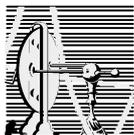


UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

MÔNICA MÜHLBAUER

EFEITOS DO TRATAMENTO COM
ÁCIDO RETINÓICO
SOBRE A FUNÇÃO TIREÓIDEA DE RATOS



Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
Universidade Federal do Rio de Janeiro
2009



Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

MÔNICA MÜHLBAUER

EFEITOS DO TRATAMENTO COM
ÁCIDO RETINÓICO
SOBRE A FUNÇÃO TIREÓIDEA DE RATOS

TESE SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – FISILOGIA DO INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS

Orientadora: Prof.^a Denise Pires de Carvalho

Co-orientadora: Prof.^a Andrea Claudia Freitas Ferreira

Rio de Janeiro

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Mühlbauer, Mônica

Efeitos do tratamento com ácido retinóico sobre a função tireóidea de ratos / Mônica Mühlbauer. -- 2009.

xvii, 126 f

Tese (Doutorado em Ciências Biológicas-Fisiologia) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2009.

Orientadora: Denise Pires de Carvalho

Co-orientadora: Andrea Claudia Freitas Ferreira

1. ácido retinóico 2. tireóide 3. tireoperoxidase 4. Co-transportador de sódio/iodeto (NIS) 5. Iodotironinas desidases tipo I e tipo II 6. Duox
I. Carvalho, Denise Pires (orientadora). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro III. Efeitos do tratamento com ácido retinóico sobre a função tireóidea de ratos.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia Endócrina Doris Rosenthal do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro sob orientação da professora Denise Pires de Carvalho e co-orientação da professora Andrea Claudia Freitas Ferreira, com apoio financeiro concedido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX) e pelo Conselho de Ensino para Graduados (CEPG/UFRJ).

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, **Henrique e Sila**, por todo incentivo e ajuda financeira para eu conseguir me manter no Rio de Janeiro; por acreditarem mais do que eu em mim, por horas de conselhos durante telefonemas, dando força nas horas difíceis e me mostrando que as dificuldades podem ser vistas como desafios e não como derrota e, acima de tudo, agradeço pelo amor.

À minha orientadora, **Denise Pires de Carvalho**, por quem tenho profunda admiração por ser uma excelente orientadora e profissional, mas principalmente por ser uma pessoa extremamente compreensiva, justa e amiga. Além de orientar a tese, ela consegue “orientar” o lado profissional, ensinando-nos a lidar com a pressão psicológica. É “doutora” em alterar tudo no último minuto do segundo tempo, mas sempre para melhor. Admiro demais seu dinamismo e competência e, acima de tudo, a sua capacidade de transmitir alegria.

À minha co-orientadora, **Andrea Claudia Freitas Ferreira**, que sempre se dedicou na orientação desse trabalho, assim como no exame de qualificação. Obrigada, desde o primeiro momento, por ter sido tão atenciosa.

À professora **Doris Rosenthal** pelos ensinamentos, principalmente estatísticos, pela dedicação à vida acadêmica, pela revisão deste trabalho e claro, pelas “críticas” merecidas, que nos fazem melhorar cada vez mais.

Às professoras **Tamar Frankenfeld e Vânia Costa**, pelas dicas e conselhos na preparação de algumas aulas e pelos seus ensinamentos.

À professora **Cristiane Del Corso** pelos ensinamentos em fisiologia cardiovascular.

Às amigas **Elaine Cristina de Souza e Camilla Antonieta Flores Brito** pela grande amizade.

À amiga **Célia Palmero** pelos ensinamentos de Histologia.

Ao amigo **Wagner Nunes Bezerra**, “Waghity” para os íntimos do laboratório, pela amizade sincera e apoio. Um amigo pra sempre.

Aos amigos de trabalho **Alba Cenélia M. Silva, Alexandre Lourenço, Álvaro Souto Padrón, Amália Lucy, Anna Lúcia China Leal, Bruno Moulin de Andrade, Carlos Frederico Gonçalves, Daniele Ignácio, Felipe Mousovich, Flávia Nóbrega, Glória Ginabreda, João Paulo Albuquerque, Karoline Tury, Luciene C. Cardoso, Maria Carolina Santos, Mariana Lopes, Mariana Slaustiano, Michelle Marassi, Monique Leandro, Renata Lopes Araujo, Renata Grozovsky, Rodrigo Soares Fortunato, Ricardo Cortez, Sabrina Coelho, Thiago Pantaleão, Valmara Pereira, William Oliveira**, que fazem com que ir ao laboratório seja diversão garantida.

Aos técnicos do nosso laboratório, **Advaldo Nunes Bezerra, José Humberto Tavares Abreu e Norma L. de Araújo Faria**, pela ajuda nos experimentos e principalmente pela amizade. “Valdinho” e Norminha” muito obrigada por todo o apoio. Saibam que tenho um enorme carinho por vocês.

Ao professor **Jorge Carvalho** da UERJ que permitiu que eu fizesse a parte de imunohistoquímica em seu laboratório. O projeto não foi adiante, mas a aprendizagem de imunohistoquímica foi de grande valia.

À técnica da UERJ, **Ana Lúcia**, que foi muito dedicada me ajudando nas técnicas de imunohistoquímica.

Ao meu companheiro **Hugo De Carlo Rocha Filho**, pelo carinho, companheirismo, compreensão e amor. Muito obrigada por agüentar o meu estresse (tarefa bem difícil, eu sei) e não ter desistido. Mesmo chegando no “segundo tempo” ajudou-me a ter paz e alegria.

A todos os meus amigos que, mesmo longe, fazem parte da minha vida e que moram no meu coração.

Aprendi muito com cada um de vocês. Esses anos de doutorado no Rio de Janeiro foram bem tumultuados, bem difíceis em alguns momentos, mas, com certeza, com muita recompensa, aprendizado e alegria no final de tudo. “**MUITO OBRIGADA**” a todos.

"...tenha fibra e enfrente com coragem o desafio que está vivendo.

Não se deixe abater, não esmoreça, lute contra o desânimo.

Quando você vencer,
você vai sentir-se orgulhosa..."
(Henrique Mühlbauer).

Dados da literatura mostram o efeito estimulatório direto do ácido retinóico (AR) sobre a captação de radioiodo em alguns casos de câncer de tireóide. Embora o ácido retinóico seja utilizado em tratamentos dermatológicos e oncológicos, pouco se sabe a respeito dos efeitos do AR sobre a tireóide normal. Assim, visamos determinar os efeitos dos isômeros do AR, ácido *All-trans*-retinóico (*All-trans*-AR) e ácido *13-cis* retinóico (*13-cis*-AR), sobre a função tireóidea normal de ratos. Ratos Wistar machos adultos foram tratados com *All-trans*-AR e *13-cis*-AR na dose 100 µg/kg PC por dia, sc, por 14 ou 28 dias e com a dose de 1,5mg/kg PC por dia, s.c., por 7 ou 28 dias. Não houve diferença significativa entre os grupos quanto aos níveis séricos de T3, T4, TSH ou na atividade da TPO com ambas as doses. O tratamento com baixa dose de *13-cis*-AR por 14 dias reduziu o peso da hipófise e ambos os isômeros foram capazes de diminuir a atividade da iodotironina desidase tipo I (D1) hipofisária. O tratamento com *All-trans*-AR por 28 dias na dose 1,5mg/kg PC reduziu o peso da tireóide. O tratamento com *13-cis*-AR, com ambas as doses, por 28 dias, aumentou significativamente a captação de radioiodeto 15 minutos após sua administração, que reflete principalmente a função do co-transportador sódio-iodeto (NIS). O tratamento com *All-trans*-AR por 14 dias diminuiu significativamente o conteúdo de radioiodo 2 horas após sua administração, que é influenciada pelo transporte e pela organificação do iodo. Este mesmo grupo teve redução significativa da atividade Duox, responsável pela geração de H₂O₂, cofator essencial à organificação do iodo. Uma vez que o tratamento com *13-cis*-AR por 28 dias aumentou a captação de 15 minutos, nossos dados sugerem efeito estimulatório sobre a função do NIS, mesmo na tireóide normal. No grupo *All-trans*-AR 14 dias, a redução concomitante do conteúdo de iodo após 2 horas e da atividade Duox sugere que a menor disponibilidade de H₂O₂ deve ser responsável pela diminuição da organificação neste grupo. O AR parece ter ação direta sobre a função tireóidea de maneira dose, tempo e isômero dependente.

ABSTRACT

Data from the literature show a direct stimulatory effect of retinoic acid (RA) on the radioiodine uptake in some cases of thyroid cancer. Although retinoic acid is used in skin and cancer treatments, little is known about the effects of RA on the normal thyroid. Thus, our aim was to determine the effects of the RA isomers, *All-trans*-retinoic acid (*All-trans*-RA) and 13-*cis*-retinoic acid (13-*cis*-RA) on thyroid function of rats. Adult male Wistar rats were treated with *All-trans*-RA and 13-*cis*-RA, 100 µg/kg BW daily, sc, for 14 or 28 days and 1,5mg/kg BW daily, sc, for 7 or 28 days. There were no significant differences in levels of serum T3, T4, TSH or in the TPO activity among the groups in both doses. The treatment with 13-*cis*-RA in the lower dose for 14 days decreased the pituitary weight and the activity of pituitary iodothyronine deiodinase type I (D1) was decreased by both isomers. The treatment with *All-trans*-RA 1,5mg/kg BW for 28 days decreased thyroid weight. The treatment with 13-*cis*-RA for 28 days in both doses significantly increased the thyroid radioiodide uptake 15 minutes after administration, which reflects primarily the function of the sodium-iodide symporter (NIS). The treatment with *All-trans*-RA for 14 days significantly decreased the radioiodine content 2 hours after its administration, which is influenced by both transport and organification of iodine. The same group had a significant reduction of the Duox activity, responsible for H₂O₂ generation, the essential cofactor for iodine organification. Since the treatment with 13-*cis*-RA for 28 days increased the 15 minutes thyroid radioiodide uptake, our data suggests a stimulatory effect on NIS function, even in the normal thyroid. The concomitant reduction in the 2 hour thyroid iodine content and in the Duox activity in rats treated with *All-trans*-RA for 14 days suggests that the reduction in H₂O₂ availability might be responsible for the decreased organification in this group. The RA seems to have a direct action on thyroid function in a fashion that is dose, time and isomer-dependent.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1: Isômeros do ácido retinóico (AR) (Fonte: NAPOLI, 1999).....30

FIGURA 2: Dimerização dos receptores de AR. Receptores de AR (RAR) formam heterodímeros com receptores de retinóide X (RXR). A ligação do AR ao RAR regula a transcrição gênica. RXR forma heterodímeros com outros receptores nucleares (Fonte: NAPOLI, 1999).....31

FIGURA 3 - Medida da atividade da TPO pelo método de oxidação do iodeto. A atividade da TPO foi avaliada através da equação da reta de regressão linear feita a partir dos pontos obtidos como exemplificado. $y = a + bx$, onde b é o coeficiente de inclinação da reta e corresponde ao $\Delta\text{abs}_{353\text{nm}} / \text{min} / \mu\text{L}$ de TPO (FERREIRA et al., 2005)47

FIGURA 4 - Efeitos do AR na dose de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal sobre a atividade da enzima desidase tipo I (D1) por 14 e 28 dias.....56

FIGURA 5 - Efeito do tratamento com ácido All-trans-retinóico e ácido 13-cis-retinóico na dose de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal por 14 dias sobre a atividade da desidase tipo II (D2) hipofisária.....57

FIGURA 6 - Efeitos do tratamento com ácido All-trans-retinóico e ácido 13-cis-retinóico, na dose de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal, sobre o conteúdo tireóideo de radioiodo 15 minutos após sua administração por 14 e 28 dias.....60

FIGURA 7 - Efeitos do tratamento com ácido All-trans-retinóico e ácido 13-cis-retinóico, na dose de 1,5 mg/kg de peso corporal, sobre o conteúdo tireóideo de radioiodo 15 minutos após sua administração por 7 e 28 dias.....60

FIGURA 8 - Efeitos do tratamento com ácido All-trans-retinóico e ácido 13-cis-retinóico, na dose de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal, sobre o conteúdo tireóideo de radioiodo 2 horas após sua administração por 14 e 28 dias.....61

FIGURA 9 - Efeitos do tratamento com ácido All-trans-retinóico e ácido 13-cis-retinóico, na dose de 1,5 mg/kg de peso corporal, sobre o conteúdo tireóideo de radioiodo 2 horas após sua administração por 7 e 28 dias.....62

FIGURA 10 - Efeitos do tratamento com ácido All-trans-retinóico e ácido 13-cis-retinóico, na dose de 100µg/kg de peso corporal, sobre a atividade da tireoperoxidase de oxidação do iodeto por 14 e 28 dias.....63

FIGURA 11 - Efeitos do tratamento com ácido All-trans-retinóico e ácido 13-cis-retinóico, na dose de 1,5mg/kg de peso corporal, sobre a atividade da tireoperoxidase de oxidação do iodeto por 7 e 28 dias.....63

FIGURA 12 - Efeitos do tratamento com ácido All-trans-retinóico e ácido 13-cis-retinóico, na dose de 100µg/kg de peso corporal, sobre a atividade da enzima Duox tireóidea por 14 e 28 dias.....64

FIGURA 13 - Efeito do tratamento com ácido All-trans-retinóico e ácido 13-cis-retinóico, na dose de 1,5mg/kg de peso corporal, sobre a atividade da enzima Duox tireóidea por 28 dias.....65

TABELA 1 - Ganho de Peso Corporal, peso da tireóide e peso da hipófise em animais tratados com ácido All-trans-retinóico e ácido 13-cis-retinóico, na dose de 100µg/kg de peso corporal, por 14 e 28 dias. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média.....54

TABELA 2 - Ganho de Peso Corporal e peso da tireóide em animais tratados com ácido All-trans-retinóico e ácido 13-cis-retinóico, na dose de 1,5mg/kg de peso corporal, por 7 e 28 dias. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média.....55

TABELA 3 – Concentrações séricas de TSH em animais tratados com ácido All-trans-retinóico e ácido 13-cis-retinóico, na dose 100µg/kg de peso corporal, por 14 e 28 dias. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média.....58

TABELA 4 – Concentrações séricas de T4 e T3 totais em animais tratados com ácido All-trans-retinóico e ácido 13-cis-retinóico, na dose 100µg/kg de peso corporal, por 14 e 28 dias. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média..59

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico, do inglês “Adrenocorticotropic hormone”
All-*trans*-AR – Ácido All-*trans*-retinóico
AMPc – Adenosina monofosfato cíclico
APL – leucemia promielocítica aguda, do inglês “Acute promyelocytic leukemia”
AR – Ácido retinóico
ATP – Adenosina trifosfato
13-*cis*-AR – Ácido 13-*cis*-retinóico
D1 – Iodotironina desiodase tipo I
D2 – Iodotironina desiodase tipo II
D3 – Iodotironina desiodase tipo III
DEHAL – Iodotirosina desalogenase
DIT – Diiidotirosina
DTT – Ditiotreitól
Duox - Oxidase dual
EDTA – Ácido etilenodinitrilotetra acético
FSH – Hormônio folículo estimulante, do inglês “Follicle stimulating hormone”
GH – Hormônio do crescimento, do inglês “Growth hormone”
HT – Hormônio tireóideo
i.p. – Intraperitoneal
LH – Hormônio luteinizante, do inglês “Luteinizing hormone”
MIT – Monoiodotirosina
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo-fosfato, do inglês “Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate”
NIS – Co-transportador Na⁺/I⁻, do inglês “Natrium iodide symporter”
pH – potencial hidrogeniônico
PKA - Proteína cinase A
PPAR – Receptor ativado pela proliferação de peroxissoma
PTU - 6-n-propil-2-tiouracil
p.c - Peso corporal
RAR – Receptor de ácido retinóico
RARE – Elemento responsivo ao ácido retinóico
RIE – Radioimunoensaio
RNAm – Ácido ribonucleico mensageiro, do inglês “Messenger ribonucleic acid”
RXR – receptor de retinóide X
s.c. - Subcutânea
SEM – Erro padrão da média, do inglês “Standard error of the mean”
SFB – Soro fetal bovino
SNC – Sistema nervoso central
T2 – 3,3'-diiidotironina
rT3 – 3,3',5'-triiidotironina reversa (T3 reverso)
T3 – 3,5,3'-triiidotironina
T4 – 3,5,3',5'-tetraiodotironina ou tiroxina
TBG – Proteína ligadora de hormônio tireóideo, do inglês “Thyroxine binding globulin”
TCA – Ácido tricloroacético
Tg – Tireoglobulina

TPO – Tireoperoxidase

TRE – Elemento responsivo a hormônio tireóideo, do inglês “Thyroid responsive element”

TRH – Hormônio liberador de TSH, do inglês “Thyrotropin releasing hormone”

TSH – Hormônio estimulador da tireóide, do inglês “Thyroid stimulating hormone”

TSH-R – Receptor de TSH, do inglês “Thyrotropin receptor”

TTF-2 - Fator de transcrição tireóideo específico 2, do inglês “Thyroid transcription factor-2”

TTR – Transtiretina

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 ASPECTOS ANATÔMICOS E HISTOLÓGICOS DA TIREÓIDE	18
1.2 BIOSÍNTESE DOS HORMÔNIOS TIREÓIDEOS	19
1.2.1 TRANSPORTE DE IODETO.....	19
1.2.2 OXIDAÇÃO DO IODETO E ORGANIFICAÇÃO	20
1.2.3 FORMAÇÃO DAS IODOTIRONINAS	22
1.3 METABOLISMO PERIFÉRICO DOS HORMÔNIOS TIREÓIDEOS	23
1.4 REGULAÇÃO DA FUNÇÃO TIREÓIDEA	26
1.4.1 EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-TIREÓIDE.....	26
1.4.2 AUTO-REGULAÇÃO PELO IODO	28
1.5 ÁCIDO RETINÓICO E SEUS RECEPTORES	29
1.6 ÁCIDO RETINÓICO E CARCINOMA DA TIREÓIDE	34
1.7 ÁCIDO RETINÓICO E FUNÇÃO TIREÓIDEA NORMAL	38
2 OBJETIVOS	42
2.1 OBJETIVO GERAL	42
2.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
3 MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1 ANIMAIS	43
3.2 TRATAMENTO COM ÁCIDO RETINÓICO	43
3.3 SACRIFÍCIO	44
3.4 CONTEÚDO TIREÓIDEO DE RADIOIODO	44
3.5 RADIOIMUNOENSAIOS	45
3.5.1 T3 e T4	45
3.5.2 TSH	45
3.6 ATIVIDADE DA ENZIMA TIREOPEROXIDASE (TPO)	46

3.7 ATIVIDADE DAS ENZIMAS IODOTIRONINAS DESIODASES TIPO I (D1) E TIPO II (D2)	47
3.7.1 PROCESSAMENTO DOS TECIDOS	48
3.7.2 PURIFICAÇÃO DO ¹²⁵ I-rT3 - E ¹²⁵ I-T4	48
3.7.3 ENSAIO DE ATIVIDADE DA D1	49
3.7.4 ENSAIO DE ATIVIDADE DA D2.....	50
3.8 ATIVIDADE DA DUOX	51
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
4 RESULTADOS.....	53
4.1 GANHO DE PESO CORPORAL, PESO DA TIREÓIDE E PESO DA HIPÓFISE ...	53
4.2 ATIVIDADE DAS ENZIMAS IODOTIRONINAS DESIODASES	55
4.2.1 ATIVIDADE DA ENZIMA IODOTIRONINA DESIODASE TIPO I (D1)	55
4.2.2 ATIVIDADE DA ENZIMA IODOTIRONINA DESIODASE TIPO II (D2)	57
4.3 CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE TSH	57
4.4 CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE T4 E T3.....	58
4.5 FUNÇÃO DO NIS	59
4.6 CONTEÚDO TIREÓIDEO DE IODO RADIOATIVO APÓS 2 HORAS	61
4.7 ATIVIDADE DA TIREOPEROXIDASE	62
4.8 ATIVIDADE DA ENZIMA DUOX.....	64
5 DISCUSSÃO	66
6 CONCLUSÃO	83
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
8 ANEXOS	100

1.1 ASPECTOS ANATÔMICOS E HISTOLÓGICOS DA TIREÓIDE

A tireóide, maior glândula exclusivamente endócrina humana, apresenta-se aderida às regiões anterior e lateral da traquéia, sendo composta por dois lobos encapsulados unidos por um istmo, imediatamente abaixo da cartilagem cricóide. O lobo direito é normalmente maior que o lobo esquerdo. Um terceiro lobo, denominado piramidal, também pode ser encontrado estendendo-se superiormente a partir do istmo, indicando a existência de uma estrutura remanescente do desenvolvimento embrionário da tireóide (UTIGER, 2001). Em roedores, suas características e localização são semelhantes às dos humanos.

Histologicamente, a tireóide apresenta numerosas estruturas ovóides, denominadas folículos, cujas paredes são compostas por uma única camada de células epiteliais denominadas tireócitos. Essas células apresentam alturas variáveis, podendo ser pavimentosas, cúbicas ou cilíndricas. O interior do folículo tireóideo é preenchido por colóide mucoprotéico responsável por grande parte da massa tireóidea total. As células parafoliculares ou células C também são encontradas na tireóide, sendo responsáveis pela produção do hormônio calcitonina, importante para o metabolismo do cálcio.

Os folículos tireóideos são considerados as unidades morfo-funcionais da glândula, uma vez que o colóide, no seu interior, tem como principal componente a tireoglobulina (Tg), uma glicoproteína que serve como substrato para a síntese dos hormônios tireóideos: triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) (LARSEN *et al.*, 2008).

1.2 BIOSÍNTESE DOS HORMÔNIOS TIREÓIDEOS

1.2.1 TRANSPORTE DE IODETO

A secreção dos hormônios tireóideos T3 (3,5,3'-triodotironina) e T4 (tiroxina) pela glândula tireóide é de extrema importância na diferenciação, no crescimento e no metabolismo celular; desempenhando papel crítico no funcionamento normal de quase todos os tecidos (YEN, 2001). Os principais efeitos dos hormônios tireóideos estão vinculados à regulação do metabolismo basal, termogênese, desenvolvimento intrauterino, maturação de uma variedade de sistemas orgânicos, dentre outros.

O iodo é essencial para a biossíntese dessas moléculas, sendo sua captação pelas células foliculares tireóideas ou tireócitos, na forma de iodeto (I^-) proveniente da dieta, mediada pelo co-transportador sódio/iodeto (NIS) (DAÍ *et al.*, 1996; SMANIK *et al.*, 1996)

O NIS, cujo gene foi clonado em 1996 (DAÍ *et al.*, 1996; SMANIK *et al.*, 1996), é uma glicoproteína integral da membrana basolateral dos tireócitos, com 13 regiões transmembrana (DOHAN e CARRASCO, 2003). Essa glicoproteína encontra-se expressa não somente na tireóide, mas também em outros tecidos, como glândulas salivares, mucosa gástrica e glândula mamária lactante (CHO *et al.*, 2000; RIEDEL *et al.*, 2001).

Para que ocorra o transporte de iodeto é necessário um gradiente eletroquímico de sódio mantido pela atividade da bomba Na^+/K^+ - ATPase. Dois íons de Na^+ são transportados a favor do seu gradiente eletroquímico e um íon de iodeto entra contra seu gradiente, ambos em direção ao interior do tireócito (KOGAI *et al.*, 2000). Uma vez no interior do tireócito, o iodeto é transportado através da membrana apical para o colóide ou lúmen folicular. O transporte de iodeto nesta região da célula folicular é realizado pela pendrina (PDS), uma glicoproteína transportadora de ânions (cloreto/iodeto) presente na membrana apical da célula folicular (KOPP *et al.*, 1999). Recentemente, foi identificado

um segundo transportador de iodeto, o transportador apical de iodeto de seres humanos, tratando-se de uma proteína de transporte de ácidos graxos de cadeia curta. Mas a sua importância fisiológica para o transporte do iodeto ainda não está bem estabelecida (LACROIX *et al.*, 2004). Também foi descoberto, na membrana apical das células tireóideas de camundongos, um canal de cloreto, voltagem dependente, o CIC-5 (VAN DEN HOVE *et al.*, 2006). Como esse canal apresenta certa seletividade a alguns ânions, sendo o iodeto um deles, os autores propõem que este canal possa ser mais um transportador de iodeto para o lúmen folicular. Outros modelos funcionais também são sugeridos; o CIC-5 poderia ter importância para manter o efluxo de cloreto para o colóide e, assim, dar suporte para a pendrina que contra-transporta o iodeto em função do cloreto; ou, ainda, que o CIC-5 tenha ação indireta, através do cloreto, modulando a expressão da pendrina nos tireócitos (VAN DEN HOVE *et al.*, 2006). Todavia, ainda não está bem esclarecida a importância desses outros transportadores, sendo aceito, portanto, que a pendrina seja o principal transportador apical de iodeto nos tireócitos.

1.2.2 OXIDAÇÃO DO IODETO E ORGANIFICAÇÃO

As células foliculares, sob estímulo do hormônio tireotrófico (TSH), sintetizam proteínas, como a tireoglobulina (Tg) e a tireoperoxidase (TPO), que se localizam no colóide e na membrana apical da célula, respectivamente. A Tg recém-sintetizada é incorporada às vesículas de exocitose, as quais migram em direção ao lúmen folicular, enquanto a TPO, uma hemoproteína glicosilada, ancora-se na membrana plasmática apical da célula tireóidea, promovendo a oxidação e organificação do iodo e acoplamento de iodotirosinas, com formação de T3 e T4 (TAUROG *et al.*, 1996).

A biossíntese de T3 e T4 inicia-se então, com a oxidação do iodeto e sua organificação. A oxidação geralmente ocorre de maneira muito rápida, sendo o iodeto oxidado incorporado principalmente à Tg presente no colóide, formando radicais iodotirosil (DE FELICE *et al.*, 2004).

Para que ocorra a oxidação do iodeto, a TPO requer a presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como um acceptor de elétrons. O H_2O_2 é sintetizado pelo complexo enzimático NADPH oxidase, uma flavoproteína dependente de Ca^{++} , localizada também na membrana apical das células foliculares (CARVALHO *et al.*, 1996; MORAND *et al.*, 2003; GINABREDA *et al.*, 2008). Recentemente, o cDNA da porção flavoprotéica relacionada à atividade NADPH oxidase foi clonado em tireócitos porcinos e humanos (DE DEKEN *et al.*, 2000). Dois genes que codificam flavoproteínas relacionados à atividade NADPH oxidase foram clonados e correspondem a enzimas denominadas oxidases tireóideas 1 e 2 (ThOx 1 e ThOx 2) (DE DEKEN *et al.*, 2000). As ThOx, pertencentes à família das Nox oxidases, foram também denominadas oxidases duais (Duox) por apresentarem um domínio N-terminal ectoperoxidase na sua região extracelular (EDENS *et al.*, 2001; LAMBETH, 2002). As Duox estão presentes, além da tireóide, em diversos tecidos, como glândulas salivares, mucosa gastrointestinal e epitélio pulmonar, nos quais dão suporte à atividade antimicrobiana das lactoperoxidases (MORAND *et al.*, 2008). A atividade da Duox 1 na geração de H_2O_2 na tireóide ainda não está bem esclarecida e sabe-se que mutações na enzima Duox 2 podem provocar hipotireoidismo, por diminuir a produção de hormônios tireóideos (BEDARD e KRAUSE, 2007). Tanto Duox 1 como 2 necessitam de fatores de maturação, DuoxA1 e DuoxA2, respectivamente, para desempenharem sua atividade (GRASBERGER e REFETOFF, 2006). Para a enzima Duox 2 ter atividade é necessário o fator de maturação DuoxA2, o qual promove a saída

da Duox 2 do retículo endoplasmático e seu transporte para a membrana apical da célula e estabelece um complexo estável com a Duox 2 (MORAND *et al.*, 2008).

Diferentemente da Duox, a TPO é exclusiva da tireóide. Esta peroxidase apresenta no seu grupamento heme o ferro na forma férrica (Fe^{+3}) que, ao reagir com H_2O_2 , se oxida. A enzima, então oxidada, apresenta dois sítios para substrato, um para o I^- e outro para a tirosina. O iodeto sofre oxidação e a organificação do iodo a radicais tirosil forma a monoiodotirosina (MIT) e a diiodotirosina (DIT). A posição 3 do anel aromático da tirosina é iodada formando MIT e, a seguir, pode ocorrer iodação na posição 5, formando DIT (TAUROG *et al.*, 1996).

1.2.3 FORMAÇÃO DAS IODOTIRONINAS

O T3 é formado pelo acoplamento de uma molécula de MIT com uma de DIT e o T4, pelo acoplamento de duas moléculas de DIT (TAUROG *et al.*, 1996). Outras possibilidades de acoplamento entre iodotirosinas, podem formar 3,3',5'-triodotironina reverso (rT3), 3,5-T2, 3,3'-T2 dentre outras que podem continuar sofrendo desiodações (BIANCO *et al.*, 2002). Havendo níveis baixos de iodo aumenta a quantidade relativa de MIT, favorecendo assim, a formação de T3; enquanto a síntese preferencial de T4 ocorrerá em situações nas quais haja maior disponibilidade de iodo (CARRASCO, 2005).

