

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

**Expressão das Iodotironinas
Desiodases Tipos I e II em Diferentes Tecidos de
Camundongos Normais e com Deficiência Inata
para a Desiodase tipo I**

Márcia dos Santos Wagner



Porto Alegre
Setembro, 2001

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

**Expressão das Iodotironinas
Desiodases Tipos I e II em Diferentes Tecidos de
Camundongos Normais e com Deficiência Inata
para a Desiodase tipo I**

Márcia dos Santos Wagner

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Luiza Maia

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas: Fisiologia, UFRGS, como requisito
parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências
Biológicas – Fisiologia



Porto Alegre
Setembro, 2001

*Live as if you were to die tomorrow
Learn as if you were to live forever*

Gandhi

Dedico este trabalho a todas as pessoas que compartilham comigo a maravilhosa aventura da vida, especialmente meus filhos *Pedro* e *Gustavo*.

AGRADECIMENTOS

- Agradeço de forma especial a minha orientadora Prof^a Dr^a. Ana Luiza Maia, com quem aprendi os fundamentos da biologia molecular, pela sua amizade, exemplo de profissional dedicada ao conhecimento científico, pelo otimismo contagiante e por estar sempre disposta a compartilhar suas conquistas e a apoiar o crescimento dos que a cercam.
- Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia pelo apoio, colaboração e incentivo.
- Sou muito grata à Prof^a Dr^a Poli Mara Spritzer que disponibilizou toda a estrutura de seu laboratório de pesquisa e, desta forma, possibilitou a realização do presente trabalho.
- À Prof^a Dr^a Ilma Simoni Brum da Silva pelo agradável convívio, pronta cooperação sempre obtida e, especialmente, pelas valiosas sugestões para a realização dos *Northern blots*.
- Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas – Endocrinologia pela atmosfera de amizade com que fui recebida em seu meio.

- Sou extremamente grata aos bolsistas de iniciação científica, Ryoko Morimoto e Alexssandro Bennemann, pela dedicação e imprescindível ajuda na rotina do laboratório que foram importantíssimas para a realização do presente trabalho.
- A todos os colegas do Laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Endocrinologiado do HCPA pela amizade e colaboração.
- À minha mãe, Ellyda, pelo amor, dedicação e constante incentivo ao desenvolvimento intelectual de seus filhos.
- Ao Mário, meu marido, por inúmeras razões, mas principalmente pelo seu amor, compreensão e apoio que tornaram-me uma pessoa mais feliz e tranquila.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - Classificação e Características das Iodotironinas Desiodases.....	4
1.2 - Clonagem dos cDNAs das Iodotironinas Desiodases.....	7
1.3 - Localização e Estrutura dos Genes das Desiodases.....	9
1.4 - Padrão de Expressão e Papel Fisiológico das Desiodases.....	10
<i>1.4.1 - Iodotironina Desiodase Tipo I.....</i>	<i>11</i>
<i>1.4.2 - Iodotironina Desiodase Tipo II</i>	<i>11</i>
<i>1.4.3 - Iodotironina Desiodase Tipo III.....</i>	<i>12</i>
1.5 - Regulação das Iodotironinas Desiodases em Resposta a Alterações no Status dos Hormônios Tireoidianos	13
1.6 - Regulação Transcricional e Pós-Transcricional das Desiodases	14
1.7 - Modelo Animal com Deficiência Inata para Desiodase Tipo I	15
2 - JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	19
3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 - Animais	23
3.2 - Tratamento dos Animais.....	24

