. Mechanisms underlying the acceleration of thyroid hormone-induced tadpole metamorphosis by corticosterone. *Endocrinology.* 1990 127:2997-3002.
59. Huang H, Marsh-Amstrong N, Brown DD. Metamorphosis is inhibited in transgenic *Xenopus laevis* tadpoles that overexpress type III deiodinase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999 96:962-967.
60. Kester MHA, de Mena RM, Obregon MJ, Marinkovic D, Howatson A, Visser TJ, Hume R, de Escobar GM. Iodothyronine levels in the human developing brain: major regulatory roles of iodothyronine deiodinases in different areas. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2004 89(7):3117-3128.
61. Friesema EC, Jansen J, Visser TJ. Thyroid hormone transporters. *Biochem Soc Trans.* 2005 Feb;33(Pt 1):228-32.
62. Heuer H, Visser TJ. Pathophysiological importance of thyroid hormones transporters. *Endocrinology* 29 Jan 2009

63. Friesema ECH, Docter R, Moerings EPCM, Stieger B, Hagenbuch B, Meier PJ, Krenning EP, Hennemann G, Visser TJ. Identification of thyroid hormone transporters. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1999 254:497-501.
64. Ritchie JWA, Shi YB, Hayashi Y, Baird FE, Muchekehu RW, Christie GR, Taylor PM. A role for thyroid hormone transporters in transcriptional regulation by thyroid hormone receptors. *Molecular Endocrinology*. 2003 17(4):653-661.
65. Visser TJ. Thyroid hormone transporters. *Hormone Research*. 2007 68(supl 5):28-30.
66. Hennemann G, Krenning EP. The kinetics of thyroid hormone transporters and their role in non-thyroidal illness and starvation. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2007 21(2):323-338.
67. Krenning EP, Docter R, Bernard HF, Visser TJ, Hennemann G. Active transport of triiodothyronine (T3) into isolated rat liver cells. *FEBS Lett*. 1978 Jul1;91(1):113-6.
68. Docter R, Krenning P, Bos G, Fekkes DF, Hennemann G. Evidence that the uptake of tri-iodo-L-thyronine by human erythrocytes is carrier-mediated but not energy-dependent. *Biochem*. 1982 J 208:27-34.
69. Arnott RD, Eastman CJ. Specific 3,3',5'-triiodothyronine (reverse T3) binding sites on rat liver plasma membranes: comparison with thyroxine (T4) binding sites. *J Recept Res*. 1983;3(3):393-407.
70. Botta JA, de Mendoza D, Morero RD et al. High affinity L-triiodothyronine binding sites on washed rat erythrocyte membranes. *Journal of Biological Chemistry*. 1983;258:6690-6692.
71. Yamauchi K, Horiuchi R, Takikawa H. Uptake of 3,5,3'-L-tri-iodothyronine in human erythrocytes. *J Endocrinol*. 1989 121(3):585-591.
72. Samson M, Osty J, Francon J, Blondeau JP. Triiodothyronine binding sites in the rat erythrocytes membrane: involvement in triiodothyronine transport and relation to the tryptofan transport System T. *Biochim Biophys Acta*. 1992 1108(1):91-8.
73. Blondeau JP, Osty J, Francon J. Characterization of the thyroid hormone transport system of isolated hepatocytes. *J Biol Chem*. 1988 263:2685-92.
74. Docter R., Krenning E.P. Role of cellular transport systems in the regulation of thyroid hormone bioactivity. 1990 In: MA G (ed) *The thyroid gland*. Raven Press, New York, pp 233-254.

75. Hennemann G, Everts ME, de Jong M, Lim CF, Krenning EP, Docter R. The significance of plasma membrane transport in the bioavailability of thyroid hormone. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1998 48:1-8.