A Tg é recaptada a partir da extensão de microvilos da membrana apical, formando vesículas de endocitose. Estas vesículas se fundem com lisossomos, formando fagolisossomas, nos quais a Tg sofre proteólise, liberando MIT, DIT, T3 e T4. As moléculas de MIT, principalmente, e DIT são desiodadas pela enzima iodotirosina desalogenase 1 (DEHAL 1), isoforma mais expressa na tireóide, presente na vesícula de endocitose da Tg iodada e na membrana apical da célula folicular (GNIDEHOU *et al.*,

2004). Após a desiodação, o iodo, juntamente com a tirosina, podem ser reutilizados pela tireóide. As moléculas de T3 e T4, liberadas após proteólise, são secretadas atingindo a circulação sanguínea (TAUROG *et al.*, 1996).

A difusão dos hormônios tireóideos através da membrana plasmática é, provavelmente, mediada por transportadores. A proteína MCT-8 é capaz de realizar tal transporte, porém sua participação na secreção dos hormônios tireóideos ainda não está comprovada (FRIESEMA *et al.*, 2003; FRIESEMA *et al.*, 2005).

Em humanos, a tireóide secreta T4 em proporção de aproximadamente quinze moléculas para uma de T3 (LARSEN *et al.*, 2008). Há cerca de três ou quatro moléculas de T4 em cada molécula de Tg bem iodada, enquanto apenas uma em cinco moléculas de Tg contém T3. Por esta razão, o T4 é o principal hormônio liberado, mas o T3 é considerado o hormônio metabolicamente ativo, pois a afinidade do receptor nuclear pelo T3 é de 10 a 15 vezes maior do que pelo T4. T4, o pró-hormônio, pode ser convertido a T3 pela enzima 5'-desiodase, que também é estimulada pelo hormônio TSH na tireóide (LARSEN *et al.*, 2008).

Apenas, aproximadamente, 0,03% do T4 total sérico e 0,3% do T3 total sérico encontram-se sob a forma livre (fisiologicamente ativa), enquanto o restante encontra-se ligado a proteínas carreadoras, como a globulina ligadora de tiroxina (TBG), a transtiretina e a albumina (YEN, 2001).

1.3 METABOLISMO PERIFÉRICO DOS HORMÔNIOS TIREÓIDEOS

O T3 não é originário exclusivamente da tireóide; a maior parte do T3 sérico é gerada pela desiodação periférica do T4 através da ação de enzimas 5'-desiodases, as

iodotironinas desiodases (LARSEN *et al.*, 2008). Em indivíduos eutireóideos, a maior quantidade de T4 liberada é desiodada para gerar T3, sendo 70 a 90% da produção de T3 circulante em humanos derivada da desiodação extra-tireóidea do T4 (REFETOFF e NICOLOFF, 1995). A desiodação do T4 também gera outras iodotironinas.

Até há bem pouco tempo, o T3 era considerado o único hormônio tireóideo com atividade biológica, mas vários estudos têm sugerido que este conceito deve ser reavaliado, pois se tem evidenciado que outras tironinas, em particular o T2 (3,5-diiodotironina) apresentam efeitos biológicos (GOGLIA, 2005 *apud* GERESEN *et al.*, 2008).

As iodotironinas desiodases existem em três isoformas diferentes: tipos I, II e III (D1, D2 e D3) e apresentam, em seu sítio catalítico, um aminoácido raro, a selenocisteína, importante para a reação de desiodação, uma vez que a deficiência de selênio leva à diminuição da atividade desiodase (BECKETT *et al.*, 1987; BERRY *et al.*, 1993).

A desiodase tipo I (D1) é uma proteína integral de membrana, localizada na membrana plasmática, facilitando o acesso do T4 circulante à enzima; assim como a exportação do T3 produzido a partir do T4 para o plasma. Esta enzima catalisa a desiodação tanto do anel interno (5 desiodação), como do anel externo (5' desiodação) de T4, gerando rT3 e T3, respectivamente. Esta enzima também promove a desiodação do rT3, levando à formação de 3,3'-T2 (diiodotironina). A D1 é sensível à inibição pelo 6-n-propil-2-tiouracil (PTU), diferentemente da D2 e D3 (LARSEN *et al.*, 2008). É encontrada, em humanos, principalmente no fígado, rins, tireóide e sistema nervoso central (SNC) (REFETOFF e NICOLOFF, 1995). Gereben *et al.*, 2008 afirmam que é encontrada

também na hipófise. Em roedores esta enzima é encontrada no fígado, rins, tireóide, hipófise, SNC, intestino e placenta (BIANCO *et al.*, 2002).

A desidase tipo II, também é uma proteína integral de membrana com localização subcelular no retículo endoplasmático, explicando assim, o rápido acesso, ao núcleo, do T3 gerado pela D2 a partir do T4. Essa diferença de localização entre a D1 (membrana plasmática) e a D2 (retículo endoplasmático) poderia explicar a existência de uma contribuição mínima na geração de T3 intracelular por D1, em contraste com a grande fração gerada pela D2 (BIANCO *et al.*, 2002). A D2 catalisa a 5' desidatção do seu principal substrato, T4, com remoção do iodo do anel externo, formando T3. Assim como a D1, esta enzima também converte rT3 em 3,3'-diiodotironina (T2). Acreditava-se que a principal contribuição fisiológica da D2 era regular os níveis intracelulares de T3 nos tecidos onde a deficiência deste hormônio seria mais crítica (GEREBEN *et al.*, 2008). Todavia, foi sugerido que além da contribuição para a geração de T3 intracelular, a D2 também poderia contribuir para a formação do T3 liberado para a circulação (MAIA *et al.*, 2005).

Bianco *et al.*, em 2002, afirmam que a D2, em humanos, encontra-se na tireóide, cérebro, coração, medula espinhal, placenta e, em quantidades menores, nos rins e pâncreas. Salvatore *et al.*, em 1996, identificaram atividade enzimática da D2 em amostras de músculo esquelético. Já em roedores, é expressa na hipófise e timo de rato, cérebro, coração, tecido adiposo marrom, gônadas, glândula mamária de camundongo e útero de rata preta, apresentando assim expressões espécie-específicas (GEREBEN *et al.*, 2008).

Já a D3, localizada na fração microsomal das células, é frequentemente encontrada no cérebro, na pele e na placenta de ratos adultos e no músculo esquelético,

fígado e intestino de ratos neonatos. Em humanos, a isoforma D3 tem distribuição bastante limitada, estando presente somente na placenta, pele e sistema nervoso central (BIANCO *et al.*, 2002).

A D3 catalisa a 5-desiodação do T4, gerando rT3, sendo esta a principal via de inativação do T4 e de degradação do T3, gerando 3,3'-T2 (LEONARD e VISSER, 1986). Desta forma, a função da D3 é muito importante para promover a proteção dos tecidos quando há excesso de hormônios tireóideos (KÖHRLE, 1999). Na embriogênese, a D3 é fundamental para a homeostase dos hormônios tireóideos, uma vez que a exposição prematura ou em excesso do embrião a estes hormônios pode acarretar mal-formações, retardo mental e alterações no crescimento e morte (GEREBEN *et al.*, 2008).

A regulação da atividade dessas três isoformas depende dos níveis séricos dos hormônios tireóideos. O hipotireoidismo acarreta diminuição da atividade da D1 e da D3, enquanto o hipertireoidismo estimula a atividade dessas duas enzimas. Por outro lado, o hipotireoidismo estimula a atividade da D2 e o hipertireoidismo diminui a atividade da mesma. Sendo assim, pode-se dizer que tanto a D1 como a D3 são reguladas positivamente pelos hormônios tireóideos e que a D2 é regulada negativamente pelos níveis séricos de T3 e T4. A desidase tipo I tireóidea também é estimulada pelo TSH (GEREBEN *et al.*, 2008).

1.4 REGULAÇÃO DA FUNÇÃO TIREÓIDEA

1.4.1 EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-TIREÓIDE

A tireóide, assim como outras glândulas do sistema endócrino, encontra-se sob regulação do eixo hipotálamo-adenohipófise. A função de todo este complexo é regulada

por um modelo básico de retroalimentação negativa envolvendo o hormônio liberador de tireotrofina (TRH) produzido pelo hipotálamo, o hormônio tireotrófico (TSH) produzido pela hipófise e os hormônios tireóideos (T3 e T4) (LARSEN *et al.*, 2002).

A tireotrofina ou hormônio estimulador da tireóide (TSH) é um hormônio glicoprotéico sintetizado e secretado pelos tireotrofos localizados na adenohipófise. Para que o TSH possa influenciar a função tireóidea, é necessário que os tireócitos expressem o receptor para este hormônio. O receptor de TSH (TSH-R) pertence à superfamília dos receptores acoplados à proteína G: Gs e Gq e localiza-se na membrana basal do tireócito, próximo aos capilares sanguíneos ((DUMONT e VASSART, 2001). Quando o TSH se liga ao seu receptor ocorre ativação da adenilato ciclase e, quando em altas concentrações, também há ativação da fosfolipase C (DUMONT e VASSART, 2001). O TSH é o principal regulador da função tireóidea, além de modular positivamente a expressão de muitos genes na tireóide. Fisiologicamente, o TSH estimula, além da captação de iodeto, a oxidação e organificação do iodo aos radicais tirosil da tireoglobulina (Tg); o acoplamento de iodotirosinas; a expressão da tireoperoxidase (TPO), da Tg, do NIS e da NADPH oxidase tireóidea; a geração intracelular de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e a secreção de T3 e T4; efeitos mediados por AMPc (VAISMAN *et al.*, 2004).

O TSH apresenta duas subunidades α e β ligadas não-covalentemente. A subunidade α é comum a outros hormônios glicoprotéicos, como hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo estimulante (FSH) e gonadotrofina coriônica, enquanto a subunidade β apresenta uma seqüência de aminoácidos específica relacionada à ligação do TSH ao seu receptor, conferindo desta forma, sua especificidade biológica. Ambas as subunidades são necessárias para a ação hormonal (LARSEN *et al.*, 2008).

A síntese e secreção do TSH são estimuladas pelo hormônio liberador de tireotrofina (TRH), um tripeptídeo produzido no hipotálamo (UTIGER, 2001). Quando o TRH se liga ao seu receptor nos tireotrofos da adenohipófise, estimula a síntese de ambas as subunidades de TSH, assim como seu processamento pós-traducional. Esses efeitos parecem ser mediados por cálcio (LARSEN *et al.*, 2008).

Existe uma inter-relação entre a tireóide, a adeno-hipófise e o hipotálamo. Variações na disponibilidade dos hormônios tireóideos livres geram um controle por retroalimentação negativa *ou feedback* negativo de alça curta na adenohipófise e de alça longa no hipotálamo. Um eventual aumento nas concentrações séricas de hormônios tireóideos acarreta inibição da produção de TSH pela adenohipófise, um controle por *feedback* negativo de alça curta. Caso ocorra diminuição nas concentrações circulantes de T3 e T4, a inibição da produção de TSH diminui e assim há aumento na sua síntese e secreção estimulando, então, a produção hormonal pela tireóide. O *feedback* de alça longa ocorre com a supressão da produção de TRH no hipotálamo pelos níveis elevados de T3 e T4 na circulação, acarretando um bloqueio da capacidade do TRH de estimular a liberação do TSH pelo tireotrofo. A diminuição nas concentrações séricas de hormônios tireóideos, por sua vez, diminui essa inibição (LARSEN *et al.*, 2008).

Uma inibição adicional da secreção de TSH, exercida nos tireotrofos diretamente pela somatostatina, um peptídeo do hipotálamo, também auxilia a manter os níveis séricos dos hormônios tireóideos na faixa da normalidade (LARSEN *et al.*, 2008).

1.4.2 AUTO-REGULAÇÃO PELO IODO

A função da tireóide é auto-regulada também de acordo com a concentração de iodo disponível. Administrando-se doses crescentes de iodeto a um indivíduo normal, ocorre inicialmente aumento da formação de hormônios tireóideos. Entretanto um

aumento adicional de iodo acarreta em bloqueio relativo da organificação do iodo, o efeito Wolff-Chaikoff, devido aos altos níveis de iodo intra-glandular (LARSEN *et al.*, 2008).

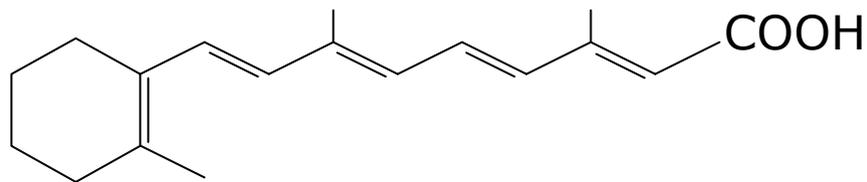
O efeito Wolff-Chaikoff possui, no entanto, uma limitação. Dentre as etapas da síntese hormonal inibidas, está o transporte de iodeto, provavelmente causado pela diminuição da expressão do NIS, o que ocasiona diminuição da concentração intra-tireóidea de iodeto e, assim, retorno aos níveis normais, insuficientes para inibir a organificação. A tireóide volta a produzir as mesmas quantidades de hormônios tireóideos que produzia antes do tratamento, sendo este fenômeno denominado escape do efeito Wolff-Chaikoff (LARSEN *et al.*, 2008).

Parte dos efeitos do iodo sobre a glândula tireóide pode ser revertida por drogas que inibem a sua organificação, sugerindo que o iodo primeiro deva ser organificado para só então, apresentar efeito inibitório. Entretanto, nem todos os efeitos são via iodo organificado. A inibição da secreção hormonal e a diminuição do bócio são exemplos de efeitos que continuam ocorrendo mesmo quando se administra bloqueador da organificação do iodo. Essas ações podem, portanto, ser atribuídas ao próprio iodeto, demonstrando que o efeito inibitório do iodo provavelmente não se dê por um único mecanismo e que várias etapas da síntese e secreção hormonal são afetadas de maneira diferente pelo iodo (PISAREV, 1985).

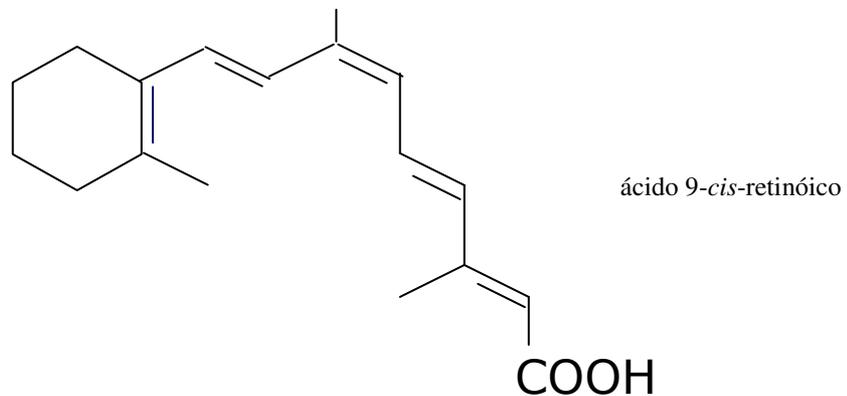
1.5 ÁCIDO RETINÓICO E SEUS RECEPTORES

O ácido retinóico (AR), um metabólito ativo da vitamina A, é encontrado na forma dos isômeros *All-trans*-AR (tretinoína), *13-cis*-AR (isotretinoína) e *9-cis*-AR (FIGURA 1). A isoforma *9-cis*-AR deriva da isomerização espontânea do *All-trans*-retinol e *All-trans*-AR

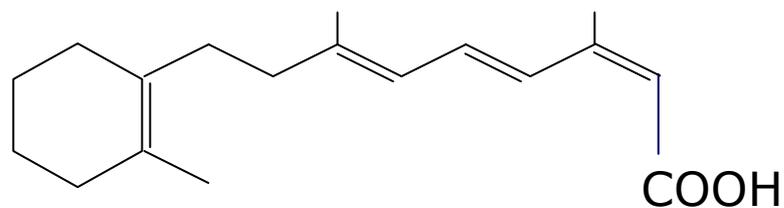
(URBACH e RANDO, 1994; WOLF, 2006). Estes isômeros agem através da ligação aos seus receptores nucleares que, atuando como fatores de transcrição dependentes de ligante, modulam a expressão dos genes responsivos ao AR (MARCUS e COULSTON, 2000).



Ácido All-*trans*-retinóico



ácido 9-*cis*-retinóico



ácido 13-*cis*-retinóico

FIGURA 1 - Isômeros do ácido retinóico (AR) (Fonte: NAPOLI, 1999).

O AR é translocado para o núcleo por proteínas celulares de ligação ao ácido retinóico (CRABP I e II) (MARILL *et al.*, 2001), onde se liga a dois grupos de receptores, o receptor de ácido retinóico (RAR) e o receptor retinóide X (RXR), pertencentes à superfamília de receptores nucleares, que incluem o receptor do hormônio tireóideo (TR)

e o receptor da vitamina D (VDR) (FELIG *et al.*, 1995). Tanto RAR como RXR apresentam os subtipos α , β e γ que se diferenciam na região N-terminal; esses subtipos possuem diferentes isoformas (GERMAIN *et al.*, 2006a). As isoformas dos receptores RAR e RXR formam homo e heterodímeros. O AR liga-se ao receptor RAR, que pode formar heterodímeros com RXRs, e este último é capaz de formar homodímeros e heterodímeros com diversos outros receptores da superfamília de receptores nucleares (FIGURA 2) Após a ligação do AR ao receptor, ocorre ativação da transcrição gênica. Os heterodímeros se ligam aos elementos responsivos ao AR (RARE) na região promotora dos genes regulados pelo AR (NAPOLI, 1999; ESPOSITO *et al.*, 2007).

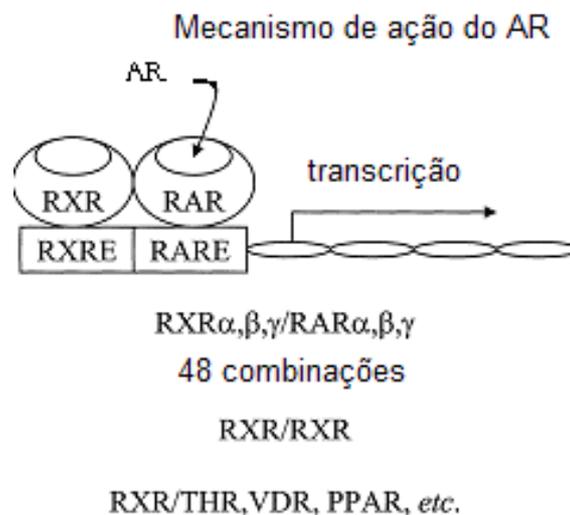


FIGURA 2 - Dimerização dos receptores de AR. Receptores de AR (RAR) formam heterodímeros com receptores de retinóide X (RXR). A ligação do AR ao RAR regula a transcrição gênica. RXR forma heterodímeros com outros receptores nucleares (Fonte: NAPOLI, 1999).

A isoforma *All-trans*-AR liga-se exclusivamente ao RAR e *9-cis*-AR liga-se com maior afinidade ao RAR do que ao RXR (GERMAIN *et al.*, 2006a), embora alguns autores afirmem que *9-cis*-AR, um isômero do *All-trans*-AR, tem grande afinidade tanto pelo RXR α , como pelo RXR β e RXR γ (ROWE *et al.*, 1991; YU *et al.*, 1991; HEYMAN *et al.*,

1992; LEID *et al.*, 1992; LEVIN *et al.*, 1992; MANGELSDORF *et al.* 1992 *apud* GERMAIN *et al.*, 2006b). Contudo, na presença do *All-trans-AR*, quase não foi detectado o isômero *9-cis-AR* em células de mamíferos (GERMAIN *et al.*, 2006b). Já a isotretinoína (*13-cis-AR*) tem pouca ou nenhuma afinidade quer para a CRABP quer pelos receptores (MARILL *et al.*, 2001), não interagindo com nenhum dos receptores; entretanto, *in vivo*, isomeriza-se espontaneamente a *All-trans-AR* e *9-cis-AR* e, portanto, ativa indiretamente tanto RAR, quanto RXR (BREEN *et al.*, 1997; MARCUS e COULSTON, 2000). O *13-cis-AR* tem alta atividade biológica, mas possui baixa afinidade pelos receptores RAR e RXR, sendo considerado uma pró-droga, por isomerizar-se a *All-trans-AR* (TSUKADA *et al.*, 2000; ZOUBOULIS, 2001a). Schroeder e colaboradores (2007) compararam o *13-cis-AR* ao *All-trans-AR* e verificaram que os efeitos biológicos desses isômeros podem diferir muito em cultura de células de queratinócitos, como no tratamento da psoríase e da acne. Tsukada e colaboradores (2000), estudando a isomerização do isômero *13-cis-AR* em cultura de células sebáceas humanas, verificaram que o tratamento com *13-cis-AR* levou a baixas concentrações deste isômero na célula, enquanto os níveis intracelulares do *All-trans-AR* aumentavam com o tempo. Porém o tratamento com o isômero *13-cis-AR* em cultura de queratinócitos resultou no aumento intracelular desse isômero e na baixa isomerização ao *All-trans-AR*, sugerindo, assim, que a isomerização do *13-cis-AR* parece ser específica de cada tecido, como, no caso, células sebáceas. Esses autores, portanto, confirmam a relação dos isômeros *13-cis-AR* e *All-trans-AR* como pró-droga e droga. Contudo, Ishikawa e colaboradores (2008) demonstraram que o uso do *13-cis-AR* foi capaz de alterar a morfologia de neurônios serotoninérgicos de ratos em cultura e que o uso de antagonistas de RAR bloqueia parcialmente o efeito do *13-cis-AR* nessas células, enquanto antagonistas de RXR bloqueiam completamente esse efeito; sugerindo, dessa

forma, que o isômero 13-*cis*-AR tem ação em ambos os receptores, RAR e RXR, porém essa ação depende da expressão dos subtipos dos receptores nos tecidos.

Desde a década de 70, os isômeros do AR vêm sendo utilizados na terapia dermatológica e oncológica. A isotretinoína (13-*cis*-AR) foi introduzida na terapia da acne em 1979, sendo aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em 1982 (SAMPAIO e RIVITTI, 2000). Peck e colaboradores (1979) demonstraram que o isômero 13-*cis*-AR foi o único retinóide capaz de manter seu efeito mesmo após a suspensão do tratamento da acne sendo, inclusive, menos tóxico que o *All-trans*-AR e, em estudos clínicos, demonstrou baixa toxicidade.

O principal uso clínico do AR, porém, é na terapia da leucemia promielocítica aguda (APL) com o isômero *All-trans*-AR (KAGECHIKA e SHUDO, 2005). Breitman *et al.*, 1980, estudando o efeito dos retinóides em células derivadas de paciente com APL (HL-60), verificaram que o isômero *All-trans*-AR era capaz de reduzir a proliferação dessas células e que tanto *All-trans*-AR como 13-*cis*-AR eram capazes de rediferenciar os promielócitos, sendo o *All-trans*-AR mais potente do que os demais retinóides.

Dessa forma, o AR, usado inicialmente por seu efeito rediferenciador e antiproliferativo em vários tipos de tumores (GRAF *et al.*, 1995 *apud* LOTAN, 1996), incluindo câncer de pele, mama, pulmão, trato digestivo, pâncreas, fígado e câncer de próstata (LOTAN, 1996), tem sido recentemente utilizado no tratamento de carcinoma de tireóide, principalmente o isômero 13-*cis*-AR (GRÜNWALD *et al.*, 1998; SIMON *et al.*, 1998; GRÜNING *et al.*, 2003).

Os retinóides podem influenciar a expressão dos receptores para certos hormônios e fatores de crescimento, influenciando assim o crescimento, a diferenciação e a função das células-alvo por ações diretas ou indiretas (MARCUS e COULSTON, 2000). Os

retinóides desempenham, assim, um papel crucial no controle da proliferação e diferenciação de células epiteliais normais e inibem processos neoplásicos em vários órgãos, já que alterações da atividade do receptor nuclear estão associadas com neoplasias. Os isômeros do AR, além de inibir a proliferação de células, induzem apoptose em diversos tipos de tumor (UNTERHOLZNER *et al.*, 2006).

Em tratamentos dermatológicos, os efeitos provocados nos queratinócitos pelos isômeros *All-trans-AR* e *13-cis-AR* na diferenciação celular e modulação da inflamação, com algum impacto no sistema imune, ocorre através de seus receptores RAR e RXR, sendo as principais isoformas na pele humana RAR α e RAR β (THACHER *et al.*, 2000; SCHROEDER e ZOUBOULIS, 2007).

1.6 ÁCIDO RETINÓICO E CARCINOMA DA TIREÓIDE

O carcinoma da tireóide corresponde a aproximadamente 1% de todos os carcinomas e é considerada a neoplasia endócrina maligna mais freqüente (COELHO *et al.*, 2004; HAUGEN e cols, 2004).

O câncer de tireóide se divide em quatro tipos: papilífero, folicular, medular e anaplásico. Os cânceres não-medulares da tireóide, do tipo papilífero e folicular, são classificados como diferenciados, correspondendo a 75 a 85% e 10 a 20% dos casos de câncer, respectivamente; enquanto o câncer anaplásico, corresponde a menos de 5% dos casos. Os dois primeiros apresentam, em geral, bom prognóstico após tratamento adequado, normalmente com a combinação dos efeitos da cirurgia, radioiodoterapia e terapia supressora de TSH. Entretanto, 20 a 40% dos pacientes têm recidiva tumoral e, em até 30% dos casos, ocorre perda da diferenciação celular. Nos carcinomas papilífero e

folicular as propriedades do tireócito podem permanecer normais, mas já foi demonstrada diminuição da expressão do NIS, da expressão e atividade da TPO e da desidase tipo 1 (SIMON *et al.*, 2002). No carcinoma papilífero também há diminuição da expressão de Tg (ELISEI *et al.*, 2005). Já para os carcinomas medular (de células parafoliculares) e anaplásico (indiferenciado), caracterizados pela falta de função e propriedades tireóide-específicas, as opções terapêuticas são limitadas e pouco eficazes (COELHO *et al.*, 2004).

A capacidade da glândula tireóide em acumular iodo radioativo é essencial para o tratamento eficaz do câncer de tireóide por radioiodoterapia (SCHMUTZLER *et al.*, 1997). O câncer diferenciado de tireóide tem sido tratado pelo uso da terapia com radioiodo (^{131}I) por mais de 40 anos (KOGAI *et al.*, 2000). O ^{131}I é administrado oralmente, absorvido, passa para a circulação sanguínea e é transportado pelo NIS para o interior da tireóide (KOGAI *et al.*, 2000). Todavia, os tumores podem perder a capacidade de captar iodeto, devido à desdiferenciação, inviabilizando a radioiodoterapia (SCHMUTZLER *et al.*, 1997). Diversos estudos têm apresentado decréscimo na expressão do NIS em adenomas da tireóide e carcinomas, o que contribui para a perda da captação de iodo em células neoplásicas da tireóide. Os pacientes desenvolvem uma doença agressiva com recidiva local e até metástases, com perda progressiva da capacidade de captar iodo (ELISEI *et al.*, 2005).

Há um grande interesse em estudar o efeito do AR sobre a carcinogênese, devido a sua capacidade de controlar a diferenciação e proliferação celular. Estudos recentes, *in vitro*, têm mostrado que os isômeros do ácido retinóico (AR) podem ser úteis para induzir a rediferenciação da célula tireóidea no carcinoma de tireóide, como evidenciado pelo aumento da expressão de tireoglobulina, receptor de TSH, 5' desidase tipo I (SCHRECK

et al., 1994; SCHMUTZLER *et al.*, 1996; KOGAI *et al.*, 2000), fosfatase alcalina e co-transportador sódio-iodeto (SCHMUTZLER *et al.*, 1997), e pelo incremento da captação de iodo (^{131}I) pela célula tumoral com o uso do isômero 13-*cis*-AR (VAN HERLE *et al.*, 1990); sendo o isômero 9-*cis*-AR o menos potente nessas funções (SCHRECK *et al.*, 1994). Além de estudos experimentais, estudos clínicos, como o realizado por COELHO *et al.*, em 2004, demonstram efeito benéfico do 13-*cis*-AR, com aumento significativo da captação de iodo e regressão tumoral em parte dos pacientes com carcinoma não captante de iodo submetidos ao tratamento com AR (SIMON *et al.*, 1996; GRÜNWALD *et al.*, 1998; SCHMUTZLER, 2001; COELHO *et al.*, 2003). Em 20 a 50% dos pacientes que não respondiam ao tratamento com radioiodoterapia, o tratamento com AR foi benéfico, re-estimulando a captação de iodo e levando à regressão do tumor por induzir a apoptose ou, pelo menos, estabilizar seu crescimento, inibindo a mitose (COELHO *et al.*, 2004). A indução de apoptose foi verificada em cultura de tireócitos de porco, onde se observou que os retinóides também reduzem a formação de folículos Tg-imunorreativos (FROHLICH *et al.*, 2001). Já a ação antiproliferativa do AR foi demonstrada por Van Herle *et al.* em 1990, em linhagem de células de carcinoma folicular metastásico, que observaram redução significativa e dose-dependente do número de células e da síntese de DNA com exposição ao 13-*cis*-AR. Del Senno e cols, em 1993, também encontraram resultado antiproliferativo semelhante em cultura de células obtidas a partir de amostras de tecido tireóideo humano normal e adenomatoso expostas ao All-*trans*-AR.

