

DÉBORA GALVÃO MOREIRA

“EFEITOS DO ENVELHECIMENTO SOBRE A  
REGULAÇÃO E FUNÇÃO DA TIREÓIDE MURINA”

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE  
JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE  
DOUTOR EM CIÊNCIAS



Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho  
2007

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

# ***Efeitos do envelhecimento sobre a regulação e função da tireóide murina***

Débora Galvão Moreira

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Fisiologia).

Orientador(es): Doris Rosenthal e Vânia Maria Corrêa da Costa

Rio de Janeiro  
Junho de 2007

# ***Efeitos do envelhecimento sobre a regulação e função da tireóide murina***

Débora Galvão Moreira

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Fisiologia).

Aprovada por:

---

Presidente, Prof.

---

Prof.

---

Prof.

---

Prof.

---

Prof.

Rio de Janeiro  
Junho de 2007

## **FICHA CATALOGRÁFICA**

---

MOREIRA, DÉBORA GALVÃO

Efeitos do envelhecimento sobre a regulação e função da tireóide murina / Débora Galvão Moreira. Rio de Janeiro: UFRJ; IBCCFº; 2007

XIV, 76f.:il.

Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2007.

Orientadoras: Doris Rosenthal e Vânia Maria Corrêa da Costa

1- Envelhecimento  
2- Hipotireoidismo  
3- Níveis séricos de T4, T3 e TSH  
4- ERK  
5- Ras

I. Rosenthal, Doris II. Corrêa da Costa, Vânia Maria. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. IV Título.

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de fisiologia Endócrina (LFE) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF<sup>o</sup>) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), sob orientação das professoras Doris Rosenthal e Vânia Maria Corrêa da Costa, com apoio financeiro concedido pelo CNPq, CAPES e FAPERJ.

*“Ser humano... ser inacabado...  
conjunto de possíveis...*

*Cada ser... um ser único... um ser  
singular...*

*Sujeito da história... construtor do  
seu tempo... do seu destino...”*

***Anna Carolina Daltro Sampaio, 1997***

A meus pais, pelo apoio e dedicação;  
a Charles, por me amar tanto;  
a meus irmãos, que fazem parte dos meus sonhos;  
a Letícia, que enche minha vida de alegria e paz;  
a Fernandinha: meu recomeço, meu horizonte,  
e a Carolina: nova esperança/criança que cresce a  
cada dia.

## **AGRADECIMENTOS**

---

Agradeço a Deus, por ter me dado uma família maravilhosa e que me amparou em todos os momentos difíceis, pela luz que ilumina meus caminhos e pela graça de alcançar mais esta bela vitória.

À professora Doris Rosenthal, por ser amiga, companheira, compreensiva, confiante, mestre, zelosa e dar asas aos meus sonhos.

À professora Vânia Costa, por participar dos momentos mais importantes da minha vida acadêmica e ser a minha principal incentivadora.

À professora Denise Pires de Carvalho, por me fazer aprender o verdadeiro significado da paixão pela ciência.

À grande amiga Michelle, pela amizade e apoio durante este tempo agradável de convívio. Aos meus amigos, que me apoiaram e incentivaram na realização deste trabalho: Alba Cenélia, Andrea Ferreira, Flávia Nóbrega, Glória Ginabreda, Lívia Pinto, Luciene Cardoso, Márcia Figueiredo, Nathércia Percegoni, Renata Araújo, Renata Grozovsky, Sabrina Mendes, Thiago Pantaleão e Valmara Pereira.

Às professoras Tânia Ortiga, Carmen Moura e Tamar Frankenfeld, pelo carinho e apoio nesta longa caminhada.

À Advaldo Bezerra, Wagner Bezerra e Norma Faria, pela amizade e apoio técnico na realização deste trabalho.

E a todos que fazem parte da minha vida e me ajudaram de alguma forma.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

---

- AIT – *Apical Iodide Transporter* (transportador apical de iodeto)
- AMPC - 3'5'adenosina monofosfato cíclico
- ATP - adenosina trifosfato
- CREB - *AMPC responsive element binding protein* (fator de transcrição responsivo a AMPC)
- DBD - *DNA-binding domain* (domínio de ligação ao DNA)
- DEHAL1- *Iodotyrosine dehalogenase 1* (iodotirosina desalogenase 1)
- D1 - desiodase tipo 1
- D2 - desiodase tipo 2
- D3 - desiodase tipo 3
- DIT – diiodotirosina
- ECL- *Enhanced Chemiluminescence System* (sistema de revelação por quimioluminescência)
- ERK- MAPK extracellular signal-regulated kinases (MAPK quinases reguladas por sinal extracelular)
- Foxe 1 – fator de transcrição tireóideo, antes conhecido como TTF-2
- FSH - *follicle-stimulating hormone* (hormônio folículo-estimulante)
- GAP - *GTP-ase activating protein* (proteína ativadora de GTP-ase)
- GDP - guanina difosfato
- GEF - *GDP-exchange factor* (fator trocador de guanina)
- GTP - guanina trifosfato
- Hhex – fator de transcrição expresso pelos tireócitos
- HRP – *Horseradish peroxidase* (peroxidase de raiz forte)
- IOP - ácido iopanóico
- LBD - ligand-binding domain (domínio de ligação ao hormônio)
- LH - *luteinizing hormone* (hormônio luteinizante)
- MAPK - *mitogen-activated protein kinase* (proteína quinase ativada por mitógenos)
- MCT8 - *monocarboxylate transporter 8* (transportador de monocarboxilato 8)
- MEK - *MAPK kinase* (MAPK quinase)
- MIT - monoiodotirosina
- MMI - *metilmercaptoimidazol* (metimazole)

NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo monofosfato reduzido

NIS – *sodium-iodide symporter* (co-transportador sódio-iodeto)

OATP - *organic anion transporter polypeptide* (polipeptídeo transportador de ânion orgânico)

Pax-8 – Fator de transcrição tireóideo

PI3-K – *phosphoinositide-3 kinase* (fosfatidilinositol-3- quinase)

PKA - proteína quinase dependente de AMPc

PTU - propiltiouracil

rT<sub>3</sub> - 3,3',5'-triodotironina ou T<sub>3</sub> reverso

RXR - receptor de retinóide X

T<sub>3</sub> - 3,5,3'-triodotironina

T<sub>4</sub> - tiroxina

TBG – *thyroid binding protein* (proteína ligadora de hormônio tireóideo)

Tg – tireoglobulina

TGF-β- *transforming growth factor beta* ( fator de crescimento tumoral beta)

ThOx – *thyroid oxidase* (oxidase tireóidea)

TPO - tireoperoxidase

TR - *thyroid hormone receptor* (receptor de hormônio tireóideo)

TRE – *thyroid responsive element* (elemento responsivo ao hormônio tireóideo)

TRH - *thyrotrophin releasing hormone* (hormônio liberador de tireotrofina)

TSH - *thyrotrophin* (tireotrofina)

TSH R – *thyrotrophin receptor* (receptor de TSH)

TTF-1 - Fator de Transcrição Tireóideo 1

Titf1/Nkx2-1 - fator de transcrição tireóideo, antes conhecido como TTF-1

TTF-2 - Fator de Transcrição Tireóideo 2

TTR - transthyretin (transtiretina)

UCP - UnCoupling Protein (proteína desacopladora)

## RESUMO

---

### EFEITOS DO ENVELHECIMENTO SOBRE A REGULACAO E FUNCAO DA TIREÓIDE MURINA

Débora Galvão Moreira

Orientador(es): Doris Rosenthal e Vânia Maria Corrêa da Costa

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Fisiologia).

Em ratos há redução dos níveis séricos de T3 e T4 com o envelhecimento, sem alteração no TSH sérico, além de menor resposta do tireócito à estimulação pelo TSH. Entretanto, a tireóide de animais velhos é maior do que a de jovens, e tem maior heterogeneidade. Para avaliar a capacidade de resposta hipofisária de ratos velhos ao hipotireoidismo induzido, ratos Dutch-Miranda e Wistar, jovens e velhos (3-5 e 12-15 meses, respectivamente) foram tratados com metimazole (MMI 0,03% v.o., 21 dias). Foi feita coleta de sangue semanal para quantificação de TSH, T4, T3 séricos, por RIE específicos, sendo também determinados testosterona e estradiol séricos basais. Ao final do tratamento, as hipófises foram processadas para dosagem de TSH. O TSH sérico aumentou significativamente com o tratamento, em ambos os sexos, tendo os animais velhos resposta significativamente menor do TSH que os jovens. O hipotireoidismo reduziu o TSH hipofisário em ratos Dutch-Miranda, jovens e velhos. Já nos ratos Wistar, esta redução só foi observada em fêmeas velhas. O envelhecimento reduziu a testosterona sérica em machos, mas as fêmeas não apresentaram variação nos níveis de estradiol sérico. Foi também avaliado o efeito do envelhecimento sobre a expressão de Ras, ERK total, pERK e TTF-1, proteínas essenciais para o funcionamento da tireóide, por *Western blots* de proteína total extraída de tireóides de ratos Dutch-Miranda de 4-5 e 11-21 meses. Nos animais velhos foi encontrada maior expressão tireóidea de Ras do que nos jovens, diferentemente do pERK, que estava diminuído, mas somente nos machos velhos. Não houve variação do TTF-1 com o envelhecimento nas fêmeas. Nossos resultados mostram que a capacidade de biossíntese e/ou secreção do TSH está diminuída nos tireotrofos de ratos velhos, em ambos os sexos. Apesar de termos encontrado aumento de Ras nas tireóides de ratos velhos, não houve ativação da via Ras-Raf1, isto sugere que, em ratos, outras vias efetoras de Ras devem estar sendo ativadas durante o envelhecimento.

Palavras-chave: Envelhecimento, Hipotireoidismo, T4, T3, TSH, ERK, Ras.

Rio de Janeiro

Junho de 2007

## **ABSTRACT**

---

### EFFECTS OF THE AGING ON THE REGULATION AND FUNCTION IN RAT THYROID

Débora Galvão Moreira

Orientador(es): Doris Rosenthal e Vânia Maria Corrêa da Costa

*Abstract da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Fisiologia).*

This study assessed the responsiveness of the pituitary from old rats to iatrogenic hypothyroidism, and the effect of aging on thyroid Ras (a GTP-binding protein involved in regulating membrane trafficking of signals) expression, as well as expression of ERK (extracellular signal-regulated kinase) and pERK. Hypothyroidism was induced by methimazole (MMI 0,03% in drinking water, for 21days) in Dutch-Miranda and Wistar rats, male and female, aged 3-5 e 12-15 months. Blood was collected from the jugular vein weekly for hormone determinations of TSH, T<sub>3</sub> and T<sub>4</sub>, testosterone and estradiol by specific RIA. At the end of the experimental period, pituitary TSH content was determined by RIA. *Western* of Ras, ERK, pERK and TTF-1 of proteins extracted from thyroids murinas was performed. There were no differences between the serum TSH of young and old rats before the MMI-treatment, but serum T(4) was significantly decreased in aged rats from both genders and strains, while serum T(3) was significantly decreased in aged male rats from both strains, and in old Wistar females. MMI treatment significantly decreased serum T4 and T3 in all treated animals, and progressively increased serum TSH in both male and female rats, but the increase was significantly smaller in the elder rats. The pituitary TSH content was higher in Wistar than in Dutch-Miranda rats, of both genders, and was not significantly affected by age. Aging significantly decreased serum testosterone in male rats but serum estradiol of aged females was not affected. MMI treatment decreased the pituitary TSH in both young and old Dutch-Miranda rats, but in the Wistar strain only the old females had a significant decrease. The Ras expression was increased in old rats, but pERK was decreased although only in the old males. There was not differences in TTF-1 expression with aging. Our results show that the ability of the pituitary thyrotrophs to increase hormonal secretion in response to decreased levels of thyroid hormones is impaired in the old rat, even when the thyroid hormone levels are dramatically reduced. Despite the increased Ras, the effectors must be different in aged male and female, since pERK activation was not observed.

**Kew-words:** Aging, hypothyroidism, serum T4, T3 and TSH, ERK and Ras

Rio de Janeiro

Junho de 2007

## **LISTA DE FIGURAS**

---

<b>Figura 1</b> – Anatomia da glândula tireóide .....	01
<b>Figura 2</b> - Estrutura dos hormônios tireóideos .....	03
<b>Figura 3</b> – Etapas da biossíntese dos hormônios tireóideos .....	05
<b>Figura 4</b> –Modelo simplificado de metabolização e ação dos hormônios tireóideos	12
<b>Figura 5</b> - Vias sinalizadoras nas células foliculares tireóideas .....	18
<b>Figura 6</b> - As principais vias efetoras ativadas por Ras .....	21
<b>Figura 7</b> – Variação de T <sub>3</sub> e T <sub>4</sub> séricos durante indução de hipotireoidismo por tratamento com MMI em ratos jovens e velhos, machos e fêmeas, Dutch-Miranda e Wistar .....	42
<b>Figura 8</b> – Variação de TSH sérico antes e durante indução de hipotireoidismo por tratamento com MMI em ratos jovens e velhos, machos e fêmeas, Dutch-Miranda e Wistar .....	43
<b>Figura 9</b> – Níveis hipofisários de TSH em ratos controle e hipotireóideos em ratos Dutch-Miranda e Wistar, ratos jovens e velhos .....	44
<b>Figura 10</b> – Expressão protéica e análise densitométrica de proteína Ras de tireóides de ratos Dutch-Miranda, machos e fêmeas, com 5, 11 e 17 meses de idade .....	46
<b>Figura 11</b> – Análise densitométrica de proteína Ras de tireóides de ratos e ratas Dutch-Miranda, jovens e velhos .....	47
<b>Figura 12</b> – Expressão protéica de pERK, ERK total e proteína de normalização e análise densitométrica de pERK e ERK total de tireóides de ratos Dutch-Miranda, jovens e velhos, machos e fêmeas .....	48
<b>Figura 13</b> – Razão da análise densitométrica de pERK por ERK total de tireóides de ratos e ratos Dutch-Miranda, jovens e velhos .....	49
<b>Figura 14</b> – Expressão protéica e análise densitométrica de proteína TTF-1 de tireóides de ratas Wistar, com 4 e 12 meses de idade.....	50
<b>Figura 15</b> – Análise densitométrica de proteína de TTF-1 de tireóides de ratas Wistar, jovens e velhas.....	51

## **LISTA DE TABELAS**

---

<b>Tabela 1</b> - Principais proteínas envolvidas na biossíntese dos hormônios tireóideos.....	07
<b>Tabela 2</b> - Características dos três tipos de iodotironina-desiodases humanas .....	10
<b>Tabela 3</b> - Genes regulados por hormônios tireóideos .....	14
<b>Tabela 4</b> – Peso corporal (g) de ratos machos e fêmeas, jovens e velhos .....	37
<b>Tabela 5</b> – Peso relativo hipofisário (mg/100g de peso corporal) em ratos machos e fêmeas, jovens e velhos .....	38
<b>Tabela 6</b> – Peso tireóideo relativo (mg/100g de peso corporal) em ratos machos e fêmeas, jovens e velhos .....	38
<b>Tabela 7-</b> Peso corporal (g), peso hipofisário relativo (mg/100g de peso corporal) e peso tireóideo relativo (mg/100g de peso corporal) em ratos Wistar fêmeas, jovens e velhas.....	39
<b>Tabela 8-</b> Peso corporal (g), peso hipofisário relativo (mg/100g de peso corporal) e peso tireóideo relativo (mg/100g de peso corporal) em ratos Wistar machos, jovens e velhos .....	39
<b>Tabela 9</b> – Efeitos do envelhecimento nos níveis séricos de T4, T3 , TSH, estradiol e testosterona de ratos machos e fêmeas Dutch-Miranda .....	41
<b>Tabela 10</b> – Efeitos do envelhecimento nos níveis séricos de T4, T3, TSH, estradiol e testosterona de ratos machos e fêmeas Wistar.....	41

# **SUMÁRIO**

---

LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	xi
SUMÁRIO.....	xv
<b>I. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
I.1. Anatomia e histologia da glândula tireóide .....	1
I.2. Biossíntese dos hormônios tireóideos .....	3
I.3. Circulação e metabolização dos hormônios tireóideos .....	8
I.4. Mecanismos de ação e efeitos dos hormônios tireóideos .....	11
I.5. Regulação da glândula tireóide .....	15
I.6. Envelhecimento e função tireóidea .....	22
<b>II. OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
<b>III. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
III.1 Animais .....	30
III.2. Tratamento dos animais e coleta das amostras .....	30
III.3. Quantificação dos níveis séricos de estradiol, testosterona, T <sub>4</sub> , T <sub>3</sub> , TSH e do conteúdo de TSH hipofisário.....	32
III.4 Avaliação da expressão de Ras e Tg por <i>Immunoblotting</i> .....	33
III.5. Avaliação da expressão de pERK e ERK total por <i>Immunoblotting</i> .....	34
III.6. Imunoprecipitação e avaliação da expressão de TTF-1 por <i>Immunoblotting</i> .....	35
III.7. Análise estatística .....	36

<b>IV. RESULTADOS</b> .....	37
IV.1. Peso corporal, peso relativo de tireóide e hipófise dos animais controles e hipotireóideos .....	37
IV.2. Quantificação dos níveis séricos de estradiol, testosterona, T <sub>4</sub> , T <sub>3</sub> e TSH em animais controle .....	40
IV.3. Quantificação dos níveis séricos de estradiol, testosterona, T <sub>4</sub> , T <sub>3</sub> e TSH em animais hipotireóideos .....	42
IV.4. Avaliação da expressão de Ras, pERK, ERK total e TTF-1 por <i>Immunoblotting</i> .....	45
<b>V. DISCUSSÃO</b> .....	52
<b>VI. CONCLUSÕES</b> .....	64
<b>VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	66

# I. INTRODUÇÃO

---

## I.1. Anatomia e histologia da glândula tireóide

A tireóide é a primeira estrutura endócrina a iniciar o seu desenvolvimento no embrião humano, sendo visualizada em torno de 3 semanas após a fertilização. O epitélio folicular da tireóide se desenvolve a partir do ducto tireoglosso, um alongamento de tecido endodérmico originado a partir do assoalho da faringe primitiva (Utiger, 2001).

A glândula tireóide é composta por dois lobos encapsulados, um em cada lado da traquéia, unidos em sua porção inferior por uma fina camada de tecido chamada istmo, situado abaixo da cartilagem cricóide (Utiger, 2001). Em humanos adultos normais, pesa cerca de 10 a 25 gramas. O lobo direito é geralmente maior e mais vascularizado que o esquerdo. Um terceiro lobo, chamado piramidal, pode ser observado ocasionalmente, revelando uma estrutura remanescente do desenvolvimento embrionário da tireóide (Larsen e cols, 1998).

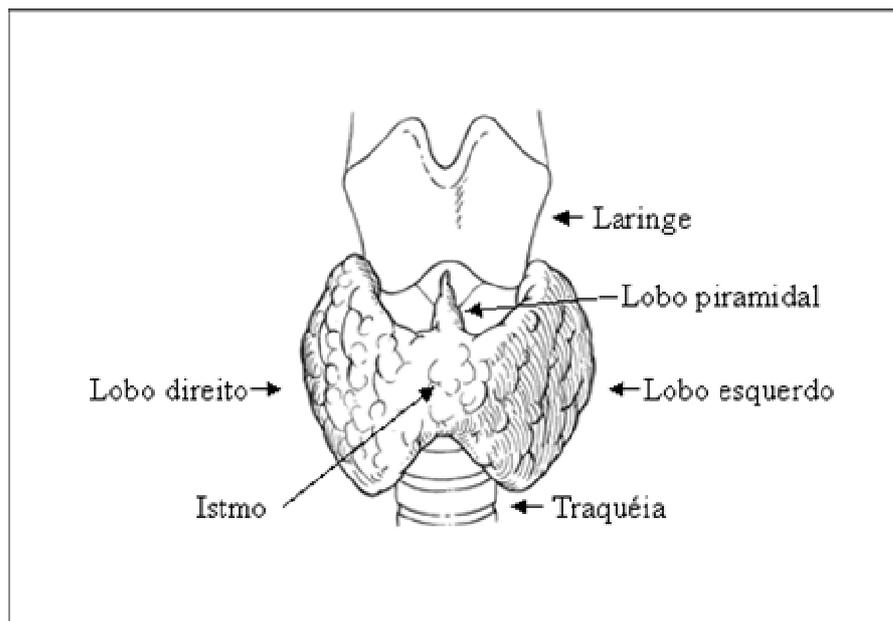


Figura 1 – Anatomia da glândula tireóide

A unidade funcional da glândula é o folículo tireóideo, composto por camada única de células foliculares cubóides que delimitam uma região central preenchida com colóide, material homogêneo rico em tireoglobulina (Tg), a proteína na qual ocorre a biossíntese dos hormônios tireóideos. (Kacsoh, 2000). O diâmetro dos folículos tireóideos varia em torno de 200 $\mu$ m. As células foliculares têm aproximadamente 15 $\mu$ m de altura e podem variar de formato conforme o grau da estimulação glandular, tornando-se colunares quando ativas e achatadas quando inativas (Larsen e cols, 1998).

A organização e polaridade dos tireócitos são fundamentais para o metabolismo especializado da glândula, incluindo o transporte da Tg e iodeto para o ápice, a biossíntese dos hormônios tireóideos na membrana apical, o armazenamento de hormônios tireóideos e iodo nas moléculas de Tg no colóide, e posterior endocitose no ápice (Utiger, 2001)

O epitélio folicular é revestido por uma membrana basal que é rica em mucopolissacarídeos e separa os tireócitos dos capilares circundantes. Além dos capilares, terminais nervosos adrenérgicos, colinérgicos e peptidérgicos estão presentes entre os folículos. A membrana apical do tireócito é rica em microvilosidades que se estendem para o colóide. (Larsen e cols, 1998).

A tireóide também contém outras células endócrinas chamadas parafoliculares ou C, que são responsáveis pela biossíntese da calcitonina, um hormônio envolvido com o metabolismo de cálcio. Estas células têm origem embrionária diferente das células foliculares, localizando-se entre os folículos tireóideos, entre as células foliculares e a membrana basal, ou até mesmo entre as células foliculares. As células parafoliculares podem ser observadas isoladas, em pequenos grupos, levemente aderidas às células foliculares, ou até mesmo formando estruturas complexas com células foliculares (Utiger, 2001).

## I.2. Biossíntese dos Hormônios Tireóideos

A tireóide é responsável pela biossíntese de tiroxina ( $T_4$ ) e triiodotironina ( $T_3$ ), hormônios envolvidos com a regulação do metabolismo basal e termogênese, do crescimento e do metabolismo intermediário. A síntese e secreção de  $T_4$  é restrita à glândula tireóide, ao contrário de  $T_3$  que também pode ser produzido a partir da desiodação de  $T_4$  em tecidos extra-tireóideos (Utiger, 2001).