76. Krenning EP, Docter R, Bernard B, Visser T, Hennemann G. Decreased transport of thyroxine (T₄), 3,3',5'-triiodothyronine (T₃) and 3,3',5'-triiodothyronine (rT₃) into rat hepatocytes in primary culture due to a decrease of cellular ATP content and various drugs. *FEBS Lett*. 1982 140:229-33.
77. de Jong M., Docter, R. Bernard BF, et al. T₄ uptake into the perfused rat liver and liver T₄ uptake in humans are inhibited by fructose. *Am J Physiol*. 1994 266:E768-75.
78. Mol JA, Krenning EP, Docter R, Rozing J, Hennemann G. Inhibition of iodothyronine transport into rat liver cells by a monoclonal antibody. *J Biol Chem*. 1986 261:7640-3.
79. Lim CF, Docter R, Visser TJ, et al. Inhibition of thyroxine transport into cultured rat hepatocytes by serum of nonuremic critically ill patients: effects of bilirubin and nonesterified fatty acids. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993 76:1165-72.
80. Docter R, Krenning EP, de Jong M, Hennemann G. The sick euthyroid syndrome: changes in thyroid hormone serum parameters and hormone metabolism. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1993 39:499-518.
81. Kragie L. Membrane iodothyronine transporters. Part I: Review of physiology. *Endocr Res*. 1994 20:319-41.
82. Kaptein EM. Hormone-specific alterations of T₄, T₃, and reverse T₃ metabolism with recent ethanol abstinence in humans. *Am J Physiol*. 1997 272:E191-200
83. Everts ME, Docter R, Moerings EP, et al. Uptake of thyroxine in cultured anterior pituitary cells of euthyroid rats. *Endocrinology*. 1994 134:2490-7.
84. Samson M, Osty J, Blondeau JP. Identification by Photoaffinity Labeling of a Membrane Thyroid Hormone-Binding Protein Associated with the Triiodothyronine Transport System in Rat Erythrocytes. *Endocrinology*. 1993 132(6).
85. Yan Z, Hinkle PM. Saturable, stereospecific transport of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and L-thyroxine into GH4C1 pituitary cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 1993 268(27):20179-20184.
86. Morimoto E, Kanai Y, Kim DK, Chairoungdua A, Choi HW, Wempe MF, Anzai N, Endou H. Establishment and characterization of mammalian cell lines stably expressing human L-type amino acid transporters. *J Pharmacol Sci*. 2008 108:505-516.

87. McLeese JM, Eales JG. Characteristics of the uptake of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and L-thyroxine into red blood cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology*. 1996 103:200-208.
88. Ribeiro RC, Cavalieri RR, Lomri N, Rahmaoui CM, Baxter JD, Scharschmidt BF. Thyroid hormone export regulates cellular hormone content and response. *J Biol Chem*. 1996 271:17147-51.
89. Ritchie JWA, Peter GJ, Shi YB, Taylor PM. Thyroid hormone transport by 4F2hc-IU12 heterodimers expressed in *Xenopus* oocytes. *Journal of Endocrinology*. 1999 163:R5-R9.
90. Friesema EC, Docter R, Moering EP, Verrey F, Krenning EP, Hennemann G, Visser TJ. Thyroid hormone transport the heterodimeric human system L amino acid transporter. *Endocrinology*. 2001 142:4339-4348.
91. Abe T, Kakyō M, Sakagami H, Tokui T, Nishio T, Tanemoto M, Nomura H, Hebert SC, Matsuno S, Kondo H, Yawo H. Molecular characterization and tissue distribution of a new organic transporter subtype (oatp3) that transports thyroid hormone and taurocholate and comparison with oatp2. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998 273(35):22395-22401.
92. Fujiwara K, Adachi H, Nishio T, Unno M, Tokui T, Okabe M, Onogawa T, Suzuki T, Asano N, Tanemoto M, Seki M, Shiiba K, Suzuki M, Kondo Y, Nunoki K, Shimosegawa T, Iinuma K, Ito S, Matsuno S, Abe T. Identification of thyroid hormone transporters in humans: different molecules are involved in a tissue-specific manner. *Endocrinology*. 2001 142(5):20005-20012.