3.3 – Dosagens Hormonais	24
3.4 – Preparação do RNA.....	25
3.5 – Avaliação dos Níveis de mRNA da Iodotironina Desiodase Tipo II por Northern Blot.....	27
3.5.1 – <i>Preparação das Amostras de RNA e Eletroforese.....</i>	28
3.5.2 – <i>Transferência do RNA do Gel para a Membrana.....</i>	28
3.5.3 – <i>Hibridização.....</i>	29
3.5.4 – <i>Preparação e Marcação das Sondas de cDNA.....</i>	30
3.6 – Avaliação dos Níveis de mRNA das Iodotironinas Desiodases Tipos I e II por RT-PCR	31
3.6.1 – <i>Síntese de cDNA</i>	32
3.6.2 – <i>Oligonucleotídeos Específicos.....</i>	33
3.6.3 – <i>Amplificação por PCR do cDNA Alvo.....</i>	34
3.6.4 – <i>Controle da Especificidade da Amplificação</i>	35
3.6.5 – <i>Análise dos Produtos da PCR</i>	36
3.7 – Análise Estatística	36
4 – RESULTADOS	37
4.1 – Determinação do Padrão de Expressão dos Genes das Iodotironinas Desiodases Tipos I e II em Diferentes Tecidos de Camundongos	38
4.2 – Níveis Séricos dos Hormônios Tireoidianos	42
4.3 – Efeitos das Alterações no Status dos Hormônios Tireoidianos Sobre os Níveis de mRNA das Desiodases Tipos I e II.....	43
4.4 – Estudo Comparativo dos Níveis de Expressão do mRNA da D2 em Diferentes Tecidos de Camundongos Normais e com Deficiência Inata para Desiodase Tipo I	50
5 – DISCUSSÃO	57
6 – CONCLUSÕES	73
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

LISTA DE ABREVIATURAS

AthG	aurotilglicose
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
C3H	camundongo tipo C3H/HeJ
C57	camundongo tipo C57BL/6J
D1	iodotironina desiodase tipo I
D2	iodotironina desiodase tipo II
D3	iodotironina desiodase tipo III
dCTP	desoxi citosina tri-fosfato
DEPC	dietil pirocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucléico
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
kb	quilobases
kd	quilodaltons
M	molar
MOPS	ácido 3-N-morfolinopropanosulfônico
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
pb	pares de bases
PTU	propiltiuracil
rT ₃	T ₃ reverso
RT-PCR	reação em cadeia da polimerase a partir da transcrição reversa
TRE	Elemento responsivo ao hormônio tireoidiano
T ₂	diiodotironina
T ₃	triiodotironina
T ₄	tiroxina
TAM	tecido adiposo marrom
TSH	hormônio estimulante da tiróide
UV	luz ultra-violeta

RESUMO

RESUMO

Duas enzimas, as iodotironinas desiodases tipos I e II (D1 e D2), catalizam a reação de 5' desiodação do T₄ promovendo a formação do hormônio tireoidiano ativo, T₃. A D1, principal fonte de T₃ circulante no plasma, esta presente no fígado, rim e tireóide. Até recentemente, acreditava-se que a expressão da D2 estivesse restrita a tecidos nos quais a concentração intracelular de T₃ desempenha um papel crítico como na hipófise, sistema nervoso central e tecido adiposo marrom (TAM). Estes conceitos foram estabelecidos com base em estudos de atividade enzimática em homogenados de tecidos de ratos. A recente clonagem dos cDNAs da D1 e D2, de ratos e humanos, forneceu novos meios para a avaliação da distribuição tecidual e dos mecanismos que regulam a expressão dos genes destas enzimas. Estudos anteriores demonstraram que altos níveis de mRNA da D2 são encontrados na tireóide e músculos cardíaco e esquelético em humanos, entretanto este mesmo padrão não foi observado em ratos. Os hormônios tireoidianos tem um efeito direto sobre as desiodases, regulando a ação dessas enzimas de maneira tecido-específica. Estudos prévios demonstraram que elevados níveis de T₄ reduzem à metade a atividade da D2 no cérebro e hipófise dos camundongos C3H/HeJ (C3H), linhagem de camundongos que apresenta uma deficiência inata da D1 compensada com o aumento dos níveis séricos de T₄ que, nestes animais, são aproximadamente o dobro daqueles observados nos camundongos normais, C57BL/6J (C57). No presente trabalho, utilizamos a técnica da PCR a partir da transcrição reversa (RT-PCR) para determinar o padrão de expressão do mRNA da D1 e D2 em diferentes tecidos de camundongos e avaliar sua regulação pelos hormônios tireoidianos. Investigamos, também, os níveis de mRNA da D2 em diferentes tecidos de camundongos normais e com deficiência inata da D1 para avaliarmos o mecanismo pelo qual o T₄ regula a atividade da D2 nos animais deficientes. Nossos resultados