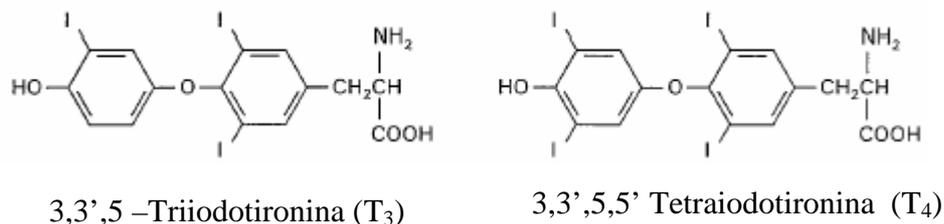


Figura 2 - Estrutura dos hormônios tireóideos

O iodo é um componente indispensável às moléculas de hormônios tireóideos, compreendendo cerca de 65% e 58% do peso de  $T_4$  e  $T_3$ , respectivamente. Os hormônios tireóideos são os únicos componentes iodados com significado fisiológico conhecido em vertebrados. Um suprimento adequado de iodo é essencial para o funcionamento normal da glândula tireóide. A ingestão mínima de iodo recomendada é de 150  $\mu\text{g}/\text{dia}$ , sendo a alimentação a sua principal fonte. A maior parte do iodo proveniente da alimentação está sob a forma de iodo inorgânico, iodeto, que é rapidamente absorvido durante o processo de digestão (Utiger, 2001).

A biossíntese dos hormônios tireóideos está esquematizada na figura 3. Uma das etapas limitantes na biossíntese dos hormônios tireóideos é a captação do iodeto pelas células foliculares. O iodeto é transportado para dentro de célula folicular por um co-transportador sódio-iodeto chamado NIS (*sodium-iodide symporter*), uma proteína com 13 domínios transmembrana, localizada na membrana basolateral dos tireócitos. O NIS co-transporta 2 íons sódio e 1 iodeto

para o compartimento intracelular, contra um gradiente químico e elétrico, sendo o gradiente de  $\text{Na}^+$  necessário à atividade normal de NIS mantido pela  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase (Dohan e cols., 2003).

Uma vez no tireócito, o iodeto difunde-se rapidamente para a membrana apical, local das etapas subseqüentes da formação dos hormônios tireóideos. O iodeto é transportado passivamente através da membrana apical, atingindo o lúmen folicular. Atualmente, acredita-se existirem dois transportadores passivos de iodeto, a proteína pendrina e uma proteína caracterizada recentemente, denominada transportador apical de iodeto (AIT) (Rodriguez e cols., 2002).

A pendrina é uma glicoproteína de membrana, expressa pelo gene PDS, com 110 kDa e localizada seletivamente na membrana apical dos tireócitos. Após a clonagem do gene PDS, a molécula da pendrina foi codificada e caracterizada como transportadora de ânions que apresenta alta homologia com transportadores de sulfato, mas também pode transportar cloreto e iodeto (Everett e cols., 1997). Atualmente, alguns estudos indicam que, em condições fisiológicas, a pendrina é importante para a captação de cloreto folicular em tireócitos e efluxo de íons iodeto para o lúmen, possibilitando que aconteçam as etapas posteriores da biossíntese de  $\text{T}_3$  e  $\text{T}_4$  (Gillam e cols., 2004; Yoshida e cols., 2004).

A molécula de AIT foi clonada recentemente. O cDNA codifica uma proteína de 610 aminoácidos, que compartilha 46% de homologia com o gene para NIS humano. Esta proteína, expressa em células de mamíferos, apresenta atividade transportadora de iodeto. No tireócito, está localizada na membrana apical, sugerindo que funcione como outro transportador no efluxo de iodeto para o lúmen folicular (Rodriguez e cols., 2002).

Após este processo de transporte passivo, o iodeto é rapidamente oxidado e ligado covalentemente a resíduos tirosila da Tg, processo catalisado por um complexo enzimático formado pela tireoperoxidase (TPO) e pelo sistema gerador de peróxido de hidrogênio, provavelmente a

NADPH-oxidase (Bjorkman & Ekholm, 1984 e 1992). A enzima responsável pela geração de peróxido de hidrogênio associada à hormonogênese tireóidea é a NADPH oxidase (ThOx ou oxidase tireóidea), que se encontra no pólo apical dos tireócitos, é estimulada pela tireotrofina (TSH) e inibida pelo iodo. Aparentemente, a geração de peróxido de hidrogênio é a etapa limitante da biossíntese dos hormônios da tireóide em condições de suficiência de iodo (Cardoso e cols., 2001; Cardoso e cols., 2002).

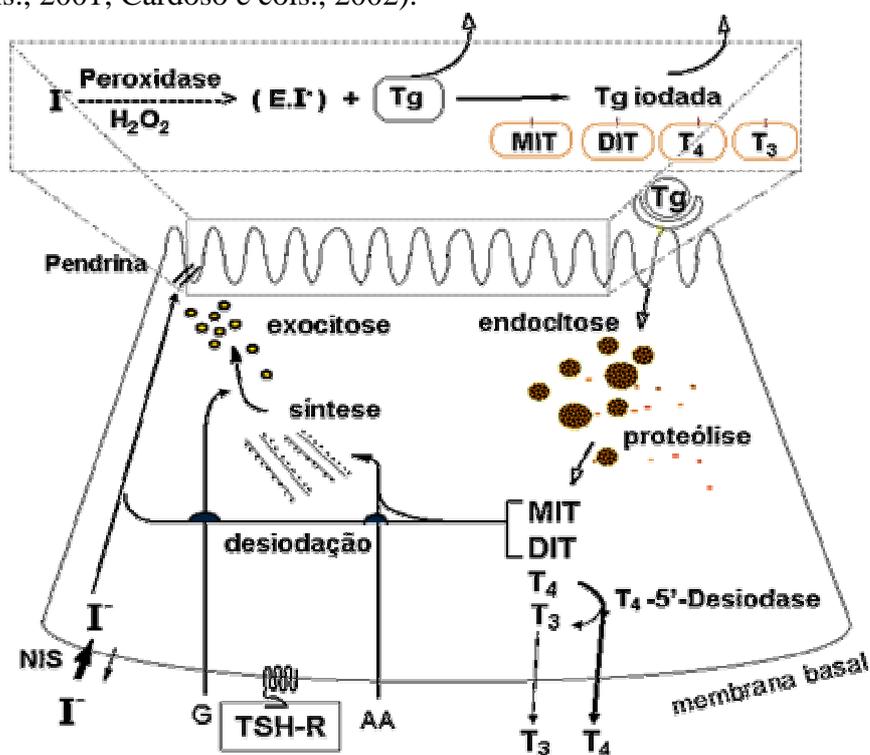


Figura 3 – Etapas da biossíntese dos hormônios tireóideos. TSH-R: Receptor para tireotrofina, MIT: monoiodotirosina; DIT: diiodotirosina; Tg: tireoglobulina, NIS: co-transportador sódio-iodeto.

Após a organificação do iodeto e formação de monoiodotirosina (MIT) e diiodotirosina (DIT), estes radicais podem ser acoplados, ainda enquanto ligados à Tg, originando os hormônios tireóideos: 3,3',5-triiodotironina (T<sub>3</sub>) e 3,3',5,5'-tetraiodotironina ou tiroxina (T<sub>4</sub>).

A Tg, glicoproteína, o substrato para a síntese dos hormônios tireóideos, é sintetizada no retículo endoplasmático rugoso; a sua glicosilação é feita no complexo de Golgi e, a seguir, a Tg recém-formada é incorporada a vesículas exocíticas que migram para a membrana apical à qual se incorporam rapidamente, principalmente quando há estímulo por TSH (Utiger, 2001).

A TPO é a enzima responsável pelos processos de oxidação e organificação do iodeto e acoplamento das iodotirosinas. Para tal, esta enzima necessita de concentrações adequadas de tireoglobulina, iodeto e de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). A geração de  $H_2O_2$  ocorre na membrana apical, é mediada pela NADPH-oxidase e requer  $Ca^{++}$  e NADPH (Carvalho e cols, 1996; Dunn, 2001).

Os hormônios tireóideos, ainda ligados à Tg, permanecem armazenados no colóide da luz folicular até que ocorra a endocitose e sua posterior proteólise por enzimas lisosomais, liberando  $T_3$ ,  $T_4$  e as iodotirosinas. As iodotirosinas MIT e DIT são rapidamente desiodadas por uma iodotirosina-desiodase dependente de NADPH (DEHAL1, ou iodotirosina desalogenase 1). Recentemente, esta flavoproteína com 42kDa foi clonada e caracterizada, sendo expressa pela tireóide e regulada positivamente pelo AMPc (Gnidehou e cols.,2004). O iodo e aminoácidos liberados desta reação podem ser reaproveitados pela glândula (Larsen e cols, 1998).

Os hormônios tireóideos  $T_4$  e  $T_3$ , liberados após a proteólise da Tg, se difundem para o líquido extracelular. Parte do  $T_4$ , ainda no tireócito, pode ser convertido a  $T_3$  pela ação de 5'-iodotironina-desiodases. Uma vez secretados pela tireóide,  $T_4$  e  $T_3$  são encontrados na circulação predominantemente ligados a proteínas plasmáticas específicas: TBG (*thyroxine binding globulin*), transtiretina ou TBPA (*thyroxine binding prealbumin*) e, com menos afinidade, à albumina.

Todas as etapas da biossíntese e secreção dos hormônios tireóideos e a expressão das proteínas essenciais a estes processos, tais como a TPO, o NIS e a Tg (ver Tabela 1), são estimuladas pela tireotrofina (TSH), sintetizada nos tireotrofos da adeno-hipófise. O TSH também é fundamental para a diferenciação e proliferação da glândula (Larsen e cols., 1998).

Tabela 1 - Principais proteínas envolvidas na biossíntese dos hormônios tireóideos

Característica	Tg	TPO	NIS
Função	matriz para a iodação e hormonogênese	catálise da oxidação do I <sup>-</sup> e acoplamento	transporte do I <sup>-</sup> para o tireócito
Massa Molecular (kDa)	660	103	65
Localização	lúmen folicular	membrana apical	membrana basal
Fatores de Transcrição	Ttf1/Nkx2-1, FOXE 1 e Pax-8	Ttf1/Nkx2-1, FOXE1 e Pax-8	Ttf1/Nkx2-1 (homologia pequena do promotor)
Resposta ao TSH	↑ atividade	↑ atividade	↑ atividade
Homologia	Acetilcolinesterase	mieloperoxidase	transportador Na <sup>+</sup> /glicose

(Adaptado de Dunn, 2001).

A expressão de TPO e Tg, proteínas específicas da tireóide e fundamentais para a formação dos hormônios tireóideos, é também regulada por fatores de transcrição tireóideos. A combinação dos fatores de transcrição Ttf1/Nkx2-1 (também chamado de TTF-1, fator de transcrição tireóideo 1), FOXE 1 (anteriormente chamado TTF-2, fator de transcrição tireóideo 2) e Pax-8 é fundamental para a expressão de genes essenciais para a diferenciação e morfogênese da glândula . Os fatores de transcrição Ttf1/Nkx2-1, Foxe1 e Pax-8 são expressos não só pelos tireócitos funcionantes, como também pelas células precursoras tireóideas, evidenciando sua importância na organogênese e diferenciação da glândula (Damante & cols, 2001). Atualmente, outros fatores de transcrição importantes para a tireóide foram identificados. O Hhex, em humanos conhecido como HHEX, é um fator de transcrição contendo um domínio *homeo-box*, inicialmente identificado em células hematopoéticas, co-expresso com os outros fatores de transcrição específicos em células foliculares precursoras e funcionantes (De Felice & Di Lauro, 2004).

### I.3. Circulação e metabolização dos hormônios tireóideos

A produção diária total de  $T_4$  em humanos é de 80-100  $\mu\text{g}$  (100-130 nmol), toda originada na glândula tireóide. Na espécie humana, o  $T_4$  tem meia-vida de cerca de 7 dias, permanecendo assim disponível na circulação por alguns dias, mesmo na ausência de secreção de  $T_4$  pela tireóide. A fração plasmática de  $T_4$  ligado à TBG (globulina ligadora de tiroxina) corresponde a 68% do total de  $T_4$ . A fração livre, responsável pelo papel biológico de  $T_4$ , corresponde a  $\approx 0,04\%$  (Kacsoh, 2000). Cerca de 80% do  $T_4$  secretado diariamente é metabolizado em tecidos periféricos pelas iodotironina-desiodases, sendo 40% convertido a  $T_3$ , hormônio tireóideo metabolicamente ativo, e 40% convertido a  $rT_3$  (3,3',5'-triiidotironina ou  $T_3$  reverso), forma metabolicamente inativa (Utiger, 2001).

A produção de  $T_3$ , ao contrário da de  $T_4$ , é realizada principalmente em tecidos extra-tireóides (cerca de 80% da produção diária). O restante, 20%, é produzido e secretado pela tireóide. A produção diária total de  $T_3$  é de 30-40  $\mu\text{g}$  (45-60 nmol) e sua meia-vida é cerca de 1 dia, sendo  $T_3$  degradado mais rapidamente que  $T_4$ , principalmente por ter menos afinidade pelas proteínas plasmáticas. O  $T_3$  também é metabolizado pelas iodotironina-desiodases, gerando os metabólitos 3,5-diiodotironina e 3,3'-diiodotironina (Utiger, 2001). A fração plasmática de  $T_3$  ligada a TBG corresponde a 80% do  $T_3$  total. Já a fração livre, cerca de 0,4 % do total, é aproximadamente 10 vezes maior que a fração livre de  $T_4$  (Kacsoh, 2000).

Em ratos, diferentemente de humanos, a glândula tireóide é a principal responsável pela produção diária de  $T_3$  (cerca de 55%). Já a produção extra-tireóide de  $T_3$ , por atividade das 5'-iodotironina-desiodases, ocorre principalmente no fígado e nos rins (Chanoine, 1993).

Três enzimas catalisadoras da metabolização dos hormônios tireóides foram identificadas, sendo denominadas iodotironina-desiodase tipo I (D1), tipo II (D2) e

tipo III (D3). As desiodases pertencem a uma família de selenoproteínas homólogas, com 250-280 aminoácidos, contendo em seu sítio ativo um resíduo de selenocisteína, essencial à sua atividade catalítica (Bianco e cols., 2002). As principais características das desiodases estão descritas no Tabela 2. Desta forma, dois oligoelementos são fundamentais para a produção e metabolismo dos hormônios tireóideos: iodo e selênio.

As desiodases estão integradas tanto à membrana plasmática quanto ao retículo endoplasmático. Há dados contraditórios acerca da localização celular do sítio ativo de D3, se estaria voltado para o meio extracelular ou para o citoplasma. Aparentemente a D1, como a D3, é uma proteína integral da membrana plasmática com o sítio ativo voltado para o citoplasma; enquanto a D2, também com o sítio ativo voltado para o citoplasma, estaria no retículo endoplasmático de onde o T3 teria acesso mais fácil aos receptores nucleares (Bianco e cols., 2002).

A atividade biológica dos hormônios tireóideos é determinada pela concentração intracelular de T3, que é dependente dos níveis circulantes de T4 (seu precursor) e T3, de proteínas transportadoras que possibilitam o transporte de T4 e T3 pela membrana plasmática das células alvo, e da atividade das iodotironina-desiodases catalisando a ativação ou inativação dos hormônios tireóideos (Friesema e cols., 2005).

Tabela 2 - Características dos três tipos de iodotironina-desiodases humanas

<b>Tipo</b>	<b>D1</b>	<b>D2</b>	<b>D3</b>
<b>Tecidos</b>	figado, rim, tireóide, hipófise	cérebro, hipófise, músculo esquelético, coração, tireóide, placenta	cérebro, placenta tecidos fetais
<b>Substratos</b>	rT3 > T4 > T3	T4 > rT3	T3 > T4
<b>Km</b>	0.1 – 10 nM	10 nM	10 nM
<b>Função</b>	produção plasmática de T3	produção local de T3	degradação de T3
<b>Inibição (IC<sub>50</sub>, mM)</b>			
<b>PTU</b>	alta	baixa	baixa

PTU: propiltiuracil; IOP: ácido iopanóico (Adaptado de Bianco e cols., 2002).

Recentemente, alguns transportadores capazes de realizar captação celular de iodotironinas foram identificados. Os mais específicos são o OATP1 e MCT-8, sendo o primeiro um transportador iônico orgânico e o segundo, pertencente a uma família de transportadores de aminoácidos. As isoformas de OATP1 são expressas em humanos e ratos, principalmente pelo tecido hepático. O OATP1C1 apresenta alta afinidade por T4 e rT3 e parece ser responsável pelo transporte de T4 para o cérebro através da barreira hemato-encefálica. O gene do MCT-8 está localizado no cromossomo X e mutações observadas neste gene parecem desencadear retardo psicomotor severo ligado ao cromossomo X (Friesema e cols., 2005, Jansen e cols., 2007, Dumitrescu e cols., 2006).

#### **I.4. Mecanismos de ação e efeitos dos hormônios tireóideos**

Receptores nucleares específicos para hormônios tireóideos estão presentes em vários tecidos e medeiam as principais ações biológicas de T<sub>4</sub> e T<sub>3</sub>. Estes receptores pertencem a uma superfamília de receptores nucleares, que inclui os

receptores para os hormônios esteróides, vitamina D e retinóides (Utiger, 2001). Os receptores para hormônios tireóideos (TRs) localizam-se predominantemente no núcleo, na ausência ou presença do ligante, em solução ou ligados ao DNA. Estes receptores podem formar heterodímeros com o receptor retinóide X (RXR) (Kishimoto e cols., 2006). O mecanismo de ação dos hormônios tireóideos está descrito sucintamente na figura 4.

De um modo geral, os hormônios tireóideos apresentam diferentes afinidades de ligação com seus receptores específicos. A afinidade de T3 pelos TRs é de cerca de 10-15 vezes maior do que a de T4, sendo responsável pela maior parte dos efeitos biológicos desencadeados pelos hormônios tireóideos. A análise estrutural e funcional do TR revela uma estrutura modular com domínios funcionais distintos. Os dois principais domínios são: o de ligação ao DNA (*DNA-binding domain- DBD*) e o de ligação ao ligante (*ligand-binding domain- LBD*). O DBD situa-se na porção central dos receptores e é organizado por dois segmentos estruturais conhecidos como dedos de zinco. O domínio de ligação do hormônio ou ligante é menos conservado que o DBD, refletindo a variedade de ligantes que atuam nestes receptores. Este domínio localiza-se na região carboxi-terminal e possui várias funções, como a homo e heterodimerização do receptor, localização nuclear, e interação com proteínas co-repressoras e co-ativadoras. Além dessas funções, o LBD contém uma superfície que é fundamental para a ativação transcricional, que se forma com a ligação do hormônio (Yen, 2001).

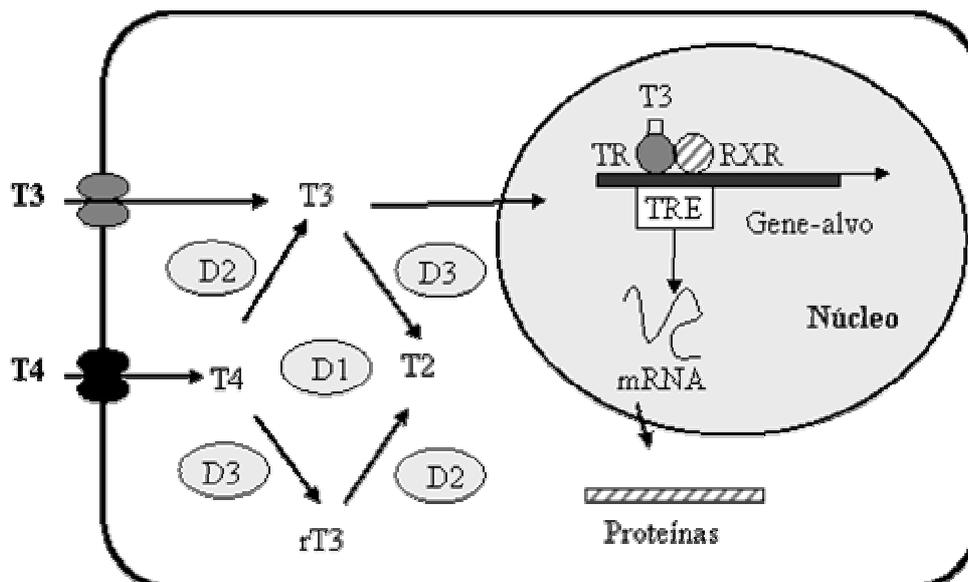


Figura 4 – Modelo simplificado de metabolização e ação dos hormônios tireóideos. TRE: elemento responsivo ao hormônio tireóideo; RXR: receptor retinóide tipo X, TR: receptor para hormônio tireóide. (Adaptado de Friesema e cols., 2005).

Os hormônios tireóideos são transportados para dentro da célula-alvo, sofrendo ou não metabolização pelas iodotironina-desiodases presentes. O T3 transloca-se para o núcleo, ligando-se à porção LDB do TR. O receptor, ativado pelo hormônio, liga-se aos elementos responsivos aos hormônios tireóideos (TREs) para alterar a taxa de transcrição gênica e consequentemente os níveis de mRNA.

Existem dois tipos de receptores para hormônios tireóideos, as isoformas  $\alpha$  e  $\beta$ . Ambas as isoformas estão muitas vezes expressas nos mesmos tecidos e, em fígado de ratos, por exemplo, ligam hormônios tireóideos com a mesma afinidade (Hulbert, 2000). Existem 2 genes distintos que codificam TR $\alpha$  e  $\beta$ , localizando-se em humanos nos cromossomos 17 e 3, respectivamente. Estes genes codificam algumas proteínas diferentes ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\Delta\alpha$ 1,  $\Delta\alpha$ 2,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3 e  $\Delta\beta$ 3), como resultado do processamento alternativo do mRNA ou da utilização de promotores alternativos. Somente as isoformas  $\alpha$ 1,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 e  $\beta$ 3 se ligam ao hormônio tireóideo. As isoformas  $\alpha$ 1 e  $\alpha$ 2 diferem em sua região carboxiterminal, domínio de ligação ao hormônio, ao passo que  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3 diferem em sua região aminoterminal. A isoforma TR  $\alpha$ 2, por

não se ligar ao T3, pode inibir a transcrição mediada por outras isoformas, provavelmente por competir com a ligação aos TREs e com a formação de heterodímeros com (RXR) (Yen, 2001; Barra e cols, 2004).