93. James SR, Franklyn JA, Kilby MD. Placental transport of thyroid hormone. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2007 21(2):253-264.
94. Sato K, Sugawara J, Sato T, Mizutamari H, Suzuki T, Ito A, Mikkaichi T, Onogawa T, Tanemoto M, Unno M, Abe T, Okamura K. Expression of organic anion transporting polypeptide E (OATP-E) in human placenta. *Placenta*. 2003 24:144-148.
95. 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. *Molecular Endocrinology*. 2003 17(7):1203-1215.
96. Pizzagalli EC, 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 16:2283-96.
97. Sugiyama D, Kusuhara H, Taniguchi H, Ishikawa S, Nozaki Y, Aburatani H, Sugiyama Y. Functional characterization of rat brain-specific organic

- anion transporter (Oatp14) at the blood-brain barrier. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003 278(44):43489-43495.
98. Hegenbuch B. Cellular entry of thyroid hormone by organic anion transporting polypeptides. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2007 21(2):209-221.
99. van der Deure WM, Hansen PS, Peeters RP, Kyvik KO, Friesema ECH, Hegedüs L, Visser TJ. Thyroid hormone transport and metabolism by organic anion transporter 1C1 and consequences of genetic variation. *Endocrinology*. 2008 149(10):5307-5314.
100. van Stralen PGJ, van der Hoek HJ, Docter R, de Jong M, Krenning EP, Everts ME, Hennemann G. Uptake and Metabolism of 3,5,3'-triiodothyronine and 3,3',5'-triiodothyronine by human liver-derived cells: HepG2 cells as a model for thyroid hormone handling by human liver. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1996 81(1):244-248.
101. Hennemann G, Krenning EP, Bernard B, et al. Regulation of influx and efflux of thyroid hormones in rat hepatocytes: possible physiologic significance of the plasma membrane in the regulation of thyroid hormone activity. *Horm Metab Res*. 1984 Suppl 12:1-6.
102. Osty J, Zhou Y, Chantoux F, Francon J, Blondeau JP. The triiodothyronine carrier of rat erythrocytes: asymmetry and mechanisms of trans-inhibition. *Biochim Biophys Acta*. 1990 1051:46-51.
103. Cavalieri RR, Simeoni LA, Park SW, Baxter JD, Scharschmidt BF, Ribeiro RCJ, Lomri N. Thyroid hormone export in rat FRTL-5 thyroid cells and mouse NHI-3T3 cells is carrier-mediated, verapamil-sensitive, and stereospecific. *Endocrinology*. 1999 140(11):4948-49054.
104. Neves FAR, Cavalieri RR, Simeoni LA, Gardner DG, Baxter JD, Scharschmidt BF, Lomri N, Ribeiro RCJ. Thyroid hormones export varies among primary cells and appears to differ from hormone uptake. *Endocrinology*. 2002 143(2):476-483.
105. Kassem NA, Deane R, Segal MB, Chen R, Preston JE. Thyroxine (T₄) transfer from CSF to choroid plexus and ventricular brain regions in rabbit: contributory role of P-glycoprotein and organic anion transporting polypeptides. *Brain Research*. 2007 1181:44-50
106. Friesema EC, Ganguly S, Abdalla A, Manning Fox JE, Halestrap AP, Visser TJ. Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *J Biol Chem*. 2003 278:40128-35.
107. Dumitrescu AM, Liao XH, Best TB, Brockmann K, Refetoff S. A novel syndrome combining thyroid and neurological abnormalities is associated with mutations in a monocarboxylate transporter gene. *Am J Hum Genet*. 2004 74:168-75.

108. Friesema EC, Grueters A, Biebermann H, et al. The association between mutations in a thyroid hormone transporters and severe X-linked psychomotor retardation. *The Lancet*. 2004 364:1435-37.