demonstraram, como esperado, que altos níveis de mRNA da D1 estão presentes no fígado e rim e em menores quantidades no testículo e hipófise. Detectamos mRNA da D2, predominantemente, no TAM, cérebro, cerebelo, hipófise e testículo. Níveis mais baixos de expressão foram detectados, também, no coração. O tratamento com T_3 reduziu, significativamente, a expressão da D2 no TAM e coração, mas não no cérebro e testículo. Por outro lado, os níveis de mRNA da D2 aumentaram, significativamente, no testículo de camundongos hipotireoideos. Transcritos da D2 foram identificados no cérebro, cerebelo, hipófise, TAM, testículo e, em menores quantidades, no coração em ambas as linhagens de camundongos, C57 e C3H. Entretanto, ao contrário da atividade, nenhuma alteração significativa nos níveis basais de expressão do mRNA da D2 foi detectada nos tecidos dos camundongos deficientes. O tratamento com T_3 reduziu de forma similar, os níveis de mRNA da D2 no TAM e coração em ambos os grupos de animais. Em conclusão, nossos resultados demonstraram que o mRNA da D2 se expressa de forma ampla em diferentes tecidos de camundongos, apresentando um padrão de expressão similar ao descrito em ratos. A co-expressão da D1 e D2 no testículo sugere um papel importante dessas enzimas no controle homeostático do hormônio tireoideo neste órgão. Demonstramos, também, que a deficiência da D1 não altera os níveis basais de expressão do mRNA da D2 nos camundongos C3H, confirmando que o T_4 atua ao nível pós-transcricional na regulação da atividade da D2 nestes animais. Além disso, o T_3 age de forma tecido-específica e tem efeito similar sobre a regulação pré-transcricional do gene da D2 em ambas as linhagens de camundongos.

ABSTRACT

ABSTRACT

The outer ring deiodination of thyroxine (T_4) is an essential step for the production of the active thyroid hormone, triiodothyronine (T_3). Two different enzymes, types I and II iodothyronine deiodinases (D1 and D2, respectively), catalyze the deiodination of T_4 . D1 is present mainly in liver, kidney and thyroid gland and it is believed to be the major source of circulating plasma T_3 in rats. Until recently, it was thought that D2 was only expressed in tissues where T_3 concentration seems to be critical, such as anterior pituitary, central nervous system and brown adipose tissue (BAT). These concepts have largely been based in studies of enzyme activity in rat tissue homogenates. Cloning of rat and human cDNAs encoding these enzymes has provided important tools for further evaluation of their genes expression and regulation. Previous works have demonstrated that high levels of D2 mRNA are found in thyroid gland, skeletal and cardiac muscles in humans. However, studies performed in rats have shown different patterns of D2 mRNA expression. It is known that thyroid hormones have direct effects on deiodination processes regulating deiodinases activities in a tissue-specific manner. The C3H/HeJ (C3H) inbred mice have an inherited D1 deficiency that is compensated by higher serum-free T_4 levels that are approximately twice those of normal controls, the C57BL/6J (C57) inbred strain. Previous studies have shown that D2 activity in brain and pituitary of C3H mice are reduced to about 50 percent those in the C57 strain. In the present work, we have used the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique to characterize the presence of D1 and D2 mRNA in a number of mice tissues and to evaluate their regulation by thyroid hormones. We have also studied the D2 gene expression in different tissues of normal and type I

deiodinase-deficient mice to evaluate the mechanism by which T_4 regulates D2 activity in C3H mice. Our results demonstrated, as expected, that D1 mRNA is highly expressed in liver and kidney and less abundantly in testis and pituitary gland. We found D2 mRNA predominantly in BAT, brain, cerebellum, pituitary gland and testis. In addition, low levels of D2 transcripts have also been detected in heart. T_3 treatment significantly decreased D2 mRNA levels in BAT and heart, but not in testis and brain. On the other hand, D2 transcript levels increased significantly in testis of hypothyroid mice. As expected, D2 is highly expressed in brain, BAT, testis and, at lower levels, in heart of both C57 and C3H mice and, contrary to the activity, no change in the basal levels of D2 mRNA was observed in the tissues of C3H mice. T_3 treatment reduced, in a similar way, D2 mRNA levels in BAT and heart of C57 and C3H animals. Our results demonstrated that D2 mRNA is broadly and differentially expressed in mice tissues, showing a pattern of expression very similar to that described for rats. Besides that, the high levels of coexpression of D1 and D2 mRNA detected in testis suggests that these enzymes may play an important role in the homeostatic control of thyroid hormone levels in this organ. We have also shown that D1 deficiency does not change the basal levels of D2 mRNA in tissues of the C3H mice strain, confirming that T_4 acts at the post-transcriptional level to regulate D2 activity in these animals. In addition, T_3 acts in a tissue-specific manner and has similar effects on the pre-transcriptional regulation of D2 gene expression in both mice strains.