Em mamíferos, TR $\alpha$ -1 e TR $\beta$ -1 têm homologia estrutural no tamanho da molécula, e nos domínios LDB e DBD. Estas isoformas são amplamente expressas em tecidos murinos. Entretanto, o mRNA para TR $\alpha$ -1 tem maior expressão em músculos, especialmente miocárdio, e tecido adiposo marrom, enquanto o TR $\beta$ -1 é mais expresso em rim, fígado e cérebro. O TR $\beta$ -2 tem expressão restrita em adeno-hipófise e algumas áreas hipotalâmicas. Acredita-se que as isoformas do TR $\beta$  estejam envolvidas com o mecanismo de *feedback* negativo pelos HT uma vez que camundongos com deleção dupla para TR $\beta$  (TR $\beta$ 1 e 2) e pacientes com resistência aos HT por mutação em TR $\beta$  apresentam os níveis de TSH elevado (Weiss e cols., 2002).

Os hormônios tireóideos regulam a expressão de proteínas estruturais importantes para diversos processos metabólicos (ver Tabela 3). O estímulo dos hormônios à expressão da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase, da UCP-1 e de UCP-3 (UnCoupling Protein), por exemplo, é fundamental para o *turnover* do ATP necessário para a manutenção do metabolismo basal e da termogênese (Kacsoh, 2000).

Os hormônios tireóideos também atuam na função cardiovascular, aumentando a contratilidade cardíaca e o consumo de oxigênio devido à expressão preferencial da isoforma  $\alpha$  da cadeia pesada da miosina (MHC) e de SERCA 1 (Ca<sup>++</sup>-ATPase) pelas células cardíacas. Além desses efeitos, há, também, aumento na expressão de receptores  $\beta_1$ - adrenérgicos e, conseqüentemente, de seu principal mediador (proteína G<sub>s</sub>) o que leva a um aumento na freqüência e no tônus cardíacos (Kacsoh, 2000).

Entretanto, nem todas as ações de  $T_3$  e  $T_4$  nos processos de síntese protéica são estimuladores. Os hormônios tireóideos diminuem a expressão de TRH (hormônio liberador de tireotrofina) pelos núcleos paraventriculares hipotalâmicos e de TSH pelos tireotrofos (Utiger, 2001).

Tabela 3 - Genes regulados por hormônios tireóideos

AUMENTO NA EXPRESSÃO	DIMINUIÇÃO NA EXPRESSÃO
UCP-1 e UCP-3 Ca <sup>++</sup> -ATPase $\alpha$ -MHC Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase Proteína mielínica básica Glicoproteína associada à mielina Receptor para LDL Receptores $\beta$ adrenérgicos GH D1 D3	TRH Subunidades $\alpha$ e $\beta$ de TSH G $\alpha_1$ , subunidade de proteínas G triméricas $\beta$ -MHC Prolactina EGF-R D2

UCP-1 e UCP-3: uncoupling proteins;  $\alpha$ -MHC: cadeia pesada  $\alpha$  da miosina;  $\beta$ -MHC: cadeia pesada  $\beta$  da miosina; LDL: lipoproteína de baixa densidade (Adaptado de Yen, 2001).

Outros efeitos conhecidos dos hormônios tireóideos são observados no controle de funções metabólicas, tais como: a regulação da produção e atividade de diversas enzimas, da produção e metabolismo de outros hormônios e da utilização de substratos, vitaminas e minerais. No metabolismo intermediário, por exemplo, os hormônios tireóideos promovem um balanço entre os processos anabólicos e catabólicos. Assim,  $T_3$  e  $T_4$  promovem tanto a lipólise quanto a lipogênese, aumentando a atividade da lipase hormônio-sensível no tecido adiposo e no fígado e estimulando a atividade da enzima málica e da ácido graxo sintase no fígado; também aumentam a gliconeogênese e a glicogenólise hepática com maior liberação de glicose. Estimulam a geração de ATP, ao mesmo tempo em que aumentam a atividade ATPásica. Em função do conjunto de seus efeitos, os hormônios tireóideos têm importância fundamental na termogênese e manutenção do metabolismo, assim como no crescimento e na maturação tecidual (Utiger, 2001).

## I.5. Regulação da glândula tireóide

A biossíntese dos hormônios tireóideos e sua disponibilidade plasmática e tecidual estão sob o controle do eixo hipotálamo-hipofisário. O TRH, secretado pelos neurônios dos núcleos paraventriculares hipotalâmicos, é o principal estimulador da produção e secreção de TSH pelos tireotrofos adeno-hipofisários. O TSH, por sua vez, é o principal hormônio modulador da função tireóidea. O aumento nos níveis séricos de T3 e T4 pelo estímulo de TSH inibe, em maior grau, a secreção de TSH pelos tireotrofos e, em menor grau, a liberação hipotalâmica de TRH. Este mecanismo de retroalimentação (ou *feedback*) negativo mantém a estabilidade da atividade tireóidea e, conseqüentemente, contribui para a manutenção da homeostase do organismo (Hulbert, 2000).

O TSH, uma glicoproteína de 28kDa, sintetizada e secretada por células tireotróficas localizadas na adeno-hipófise, é o principal regulador da função tireóidea normal. O TSH é composto por duas subunidades peptídicas ( $\alpha$  e  $\beta$ ) ligadas não-covalentemente. A subunidade  $\alpha$  do TSH é igual à do hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo-estimulante (FSH) e gonadotrofina coriônica, enquanto a subunidade  $\beta$  confere a especificidade ao TSH (Utiger, 2001).

Os níveis séricos de TSH refletem tanto as variações pulsáteis quanto as circadianas. A magnitude dos pulsos de TSH, caracterizados por flutuações de intervalos de 1-2h, estão diminuídos no jejum, em algumas doenças e no período pós-cirúrgico. A variação circadiana é caracterizada por um pico noturno que não depende de variações nos níveis dos hormônios tireóideos (Larsen e cols, 1998).

O principal estimulador da síntese e secreção do TSH pela hipófise é o TRH, tripeptídeo produzido principalmente nos núcleos paraventriculares hipotalâmicos. Estes núcleos enviam seus axônios para regiões próximas à eminência média, em

aposição aos capilares do sistema porta hipotalâmico-hipofisário. Em resposta a um estímulo, esses neurônios liberam o TRH que rapidamente atinge a adeno-hipófise pelo sistema porta hipotalâmico-hipofisário e age nos tireotrofos mediando a liberação, assim como a síntese, de TSH (Nillni & Sevarino, 1999).

Os hormônios tireóideos exercem controle negativo na secreção de TSH diretamente nos tireotrofos adeno-hipofisários, sendo a conversão intra-hipofisária de  $T_4$  a  $T_3$ , pelas 5'-iodotironina-desiodases, muito importante para este efeito. Além das ações diretas na inibição da expressão gênica das subunidades do TSH, os hormônios tireóideos também diminuem a expressão de receptores para TRH nos tireotrofos. Em animais, o hipotireoidismo duplica a capacidade de ligação de TRH aos seus receptores específicos; este efeito pode ser reduzido pela reposição de hormônios tireóideos, sem afetar os receptores para somatostatina (Scanlon, 2001). Os hormônios tireóideos também reduzem a secreção do TRH, provavelmente por diminuir o RNAm do pro-TRH e o próprio pro-TRH (precursor de TRH), reduzindo a síntese de TRH hipotalâmico (Utiger, 2001). Outras substâncias, tais como: leptina e noradrenalina, podem estimular direta ou indiretamente a secreção de TSH, ao passo que neuropeptídeo Y (NPY), GH, dopamina, glicocorticóides e opióides podem inibi-la. (Scanlon, 2001; Ahima & Osei, 2001).

O TSH regula positivamente todas as etapas de biossíntese dos hormônios tireóideos: o transporte de iodeto, a geração de  $H_2O_2$ , a endocitose do colóide contendo Tg, a atividade iodotirosina-desiodase e a secreção dos hormônios tireóideos, assim como a expressão de proteínas essenciais para essa biossíntese, tais como NIS, TPO, NADPH-oxidase e Tg (Larsen e cols, 1998, Carvalho e cols, 1996).

O TSH estimula o crescimento, a diferenciação, função e sobrevivência das células tireóideas via um receptor específico (TSH-R), com sete domínios

transmembrana, por ativação de uma proteína  $G_s$ , que estimula a enzima adenilato-ciclase e aumenta o conteúdo intracelular de AMPc (ver figura 5). Este funciona como um segundo mensageiro, ligando-se a subunidades regulatórias da proteína-quinase dependente de AMPc (PKA) e liberando as sub-unidades catalíticas que poderão fosforilar diferentes proteínas-alvo entre as quais o CREB (AMPc responsive element binding protein), um fator de transcrição responsivo a AMPc (Schlumberger & Pacini, 1999).

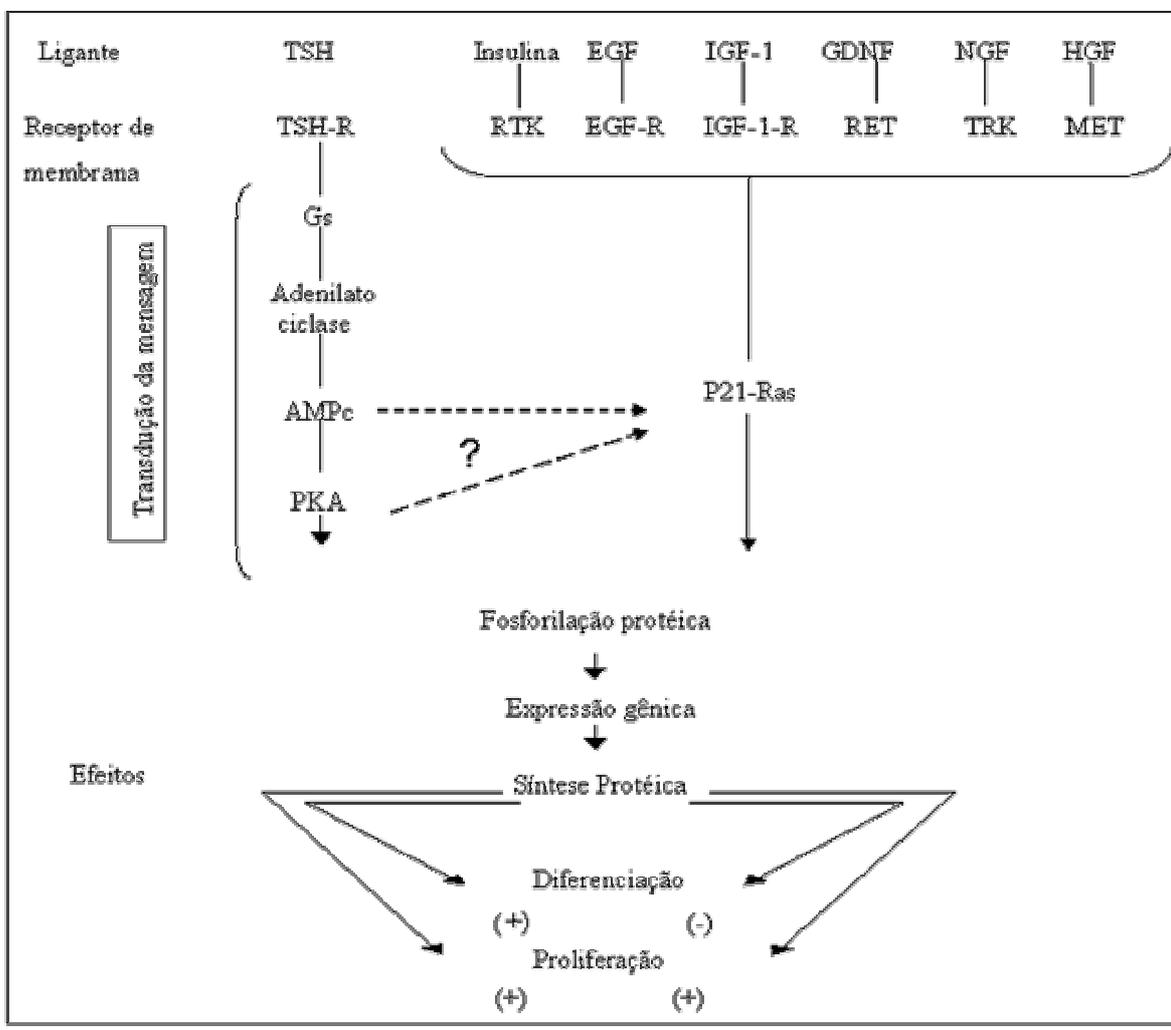


Figura 5 - Vias sinalizadoras nas células foliculares tireóideas (adaptado de Schlumberger & Pacini, 1999).

Após a ligação do TSH ao seu receptor de membrana específico, também ocorre ativação de proteína Gq ativando a fosfolipase C (PLC), que hidrolisa o fosfatidil-inositol 4,5-bifosfato da membrana celular (PIP<sub>2</sub>) e gera fosfatidil-inositol 3-fosfato (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (DAG). O aumento no influxo de Ca<sup>++</sup> gerado pelo IP<sub>3</sub> e a ativação da proteína cinase C (PKC) pelo DAG parecem ser responsáveis pela ativação da NADPH-oxidase e geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Carvalho e cols., 1996) e Corvilain e cols.,1994). Mais recentemente, um estudo *ex-vivo* em nódulos frios de tireóides humanas, observou-se ativação de PLC e geração de IP<sub>3</sub> e outros fosfatos de inositol, mesmo em presença de pequenas concentrações de TSH (Van Sande e cols., 2006).

A via AMPc-PKA medeia a maior parte dos efeitos biológicos de TSH, sendo fundamental para a proliferação e diferenciação das células foliculares. Entretanto, para o efeito proliferativo pleno do TSH em células tireóideas FRTL-5, a atividade Ras p21 é necessária, indicando uma possível ativação da via efetora Ras pela cascata de sinalização gerada por AMPc (Ciullo e cols, 2001).

A ativação da via Ras estimula a proliferação e inibe a diferenciação em diferentes tipos celulares (Schlumberger & Pacini, 1999). A subfamília de pequenas GTPases Ras é constituída por proteínas de 20-25 kDa, incluindo H-, K- e N-Ras. Uma célula de mamífero possui cerca de 50-100 diferentes proteínas ligadoras de GTP, capazes de regular diversos processos biológicos, tais como: biossíntese protéica e processos de sinalização transmembrana envolvidos na comunicação entre os meios intra- e extracelular (Wittinghofer & Nassar, 1996). A ativação das proteínas Ras requer a transição de seu estado inativo, ligado a guanina difosfato (GDP) para o estado ativo, ligado a guanina trifosfato (GTP). Este ciclo é controlado por dois tipos principais de proteínas reguladoras: o fator trocador de guanina (GDP-exchange factor, ou GEF) que catalisa a troca de GDP por GTP, ativando Ras, e a

proteína ativadora de GTP-ase (GTP-ase activating protein ou GAP) que aumenta a atividade GTP-ase intrínseca de Ras, inativando-a. (Crespo & Leon, 2000).

Estímulos extracelulares de diversos tipos, mediados por receptores de membrana celular, ativadores de tirosina-quinase ou acoplados à proteína G (vide figura 5) podem convergir na ativação de proteínas Ras. Estas se associam a diversos tipos de efetores e geram uma cascata de sinalização. O efector mais conhecido da via Ras é a proteína Raf-1, cuja ligação com Ras aumenta o seu próprio recrutamento para a membrana celular. Uma vez ativada, Raf-1 fosforila a MEK em serina (*MAPK kinase*). MEK ativada funciona como uma “dual-specificity kinase” e fosforila resíduos treonina e tirosina em seu principal grupo de substratos, as proteínas ERK1 e ERK2 (*MAPK extracellular signal-regulated kinases p42 e p44*). As proteínas ERK fosforilam resíduos em tirosina e treonina e têm vários substratos localizados no citoplasma, incluindo SOS e MEK, e no núcleo, como SMADs e Elk-1, que são fosforiladas após translocação de ERK fosforilada para o núcleo. A ativação da via Raf-ERK é suficiente para induzir transformação ou diferenciação em diversos tipos celulares (Crespo & Leon, 2000, Vandeput e cols, 2003).

Outra via efectora importante de Ras é a da PI3-K (fosfatidilinositol-3-fosfato cinase). Esta enzima catalisa a fosforilação de fosfoinosítídeos, na posição 3' do anel inositol, em resposta a ativação de Ras. A PI3-K é uma enzima composta de uma subunidade regulatória p85 e uma subunidade catalítica p110, ambas com várias isoformas identificadas. A ativação de Akt, ativada pela PI3-quinase, tem efeito anti-apoptótico e regula várias vias metabólicas (Crespo & Leon, 2000). Estas vias estão esquematizadas na Figura 6.

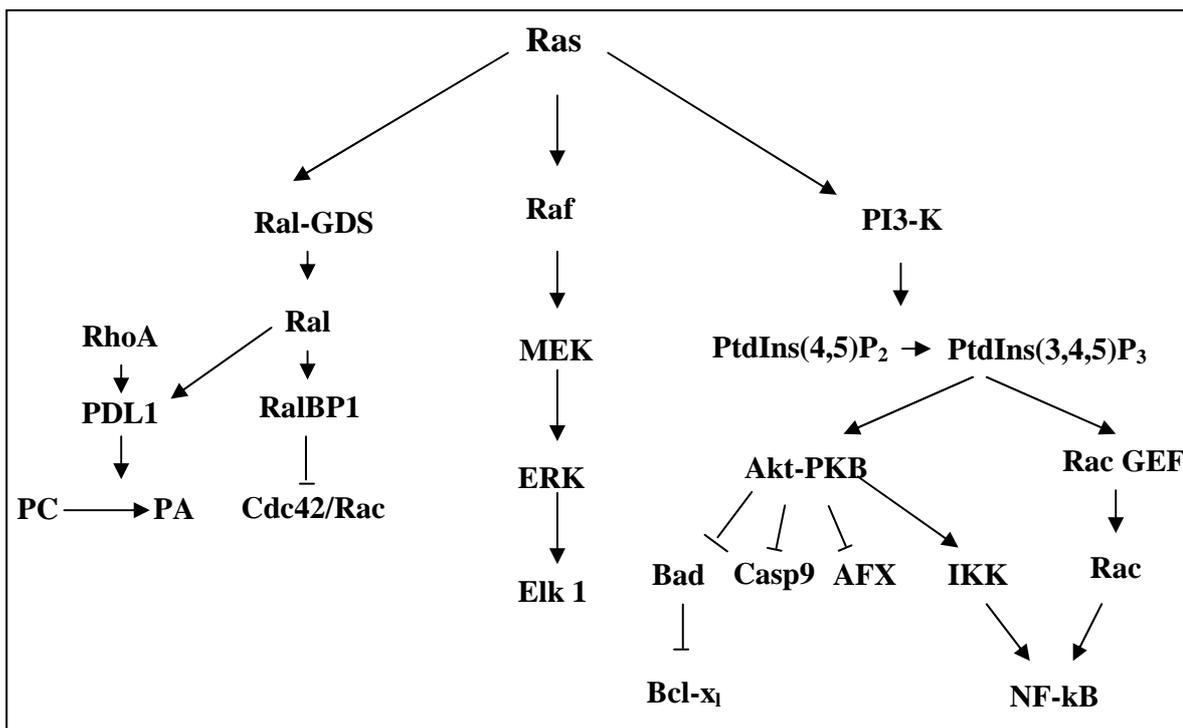


Figura 6 - As principais vias efectoras ativadas por Ras. MEK: MAPK kinase, PI3-K: fosfatidilinositol-3-fosfato cinase, Raf serina-treonina kinases: Raf-1, A-Raf e B-Raf, Ral-GDS, RGL e RGL-2/Rlf: fatores trocadores de GDP-GTP, RalBP1 ou RLIP1/RIP1: proteína ativadora de GTPase, ERK: MAPK extracelular signal-regulated kinases p42 e p44, Elk1: fator de transcrição, PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato, PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>: fosfatidilinositol 3,4,5- trifosfato, Akt-PKB: proteína kinase B, PDL1: fosfolipase D1, PC:fosfatidilcolina PA: fosfatidic acid, RhoA e Cdc42/rac: proteínas pertencentes a família Rho de GTPases, Bad: Bcl- x<sub>1</sub>: proteína anti-apoptótica Casp 9: caspase 9, AFX: fator de transcrição pertencente a família *Forkhead* IKK: kinase IκB Rac GEF, Rac, NF-kB: fator de transcrição nuclear κB (Adaptado de Wittinghofer & Nassar, 1996).

O acúmulo de iodeto pela glândula tireóide também é um fator regulatório importante da função tireóidea. Desta forma, o iodeto, principal substrato da biossíntese dos hormônios tireóideos, pode diminuir a resposta do tireócito ao TSH, inibindo agudamente sua própria oxidação (efeito Wolff-Chaikoff) e reduzindo a captação de iodeto logo depois (adaptação ao efeito Wolff-Chaikoff). Quando presente em altas concentrações nas células foliculares, o iodeto inibe a secreção dos hormônios tireóideos (Dumont & Vassart, 2001).

Estes mecanismos autorregulatórios da glândula tireóide servem para adequar a velocidade de síntese dos hormônios tireóideos à disponibilidade do substrato, mantendo a constância do pool hormonal. Existe, portanto, uma relação inversa entre o nível de iodeto orgânico na glândula tireóide e a velocidade de formação de T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> (Larsen e cols, 1998).

***Para explicar como o acúmulo de iodeto na célula folicular poderia levar aos efeitos inibitórios sobre a função tireóidea, foram postulados a participação de um ou mais compostos iodados neste processo, denominados genericamente por compostos XI, tendo sido sugeridos: a própria tiroxina, eicosanóides iodados (iodolactona) e iodoheptadecanal (Dumont & Vassart, 2001).***

## **I.6. ENVELHECIMENTO E FUNÇÃO TIREÓIDEA**

Algumas das principais teorias sobre envelhecimento baseiam-se nas modificações encontradas nos sistemas orgânicos para explicar a senescência. Na teoria neuro-endócrina, por exemplo, sugere-se que um marcapasso central

desencadearia a falência endócrina múltipla, levando ao processo de envelhecimento. Além disso, algumas mudanças próprias do envelhecimento acabam se confundindo com sinais e sintomas de doenças endócrinas. Por exemplo, alterações bastante encontradas em pessoas idosas, tais como: bradicardia, hipertensão, hipercolesterolemia, ganho de peso, intolerância ao frio, constipação, cabelos e pele ressecadas, perda de massa muscular, letargia e disfunção cognitiva, assemelham-se a sintomas freqüentes no hipotireoidismo (Morley, 2001).

O processo de envelhecimento tem sido estudado do ponto de vista molecular, celular e orgânico, com destaque para a identificação de genes relacionados com a duração da vida de um organismo. No microorganismo *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, a longevidade é aparentemente determinada pelo acúmulo celular de DNA circular extracromossômico (ERCs), uma vez que o seu acúmulo nas células-filhas aumenta gradativamente, após sucessivas divisões celulares, gerando mudanças no fenótipo do organismo e cada cópia celular funciona como um marcador do número de divisões celulares da célula-mãe (Guarente e cols., 1998).