109. Papadimitriou A, Dumitrescu AM, Papavasiliou A, Fretzayas A, Nicolaidou P, Refetoff S. A novel monocarboxylate transporter 8 gene mutation as a cause of severe neonatal hypotonia and developmental delay. *Pediatrics*. 2008 121:e199-e202.
110. Visser WE, Friesema ECH, Jansen J, Visser TJ. Thyroid hormone by monocarboxylate transporters. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2007 21(2):223-236.
111. Refetoff S, Dumitrescu AM. Syndromes of reduced sensitivity to thyroid hormone: genetic defects in hormone receptors, cell transporters and deiodination. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2007 21(2):277-305.
112. Visser WE, Jansen J, Friesema EC, Kester MH, Mancilla E, Lundgren J, van der Knaaps MS, Lunsing RJ, Brouwer OF, Visser TJ. Novel pathogenic mechanism suggested by ex vivo analysis of MCT8 (SLC16A2) mutations. *Hum Mutat*. 2009 Jan;30(1):29-38.
113. Heuer H, Maier MK, Iden S, Mittag J, Friesema ECH, Visser TJ, Bauer K. The monocarboxylate transporter 8 linked to human psychomotor retardation is highly expressed in thyroid hormone sensitive neuron populations. *Endocrinology*. 20 Jan 2005.
114. Friesema ECH, Kuiper GGJM, Jansen J, Visser TJ, Kester MHA. Thyroid hormone transport by human monocarboxylate transporter 8 and its rate-limiting role in intracellular metabolism. *Molecular Endocrinology*. 2006 20(11):2761-2772.
115. Heuer H. The importance of thyroid hormone transporters for brain development and function. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2007 21(2):265-276.
116. Morris ME, Felmler MA. Overview of the proton-coupled MCT (SLC16A) family of transporters: characterization, function and role in the transport of the drug of abuse γ -hydroxybutyric acid. *AAPS J*. 2008 10(2):311-321.
117. Friesema ECH, Jansen J, Jachtenberg JW, Visser WE, Kester MHA, Visser TJ. Effective cellular uptake and efflux of thyroid hormone by human monocarboxylate transporter 10. *Molecular Endocrinology*. 2008 22(6):1357-1369.
118. Davis PJ, Davis FB, Cody V. Membrane receptors mediating thyroid hormone action. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2005 16(9):429-435.

119. Haidy HAGM, van der Putten, Friesema ECH, Abumrad NA, Everts ME, Visser TJ. Thyroid hormone transport by rat fatty acid translocase. *Endocrinology*. 2003 144(4):1315-1323.
120. de Jong M, Docter R, Van Der Hoek HJ, Vos RA, Krenning EP, Hennemann G. Transport of 3,5,3'-triiodothyronine into the perfused rat liver and subsequent metabolism are inhibited by fasting. *Endocrinology*. 1992 131:463-70.
121. Kleinhaus N, Faber J, Kahana L, Schneer J, Scheinfeld M. Euthyroid hyperthyroxinemia due to a generalized 5'-deiodinase defect. *J Clin Endocrinol Metab*. 1988 66:684-8.
122. Jansen M, Krenning EP, Oostdijk W, et al. Hyperthyroxinaemia due to decreased peripheral triiodothyronine production. *Lancet*. 1982 2:849-51.
123. Toyoda N, Kleinhaus N, Larsen PR. The structure of the coding and 5'-flanking region of the type 1 iodothyronine deiodinase (dio1) gene is normal in a patient with suspected congenital dio1 deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996 81:2121-4.
124. van der Heyden JT, Docter R, van Toor H, Wilson JH, Hennemann G, Krenning EP. Effects of caloric deprivation on thyroid hormone tissue uptake and generation of low-T3 syndrome. *Am J Physiol*. 1986 251:E156-63.
125. Lim CF, Docter R, Krenning EP, et al. Transport of thyroxine into cultured hepatocytes: effects of mild non-thyroidal illness and calories restriction in obese subjects. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1994 40:79-85.