1 - INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

Os hormônios tireoidianos são essenciais para vários processos biológicos como desenvolvimento, crescimento e metabolismo^(1,2,3,4,5). A manutenção de níveis apropriados destes hormônios nos diferentes tecidos e em diferentes estágios do desenvolvimento é fundamental para a normalidade fisiológica de tais processos. Os hormônios tireoidianos, pequenas moléculas ligantes hidrofóbicas não-peptídicas, afetam os processos celulares, principalmente, através da sua ligação a receptores nucleares específicos que ligam T_3 com alta afinidade. Estes receptores são proteínas que se associam, na forma de monômeros, homodímeros ou heterodímeros a seqüências específicas do DNA, os chamados elementos responsivos aos hormônios tireoidianos ou TREs^(6,7), localizados normalmente na região promotora dos genes alvo. A ligação do hormônio tireoidiano aos receptores específicos faz com que estes atuem como fatores de transcrição, aumentando ou diminuindo a taxa de transcrição dos genes influenciados por T_3 , através da interação direta ou indireta com o aparato transcricional basal⁽⁷⁾.

A glândula tireóide sintetiza e secreta, principalmente, tiroxina (3,5,3',5'- tetraiodo-L-tiroxina, T_4) e triiodotironina (3,5,3'- triiodo-L-tironina, T_3). A tiroxina, o principal produto secretado pela tireóide, funciona primariamente como um pró-hormônio para a produção do hormônio tireoidiano ativo, T_3 , e outras iodotironinas, nas células alvo⁽⁸⁾. O T_3 , que possui alta afinidade pelos receptores nucleares dos hormônios tireoidianos é o responsável, virtualmente, por todos os efeitos metabólicos desta classe de hormônios⁽⁶⁾. A ativação do T_4 , com sua conversão a T_3 , ocorre na tireóide e, principalmente, nos tecidos alvo através da ação de enzimas celulares específicas que promovem a desiodação, ou remoção de um único átomo de iodo, do anel fenólico (posição 5') da molécula de T_4 ⁽⁹⁾. Por outro lado, a desiodação do anel tirosínico (posição 5) do T_4 e T_3 resulta na formação das iodotironinas inativas T_3 reverso (3,3',5'-triido-L-tironina, rT_3) e T_2 (3,3'-diiido-L-tironina), respectivamente (Figura 1). A transformação metabólica dos hormônios tireoidianos, nos tecidos periféricos, envolve uma série de outras reações enzimáticas complexas como sulfoconjugação, desaminação e descarboxilação, mas a desiodação é o mecanismo predominante para o metabolismo das iodotironinas⁽¹⁰⁾. Cerca de 80% do T_4 secretado diariamente é desiodado, nos tecidos extratireoidianos, para a produção de quantidades equimolares de T_3 e rT_3 , o que significa que, 80% do T_3 circulante e, virtualmente, todo o rT_3 são produzidos pela desiodação periférica do T_4 ⁽⁸⁾. Assim, as reações de desiodação das iodotironinas resultam na ativação e

inativação dos hormônios tireoidianos e são catalizadas por uma família de enzimas, as iodotironinas monodesiodases.