Os principais estudos acerca do envelhecimento e repercussões na função tireóidea em humanos mostram uma redução da atividade tireóidea em indivíduos velhos, afetando o eixo hipotálamo-hipófise-tireóide. Em estudos que abordam a freqüência de doenças em uma dada população, verificou-se que o hipotireoidismo acomete mais pessoas na faixa etária de 45-65 anos, sendo mais prevalente nas mulheres (6- 10% do total) do que nos homens (2-3% do total) (Griffin, 1990). Histologicamente, observa-se aumento substancial na quantidade de tecido conjuntivo interfolicular, diminuição relativa da quantidade de células foliculares e, eventualmente, de colóide, aumento do número de micronódulos e da

heterogeneidade intratecidual (Studer e Berger, 1995).

Há controvérsias em relação aos níveis séricos de TSH e da resposta do TSH ao TRH em idosos, levando-se em consideração a heterogeneidade das populações estudadas e da prevalência de alguns anticorpos anti-tireóideos (Van Coevorden e cols, 1991; Morley, 2001, Mariotti e cols., 1995). A secreção de TSH em resposta ao estímulo do TRH parece diminuir, indicando menor resposta dos tireotrofos à estimulação do TRH nos idosos (Van Coevorden e cols, 1991; Monzani e cols, 1996).

Os níveis séricos de TSH variam pouco durante o envelhecimento humano, seja nem relação às variações pulsáteis ou às variações circadianas da secreção de TSH, apesar da amplitude dos pulsos ser menor nos velhos (Van Coevorden e cols, 1991; Lewis e cols, 1991). mas variações para mais (Sawin e cols, 1979; Tietz e cols, 1992) ou para menos em relação aos jovens (Mariotti e cols, 1993, Pinchera e cols., 1995) são também referidas.

A produção de  $T_4$  em humanos velhos diminui para cerca de 60  $\mu\text{g}/\text{dia}$ , o que é contrabalançado por uma diminuição na taxa de *clearance* de  $T_4$ , assim não haveria alteração na fração livre de  $T_4$  em indivíduos velhos. Já a fração livre de  $T_3$  diminui com o envelhecimento, em conseqüência do decréscimo na produção diária, sem alteração concomitante do *clearance* (Morley, 2001).

Indivíduos centenários, estudados na Itália, modificaram alguns dos conceitos anteriormente vigentes em relação às alterações na função tireóidea em pessoas idosas, uma vez que apresentam menor prevalência de anticorpos anti-tireóideos que a população na faixa etária de 60-85 anos estudada em paralelo, o que indica que nestes indivíduos muito idosos a prevalência de doença autoimune tireóidea é bem menor que na população geral. Tanto os níveis séricos de  $T_3$  quanto os de TSH estão diminuídos nos centenários quando comparados ao de pessoas na faixa etária de 65-80 anos ou mais jovens (Mariotti e cols, 1993, Pinchera e cols., 1995).

Em ratos, ocorre progressiva redução do número de folículos, durante o envelhecimento, associada à redução nos níveis séricos de T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> (Cizza e cols, 1992). Os níveis de TSH parecem estar inalterados nos ratos velhos (Klug & Adelman, 1979; Donda e cols, 1987; Corrêa da Costa e cols., 2001). Outros dados indicam uma diminuição na resposta da glândula tireóide à estimulação por TSH, possivelmente mediada por uma diminuição no número de sítios ligantes do TSH-R, o que poderia causar a redução nos níveis séricos de T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> (Reymond e cols, 1992).

Tamura & Fujita (1981) observaram em camundongos, a partir de 10 meses, um aumento da heterogeneidade da glândula tireóide, com cerca de 4,5% dos folículos não responsivos ao TSH, com baixa capacidade de concentração de radiodo, aumento no tamanho e no conteúdo coloidal. Estas alterações morfológicas são associadas a modificações funcionais na glândula, que são refletidas em níveis séricos de hormônios tireóideos alterados no envelhecimento. Já Gerber e cols. (1987), evidenciaram efeitos do envelhecimento na tireóide a partir dos 6 meses de idade, com perda gradativa da capacidade de iodação e de remoção dos estoques de tireoglobulinas iodadas do colóide. Além disso, ocorre uma redução dos níveis séricos de testosterona em função do envelhecimento (Wang e cols, 2002; Wang & Stocco, 2005) mas não há descrição na literatura para alterações em níveis séricos de estradiol e progesterona, em ratos.

Diferenças entre os sexos na função tireóidea também são descritas em ratos. Enquanto as fêmeas velhas parecem manter os níveis séricos de T<sub>3</sub> dentro de limites normais, provavelmente por apresentarem maior atividade da D1 hepática, os machos apresentam diminuição significativa nos níveis de T<sub>3</sub> (Corrêa da Costa e cols., 2001). Já Marassi (2005) verificou um aumento da D1 em machos pré-puberes. Corrêa da Costa e cols. (2001) observaram, ainda, maior expressão de Tg

e TPO em machos jovens do que em ratos velhos e fêmeas. Fukuda e cols. (1975) não observaram variação entre os sexos de T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> e TSH em ratos adultos.

O fator idade associado à diferença entre os sexos pôde ser acompanhado por estudos seqüenciais realizados com ratos Wistar. Em ratos imaturos, as fêmeas apresentam níveis séricos mais elevados de TSH do que os machos, com valores significativamente maiores por volta do 20º dia de vida. Entretanto, as concentrações de TSH-R em frações de membrana do 1º ao 20º dia aumentam gradativamente, sendo significativamente maiores em machos devido ao aumento em paralelo nos níveis séricos de androgênios (Banu e cols; 2002). Durante o período pré-puberal ocorre à maturação do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide, com o início da produção de estrogênio e testosterona, por isso postula-se influência dos hormônios desta fase no crescimento e função tireóidea. Corroborando esta hipótese, foi demonstrada a presença de receptores para estrogênio e androgênio na glândula tireóide de ratos imaturos, sob condições normais (Banu e cols., 2002). Ainda durante o período pré-puberal, Banu e cols. (2002) relataram que ratos imaturos, tratados com esteróides sexuais, apresentam correlação positiva do TSH com os índices de proliferação dos tireócitos, em machos e fêmeas. Banu & Aruldas (2002) avaliaram os níveis séricos de T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub>, totais e livres, de ratos machos e fêmeas em vários estágios de maturação sexual, não tendo encontrado diferenças entre os sexos nos animais pré-púberes. Durante a maturação sexual, ocorre uma reversão do modelo observado para ratos pré-púberes, com TSH sérico mais elevado em machos e TSH-R em fêmeas (Banu & Aruldas 2002).

Também está descrito, em ratos velhos, a perda de responsividade dos tireotrofos ao estímulo de TRH e uma redução no conteúdo hipotalâmico de pré-pró-TRH (Cizza e cols, 1992). Entretanto, o conteúdo hipofisário de TRH parece ser

maior nos velhos, com aumento na densidade de receptores para TRH nos tireotrofos, sem aumento de sua afinidade (Donda e cols, 1989).

Como observado em humanos e ratos, a presença de níveis inalterados de TSH, associados a níveis reduzidos de  $T_3$  e  $T_4$ , indica alteração do limiar de supressão da secreção de TSH pelos hormônios tireóideos, durante o envelhecimento. Esta alteração poderia ser resultado de uma conversão hipofisária aumentada de  $T_4$  para  $T_3$  (Donda e cols.,1987) ou, ainda, de aumento na captação de  $T_4$  pelos tireotrofos (Lewis e cols, 1991; Scanlon, 2001). No entanto, resultados prévios do nosso laboratório mostram diminuição significativa das atividades  $T_4$ -5'-desiodase tipos I e II, pelo menos em ratas velhas (Corrêa da Costa & Rosenthal, 1996). Por outro lado, não há resposta adequada da tireóide ao estímulo do TSH, cujos níveis séricos estão em limites considerados normais, embora haja diminuição nos níveis séricos de  $T_4$ .

Em função das informações vistas acima, pode-se afirmar que, no envelhecimento, existe tanto um comprometimento no eixo hipotálamo-hipofisário como alteração da função tireóidea. O fato de a diminuição nos níveis circulantes de hormônios tireóideos não produzir o aumento do TSH sérico que seria de esperar deixa a dúvida: a adeno-hipófise não responde por disfunção intrínseca dos tireotrofos, ou porque o seu estímulo pelo TRH está diminuído? Assim, resolvemos avaliar a resposta hipofisária de ratos velhos a uma acentuada redução nos níveis séricos de hormônios tireóideos induzida pelo hipotireoidismo farmacológico.

Por outro lado, o fato do tamanho da glândula tireóide de ratos velhos manter-se inalterado, quando tudo sugere que – funcionalmente - o estímulo pelo TSH sérico é ineficiente, levanta uma dúvida acerca dos mecanismos envolvidos neste aparente paradoxo: função diminuída e trofismo mantido. Sabendo do papel fundamental da via RAS na proliferação e diferenciação tireóidea, resolvemos

verificar se a atividade desta via estaria modificada no envelhecimento, bem como se ocorre alteração na via Ras do tireócito com o envelhecimento.

O TTF-1 é um dos fatores de transcrição tireóideos fundamentais para o funcionamento adequado da glândula, pois regula, além da morfogênese, a expressão gênica de proteínas fundamentais para a biossíntese dos hormônios tireóideos, tais como Tg e TPO. Assim, interessou-nos investigar, também, se há modificação a expressão de TTF-1 em tireócitos murinos em função do envelhecimento.

## **II. OBJETIVOS**

---

### **Geral**

**Analisar as repercussões do envelhecimento nos hormônios tireóideos e no TSH (sérico e hipofisário), em resposta ao hipotireoidismo farmacológico, assim como avaliar o efeito do envelhecimento em uma das vias de sinalização intra-tireóideas (RAS, ERK).**

### **Específicos**

**⇒ Verificar se existe diferença entre ratos adultos jovens e velhos em relação à capacidade de secreção de TSH e/ou conteúdo de TSH hipofisário em resposta ao hipotireoidismo farmacológico.**

**⇒ Avaliar se ocorrem modificações na expressão tireóidea de Ras, pERK, ERK total e TTF-1 com o envelhecimento.**

### **III. MATERIAL E MÉTODOS**

---

#### **III.1. Animais**

Neste estudo foram utilizados ratos Dutch-Miranda e Wistar, machos e fêmeas, criados e mantidos no biotério do Laboratório de Fisiologia Endócrina, IBCCF<sup>o</sup>, em condições adequadas de temperatura (22-25°C) e ciclo claro-escuro (12/12h), com livre acesso à água e a ração comercial (Purina, conteúdo de iodo  $\approx$  2 mg/kg). O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Avaliação do Uso de Animais em Pesquisa (CAUAP) do IBCCF<sup>o</sup>/UFRJ.

#### **III.2. Tratamento dos animais e coleta das amostras**

##### **- Hipotireoidismo**

Para a avaliação da capacidade de produção/secreção de TSH pelos tireotrofos, em resposta ao hipotireoidismo farmacológico, grupos de ratos Wistar e Dutch-Miranda, machos e fêmeas, jovens e velhos, foram tornados hipotireóides pela adição de metimazole (MMI 0,03%) à água de beber, por 21 dias.

##### **- Grupos experimentais:**

Macho Jovem Controle - animais com 3-5 meses de idade não tratados

Fêmea Jovem Controle - animais com 3-5 meses de idade não tratados

Macho Velho Controle - animais com 12-15 meses de idade não tratados

Fêmea Velha Controle - animais com 12-15 meses de idade não tratados

Macho Jovem Hipotireóideo - animais com 3-5 meses de idade com o hipotireoidismo induzido por adição de MMI 0,03% na água de beber por 21 dias.

Fêmea Jovem Hipotireóidea - animais com 3-5 meses de idade com o hipotireoidismo induzido por adição de MMI 0,03% na água de beber por 21 dias.

Macho Velho Hipotireóideo - animais com 12-15 meses de idade com o hipotireoidismo induzido por adição de MMI 0,03% na água de beber por 21 dias.

Fêmea Velha Hipotireóidea - animais com 12-15 meses de idade com o hipotireoidismo induzido por adição de MMI 0,03% na água de beber por 21 dias.

Após anestesia com éter, amostras de sangue foram coletadas no 3º, 7º, 14º e 21º dias de tratamento. O soro foi obtido por centrifugação a 1200 x g e 4°C, por 15 min, em centrífuga refrigerada Incibrás Spin VI, e os soros armazenados a -20°C até posterior dosagem de T<sub>4</sub>, T<sub>3</sub> e TSH séricos. Nos grupos de animais controle, também foi realizada dosagem de estradiol e testosterona séricos.

Para a avaliação do conteúdo hipofisário de TSH, as hipófises foram excisadas ao final do tratamento (21º dia) e homogeneizadas em tampão PBS (0,01M de NaCl, pH 7,6). O homogeneizado foi centrifugado a 1200 x g e 4°C, por 15 min, em centrífuga refrigerada Incibrás Spin VI. O sobrenadante foi armazenado a -20°C até posterior dosagem de TSH. A concentração protéica do homogeneizado foi determinada pelo método de Bradford (1976) e o TSH foi expresso em função do conteúdo protéico glandular.

- Western blotting

Ratos machos e fêmeas Dutch-Miranda com 4-5 e 11-21 meses de idade foram sacrificados por decapitação, as tireóides rapidamente excisadas e 3-5 glândulas foram homogeneizadas em 750µl ou 1000µl de tampão Tris-HCl 0,0625M,

pH 6,8, contendo 10% de glicerol, 3% de SDS e uma alíquota do homogeneizado foi utilizada para a dosagem de proteínas pelo método de Bradford (1976). Posteriormente, foram adicionadas às amostras 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol, e 0,01% de azul de bromofenol para análise de Ras, ERK total e ERK fosforilado por *immunoblotting*.

### **III.3. Quantificação dos níveis séricos de estradiol, testosterona, T<sub>4</sub>, T<sub>3</sub>, TSH e do conteúdo de TSH hipofisário**

Os níveis de T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> foram quantificados por radioimunoensaios comerciais específicos (Total triiodothyronine RIA *Kits* - Immunotech e DSL-3200 ACTIVE<sup>®</sup> Thyroxine Coated-Tube Radioimmunoassay *Kit* – Diagnostic Systems Laboratories), usando soro de ratos livre de iodotironinas para a preparação da curva padrão e para a verificação do máximo de ligação entre o anticorpo fornecido pelo *kit* e o hormônio marcado com <sup>125</sup>I.

Os níveis séricos e hipofisários de TSH foram medidos por radioimunoensaio de duplo anticorpo, específico para ratos, com reagentes fornecidos pelo Dr. A. F. Parlow (National Hormone & Peptide Program, National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney Diseases, EUA). O TSH foi radiomarcado, em nosso laboratório, pelo método da cloramina T. As amostras, conhecidas (curva padrão- 0.625-25ng/ml) e desconhecidas (do soro obtido de ratos dos grupos experimentais descritos), foram incubadas em tampão PBS 0.01M contendo 1% de albumina bovina sérica, pH 7.6, com um anti-IgG de rato por 2 horas (diluição de 1:1500), com posterior adição de I<sup>125</sup>-TSH (10.000 cpm por tubo). Após incubação com o I<sup>125</sup>-TSH por 21-24 horas, foi adicionado o 2º anticorpo (Sigma), anti-IgG de coelho, em cabra, na diluição de 1:15. Outra incubação foi realizada por 3 horas em temperatura ambiente, com posterior centrifugação a 1200 x g e 4°C, por 30 min, em centrífuga

refrigerada Incibrás Spin VI. Após decantação da fração sobrenadante, os tubos foram levados a um contador gama de radioatividade (Compugamma).

Os níveis de estradiol e testosterona foram quantificados por *Kits* de radioimunoensaios comerciais específicos (DSL-4400 Estradiol e DSL-4100 Testosterone Radioimmunoassay *Kits*- Diagnostic Systems Laboratories), seguindo as normas do fabricante.

#### **III.4. Avaliação da expressão de Ras por *Immunoblotting***

Para a realização dos *western blots*, 50µg de proteína total do homogeneizado das tireóides foram submetidas a eletroforese (100 V por cerca de 2 horas) em gel 12% poliacrilamida contendo SDS a 3% (SDS-PAGE) e transferidas para membrana PVDF (Millipore). Após o bloqueio de ligações inespecíficas com tampão TBS-Tween 20 (NaCl 200mM, Tris 20mM, pH 7,6) contendo 0,1 % de Tween 20 e leite desnatado a 5%, por 1 h, as membranas foram hibridizadas com anticorpos específicos. Para a avaliação da expressão de Ras, foi utilizado um 1º anticorpo monoclonal de rato que reconhece determinantes antigênicos comuns às isoformas H-, K-, e N-Ras p21 (H-Ras (259) cat # sc-35, Santa Cruz Biotechnology, INC), na concentração de 2 µg/ml por 90 min de incubação, sob agitação. A seguir, foram realizadas 3 lavagens, por 10 minutos, com tampão TBS-Tween 20. Como 2º anticorpo, foi utilizado um anti-IgG de rato, em cabra, associado a peroxidase de raiz forte (HRP, Amersham) na concentração diluição de 1:1000. A membrana foi incubada com o 2º anticorpo por 60 minutos, com 3 lavagens posteriores por 10 minutos em tampão TBS-Tween. Os *immunoblots* foram revelados pelo método do ECL (Amersham). A análise densitométrica foi realizada usando o programa NIH-Image 1.6 (USA).

### **III.5. Avaliação da expressão do conteúdo de ERK fosforilado e ERK total por *Immunoblotting***

Para a realização dos *western blots*, 100µg de proteína total do homogeneizado das tireóides foram submetidos a eletroforese (100 V por cerca de 2 horas) em gel 9,0% poliacrilamida contendo SDS a 3% (SDS-PAGE) e transferidas para membrana PVDF (Millipore). Após o bloqueio de ligações inespecíficas com leite desnatado a 5%, em tampão TBS-Tween 20 por 1 h, as membranas foram hibridizadas com anticorpos específicos. Para a avaliação da expressão de pERK, foi utilizado um 1° anticorpo monoclonal de camundongo (# sc-7383, Santa Cruz Biotechnology, INC), na concentração de 2 µg/ml e 90 min de incubação. A seguir, foram realizadas 3 lavagens, por 10 minutos, com tampão TBS-Tween. Como 2° anticorpo, foi utilizado um anti-IgG de camundongo associado a HRP (Amersham), incubado com a membrana por 60min, seguindo-se de 3 lavagens por 10 minutos em tampão PBS-Tween. Os *immunoblots* foram revelados pelo método do ECL (sistema de revelação por quimioluminescência, Amersham). A análise densitométrica foi realizada usando o programa NIH-Image 1.6 (USA).

Para a avaliação da expressão da ERK total, as membranas PVDF foram submetidas a incubação das membranas em tampão Tris-HCl 62.5mM, 100mM de β-mercaptoetanol, 2% de SDS, pH 6.8 à 50°C por 30min. A seguir, foram realizadas 2 lavagens por 10 minutos, com tampão TBS-Tween. O bloqueio para ligações inespecíficas e as lavagens das membranas após as hibridizações com os anticorpos específicos, foram realizadas de forma semelhante à descrita acima. Como 1° anticorpo, foi utilizado um anti-ERK policlonal de coelho (# sc-93, Santa Cruz Biotechnology, INC) na concentração de 2µg/ml e como 2° anticorpo, na

diluição de 1:2000, um anti-IgG de coelho associado a HRP (Amersham). Os processos de revelação e análise densitométrica dos *immunoblots* foram realizados da mesma forma descrita anteriormente.

### **III.6. Imunoprecipitação e avaliação da expressão de TTF-1 por *Immunoblotting***

Para a quantificação do TTF-1 em tireóides murinas, ratas Wistar com 3-5 (jovens) e 12-18 (velhas) meses de idade foram sacrificadas por decapitação, as tireóides rapidamente excisadas e 5 glândulas por grupo experimental (jovens e velhas) foram homogeneizadas em tampão 50mM Hepes, pH 7.4, contendo triton X-100 1%, glicerol 10%, pirofosfato de sódio 100mM, fluoreto de sódio 100mM, EDTA 10mM, e PMSF 2mM. A seguir, as amostras foram incubadas, sob agitação, por 16 horas, a 4°C com 0.8 µg de anticorpo anti TTF-1 murino. A imunoprecipitação foi realizada após incubação com proteína A-sepharose (Sigma) por 2.5 horas a 4°C. Os precipitados, contendo os imunocomplexos, e a fração sobrenadante, foram armazenados a -80°C até posterior realização de *western blots*.

Para a realização dos Western blots, os precipitados foram ressuspensos em tampão Tris-HCl 0,0625M, pH 6,8, contendo glicerol 10%, β-mercaptoetanol 5%, SDS 3% e azul de bromofenol 0,01%, aquecidos a 100°C por 2 min e centrifugados a 6000 x g por 5 min. e alíquotas do sobrenadante foram diluídas no mesmo tampão. Alíquotas de 20µl de cada amostra e respectivo sobrenadante foram submetidas a eletroforese de proteínas em gel 9,0 % de poliacrilamida (SDS-PAGE) e transferidos para membrana PVDF (Millipore). Os processos de hibridização com anticorpos específicos, revelação e análise densitométrica foram realizados conforme descrito anteriormente.

### III.7. Análise estatística

Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. A análise dos resultados de T4, T3, TSH, estradiol e testosterona foi feita por análise de variância bivariada, complementada por testes de comparação e contrastes múltiplos (Zar, 1996) com o uso do programa SuperANOVA (Abacus Concept Berkeley, C. A.) para Macintosh. A avaliação dos valores de TSH foi realizada após transformação logarítmica dos valores.

Os resultados obtidos após análise densitométrica das bandas obtidas pelos *western blots* foram analisadas pelo programa SuperANOVA, utilizando-se análise de variância univariada complementada por testes de comparação. Os valores obtidos pela análise densitométrica foram normalizados pela proteína da membrana utilizada para a hibridização com os anticorpos, posteriormente corada por *rouge ponceau*, considerando-se o grupo de jovens controle como 1. A normalização não foi realizada para o TTF-1, uma vez que as amostras foram imunoprecipitadas antes da realização do *immunoblotting*.

## IV. RESULTADOS

---

### IV.1. Peso corporal, peso relativo tireóideo e hipofisário dos animais controles e hipotireóideos.

O peso corporal dos animais velhos de ambas as linhagens foi maior do que os valores observados para animais jovens, como esperado (tabela 4).

Tabela 4 – Peso corporal (g) de ratos machos e fêmeas, jovens e velhos

	DUTCH-MIRANDA		WISTAR	
	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos
Jovens	180,0 ± 22,45	299,2 ± 12,48	233,3 ± 8,81	335,7 ± 9,10
Velhos	232,2 ± 10,11*	385,0 ± 5,00*	285,7 ± 8,05*	453,5 ± 15,25*

Média ± SEM, n=8-10. \* p < 0,05 no mínimo, em relação ao respectivo grupo controle.