A captação de iodo pelo NIS exerce um papel fundamental para diagnóstico e terapia dos carcinomas de tireóide e suas metástases, sendo útil para a terapia com radioiodo em tumores extratireóides (DAÍ *et al.*, 1996). No câncer de tireóide e mama, o uso do All-*trans*-AR aumenta a expressão do NIS nos tecidos e aumenta captação de

iodo, viabilizando ou otimizando a terapia com iodo radioativo (ALOTAIBI *et al.*, 2006, UNTERHOLZNER *et al.*, 2006, WILLHAUCK *et al.*, 2007). A indução do NIS por retinóides seguido por tratamento com radioiodoterapia tem sido uma escolha terapêutica com grande potencial para diversos tumores (KOGAI *et al.*, 2008); sendo que, segundo Ohashi e colaboradores (2009), essa indução parece ser decorrente da ligação do isômero *All-trans-AR* nos receptores RAR β e RXR α .

A terapia com AR é bem tolerada e os efeitos adversos mais freqüentes são alteração de pele e mucosas, como ressecamento e prurido, além de hipertrigliceridemia (COELHO *et al.*, 2004).

Contudo, os efeitos de rediferenciação do AR na terapia de câncer requerem receptores intactos de AR nos tecidos tumorais. Os receptores do AR são expressos diferentemente nos diversos tipos de carcinomas (HAUGEN *et al.*, 2004). Na leucemia promielocítica encontra-se transcrição aumentada do receptor RAR γ , sendo a leucemia promielocítica o modelo mais clássico de terapia com AR, segundo Haugen e colaboradores (2004). Ainda conforme estes autores, a isoforma RXR γ não é expressa na glândula tireóide normal, mas é amplamente expressa no carcinoma tireóideo. Além disso, em linhagens tumorais de células tireóideas, o RNAm de RXR β não é detectado segundo Simon e colaboradores (2002). A redução da expressão de RNAm de RAR β também tem sido observada em vários cânceres (GEISEN *et al.*, 1997). Em 2005, Elisei *et al.*, estudando células cancerosas da tireóide, demonstraram que a isoforma RAR β tem um papel antioncogênico, estando ausente em vários tipos de câncer, como da cavidade bucal, pulmonar, mamário e esofágico, e no câncer folicular de tireóide sua expressão apresenta-se diminuída em relação à tireóide normal. Ainda neste estudo, o tratamento com *All-trans-AR* ocasionou inibição do crescimento de células tireóideas, que pode estar

sendo mediada pelo RAR β , uma vez que o tratamento com ácido retinóico é capaz de aumentar a expressão do RAR β , sugerindo que a ausência dessa isoforma possa ser um dos fatores responsáveis pela resistência das células tumorais ao ácido retinóico, explicando o fato do tratamento com AR ser ineficaz em pacientes com tumores avançados (ZANGH *et al.*, 1996). A ausência da expressão do RAR β foi descrita como sendo provocada por metilação do DNA, sendo que novos estudos, em linhagem de células de tumores tireóideos desdiferenciados, afirmam que isso pode ser revertido com agentes desmetilantes que seriam capazes de induzir a expressão do RNAm de RAR β (MIASAKI *et al.*, 2008; VIVALDI *et al.*, 2009). Recentemente, também foi relatado que em carcinomas de tireóide há aumento da expressão de receptores citoplasmáticos RAR α , RAR γ , RXR β e diminuição da expressão dos receptores nucleares RAR β , RAR γ e RXR α (HOFTIJZER *et al.* 2009). Isto posto, sugere-se que diferenças na expressão de subtipos de receptores e de sua localização subcelular possam ser de grande valia para o diagnóstico diferenciado de câncer de tireóide. Estes estudos sugerem, portanto, que os receptores para AR podem ser afetados ou mesmo estar envolvidos na carcinogênese tireóidea (GEISEN *et al.*, 1997; HAUGEN *et al.*, 2004; ELISEI *et al.*, 2005).

1.7 ÁCIDO RETINÓICO E FUNÇÃO TIREÓIDEA NORMAL

A isotretinoína (13-*cis*-AR), administrada por via oral, tem sido, atualmente, prescrita de forma abusiva para tratamento dermatológico, inclusive para casos de acne vulgar, para a qual não é indicada.

A par deste fato e sabendo que os isômeros do AR têm ação no câncer de tireóide, surge a dúvida se em pacientes que fazem uso do ácido retinóico haveria algum

efeito colateral sobre a tireóide, uma vez que o uso de algumas drogas pode afetar essa glândula, levando a disfunções tireóideas.

O tratamento com *All-trans-AR*, muito utilizado para psoríase, diminui, embora temporariamente (1 mês de tratamento), os níveis de TSH sérico. Prolongando-se o tratamento, os níveis do hormônio retornam a valores basais, normalizando, inclusive, a resposta ao TRH. Porém, os níveis de T3 permanecem diminuídos, enquanto o T4 não é afetado (ANGIONI *et al.*, 2005). Isto sugere que o uso de retinóides possa afetar o metabolismo dos hormônios tireóideos, conforme verificado em experimentos *in vitro*, em que retinóides, como o *All-trans-AR* e o *9-cis-AR*, mostraram-se capazes de aumentar a expressão do gene da desidase tipo I em células com câncer de mama (GARCIA-SOLES e ACEVES, 2003) e em linhagens de células tumorais da tireóide com o uso também, do isômero *13-cis-AR* (SCHRECK *et al.*, 1994; SCHMUTZLER *et al.*, 2004).

Assim, o amplo uso do AR, por induzir o aumento da expressão do NIS e o aumento da captação de iodeto em tumores, inclusive em câncer de tireóide (KOGAI *et al.*, 2000; TANOSAKI *et al.*, 2003; KOGAI *et al.*, 2004; WAPNIR *et al.*, 2004; UNTERHOLZNER *et al.*, 2006; ALOTAIBI *et al.*, 2006), reforça a idéia de que o AR possa ter efeitos diretos e indiretos na tireóide normal. Sabe-se que o TSH regula a captação de iodeto na tireóide e que, na mama, a expressão do NIS é regulada pelos hormônios estrogênio, prolactina e ocitocina (WAPNIR *et al.*, 2004) e que o *All-trans-AR* pode aumentar a captação de iodo pelo NIS na glândula lactante e no câncer de mama (WILLHAUCK *et al.*, 2007). Assim, Wapnir e colaboradores, em 2004, estudando o carcinoma de mama, propõem o uso concomitante de T3 com o *All-trans-AR* com o objetivo de inibir a liberação de TSH pela hipófise e, assim, ocorrer *down-regulation* da expressão do NIS na tireóide e a terapia com iodo radioativo ser mais direcionada para a

glândula mamária. Van Santen *et al.*, em 2003, também tentaram preservar a função da tireóide utilizando drogas para inibir a liberação de TSH e, assim, tratar seus pacientes com neuroblastoma com ^{131}I metaiodobenzilguanidina associado ao AR. Estes estudos realizados *in vitro* e *in vivo* presumem que haja necessidade de TSH para o AR ter efeito sobre a tireóide, mas não se detêm na possibilidade de que o AR possa exercer efeitos diretos, independentes de TSH, na glândula normal e afetá-la de algum modo. Sendo assim, são necessários estudos dos efeitos do AR sobre a tireóide normal.

Diversos estudos com cultura de células tumorais e estudos em humanos com carcinomas diferenciados foram realizados, porém poucos autores avaliaram os efeitos do AR sobre células normais. Um dos estudos que demonstra os efeitos do AR sobre cultura de células normais de tireóide foi realizado por Del Senno *et al.*, em 1993. Neste estudo foi demonstrado que o isômero *All-trans-AR* tem atividade antiproliferativa em cultura de células normais e tumorais.

Segundo alguns estudos, o AR também interfere com o eixo hipotálamo-hipófise-tireóide. A ligação específica do AR ao receptor RXR pode ocasionar diminuição do nível sérico de TSH, redução da resposta do TSH ao TRH e, conseqüentemente, hipotireoidismo central em ratos (LIU *et al.*, 2002). Coya *et al.*, em 1997, descreveram que o AR inibe a resposta do TSH ao TRH em ratos eutiróideos e hipotireóideos que receberam TRH. No entanto, não há na literatura qualquer estudo, *in vivo*, referente à investigação de efeitos do AR sobre a função tireóidea normal. Sendo assim, mais estudos nesta área devem ser realizados com o objetivo de investigar se o uso de AR exerce algum efeito sobre a tireóide normal.

Estudos realizados em nosso laboratório (SOUZA, 2008) demonstraram que linhagens de células tireóideas normais de ratos (PCCL3) expressam a maioria dos

receptores de AR, com exceção do RAR γ , estando todos localizados no núcleo, exceto o RAR β . Como a expressão dos receptores de AR parece ser diferente em células tireóideas normais e tumorais, cabe ressaltar a importância de verificar se os tratamentos, até mesmo estéticos, com ácido retinóico podem afetar de alguma forma a função tireóidea.

Tendo em vista que tanto o isômero *All-trans*-AR como o *13-cis*-AR são amplamente utilizados em tratamentos dermatológicos e oncológicos, ambos os isômeros foram usados no presente estudo.

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a influência do tratamento com os isômeros do ácido retinóico, ácido 13-*cis*-retinóico e ácido *All-trans*-retinóico, sobre a função tireóidea *in vivo*.

2.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o efeito dos isômeros de ácido retinóico sobre a massa corporal, peso das glândulas tireóide e hipófise de ratos alimentados *ad libitum*;
- Avaliar se a administração dos isômeros é capaz de influenciar as concentrações séricas de T3 e T4 totais e TSH;
- Analisar os efeitos dos isômeros sobre a atividade das enzimas desidases tipo I na tireóide, rim, fígado e hipófise e tipo II na hipófise;
- Avaliar se os isômeros têm efeito sobre a função do co-transportador Na^+/I^- (NIS) e a atividade da enzima tireoperoxidase (TPO) de oxidação do iodeto;
- Avaliar se os isômeros afetam a organificação do iodo e a atividade de geração de H_2O_2 pela enzima Duox.

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar*, machos adultos (250 a 400g), mantidos sob condições de temperatura ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) e ciclo claro/escuro (12h/12h, com ciclo claro iniciando às 19h) controlados. Os animais, pesados semanalmente, receberam água e alimentação *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados após aprovação do protocolo pela Comissão de Ética em Pesquisa com o Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob o número de protocolo IBCCF078.

3.2 TRATAMENTO COM ÁCIDO RETINÓICO

Os ratos foram divididos nos seguintes grupos experimentais: controle (animais que receberam o veículo DMSO 4% (Sulfóxido de dimetil, Hybri-Max®, Sigma Chemical CO) em Propilenoglicol (P.A., VETEC Química Fina Ltda)), animais tratados com o isômero do ácido retinóico *All-trans-AR* ou tretinoína, e animais tratados com o isômero 13-*cis-AR* ou isotretinoína (Sigma Chemical Co.). Foram administrados, por via subcutânea, doses de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e de 1,5mg/kg de peso corporal diariamente por 14 ou 28 dias e por 7 ou 28 dias, respectivamente. A menor dose foi administrada de acordo com estudos realizados por Coya *et al.* (1997).

A dose de 1,5mg/kg de peso corporal, correspondente à dose utilizada em alguns pacientes com câncer diferenciado de tireóide e no tratamento dermatológico, foi administrada posteriormente para avaliarmos os possíveis efeitos do AR em alguns

parâmetros da função tireóidea em um tratamento subagudo (7 dias) ou prolongado (28 dias).

3.3 SACRIFÍCIO

Ao término do tratamento, os animais foram sacrificados por decapitação. As tireóides e as hipófises foram excisadas e pesadas. As tireóides, fígados, rins e hipófises excisados foram armazenados a -80° C para posterior análise das atividades das desidases.

O sangue foi coletado no momento do sacrifício e o soro armazenado a -20° C para posterior realização de dosagens hormonais por radioimunoensaio (RIE), conforme descrito a seguir.

3.4 CONTEÚDO TIREÓIDEO DE RADIOIODO

À metade dos animais administrou-se, i.p, ^{125}I (37000 Bq, Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra) 15 minutos ou 2 horas antes de serem sacrificados. As tireóides removidas foram limpas e pesadas. A radioatividade das glândulas foi medida usando um contador gama automático de fase sólida (*Wallac WizardTM 1470 automatic gamma counter*) e expressa como o percentual da dose de ^{125}I administrada por mg de tireóide.

3.5 RADIOIMUNOENSAIOS

3.5.1 T3 e T4

Os níveis séricos de T3 e T4 totais foram determinados através de *kit* comercial para RIE de T3 (DLS – 3100 Active®, Texas, EUA) e T4 (DLS – 3200, Active®, Texas, EUA), contendo anticorpos específicos aderidos à parede dos tubos de polipropileno. As curvas padrão foram realizadas com T3 e T4 diluídos em soro de rato livre de iodotironinas (soro zero) nas concentrações de 25 a 1000ng/dL e 1 a 50µg/dL, respectivamente. Para o kit de T3 os coeficientes de variação intra- e inter-ensaio foram 6,0% e 7,4%, respectivamente e o limite de sensibilidade do ensaio foi de 4,3ng/dL, usando volume de 50µL por amostra. Para o kit de T4 os coeficientes de variação intra- e inter-ensaio foram 7,4% e 5,1%, respectivamente e o limite de sensibilidade do ensaio foi de 0,4µg/dL, usando volume de 25µL por amostra. Todo o procedimento foi realizado seguindo-se as recomendações do fornecedor. Os resultados foram expressos em ng/dL para o T3 e em µg/dL para o T4.

3.5.2 TSH

A determinação dos níveis séricos de TSH foi realizada por RIE específico, através de um *kit* fornecido pelo “*National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney Diseases* (NIDDK – Bethesda, EUA). Este *kit* é composto por TSH murino purificado para preparação dos padrões utilizados para a construção da curva padrão (0,625 a 25 ng/mL), TSH murino purificado para ser radioiodado e anticorpo de coelho anti-TSH murino (1º anticorpo). A iodação da molécula do TSH com ¹²⁵I foi realizada em nosso laboratório, pelo método da cloramina T, sendo a molécula marcada purificada em coluna de Biogel (Biogel-P60 fino da Bio-rad, EUA), conforme previamente descrito (ORTIGA, 1992). O RIE

foi realizado pelo método do 2º anticorpo (anti-rabbit IgG, SIGMA), com adição de 6% de polietilenoglicol (PEG). Os coeficientes de variação intra- e inter-ensaio foram 7,7 e 6,5%, respectivamente, e o limite de sensibilidade do ensaio foi de 0,625 ng/mL. Os resultados foram expressos em ng/mL.

3.6 ATIVIDADE DA ENZIMA TIREOPEROXIDASE (TPO)

A extração da TPO de tireóides murinas e a medição da atividade de oxidação do iodeto da TPO foram realizadas como descrito por Moura *et al.*, em 1987 e Carvalho *et al.*, em 1994. Cada tireóide foi homogeneizada em 500µl de tampão Tris-HCl 50mM, pH 7,2, contendo iodeto de potássio 10^{-3} M, utilizando-se homogeneizador elétrico (Ultra-Turrax T-25, Ika-Labortechnik). Os homogeneizados foram centrifugados a 200.000xg, 4°C por 35 minutos e o precipitado foi ressuspensão em solução de digitonina 1% e mantido a 4°C em câmara fria por 24 horas. A seguir, foi realizada uma nova centrifugação nas mesmas condições e o sobrenadante contendo a TPO pseudo-solubilizada foi utilizado nos ensaios de medida da sua atividade. O conteúdo de proteína da amostra foi medido através do método de Bradford (1976).

A atividade de oxidação do iodeto da TPO foi medida como descrito anteriormente (MOURA *et al.*, 1987; CARVALHO *et al.*, 1994). Para tal, volumes crescentes da preparação contendo TPO (10 a 100µL) foram adicionados a uma cubeta contendo iodeto de potássio 24mM, glicose 11mM e tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4, em volume final de 2ml. A seguir, foram adicionados 10µl de glicose oxidase 1mg/ml (Boehringer Grade I) para iniciar a reação. A absorbância (A) decorrente da geração de tri-iodeto (I_3^-) foi medida em espectrofotômetro (Hitachi U-3300), no comprimento de onda de 353nm

durante 4 minutos. O cálculo da atividade foi feito a partir da variação da absorbância por minuto, em função do volume de amostra utilizado, através do cálculo da inclinação da reta de regressão, como exemplificada na figura 3.

A atividade específica foi obtida dividindo-se a atividade de oxidação do iodeto ($\Delta\text{abs}_{353\text{ nm}}/\text{min}$ por mL) pela concentração de proteína (g/mL) de cada amostra. A atividade específica da enzima foi expressa em U/g (1 unidade de atividade TPO corresponde à $\Delta\text{abs}_{353\text{ nm}}/\text{min} = 1,0$).

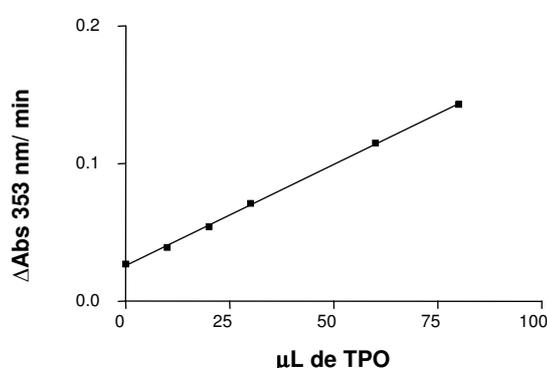


FIGURA 3 - Medida da atividade da TPO pelo método de oxidação do iodeto. A atividade da TPO foi avaliada através da equação da reta de regressão linear feita a partir dos pontos obtidos como exemplificado. $y = a + bx$, onde b é o coeficiente de inclinação da reta e corresponde ao $\Delta\text{abs}_{353\text{nm}}/\text{min}/\mu\text{L}$ de TPO (FERREIRA *et al.*, 2005).

3.7 ATIVIDADE DAS ENZIMAS IODOTIRONINAS DESIODASES TIPO I (D1) E TIPO II (D2)

Foram determinadas as atividades da desiodase tipo I (no fígado, rim, glândula tireóide e hipófise) e da desiodase tipo II (na hipófise) pelo método previamente publicado por Berry e colaboradores (1991) e adaptado por Antonio Carlos Bianco e Peer Reed Larsen (comunicação pessoal).

3.7.1 PROCESSAMENTO DOS TECIDOS

Para a mensuração da atividade da D1, as amostras de fígado e rim, foram pesadas em balança digital (Precision advanced) e homogeneizadas em solução tampão fosfato -sucrose-DTT (0,25 M de sucrose e 10 mM de DTT em 100mM de fosfato de sódio com 1mM de EDTA, pH 6,9) (25 mg de tecido em 1mL). Para as amostras de tireóide e hipófise, cada glândula foi processada em 500µL do mesmo tampão. Para a mensuração da atividade da D2, a glândula hipófise foi processada em 500µL de tampão. Os tecidos foram homogeneizados, em gelo, em Ultra-turrax T25 (Ika-Labortechnik) e, após essa etapa, foram colocados em tubos eppendorf e armazenados a -70 °C até o dia do ensaio. Alíquotas de 20µL foram guardadas separadamente, a -20 °C, para dosagem de proteínas pelo método de Bradford (1976). As amostras foram solubilizadas com NaOH 2,5N pelo menos 30 minutos antes da dosagem (em duplicata) e a albumina bovina sérica (BSA – SIGMA, MO, EUA) foi utilizada para a construção de uma curva padrão.

3.7.2 PURIFICAÇÃO DO ^{125}I -rT3 E ^{125}I -T4

Antes da dosagem da atividade da D1 e D2 foi necessário purificar o traçador radioativo em virtude do decaimento radioativo e da desiodação das iodotironinas marcadas, mesmo na ausência das enzimas. Esta etapa minimiza possíveis interferências de desiodação inespecífica. Para isso, utilizamos uma coluna de 2,5mL de SephadexTM LH-20 (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) (4 mL de H₂O/ g de gel seco) para purificar tanto o ^{125}I -rT3 (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Inc., Boston, MA) para o ensaio da atividade da D1, quanto o ^{125}I -T4 (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Inc., Boston, MA) para o ensaio da atividade da D2. Uma alíquota de 70µL da 3,3',5'-Triiodotironina reversa marcada, com atividade de 1210µCi/ µg (44,8MBq/ µg) para o ensaio de atividade

da D1 ou da tiroxina marcada, com atividade específica de $1250\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ ($46,3\text{MBq}/\mu\text{g}$) para o ensaio de atividade da D2 foi diluída em 12mL de H_2O Milli Q e adicionada à coluna. Desprezou-se o eluato, pois o rT3 ou o T4 radioativo ficam retidos na trama da coluna. Após essa etapa, a coluna foi lavada com 6mL de H_2O Milli Q e posteriormente, as iodotironinas foram eluídas com 9 alíquotas de 500 μL de etanol 70%. Alíquotas de 5 μL foram retiradas para contagem da radioatividade em contador gama automático (*Wallac WizardTM 1470 automatic gamma counter*), sendo selecionadas as amostras com máxima radioatividade para as determinações de atividade das desidases.

3.7.3 ENSAIO DE ATIVIDADE DA D1

Para a dosagem da atividade da D1, foram adicionados a tubos eppendorf novos, na seguinte ordem: tampão (100mM fosfato de sódio, 1mM EDTA, pH 6,9) em volume calculado para um volume total de reação de 300 μL , 10 mM de ditioneitol (DTT, cofator da enzima) (*USB*), 1 μM de rT3 frio e, por último, foi adicionado o volume de homogeneizado contendo 30 μg de proteína para fígado, rim e tireóide, e 150 μg para hipófise. A reação foi iniciada com a adição de 50 μL do ^{125}I -rT3 purificado, contendo 50000 cpm, seguindo-se incubação por uma hora a 37 °C. Decorrido o tempo de incubação, os tubos foram colocados no gelo para parar a reação e foram, então, adicionados 200 μL de soro fetal bovino (*Cultilab, BR*) e 100 μL de ácido tri-cloro acético (TCA) 50% para a precipitação das proteínas. Em seguida, os tubos foram agitados vigorosamente no vórtex por 2 minutos e então centrifugados a 8000xg por 3 minutos. Após a centrifugação transferiu-se 360 μL do sobrenadante de cada tubo para tubos de polipropileno e a emissão de partículas γ foi medida no contador gama automático de fase sólida (*Wallac WizardTM 1470 automatic*

gamma counter). A atividade da enzima foi expressa em pmoles de $rT3 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína (MARASSI *et al.*, 2007).

3.7.4 ENSAIO DE ATIVIDADE DA D2

Para a dosagem da atividade da D2 hipofisária foram adicionados, a tubos eppendorfs novos, na seguinte ordem: tampão (100mM fosfato de sódio, 1mM EDTA, pH 6,9) em volume calculado para um volume total de reação de 300 μ L, 20mM ditioneitol (DTT) (USB), 1nM T4 frio, 10 mM PTU (para inibição da D1) e por último foi adicionado o volume de homogeneizado do tecido contendo 150 μ g de proteína para hipófise. A reação foi iniciada com a adição de 100 μ L do ^{125}I -T4, contendo 100.000 cpm, e posterior incubação a 37 °C por 3 horas. Decorrido o tempo de incubação, os tubos foram colocados no gelo para parar a reação. Foram adicionados 200 μ L de soro fetal bovino (Cultilab, BR) e 100 μ L de ácido tri-cloro acético (TCA) 50% para a precipitação das proteínas. Em seguida, os tubos foram agitados vigorosamente no vórtex por 2 minutos e então centrifugados a 8000xg por 3 minutos. Após a centrifugação, 360 μ L do sobrenadante foram transferidos para tubos de polipropileno e a emissão de partículas γ foi medida no contador gama automático de fase sólida (*Wallac WizardTM 1470 automatic gamma counter*).

A atividade da enzima foi expressa em fmoles de T4. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína.

Tubos contendo excesso de T4 frio (100 μ M) foram utilizados como controle da reação, pois a atividade D1 residual não bloqueada por PTU pode ser diminuída da atividade D2 final.

3.8 ATIVIDADE DA DUOX

Para a extração da Duox tireóidea, as tireóides foram homogeneizadas em 500µl de tampão fosfato de sódio 50mM; pH 7,2 contendo sacarose 0,25M; ditioneitol 0,1mM; EGTA 1mM e uma mistura de inibidores de proteases – aprotinina 5µg/mL e PMSF 34,8µg/mL. O homogeneizado foi centrifugado a 100.000xg, por uma hora, a 4°C. O precipitado foi ressuspenso em tampão fosfato de sódio 50mM; pH 7,2 contendo sacarose 0,25M; MgCl₂ 1mM e a mistura de inibidores. As amostras obtidas foram armazenadas para posterior medida da atividade de geração de H₂O₂.

A atividade Duox foi determinada como descrito por Cardoso e colaboradores (2001) e Ameziane-El-Hassani e colaboradores (2005). As amostras foram incubadas a 30°C com azida sódica 1mM, EGTA 1mM, FAD 0,1µM, CaCl₂ 1,5mM e tampão fosfato 150mM, pH 7,4. A reação foi iniciada adicionando-se NADPH 100µM, que é o substrato da enzima. Após intervalos regulares de tempo, alíquotas de 100µl foram transferidas para tubos de ensaio contendo 10µl de HCl 3N, de forma a interromper a reação. A quantidade de H₂O₂ gerada foi determinada pelo decréscimo da fluorescência da escopoletina 0,4µM na presença da peroxidase de raiz forte e tampão fosfato 200mM, pH 7,8, em fluorímetro Hitachi F-45000 no comprimento de onda de excitação de 360nm e de emissão de 460nm.

Determinamos a concentração de proteína presente em cada amostra pelo método de Bradford (1976). Para determinação da atividade específica da Duox, a atividade geradora de H₂O₂ foi dividida pela concentração de proteína na amostra. A atividade específica da Duox foi expressa em nmoles H₂O₂ .h⁻¹ . mg⁻¹ de proteína.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (S.E.M.), tendo sido realizado no mínimo três experimentos diferentes, com pelo menos três animais por grupo. Para a análise estatística dos resultados do ganho de peso dos animais e do peso das glândulas tireóide e hipófise e da atividade da D2, empregamos a análise de variância univariada seguida de teste de comparação múltipla de Dunnet. Já para a análise estatística dos resultados do TSH e da atividade da enzima Duox na dose de 1,5mg/kg de peso corporal, utilizamos teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de comparação múltipla de Dunn. Para a análise estatística dos demais resultados, utilizamos a análise de variância bivariada, seguida de teste Bonferroni. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Na representação dos dados mostramos a média dos grupos controle, pois não houve diferença entre os controles realizados em paralelo nos tratamentos de 7, 14 ou 28 dias.

4.1 GANHO DE PESO CORPORAL, PESO DA TIREÓIDE E PESO DA HIPÓFISE

Os animais tratados com os isômeros do AR não apresentaram mudanças no ganho de peso corporal durante o tratamento por 14 e 28 dias na dose de 100µg/kg de peso corporal.

O peso das glândulas tireóide dos animais tratados com ácido *All-trans*-retinóico e ácido 13-*cis*-retinóico, na dose de 100µg/kg de peso corporal, não mudaram em relação ao grupo controle.

Houve diminuição nas glândulas hipófise dos animais que receberam ácido 13-*cis*-retinóico na dose de 100µg/kg de peso corporal por 14 dias de tratamento em relação às hipófises do grupo controle e do grupo tratado com ácido *All-trans*-retinóico. Mas, no tratamento com AR por 28 dias, o peso das glândulas hipófise não sofreu alterações significativas.

Na dose de 1,5mg/kg, o uso de ambos os isômeros do AR não alterou o ganho de peso corporal por 7 ou 28 dias de tratamento.

As glândulas tireóide dos animais tratados com o isômero *All-trans*-AR, na dose de 1,5mg/kg de peso corporal, apresentaram uma diminuição significativa de peso com o tratamento por 28 dias; o que não ocorreu com o tratamento por 7 dias. Esses dados são apresentados nas tabelas a seguir.

TABELA 1 - Ganho de Peso Corporal, peso da tireóide e peso da hipófise em animais tratados com ácido *All-trans*-retinóico e ácido *13-cis*-retinóico, na dose de 100µg/kg de peso corporal, por 14 e 28 dias.