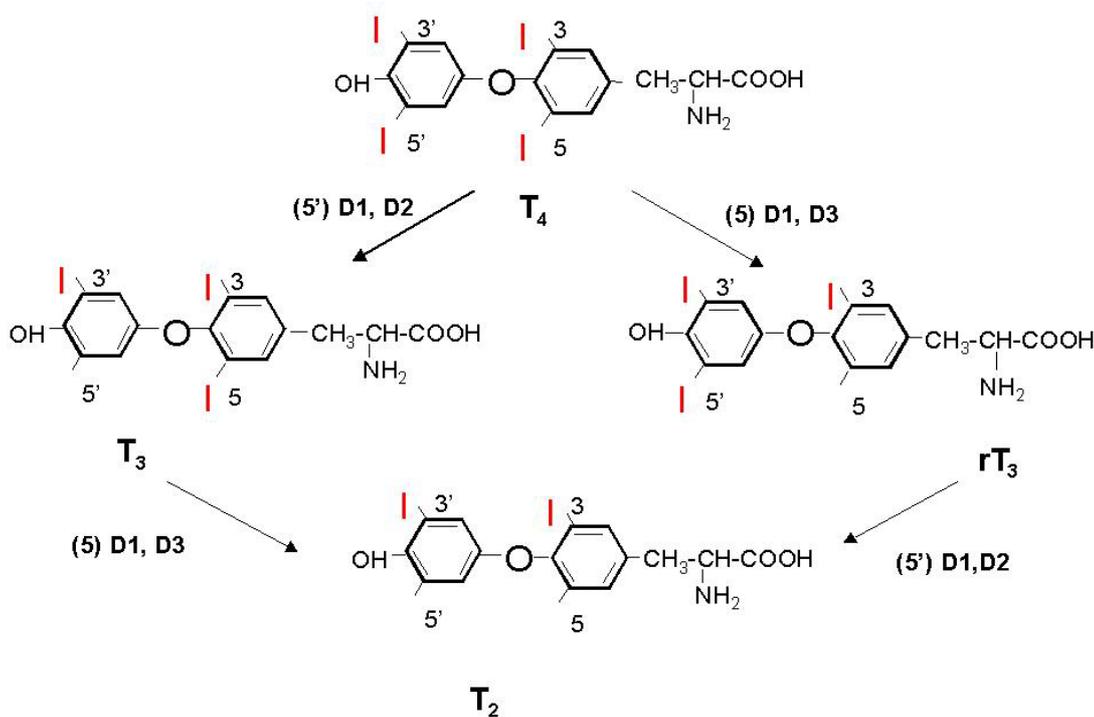


Figura 1: Produtos das sucessivas reações de monodesiodação dos anéis externo e interno da tiroxina (T_4).

1.1 - Classificação e Características das Iodotironinas Desiodases

A desiodação do T_4 e seus metabólitos é catalizada pela ação de três isoenzimas diferentes denominadas iodotironinas monodesiodases. Inicialmente, utilizando-se homogenados de tecidos de ratos, e

fundamentados em estudos de cinética enzimática e em diferentes padrões de inibição por compostos tais como propiltiuracil (PTU) e aurotilglicose (AthG), três diferentes tipos de iodotironinas desiodases foram identificadas e caracterizadas^(11,12,13) e, recentemente, clonadas^(14,15,16). As três enzimas denominadas iodotironinas desiodases tipos I (D1), II (D2) e III (D3) são codificadas por três genes diferentes^(17,18,19) e possuem propriedades catalíticas distintas⁽¹¹⁾.

Os recentes estudos que, através da utilização de técnicas de biologia molecular, resultaram na clonagem dos cDNAs para as três isoformas das desiodases forneceram importantes informações a respeito das características estruturais destas enzimas. Uma das mais importantes foi a demonstração de que as desiodases são selenioproteínas, enzimas que contém no seu sítio ativo o raro aminoácido seleniocisteína⁽¹⁴⁾, cuja presença no centro catalítico é crítica para a atividade enzimática. A substituição da seleniocisteína por cisteína no sítio ativo reduz significativamente a capacidade catalítica dessas enzimas, enquanto a substituição por outro aminoácido resulta em completa inativação⁽²⁰⁾. A seleniocisteína, um aminoácido raramente incorporado a proteínas eucarióticas, tem propriedades ideais para a catálise de reações oxirredutivas do tipo catalizada pelas desiodases conferindo a estas enzimas alta afinidade pelo substrato e eficiência catalítica⁽²¹⁾.