O peso hipofisário relativo das fêmeas Dutch-Miranda e Wistar foi aproximadamente o dobro do valor observado em machos (p<0,0001). Não houve modificação do mesmo com o envelhecimento, exceto nas fêmeas Wistar velhas, nas quais o peso hipofisário relativo foi maior do que nas ratas controle de sua linhagem (p<0,03, Tabela 5). O peso tireóideo relativo não foi alterado pelo envelhecimento, apesar de haver diferenças significativas entre os sexos, observada para as duas linhagens (p<0,0004 para os Dutch-Miranda e p<0,0062 para os Wistar, tabela 6).

Tabela 5 – Peso hipofisário relativo (mg/100g de peso corporal) em ratos machos e fêmeas, jovens e velhos.

	DUTCH-MIRANDA		WISTAR	
	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos
Jovens	6,13 ± 1,08	2,53 ± 0,09	4,60±0,39	1,72 ± 0,37
Velhos	5,90 ± 0,56	2,47 ± 0,15	5,81 ± 0,52*	2,28 ± 0,24

Média ± SEM, n= 8-10. \* p < 0,05 no mínimo, em relação ao respectivo grupo controle.

Tabela 6 – Peso tireóideo relativo (mg/100g de peso corporal) em ratos machos e fêmeas, jovens e velhos.

	DUTCH-MIRANDA		WISTAR	
	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos
Jovens	9,24 ± 1,15	6,35 ± 0,35	6,55 ± 0,40	5,13 ± 0,48
Velhos	8,80 ± 0,25	5,38 ± 0,70	6,09 ± 0,54	4,38 ± 0,54

Média ± SEM, n= 8-10.

O tratamento com MMI não afetou o peso corporal nas fêmeas jovens Wistar mas observamos redução significativa nas fêmeas velhas com a indução do hipotireoidismo. Nos ratos Wistar machos, o hipotireoidismo não afetou o peso corporal em jovens e velhos, apesar da redução observada para os velhos hipotireóides em relação aos velhos controle.

O peso absoluto e relativo hipofisário não variou nos animais hipotireóides Wistar, quando comparados aos valores dos animais controle que não foram tratados com a droga anti-tireóidea. Entretanto, houve diferença significativa entre os sexos em relação ao peso relativo hipofisário, com as fêmeas apresentando aproximadamente o dobro dos valores observados para os machos (p<0,0001).

Tabela 7- Peso corporal (g), peso hipofisário relativo (mg/100g de peso corporal) e peso tireóideo relativo (mg/100g de peso corporal) em ratos Wistar fêmeas, jovens e velhas

	Jovem	Jovem hipotireóidea	Velha	Velha hipotireóidea
Peso corporal	233,3±8,81	213,8±8,40	285,7±8,05	259,0±8,19*
Peso hipofisário relativo	5,27±0,26	4,38±0,28	5,72±0,54	5,49±0,49
Peso tireóideo relativo	6,55±0,40	19,02±2,21	6,09±0,54	17,52±0,74

Média ± SEM, n= 8-10. \* p < 0,05 no mínimo, em relação ao respectivo grupo não tratado.

Em contrapartida, houve aumento do peso absoluto e relativo da tireóide em animais jovens e velhos hipotireóideos em relação aos respectivos animais controle. Além disso, houve diferença significativa entre os sexos (p<0,008) e entre as idades estudadas (p<0,04).

Tabela 8- Peso corporal (g), peso hipofisário relativo (mg/100g de peso corporal) e peso tireóideo relativo (mg/100g de peso corporal) em ratos Wistar machos, jovens e velhos

	Jovem	Jovem hipotireóideo	Velho	Velho hipotireóideo
Peso corporal	335,7±9,09	345,0±10,28	453,5±15,25	435,0±15,97*
Peso hipofisário relativo	2,52±0,71	3,05±0,26	2,28±0,24	2,16±0,16
Peso tireóideo relativo	5,13±0,48	16,37±2,58	4,38±0,54	11,17±0,89

Média ± SEM, n= 8-10. \* p < 0,05 no mínimo, em relação ao respectivo grupo não tratado.

#### **IV.2. Quantificação dos níveis séricos de estradiol, testosterona, T<sub>4</sub>, T<sub>3</sub> e TSH em animais controle**

Verificamos que ratos Dutch-Miranda velhos têm diminuição acentuada de  $T_4$  sérico, sem que ocorra aumento do nível sérico de TSH, enquanto o  $T_3$  sérico diminui significativamente apenas nos machos velhos.

Em ratos Wistar, os níveis séricos de  $T_3$  e  $T_4$  nos animais velhos foram significativamente menores do que nos jovens, tanto em machos quanto em fêmeas. Os níveis séricos de TSH permanecem inalterados em ratos machos e fêmeas com o envelhecimento, de forma semelhante à observada anteriormente em animais Dutch-Miranda.

Em ratas de ambas as linhagens, não houve alteração nos níveis séricos de estradiol com o envelhecimento, como podemos observar nas tabelas 9 e 10. Em contraste, os níveis séricos de testosterona de ratos velhos Dutch-Miranda e Wistar diminuíram 36% e 76% relativamente aos valores dos jovens, embora a diferença só seja estatisticamente significativa nos machos velhos Wistar.

Em resumo, os animais velhos de ambas as linhagens apresentaram níveis reduzidos de  $T_3$  e  $T_4$  em relação aos animais controle, ao passo que os níveis de TSH permaneceram inalterados com o envelhecimento. Diferenças específicas relacionadas ao sexo foram observadas somente nas dosagens dos esteróides sexuais: enquanto nas fêmeas velhas não houve alteração dos níveis séricos de estradiol, em machos velhos encontramos redução dos níveis séricos de testosterona.

Tabela 9 – Efeitos do envelhecimento nos níveis séricos de TSH,  $T_4$ ,  $T_3$ , estradiol e testosterona de ratos Dutch-Miranda, machos e fêmeas.

MACHOS		FÊMEAS	
3-5 meses	10-15 meses	3-5 meses	10-15 meses

<b>Média</b>				
<b>[Média ± SEM]</b>				
TSH ( ng/ml ) *	2,01 [1,72 – 2,34]	1,86 [1,76 – 1,97]	1,42 [1,20 – 1,68]	1,71 [1,54 – 1,90]
<b>Média ± SEM</b>				
T <sub>3</sub> ( ng/dl )	31,9 ± 4,4	18,2 ± 3,9 *	41,2 ± 4,2	33,9 ± 3,4
T <sub>4</sub> ( µg/dl )	3,84 ± 0,16	2,86 ± 0,22 *	3,53 ± 0,21	2,90 ± 0,17 *
Estradiol (pg/ml)	-	-	37,8 ± 4,7	35,8 ± 3,5
Testosterona (ng/ml)	1,60 ± 0,13	1,02 ± 0,18	-	-

Os valores de TSH sérico foram analisados após transformação logarítmica, limites da média do TSH definidos por Média ± SEM, n=10-12.

\* significativamente diferente das médias de animais jovens p<0.05 ou menos

Tabela 10 – Efeitos do envelhecimento nos níveis séricos de TSH, T<sub>4</sub>, T<sub>3</sub>, estradiol e testosterona de ratos Wistar, machos e fêmeas.

	<b>MACHOS</b>		<b>FÊMEAS</b>	
	3-5 meses	10-15 meses	3-5 meses	10-15 meses
<b>Média</b>				
<b>[Média ± SEM]</b>				
TSH ( ng/ml ) *	2,30 [2,05 – 2,58]	2,11 [1,88 – 2,37]	2,03 [1,76 – 2,34]	2,11 [1,83 – 2,44]
<b>Média ± SEM</b>				
T <sub>3</sub> ( ng/dl )	22,2 ± 1,7	17,2 ± 1,7 *	41,4 ± 4,2	29,7 ± 3,1*
T <sub>4</sub> ( µg/dl )	3,84 ± 0,54	1,96 ± 0,13 *	3,21 ± 0,33	2,04 ± 0,27 *
Estradiol (pg/ml)	-	-	41,6 ± 5,5	41,0 ± 5,8
Testosterona (ng/ml)	3,67 ± 0,55	0,88 ± 0,15*	-	-

Os valores de TSH sérico foram analisados após transformação logarítmica, limites da média do TSH definidos por Média ± SEM, n=10-12.

\* significativamente diferente das médias de animais jovens p<0.05 ou menos

### IV.3. Quantificação dos níveis séricos de T<sub>4</sub>, T<sub>3</sub>, TSH em animais hipotireóides

O tratamento com MMI diminuiu significativamente os níveis séricos de T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> (p< 0,01) em ratos jovens e velhos, Dutch-Miranda e Wistar, machos e fêmeas, como

esperado. Como se pode observar na figura 7, os valores de T<sub>3</sub> durante as 2 primeiras semanas de tratamento, são mais elevados em fêmeas do que em machos. Este fato correlaciona-se aos níveis séricos de T<sub>3</sub> de animais sem tratamento, mais elevados nas fêmeas do que nos machos (tabelas 9 e 10).

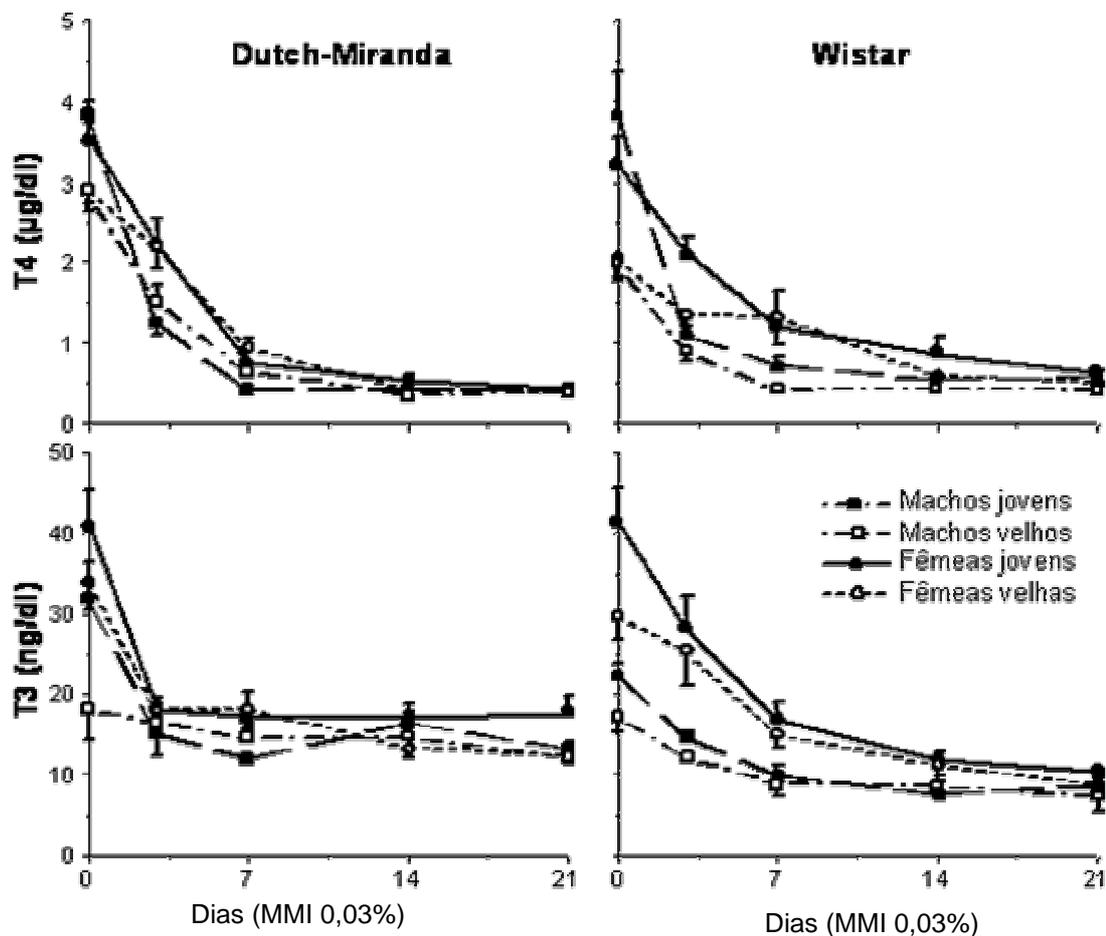


Figura 7 – Variação de T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> séricos durante indução de hipotireoidismo por tratamento com MMI (0.03%, v.o.) em ratos jovens (símbolos vazios) e velhos (símbolos cheios), machos (quadrados) e fêmeas (círculos), Dutch-Miranda e Wistar. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média, n= 10-12.

O hipotireoidismo induzido elevou significativamente os níveis séricos de TSH em animais de ambos os sexos (figura 8). Entretanto, os animais velhos apresentaram menor secreção de TSH do que os ratos controles durante o período de hipotireoidismo medicamentoso ( $p < 0,01$ ), embora nas fêmeas Dutch-Miranda velhas, o valor de TSH sérico atinja valor semelhante ao das ratas controle ao final do

tratamento. A menor capacidade de resposta dos tireotrofos à marcada diminuição dos hormônios tireóideos séricos, induzida pela droga anti-tireóidea, que encontramos nos animais mais velhos, reflete o mesmo tipo de deficiência já sugerida anteriormente por resultados do nosso laboratório (Corrêa da Costa e cols., 2001).

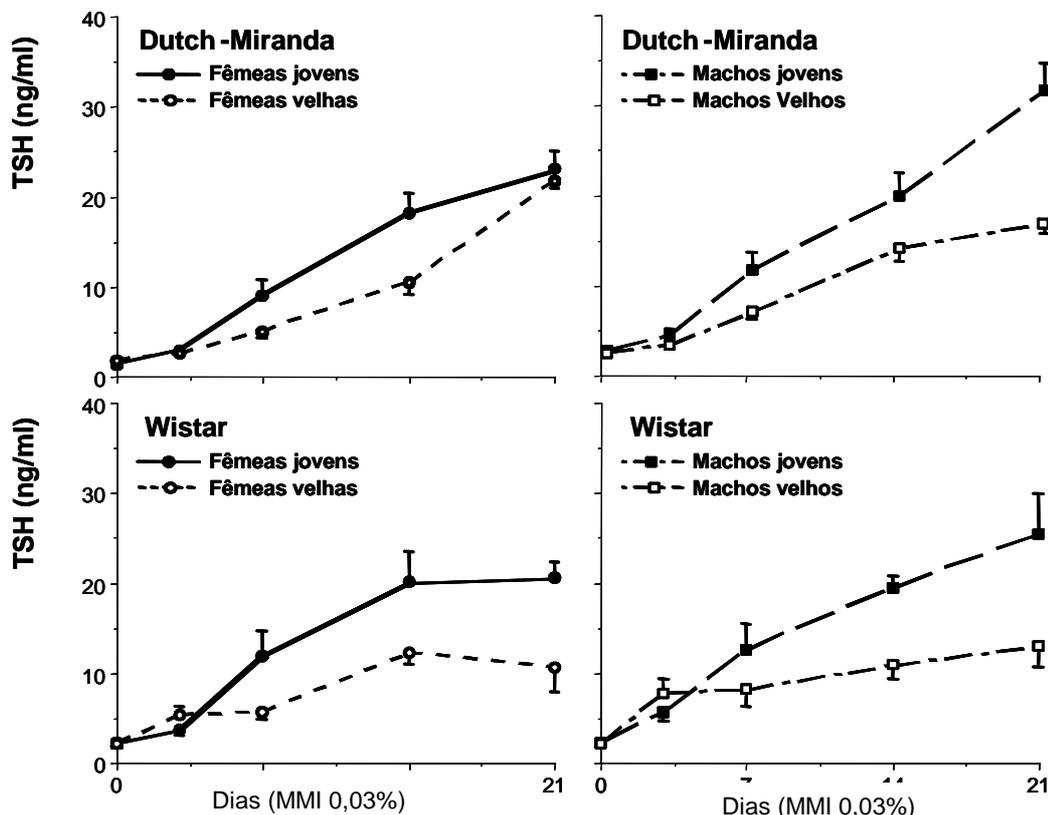


Figura 8 – Variação de TSH sérico antes e durante indução de hipotireoidismo por tratamento com MMI (0.03%, v.o.) em ratos jovens (símbolos preenchidos) e velhos (símbolos vazios), machos e fêmeas, Dutch-Miranda (gráfico superior) e Wistar (gráfico inferior). Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média, n= 10-12.

No grupo dos animais sem tratamento, o conteúdo hipofisário de TSH nos ratos Wistar foi sistematicamente maior do que os valores observados para animais Dutch-Miranda, em ambos os sexos. Apesar de ocorrer uma redução nos níveis hipofisários de TSH em fêmeas Wistar velhas, esta diferença não chega a ser estatisticamente significativa. Já em ratos Dutch-Miranda velhos houve uma redução significativa do TSH hipofisário tanto em machos quanto em fêmeas. Estas diferenças mostram que, em relação ao conteúdo hipofisário de TSH, há diferenças entre as linhagens, mas

não entre os sexos (figura 10).

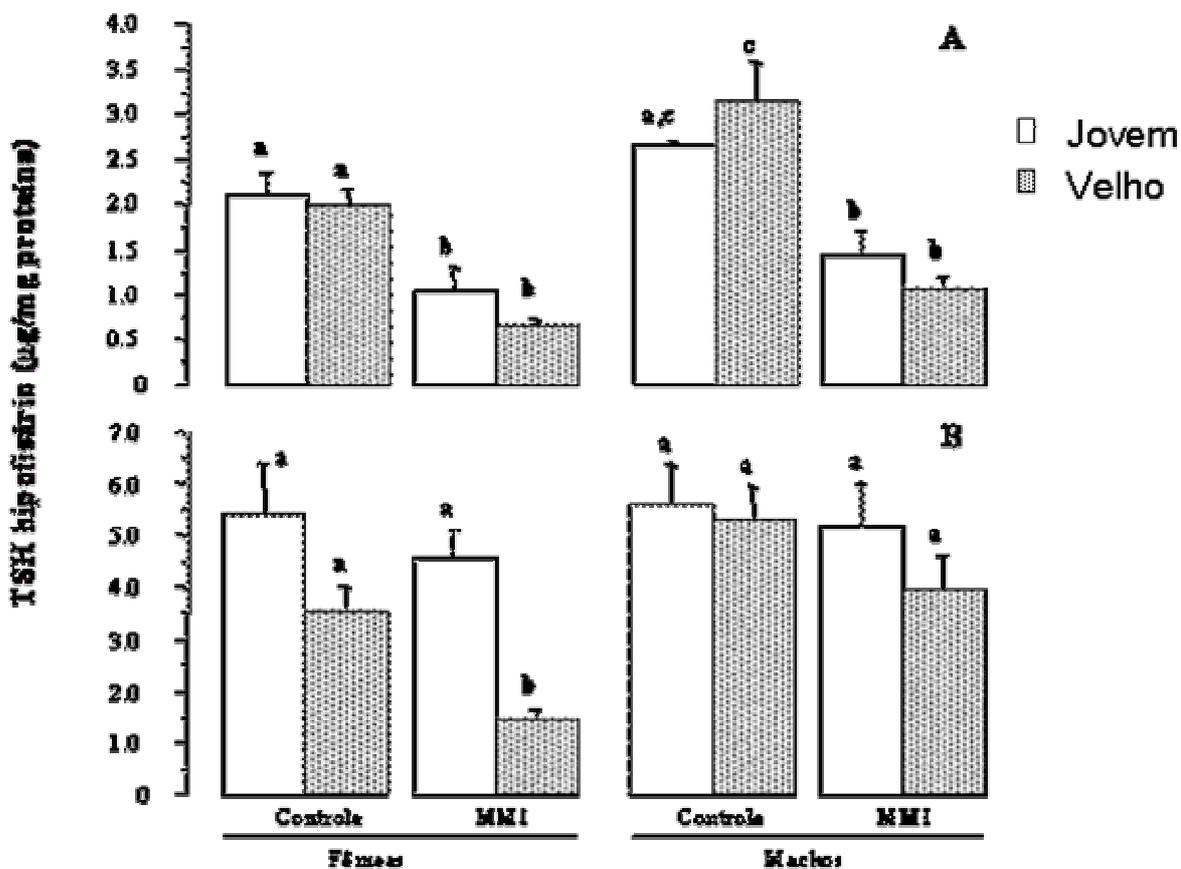


Figura 9— Níveis hipofisários de TSH em ratos controle e hipotireóides (0,03% MMI/dia, v.o., 21 dias) em ratos Dutch-Miranda (A) e Wistar (B). Ratos jovens (colunas vazias) e velhos (colunas cheias). Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão da média, n= 10-12. Letras diferentes indicam médias estatisticamente diferentes.

Como pode ser visto na Figura 9, em ratos Dutch-Miranda, a indução do hipotireoidismo, reduziu o TSH hipofisário a menos da metade dos valores encontrados no grupo controle ( $p < 0,05$ ), em ambos os sexos, jovens e velhos, embora a redução fosse mais acentuada nos animais velhos do que nos jovens. Em fêmeas Wistar velhas, o tratamento com MMI reduziu significativamente os níveis hipofisários de TSH em relação às ratas jovens e às velhas não tratadas. Nos machos, não houve diferença significativa no conteúdo intra-hipofisário de TSH entre jovens e velhos, hipotireóides ou não. Assim, o fenômeno observado em ratos

Dutch-Miranda só se reproduziu em fêmeas velhas Wistar, não sendo verificado nas ratas jovens ou em machos mostrando que além da diferença entre linhagens há também uma resposta diferenciada do TSH hipofisário ao hipotireoidismo induzido por MMI, entre os dois sexos.

#### **IV.4. Avaliação da expressão de Ras, do conteúdo de ERK fosforilado, ERK total e TTF-1 por *Immunoblotting***

A expressão da proteína Ras em tireóides de ratos Dutch-Miranda velhos está significativamente aumentada ( $p \leq 0,01$ ) nos animais velhos de ambos os sexos, como exemplificado na Figura 10. O número de experimentos realizados foi de 5 e a análise densitométrica pode ser observada na figura 11.