	Ganho de Peso Corporal (Peso corporal final/inicial) Dose 100µg/kg	Peso da Tireóide (mg/100g PC) Dose 100µg/kg	Peso da Hipófise (mg/100g PC) Dose 100µg/kg
14 dias			
Controle	1,15 ± 0,01 (n=69)	5,17 ± 0,18 (n=45)	2,25 ± 0,13 (n=19)
<i>All-trans</i> -AR	1,13 ± 0,01 (n=85)	4,85 ± 0,17 (n=51)	2,03 ± 0,09 (n=19)
<i>13-cis</i> -AR	1,14 ± 0,01 (n=83)	5,13 ± 0,15 (n=50)	1,77 ± 0,13 * (n=18)
28 dias			
Controle	1,24 ± 0,03 (n=35)	5,17 ± 0,20 (n=35)	2,49 ± 0,08 (n=12)
<i>All-trans</i> -AR	1,22 ± 0,04 (n=38)	5,04 ± 0,22 (n=38)	2,40 ± 0,10 (n=15)
<i>13-cis</i> -AR	1,31 ± 0,03 (n=38)	5,34 ± 0,20 (n=38)	2,34 ± 0,14 (n=14)

Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média. * p<0,05 vs. controle.

TABELA 2 - Ganho de Peso Corporal e peso da tireóide em animais tratados com ácido *All-trans*-retinóico e ácido *13-cis*-retinóico, na dose de 1,5mg/kg de peso corporal, por 7 e 28 dias.

	Ganho de Peso Corporal (Peso corporal final/inicial) Dose 1,5mg/kg	Peso da Tireóide (mg/100g PC) Dose 1,5mg/kg
7 dias		
Controle	1,03 ± 0,01 (n=8)	7,06 ± 0,53 (n=14)
<i>All-trans</i> -AR	1,19 ± 0,06 (n=8)	6,07 ± 0,31 (n=23)
<i>13-cis</i> -AR	1,16 ± 0,06 (n=8)	7,51 ± 0,43 (n=24)
28 dias		
Controle	1,27 ± 0,04 (n=29)	7,31 ± 0,22 (n=29)
<i>All-trans</i> -AR	1,22 ± 0,02 (n=31)	6,06 ± 0,26* (n=31)
<i>13-cis</i> -AR	1,26 ± 0,03 (n=31)	6,65 ± 0,30 (n=31)

Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média. * p<0,05 vs. controle.

4.2 ATIVIDADE DAS ENZIMAS IODOTIRONINA DESIODASES

4.2.1 ATIVIDADE DA ENZIMA IODOTIRONINA DESIODASE TIPO I (D1)

A atividade da D1 nos tecidos tireóide, rim e fígado nos ratos tratados com 100µg/kg de peso corporal de isômeros do AR por 14 e 28 dias não foi alterada (FIGURA 4). Porém, na hipófise, a sua atividade diminuiu significativamente com o uso dos dois isômeros por 14 dias de tratamento, em relação ao grupo controle, retornando a valores normais aos 28 dias de tratamento (FIGURA 4 D).

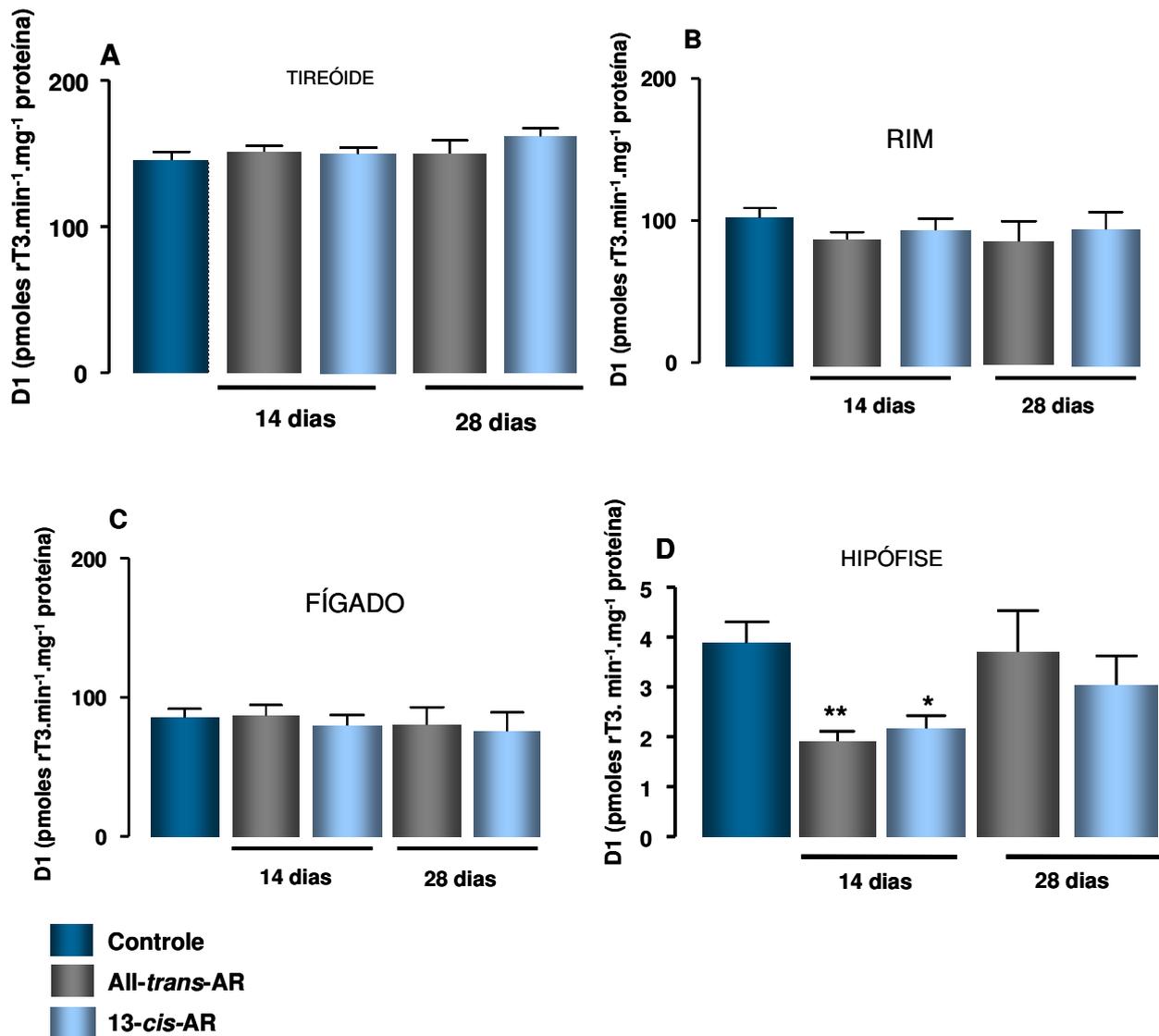


FIGURA 4 - Efeitos do AR na dose de 100 μ g/kg de peso corporal sobre a atividade da enzima desiodase tipo I (D1) por 14 e 28 dias. A, Na tireóide: tratamento com ácido All-*trans*-retinóico e ácido 13-*cis*-retinóico (controle: 145,7 \pm 5,61, n=25; All-*trans*-AR 14 dias: 151,4 \pm 4,02, n=19; 13-*cis*-AR 14 dias: 150,0 \pm 4,75, n=18; All-*trans*-AR 28 dias: 149,6 \pm 9,34, n=11; 13-*cis*-AR 28 dias: 161,7 \pm 5,67, n=11). B, No rim: tratamento com ácido All-*trans*-retinóico e ácido 13-*cis*-retinóico (controle: 104,7 \pm 6,93, n=25; All-*trans*-AR 14 dias: 89,4 \pm 5,35, n=19; 13-*cis*-AR 14 dias: 96,0 \pm 8,34, n=18; All-*trans*-AR 28 dias: 86,7 \pm 14,28, n=11; 13-*cis*-AR 28 dias: 96,6 \pm 12,41, n=11). C, No fígado: tratamento com ácido All-*trans*-retinóico e ácido 13-*cis*-retinóico (controle: 85,3 \pm 6,62, n=25; All-*trans*-AR 14 dias: 86,8 \pm 7,98, n=19; 13-*cis*-AR 14 dias: 79,8 \pm 7,42, n=18; All-*trans*-AR 28 dias: 80,2 \pm 12,94, n=11; 13-*cis*-AR 28 dias: 75,8 \pm 13,49, n=11). D, Na Hipófise: tratamento com ácido All-*trans*-retinóico e ácido 13-*cis*-retinóico (controle: 3,88 \pm 0,43, n=24; All-*trans*-AR 14

dias: $1,92 \pm 0,19$, $n=19$; 13-*cis*-AR 14 dias: $2,17 \pm 0,26$, $n=17$; All-*trans*-AR 28 dias: $3,70 \pm 0,84$, $n=10$; 13-*cis*-AR 28 dias: $3,04 \pm 0,58$, $n=11$). ** $p < 0,01$ vs. controle; * $p < 0,05$ vs. controle.

4.2.2 ATIVIDADE DA ENZIMA IODOTIRONINA DESIODASE TIPO II (D2)

A atividade da D2 hipofisária foi analisada nos ratos tratados com os isômeros do AR na dose de $100\mu\text{g/kg}$ de peso corporal por 14 dias e o uso dos dois isômeros não acarretou em alterações significativas em relação ao grupo controle (FIGURA 5).

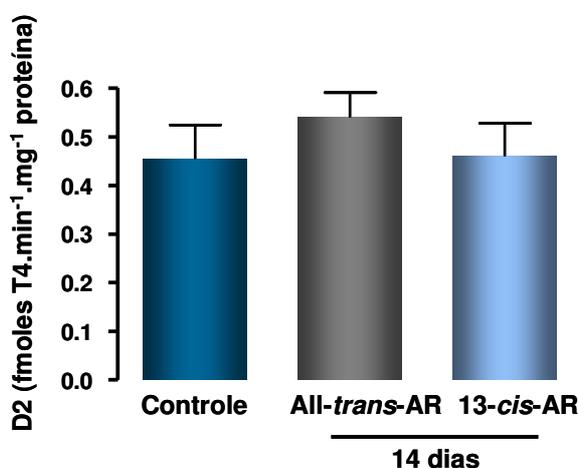


FIGURA 5 - Efeito do tratamento com ácido All-*trans*-retinóico e ácido 13-*cis*-retinóico na dose de $100\mu\text{g/kg}$ de peso corporal por 14 dias sobre a atividade da desiodase tipo II (D2) hipofisária (controle: $0,49 \pm 0,07$, $n=10$; All-*trans*-AR: $0,56 \pm 0,05$, $n=10$; 13-*cis*-AR: $0,45 \pm 0,07$, $n=10$).

4.3 CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE TSH

Foram analisados os níveis séricos de TSH e nenhuma diferença significativa foi encontrada com o uso dos isômeros All-*trans*-AR e 13-*cis*-AR do ácido retinóico por 14 e 28 dias de tratamento na dose de $100\mu\text{g/Kg}$ de p.c., conforme apresentado na tabela a seguir.

TABELA 3 – Concentrações séricas de TSH em animais tratados com ácido *All-trans*-retinóico e ácido *13-cis*-retinóico, na dose de 100µg/Kg de peso corporal, por 14 e 28 dias.

	TSH (ng/mL)
Controle	1,56 ± 0,13 (n=33)
14 dias	
<i>All-trans</i> -AR	1,83 ± 0,23 (n=19)
<i>13-cis</i> -AR	1,75 ± 0,26 (n=17)
28 dias	
<i>All-trans</i> -AR	1,28 ± 0,15 (n=11)
<i>13-cis</i> -AR	1,33 ± 0,17 (n=10)

Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média.

4.4 CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE T4 E T3

Foram analisados os níveis séricos de T4 total e nenhuma diferença significativa foi encontrada com o uso dos isômeros *All-trans*-AR e *13-cis*-AR do ácido retinóico na dose de 100µg/Kg de p.c. por 14 e 28 dias de tratamento. Os animais tratados com os isômeros do AR apresentaram tendência à diminuição na concentração sérica de T3 total, entretanto esta diminuição não foi significativa nos tratamentos por 14 e 28 dias, conforme apresentado na tabela a seguir.

TABELA 4 - Concentrações séricas de T4 e T3 totais em animais tratados com ácido *All-trans*-retinóico e ácido *13-cis*-retinóico, na dose de 100µg/kg de peso corporal, por 14 e 28 dias.

	T4 (µg/dL)	T3 (ng/dL)
Controle	5,88 ± 0,33 (n=25)	74,47 ± 6,30 (n=28)
14 dias		
<i>All-trans</i> -AR	6,22 ± 0,23 (n=19)	65,23 ± 8,93 (n=19)
<i>13-cis</i> -AR	6,02 ± 0,33 (n=18)	56,04 ± 5,46 (n=18)
28 dias		
<i>All-trans</i> -AR	5,94 ± 0,44 (n=11)	59,37 ± 5,70 (n=15)
<i>13-cis</i> -AR	6,07 ± 0,70 (n=11)	53,38 ± 3,08 (n=15)

Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média.

4.5 FUNÇÃO DO NIS

A função do NIS foi estimada através do conteúdo tireóideo de radioiodo 15 minutos após sua administração, conforme descrito por Ferreira e colaboradores (2005).

Nos ratos tratados com os isômeros de AR na dose de 100µg/Kg de p.c. por 14 dias não houve alteração significativa na função do NIS. Entretanto, os ratos tratados com o isômero *13-cis*-AR por 28 dias com a mesma dose tiveram aumento significativo da captação do iodo radioativo em relação ao grupo controle e ao *All-trans*-AR por 28 dias (FIGURA 6).

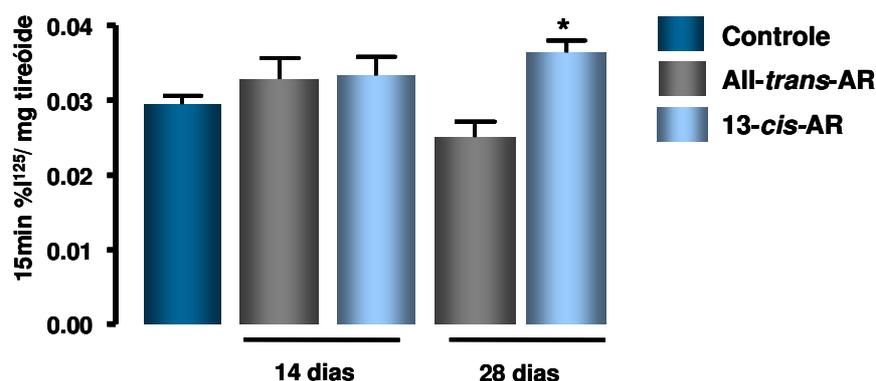


FIGURA 6 - Efeitos do tratamento com ácido *All-trans*-retinóico e ácido *13-cis*-retinóico, na dose de 100µg/kg de peso corporal, sobre o conteúdo tireóideo de radioiodo 15 minutos após sua administração por 14 e 28 dias (Controle: 0,029 ± 0,001, n=26; *All-trans*-AR 14 dias: 0,033 ± 0,003, n=19; *13-cis*-AR 14 dias: 0,033 ± 0,003, n=19; *All-trans*-AR 28 dias: 0,025 ± 0,002, n=11; *13-cis*-AR 28 dias: 0,036 ± 0,002, n=11). *p<0,05 vs. controle e vs. *All-trans*-AR 28 dias.

O tratamento com os isômeros ácido *All-trans*-retinóico e ácido *13-cis*-retinóico na dose de 1,5mg/kg de p.c. por 7 dias não alterou a função do NIS. Contudo, o tratamento com *13-cis*-AR por 28 dias na dose de 1,5mg/kg de p.c. também aumentou significativamente a captação do iodo radioativo em relação ao grupo controle, conforme verificado com a menor dose (FIGURA 7).

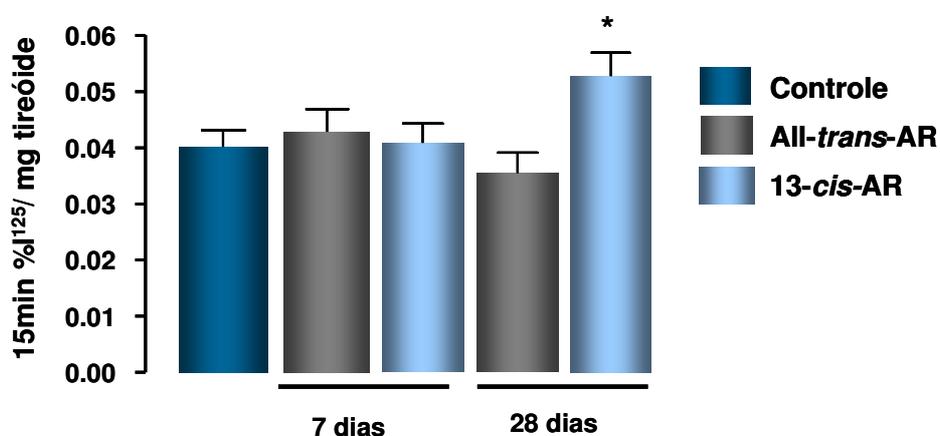


FIGURA 7 - Efeitos do tratamento com ácido *All-trans*-retinóico e ácido *13-cis*-retinóico, na dose de 1,5mg/kg de peso corporal, sobre o conteúdo tireóideo de radioiodo 15 minutos após sua administração por

7 e 28 dias (Controle: $0,040 \pm 0,003$, $n=23$; All-*trans*-AR 7 dias: $0,043 \pm 0,004$, $n=14$; 13-*cis*-AR 7 dias: $0,041 \pm 0,003$, $n=14$; All-*trans*-AR 28 dias: $0,035 \pm 0,004$, $n=10$; 13-*cis*-AR 28 dias: $0,053 \pm 0,004$, $n=10$). * $p < 0,05$ vs. controle.

4.6 CONTEÚDO TIREÓIDEO DE IODO RADIOATIVO APÓS 2 HORAS

O conteúdo de iodo radioativo tireóideo 2 horas após sua administração reflete a capacidade de transporte e de organificação do iodo na glândula (FERREIRA *et al.*, 2005). No grupo de animais tratados com o isômero ácido All-*trans*-retinóico na dose de $100\mu\text{g}/\text{kg}$ de p.c. por 14 dias, o conteúdo de radioiodo tireóideo apresentou uma diminuição significativa 2 horas após a injeção de iodo radioativo quando comparado ao grupo controle. Já a captação de 2 horas com o uso dos isômeros do AR na mesma dose por 28 dias de tratamento não apresentou alterações em relação ao grupo controle (FIGURA 8).

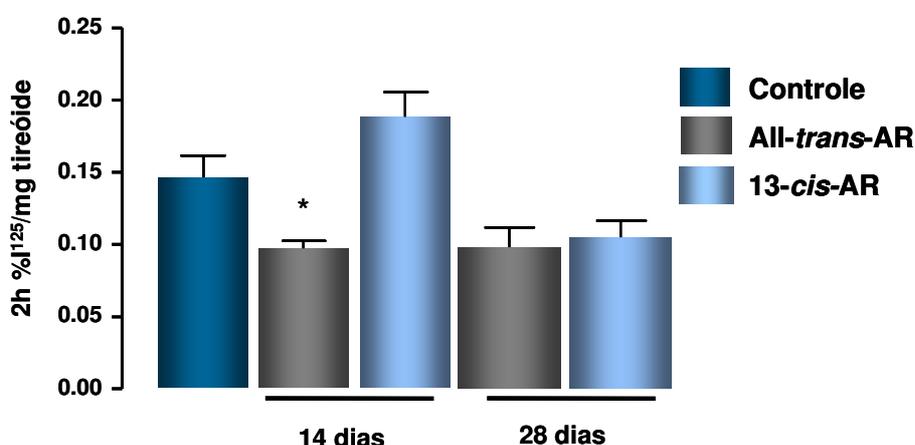


FIGURA 8 - Efeitos do tratamento com ácido All-*trans*-retinóico e ácido 13-*cis*-retinóico, na dose de $100\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal, sobre o conteúdo tireóideo de radioiodo 2 horas após sua administração por 14 e 28 dias. A, (Controle: $0,146 \pm 0,015$, $n=23$; All-*trans*-AR 14 dias: $0,096 \pm 0,006$, $n=13$; 13-*cis*-AR 14 dias: $0,188 \pm 0,017$, $n=13$; All-*trans*-AR 28 dias: $0,098 \pm 0,013$, $n=12$; 13-*cis*-AR 28 dias: $0,105 \pm 0,012$, $n=12$). * $p < 0,05$ vs. controle.

O tratamento com *All-trans*-AR na dose de 1,5mg/kg de p.c. por 7 dias acarretou em uma diminuição significativa no conteúdo de radioiodo tireóideo administrado 2 horas após a injeção de iodo radioativo. Porém, com 28 dias de tratamento na mesma dose, o conteúdo de radioiodo tireóideo normalizou (FIGURA 9).

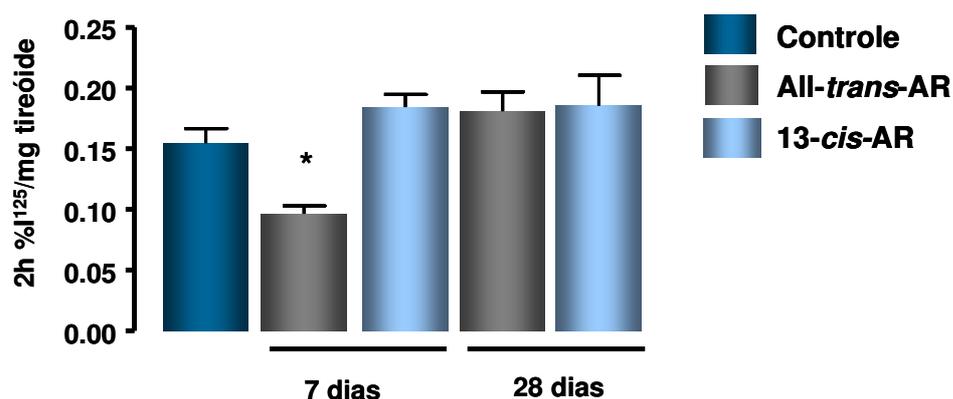


FIGURA 9 - Efeitos do tratamento com ácido *All-trans*-retinóico e ácido *13-cis*-retinóico, na dose de 1,5mg/kg de peso corporal, sobre o conteúdo tireóideo de radioiodo 2 horas após sua administração por 7 e 28 dias. (Controle: 0,155 ± 0,012, n=21; *All-trans*-AR 7 dias: 0,097 ± 0,006, n=9; *13-cis*-AR 7 dias: 0,185 ± 0,010, n=9; *All-trans*-AR 28 dias: 0,181 ± 0,016, n=14; *13-cis*-AR 28 dias: 0,185 ± 0,025, n=14). *p<0,05 vs. controle.

4.7 ATIVIDADE DA TIREOPEROXIDASE

A atividade da TPO de oxidação do iodeto nas tireóides de ratos tratados com AR não sofreu alterações significativas em relação ao grupo controle durante os tratamentos de 14 e 28 dias na dose de 100µg/kg de p.c. (apresentado na figura 10) e durante os tratamentos de 7 e 28 dias na dose de 1,5mg/kg de p.c. (apresentado na figura 11).

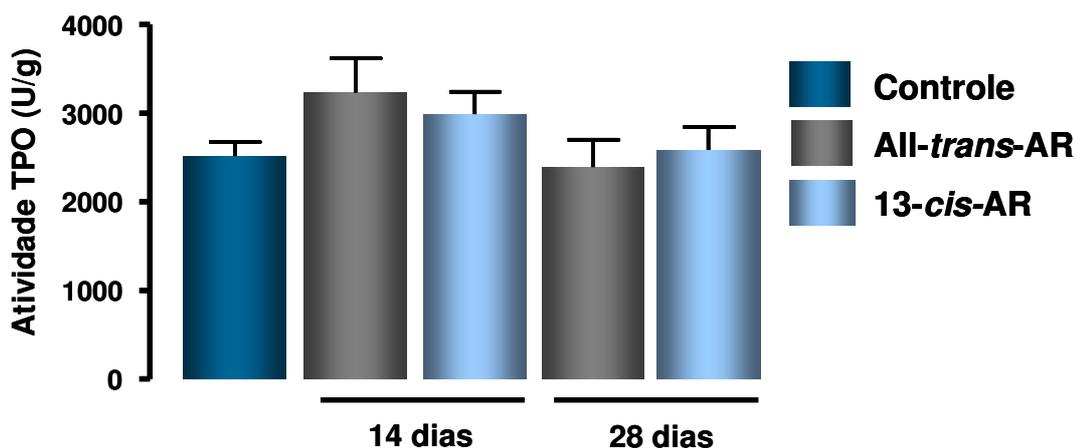


FIGURA 10 - Efeitos do tratamento com ácido *All-trans*-retinóico e ácido *13-cis*-retinóico, na dose de 100µg/kg de peso corporal, sobre a atividade da tireoperoxidase de oxidação do iodeto por 14 e 28 dias (Controle: 2519 ± 157, n=50; *All-trans*-AR 14 dias: 3228 ± 391, n=32; *13-cis*-AR 14 dias: 2988 ± 253, n=31; *All-trans*-AR 28 dias: 2387 ± 315, n=23; *13-cis*-AR 28 dias: 2584 ± 260, n=22).

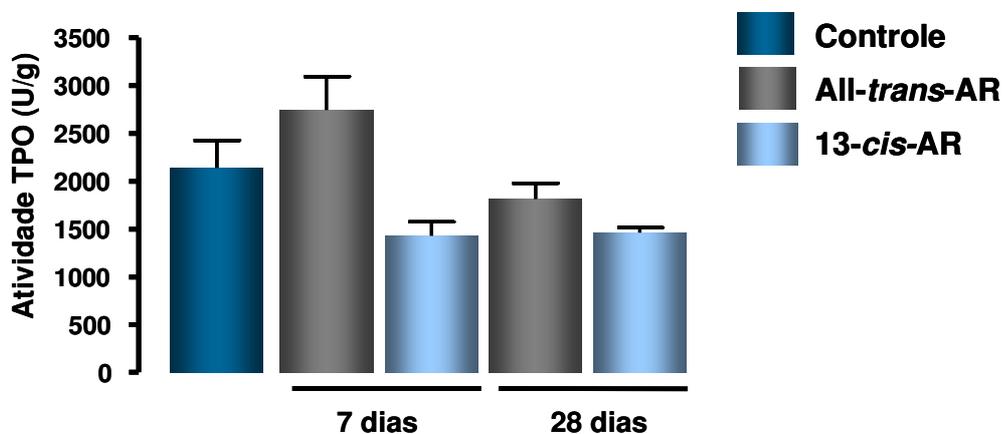


FIGURA 11 - Efeitos do tratamento com ácido *All-trans*-retinóico e ácido *13-cis*-retinóico, na dose de 1,5mg/kg de peso corporal, sobre a atividade da tireoperoxidase de oxidação do iodeto por 7 e 28 dias (Controle: 2138 ± 288, n=14; *All-trans*-AR 7 dias: 2742 ± 350, n=13; *13-cis*-AR 7 dias: 1428 ± 146, n=14; *All-trans*-AR 28 dias: 1813 ± 165, n=7; *13-cis*-AR 28 dias: 1459 ± 54,9, n=7).

4.8 ATIVIDADE DA ENZIMA DUOX

A atividade da Duox nas tireóides apresentou redução significativa nos ratos tratados com o isômero *All-trans*-AR em relação ao grupo controle e ao grupo tratado com o isômero *13-cis*-AR, durante o tratamento de 14 dias com a dose de 100µg/kg. Porém, com 28 dias de tratamento na mesma dose, a atividade da enzima normalizou. Por outro lado, o tratamento de 14 dias na dose de 100µg/kg de peso corporal com o isômero *13-cis*-AR ocasionou aumento significativo da atividade da Duox nas tireóides em relação ao grupo controle e ao grupo tratado com o isômero *All-trans*-AR, retornando a valores normais com 28 dias de tratamento (FIGURA 12).