Os cDNAs das três desiodases, isolados em diferentes espécies de vertebrados, compartilham características estruturais que salientam a

importância da seleniocisteína para o funcionamento das enzimas, como a presença de um códon TGA ("stop" códon) na região codificadora do gene que, ao invés de sinalizar o final da síntese proteica, como na maioria das proteínas, funciona como um códon para a inserção da seleniocisteína à proteína⁽¹⁴⁾. Uma estrutura em forma de *stem-loop* denominada seqüência de inserção da seleniocisteína (SECIS), localizada na região 3' não traduzida do mRNA destas enzimas, é fundamental para o reconhecimento do códon TGA como um códon para a incorporação da seleniocisteína à cadeia polipeptídica durante o processo de tradução⁽²²⁾. Estudos recentes demonstraram que a região que flanqueia o códon TGA, referente ao sítio ativo das enzimas, é altamente conservada entre as isoformas das desidases⁽¹⁵⁾. Além destas, outras características estruturais são compartilhadas entre as enzimas, como a presença de dois resíduos de histidina próximos ao sítio ativo e um domínio hidrofóbico na região amino terminal da proteína que, provavelmente, corresponde a região de ligação à membrana plasmática⁽⁹⁾. Os estudos moleculares confirmaram resultados de estudos anteriores, os quais forneciam evidências indiretas, de que a D1 é uma selenioproteína^(23,24).

1.2 - Clonagem dos cDNAs das Iodotironinas Desidases

Inicialmente, através de estratégias de clonagem que dependiam da indução direta da atividade da D1 em oócitos de *Xenopus leavis*, através da injeção de poli A+ RNA extraído de fígado de ratos hipertireoideos, Berry e

cols, 1991⁽¹⁴⁾ isolaram o cDNA da D1 do rato. O estudo detalhado da estrutura deste cDNA e da proteína revelaram as importantes características estruturais discutidas anteriormente. Em estudos subseqüentes, utilizando o cDNA da D1 do rato como sonda, os cDNAs da D1 humana⁽²⁵⁾, do cachorro⁽²⁶⁾, camundongo⁽²⁷⁾ e também, recentemente, da galinha⁽²⁸⁾ e de peixe⁽²⁹⁾ foram isolados.

O primeiro clone da D3 foi isolado do *Xenopus leavis* por Wang e Brown em 1993⁽¹⁶⁾. Este cDNA de 1,5 kb apresentava seqüências que exibiam alta homologia com o cDNA da D1 de mamíferos. Subseqüentes estudos de expressão, demonstraram que este cDNA codificava a D3. Posteriormente, através das técnicas de hibridização e/ou PCR, os cDNAs da D3 do rato⁽³⁰⁾, humana⁽³¹⁾, da rã⁽³²⁾, galinha⁽²⁸⁾ e do peixe⁽²⁹⁾ foram isolados. Seqüências de alta homologia, nas regiões que flanqueiam o códon TGA da seleniocisteína e o primeiro resíduo de histidina, observadas nas estruturas dos cDNAs da D1 e D3, foram utilizadas como base para uma estratégia que utilizando PCR levou a clonagem do cDNA da D2 da rã⁽³³⁾. Subsequentemente, cDNAs da D2 do rato e humana⁽¹⁵⁾, de peixe⁽³⁴⁾, do camundongo⁽³⁵⁾ e da galinha⁽³⁶⁾ também foram clonados.

Todos os cDNAs das iodotironinas desidases clonados, em diferentes espécies, compartilham as características estruturais básicas desta família de selenioproteínas. A comparação estrutural da D1, D2 e D3 do rato, baseada na seqüência de aminoácidos deduzida a partir de seus cDNAs, demonstrou

que todos codificam proteínas de peso molecular de aproximadamente 30 kd⁽³⁷⁾. As regiões próximas a seleniocisteína e primeiro resíduo de histidina são altamente conservadas. Além disso, todas apresentam um domínio hidrofóbico na região amino terminal. Embora, a homologia global na seqüência de aminoácidos das três isoformas seja de apenas 24%, as regiões próximas a seleniocisteína e histidina, que formam o sítio ativo das enzimas, são altamente homólogas, 80% e 69%, respectivamente⁽⁹⁾.