126. Jeanningros R, Gronier B, Azorin JM, Tissot R. Platelet [3H]-imipramine binding according to DSM-III subtypes of depression. *Neuropsychobiology*. 1989 22(1):33-40.
127. Moreau X, Azorin JM, Lejeune PJ, Jeanningros R. Red blood cell triiodothyronine uptake in unipolar major depression: effect of a chronic antidepressant treatment. *Prog Neuro-Psychopharmacol & Biol Psychiat*. 2000 24:23-35.
128. Kalisova-Starkova L, Fisar Z, Paclt I, Hanus Z, Vevera J. Red blood cell triiodothyronine uptake as membrane parameter of depression. *Physiol Res*. 2006 55:195-204.
129. Kemp HF, Taylor PM. Interactions between thyroid hormone and tryptofan transport in rat liver are modulated by thyroid status. *Am J Physiol*. 1997 272:E809-E816.
130. Moreau X, Lejeune PJ, Jeanningros R. Kinetics of red blood cell T3 uptake in hypothyroidism with or without hormonal replacement, in the rat. *J Endocrinol Invest*. 1999 22(4):257-261.

131. Ritchie JWA, Collingwood CFJ, Taylor PM. Effect of hypothyroidism on pathways for iodothyronine and tryptofan uptake into rat adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001 280:E254-E259.
132. Rodrigues MC, Santos GM, da Silva CA, Baxter JD, Webb P, Lomri N, Neves FA, Ribeiro RC, Simeoni LA. Thyroid hormone transport is disturbed in erythrocytes from patients with chronic renal failure on hemodialysis. *Ren Fail.* 2004 Jul;26(4):461-6.
133. Benvenga S, Robbins J. Altered thyroid hormones binding to plasma lipoproteins in hypothyroidism. *Thyroid.* 1996 6(6):595-600.
134. Benvenga S, Robbins J. Altered thyroid hormone binding to plasma lipoproteins in the syndrome of resistance to thyroid hormones. *Biochimie.* 1999 May;81(5):545-8.
135. Benevenga S, Alesci S, Trimarchi F. High-density lipoprotein-facilitated entry of thyroid hormones into cells: a mechanism different from the low-density lipoprotein-facilitated entry. *Thyroid.* 2002 Jul;12(7):547-56.
136. Setain N. Hypothyroidism in children: diagnosis and treatment. *Jornal de Pediatria.* 2007 83(5):S209-S216.
137. Bursell JDH, Warner JT. Interpretation of thyroid function in children. *Pediatrics and Child Health Symposium: Endocrinology.* 2007 17(9):361-366.
138. Weetman AP, McGregor AM. Autoimmune thyroid disease: further development in our understanding. *Endocr Rev.* 1994 Dec;15(6):788-830.
139. Dayan CM, Daniel GH. Chronic autoimmune thyroiditis. *N Engl J Med.* 1996 Jul;335(2):99-107.
140. Brent GA. Clinical practice. Grave's disease. *N Engl J Med.* 2008 Jun;358(24):2594-605.
141. Wartofsky L; Glinoe D; Solomon B; Nagataki S; Lagasse R; Nagayama Y; Izumi M. Differences and similarities in the diagnosis and treatment of Graves' disease in Europe, Japan, and the United States. *Thyroid* 1991;1(2):129-35.
142. Franklyn JA. The management of hyperthyroidism. *N Engl J Med* 1994 Jun;330(24):1731-8.
143. de Jong M, Docter R, Van der Hoek HJ, Krenning EP, Hennemann G. Adaptive changes in transmembrane transport and metabolism of triiodothyronine in perfused livers of fed and fasted hypothyroid and hyperthyroid rats. *Metabolism.* 1994 43:1355-61.

144. Holm AC, Jacquemin C. Membrane transport of L-triiodothyronine by human red cell ghost. *Biochem Biophys Res Commun.* 1979 89(3):1006-1017.