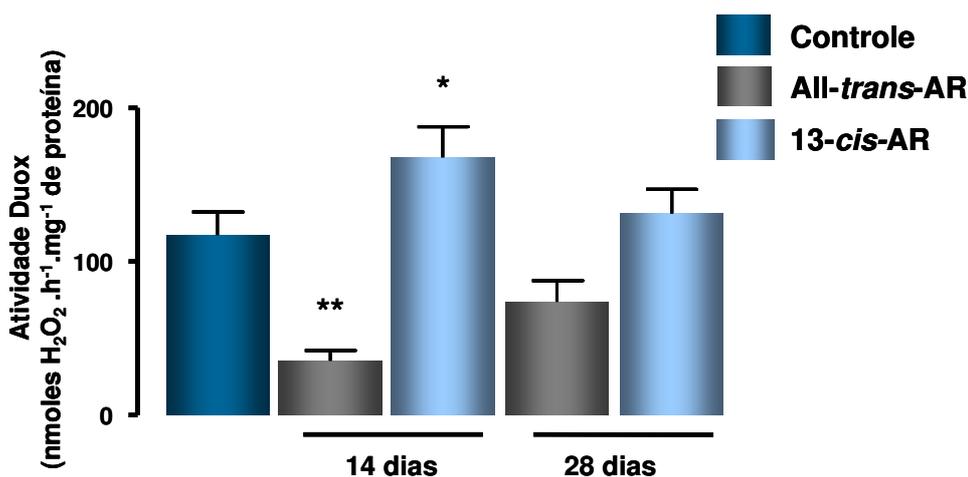


FIGURA 12 - Efeitos do tratamento com ácido *All-trans*-retinóico e ácido *13-cis*-retinóico, na dose de 100µg/kg de peso corporal, sobre a atividade da enzima Duox tireóidea por 14 e 28 dias (Controle:117,0 ± 15,3, n=19; *All-trans*-AR 14 dias: 35,2 ± 6,7, n=10; *13-cis*-AR 14 dias: 167,6 ± 20,2, n=12; *All-trans*-AR 28 dias: 73,7 ± 13,9, n=9; *13-cis*-AR 28 dias: 131,0 ± 16,1 n=7). ** p< 0,01. *p< 0,05.

A atividade da enzima com o tratamento com os isômeros de AR, na dose de 1,5mg/kg de peso corporal, por 28 dias não apresentou alteração significativa, conforme apresentado na figura 13.

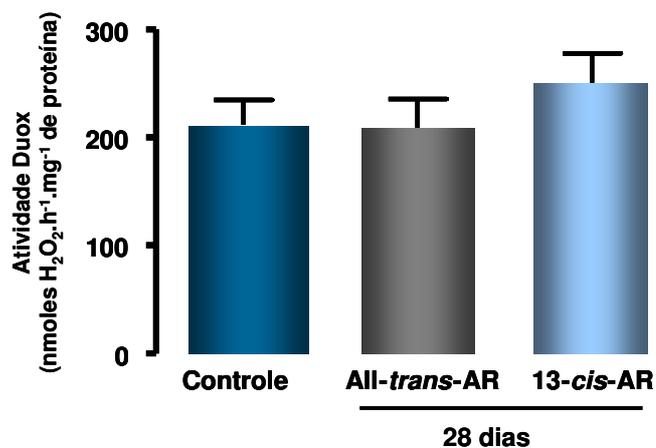


FIGURA 13 - Efeito do tratamento com ácido *All-trans*-retinóico e ácido *13-cis*-retinóico, na dose de 1,5mg/kg de peso corporal, sobre a atividade da enzima Duox tireóidea por 28 dias (controle: 222,0 ± 22,7, n=10; *All-trans*-AR: 196,6 ± 26,7, n=10; *13-cis*-AR: 237,1 ± 28,0, n=10).

DISCUSSÃO

Desde a descoberta de que os retinóides estão envolvidos na diferenciação celular, sendo essenciais para a morfogênese, diferenciação e homeostase (GIGUERE, 1994; ROSS *et al.*, 2000), eles têm sido utilizados terapêuticamente, sendo considerados eficazes no tratamento e na quimioprevenção de algumas neoplasias.

Antes mesmo do uso do ácido retinóico no câncer de tireóide, esta medicação já vem sendo utilizada no tratamento da leucemia promielocítica aguda, câncer de cabeça e pescoço e carcinoma escamoso de pele, devido ao seu efeito antiproliferativo e rediferenciador (LOTAN, 1996; HANSEN *et al.*, 2000).

A terapia de câncer de tireóide diferenciado consiste na combinação dos efeitos da cirurgia, radioiodoterapia e supressão de TSH. Como descrito anteriormente (SCHMUTZLER *et al.*, 1997), a expressão do NIS e a expressão do receptor de TSH encontram-se geralmente diminuídas em carcinomas de tireóide, assim como a expressão e atividade das enzimas TPO e desidase tipo I. A expressão da Tg também pode estar diminuída em carcinoma papilífero. Em carcinomas papilífero e folicular é comum ocorrer perda da diferenciação celular e das funções específicas da tireóide. Como consequência, terapias com radioiodo não são eficazes pois esses tumores apresentam diminuição da capacidade de concentrar e organificar o iodo, e de síntese hormonal. O AR tornou-se, dessa forma, uma opção terapêutica para o carcinoma dediferenciado, uma vez que o tratamento com os isômeros *All-trans-AR* e *13-cis-AR* poderia ser capaz de reinduzir as funções diferenciadas do tireócito e do metabolismo de iodo (SCHMUTZLER *et al.*, 1996; SCHREK *et al.*, 1994; VAN HERLE *et al.*, 1990). O *13-cis-AR* mostrou-se um composto

eficaz em 20% dos pacientes resistentes a tratamentos tradicionais, viabilizando ou otimizando o mecanismo de captação de iodo radioativo pelas células tumorais (COELHO *et al.*, 2004). Além disso, foi relatado que *All-trans-AR* tem efeito antiproliferativo e é capaz de induzir a apoptose (FRÖLICH *et al.*, 2001).

Isto posto, o uso clínico do ácido retinóico vem sendo amplamente estudado no tratamento não somente de câncer de tireóide, mas também de outros tecidos que expressam o NIS. A maioria dos estudos analisa as ações do ácido retinóico em cultura de células tumorais tireóideas (VAN HERLE *et al.*, 1990; SCHMUTZLER *et al.*, 2004; JEONG *et al.*, 2006). Porém, há poucos estudos relacionados ao uso de ácido retinóico em células da tireóide normal, sendo que o número de estudos *in vivo* é ainda mais escasso. Além disso, o ácido retinóico tem sido muito utilizado no tratamento dermatológico, sendo este uso, às vezes, até abusivo (ZOUBOULIS, 2001b). No tratamento dermatológico, o AR, principalmente o 13-*cis-AR*, é capaz de diferenciar o epitélio e modular a inflamação com algum impacto no sistema imune; reduzindo o tamanho da glândula sebácea e a produção de sebo, alterando a composição da superfície lipídica (WARD *et al.*, 1984). Além disso, é muito utilizado no tratamento antienvhecimento e da seborréia (ZOUBOULIS, 2001b). O isômero *All-trans-AR* também é bastante estudado no tratamento da psoríase, rosácea, foliculite eosinófila, dentre outras dermatoses (ZOUBOULIS, 2001b).

Diante do exposto, pessoas que fazem uso de ácido retinóico com a finalidade estética, ou mesmo como um agente quimiopreventivo ou terapêutico para diversos tipos de câncer e dermatoses, poderiam desenvolver alguma disfunção na tireóide, uma vez que o ácido retinóico exerce tantos efeitos sobre o câncer da tireóide. A preocupação provou-se justificada perante o uso até mesmo abusivo do AR na estética. A isotretinoína

(13-*cis*-AR) é indicada para este fim somente em casos de formas graves de acne, como nódulo-cístico e conglobata ou acne com risco de cicatrizes permanentes e quando os quadros de acne são resistentes a terapias como antibióticos sistêmicos e agentes tópicos (bula do medicamento Roacutan® do laboratório Roche); contudo, esta medicação está sendo, muitas vezes, prescrita para pacientes com acnes não severas, que não se enquadram nesta indicação.

Este trabalho foi, portanto, desenvolvido visando avaliar os efeitos do ácido retinóico sobre a função tireóidea de ratos normais. Para tanto, utilizamos os isômeros ácido *All-trans*-retinóico (*All-trans*-AR) e o ácido 13-*cis*-retinóico (13-*cis*-AR), por serem os mais utilizados nos tratamentos tanto dermatológicos como oncológicos e para abranger a ação nos dois grupos de receptores do AR, uma vez que o *All-trans*-AR isomeriza-se a 9-*cis*-AR, espontaneamente, tendo assim, afinidade tanto pelo receptor de ácido retinóico (RAR), como pelo receptor retinóide X (RXR) (BREEN *et al.*, 1997; MARCUS e COULSTON, 2000). Contudo, é controverso se o isômero 9-*cis*-AR é de ocorrência natural, pois durante tratamentos com *All-trans*-AR em células de mamíferos quase não foi detectada a presença de 9-*cis*-AR (GERMAIN *et al.*, 2006). Já o isômero 13-*cis*-AR, *in vivo*, isomeriza-se espontaneamente a *All-trans*-AR e 9-*cis*-AR (BREEN *et al.*, 1997; MARCUS e COULSTON, 2000). Schroeder e colaboradores, 2007, comparando os efeitos do *All-trans*-AR e do 13-*cis*-AR em queratinócitos, verificaram que os efeitos desses isômeros podem diferir muito. Esses autores também avaliaram a isomerização do 13-*cis*-AR a *All-trans*-AR e afirmaram que o 13-*cis*-AR é uma pró-droga, isomerizando-se, *in vivo*, a *All-trans*-AR. Contudo, a isomerização depende do tipo celular, uma vez que o tratamento com 13-*cis*-AR não aumenta a concentração intracelular do *All-trans*-AR em queratinócitos, enquanto o tratamento com 13-*cis*-AR leva ao aumento da concentração

do *All-trans*-AR em células sebáceas humanas. Portanto, as diferenças dos efeitos do tratamento com os isômeros pode ser decorrente da baixa afinidade do *13-cis*-AR pelos receptores RAR e RXR (SCHROEDER *et al.*, 2007; ISHIKAWA *et al.*, 2009).

Avaliamos vários parâmetros como ganho de peso corporal dos animais tratados com os isômeros *All-trans*-AR e *13-cis*-AR, peso das glândulas tireóide e hipófise desses animais, atividade da enzima TPO, função do NIS, conteúdo de iodeto radioativo por 2 horas após sua administração, dosagem dos níveis séricos de hormônios tireóideos e de TSH, atividade das enzimas desidases tipo I na tireóide e em diversos tecidos, e tipo II na hipófise e atividade da Duox tireóidea.

Os tratamentos com os isômeros do AR foram utilizados em duas doses diferentes. Primeiramente analisamos os parâmetros com a dose de 100 µg/kg de peso corporal por dia, de acordo com a descrição de Coya e colaboradores (1997), os quais avaliaram o uso do AR *in vivo* por 14 dias de tratamento. Após, analisamos os principais parâmetros com dose de 1,5mg/kg de peso corporal por dia, dose esta utilizada tanto para o tratamento dermatológico (WARD *et al.*, 1984) como para o tratamento de pacientes com carcinomas de tireóide (SIMON *et al.*, 2002; COELHO *et al.*, 2004). O tempo de tratamento com a menor dose, 14 dias, correspondeu ao descrito na literatura (COYA *et al.*, 1997) e o tratamento com AR por 28 dias em murinos equivale a um tratamento crônico. Já o tratamento com AR com a maior dose é uma tentativa de demonstrar os efeitos do AR sobre a tireóide normal em um tratamento agudo (7 dias) e mais prolongado (28 dias). Como os pacientes fazem uso de AR por aproximadamente 24 semanas de tratamento dermatológico e em torno de 5 semanas no tratamento de câncer de tireóide, o uso de 28 dias em murinos equivaleria ao uso mais prolongado.

Avaliando o ganho de peso dos animais tratados com os isômeros do ácido retinóico em ambas as doses, verificamos que estes não apresentaram diferença no ganho de peso quando comparados aos animais do grupo controle. Nosso grupo também desenvolveu um trabalho com ratas tratadas com o AR que também não apresentaram diferença no ganho de peso (SILVA *et al.*, 2009). Não há nada, inclusive, na literatura que relate que o tratamento com o ácido retinóico possa alterar o ganho de peso corporal; embora Ziouzenkova e colaboradores (2007) tenham relatado que o retinaldeído, outro derivado da vitamina A, cause redução no ganho de peso de camundongos.

O peso da glândula tireóide também não sofreu alterações significativas com o uso do ácido retinóico na dosagem de 100µg/kg de peso corporal por dia. Porém, o tratamento com o isômero *All-trans*-AR na dosagem de 1,5mg/kg PC por dia, durante 28 dias diminuiu o peso da glândula, conforme relatado em muitos trabalhos que mencionam o efeito antiproliferativo do ácido retinóico em linhagem de células tumorais tireóideas (VAN HERLE *et al.*, 1990). O único trabalho encontrado que se refere ao efeito do ácido retinóico sobre o peso da tireóide *in vivo*, postulou que a diminuição do peso da glândula em ratos que receberam altas doses de vitamina A possa ser resultado de mecanismos centrais (SHADU e BRODY, 1947 *apud* SHARMA *et al.*, 2006). No entanto, não detectamos diminuição do TSH nesses animais.

Nossos resultados mostraram que o uso do isômero 13-*cis*-AR com baixa dosagem diminuiu significativamente o peso da glândula hipófise de ratos machos no tratamento de 14 dias. Paez-Pereda e colaboradores (2001) verificaram que o *All-trans*-AR tem atividade antiproliferativa e apoptótica tanto em cultura de corticotrofos tumorais, como em cultura de células hipofisárias normais de ratos. Neste estudo, verificou-se também que o tratamento com ácido retinóico *in vivo* inibiu o crescimento de corticotrofos tumorais,

confirmando os efeitos antiproliferativo e apoptótico encontrados *in vitro*. Assim, nossos resultados corroboram a literatura, demonstrando que o ácido retinóico pode afetar o peso da hipófise, uma vez que o peso da glândula diminuiu significativamente, porém esse efeito pode não ser em tireotrofos. Este efeito, entretanto, foi transitório, não havendo diferença aos 28 dias em relação ao grupo controle. Assim, é provável que outros mecanismos atuem, revertendo a ação do ácido retinóico. Inclusive, sabe-se que o AR é capaz de exercer efeitos diferenciadores na hipófise através do fator de transcrição hipofisário (Pit 1), afetando vários tipos de células e, conseqüentemente, sua secreção hormonal (SAGAZIO *et al.*, 2007; BONDIONI *et al.*, 2008). Foi relatado que os isômeros do AR são capazes de estimular a produção de GH em linhagem de células somatotróficas tumorais (PÁEZ-PEREDA *et al.*, 2001; SAGAZIO *et al.*, 2007; BONDIONI *et al.*, 2008) e Angioni e colaboradores (2005) verificaram que o uso do AR no tratamento de pacientes com psoríase diminui os níveis de prolactina, o que é condizente com os dados encontrados por Bondioni e colaboradores (2007), os quais relatam que o uso do AR é capaz de aumentar a expressão de receptores de dopamina em células de adenomas hipofisários.

Em relação ao metabolismo periférico dos hormônios tireóideos em tecidos extratireóideos, nossos resultados mostraram que o uso de ambos os isômeros do ácido retinóico, diminui significativamente a atividade da D1 na hipófise, não alterando a atividade da D1 no rim e fígado; e a atividade da D2 hipofisária também não sofre alterações significativas com o tratamento de AR na dose de 100 µg/kg de peso corporal por 14 dias. A diminuição da D1 hipofisária coincidiu com a diminuição do peso da glândula, porém com o tratamento por 28 dias com AR tanto a atividade da D1 hipofisária como o peso da hipófise retornaram aos valores normais. Dados da literatura mostram

que os isômeros do ácido retinóico são capazes de estimular a atividade da D1 em diversos tecidos tumorais (SCHRECK *et al.*, 1994; GARCIA-SOLIS e ACERVES, 2003), Em linhagem de células tumorais de mama (MCF-7), na qual a expressão da D1 é reduzida significativamente, deixando, às vezes, até mesmo de ser expressa, o uso do AR é capaz de aumentar a expressão desta enzima (GARCIA-SOLIS e ACERVES, 2003). O uso de ácido retinóico estimula a atividade de D1 em células tumorais. Além do aumento da atividade da D1 em células tumorais, foi verificado que o uso do AR também aumenta a atividade de D3 em cultura de células astrogiais no cérebro (ESFANDIARI *et al.*, 1994) e, aumenta tanto a expressão de D3 como a sua atividade em cultura primária de astrócitos de ratos neonatos (PALLUD *et al.*, 1999). Parece, portanto, que o efeito do ácido retinóico sobre o metabolismo periférico dos hormônios tireóideos depende do tipo e estado de tecido, sugerindo que mais estudos devam ser realizados para estabelecer as ações do AR sobre a atividade das desidases.

Além dos efeitos do ácido retinóico sobre a hipófise, ele parece regular marcadores de diferenciação específicos do tireócito, como desidase tipo I, co-transportador Na^+/I^- e tireoperoxidase. Estudos avaliaram que o uso dos isômeros *All-trans*-AR, *9-cis*-AR e *13-cis*-AR, além de reinduzir a expressão de proteínas, como Tg, TPO e NIS, que deixaram de ser expressas no carcinoma de tireóide, estimulou a atividade da D1 tireóidea em linhagem de células de carcinoma de tireóide folicular (FTC-133 e FTC-238), mas não modulou sua atividade no carcinoma de tireóide do tipo anaplásico (SCHRECK *et al.*, 1994). A literatura relata que, em células de carcinoma de tireóide diferenciado, a expressão da enzima D1 é reduzida e não responde fisiologicamente nem ao T3 nem ao TSH, mas torna-se responsiva ao uso dos isômeros do ácido retinóico e que em carcinoma anaplásico de tireóide, a expressão de D1 não é detectável, não se verificando

estímulo pelo ácido retinóico (SCRECK *et al.*, 1994; SCHMUTZLER *et al.*, 1996). Por outro lado, van Herle e colaboradores, em 1990, verificaram que em linhagem de células tumorais de carcinoma folicular de tireóide metastático (UCLA RO 82 W-1) houve diminuição significativa da atividade da D1 com o uso do isômero 13-*cis*-AR. Portanto, embora a atividade da D1 tireóidea em linhagens de células de carcinomas de tireóide diversos seja modulada pelo uso do ácido retinóico, nossos resultados demonstraram que o tratamento com ácido retinóico, *in vivo*, não afeta significativamente a atividade da D1 tireóidea em machos. Por outro lado, o tratamento com *All-trans*-AR por 14 dias em fêmeas aumentou significativamente a atividade desta enzima, embora esse aumento tenha sido transitório, normalizando-se após 28 dias de tratamento (SILVA *et al.*, 2009). Marassi e colaboradores (2007) reportaram que a atividade da D1 tireóidea, assim como renal, hepática e hipofisária, apresentam-se diminuídas em fêmeas quando comparadas aos machos. Sabe-se que existe um dimorfismo sexual e que hormônios sexuais influenciam a função tireóidea, embora o mecanismo ainda não esteja bem definido (DONDA *et al.*, 1990).

Embora o ácido retinóico seja tão estudado para o tratamento de câncer de tireóide, ainda não estão definidos os efeitos que o ácido retinóico pode provocar na tireóide normal *in vivo*. Coya e colaboradores (1997) verificaram que o uso de ácido retinóico, na dose de 100µg/kg de peso corporal, em ratos eutireóideos e hipotireóideos diminuiu significativamente os níveis de TSH em resposta ao TRH aos 14 dias de tratamento. Outros autores avaliaram também os níveis séricos de diversos hormônios hipofisários em pacientes que faziam uso do *All-trans*-AR para tratamento de psoríase e os níveis de TSH também diminuíram significativamente nestes pacientes, retornando a valores normais com três meses de tratamento (ANGIONI *et al.*, 2005). Foi relatado que

ratos com deficiência de vitamina A apresentavam na hipófise níveis elevados de RNAm para a subunidade β do TSH (TSH β), subunidade que confere especificidade biológica do TSH pelo seu receptor, e que esses níveis retornavam a valores normais com a administração do isômero *All-trans-AR* (BREEN *et al.*, 1995). Além disso, camundongos com ausência de receptores RXR apresentaram níveis elevados de TSH e T4 e o uso de agonistas seletivos para RXR foi capaz de diminuir os níveis circulantes de TSH por algumas horas, retornando a valores normais após 24h de tratamento, não afetando, deste modo, os níveis de RNAm para TSH β na hipófise (LIU *et al.*, 2002). Entretanto, nossos resultados demonstraram que o uso do ácido retinóico por 14 e 28 dias de tratamento na dosagem de 100 μ g/ kg PC não alterou os níveis séricos de TSH. Sabe-se que os retinóides em altas doses são capazes de suprimir o eixo dos hormônios tireóideos tanto em roedores como em humanos via RXR, podendo ser uma nova estratégia na terapia de câncer a utilização de ligantes de receptores nucleares em associação com o AR com o objetivo de inibir o crescimento do tumor em pacientes com câncer de mama (BONOFIGLIO *et al.*, 2009). Todavia, a literatura deixa claro que o uso de ácido retinóico diminui os níveis séricos de TSH apenas temporariamente (COYA *et al.*, 1997; LIU *et al.*, 2002; ANGIONI *et al.*, 2005), não sendo capaz de afetar os níveis de RNAm para TSH β na hipófise (LIU *et al.*, 2002).

Além disso, sabe-se que T4 é convertido à T3 na hipófise e os níveis de T3 hipofisário regulam negativamente os níveis de TSH sérico. Como está descrito na literatura que o uso do ácido retinóico parece diminuir os níveis séricos de TSH, uma hipótese seria a atividade da D2 hipofisária estar aumentada, o que causaria maior conversão do T4 a T3 e, assim, diminuição do TSH. Mas nossos resultados demonstraram que a atividade da D2 não sofreu alterações significativas com o uso dos

dois isômeros de ácido retinóico por 14 dias de tratamento. A literatura afirma, inclusive, que a D2 hipofisária é mais importante do que a D1 para modular os níveis de TSH (SCHNEIDER *et al.*, 2006). A deficiência de D1 em camundongos não altera níveis séricos de T3, mas aumenta T4 e não altera os níveis de TSH (BERRY *et al.*, 1993; SCHNEIDER *et al.*, 2006). O fato do nível de TSH sérico estar normal em camundongos com ausência de D1, provavelmente é resultado dos níveis séricos normais de T3 e da conversão de T4 a T3 pela D2 hipofisária, conforme proposto por Schneider e colaboradores (2006). Portanto, na hipófise, a diminuição tanto da atividade da enzima D1, como do peso da glândula não estão relacionadas aos níveis de TSH, que se encontram normais.

Em relação aos níveis séricos dos hormônios tireóideos, sabe-se que até 80% da produção diária de T3 em humanos é devida à conversão de T4 a T3 em tecidos extratireóideos através da atividade das enzimas D1 e D2 (SCHRECK *et al.*, 1994; BIANCO *et al.*, 2002), sendo a D2 mais importante (BIANCO *et al.*, 2002); e que em ratos, essa produção de T3 extratireóidea em função da conversão realizada igualmente por D1 e D2 chega a ser de 60% (GEREBEN *et al.*, 2008). Inclusive, a D1 é responsável pela geração da maior quantidade de T3 circulante em ratos e é expressa predominantemente no fígado, rim e tireóide (ACEVES e VALVERDE-R, 1989; KÖHRLE, 2000; BIANCO *et al.*, 2002). Como mencionado anteriormente, avaliamos a atividade da D1 em diversos tecidos e não houve alterações significativas na sua atividade no rim, fígado e tireóide, podendo contribuir também para os níveis séricos inalterados de T3 encontrados. Com o uso do ácido retinóico por 14 dias de tratamento, na dose de 100µg/kg de peso corporal por dia, houve diminuição significativa da atividade da D1

hipofisária, sugerindo mais uma vez que na hipófise, o ácido retinóico exerce efeitos diretos, provavelmente em outras células, que não os tireotrofos.

Além da hipófise, o ácido retinóico parece também exercer efeito direto sobre a tireóide. Sabe-se que muitos fatores, como insulina, IGF-1 (fator de crescimento insulina símile-1), EGF (fator de crescimento epidérmico), TGF β (fator de crescimento transformador β), TNF α (fator de necrose tumoral α), interleucinas, e o próprio iodeto, podem influenciar a capacidade do tireócito em concentrar iodo. Entretanto, o TSH é o principal regulador da captação de iodeto no tireócito. O TSH, além de estimular a transcrição do NIS, regula a função deste transportador através de fosforilação. Na ausência de TSH, o NIS é redistribuído da membrana basal para estruturas intra-celulares (RIEDEL *et al.*, 2001). Entretanto, como o peso da tireóide, os níveis séricos dos hormônios tireóideos, a atividade da D1 tireóidea e os níveis séricos de TSH não foram alterados com o tratamento com os isômeros do AR por 14 e 28 dias, nossos resultados sugerem que o aumento do conteúdo tireóideo de iodo radioativo 15 minutos após a administração do isômero 13-*cis*-AR, em ambas doses, por 28 dias de tratamento não seja um efeito indireto sobre a tireóide em função do TSH, mas sim um efeito direto do AR sobre a glândula. Em linhagem de células tireóideas tumorais, o tratamento com o isômero 13-*cis*-AR também foi capaz de aumentar a captação de iodo (VAN HERLE *et al.*, 1990). Há vários estudos demonstrando a atividade do NIS aumentada com o uso do AR em carcinomas de tireóide, sendo este medicamento utilizado no tratamento de câncer da tireóide não responsivo ao tratamento convencional e em câncer extratireóideos, onde há diminuição da expressão da proteína NIS, viabilizando a terapia com o iodo radioativo, como descrito anteriormente (ALOTAIBI *et al.*, 2006, UNTERHOLZNER *et al.*, 2006, WILLHAUCK *et al.*, 2007).

Foi mostrado também que, em cultura de células foliculares originadas de carcinoma de tireóide, os isômeros *All-trans-AR* e *13-cis-AR* têm efeito direto sobre a expressão do NIS (SCHMUTZLER *et al.*, 1997), porém *in vivo* ainda não havia sido relatado nenhum estudo a este respeito em tireóide normal. Nossos estudos demonstraram que, em ratas, o *13-cis-AR* é capaz de aumentar a captação de iodo pelos tireócitos após 28 dias de tratamento (SILVA *et al.*, 2009). Já em cultura de células normais da tireóide, foi verificado que o ácido *All-trans-retinóico* diminui o RNAm do receptor de TSH e do NIS, embora este último por um curto período de tempo, retomando a seus níveis basais com aumento do tempo de tratamento; e houve diminuição também da captação de iodo radioativo (TUNCEL *et al.*, 2007). Além disso, nestas células também foi observado aumento do RNAm de TPO e tireoglobulina. Deste modo, nossos resultados demonstram que *in vivo* o AR aumenta a atividade do NIS na tireóide normal assim como ocorre em células tumorais da tireóide. Todavia, o efeito do AR sobre a captação do iodo parece ser influenciado pelo padrão de expressão dos seus receptores de AR no tireócito; já que em carcinomas de tireóide há aumento da captação de iodo e da expressão de receptores citoplasmáticos RAR α , RAR γ , RXR β e diminuição da expressão dos receptores nucleares RAR β , RAR γ e RXR α (HOFTIJZER *et al.* 2009); enquanto que, em células PCCL3, há diminuição da captação de iodeto e os receptores de AR são todos nucleares, exceto o RAR β , lembrando que RAR γ não é expresso nessas células (dados não publicados do nosso laboratório).

O RNAm do NIS também está presente em tecidos extratireóideos capazes assim, de concentrar iodo, como glândula salivar (células ductais), estômago (células parietais), timo e mama; sendo também detectado na próstata, ovário, adrenal, pulmão e coração (TANOSAKI *et al.*, 2003). Kogai *et al.* em 2004 demonstraram que, *in vivo*, o uso do *All-*

trans-AR aumenta a expressão do NIS e captação de iodo radioativo em câncer de mama. Foi proposto, inclusive, o uso do AR concomitante ao T3, associado ou não com metimazol (inibidor de peroxidases), com a finalidade de diminuir a expressão do NIS na tireóide e melhorar a eficácia da radioiodoterapia no câncer de mama (WAPNIR *et al.*, 2004); uma vez que altas doses de T3 são capazes de suprimir a transcrição do gene de TSH β (WOLF, 2002). Entretanto, como apresentado, o próprio AR parece exercer efeito direto na glândula tireóide aumentando a captação de iodeto, ou seja, a administração de T3 pode não contribuir para a melhora da eficácia da radioiodoterapia no câncer de mama. Novos estudos também estão sendo realizados utilizando ligantes de receptores retinóides X e de receptores ativados por proliferação de peroxissomas (PPAR γ), fatores de transcrição pertencentes à família de receptores nucleares, os quais têm sua expressão aumentada em células tumorais de mama. Em células tumorais de mama o All-*trans*-AR e o 9-*cis*-AR em associação com ligantes de PPAR γ , foram também capazes de induzir tanto a diferenciação celular como a apoptose nestas células, além de inibir o crescimento do tumor. Agonistas de RXR em altas doses são capazes de suprimir o eixo dos hormônios tireóideos, propiciando dessa forma, uma melhora da terapia com o iodo radioativo no câncer de mama (BONOFIGLIO *et al.*, 2009). Cabe ressaltar que a expressão dos receptores de AR difere em diversos tipos de carcinomas (HAUGEN *et al.*, 2004) e que a indução do NIS por retinóides parece ser decorrente da ligação do isômero All-*trans*-AR nos receptores RAR β e RXR α em células tumorais de mama ou por mecanismos não-genômicos (OHASHI *et al.*, 2009).