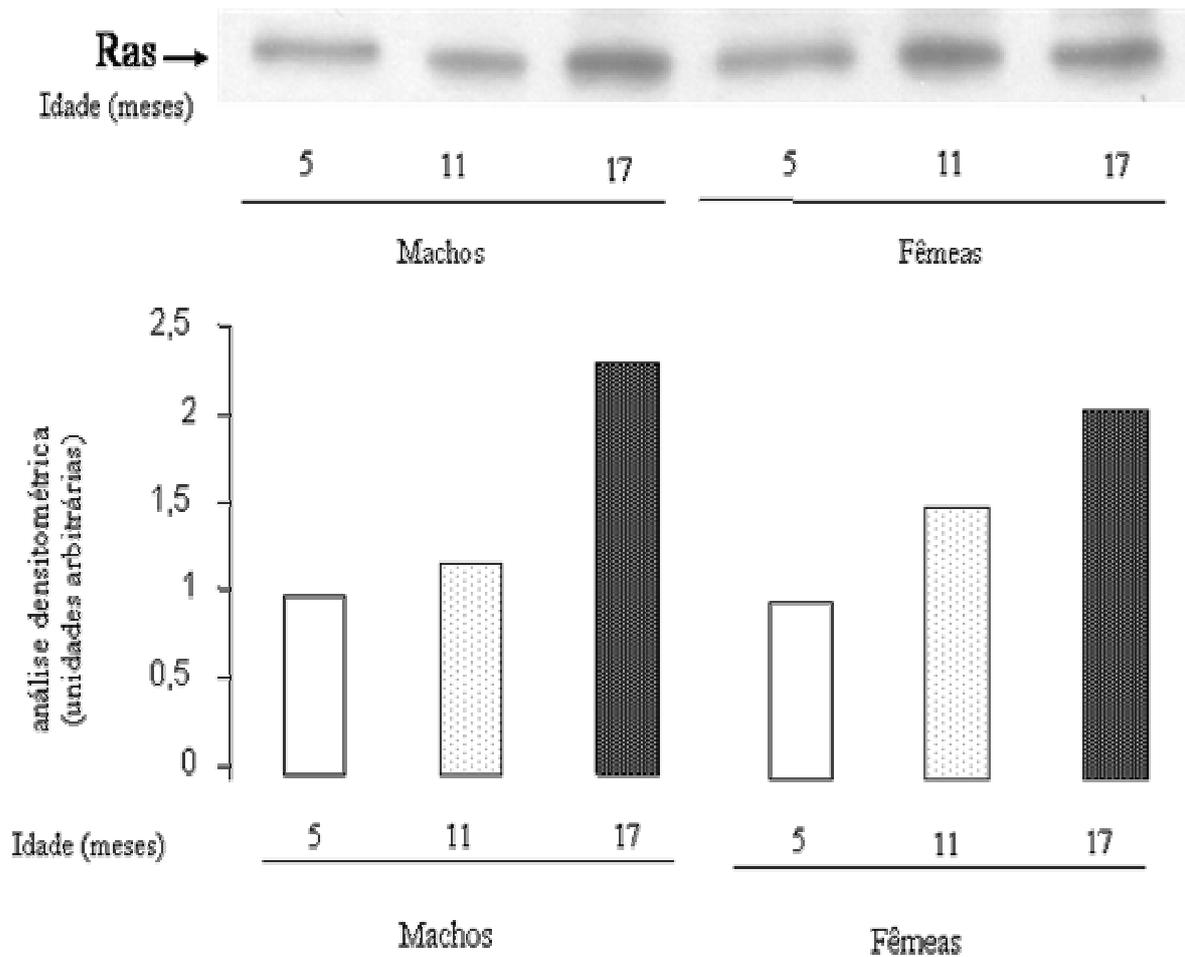


Figura 10– Expressão protéica (A) e análise densitométrica (B) de proteína Ras de tireóides de ratos Dutch-Miranda, machos e fêmeas, com 5, 11 e 17 meses de idade.

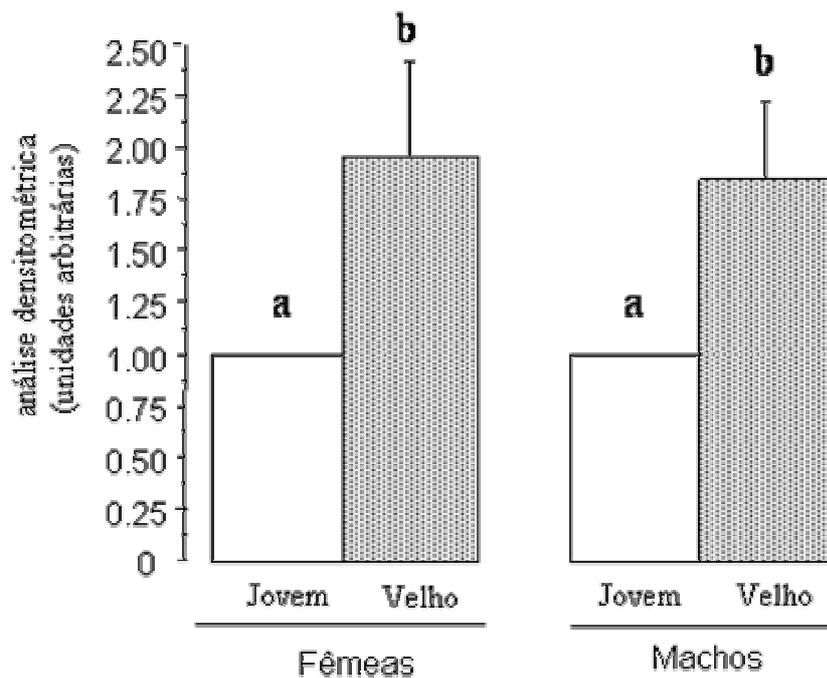


Figura 11– Análise densitométrica de proteína Ras de tireóides de ratos e ratas Dutch-Miranda, jovens (coluna vazia) e velhos (coluna cheia). Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média,  $n=5$ . Letras diferentes indicam médias estatisticamente diferentes,  $p \leq 0.01$ .

O conteúdo protéico de ERK total não variou com o envelhecimento em ratos Dutch-Miranda, como observamos na figura 12. Os machos têm expressão de ERK total um pouco menor do que as fêmeas, mas esta diferença não chega a ser significativa. Os valores da análise densitométrica de Ras, observados na figura 10, ERK total e pERK, vistos na figura 12, foram corrigidos por proteína, na membrana utilizada para a hibridização com os anticorpos, posteriormente corada por *rouge ponceau*.



Figura 12– Expressão protéica (A) de pERK, ERK total e proteína de normalização, e análise densitométrica (B) de pERK e ERK total de tireóides de ratos Dutch-Miranda, jovens e velhos, machos e fêmeas. N=3

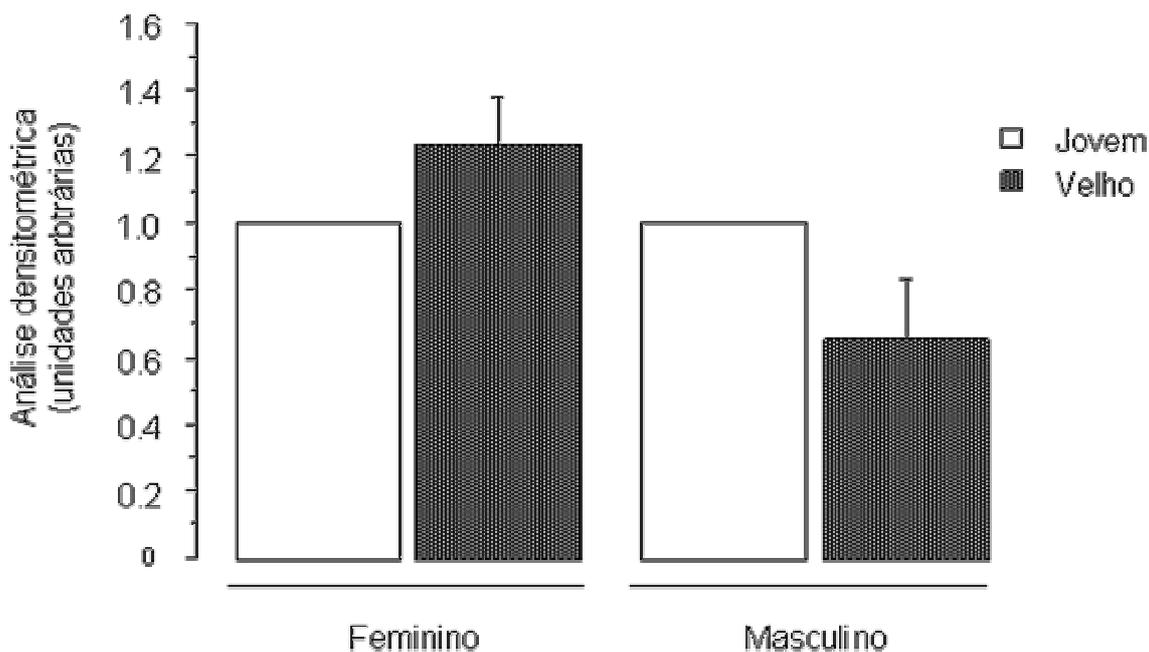


Figura 13 – Razão da análise densitométrica de pERK por ERK total de tireóides de ratos e ratos Dutch-Miranda, jovens (coluna vazia) e velhos (coluna cheia). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média,  $n = 3$ .

A fosforilação da proteína ERK (pERK) de animais jovens e velhos foi diferente entre os sexos ( $p \leq 0,03$ ). Em fêmeas, não houve diferença na pERK entre jovens e velhas. Já em machos, houve redução – embora não significativa - no conteúdo de pERK em animais velhos, comparativamente aos valores dos jovens (figuras 12 e 13). As fêmeas velhas apresentaram maior grau de fosforilação de ERK que os machos velhos.

A análise do conteúdo protéico de TTF-1 em fêmeas Wistar, após imunoprecipitação com anticorpo contra TTF-1, não revelou alterações significativas com o envelhecimento (vide figuras 14 e 15). Na figura 15, observamos a análise densitométrica do TTF-1 nos grupos experimentais ( $n=4$ ).

A

TTF-1 →



Figura 14– Expressão protéica (A) e análise densitométrica (B) de proteína TTF-1 de tireóides de ratas Wistar, com 4 e 12 meses de idade.

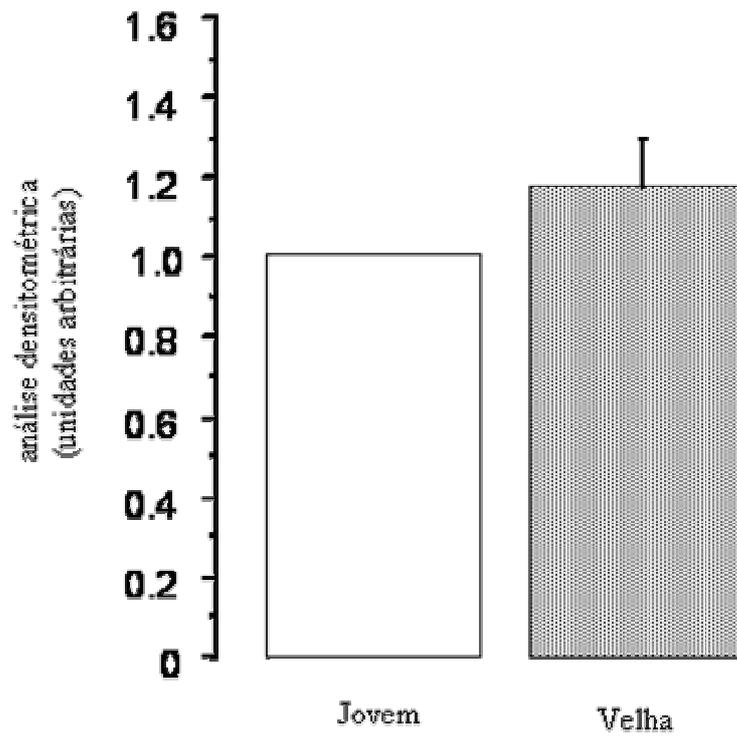


Figura 15 – Análise densitométrica de proteína de TTF-1 de tireóides de ratas Wistar, jovens (coluna vazia) e velhas (coluna cheia). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média, n=4. Não há diferença significativa entre os grupos estudados.

## **V DISCUSSÃO**

---

O envelhecimento afetou de forma importante o funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide murino. O peso dos ratos Dutch-Miranda e Wistar aumentou em função do envelhecimento, como o esperado. Entretanto, os ratos Wistar apresentaram valores maiores do que os Dutch-Miranda. Não houve variação no peso absoluto e relativo hipofisário com o envelhecimento em ambas as linhagens, exceto um aumento significativo observado em ratas velhas Wistar. Lembrando que Console e cols (1995) observaram hipertrofia dos tireotrofos em ratos velhos Sprague-Dawley, com aumento no peso absoluto hipofisário

Banu e cols. (2001) avaliaram a influência de estradiol e testosterona no crescimento da tireóide em ratos Wistar. Neste trabalho, a gonadectomia reduziu o peso tireóideo absoluto e relativo em machos do 21° ao 160° dia de vida, sendo este efeito revertido por reposição com testosterona. Já em fêmeas, o peso relativo só diminuiu após com 45 dias de vida e a suplementação com estradiol foi eficiente para em reverter os efeitos causados pela gonadectomia. Em nosso estudo, observamos que peso relativo tireóideo não variou em função do envelhecimento, entretanto, os valores observados para as fêmeas foi maior do que os valores para os machos, que apresentaram redução de testosterona sérica. Em ratos, o tamanho da glândula tireóide se relaciona com o peso corporal mais do que com o envelhecimento (Habra e Sarlis, 2005).

Os níveis séricos de  $T_3$  e  $T_4$  estavam reduzidos em ratos velhos Dutch-Miranda e Wistar, machos e fêmeas, ao passo que os níveis de TSH permaneceram inalterados, corroborando os achados de Cizza e cols, 1992; Klug & Adelman, 1979, e Corrêa da Costa e cols., 2001. Existem diferenças entre linhagens de ratos quanto aos parâmetros avaliados para a influência do envelhecimento em hipófise e

tireóide. Em ratos 344/N Fischer, a histologia tireóidea revelou perda folicular progressiva nos ratos velhos, associada à redução significativa nos níveis plasmáticos de T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub>, mas não de TSH, que permaneceu inalterado (Cizza e cols., 1992). Entretanto, em estudo realizado previamente em nosso laboratório, observamos que as fêmeas Dutch-Miranda mantiveram os níveis séricos de T<sub>3</sub> dentro de limites normais em função do envelhecimento, provavelmente por apresentarem maior atividade da 5' iodotironina-desiodase tipo 1 hepática, (Corrêa da Costa e cols., 2001). Donda e cols. (1987) observaram redução significativa de hormônios tireóideos com o envelhecimento em animais Wistar, machos e fêmeas, em acordo com os nossos resultados. Todavia, o TSH estava reduzido nos machos velhos e aumentado em fêmeas velhas, fato que não observamos em ambas as cepas. Além disso, Donda e Lemarchand-Béraud (1989) observaram uma maior geração de T<sub>3</sub> a partir de T<sub>4</sub> na hipófise em machos velhos.

O hipotireoidismo induzido por MMI elevou significativamente os níveis séricos de TSH em ambos os sexos. Entretanto, os animais velhos apresentaram menor secreção de TSH durante o período de hipotireoidismo medicamentoso que os controles ( $p < 0,01$ ), embora nas fêmeas velhas Dutch-Miranda, o valor de TSH sérico atinja valor semelhante ao das ratas controle ao final do tratamento. A menor capacidade dos tireotrofos em animais mais velhos de responderem à marcada diminuição dos hormônios tireóideos séricos, induzida pela droga anti-tireóidea, reflete o mesmo tipo de deficiência já observada anteriormente nos animais velhos. Em um estudo realizado previamente em nosso laboratório, observamos uma redução nos níveis séricos de hormônios tireóideos com o envelhecimento em ratos Dutch-Miranda, ao passo que o TSH sérico permaneceu inalterado (Corrêa da Costa e cols., 2001).

Em ratos Wistar, ocorre uma redução da mitose celular hipofisária para cerca de 1/10 do valor observado para ratos jovens a partir de 1 ano de idade, com diminuição importante do *turnover* hipofisário (Levy, 2002). Em tireotrofos de ratos Sprague-Dawley, observou-se redução do número de tireotrofos imuno-reativos, aumento do tamanho celular, com alguns se tornando hiperativos em função da redução de T3 e T4 com o envelhecimento (Console e cols, 1995). Além disso, existe uma perda da responsividade dos tireotrofos ao estímulo de TRH e uma redução no conteúdo hipotalâmico de pré-pró-TRH (Cizza e cols, 1992), o que poderia ser acentuado pelo hipotireoidismo induzido. Isto, apesar de ser referido aumento na densidade de receptores para TRH nos tireotrofos de animais velhos, sem aumento de sua afinidade (Donda e cols, 1989).

Woodmansee e cols. (2006) evidenciaram um efeito anti-proliferativo dos hormônios tireóideos nos tireotrofos de camundongos. Assim, os hormônios tireóideos controlam a proliferação celular dos tireotrofos por mudanças reversíveis na expressão de reguladores-chave que afetam a progressão do ciclo celular. Além disso, os hormônios tireóideos podem ativar a via somatostatinérgica, ativando a cascata de sinalização MAPK e ocasionando mudanças na transição das fases G1/S e G2/M do ciclo celular (Woodmansee e cols., 2006). Já Nolan e cols. (2004) descreveram que, em condições normais, os níveis de hormônios tireóideos limitam a proliferação dos tireotrofos em ratos machos adultos. Weiss e cols. (2002) observaram que a presença de TR $\alpha$  e TR $\beta$ , mesmo na ausência dos hormônios tireóideos, influencia a secreção de TSH pelos tireotrofos. Estes autores destacam ainda que TR $\beta$  é o principal responsável pela diminuição da secreção de TSH mediada pelos hormônios tireóideos (Weiss e cols., 2002). Além disso, a observação de que, diferentemente de humanos, camundongos hipotireóideos não respondem

acentuadamente ao estímulo por TRH pode correlacionar-se com a redução nos níveis de TSH hipofisário (Weiss e cols., 2002).

Ao final do período de tratamento com MMI, o conteúdo hipofisário de TSH dos ratos velhos Dutch-Miranda, reduziu-se a cerca da metade dos valores encontrados no grupo controle ( $p < 0,05$ ), sugerindo fortemente haver diminuição expressiva da reserva de TSH nas adeno-hipófises destes ratos durante o envelhecimento, em ambos os sexos, o que já havia sido visto anteriormente nos machos desta cepa por Borges e cols (1998).

O padrão é diferente na cepa de ratos Wistar. Embora nas ratas velhas tenha havido uma tendência à redução no TSH hipofisário com o envelhecimento, a mesma só se tornou significativa quando ao envelhecimento acrescentou-se o hipotireoidismo. Já nos machos Wistar velhos, a variação no conteúdo hipofisário de TSH, após a indução do hipotireoidismo não chega a ser significativa (Figura 9). Donda e cols. (1987) referiram não haver alteração da resposta do TSH ao estímulo por TRH, em ratos Wistar velhos de ambos os sexos, embora tenham constatado ter havido diminuição do TSH hipofisário nos mesmos. Nossos resultados discordam dos citados acima, já que apesar de não ter havido diminuição do conteúdo de TSH hipofisários nos ratos Wistar velhos, sua capacidade de resposta ao estímulo do hipotireoidismo farmacológico estava proporcionalmente tão diminuído quanto nos ratos Dutch-Miranda velhos.

A possibilidade de que a diminuição da atividade gonadal durante o envelhecimento tenha algo a ver com as modificações que ocorrem no eixo hipotálamo-hipófise-tireóide deve ser levada em consideração. Várias das alterações observadas durante o envelhecimento, também podem ser encontradas após a castração, pelo menos em ratos. Em nossos resultados, isto só foi verdade para os machos.

Christianson e cols. (1981) verificaram que, após castração, há diminuição significativa do TSH sérico em ratos adultos, e que a reposição de testosterona restaura os níveis séricos de TSH, em machos, ao passo que em fêmeas, a reposição com estrogênio não reverte à redução no TSH sérico que ocorre após a ooforectomia. Já Borges e cols. (1998), assim como Marassi (2005), não encontraram alteração significativa nos níveis séricos de TSH após orquiectomia. Borges e cols. (1998) avaliaram a influência dos androgênios na secreção de TSH durante o envelhecimento em ratos Dutch-Miranda. Em animais jovens castrados, o conteúdo hipofisário de TSH era cerca da metade dos valores de animais controle, e a reposição com propionato de testosterona o restaurou parcialmente. Nos ratos velhos havia uma redução de aproximadamente 30% no TSH hipofisário, sem haver variação após castração ou tratamento com testosterona. No entanto, não houve variação do TSH sérico com o envelhecimento. Curiosamente, a castração dos ratos velhos elevou os níveis séricos de TSH, sugerindo que os testículos de ratos velhos poderiam secretar um fator testicular inibidor da secreção de TSH. Este estudo ainda espera comprovação.

Em nosso estudo, observamos redução nos níveis séricos de testosterona com o envelhecimento, com valores estatisticamente significativos somente observados nos ratos Wistar. Além disso, o TSH destes animais não variou com o envelhecimento, exceto quando houve a indução do hipotireoidismo. Outro fato importante a ser destacado foi à redução significativa de TSH hipofisário em ratos velhos Dutch-Miranda, com indução de hipotireoidismo ou não, Em ratos Wistar, só houve redução de TSH hipofisário em fêmeas velhas hipotireóideas. Apesar destas diferenças entre as linhagens estudadas, a resposta do TSH sérico ao hipotireoidismo tem o mesmo padrão em ambas.

Malgrado a relativa diminuição da resposta funcional tireóidea ao estímulo tireotrófico, a tireóide de animais ou humanos mais idosos tende a ser maior que a de jovens e a apresentar aumento da heterogeneidade morfofuncional, com predomínio de células achatadas, acúmulo de Tg no colóide e redução da endocitose, contrastando com folículos tireóideos pequenos, ativos, muito provavelmente os responsáveis pela síntese e secreção dos hormônios tireóideos circulantes nestas glândulas (Studer e cols, 1995, Mariotti e cols., 1995), sugerindo uma dissociação entre o controle da função secretora e o trofismo da glândula durante o envelhecimento. .

A via AMPc PKA, sabidamente, medeia a maior parte dos efeitos biológicos de TSH, sendo fundamental para a proliferação e diferenciação das células foliculares. Os estudos de Reymond e cols. (1992) mostram que, em membranas tireóideas de ratos velhos, o incremento de AMPc induzido por TSH é menor que em jovens, embora não haja diferença na produção de AMPc em resposta a GTP ou forskolina, o que torna pouco provável haver alteração na adenilato-ciclase. Os autores postularam que a diminuição da resposta da glândula tireóide à estimulação por TSH possivelmente seria mediada por diminuição no número de receptores da tireotrofina, o que poderia explicar a redução nos níveis séricos de T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> encontrada nos animais velhos.

Deve, também, ser lembrado que o TSH circulante pode apresentar-se sob múltiplas formas e isoformas moleculares, em função de alterações em sua composição oligossacarídea que podem alterar sua atividade. Oliveira e cols. (2001 e 2007) encontraram uma correlação positiva entre níveis de hormônios tireóideos e bioatividade do TSH, mas não entre os hormônios tireóideos e o TSH imunoreativo, em pacientes que sofreram uma necrose maciça adeno-hipofisária (síndrome de Sheehan), que resultou em hipotireoidismo mas com níveis inadequadamente

“normais” de TSH sérico. O mesmo comprometimento da bioatividade do TSH foi verificado em pacientes com hipotireoidismo central e adenomas hipofisários (Persani e cols, 2000). A redução na bioatividade do TSH no envelhecimento poderia explicar a manutenção de reduzidos níveis de hormônios tireóideos em presença de níveis aparentemente inalterados de TSH sérico.