145. Holm AC, Kagedal B. Kinetics of triiodothyronine uptake by erythrocytes in hyperthyroidism, hypothyroidism and thyroid hormone resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 1989 Aug;69(2):364-8.
146. Angel RC, Botta JA, Farias RN. High affinity L-triiodothyronine binding to right-side-out and inside-out vesicles from rat and human erythrocyte membrane. *The Journal of Biological Chemistry* 1989 264(32):19143-46.
147. Zhou Y, Samson M, Osty J, Francon J, Blondeau JP. Evidence for a close link between the thyroid hormone transport system and the aromatic amino acid transport system T in erythrocytes. *J Biol Chem.* 1990 265:17000-17004.
148. Osty J, Jegou L, Francon J, Blondeau JP. Characterization of triiodothyronine transport and accumulation in rat erythrocytes. *Endocrinology.* 1988 123(5):2303-2311.
149. Angel RC, Botta JA, Farias RN. Modification of L-triiodothyronine binding sites from rat erythrocytes membrane by heating and by proteinase treatments. *Biochim Biophys Acta.* 1987 12;897(3):488-94.
150. Zhou Y, Samson M, Francon J, Blondeau JP. Thyroid hormone concentrative uptake in rat erythrocytes - Involvement of the tryptophan transport system T in countertransport of tri-iodothyronine and aromatic amino acids. *Biochem J.* 1992 281:81-86.
151. Eckel J, Rao GS, Rao ML, Breuer H. Uptake of L-Tri-iodothyronine by Isolated Rat Liver Cells. A process partially inhibited by metabolic inhibitors; attempts to distinguish between uptake and binding to intracellular proteins. *Biochem J.* 1979 182:473-91.
152. Holm AC. Active transport of L-tri-iodothyronine through the red cell plasma membrane—true or false? *Scand J Clin Lab Invest.* 1987 47(2):185-189.
153. Fanjul AN, Farias RN. Molecular interconversion of cold-sensitive cytosolic 3,3',5-tri-iodo-L-thyronine-binding proteins from human erythrocytes: effect of cold, heat and pH treatments. *Biochem J.* 1993 299:579-582.
154. Catt KJ, Harwood JP, Aguilera G, Dufal ML. Hormonal regulation of peptide receptors and targeted cells responses. *Nature.* 1979 Jul 12;280(5718):109-116.
155. Shi Y-B, Ritchie JWA, Taylor PM. Complex regulation of thyroid hormone action: multiples opportunities for pharmacological intervention. *Pharmacology & Therapeutics.* 2002 94:235-251.

156. Francon J, Osty J, Chantoux F, Francon J, Blodeau JP. Erythrocyte-associated triiodothyronine in the rat: a source of hormone for target cells. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1990 Jan;1051(1):46-51.
157. De Riva C, Virgili F, Frigato F. Increased sodium influx and calcium uptake in erythrocytes in hyperthyroidism: role of abnormal membrane lipid levels. *Metabolism*. 1996 45(6):707-711.
158. Hennemann G, Vos RA, de Jong M, Krenning EP, Docter R. Decreased peripheral 3,5,3'-triiodothyronine (T3) production from thyroxine (T4): a syndrome of impaired thyroid hormone activation due to transport inhibition of T4- into T3-producing tissues. 1993 *J Clin Endocrinol Metab* 77:1431-5.
159. Tu HM, Legradi G, Bartha T, Salvatore D, Lechan RM, Larsen PR. Regional expression of the type 3 iodothyronine deiodinase Messenger ribonucleic acid in the rat central nervous system and its regulation by thyroid hormone. *Endocrinology*. 1999 140:784-790.
160. Ahmed OM, El-Gareib AW, El-bakry AM, Abd El-Tawab SM, Ahmed RG. Thyroid hormones states and brain development interactions. *International Journal of Development Neurosciense*. 2007 Sept:1-63.