Contudo, a presença do NIS no tecido tumoral não deve ser o único fator considerado para avaliar a eficácia do tratamento radioativo, igualmente relevante é a sua localização. Este transportador deve estar posicionado na membrana basal. Dohan e

colaboradores (2001), através de imunohistoquímica, observaram aumento da expressão do NIS com o tratamento com o AR em várias amostras carcinomatosas; entretanto, o transportador estava localizado não somente na membrana basal, mas, principalmente, no compartimento intracelular. Não menos importante que a expressão do NIS na membrana basal, é a expressão de outras proteínas relacionadas à organificação, como TPO e Duox. Diferente de outros tecidos capazes de concentrar iodo, a tireóide consegue acumular de forma prolongada o iodo, devido à rápida organificação, ou seja, a sua ligação às proteínas. Entretanto, proteínas responsáveis pela organificação do iodo devem estar expressas e possuírem atividade para garantir que o iodo permaneça no tireócito. A aplicação terapêutica de radioiodo depende também da sua captação e da permanência de uma dose suficiente no tumor e é necessário que o iodo seja, portanto, organificado no tireócito.

Isto posto, quantificamos o conteúdo de iodo radioativo tireóideo 2 horas após sua administração, o que corresponde à capacidade de transporte e organificação do iodo na glândula tireóide (FERREIRA *et al.*, 2005). A captação de 2 horas de iodo radioativo diminuiu significativamente com o isômero ácido *All-trans*-retinóico por 14 dias na dose de 100µg/kg PC e por 7 dias de tratamento na dose de 1,5mg/kg PC, retornando a valores normais com 28 dias de tratamento. O fato de diminuir a captação de 2 horas de iodo radioativo com o isômero *All-trans*-AR poderia ser reflexo da diminuição da atividade da TPO ou da diminuição de H₂O₂ gerado pela Duox com o tratamento por 14 dias. Namba *et al.*, em 1993, analisando os efeitos do ácido retinóico em tireócitos provenientes de tireóide de pacientes com Graves, verificaram que o ácido retinóico inibe a síntese de tireoperoxidase, suprimindo a expressão de genes específicos da tireóide. Além disso, retinóides são capazes de inibir o metabolismo de iodeto estimulado pelo TSH, diminuindo

tanto a captação de iodeto como a sua organificação, através da diminuição do estímulo de TSH sobre a expressão da TPO, em cultura de células de tireóide porcinas. Essa inibição ocorre devido à redução de AMPcíclico, via de ação do TSH (ARAI *et al.*, 1991). Porém, como descrito anteriormente, Tuncel e colaboradores, em 2007, verificaram que o All-*trans*-AR, em linhagem de células tireóideas normais de ratos, aumenta os níveis de RNA mensageiro para TPO e Tg. Os estudos sugerem assim, que o ácido retinóico tem ações diferentes em linhagem de células normais e tumorais da tireóide (TUNCEL *et al.*, 2007). Foi relatado que os receptores envolvidos com a resposta ao ácido retinóico em linhagem de células tumorais da tireóide são o RAR β e o RXR γ , sendo que RXR γ não é encontrado em linhagem de células normais da tireóide (HAUGEN *et al.*, 2004).

Avaliando a atividade da enzima TPO em tireóide normal de ratos, verificamos que o uso dos isômeros do ácido retinóico, em ambas as dosagens, não alterou sua atividade. Entretanto, em nosso estudo anterior com ratas, o tratamento por 28 dias com o isômero 13-*cis*-AR diminuiu significativamente a atividade dessa enzima (SILVA *et al.*, 2009). Dados da literatura são, inclusive, controversos quanto aos efeitos do ácido retinóico sobre a expressão da TPO. Alguns autores verificaram que o ácido retinóico inibe a síntese de tireoperoxidase em tireócitos provenientes de tireóide de pacientes com Graves (NAMBA *et al.*, 1993), enquanto outros autores afirmam que o uso de ácido retinóico em linhagem de células tireóideas normais de ratos aumenta os níveis de RNA mensageiro para TPO (TUNCEL *et al.*, 2007).

Como nossos resultados demonstraram que o tratamento com o AR não afetou a atividade da TPO, a diminuição da organificação do iodo avaliado pela captação de 2 horas de iodo radioativo ocorreu, provavelmente, devido à diminuição da produção de peróxido de hidrogênio, uma vez que a oxidação e a organificação do iodo são reações

catalisadas pela enzima TPO e sua atividade depende da geração de peróxido de hidrogênio pela Duox; sendo a disponibilidade de H_2O_2 uma etapa limitante da organificação do iodeto (CARDOSO *et al.*, 2001). A atividade da enzima Duox diminui com o tratamento com o isômero *All-trans-AR* na dose de $100\mu\text{g/kg}$ PC por 14 dias e na dose de $1,5\text{mg/kg}$ PC por 7 dias, enquanto a função do NIS e a atividade da TPO não foram afetadas, sugerindo desta forma, uma redução da organificação do iodo.

Isso demonstra a importância da duração do tratamento com o ácido retinóico e do isômero utilizado para atingir o efeito desejado. Não basta que o radioiodo entre no tireócito, este deve permanecer na tireóide para a radioiodoterapia ter eficácia. Neste estudo demonstramos que o isômero *13-cis-AR* também aumentou significativamente a captação de radioiodo com ambas as doses utilizadas por 28 dias de tratamento. A captação de radioiodo após 15 minutos da sua administração pode ser utilizada para avaliar o transporte basolateral do iodo através do NIS (FERREIRA *et al.*, 2005). Contudo, o conteúdo de radioiodo aumentou, porém não significativamente, apenas nos ratos tratados com a alta dose de *13-cis-AR* e com a dose baixa por 14 dias. Este resultado reforça o conceito que um aumento na função do NIS não necessariamente resulta em um aumento do conteúdo de radioiodo no tireócito. Neste contexto, a geração de H_2O_2 aumentou em ratos tratados com a baixa dose do isômero *13-cis-AR* por 14 dias, enfatizando novamente a importância da atividade da Duox como etapa limitante na organificação do iodo.

Cabe ressaltar que, pela primeira vez, foi apresentado o efeito regulatório do ácido retinóico na atividade da oxidase dual. Segundo Lambeth e colaboradores (2007), a expressão da Duox1 e da Duox2 é regulada tanto em células tireóideas como extratireóideas por uma região promotora com 150 bp no primeiro exon da Duox 1 e com

250 bp da Duox2. Em tireócitos de cães e porcos, o AMPc é capaz de aumentar a proteína e o RNAm da Duox (DE DEKEN *et al.*, 2000; MORAND *et al.*, 2003). Entretanto, não há nenhum estudo sobre o efeito do AR na expressão ou atividade da Duox. No entanto, um efeito do ácido retinóico sobre o promotor da Duox não pode ser excluído, sugerindo que mais estudos são necessários para elucidar o mecanismo pelo qual o AR tem efeito na atividade da Duox.

Com todos os resultados analisados, é inegável que o ácido retinóico pode exercer efeitos diretos sobre a função da tireóide normal e que esses efeitos parecem ser dose, isômero e tempo-dependentes, sugerindo que a resposta possa mudar, devido a mudanças no repertório de receptores, ao longo do tratamento. Assim, devem-se considerar os efeitos que o ácido retinóico pode provocar diretamente na tireóide de pacientes que fazem uso, tanto oncológico como dermatológico, desta medicação.

CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que o ácido retinóico exerce ação direta sobre a função da tireóide e da hipófise *in vivo*. Na hipófise o isômero 13-*cis*-AR, na dose de 100µg/kg PC ao dia, é capaz de diminuir o peso da glândula durante 14 dias de tratamento, porém este efeito é transitório e não parece afetar a secreção de TSH.

A atividade da D1 hipofisária diminui significativamente com o uso de ambos os isômeros do ácido retinóico durante 14 dias de tratamento em ratos, normalizando sua atividade após 28 dias de tratamento, efeito também transitório.

Na tireóide, o AR exerce efeitos diretos causando diminuição do peso da glândula na dose mais alta por um período mais longo, apesar do TSH normal.

A captação de iodo pelo tireócito, *in vivo*, é aumentada quando administrado o isômero 13-*cis*-AR, em ambas as doses, por 28 dias de tratamento. Contudo, um aumento na função do NIS não necessariamente resulta em um aumento do conteúdo de radioiodo no tireócito.

O ácido retinóico apresenta efeito regulatório na atividade da Duox, uma vez que o tratamento por 14 dias com o *All-trans*-AR, com ambas as doses, diminui a atividade da enzima, sugerindo uma redução da organificação do iodo.

O uso do ácido retinóico por 28 dias de tratamento não afeta a função tireóidea de ratos.

É inegável que o ácido retinóico tem efeitos diretos sobre a função da tireóide normal *in vivo*; entretanto, cabe ressaltar que esses efeitos parecem ser dose, isômero e tempo-dependentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEVES, C. VALVERDE-R, C. (1989). Type I, 5'-monodeiodinase activity in the lactating mammary gland. **Endocrinology**, 124: 2818-2820.
- AMEZIANE-EL-HASSANI, R.; MORAND, S.; BOUCHER, J.L.; FRAPART, Y.M.; APOSTOLOU, D.; AGNALDJI, D.; GNIDEHOU, S.; OHAYON, R.; NOEL-HUDSON, M.S.; FRANCON, J.; LALAOUI, K.; VIRION, A.; DUPUY, C. (2005). Dual oxidase-2 has an intrinsic Ca²⁺ dependent H₂O₂ generating activity. **Journal of Biological Chemistry**, 280: 30046-30054.
- ANGIONI, A. R.; LANIA, A.; CATTANEO, A.; BECK-PECCOZ, P.; SPADA, A. (2005). Effects of chronic retinoid administration on pituitary function. **Journal of Endocrinological Investigation**, 28: 961-664.
- ALOTAIBI, H.; YAMAN, E. Ç.; DEMIRPENÇE, E.; TAZEBAY, U. H. Unliganded estrogen receptor- α activates transcription of the mammary gland Na⁺/I⁻ symporter gene.(2006). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 345: 1487-1496.
- ARAI, M.; TSUSHIMA, T.; ISOZAKI, O.; SHIZUME, K.; EMOTO, N.; DEMURA, H.; MIYAKAWA, M.; ONODA, N. (1991). Effects of retinoids on iodine metabolism, thyroid peroxidase gene expression, and deoxyribonucleic acid synthesis in porcine thyroid cells in culture. **Endocrinology**, 129 (6): 2827-2833.
- BECKETT, G. J.; BEDDOWS, S. E.; MORRICE, P. C.; NICOL, F.; ARTHUR, J. R. (1987). Inhibition of hepatic deiodination of thyroxine is caused by selenium deficiency in rats. **The Biochemical Journal**, 248: 443-447.
- BEDARD, K.; KRAUSE, K.M. (2007). The nox family of ros-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiological Reviews**, 87 (1): 245-313.
- BERRY, M.J.; BANU, L.; LARSEN, P.R. (1991). Selenocysteine confers the biochemical properties of the type 1 iodothyronine deiodinase. **The Journal of Biological Chemistry**, 266: 14155-14158.

- BERRY, M. J.; GRIECO, D.; TAYLOR, B. A.; MAIA, A. L.; KIEFFER, J. D.; BEAMER, W.; GLOVER, E.; POLAND, A.; LARSEN, P. R. (1993). Physiological and Genetic Analyses of Inbred Mouse Strains with a Type I Iodothyronine 5'Deiodinase Deficiency. **The Journal of Clinical Investigation.**, 92: 1517-1528.
- BIANCO, A.C.; SALVATORE, D.; GEREBEN, B.; BERRY, M.J.; LARSEN, P.R. (2002). Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. **Endocrine Reviews**, 23 (1): 38-89.
- BONDIONI, S.; ANGIONI, A.R.; CORBETTA, S.; LOCATELLI, M.; FERRERO, S.; FERRANTE, E.; MANTOVANI, G.; OLGIATI, L.; BECK-PECCOZ, P.; SPADA, A.; LANIA, A.G. (2008). Effect of 9-*cis* retinoic acid on dopamine D2 receptor expression in pituitary adenoma cells. **Experimental Biology and Medicine**, 233: 439-446.
- BONOFILIO, D.; CIONE, E.; QI, H.; PINGITORE, A.; PERRI, M.; CATALANO, S.; VIZZA, D.; PANNO, M.L.; GENCHI, G.; FUQUA, S.A.W.; ANDÒ, S. (2009). Combined low doses of PPAR σ and RXR ligands trigger an intrinsic apoptotic pathway in human breast cancer cells. **The American Journal of Pathology**, 175 (3): 1270-1280.
- BREEN, J. J.; HICKOK, N.J.; GURR, J. A. (1997). The rat TSH β gene contains distinct response elements for regulation by retinoids and thyroid hormone. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 131: 137-146.
- BREITMAN, T.R.; SELONICK, S.E.; COLLINS, S.J. (1980). Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. **Medical Sciences**, 77 (5): 2936-2940.
- CARDOSO, L.C.; MARTINS, D.C.L.; FIGUEIREDO, M.D.L.; ROSENTHAL, D.; VAISMAN, M.; VIOLANTE, A.H.D.; CARVALHO, D.P. (2001). Ca²⁺ /nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent H₂O₂ generation is inhibited by iodide in human thyroids. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 86: 4339-4343.
- CARRASCO, N. (2005). Thyroid hormone synthesis. In: BRAVERMAN, L.; UTIGER, R. D. (editors). **Werner & Ingbar's. The thyroid: a fundamental and clinical text**. 9 ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, cap.4, p.37-52.

- CARVALHO, D.P.; DUPUY, C.; GORIN, Y.; LEGUE, O.; POMMIER, J.; HAYE, B.; VIRION, A. (1996). The Ca^{2+} and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent H_2O_2 generation system is induced by thyrotropin in porcine thyroid cells. **Endocrinology**, 137: 1007-1012.
- CARVALHO, D.P.; REGO, K. G. M.; ROSENTHAL, D. (1994). Thyroid peroxidase in dysmorphogenetic goiters with organification and thyroglobulin defects. **Thyroid**, 4: 421-426.
- CHO, J-Y.; LÉVEILLÉ, R.; KAO, R.; ROUSSET, B.; PARLOW, A. F.; BURAK Jr, W. E.; MAZZAFERRI, E. L.; JHIANG, S. (2000). Hormonal regulation of radioiodide uptake activity and Na^+/I^- symporter expression in mammary glands. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 85 (8): 2936-2943.
- COELHO, S. M.; CORBO, R.; BUESCU, A.; CARVALHO, D. P.; VAISMAN, M. (2003). Àcido retinóico: uma terapia promissora para carcinoma tireoideano desdiferenciado? **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, 47 (2):190-197.
- COELHO, S. M.; VAISMAN, M.; CARVALHO, D. P. (2004). Tumour re-differentiation effect of retinoic acid: a novel therapeutic approach for advanced thyroid cancer. **Current Pharmaceutical Design**, 10 (0):1-7.
- COYA, R.; CARRO, E.; MALLO, F.; DIÉGUEZ, C. (1997). Retinoic acid inhibits *in vivo* thyroid-stimulating hormone secretion. **Life Sciences**, 60 (16): 247-250.
- DAI, G.; LEVY, O.; CARRASCO, N. (1996). Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. **Nature**, 379: 458-460.
- DE DEKEN, X.; WANG, D.; MANY, M.C.; COSTAGLIOLA, S.; LIBERT, F.; VASSART, G.; DUMONT, J.E.; MIOT, F. (2000). Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. **The Journal of Biological Chemistry**, 275: 23227-23233.
- DE FELICE, M.; POSTIGLIONE, M.P.; DI LAURO, R. (2004). Minireview: thyrotropin receptor signaling in development and differentiation of the thyroid gland: insights from mouse models and human diseases. **Endocrinology**, 145: 4062-4067.

- DEL SENNO, L.; ROSSI, R.; GANDINI, D.; PIVA, R.; FRANCESCHETTI, P.; UBERTI, E. C. (1993). Retinoic acid-induced decrease of DNA synthesis and peroxidase mRNA levels in human thyroid cells expressing retinoic acid receptor alpha. **Life Sciences**, 53: 1039-1048.
- DOHÁN, O.; CARRASCO, N. (2003). Advances in Na⁺/I⁻ symporter (NIS) research in the thyroid and beyond. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 213: 59-70.
- DONDA, A.; REYMOND, F.; REY, F.; LEMARCHAND-BÉRAUD, T. (1990). Sex steroids modulate the pituitary parameters involved in the regulation of TSH secretion in the rat. **Acta Endocrinologica**, 122: 577-584.
- DUMONT, J.E.; VASSART, G. (2001). Thyroid regulatory factors. In: DeGROOT, L.J.; JAMESON, J.L. (editors). **Endocrinology**. Saunders Company, p. 1301-1319.
- EDENS, W. A.; SHARLING, L.; CHENG, G.; SHAPIRA, R.; KINKADE, J. M.; LEE, T. *et al.* (2001). Tyrosine cross-linking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain oxidase/peroxidase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91phox. **The Journal of Cell Biology**; 154: 879-91.
- ELISEI, R.; VIVALDI, A.; AGATE, L.; CIAMPI, R.; MOLINARO, E.; PIAMPIANI, P.; ROMEI, C.; FAVIANA, P.; BASOLO, F.; MICCOLI, P.; CAPODANNO, A.; COLLECCHI, P.; PACINI, F.; PINCHERA, A. (2005). *All-trans*-retinoic acid treatment inhibits the growth of retinoic acid receptor β messenger ribonucleic acid expressing thyroid cancer cell lines but does not reinduce the expression of thyroid-specific genes. **The Journal of Endocrinology and Metabolism**, 90 (4): 2403-2411.
- ESFANDIARI, A.; GAGELIN, C.; GAVARET, J. M.; PAVELKA, S.; LENNON, A. M.; PIERRE, M.; COURTIN, E. (1994). Induction of type III-deiodinase activity in astroglial cells by retinoids. **Glia**, 11 (3): 255-261.
- ESPOSITO, T.; CACCAVO, M.; CIANCI, A.; CARDONE, A.; ANGELINI, F.; VARRIALE, B. (2007). **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, 104: 143-153.
- FELIG, P.; BAXTER, J.D.; FROHMAN, L.A. (1995). **Endocrinology and Metabolism**. 3^a ed. McGraw-Hill. 1940 p. p 189-191.

- FERREIRA, A. C. F.; LIMA, L. P.; ARAÚJO, R. L.; MÜLLER, G.; ROCHA, R. P.; ROSENTHAL, D.; CARVALHO, D. P. (2005). Rapid regulation of thyroid sodium-iodide symporter activity by thyrotrophin and iodine. **Journal of Endocrinology**, 184: 69-76.
- FRIESEMA EC, GANGULY S, ABDALLA A, MANNING FOX JE, HALESTRAP AP, VISSER TJ (2003). Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. **The Journal of Biological Chemistry**. 10;278(41):40128-35.
- FRIESEMA EC, JANSEN J, VISSER TJ. (2005) Thyroid hormone transporters. **Biochemical Society Transactions**. 33(Pt 1):228-32.
- FROHLICH, E.; BROSSART, P.; WAHL, R. (2001). Effects of retinoids on porcine thyrocytes under different culture conditions. **The Histochemical Journal**, 33 (5): 295-304.
- GARCIA-SOLES, P.; ACEVES, C. (2003). 5'- Deiodinase in two breast cancer cell lines: effect of triiodothyronine, isoproterenol and retinoids. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 201: 25-31.
- GEISEN, C.; DENK, Q.; GREUN, B.; BAUST C.; KARGER, A.; BOLLAG, W. *et al.* (1997). High-level of the retinoic acid receptor beta gene in normal cells of the uterine cervix is regulated by the retinoic acid receptor alpha and is abnormally down-regulated in cervical carcinoma cells. **Cancer Research**, 57: 1460-1467.
- GEREBEN, B.; ZAVACKI, A.M.; RIBICH, S.; KIM, B.W.; HUANG, S.A.; SIMONIDES, W.S.; ZEÖLD, A.; BIANCO, A.C. (2008). Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. **Endocrine Reviews**, 29 (7): 898-938.
- GERMAIN, P.; CHAMBON, P.; EICHELE, G.; EVANS, R.M.; LAZAR, M.A.; LEID, M.; DE LERA, A.R.; LOTAN, R.; MANGELSDORF, D.J.; GRONEMEYER, H. (2006a). International Union of Pharmacology. LX. Retinoid Acid Receptors. **Pharmacological Reviews**, 58: 712-725.
- GERMAIN, P.; CHAMBON, P.; EICHELE, G.; EVANS, R.M.; LAZAR, M.A.; LEID, M.; DE LERA, A.R.; LOTAN, R.; MANGELSDORF, D.J.; GRONEMEYER, H. (2006b). International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X Receptors. **Pharmacological Reviews**, 58: 760-772.

- GIGUERE, V. (1994). Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins: complex interplay in retinoid signaling. **Endocrine Reviews**, 15 (1): 61-79.
- GINABREDA, M.G.; CARDOSO, L.C.; NOBREGA, F.M.; FERREIRA, A.C.F.; DOMINGOS, M.; GONÇALVES, C.; VAISMAN, M.; CARVALHO, D.P. (2008). Negative correlation between thyroperoxidase and dual oxidase H₂O₂-generation activities in thyroid nodular lesions. **European Journal of Endocrinology**, 158: 223-227.
- GNIDEHOU, S.; CAILLOU, B.; TALBOT, M.; OHAYON, R.; KANIEWSKI, J.; NOEL-HUDSON, M.S.; MORAND, S.; AGNANGJI, D.; SEZAN, A.; COURTIN, F.; VIRION, A.; DUPUY, C. (2004). Iodotyrosine dehalogenase 1 (DEHAL 1) is a transmembrane protein involved in the recycling of iodide close to the thyroglobulin iodination site. **The FASEB Journal**, 18: 1574-1576.
- GOGLIA, F. (2005). Biological effects of 3,5-diiodothyronine (T2). *Biochemistry (Mosc)*. 70: 164-172. In: GEREBEN, B.; ZAVACKI, A.M.; RIBICH, S.; KIM, B.W.; HUANG, S.A.; SIMONIDES, W.S.; ZEÖLD, A.; BIANCO, A.C. (2008). Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. **Endocrine Reviews**, 29 (7): 898-938.
- GRAF, N.; RIESINGER, P.; REINHARD, H. (1995). Retinoids in the treatment of acute promyelocytic leukemia. Review of the Literature. *Klin Padiatr.*, 207: 43-47. In: LOTAN, R. 1996. Retinoids in cancer chemoprevention. **FASEB Journal**, 10: 1031-1039.
- GRASBERGER, H.; REFETOFF, S. (2006). Identification of the maturation factor for dual oxidase: evolution of an eukaryotic operon equivalent. **Journal of Biological Chemistry**, 281: 18269-18272.
- GRÜNING, T.; TIEPOLT, C.; ZOPHEL, K.; BREDOW, J.; KROPP, J.; FRANKE, W. G. (2003). Retinoic acid for differentiation of thyroid cancer – does it hold its promise? **European Journal of Endocrinology**, 148: 395-402.
- GRÜNWARD, F.; MENZEL, C.; BENDER, H.; PALMEDO, H.; OTTE, R.; FIMMERS, R.; RISSE, J.; BIERSACK, H. J. (1998). Redifferentiation therapy-induced radioiodine uptake in thyroid cancer. **The Journal of Nuclear Medicine**, 39 (11):1903-1906.

- HANSEN, L.A.; SIGMAN, C.C.; ANDREOLA, F.; ROSS, S.A.; KELLOFF G.J.; DE LEA, L.M. (2000). Retinoids in chemoprevention and differentiation therapy. **Carcinogenesis**, 21: 1271-1279.
- HAUGEN, B. R.; LARSON, L. L., PUGAZHENTHI, U., HAYS, W. R., KLOPPER, J. P., KRAMER, C. A., SHARMA, V. (2004). Retinoic acid and retinoid X receptors are differentially expressed in thyroid cancer and thyroid carcinoma cell lines and predict response to treatment with retinoids. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 89 (1): 272-280.
- HEYMAN, R. A.; MANGELSDORF, D. J.; DYCK, J. A.; STEIN, R. B.; EICHELE, G.; EVANS, R. M.; THALLER, C. (1992). 9-cis-retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid x receptor. **Cell**, 68: 397-406.
- HOFTIJZER, H.C.; LIU, Y.Y.; MORREAU, H.; VAN WEZEL, T.; PEREIRA, A.M.; CORSSMIT, E.P.M.; ROMIJN, J.A.; SMIT, J.W.A. (2009). Retinoic acid receptor and retinoid x receptor subtype expression for the differential diagnosis of thyroid neoplasms. **European Journal of Endocrinology**, 60 (4): 631-638.
- ISHIKAWA, J.; SUTOH, C.; ISHIKAWA, A.; KAGECHIKA, H.; HIRANO, H.; NAKAMURA, S. (2008). 13-cis-retinoic acid alters the cellular morphology of slice-cultured serotonergic neurons in the rat. **The European Journal of Neuroscience**, 27 (9): 2363-2372
- JEONG, H.; KIM, Y-R.; KIM, K-N.; CHOE, J-G.; CHUNG, J-K.; KIM, M-K. (2006). Effect of all-*trans* retinoic acid on sodium/iodide symporter expression radioiodine uptake and gene expression profiles in a human anaplastic thyroid carcinoma cell line. **Nuclear Medicine and Biology**, 33: 875-882.
- KAGECHIKA, H.; SHUDO, K. (2005). Synthetic retinoids: recent developments concerning structure and clinical utility. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 19: 5875-5883.
- KOGAI, T.; SCHULTZ, J. J.; JOHNSON, L. S.; HUANG, M.; BRENT, G. A. (2000). Retinoic acid induces sodium/iodide symporter gene expression and radioiodide uptake in the MCF-7 breast cancer cell line. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 97 (15): 8519-8524.

- KOGAI, T.; KANAMOTO, Y.; CHE, L. H.; TAKI, K.; MOATAMED, F.; SCHULTZ, J. J.; BRENT, G. A. (2004). Systemic retinoic acid treatment induces sodium/iodide symporter expression and radioiodide uptake in mouse breast cancer models. **Cancer Research**, 64 (1): 415-422.
- KOGAI, T.; OHASHI, E.; JACOBS, M. S. ; SAJID-CROCKETT, S. ; FISHER, M.L.; KANAMOTO, Y.; BRENT, G.A. (2008). Retinoic acid stimulation of the sodium/iodide symporter in MCF-7 breast cancer cells is mediated by the insulin growth factor-I/phosphatidylinositol 3-kinase and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 93 (5): 1884-1892.
- KOPP, P. (1999). Pendred's syndrome: identification of the genetic defect a century after its recognition. **Thyroid**, 9: 65-69.
- KÖHRLE, J. (1999). Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 151: 103-119.
- KÖHRLE, J. (2000). The selenoenzyme family of deiodinase isozymes controls local thyroid hormone availability. *Rev. Endocr. Metab. Disord*, 1: 49-58.
- LACROIX, L.; POURCHER, T.; MAGNON, C.; BELLON, N. ; TALBOT, M. ; INTARAPHAIROT, T. ; CAILLOW, B. ; SCHLUMBERGER, M. ; BIDART, J-M. (2004). Expression of the apical iodide transporter in human thyroid tissues : a comparison study with other iodide transporters. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 89 (3): 1423-1428.
- LAMBETH, J. D. (2002). Nox/Duox family of nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) oxidases. **Current Opinion in Hematology**; 9: 11-17.
- LAMBETH J.D., KAWAHARA T., DIEBOLD B. (2007). Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. **Free Radical Biology and Medicine**, 43(3):319-31.
- LARSEN, P. R.; DAVIES, F. T.; SCHLUMBERGER, M-J.; HAY, D. I. (2008). Thyroid physiology and diagnostic evaluation of patients with thyroid disorders. In: KRONENBERG, H. M.; MELMED, S.; POLONSKY, K.; LARSEN, P. R. **Williams**

Textbook of Endocrinology, 11 ed. Saunders Elsevier, Philadelphia, cap. 10, p. 299-332. 1909 p.

LEONARD, J. L.; VISSER, T. J. (1986). Biochemistry of deiodination. In: HENNENMANN, G. **Thyroid Hormone Metabolism**, 8 ed. Dekker, New York, p. 189-230.

LIU, S.; OGILVIE, K.M.; KLAUSING, K.; LAWSON, M.A.; JOLLEY, D.; LI, D.; BILAKOVICS, J.; PASCUAL, B.; HEIN, N.; URCAN, M.; LEIBOWITZ, M.D. (2002). Mechanism of selective retinoid x receptor agonist-induced hypothyroidism in the rat. **Endocrinology**, 143 (8): 2880-2885.

LOTAN, R. 1996. Retinoids in cancer chemoprevention. **FASEB Journal**, 10: 1031-1039.

MAIA, A.L.; KIM, B.W.; HUANG, S.A.; HARNEY, J.W.; LARSEN, P.R. (2005). Type 2 iodothyronine deiodinase is the major source of plasma T3 in euthyroid humans. **The Journal of Clinical Investigation**, 115: 2524-2588.