É possível que, no envelhecimento, uma via de sinalização diversa da estimulada por AMPc-PKA esteja mantendo o trofismo dos tireócitos em presença de menor estímulo por TSH. Esta possibilidade parece ser confirmada pelo aumento da proteína Ras nas tireóides dos animais idosos em ambos os sexos. Uma das vias comumente ativadas por Ras, embora não a única, em diferentes tipos celulares é a Raf-MAPK-ERK.

A ativação da via AMPc-PKA por hormônios em alguns tipos celulares, tais como adipócitos, células endoteliais, fibroblastos e hepatócitos de ratos, pode inibir a ativação de ERK dependente da estimulação por fatores de crescimento. Em outras células, ocorre ativação de ERK por estímulo de AMPc-PKA (Stork & Schmitt, 2002). Já em linhagens de células tireóideas murinas FRTL-5, ocorre estimulação de ERK por estímulo de TSH e AMPc, embora não mediado por PKA (Iacovelli e cols, 2001). Leal e cols (2007) demonstraram que o hipotireoidismo farmacológico é um regulador positivo de Ras em tireóide de ratos machos Wistar. Este achado pode explicar, em parte, o aumento em Ras observado com o envelhecimento em nosso estudo, sendo o TSH um possível candidato a ativador da via Ras nestes ratos velhos. Além disso, esse trabalho reforça a teoria de que outros efetores da via Ras podem ser influenciados pelo envelhecimento, uma vez que também se observou uma redução da fosforilação de ERK com a indução do hipotireoidismo (Leal e cols., 2007).

Existem evidências de que o efeito proliferativo pleno induzido pelo TSH em células FRTL-5 depende da ativação da via Ras, indicando uma possível ativação desta via efetora pela cascata de sinalização gerada por AMPc (Ciullo e cols, 2001). Assim, uma via de sinalização diferente da PKA-CREB, que não seja importante na regulação da proliferação tireóidea em jovens, como a via Ras, poderia tornar-se mais relevante na tireóide do idoso.

A redução da fosforilação de ERK observada somente em machos velhos Dutch-Miranda, pode correlacionar-se com a redução nos níveis séricos de testosterona nestes animais em função do envelhecimento; ao contrário das fêmeas velhas, que não apresentam redução no estradiol sérico. Lee e cols. (2005) mostraram que após tratamento de uma linhagem de células de carcinoma papilífero de tireóide humana com estradiol, houve estímulo à proliferação celular, ao passo que nas células tratadas com testosterona, ou não tratadas, não houve aumento nas taxas de proliferação celular. Achado coerente com o fato deste tipo de carcinoma ser mais prevalente em mulheres em idade reprodutiva do que em homens.

Aparentemente, o aumento de Ras observado em ratos velhos não se correlaciona com ativação da via Raf-MEK-ERK, já que não houve aumento da fosforilação de ERK em função do envelhecimento. Cass & Meinkoth (2000) demonstraram que a ativação de PI3-K por Ras potencializou a proliferação e diferenciação estimulada pelo TSH, em células WRT transfectadas com genes Ras mutantes que ativavam seletivamente PI3-K ou Raf-ERK, o que não ocorria quando a sinalização por Raf-ERK era ativada. Corroborando estes achados, Ciullo e cols, (2001) evidenciaram que durante a progressão da fase G0 para G1 de células FRTL-5, induzida por TSH, PKA ou AMPc, havia aumento na formação do complexo Ras-PI3-K mas não do complexo Ras-Raf-1. Vale ressaltar que estes autores postulam ser o estímulo por Ras necessário para que haja a progressão da fase G1 do ciclo celular nas células FRTL-5. No entanto, Van Keymeulen, e cols. (2000) não observaram ativação de mitogênese via Ras por estímulo de TSH ou AMPc em tireócitos caninos.

Kimura e cols. (2001) destacam ser fundamental a ação do TSH, via AMPc, e de vários fatores de crescimento, em cooperação com insulina ou IGF-1, para que haja a progressão do ciclo celular e proliferação em vários tipos de células tireóideas

em cultura, incluindo linhagens celulares de tireóides murinas (FRTL-5, WRT e PCC13) e culturas primárias de tireóide humana, de ratos e de cães. Na maior parte dos estudos realizados com células FRTL-5, o TSH age - via AMPc - como um fator amplificador da ativação de PI3-K e MAPK e da síntese de DNA induzida por insulina/IGF-1. Já em células WRT, TSH e insulina/IGF-1 pode ativar, independentemente, Ras, PI3-K e a síntese de DNA (Kimura e cols., 2001). Em cultura primária de tireócitos caninos, o TSH não ativa Ras e PI3-K, e o efeito proliferativo parece ser mediado por AMPc (Van Keymeulen, e cols.,2000). O TGF- $\beta$ , *transforming growth factor beta* ou fator de crescimento tumoral beta, participa aparentemente da dessensibilização da resposta proliferativa ao TSH em cultura de células FRTL-5, sendo produzido pelo próprio tireócito (Kimura e cols., 2001).

Além de TSH, insulina, IGF-1 e fatores de crescimento, outros hormônios também parecem ser importantes na proliferação tireóidea em ratos, especialmente os esteróides gonadais. Furlanetto e cols. (1999) avaliaram os efeitos do tratamento com estradiol em células FRTL-5, com estímulo da proliferação celular e regulação negativa do gene para NIS. Assim, o estrogênio pode ter um papel importante no trofismo da tireóide das ratas velhas, já que não houve variação nos níveis séricos de estrogênio com o envelhecimento.

Além disso, acredita-se que o sexo seja um dos principais fatores influenciadores do crescimento tireóideo. A maturação do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide no rato ocorre durante as primeiras três semanas após o nascimento, seguida pela fase final de maturação da tireóide. Sabe-se que durante a fase pré-puberal há o aparecimento de estrogênio e testosterona, por isso postula-se influência dos hormônios desta fase no crescimento e função tireóidea (Banu e cols., 2002). Corroborando esta hipótese, foi demonstrada a presença de receptores para estrogênio e androgênio na glândula tireóide de ratos

imaturos, sob condições normais (Banu e cols., 2002). Estes autores também mostraram uma correlação positiva dos esteróides sexuais com o TSH sérico, não havendo diferenças entre os sexos. Banu e cols. (2001) relataram, em ratos de imaturos a adultos, influência dos esteróides sexuais no crescimento da tireóide, via regulação positiva da secreção de TSH e do número de seus receptores na tireóide, além de modularem a concentração de DNA tireóidea. Enquanto a testosterona tem ação independente do sexo e idade, o estrogênio, após gonadectomia, só elevou o TSH sérico e estimulou o crescimento tireóideo apenas nas fêmeas (Banu e cols., 2001). Logo, a redução na testosterona sérica observada nos ratos velhos pode ter contribuído para a disfunção hipofisária e tireóidea observada nestes animais, o que não pode ser afirmado para as fêmeas.

A expressão de Ras oncogênico em células tireóideas resulta em perda da expressão de alguns genes específicos da tireóide e na inativação de TTF-1, um fator de transcrição requerido para o desenvolvimento normal da tireóide (Missero e cols., 2000). Como o TTF-1 tem papel fundamental não só na organogênese tireóidea, mas também para a expressão adequada de proteínas específicas da tireóide, tais como Tg e TPO, a sua diminuição em função de um aumento do Ras nas tireóide de animais velhos poderia ser co-responsável pela diminuição da síntese hormonal nestas glândulas. No entanto, esta hipótese pode ser descartada já que evidenciamos não haver alteração do conteúdo protéico de TTF-1 em ratas Wistar velhas. Resta ver se nos machos velhos, nos quais – ao contrario das fêmeas – há diminuição da ativação de ERK e alterações funcionais mais acentuadas, se ocorre ou não alteração do conteúdo tireóideo de TTF-1. Esta será a próxima etapa de nosso estudo.

Este estudo reforça o papel do envelhecimento no eixo hipotálamo-hipófise-tireóide, destacando-se a disfunção hipofisária em responder à redução importante

nos níveis séricos de  $T_3$  e  $T_4$ . Em contrapartida, existe comprometimento do tireócito em responder a estimulação por TSH, aparentemente em concentração normal, embora haja a possibilidade da bioatividade do TSH estar comprometida. Assim, o aumento no conteúdo protéico de Ras sugere existir algum outro estímulo trófico ao tireócito, mas ainda falta determinar quais efetores citoplasmáticos podem estar sendo ativados.

## VI. CONCLUSÃO

---

A fim de analisar as repercussões do envelhecimento no eixo hipotálamo-hipófise-tireóide, avaliamos diferenças entre ratos adultos jovens e velhos com relação à capacidade de secreção de TSH e/ou conteúdo de TSH hipofisário em resposta ao hipotireoidismo farmacológico. Por outro lado, avaliamos a expressão de Ras, pERK, ERK total e TTF-1 com o envelhecimento.

A luz dos nossos resultados pode-se afirmar que:

- O envelhecimento induz mudanças na função e regulação da tireóide murina.
- A capacidade dos tireotrofos hipofisários de aumentar sua secreção de TSH em resposta à redução nos níveis séricos de T3 e T4 está diminuída nos ratos velhos, mesmo quando os níveis de hormônios tireóideos foram drasticamente reduzidos.
- A redução no conteúdo hipofisário de TSH de ratos velhos hipotireóideos Dutch-Miranda, em ambos os sexos, sugere comprometimento da biossíntese do TSH hipofisário nos animais velhos.
- Ao contrário dos ratos Dutch-Miranda, nos ratos Wistar só houve redução significativa do TSH hipofisário nas fêmeas velhas hipotireóideas, confirmando as diferenças entre diversas linhagens, sugeridas por estudos anteriores.
- As alterações do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide de ratos velhos podem ser influenciadas pelas alterações decorrentes da redução da testosterona sérica

observada em machos; no entanto, houve modificações também em fêmeas velhas nas quais não houve variação do estradiol sérico.

→ Apesar do aumento do conteúdo de proteína Ras, na tireóide dos ratos velhos, não houve ativação de ERK na tireóide de machos e fêmeas, nem de TTF-1 nas de fêmeas, sugerindo haver ativação de outros efetores da via Ras, seja estimulados por TSH ou por fatores de crescimento.

## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

AHIMA, R.S. & OSEI, S.Y. *Molecular regulation of eating behavior: new insights and prospects for therapeutic strategies*. *TRENDS in Molecular Medicine* 7(5): 205-213, 2001.

BANU, S.K.; AROSH, J.A.; GOVINDARAJULU, P.; ARULDHAS, M.M. *Testosterone and estradiol differentially regulate thyroid growth in wistar rats from immature to adult age*. *Endocrine Research* 27(4): 447-463, 2001.

BANU, S.K.; GOVINDARAJULU, P.; ARULDHAS, M.M. *Developmental profiles of TSH, sex steroids, and their receptors in the thyroid and their relevance to thyroid growth in immature rats*. *Steroids* 67(2): 137-144, 2002.

BANU, S.K.; ARULDHAS, M.M. *Sex steroids regulate TSH-induced thyroid growth during sexual maturation in wistar rats*. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes* 110 (1): 37-42, 2002.

BARRA, G.B.; VELASCO, L.F.; PESSANHA, R.P.; CAMPOS, A.M.; MOURA, F.N.; DIAS, S.M.; POLIKARPOV, I.; RIBEIRO, R.C.; SIMEONI, L.A.; & NEVES F.A. *Molecular mechanism of thyroid hormone action*. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* 48(1): 25-39, 2004.

BIANCO, A.C. *Hormônios Tireóideos, UCPs e Termogênese*. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* 44(4): 281-289, 2000.

BIANCO, A.C.; SALVATORE, D.; GEREBEN, B.; BERRY, M.J. & LARSEN, P.R. *Biochemistry, Cellular and Molecular Biology, and Physiological Roles of the Iodothyronine Selenodeiodinases*. *Endocrine Reviews* 23(1): 38-89, 2002.

BIANCO, A.C. & KIM, B.W. *Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action*. *The Journal of Clinical Investigation*. 116(10): 2571-2579, 2006.

BIDART, J.M.; MIAN, C.; LAZAR, V.; RUSSO, D.; FILETTI, S.; CAILLOU, B. & SCHLUMBERGER, M. *Expression of Pendrin and the Pendred Syndrome (PDS) Gene in Human Thyroid Tissues*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 85(5): 2028-2033, 2000.

BJORKMAN, U. & EKHOLM, R. *Generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in isolated porcine thyroid follicles*. *Endocrinology* 115 (1): 392-398, 1984.

BJORKMAN, U. & EKHOLM, R. *Hydrogen peroxide generation and its regulation in FRTL-5 and porcine thyroid cells*. *Endocrinology* 130(1):393-399, 1992.

BLACKMAN, M.R.; ELAHI, D. & HARMAN, S.M. (1995) *Endocrinology and aging*. In: DE GROOT, L.J. e cols.; eds. *Endocrinology*, 3rd ed., WB Saunders Co., Philadelphia. Vol.3, pp. 2703-2730, 1995.

BORGES, P.P.; CURTY, F.H.; PAZOS-MOURA, C.C. & MOURA, E.G. *Effect of Testosterone Propionate Treatment on Thyrotropin Secretion of Young and Old Rats in vitro*. Life Sciences 62(22): 2035-2043, 1998.

BRADFORD, M.M. *A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the protein-dye binding*. Analytical Biochemistry 72: 248-254, 1976.

CARDOSO, L.C.; MARTINS, D.C.; FIGUEIREDO, M.D.L.; ROSENTHAL, D.; VAISMAN, M.; ALICE H. D. VIOLANTE, A.H..D. & CARVALHO, D.P. *Ca<sup>2+</sup>/Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Generation Is Inhibited by Iodide in Human Thyroids*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 86(9): 4339–4343, 2001.

CARDOSO, L.C.; MARTINS, D.C.; CAMPOS, D.V.; SANTOS, L.M.; CORREA DA COSTA, V.M.; ROSENTHAL, D.; VAISMAN, M.; VIOLANTE, A.H.& CARVALHO, D.P. *Effect of iodine or iopanoic acid on thyroid Ca<sup>2+</sup>/NADPH-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating activity and thyroperoxidase in toxic diffuse goiters*. European Journal of Endocrinology. 147(3): 293-298, 2002.

CARVALHO, D.P.; REGO, K.G.M. & ROSENTHAL, D. *Thyroid peroxidase in dysmorphogenetic goiters with organification and thyroglobulin defects*. Thyroid 4(4): 421-426, 1994.

CARVALHO, D.P.; DUPUY, C.; GORIN, Y.; LEGUE, O.; POMMIER, J.; HAYE, B.; VIRION, A. *The Ca<sup>2+</sup> and reduced nicotinamide adenine dinucleotide Phosphatedependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation system is induced by thyrotropin in porcine thyroid cells*. Endocrinology 137(3): 1007-1012, 1996

CASS, L.A. & MEINKOTH, J.L. *Ras signaling through PI3K confers hormone-independent proliferation that is compatible with differentiation*. Oncogene 19(7): 924-932, 2000.

CHANOINE, J. P.; BRAVERMAN, L.E.; FARWELL, A.P.; SAFRAN, M.; ALEX. S.; DUBORD, S. & LEONARD, J.L. *The Thyroid Gland is a Major Source of Circulating T<sub>3</sub> in the Rat*. The Journal of Clinical Investigation 91(6): 2709-2713, 1993.

CHIAO, Y.C.; LEE, H.Y.; WANG, S.W.; HWANG, J.J.; CHIEN, C.H.; HUANG, S.W.; LU, C.C.; CHEN, J.J.; TSAI, S.C. & WANG, P.S. *Regulation of thyroid hormones on the production of testosterone in rats*. Journal of Cellular Biochemistry 73(4): 554-62, 1999.

CHRISTIANSON, D.; ROTI, E.; VAGENAKIS, A.G. *The sex-related difference in serum thyrotropin concentration is androgen mediated*. Endocrinology 108(2): 529-535, 1981.

CIULLO, I.; DIEZ-ROUX, G.; DI DOMENICO, M.; MIGLIACCIO, A. & AVVEDIMENTO, EV. *cAMP signaling selectively influences Ras effectores pathways*. Oncogene 20(10): 1186-1192, 2001.

CIZZA, G.; BRADY, L.S.; CALOGERO, A.E.; BADGY, G.; LYNN, A.B.; KLING, M.A.; BLACKMAN, M.R.; CHROUSOS, G.P. & GOLD, P.W. *Central Hypothyroidism Is Associated with Advanced Age in Male Fisher 344/N Rats: In Vivo and In Vitro Studies*. *Endocrinology* 131(6): 2672-2680, 1992.

CIZZA, G.; BRADY, L.S.; ESCLAPES, M.; BLACKMAN, M.R.; CHROUSOS, G.P. & GOLD, P.W. *Age and Gender Influence Basal and Stress-Modulated Hypothalamic-Pituitary-Thyroidal Function in Fisher 344/N Rats*. *Neuroendocrinology* 64(6): 440-448, 1996.

CONSOLE, G.M.; GÓMEZ- DUMM, C.L. & GOYA, R.G. *Immunohistochemical and radioimmunological assessment of thyrotrophs in the pituitary of aging rats*. *Acta anatomica* 152(1):28-32, 1995.

CORRÊA DA COSTA, V.M.C. & ROSENTHAL, D. *Effect of aging on thyroidal and pituitary T4-5'-deiodinase activity in female rats*. *Life Sciences* 59(18): 1515-1520, 1996.

CORRÊA DA COSTA, V.M.C.; MOREIRA, D.G. & ROSENTHAL, D. *Thyroid function and aging: gender-related differences*. *Journal of Endocrinology* 171: 193-198, 2001.

CORVILAIN, B.; LAURENT, E.; LECOMTE, M.; VANSANDE, J. & DUMONT, J.E. *Role of the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and the phosphatidylinositol-Ca<sup>2+</sup> cascades in mediating the effects of thyrotropin and iodide on hormone synthesis and secretion in human thyroid slices*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 79(1): 152-9, 1994.

CRESPO, P. & LEÓN, J. *Ras proteins in the control of the cell cycle and cell differentiation*. *Cellular and Molecular Life Sciences* 57(11): 1613-1636, 2000.

DAMANTE, G.; TELL, G. & DI LAURO, R. *A Unique Combination of Transcription Factors Controls Differentiation of Thyroid Cells*. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 66: 307-356, 2001.

DE FELICE, M & DI LAURO, R. *Thyroid Development and Its Disorders: Genetics and Molecular Mechanisms*. *Endocrine Reviews* 25(5): 722–746, 2004.

DE FELICE, M.; POSTIGLIONE, P.P. & DI LAURO, R. *Thyrotropin Receptor Signaling in Development and Differentiation of the Thyroid Gland: Insights from Mouse Models and Human Diseases*. *Endocrinology* 145(9):4062–4067, 2004.

DI LAURO, R. & DE FELICE, M. *Thyroid Gland: Anatomy and Development*. In: DE GROOT, L. J. & JAMESON, J. L. eds *Endocrinology* 7<sup>th</sup> ed. W. B. Saunders Company, New York, pp. 1268-1277, 2001.

DOHAN, O.; DE LA VIEJA, A.; PARODER, V.; RIEDEL, C.; ARTANI, M.; REED, M.; GINTER, C.S. & CARRASCO, N. *The Sodium/Iodide Symporter (NIS): Characterization, Regulation, and Medical Significance*. *Endocrine Reviews* 24(1): 48–77, 2003.

DONDA, A.; REYMOND, M.J.; ZÜRICH, M.G.; LEMARCHAND-BÉRAUD, T.H. *Influence of sex and age on T3 receptors and T3 concentration in the pituitary gland*

of the rat: consequences on TSH secretion. *Molecular and cellular endocrinology* 54(1): 29-34, 1987.

DONDA, A. & LEMARCHAND-BÉRAUD, T. *Aging alters the activity of 5'-deiodinase in the adenohypophysis, thyroid gland, and liver of the male rat.* *Endocrinology* 124(3):1305-1309, 1989.

DONDA, A.; REYMOND, M.J. & LEMARCHAND-BÉRAUD, T. *Influence of Age on the Control of Thyrotropin Secretion by Thyrotropin-Releasing hormone in the Male Rat.* *Neuroendocrinology* 49(4): 389-394, 1989.

DONDA, A.; REYMOND, F.; REY, F.; LEMARCHAND-BÉRAUD, T. *Sex steroids modulate the pituitary parameters involved in the regulation of TSH secretion in the rat.* *Acta Endocrinologica* 122(5): 577-584, 1990.

DUMITRESCU, A.M.; LIAO, X.H.; WEISS, R.E.; MILLEN, K. & REFETOFF, S. *Tissue-Specific Thyroid Hormone Deprivation and Excess in Monocarboxylate Transporter (Mct)8-Deficient Mice.* *Endocrinology* 147(9):4036–4043, 2006.

DUMONT, J.E. & VASSART, G. *Thyroid Regulatory Factors.* In: DE GROOT, L. J. & JAMESON, J. L. eds., *Endocrinology* 7<sup>th</sup> ed. W. B. Saunders Company, New York, pp. 1301-1313, 2001.

DUNN, J. T. *Biosynthesis and Secretion of Thyroid Hormones.* In: DE GROOT, L. J. & JAMESON, J. L. eds., *Endocrinology* 7<sup>th</sup> ed. W. B. Saunders Company, New York, pp. 1290-1300, 2001.

EVERETT, L.A.; GLASER, B.; BECK, J.C.; IDOL, J.R.; BUCHS, A.; HEYMAN, M.; ADAWI, F.; HAZANI, E.; NASSIR, E.; BAXEVANIS, A.D.; SHEFFIELD, V.C. & GREEN, E.D. *Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS).* *Nature genetics* 17(4):411-22, 1997.

FARBOTA, L.; HOFMANN, C.; OSLAPAS, R.; PALOYAN, E. *Sex hormone modulation of serum TSH levels.* *Surgery* 102(6): 1081-1087, 1987.

FELICETTA, J.V. (1988) *The thyroid and aging.* In: SOWERS J. R. & FELICETTA, J.V. eds., *The endocrinology of aging.* Raven Press, New York, pp. 15-39, 1988.

FERREIRA, ACF.; LIMA, L.P.; ARAÚJO, R.L.; MÜLLER, G.; ROCHA, P.R.; ROSENTHAL, D. & CARVALHO, D.P. *Rapid regulation of thyroid sodium-iodide symporter activity by thyrotrophin and iodine.* *Journal of Endocrinology* 184(1): 69–76, 2005.

FIGUEIREDO, M.D.; CARDOSO, L.C.; FERREIRA, A.C.; CAMPOS, D.V.; DA CRUZ DOMINGOS, M.; CORBO, R.; NASCIUTTI, L.E.; VAISMAN, M. & CARVALHO, D.P. *Goiter and hypothyroidism in two siblings due to impaired Ca<sup>2+</sup>/NAD(P)H-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating activity.* *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86(9): 4843-4848, 2001.

FRIESEMA, E.C.; DOCTER, R.; MOERINGS, E.P.; STIEGER, B.; HAGENBUCH, B.; MEIER, P.J.; KRENNING, E.P.; HENNEMANN, G.; VISSER, T.J. *Identification of*

*thyroid hormone transporters*. Biochemical and biophysical research communications 254(2): 497-501,1999.

FRIESEMA, E.C.; GANGULY, S.; ABDALLA, A.; MANNING FOX, J.E.; HALESTRAP, A.P.; VISSER, T.J. *Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter*. The Journal of biological chemistry. 278(41): 40128-40135, 2003.

FRIESEMA, E.C.; JANSEN, J.; MILICI, C.; VISSER, T.J. *Thyroid hormone transporters*. Vitamins and hormones 70: 137-167, 2005.

FURLANETTO, T.W.; NGUYEN, L.Q.; JAMESON, J.L. *Estradiol increases proliferation and down-regulates the sodium/iodide symporter gene in FRTL-5 cells*. Endocrinology 140(12): 5705-5711, 1999.

GERBER H., PETER, H.J. & STUDER, H. *Age-related failure of endocytosis may be the pathogenetic mechanism responsible for "cold" follicle formation in the aging mouse thyroid*. Endocrinology 120(5):1758-64, 1987.

GILLAM, M.P.; SIDHAYE, A.R.; LEE, E.J.; RUTISHAUSER, J.; STEPHAN, C.W. & KOPP, P. Functional characterization of pendrin in a polarized cell system. Evidence for pendrin-mediated apical iodide efflux. *The Journal of biological chemistry* 279(13):13004-13010, 2004.

GOYA, R.G.; QUIGLEY, K.L.; TAKAHASHI, S.; SOSA, Y.E. & MEITES, J. *Changes in somatotropin and thyrotropin secretory patterns in aging rats*. Neurobiology of Aging 11: 625-630,1990.

GREELEY, G.H.; LIPTON JR., M.A. & KIZER, J.S. *Serum thyroxine, triiodothyronine, TSH levels and TSH release after TRH in aging male and female rats*. Endocrine Research Communications 9(3-4): 169-177, 1983.

GRIFFIN, J.E. *Hypothyroidism in the elderly*. The American journal of the medical sciences. 299(5): 334-345, 1990.

GNIDEHOU, S.; CAILLOU, B.; TALBOT, M.; OHAYON, R.; KANIEWSKI, J.; NOEL-HUDSON, M.S.; MORAND, S.; AGNANGJI, D.; SEZAN,.; COURTIN, F.; VIRION, A. & DUPUY, C. *Iodotyrosine dehalogenase 1 (DEHAL1) is a transmembrane protein involved in the recycling of iodide close to the thyroglobulin iodination site*. The FASEB Journal 18(13):1574-1576, 2004.

GUARENTE, L.; RUVKUN, G. & AMASINO, R. *Aging, life span, and senescence*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95(19):11034-11036, 1998.

HABRA, M. & SARLIS, N.J. *Thyroid and Aging*. Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders 6:145–154, 2005.

HULBERT, A.J. *Thyroid hormones and their effects: a new perspective*. Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society 75(4): 519-631, 2000.

IACOVELLI, L.; CAPOBIANCO, L.; SALVATORE, L.; SALLESE, M.; D'ANCONA, G.M. & DE BLASI, A. *Thyrotropin Activates Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in FRTL-5 by a cAMP-Dependent Protein Kinase A Independent Mechanism*. *Molecular Pharmacology* 60(5): 924–933, 2001.

JANNINI, E.A.; ULISSE, S. & D'ARMIENTO, M. *Thyroid Hormone and Male Gonadal Function*. *The Endocrine Society* 16(4): 443-459, 1995.

JANSEN, J.; FRIESEMA, E.C.H.; KESTER, M.H.A.; MILICI, C.; REESER, M.; GRÜTERS, A.; BARRETT, T.G.; MANCILLA, E.E.; SVENSSON, J.; WEMEAU, J.L.; CANALLI, M.H.B.S.; LUNDGREN, J.; MCENTAGART, M.E.; HOPPER, N.; ARTS, W.F. & VISSER, T.J. *Functional analysis of MCT8 mutations identified in patients with X-linked psychomotor retardation and elevated serum triiodothyronine* *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* Mar 13; *in press*, 2007.

KACSOH, B. *The Thyroid Gland*. In: KACSOH B. eds., *Endocrine Physiology* ed McGraw-Hill, New York, pp. 307-359, 2000.

KANG, H.C.; OHMORI, M.; HARII, N.; ENDO, T. & ONAYA, T. *Pax-8 Is Essential for Regulation of the Thyroglobulin Gene by Transforming Growth Factor- $\beta$ 1*. *Endocrinology* 142(1): 267-275, 2001.

KIMURA, T.; VAN KEYMEULEN, A.; GOLSTEIN J.; FUSCO, A.; DUMONT, J.E. & ROGER, P.P. *Regulation of Thyroid Cell Proliferation by TSH and Other Factors: A Critical Evaluation of in Vitro Models*. *Endocrine Reviews* 22(5): 631–656, 2001.

KISHIMOTO M.; FUJIKI, R.; TAKEZAWA, S.; SASAKI, Y.; NAKAMURA, T.; YAMAOKA, K.; KITAGAWA, H. & KATO, S. *Nuclear receptor mediated gene regulation through chromatin remodeling and histone modifications*. *Endocrine Journal* 53(2):157-172, 2006.

KLUG, T.L. & ADELMAN, R.C. *Altered hypothalamic-pituitary regulation of thyrotropin in male rats during aging*. *Endocrinology* 104(4): 1136-1142, 1979.

KONTOGEORGOS, G. & KOVACS, K. *Apoptosis in Endocrine Glands*. *Endocrine pathology* 6(4): 257-265, 1997.

LARSEN, P.R.; DAVIES, T.F. & RAY, I.D. *The Thyroid Gland*. In: Foster, D. W.; KRONENBERG, H. M. & LARSEN P. R. eds., *Williams Textbook of Endocrinology* 9<sup>th</sup> ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 389-515, 1998.

LEAL, A.L.R.C.; PANTALEÃO, T.U.; MOREIRA, D.G.; MARASSI, M.P.; PEREIRA, V.S., ROSENTHAL, D. & CORRÊA DA COSTA, V.M. *Hypothyroidism and hyperthyroidism modulates Ras-MAPK intracellular pathway in rat thyroids*. *Endocrine in press*, 2007.

LEVY, A. *Physiological implications of pituitary trophic activity*. *Journal of Endocrinology* 174, 147–155, 2002.

LEE, M.L.; CHEN, G.G.; VLANTIS, A.C.; TSE, G.M.K.; LEUNG, B.C.H.; VAN HASSELT, C.A. *Induction of Thyroid Papillary Carcinoma Cell Proliferation by*

*Estrogen Is Associated with an Altered Expression of Bcl-xL.* The Cancer Journal 11(2):113-121, 2005.

LEWIS, G.F.; ALESSI, C.A.; IMPERIAL, J.G. & REFETTOFF, S. *Low Serum Free Thyroxine Index in Ambulating Elderly Is due to a Resetting of the Threshold of Thyrotropin Feedback Suppression.* The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 73 (4): 843-849,1991.

LISBÔA, P.C. *Efeito dos esteróides sexuais na atividade 5'-desiodase e na secreção hormonal do eixo hipófise-tireóide.* Tese de Mestrado, IBCCF, UFRJ, Rio de Janeiro, 1997.

LISBÔA, P.C.; CURTY, F.H.; MOREIRA, R.M.; PAZOS-MOURA, C.C. *Effects of estradiol benzoate on 5'-iodothyronine deiodinase activities in female rat anterior pituitary gland, liver and thyroid gland.* Brazilian Journal of Medical and Biological Research 30(12):1479-1484, 1997.

LISBÔA, P.C.; CURTY, F.H.; MOREIRA, R.M.; OLIVEIRA, K.J.; PAZOS-MOURA, C.C. *Sex steroids modulate rat anterior pituitary and liver iodothyronine deiodinase activities.* Hormone and Metabolic Research 33(9): 532-535, 2001.

MAENHAUT, C.; ROGER, P.P. & DUMONT, J.E. *Activation of the cyclic AMP cascade as an oncogenic mechanism: the thyroid example.* Biochimie 73(1): 29-36, 1991.

MANOLE, D.; SCHILDKNECHT, B.; GOSNELL, B.; ADAMS, E.; DERWAHL, M. *Estrogen promotes growth of human thyroid tumor cells by different molecular mechanisms.* The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 86(3):1072-1077, 2001.

MARASSI, M.P. *Influência dos esteróides gonadais na função tireóidea e na atividade iodotironina-desiodase tipo 1.* Tese de Mestrado, IBCCF, UFRJ, Rio de Janeiro, 2005.

MARIOTTI, S.; BARBESINO, G.; CATUREGLI, P.; CATUREGLI, P.; BARTALENA, L.; SANSONI, P.; FAGNONI, F.; MONTI, D.; FAGIOLO, U.; FRANCESCHI, C. & PINCHERA, A. *Complex alteration of thyroid function in healthy centenarians.* The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 77(5): 1130-1135, 1993.

MARIOTTI, S.; FRANCESCHI, C.; ANDREA COSSARIZZA, A. & PINCHERA, A. *The Aging Thyroid.* Endocrine Review 16 (6): 686-715, 1995.

MEDINA, D.L. & SANTISTEBAN, P. *Thyrotropin-dependent proliferation of in vitro rat thyroid cell systems.* European Journal of Endocrinology 143(2): 161-178, 2000.

MISSERO, C.; PIRRO, M. T. & DI LAURO, R. *Multiple Ras Downstream Pathways Mediate Functional Repression of the Homeobox Gene Product TTF-1.* Molecular and Cellular Biology 20 (8): 2783-2793, 2000.

MONZANI, F.; DEL GUERRA, P.; CARACCIO, N.; DEL CORSO, L.; CASOLARO, A.; MARIOTTI, S. & PENTIMONE, F. *Age-Related Modifications in the Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis.* Hormone Research 46(3): 107-112,1996.

MORAND, S.; CHAARAOUI, M.; KANIEWSKI, J. DEME, D.; OHAYON, R.; NOEL-HUDSON, M.S.; VIRION, A. & DUPUY, C. *Effect of iodide on nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity and Duox2 protein expression in isolated porcine thyroid follicles*. *Endocrinology* 144 (4): 1241-1248, 2003.

MOREIRA, D.G.; MARASSI, M.P.; CORRÊA DA COSTA, V.M.; CARVALHO, D.P.; ROSENTHAL, D. Effects of ageing and pharmacological hypothyroidism on pituitary-thyroid axis of Dutch-Miranda and Wistar rats. *Experimental Gerontology* 40(4): 330-334, 2005.

MOREIRA, R.M.; LISBÔA, P.C.; CURTY, F.H.; PAZOS-MOURA, C.C. *Dose-dependent effects of 17- $\beta$ -estradiol on pituitary thyrotropin content and secretion in vitro*. *Brasilian Journal of Medical and Biological Research* 30(9): 1129-1134, 1997.

MORLEY, J.E. *Hormones, Aging, and Endocrine Disorders in the Elderly*. In: FELIG, P. & FROHMAN, L. A. eds., *Endocrinology and Metabolism* 4<sup>th</sup> ed. Mc Graw-Hill, New York, pp.1455-1482, 2001.

NILLNI, E.A. & SEVARINO, K.A. *The Biology of pro-Thyrotropin-Releasing Hormone Derived Peptides*. *Endocrine Reviews* 20(5): 599-648, 1999.

NOLAN, A.L.; THOMAS, C.K. & LEVY, A. *Permissive effects of thyroid hormones on rat anterior pituitary mitotic activity*. *Journal of Endocrinology* 180: 35-43, 2004.

OLIVEIRA, J.H.; PERSANI, L.; BECK-PECCOZ, P. & ABUCHAM, J. *Investigating the paradox of hypothyroidism and increased serum thyrotropin (TSH) levels in Sheehan's syndrome: characterization of TSH carbohydrate content and bioactivity*. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86(4):1694-1699, 2001.

OLIVEIRA J.H.; BARBOSA, E.R.; KASAMATSU, T. & ABUCHAM, J. Evidence For Thyroid Hormone As A Positive Regulator Of Serum Thyrotropin (TSH) Bioactivity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. May 15, *in press*, 2007.

PEETERS, R.; BUYS, N.; VANMONTFORT, D.; ISTERDAEL, J.V.; DECUYPERE, E.; KUHN, E.R. *Preferential release of triiodothyronine following stimulation by thyrotropin or thyrotropin-release hormone in sheep of different ages*. *Journal of Endocrinology* 132 (1): 93-100, 1992.

PEKARY, A.E.; HERSHMAN, J.M.; SUGAWARA, M; GIESCHEN, K.I.; SOGOL, P.B.; REED, A.W.; PARDRIDGE, W.M. & WALFISH, P.G. *Preferential release of triiodothyronine: an intrathyroidal adaptation to reduced serum thyroxine in aging rats*. *Journal of Gerontology* 38(6): 653-659, 1983.

PERALTA, S.; CARRASCOSA, J.M.; GALLARDO, N.; ROS, M. & ARRIBAS C. *Ageing increases SOCS-3 expression in rat hypothalamus: effects of food restriction*. *Biochemical and biophysical research communications* 296(2):425-428, 2002.

PERSANI, L.; FERRETTI, E.; BORGATO, S.; FAGLIA, G. & BECK-PECCOZ, P. *Circulating Thyrotropin Bioactivity in Sporadic Central Hypothyroidism*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 85(10): 3631-3635, 2000.

PETER, H.J.; GERBER, H.; STUDER, H. & SMEDS, S. *Pathogenesis of heterogeneity in human multinodular goiter. A study on growth and function of thyroid tissue transplanted onto nude mice.* The Journal of Clinical Investigation 76 (5): 1992-2002, 1985.

PETER, H.J.; GERBER, H.; STYDER, H. & SMEDS, S. *Pathogenesis of heterogeneity.* In: PINCHERA, A.; MARIOTTI, S.; BARBESINO, G.; BECHI, R.; SANSONI, P.; FAGIOLO, U.; COSSARIZZA, A. & FRANCESCHI, C. *Thyroid Autoimmunity and Ageing.* Hormone Research 43: pp.64-68, 1995.

PINCHERA, A.; MARIOTTI, S.; BARBESINO, G.; BECHI, R.; SANSONI, P.; FAGIOLO, U.; COSSARIZZA, A. & FRANCESCHI, C. *Thyroid autoimmunity and ageing.* Hormone Research 43(1-3):64-68, 1995.

POMERANCE, M.; ABDULLAH, H.B.; KAMERJI, S.; CORREZE, C. & BLONDEAU, J. P. *Thyroid-stimulating Hormone and Cyclic AMP Activate p38 Mitogen-activated Protein Kinase Cascade.* The Journal of Biological Chemistry 275(51): 40539–40546, 2000.

POSTIGLIONE, M. P.; PARLATO, R.; RODRIGUEZ-MALLON, A.; ROSICA, A.; MITHBAOKAR, P.; MARESCA, M.; MARIANS, R.C.; DAVIES, T.F.; ZANNINI, M.S.; DE FELICE, M. & DI LAURO, R. *Role of the thyroid-stimulating hormone receptor signaling in development and differentiation of the thyroid gland.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99(24): 15462–15467, 2002.

REYMOND, F.; DENEREAZ, N. & LEMARCHAND-BÉRAUD, T. *Thyrotropin action is impaired in the thyroid gland of old rats.* Acta Endocrinologica 126(1): 55-63, 1992.

RIVAS, M. & SANTISTEBAN, P. *TSH-activated signaling pathways in thyroid tumorigenesis.* Molecular and Cellular Endocrinology 213(1): 31–45, 2003.

RODRIGUEZ, A.M.; PERRON, B.; LACROIX, L.; CAILLOU, B.; LEBLANC, G.; SCHLUMBERGER, M.; BIDART, J.M. & POURCHER, T. *Identification and characterization of a putative human iodide transporter located at the apical membrane of thyrocytes.* The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 87(7): 3500-3503, 2002.

SAWIN, C.T.; CHOPRA, D.; AZIZI, F.; MANNIX, J.E. & BACHARACH, P. *The aging thyroid: increased prevalence of elevated serum thyrotropin levels in the elderly.* The journal of the American Medical Association 242 (3): 247-250, 1979.

SCANLON, M.F. *Thyrotropin-Releasing Hormone and Thyroid-Stimulating Hormone.* In: DE GROOT, L. J. & JAMESON, J. L. eds., *Endocrinology* 7<sup>th</sup> ed. W. B. Saunders Company, New York, pp. 1279-1289, 2001.

SCHLUMBERGER, M. & PACINI, F. *Oncogenes and Tumor Suppressor Genes* In: SCHLUMBERGER, M. & PACINI, F. eds., *Thyroid Tumors*, Nucléon, Paris, pp. 61-81, 1999.

SOLOMON, D.H. *Effect of aging on thyroid hormone metabolism*. In: WU SING-YUNG, eds., *Thyroid hormone metabolism regulation and clinical implications*. Blackwell Scientific Publications, Boston, 267-292, 1991.

STORK, P.J. & SCHMITT, J.M. *Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation*. *Trends of Cellular Biology* 12(6): 258-266, 2002.

STUDER, H. & GERBER, H. *Multinodular goiter*. In: DE GROOT, L.J. e cols., eds. *Endocrinology*, 3rd ed., WB Saunders Co., Philadelphia. Vol.1, pp. 769-782, 1995.

TAMURA, S. & FUJITA, H. *Fine structural aspects on the cold follicles in the aged mouse thyroid*. *Archivum histologicum Japonicum* 44(2):177-88, 1981.

TIETZ, N.W.; SHUEY, D.F. & WEKSTEIN, D.R. *Laboratory values in fit aging individuals – sexagenarians through centenarians*. *Clinical Chemistry* 38(6): 1167-1185, 1992.

TRUEBA, S.S.; AUGE, J.; MATTEI, G.; ETCHEVERS, H.; MARTINOVIC, J.; CZERNICHOW, P.; VEKEMANS, M.; POLAK, M. & ATTIE-BITACH, T. *PAX8, TTF1, and FOXE1 Gene Expression Patterns during Human Development: New Insights into Human Thyroid Development and Thyroid Dysgenesis-Associated Malformations*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 90(1): 455–462, 2005.

UTIGER, R.D. *The Thyroid: Physiology, Thyrotoxicosis, Hypothyroidism, and the Painful Thyroid*. In: FELIG, P. & FROHMAN, L. A. eds *Endocrinology and Metabolism* 4<sup>th</sup> ed. Mc Graw-Hill, New York, pp. 261-288, 2001.

VAN COEVORDEN, A.; LAURENT, E.; DECOSTER, C.; KERKHOF, M.; NEVE, P.; VAN CAUTER, E. & MOCKEL, J. *Decreased basal and stimulated thyrotropin secretion in healthy elderly man*. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 69(1): 177-185, 1989.

VAN COEVORDEN, A.; MOCKEL, J.; LAURENT, E.; KERKHOF, M.; L'HERMITE-BALÉRIAUX, M.; DECOSTER, C.; NEVE, P. & VAN CAUTER, E. *Neuroendocrine rhythms and sleep in aging men*. *The American Journal of Physiology* 4(1): 651-661, 1991.

VANDEPUT, F.; PERPETE, S.; COULONVAL, K.; LAMY, F. & DUMONT, J.E. *Role of the different mitogen-activated protein kinase subfamilies in the stimulation of dog and human thyroid epithelial cell proliferation by cyclic adenosine 5'-monophosphate and growth factors*. *Endocrinology* 144(4):1341-1349, 2003.

VAN KEYMEULEN A.; ROGER P. P.; DUMONT E. J. & DREMIER, S. *TSH and cAMP Do Not Signal Mitogenesis through Ras Activation*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 273 (1): 154–158, 2000.

VAN SANDE, J.; MASSART, C.; BEAUWENS, R.; SCHOUTENS, A.; COSTAGLIOLA, S.; DUMONT, J. E. & WOLFF, J. *Anion Selectivity by the Sodium Iodide Symporter*. *Endocrinology* 144(1): 247–252, 2003.

VAN SANDE, J.; DEQUANTER, D.; LOTHAIRE, P.; MASSART, C.; DUMONT, J.E. & ERNEUX, C. Thyrotropin stimulates the generation of inositol 1,4,5-trisphosphate in human thyroid cells. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 91(3):1099-107, 2006

WANG, C.; HIKIM, A.S.; FERRINI, M.; BONAVERA, J.J.; VERNET, D.; LEUNG, A.; LUE, Y.H.; GONZALEZ-CADAVID, N.F. & SWERDLOFF, R.S. *Male reproductive ageing: using the brown Norway rat as a model for man*. Novartis Foundation symposium. 242:82-97; 2002.

WANG, X. & STOCCO, D.M. *The decline in testosterone biosynthesis during male aging: a consequence of multiple alterations*. *Molecular and cellular endocrinology* 238(1-2): 1-7, 2005.

WEISS, R.E.; CHASSANDE, O.; KOO, E.K.; MACCHIA, P.E.; CUA, K. SAMARUT, J. & REFETTOFF, S. *Thyroid function and effect of aging in combined hetero/homozygous mice deficient in thyroid hormone receptors and genes* *Journal of Endocrinology* 172(1):177–185, 2002.

WITTINGHOFER, A. & NASSAR, N. (1996) *How Ras-Related proteins talk to their effectors*. *Trends in biochemical sciences* 21(12): 488-491, 1996.

WOODMANSEE, W.W.; KERR, J.M.; TUCKER, E. A.; MITCHELL, J.R.; HAAKINSON, D.J.; GORDON, D.F.; RIDGWAY, E.C. & WOOD, W.M. *The Proliferative Status of Thyrotropes Is Dependent on Modulation of Specific Cell Cycle Regulators by Thyroid Hormone*. *Endocrinology* 147(1): 272–282, 2006.

YEN, P.M. *Physiological and Molecular Basis of Thyroid Hormone Action*. *Physiological Reviews* 81(3): 1097-1142, 2001.

YOSHIDA, A.; HISATOME, I.; TANIGUCHI, S.; SASAKI, N.; YAMAMOTO, Y.; MIAKE, J.; FUKUI, H.; SHIMIZU, H.; OKAMURA, T.; OKURA, T.; IGAWA, O.; SHIGEMASA, C.; GREEN, E.D.; KOHN, L.D. & SUZUKI, K. *Mechanism of Iodide/Chloride Exchange by Pendrin*. *Endocrinology* 145(9): 4301–4308, 2004.

YOSHIDA, T.; SATO, M.; OHTOH, K., CHO, & HONJO, S. *Effect of aging on the “in vivo” release of thyrotropin (TSH), triiodothyronine and thyroxine induced by TSH-releasing hormone in the cynomolgus monkey (Macaca fascicularis)*. *Endocrinology* 124(3): 1287-1293, 1989.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)