MARASSI, M.P.; FORTUNATO, R.S.; SILVA, A.C.M.; PEREIRA, V.S.; CARVALHO, D.P.; ROSENTHAL, D.; COSTA, V.M.C. (2007). Sexual dimorphism in thyroid function and type 1 iodothyronine deiodinase activity in pre-pubertal and adult rats. **Journal of Endocrinology**, 192: 121-130.

MARCUS, M.; COULSTON, A. M. (2000). Fat-soluble vitamins: vitamins A, K and E. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G., Eds. **Goodman and Gilman's The Pharmacologic Basis of Therapeutics**. 10 ed. Mc Graw Hill, p.1773-1792.

MARILL, J.; CAPRON, C.; IDRES, N.; CHABOT, G. (2001). Human cytochrome P450s involved in the metabolism of 9-cis- and 13-cis-retinoic acids. **Biochemical Pharmacology**, 63: 933-94.

MIASAKI, F.Y.; CIAMPI, V.A.; AGATE, R.; COLLECCHI, L.; CAPODANNO, P.; PINCHERA, A.; ELISEI, R.A. (2008). Retinoic acid receptor beta 2 re-expression and growth inhibition in thyroid carcinoma cell lines after 5-Aza-2'-deoxycytidine treatment. **Journal of Endocrinological Investigation**, 31: 724-730.

- MORAND, S.; CHAARAOU, M.; KANIEWSKI, J.; DÈME, D.; OHAYON, R.; NOEL-HUDSON, M.S.; VIRION, A.; DUPUY, C. (2003). Effect of iodide on nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity and duox2 protein expression in isolated porcine thyroid follicles. **Endocrinology**, 144 (4): 1241-1248.
- MOURA, E. G.; RAMOS, C. F.; NASCIMENTO, C. C.; ROSENTHAL, D.; BREITENBACH, M. M. (1987). Thyroid function in fasting rats: variations in ¹³¹I uptake and transient decrease in peroxidase activity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 20 (3-4): 407-410.
- NAMBA, H.; YAMASHITA, S.; MORITA, S.; VILLADOLID, M. C.; KIMURA, H.; YOKOYAMA, N.; IZUMI, M.; ISHIKAWA, N.; ITO, K.; NAGATAKI, S. (1993). Retinoic acid inhibits human thyroid peroxidase and thyroglobulin gene expression in cultured human thyrocytes. **Journal of Endocrinological Investigation**, 16 (2): 87-93.
- NAPOLI, J. L. (1999). Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism. Review. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1440: 139-162.
- OHASHI, E.; KOGAI, T.; KAGECHIKA, H.; BRENT, G.A. (2009). Activation of the PI3 kinase pathway by retinoic acid mediates sodium/iodide symporter induction and iodide transport in MCF-7 breast cancer cells. **Cancer Research**, 69 (8): 3443-3450.
- ORTIGA, T. M. R. (1992). Secreção in vitro de tireotrofina basal e pós-TRH de adenohipófises de ratos hipo e hipertireóides. Monografia apresentada no Instituto de Biologia (UERJ) para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.
- PÁEZ-PEREDA, M.; KOVALOVSKY, D.; HOPFNER, U.; THEODOROPOULOU, M.; PAGOTTO, U.; UHL, E.; LOSA, M.; STALLA, J.; GRÜBLER, Y.; MISSALE, C.; ARZT, E.; STALLA, G. K. (2001). Retinoic acid prevents experimental Cushing syndrome. **The Journal of Clinical Investigation**, 108 (8): 1123-1131.
- PALLUD, S.; RAMAUGÉ, M.; GAVARET, J. M.; LENNON, A. M.; MUNSCH, N.; St. GERMAIN, D. L.; PIERRE, M.; COURTIN, F. (1999). Regulation of type 3 iodothyronine deiodinase expression in cultured rat astrocytes: role of the Erk cascade. **Endocrinology**, 140 (6): 2917-2923.

- PECK, G.L.; OLSEN, T.G.; YODER, F.W.; STRAUSS, J.S.; DROWING, D.T.; PANDYA, M.; BUTKUS, D.; ARNAUD-BATTANDIER, J. (1979). Prolonged remissions of cystic and conglobate acne with 13-*cis*-retinoic acid. **The New England Journal of Medicine**, 300 (7): 329-333.
- PISAREV, M. A. (1985). Thyroid Autoregulation. **Journal of Endocrinological Investigation**, 8: 475-484.
- QI, J-S; DESAI-YAJNIK, V.; GREENE, M. E.; RAAKA, B. M.; SAMUELS, H. H. (1995). The ligand-binding domains of the thyroid hormone/retinoid receptor gene subfamily function *in vivo* to mediate heterodimerization, gene silencing, and transactivation. **Molecular and Cellular Biology**, 15 (3): 1817-1825.
- REFETTOFF, S.; NICOLOFF, J. T. (1995). The thyroid hormones transport and metabolism. In: DE GROOT, L. J. **Endocrinology**, 3 ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia, v.1, p. 560-582.
- RIEDEL, C.; LEVY, O.; CARRASCO, N. (2001). Post-transcriptional regulation of the sodium/iodide symporter by thyrotropin. **The Journal of Biological Chemistry**, 276 (24): 21458-21463.
- ROSS, S.A.; McCAFFERY, P.J.; DRAGER, U.C.; DE LUCA, L.M. (2000). Retinoids in embryonal development. **Physiological Reviews**, 80 (3): 1021-1054.
- SAGAZIO, A.; PIANTEDOSI, R.; ALBA, M.; BLANER, W.S.; SALVATORI, R. (2007). Vitamin A deficiency does not influence longitudinal growth in mice. **Nutrition**, 23: 483-488.
- SALVATORE, D. BARTHA, T.; HARNEY, J. W.; LARSEN, P. R. (1996). Molecular biological and biochemical characterization of the human type 2 selenodeiodinase. **Endocrinology**, 137: 3308-3315.
- SAMPAIO, S.; RIVITTI, E.A. (2000). **Dermatologia**. 2. ed. São Paulo: Artes Médicas.

- SCHMUTZLER, C.; BRTKO, J.; BIENERT, K.; KÖHRLE, J. (1996). Effects of retinoids and role of retinoic acid receptors in human thyroid carcinomas and cell lines derived therefrom. **Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes**, 104 (4): 16-19.
- SCHMUTZLER, C.; WINZER, R.; MEISSNER-WEIGL, J.; KÖHRLE, J. (1997). Retinoic acid increases sodium/iodide symporter mRNA levels in human thyroid cancer cell lines and suppress expression of functional symporter in nontransformed FRTL-5 rat thyroid cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 240: 832-838.
- SCHMUTZLER, C. (2001). Regulation of the sodium/iodide symporter by retinoids – a review. **Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes**, 109 (1): 41-44.
- SCHMUTZLER, C.; HOANG-VU; RUGER B.; KOHRLE, J. (2004). Human thyroid carcinoma cell lines show different retinoic acid receptors and retinoid responses. **European Journal of Endocrinology**, 150: 547-556.
- SCHNEIDER, M. J.; FIERING, S. N.; THAI, B.; WU, S-Y.; GERMAIN, E. St.; PARLOW, A. F.; GERMAIN, D. L. St.; GALTON, V. A. (2006). Targeted disruption of the type 1 selenodeiodinase gene (Dio 1) results in marked changes in thyroid hormone economy in mice. **Endocrinology**, v. 147, n. 1: 580-589.
- SCHRECK, R.; SCHNIEDERS, F.; SCHMUTZLER, C.; KÖHRLE, J. (1994). Retinoids stimulate type I iodothyronine 5'-deiodinase activity in human follicular thyroid carcinoma cell lines. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 79 (3): 791-798.
- SCHROEDER, M.; ZOUBOULIS, C. C. (2007). All-*trans*-retinoic acid and 13-*cis*-retinoic acid: pharmacokinetics and biological activity in different cell culture models of human keratinocytes. **Hormone and Metabolic Research**, 39: 136-140.
- SHADU, D. P.; BRODY, S. (1947). Excess vitamin A ingestion, thyroid size and energy metabolism. *The American Journal of Physiology*, 149: 400-404. In: SHARMA, V.; HAYS, W. R.; WOOD, W. M.; PUGAZHENTHI, U.; St. GERMAIN, D. L.; BIANCO, A. C.; KREZEL, W.; CHAMBON, P.; HAUGEN, B. R. (2006). Effects of retinoids on thyrotropic function and the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. **Endocrinology**, 147 (3): 1438-1451.

- SILVA, A.C.M.; MARASSI, M.P.; MÜHLBAUER, M.; LOURENÇO, A.L.; CARVALHO, D.P.; FERREIRA, A.C.F. (2009). Retinoic acid effects on thyroid function of female rats. **Life Sciences**, 84: 673-677.
- SIMON, D.; KÖHRLE, J.; SCHMUTZLER, C.; MAINZ, K.; REINERS, C.; RÖHER, H. –D. (1996). Redifferentiation therapy of differentiated thyroid carcinoma with retinoic acid: basics and first clinical results. **Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes**. 104 (4): 13-15.
- SIMON, D.; KOHRLE, J.; REINERS, C.; BOERNER, A. R.; SCHMUTZLER, C.; MAINZ, K.; GORETSKI, P. E.; ROEHER, H. D. (1998). Redifferentiation therapy with retinoids – a therapeutic option in advanced follicular and papillar thyroid carcinoma? **World Journal of Surgery**, 22: 569-574.
- SIMON, D. .; KÖRBER, C.; KRAUSCH, M.; SEGERING, J.; GROTH, P.; GÖRGES, R.; GRÜNWARD, F.; MÜLLER-GÄRTNER, H.W.; SCHMUTZLER, C.; KÖHRLE, J.; RÖHER, H.D.; REINERS, C. (2002). Clinical impact of retinoids in redifferentiation therapy of advanced thyroid cancer: final results of a pilot study. **European Journal of Nuclear Medicine**, 29 (6) 775-782.
- SMANIK, P.A.; LIU, Q.; FURMINGER, T.L.; RYU, K.; XING, S.; MAZZAFERRI, E.L.; JHIANG, S.M. (1996). Cloning of the human sodium iodide symporter. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 226 (2): 339-345.
- SOUZA, E.C.L. (2008). **Modulação da captação de iodeto e da expressão de receptores de ácido retinóico (RAR e RXR) pela tireotrofina e pelo ácido retinóico em células tireóideas normais PCCL3**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Fisiologia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.
- TANOSAKI, S.; IKEZOE, T.; HEANEY, A.; SAID, J. W.; DAN, K.; AKASHI, M.; KOEFFLER, H. P. (2003). Effect of ligands of nuclear hormone receptors on sodium/iodide symporter expression and activity in breast cancer cells. **Breast Cancer Research and Treatment**, 79: 335-345.
- TAUROG, A.; DORRIS, M.L.; DOERGE, D.R. (1996). Mechanism of simultaneous iodination and coupling catalyzed by thyroid peroxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 330: 24-32.

- THACHER, S. M.; VASUDEVAN, J.; CHANDRARATNA, R. A. (2000). Therapeutic applications for ligands of retinoid receptors. **Current Pharmaceutical Design**, 6(1): 25-58.
- TUNCEL, M.; AYDIN, D.; YAMAN, E.; TAZEBAY, U. H.; GÜÇ, D.; DOĞAN, L.; TAŞBASAN, B.; UĞUR, Ö. (2007). The comparative effects of gene modulators on thyroid-specific genes and radioiodine uptake. **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals**, 22 (3): 443-449.
- TSUKADA, M.; SCHRÖDER, M.; ROOS, T.C.; CHANDRARATNA, R.A.S.; REICHERT, U.; MERCK, H.F.; ORFANOS, C.E.; ZOUBOULIS, C.C. (2000). 13-*cis* retinoic acid exerts its specific activity on human sebocytes through selective intracellular isomerization to All-*trans* retinoic acid and binding to retinoid acid receptors. **The Journal of Investigative Dermatology**, 115 (2): 321-327.
- UNTERHOLZNER, S.; WILLHAUCK, M. J.; CENGIC, N.; SCHÜTZ, M.; GÖKE, B.; MORRIS, J. C.; SPITZWEG, C. (2006). Dexamethasone stimulation of retinoic acid-induced sodium iodide symporter expression and cytotoxicity of ¹³¹I in breast cancer cells. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 91 (1): 69-78.
- URBACH, J.; RANDO, R.R. (1994). Isomerization of *all-trans*-retinoic acid to *9-cis*-retinoic acid. **The Biochemical Journal**, 299: 459-465.
- UTIGER, R. D. (2001). The thyroid: Physiology, thyrotoxicosis, hypothyroidism and the painful thyroid. In: FELIG, P. and FROHMAN, L. A. **Endocrinology and Metabolism**, 4 ed. Mc Graw-Hill, New York, cap. 9, p. 259-330.
- VAISMAN, M.; ROSENTHAL, D.; CARVALHO, D. P. (2004). Enzimas envolvidas na organificação tireoideana do iodo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, 48 (1): 9-15.
- VAN HERLE, A. J.; AGATEP, M. L.; PADUA, D. N.; TOTANES, T. L.; CANLAPAN, D. V.; HERLE, H. M. L.; JUILLARD, G. J. F. (1990). Effects of 13-*cis*-retinoic acid on growth and differentiation of human follicular carcinoma cells (UCLA RO 82 W-1) in vitro. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 71 (3): 755-763.

- VAN DEN HOVE, M-F.; CROIZET-BERGER, K.; JOURET, F.; GUGGINO, S. E.; GUGGINO, W. B.; DEVUYST, O.; COURTOY, P. (2006). The loss of the chloride channel, CIC-5, delays apical iodide efflux and induces a euthyroid goiter in the mouse thyroid gland. **Endocrinology**, 147 (3): 12871296.
- VIVALDI, A.; MIASAKI, F.Y.; CIAMPI, R.; AGATE, L.; COLLECCHI, P.; CAPODANNO, A.; PINCHERA, A.; ELISEI, R. (2009). Re-differentiation of thyroid carcinoma cell lines treated with 5-Aza-2'-deoxycytidine and retinoic acid. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 307: 142-148.
- WAPNIR, I.; GORIS, M.; YUDD, A.; DOHAN, O.; ADELMAN, D.; NOWELS, K.; CARRASCO, N. (2004). The Na⁺/I⁻ symporter mediates iodide uptake in breast cancer metastases and can be selectively down-regulated in the thyroid. **Clinical Cancer Research**, 10: 4294-4302.
- WARD, A.; BROGDEN, R. N.; HEEL, R. C.; SPEIGHT, T. M.; AVERY, G. S. (1984). Isotretinoin. A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in acne and other skin disorders. **Drugs**, 28 (1): 6-37.
- WILLHAUCK, M. J.; SHARIF-SAMANI, B.; SENEKOWITSCH-SCHMIDTKE, R.; WUNDERLICH, N.; GÖKE, B.; MORRIS, J. C.; SPITZWEG, C. (2008). Functional sodium iodide symporter expression in breast cancer xenografts in vivo after systemic treatment with retinoic acid and dexamethasone. **Breast Cancer Research and Treatment**, 109 (2): 263-272.
- WOLF, G. (2002). The regulation of the thyroid-stimulating hormone of the anterior pituitary gland by thyroid hormone and by 9-*cis*-retinoic acid. **Nutrition Reviews**, 60 (12): 374-377.
- WOLF, G. (2006). Is 9-*cis*-Retinoic Acid the Endogenous Ligand for the Retinoic Acid-X-Receptor? **Nutrition Reviews**, 64 (12): 532-538.
- YEN, P. M. (2001). Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. **Physiological Reviews**, 81: 1097-1142.
- ZHANG, X-K.; LIU, Y.; LEE, M-O. (1996). Retinoid receptors in human lung cancer and breast cancer. **Mutation Research**, 350: 267-277.

ZIOUZENKOVA, O.; ORASANU, G.; SHARLACH, M.; AKIYAMA, T. E.; BERGER, J. P.; VIERECK, J.; HAMILTON, J. A.; TANG, G.; DOLNIKOWSKI, G. G.; VOGEL, S.; DUESTER, G.; PLUTZKY, J. (2007). Retinaldehyde represses adipogenesis and diet-induced obesity. **Nature Medicine**, 13 (6): 695-702.

ZOUBOULIS, C. C. (2001a). Exploration of retinoid activity and the role of inflammation in acne: issues affecting future directions for acne therapy. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, 15 (3): 63-67.

ZOUBOULIS, C. C. (2001b). Retinoids – which dermatological indications will benefit in the near future? **Journal of Pharmacological and Biophysiological Research**, 14 (5): 303-315.

ANEXOS

Enviado à revista:

Journal of Endocrinology.

**RETINOIC ACID MODULATION OF THYROID DUAL OXIDASE ACTIVITY IN RATS
AND ITS IMPACT ON THYROID IODINE ORGANIFICATION**

¹Mônica Mühlbauer, ¹Alba Cenélia Matos da Silva, ¹Michelle Porto Marassi, ²Alexandre Lopes Lourenço, ¹Andrea Claudia Freitas Ferreira and ¹Denise Pires de Carvalho.

¹Laboratório de Fisiologia Endócrina, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho; ²Laboratório de Produtos Naturais, Instituto de Farmacologia Básica e Clínica; Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

Correspondence:

Andrea Claudia Freitas Ferreira

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

CCS - Bloco G - Cidade Universitária, Ilha do Fundão

Rio de Janeiro, 21949-900, Brasil

tel : 55 21 25626552

fax : 55 21 22808193

e-mail : deiaclau@biof.ufrj.br

Short title: Effect of retinoic acid on thyroid DuOx activity

Key words: retinoic acid (RA), dual oxidase (DuOx), thyroperoxidase (TPO), sodium-iodide symporter (NIS), thyroid.

ABSTRACT

The sodium iodide symporter (NIS) mediates iodide uptake into the thyrocytes, which is important for the diagnosis and therapy of thyroid disorders. Decreased ability to uptake iodide in thyroid carcinomas reduces the efficacy of radioiodine therapy, and retinoic acid (RA) treatment re-induces iodide uptake. The effectiveness of treatment depends not only on iodide uptake, but also on the ability of thyrocytes to organify iodine, which is catalyzed by thyroperoxidase (TPO) in the presence of H₂O₂, generated by dual oxidase (DuOx). Our goal was to determine the influence of RA on thyroid iodide uptake, iodine organification, and TPO and DuOx activities in normal rats. Normal rats were treated with all-*trans*-RA or 13-*cis*-RA (100 or 1500µg/100g b.w., s.c.) for 14 and 28 days. The 2h thyroid radioiodine content was significantly decreased in rats treated with all-*trans*-RA 100µg/100g b.w. for 14 days. In this group, NIS function and TPO activity were unchanged, whereas DuOx activity was significantly decreased, which might have contributed to the decrease in iodine organification. Both doses of 13-*cis*-RA for 28 days increased the 15 min thyroid radioiodine uptake. However, the 2h thyroid radioiodide uptake was increased only in rats treated with the highest dose of 13-*cis*-RA. While TPO activity did not change, H₂O₂ generation was increased in this group. Since radioiodine half-life in the thyroid gland is important for treatment efficacy, our results highlight the importance of correctly choosing the RA isomer, the time and the dose of treatment, in order to improve the efficacy of radioiodine therapy.

INTRODUCTION

The content of iodine in the thyroid gland depends on the presence of proteins that are necessary for iodide uptake through the basolateral membrane of thyrocytes and its incorporation into the acceptor protein thyroglobulin (Tg) at the apical surface of these cells (DeGroot LJ & Niepomniszcze 1977; Kopp 2005). The sodium-iodide symporter (NIS) is responsible for iodide uptake through the thyroid cell basolateral membrane against its electrochemical gradient. At the apical pole of thyrocytes, intracellular iodide is transported through pendrin (PDS) (Royaux *et al.* 2000) into the follicular lumen and then incorporated into Tg. Iodide oxidation and organification occur at the apical surface of the follicular cell and these reactions are catalyzed by thyroperoxidase (TPO) in the presence of hydrogen peroxide. Thus, thyroid iodide organification depends on TPO activity, which is modulated by the concentration of iodide, and hydrogen peroxide (DeGroot LJ & Niepomniszcze 1977; Kopp 2005). In the presence of sufficient amounts of iodine, the limiting step for thyroid hormone biosynthesis is the availability of H₂O₂, which is generated by thyroid dual oxidase (DuOx) (Corvilain *et al.* 1991; Dupuy *et al.* 1999).

Treatment with RA was shown to increase NIS, TPO and Thyroglobulin (Tg) mRNA levels in cancer cell lines and to decrease NIS mRNA levels and iodide uptake in normal rat thyroid cell line (Schmutzler *et al.* 1997). In normal thyroid cell line, RA reduces TSH receptor mRNA levels and increases TPO and Tg mRNA levels (Schmutzler *et al.* 1997; Kurebayashi *et al.* 2000). On the other hand, some authors demonstrated that RA suppress the accumulation of TPO and Tg mRNA stimulated by TSH in a time- and dose-dependent manner in cultures of human thyrocytes (Arai *et al.* 1991; del Senno *et al.* 1993; Namba *et al.* 1993; del Senno *et al.* 1994). However, the possible effect of retinoic acid on thyroid dual oxidase (DuOx) has not been assessed so far.

RA is widely used in dermatological treatment and thyroid cancer management (Vershoore *et al.* 1993; Coelho *et al.* 2004), although the effects of this drug on normal thyroid function are

poorly defined. We have recently demonstrated that 13-*cis*-retinoic acid is able to increase thyroid radioiodide uptake in normal female rats (Silva *et al.* 2009), however the effect on the thyroid of male rats was not evaluated.

Therefore, the aim of the present study was to analyze the influence of RA treatment on thyroid iodide uptake, TPO and DuOx activities in male rats.

MATERIALS AND METHODS

Materials

All-*trans*- and 13-*cis*-retinoic acid were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Tris(hydroxymethyl)aminomethan, glucose and potassium iodide were from Merck (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Fetal bovine serum was purchased from Cultilab (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Glucose oxidase (Grade I) was from Boehringer (Mannheim, Germany) and Na- ¹²⁵I was purchased from Amersham (Buckinghamshire, England).

Animals

Adult male Wistar rats weighing 250-300g were housed under controlled conditions of temperature (24 ± 1°C) and light (12h light starting at 7:00 a.m.) with water and food *ad libitum*. The study conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No.85-23, revised 1996) and was approved by the Institutional Animal Welfare Committee (CAUAP/UFRJ).

Rats were randomly divided into the following groups: control, all-*trans*-retinoic acid (all-*trans*-RA) and 13-*cis*-retinoic acid (13-*cis*-RA). Retinoic acid was administered in the dose of

100µg/kg body weight (B.W.), subcutaneously, daily, for 14 days according to Coya *et al.* (1997) and in the doses 100µg/kg and 1500µg/kg body weight for 28 days. The dose of 1500µg/kg body weight is similar to that used in the treatment of thyroid cancer in humans (Coelho *et al.* 2004). Both all-*trans*- and 13-*cis*-RA were dissolved in DMSO and suspended in propylene glycol (1:1, v/v). Rats from all experimental groups were sacrificed 24 h after the last injection.

TPO preparation

TPO extraction from rat thyroids was performed as previously described (Moura *et al.* 1989; Ferreira *et al.* 2005). Pools of two rat thyroids were minced and homogenized in 0.5 ml 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.2, containing 1 mM KI, using an Ultra-Turrax homogenizer (Staufen, Germany). The homogenate was centrifuged at 100,000 g, 4°C for 1 h. The pellet was suspended in 0.5 ml digitonin (1%, w/v) and incubated at 4°C for 24 h to solubilize the peroxidase. The digitonin-treated suspension was centrifuged at 100,000 g, 4°C for 1 h, and the supernatant containing the solubilized TPO was used for the assays. Protein content was determined by the method of Bradford (1976).

Thyroid peroxidase activity

The TPO iodide-oxidation activity was measured as previously described, (Nakashima and Taurog 1978; Pommier 1978; Moura *et al.* 1989; Carvalho *et al.* 1994; Ferreira *et al.* 2005). The assay mixture contained: 1.0 ml of freshly prepared 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 24 mM KI and 11 mM glucose, and increasing amounts (20 to 80 µl) of solubilized TPO. The final volume was adjusted to 2.0 ml with 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, and

the reaction was started by the addition of 10 μ l of 0.1% glucose oxidase (Boehringer Grade I). The increase in absorbance at 353 nm (tri-iodide production) was registered for 4 min on a Hitachi spectrophotometer (U-3300). The $\Delta A_{353\text{nm}}/\text{min}$ was determined from the linear portion of the reaction curve and one unit (U) of TPO corresponds to $\Delta A_{353\text{nm}}/\text{min} = 1.0$. The enzymatic activity is expressed as U/g protein.

DuOx preparation

For dual oxidase (DuOx) preparation, the excised thyroid glands remained at 4 C for 24h in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.2, containing 0.25 M sucrose, 0.5 mM DTT, 1 mM EGTA, 5 μ g/ml aprotinin and 34,8 μ g/ml PMSF before homogenization. Then, the homogenate was centrifuged at 100,000 g for 35 min at 4°C and resuspended in 0.5 ml 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.2, containing 0.25 M sucrose, 2 mM MgCl₂, 5 μ g/ml aprotinin and 34,8 μ g/ml PMSF and stored at -20°C until H₂O₂ generation measurements.

Ca²⁺ and NADPH-dependent H₂O₂ generating activity – Dual oxidase activity

H₂O₂ production was measured as previously described (Leseney *et al.* 1999; Cardoso *et al.* 2001). We incubated samples of thyroid particulate fractions at 30°C, in 1 ml 170 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 1 mM sodium azide, 1 mM EGTA, 1 μ M FAD and 1.5 mM CaCl₂. The addition of 0.2 mM NADPH started the reaction; aliquots of 100 μ l were collected at intervals up to 20 minutes, and mixed with 10 μ l 3 N HCl to stop the reaction and destroy the remaining NADPH. Initial rates of H₂O₂ formation were determined from eight aliquots of each assay by following the decrease in 0.4 μ M scopoletin fluorescence in the presence of HRP (0.5

$\mu\text{g/ml}$) in 200 mM phosphate buffer, pH 7.8, in a Hitachi spectrofluorimeter (F 4000). The excitation and emission wavelengths were 360 and 460 nm, respectively. Specific activities were expressed per mg protein ($\text{nmoles H}_2\text{O}_2\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein).

Thyroid radioiodide content

We have previously shown that the measurement of radioiodide uptake 15 min after $^{125}\text{I-NaI}$ administration (short-term iodide uptake) reflects iodide transport through the sodium-iodide symporter, without influence of *in vivo* thyroid iodine organification activity (Ferreira *et al.* 2005; Lima *et al.* 2006). Thus, in order to evaluate the *in vivo* NIS function, the animals received $\text{Na-}^{125}\text{I}$ (3700 Bq, i.p., Amersham, Buckinghamshire, England) 15 min before decapitation. We also administered $\text{Na-}^{125}\text{I}$ (3700 Bq, i.p., Amersham, Buckinghamshire, England) 2 hours before decapitation, in order to evaluate both iodide transport and *in vivo* organification activities (thyroid iodine accumulation). In the thyroid, iodine organification is catalyzed by TPO and consists of binding of iodine to tyrosil residues of thyroglobulin, an essential step of thyroid hormone biosynthesis. The radioactivity of the thyroid glands was measured using a gamma counter (LKB) and expressed as percentage of total ^{125}I injected per mg of thyroid.

Statistical analysis

The experiments were repeated at least two times, using at least 3 animals per group in each experiment, so a total number of at least 6 animals per group was achieved. Results are expressed as mean \pm SEM and were analyzed by unpaired *t*-test. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS

14 days retinoic acid treatment

Short-term (15 minutes) thyroid radioiodide uptake was unchanged by the treatment with both isomers of RA in the low dose administered (100 μ g/100g b.w.) for two weeks (figure 1A), suggesting that retinoic acid did not affect NIS function in the period of time and dose used. On the other hand, treatment with all-*trans*-retinoic acid for two weeks produced a significant decrease in thyroid iodine accumulation (2h) (Figure 1B). TPO activity was not affected by the treatment with either isomers of RA for two weeks when compared to the control group, as shown in figure 1C. However, administration of the low dose of all-*trans*-retinoic acid (100 μ g/100g b.w.) for two weeks led to a significant decrease in H₂O₂ formation while treatment with 13-*cis*-retinoic acid had no effect (Figure 1D), suggesting an inhibitory effect of all-*trans*-retinoic acid on DuOx activity.

28 days retinoic acid treatment

All-*trans*-retinoic acid treatment did not affect 15 minutes thyroid radioiodide uptake (Figure 2A). However, treatment with 13-*cis*-retinoic acid for 28 days significantly increased NIS function in both doses (Figure 2B), as previously described for thyroid cancers (Coelho *et al.* 2004) and female rats (Silva *et al.* 2009).

Treatment with 13-*cis*-RA at the higher dose (1500 μ g/100g b.w.) for four weeks produced a significant increase in the 2h thyroid radioiodine content (Figure 2D), which was unchanged by treatment with all-*trans*-RA (Figure 2C).

While TPO activity was not affected by retinoic acid treatment in both doses (Figures 3A and 3B), DuOx activity was significantly increased in the thyroid of rats treated with 13-*cis*-RA in the dose of 1500 μ g/100g b.w. for four weeks (Figure 3D), but not with all-*trans*-RA (Figure 3C).

DISCUSSION

We have shown herein that retinoic acid may affect thyroid function not only by interfering with NIS function, but also by modulating dual oxidase activity. It is well documented that retinoic acid stimulates thyroid iodide uptake in human thyroid follicular carcinoma cells (Schmutzler 2001), thyroid cancer (Coelho *et al.* 2004) and thyroid gland of female rats (Silva *et al.* 2009). We now demonstrate that, although 28 days of treatment with 13-*cis*-retinoic acid stimulates radioiodide uptake, in fact, 14 days of all-*trans*-retinoic acid decreased thyroid iodide content, what has been shown to be related to decreased thyroid iodide organification. DuOx activity was reduced in this group while NIS function and TPO activity were not affected. It is known that the availability of H₂O₂ is a limiting step for iodine organification (Corvilain *et al.* 1991), so the decreased radioiodine content 2h after its administration might be related to the decreased DuOx activity. This result highlights the importance of the duration of treatment with retinoic acid and the isomer used in order to achieve the desirable effect. It is known that radioiodide uptake *per se* is important although not sufficient for its therapeutic effectiveness.

On the other hand, 13-*cis*-retinoic acid significantly increased radioiodide uptake in both doses used when the rats were treated for 28 days. Increased NIS function after RA treatment is in agreement with data shown by Schmutzler *et al.* (2002). However, the increased radioiodine content was only detected in rats treated with the highest dose of 13-*cis*-retinoic acid. This result reinforces

the concept that an increase in NIS function does not necessarily lead to increased thyroid radioiodine content. In this sense, H₂O₂ generation was increased in rats treated with the highest dose of 13-cis-retinoic acid for 28 days, showing again the importance of dual oxidase activity as a limiting step for iodine organification.

To our knowledge, we have reported herein for the first time the regulatory effect of retinoic acid on dual oxidase activity. As reviewed by Lambeth *et al.* (2007), Duox1 and Duox2 expression are regulated in both thyroid and non-thyroid cells by a promoter region within –150 bp of the first exon of Duox1 and within –250 bp of Duox2. In dog and pig thyrocytes, cAMP, which is a pathway downstream of the TSH receptor, increase Duox protein and mRNA (Dupuy *et al.* 1999; De Deken *et al.* 2000; Morand *et al.* 2003). However, no data about a retinoic acid responsive element in Duox promoter are available. Pailler-Rodde *et al.* (1991) have shown that retinoic acid induces an increase in PKC activity. Since Duox is a calcium-dependent NADPH oxidase (Dupuy *et al.* 1999; Carvalho *et al.* 1996; Ferreira *et al.* 2003; Ginabreda *et al.* 2008) 13-cis-retinoic acid could also increase Duox activity by a stimulatory effect on the calcium pathway. Nevertheless, a direct effect of retinoic acid on dual oxidase promoter cannot be excluded. Further experiments are needed to elucidate the mechanism underlying the effect of retinoic acid on dual oxidase activity.

In conclusion, our data suggest that treatment with RA produces direct effects on thyroid function that are dose, isomer and time-dependent. Treatment with 100µg/100g b.w. of all-trans-retinoic acid for 2 weeks reduced thyroid iodine content while treatment with 1500µg/100g b.w. of 13-cis-retinoic acid increase thyroid iodine content.

DECLARATION OF INTEREST

We declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

FUNDING

This work was supported by grants from CNPq, FAPERJ/SUS and FAPERJ/Pensa Rio.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful for the technical assistance of Norma Lima de Araújo Faria, Advaldo Nunes Bezerra and Wagner Nunes Bezerra. The authors declare that there is no conflict of interest that would prejudice the impartiality of this scientific work. Mônica Mühlbauer, Alba Cenélia Matos da Silva, Michelle Porto Marassi were recipients of fellowships from CAPES and CNPq.

REFERENCES

- Arai M, Tsushima T, Isozaki O, Shizume K, Emoto N, Demura H, Miyakawa M & Onoda N 1991 Effects of retinoids on iodine metabolism, thyroid peroxidase gene expression, and deoxyribonucleic acid synthesis in porcine thyroid cells in culture. *Endocrinology* **129** (6): 2827-2833.
- Bradford MM 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals of Biochemistry* **72**: 248-254.
- Cardoso LC, Martins DCL, Figueiredo MDL, Rosenthal D, Vaisman M, Violante AHD & Carvalho DP 2001 Ca^{2+} /nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent H_2O_2 generation is inhibited by iodide in human thyroids. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **86** 4339-4343.
- Carvalho DP, Rego KGM & Rosenthal D 1994 Thyroid peroxidase in dysmorphogenetic goiters with organification and thyroglobulin defects. *Thyroid* **4** 421-426.
- Carvalho-Guimarães DP, Ramos CF & Rosenthal D 1989 A technical improvement for the thyroid peroxidase iodination assay. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **22** 821-823.
- Coelho SM, Vaisman M & Carvalho DP 2004 Tumour re-differentiation effect of retinoic acid: a novel therapeutic approach for advanced thyroid cancer. *Current Pharmaceutical Design* **10**: 1-7.
- Corvilain B, Van Sande J, Laurent E & Dumont JE 1991 The H_2O_2 generating system modulates protein iodination and the activity of the pentose phosphate pathway in dog thyroid. *Endocrinology*. **128** 779-785.
- Corvilain B, Van Sande J, Laurent E & Dumont JE 1991 The H_2O_2 generating system modulates protein iodination and the activity of the pentose phosphate pathway in dog thyroid. *Endocrinology* **128** 779-785.

- Coya R, Carro E, Mallo F & Diéguez C 1997 Retinoic acid inhibits *in vivo* thyroid-stimulating hormone secretion. *Life Sciences* **60** 16: 247-250.
- De Deken X, Wang D, Many MC, Costagliola S, Libert F, Vassart G, Dumont JE & Miot F 2000 Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *Journal of Biological Chemistry* **275**:23227–23233.
- Dupuy C, Ohayon R, Valent A, Noël-Hudson MS, Dème D, Virion A 1999 Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cDNAs. *Journal of Biological Chemistry* **274** 37265-37269.
- DeGroot LJ & Niepomniszcze H 1977 Biosynthesis of thyroid hormone: basic and clinical aspects. *Metabolism* **26** 665-718.
- Del Senno L, Rossi R, Franceschetti P & Uberti EC 1994 Expression of all-trans-retinoic acid receptor RNA in human thyroid cells. *Biochemistry and Molecular Biology International* **33** (6): 1107-1115.
- Del Senno L, Rossi R, Gandini D, Piva R, Franceschetti P & Uberti EC 1993 Retinoic acid-induced decrease of DNA synthesis and peroxidase mRNA levels in human thyroid cells expressing retinoic acid receptor alpha. *Life Science* **53**: 1039-1048.
- Ferreira ACF, Lima LP, Araújo RL, Müller G, Rocha RP, Rosenthal D & Carvalho DP 2005 Rapid regulation of thyroid sodium-iodide symporter activity by thyrotrophin and iodine. *Journal of Endocrinology* **184**: 69-76.
- Ginabreda MGP, Cardoso LC, Nobrega FM, Ferreira ACF, Gonçalves MDC, Vaisman M & Carvalho DP 2008 Negative correlation between thyroperoxidase and dual oxidase H₂O₂-generating activities in thyroid nodular lesions. *European Journal of Endocrinology* **158**: 223-227.
- Grünwald F, Pakos E, Bender H, Menzel C, Otte R, Palmedo H & Pfeifer U 1998 Redifferentiation therapy with retinoic acid in follicular thyroid cancer. *Journal Nuclear Medicine* **39**: 1555-1558.

- Kaminsky SM, Levy O, Slavador C, Dai G & Carrasco N 1994 Na⁺/I⁻ symport activity is present in membrane vesicles from thyrotropin-deprived non-I⁻ transporting cultured thyroid cells. *PNAS* **91**: 3789-3793.
- Kopp P 2005 Thyroid Synthesis and Secretion: Thyroid Hormone Synthesis. In: *The Thyroid*, edn 9, ch. 4, pp 52-76. Eds LE Braverman & RD Utiger. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Kurebayashi J, Tanaka K, Otsuki T et al. 2000 All-trans-retinoic acid modulates expression levels of thyroglobulin and cytokines in a new human poorly differentiated papillary thyroid carcinoma cell line KTC-1. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **85** (8): 2889.
- Lambeth JD, Kawahara T, Diebold B 2007 Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. *Free Radic Biol Med.* **43**(3):319-31.
- Leseney AM, Dème D, Dupuy C, Ohayon R, Chanson P, Sales JP, Carvalho DP, Haye B & Virion A 1999 Biochemical characterization of a Ca²⁺ / NaD(P)H-dependent H₂O₂ generator in human thyroid tissue. *Biochimie* **81** 373-380.
- Lima LP, Barros IA, Lisbôa PC, Araújo RL, Silva AC, Rosenthal D, Ferreira AC & Carvalho DP 2006 Estrogen effects on thyroid iodide uptake and thyroperoxidase activity in normal and ovariectomized rats. *Steroids* **71** (8): 653-659.
- Milenkovic M, De Deken X, Jin L, De Felice M, Di Lauro R, Dumont JE, Corvilain B & Miot F 2007 Duox expression and related H₂O₂ measurement in mouse thyroid: onset in embryonic development and regulation by TSH in adult. *Journal of Endocrinology* **192**: 615-626.
- Morand S, Chaaoui M, Kaniewski J, Deme D, Ohayon R, Noel-Hudson MS, Virion A & Dupuy C 2003 Effect of iodide on nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity and Duox2 protein expression in isolated porcine thyroid follicles. *Endocrinology* **144**:1241–1248.

- Moura EG, Rosenthal D & Carvalho-Guimarães DP 1989 Thyroid peroxidase activity in human nodular goiters. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **22** 31-39.
- Nakashima T & Taurog A 1978 Improved assay procedures for thyroid peroxidase; applications to normal and adenomatous human thyroid tissue. *Clinica Chimica Acta* **83**:129-140.
- Namba H, Yamashita S, Morita S, Villadolid MC, Kimura H, Yokoyama N, Izumi M, Ishikawa N, Ito K & Nagataki S 1993 Retinoic acid inhibits human thyroid peroxidase and thyroglobulin gene expression in cultured human thyrocytes. *Journal of Endocrinological Investigation* **16** (2): 87-93.
- Pommier J 1978 Solubilization, purification, propriétés moléculaires et mécanisme d'action de la peroxidase thyroïdienne. In: *Méthodologie Experimentale en Physiologie et Physiopathologie Thyroïdienne*, pp 137-148. Eds R Hornek & J Nunez. Paris: INSERM.
- Riedel C, Levy O & Carrasco N 2001 Post-transcriptional regulation of the sodium/iodide symporter by thyrotropin. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 21458-21463.
- Royaux IE, Suzuki K, Mori A, Katoh R, Everett LA, Kohn LD & Green ED 2000 Pendrin, the protein encoded by the Pendred syndrome gene (PDS), is an apical porter of iodide in the thyroid and is regulated by thyroglobulin in FRTL-5 cells. *Endocrinology* **141** 839-845.
- Royaux IE, Suzuki K, Mori A, Katoh R, Everett LA, Kohn LD & Green ED 2000 Pendrin, the protein encoded by the Pendred syndrome gene (PDS), is an apical porter of iodide in the thyroid and is regulated by thyroglobulin in FRTL-5 cells. *Endocrinology* **141** 839-845.
- Schmutzler C, Schmitt TL, Glaser F, Loos U, Köhrle J 2002 The promoter of the human sodium/iodide-symporter gene responds to retinoic acid. *Molecular and Cellular Endocrinology* **189**(1-2), 145-155.
- Schmutzler C 2001 Regulation of the sodium/iodide symporter by retinoids – a review. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* **109**: 41-44.

- Schmutzler C, Brtko J, Bienert K & Köhrle J 1996 Effects of retinoids and role of retinoic acid receptors in human thyroid carcinomas and cell lines derived therefrom. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* **104**: 16-19.
- Schmutzler C, Winzer R, Meissner-Weigl J et al. 1997 Retinoic acid increases sodium/iodide symporter mRNA levels in human thyroid cancer cell lines and suppresses expression of functional symporter in nontransformed FRTL-5 rat thyroid cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **240** (3): 832.
- Silva AC, Marassi MP, Mühlbauer M, Lourenço AL, Carvalho DP & Ferreira AC 2009 Retinoic acid effects on thyroid function of female rats. *Life Science.* **84**(19-20):673-7.
- Simon D, Köhrle J, Schmutzler C, Mainz K, Reiners C & Röher HD 1996 Redifferentiation therapy of differentiated thyroid carcinoma with retinoic acid: basics and first clinical results. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* **104** 4: 13-15.
- Tuncel M, Aydin D, Yaman E, Tazebay UH, Güç D, Doğan AL, Tasbasan B & Uğur O 2007 The comparative effects of gene modulators on thyroid-specific genes and radioiodine uptake. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* **22** (3): 443-449.
- Verschoore M, Bouclier M, Czernielewski J & Hensby C 1993 Topical retinoids. Their uses in dermatology. *Dermatologic Clinics* **11** (1): 107-115.
- Willhauck MJ, Sharif-Samani B, Senekowitsch-Schmidtke R, Wunderlich N, Göke B, Morris JC & Spitzweg C 2008 Functional sodium iodide symporter expression in breast cancer xenografts in vivo after systemic treatment with retinoic acid and dexamethasone. *Breast Cancer Research Treatment* **109** (2): 263-272.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Effect of all-trans-retinoic acid and 13-cis-retinoic acid for 14 days, in the dose of 100µg/kg b.w., daily injections, sc, on some parameters of thyroid function. **A:** Short-term iodide uptake 15 minutes after radioiodide administration [Control (n=16), All-trans-RA (n=19), 13-cis-RA (n=19)]. **B:** Thyroid iodine accumulation 2 hour after radioiodide administration [Control (n=11), All-trans-RA (n=13), 13-cis-RA (n=13)]. * p<0.05 vs. Control and vs. 13-cis-RA100µg/kg b.w.. **C:** Thyroperoxidase iodide-oxidation activity [Control (n=27), All-trans-RA (n=32), 13-cis-RA (n=31)]. **D:** DuOx Ca⁺⁺-dependent H₂O₂-generating activity [Control (n=12), All-trans-RA (n=10), 13-cis-RA (n=12)]. * p<0.0001 vs. control and 13-cis-RA. Measurements were performed as described in Material and Methods. Data are expressed as mean ± S.E.M.

Figure 2: Effect of all-trans-retinoic acid and 13-cis-retinoic acid for 28 days, in the doses of 100 and 1500µg/kg b.w., daily injections, sc, on thyroid iodide uptake (15 min) and accumulation (2h). **A:** Short-term iodide uptake 15 minutes after radioiodide administration in rats treated with all-trans-retinoic acid [Control (n=17), All-trans-RA100µg/kg BW (n=11), All-trans-RA1500µg/kg b.w. (n=7)]. **B:** Short-term iodide uptake 15 minutes after radioiodide administration in rats treated with 13-cis-retinoic acid [Control (n=17), 13-cis-RA100µg/kg b.w. (n=11), 13-cis-RA1500µg/kg b.w. (n=7)]. * p<0.05 vs. control. **C:** Thyroid iodine accumulation 2 hour after radioiodide administration in rats treated with all-trans-retinoic acid [Control (n=24), All-trans-RA100µg/kg b.w. (n=12), All-trans-RA1500µg/kg b.w. (n=14)]. **D:** Thyroid iodine accumulation 2 hour after radioiodide administration in rats treated with 13-cis-retinoic acid [Control (n=24), 13-cis-

RA100 μ g/kg b.w. (n=12), 13-cis-RA1500 μ g/kg b.w. (n=14)]. * $p < 0.05$ vs. Control. Measurements were performed as described in Material and Methods. Data are expressed as mean \pm S.E.M.

Figure 3: Effect of all-trans-retinoic acid and 13-cis-retinoic acid for 28 days, in the doses of 100 and 1500 μ g/kg b.w., daily injections, sc, on thyroperoxidase and DuOx activities. **A:** Thyroperoxidase iodide-oxidation activity in the thyroid of rats treated with all-trans-retinoic acid [Control (n=26), All-trans-RA100 μ g/kg b.w. (n=23), All-trans-RA1500 μ g/kg b.w. (n=7)]. **B:** Thyroperoxidase iodide-oxidation activity in the thyroid of rats treated with 13-cis-retinoic acid [Control (n=26), 13-cis-RA100 μ g/kg b.w. (n=22), 13-cis-RA1500 μ g/kg b.w. (n=7)]. **C:** DuOx Ca⁺⁺-dependent H₂O₂-generating activity in the thyroid of rats treated with all-trans-retinoic acid [Control (n=17), All-trans-RA100 μ g/kg b.w. (n=9), All-trans-RA1500 μ g/kg b.w. (n=10)]. **D:** DuOx Ca⁺⁺-dependent H₂O₂-generating activity in the thyroid of rats treated with 13-cis-retinoic acid [Control (n=17), 13-cis-RA100 μ g/kg b.w. (n=7), 13-cis-RA1500 μ g/kg b.w. (n=10)]. * $p < 0.05$ vs. Control and vs. 13-cis-RA100 μ g/kg b.w. Measurements were performed as described in Material and Methods. Data are expressed as mean \pm S.E.M.

FIGURE 1

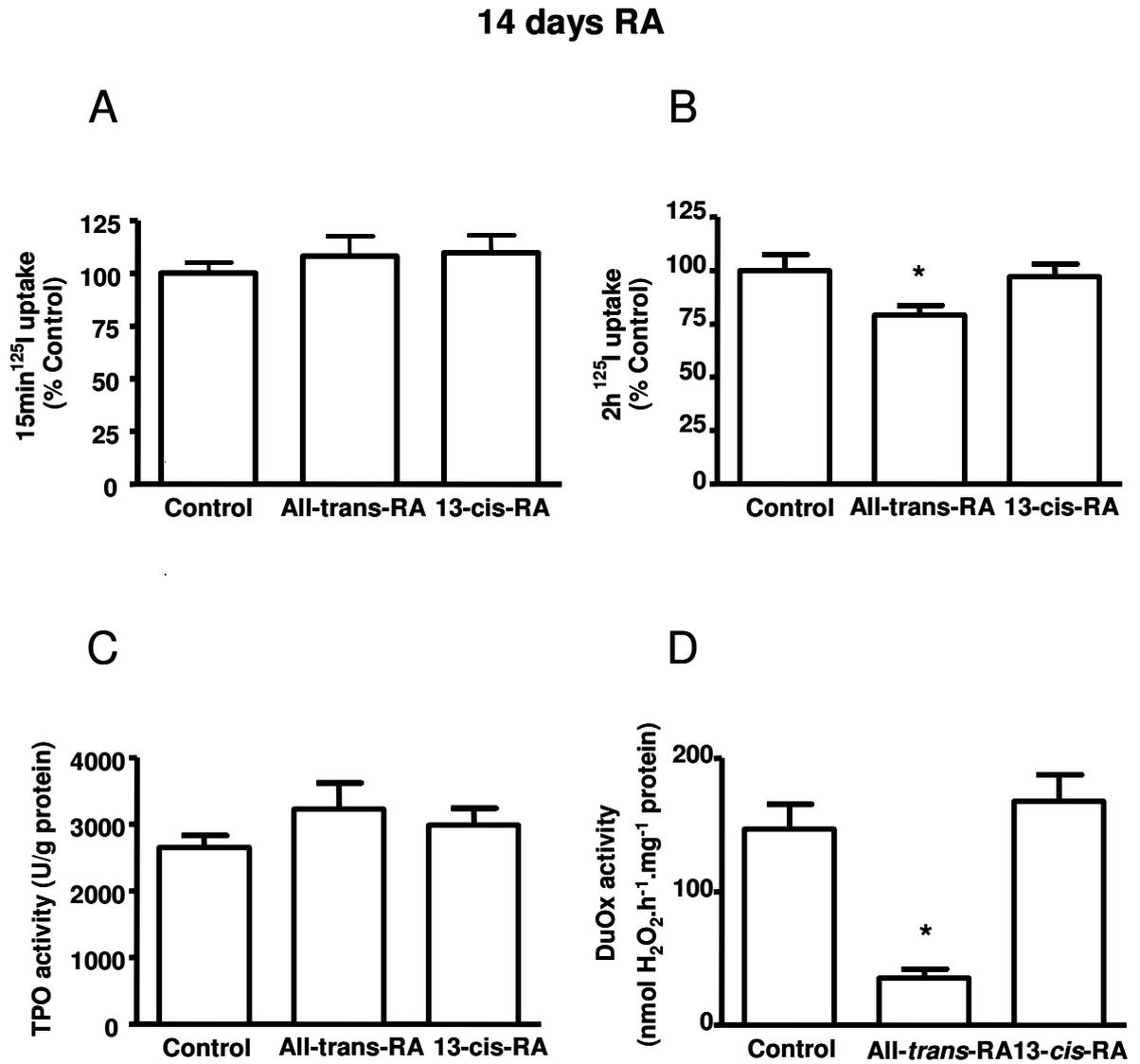


FIGURE 2

28 days RA

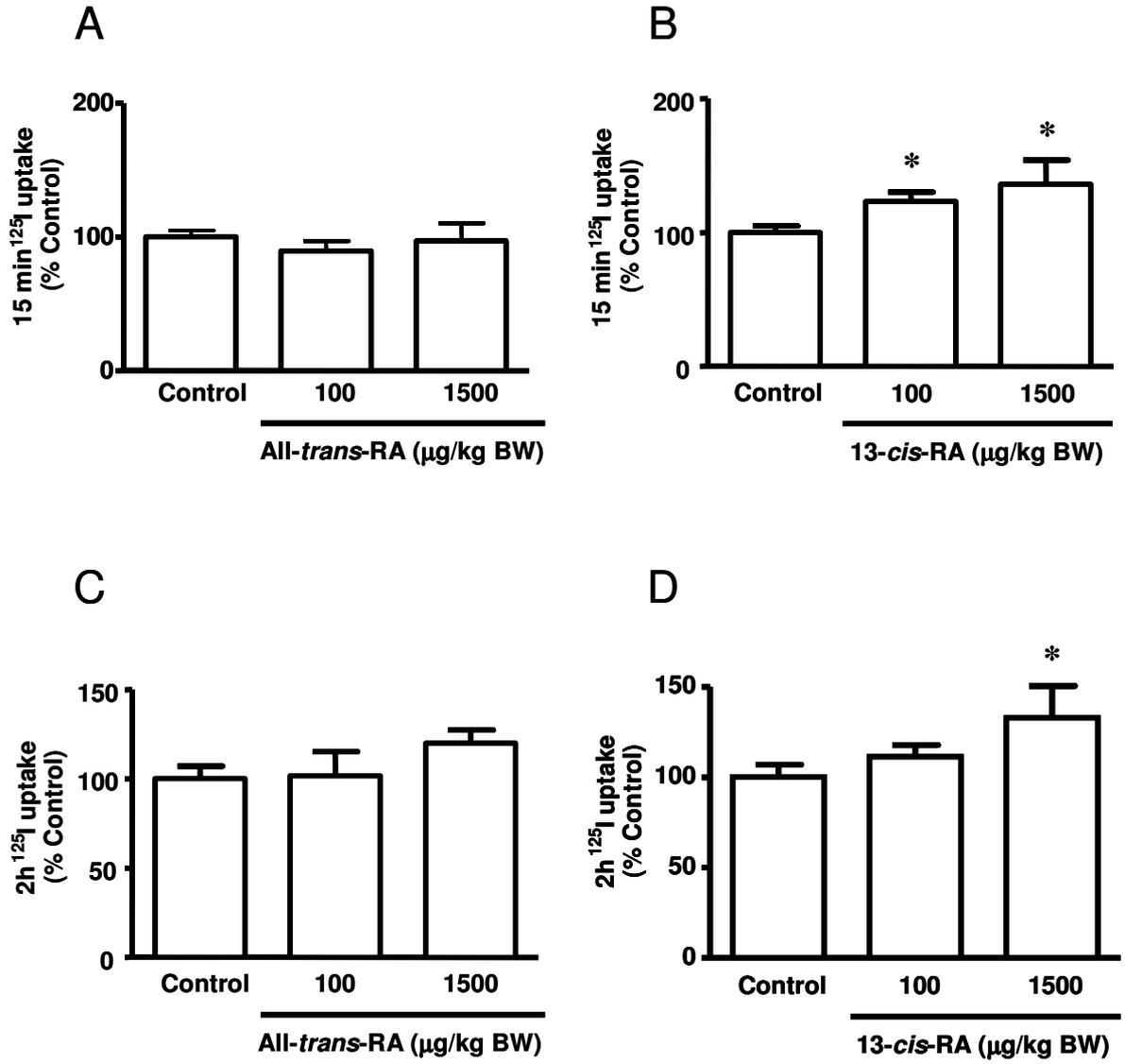
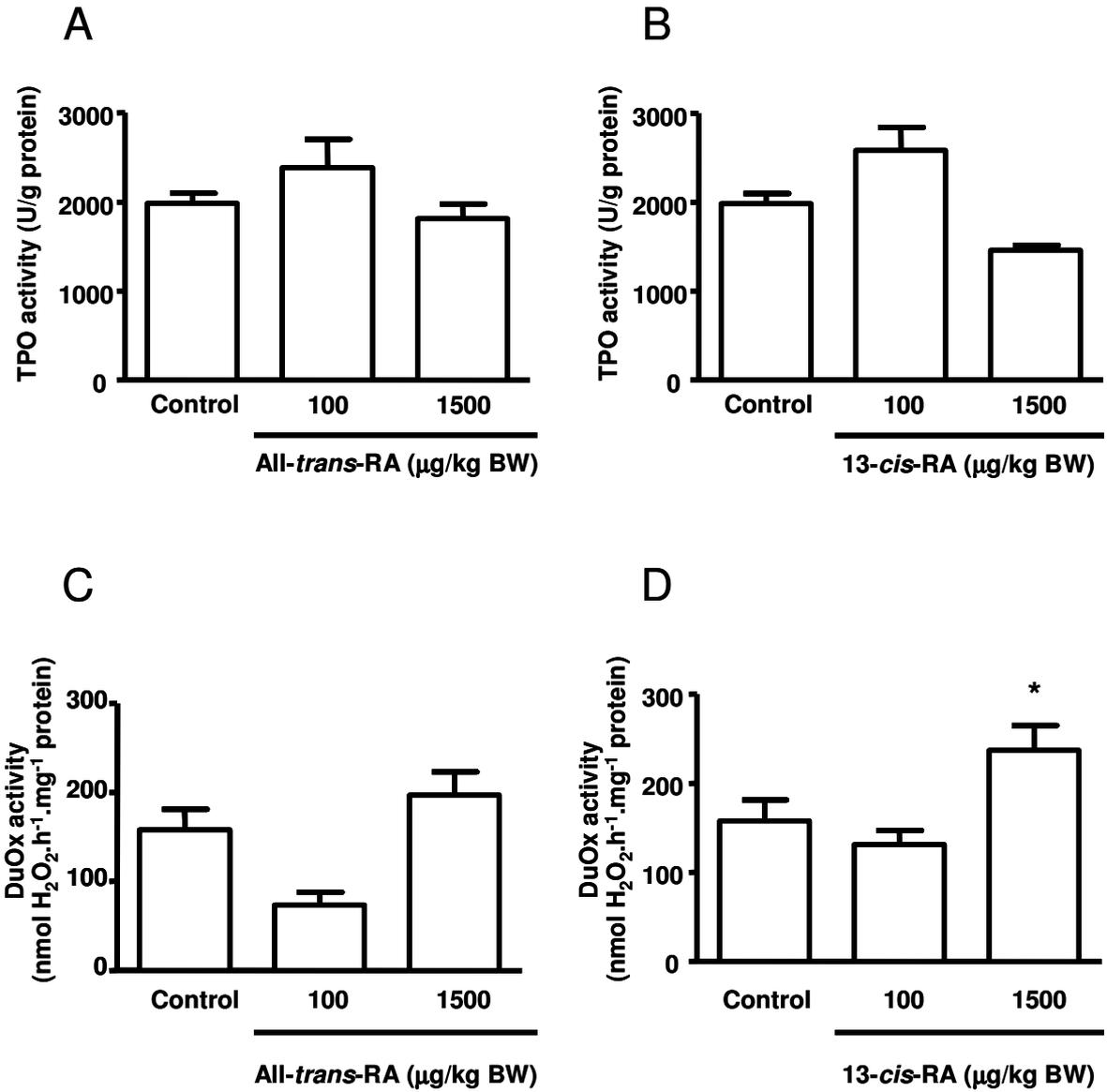


FIGURE 3**28 days RA**

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](#)