Os estudos utilizando o cDNA da D2 do rato e humana revelaram algumas características únicas desta isoforma que a diferem das demais desidases. O mRNA desta enzima é muito mais longo, aproximadamente 7,5 kb^(15,38), do que o da D1 e D3 que apresentam mRNAs de 2,1 e 2,4 kb, respectivamente. O mRNA da D2 parece ser polimórfico, sendo que em alguns tecidos, hibridizações cruzadas identificaram transcritos menores, em menor abundância^(15,39). A outra característica única do cDNA da D2 é a presença de um segundo códon TGA localizado próximo a região carboxi terminal da proteína⁽¹⁵⁾. A função deste segundo códon TGA ainda não foi determinada, mas evidências experimentais favorecem a hipótese de que ele funcione como um códon de terminação da tradução ao invés de um códon de inserção da seleniocisteína⁽⁴⁰⁾.

1.3 - Localização e Estrutura dos Genes das Desiodases

O gene da D1 no camundongo está localizado no cromossoma 4⁽⁴¹⁾, possui aproximadamente 15 kb, 4 éxons e a região promotora não contém TATA ou CCAAT *boxes*, mas GC *boxes* próximos ao sítio de início da transcrição⁽²⁷⁾. O gene homólogo de 17,5 kb da D1 humana está localizado no cromossoma 1p32-p33 e é composto, também, por 4 éxons^(17,42). O códon TGA está localizado no segundo éxon e o tamanho do mRNA transcrito é de 2,2 kb. O promotor do gene da D1 humana, da mesma forma que o do camundongo, não contém TATA ou CCAAT *boxes*. Dois elementos responsivos aos hormônios tireoidianos (TREs) foram identificados e funcionalmente caracterizados no promotor deste gene^(43,44).

O gene da D2 humana localiza-se no cromossoma 14q24.3⁽¹⁹⁾. Um único intron de 7,4 kb separa os 2 éxons deste gene e evidências sugerem a utilização de sítios de início da transcrição alternativos para a produção dos transcritos de, aproximadamente, 7,5 kb que variam de tamanho em diferentes tecidos⁽³⁹⁾. Detalhes sobre a estrutura do promotor e sua regulação ainda não estão disponíveis na literatura.

O gene da D3 localiza-se no cromossoma humano 14q32 e no cromossoma homólogo do camundongo 12F1⁽¹⁸⁾. O gene do camundongo, de 12 kb, apresenta um único éxon de 1853 pb, que codifica o mRNA desta enzima, e a região promotora apresenta TATA, CAAT e GC *boxes*⁽⁴⁵⁾.

1.4 - Padrão de Expressão e Papel Fisiológico das Desiodases

Embora, as três iodotironinas desiodases apresentem em comum certas características estruturais importantes, essas enzimas diferem entre si em vários aspectos como no padrão de expressão, preferência pelo substrato, sensibilidade a inibidores, papel fisiológico e na forma como são reguladas pelos hormônios tireoidianos

1.4.1 - Iodotironina Desiodase Tipo I

A D1 se expressa em vários tecidos, mas os mais altos níveis de expressão são observados na tireóide, rim, fígado e hipófise⁽⁴⁶⁾. Esta enzima, localizada na membrana do retículo endoplasmático, cataliza a desiodação tanto do anel fenólico (5' desiodação) quanto do anel tirosínico (5 desiodação) das diversas iodotironinas podendo converter T_4 a T_3 , T_4 a rT_3 e T_3 a T_2 ⁽⁴⁷⁾. Ambos os processos de desiodação são sensíveis a inibição por PTU e AhTG^(11,46). A preferência da D1 pelos substratos segue a seguinte ordem $rT_3 > T_4 > 3',5'-T_2 > 3,3'-T_2$ apresentando um K_m de, aproximadamente, $2 \mu M$ para o T_4 . Embora a D1 apresente maior afinidade por rT_3 como substrato ela é considerada, principalmente, como a maior fonte produtora de T_3 para a circulação. Esta enzima pode catalizar, também, a desiodação do anel tirosínico, mas somente iodotironinas sulfatas podem servir como substrato para estas reações. Portanto, a D1, sob condições fisiológicas normais, desempenha um papel importante na ativação do T_4 fornecendo a

maior parte do T_3 sistêmico para todo o organismo, além de atuar no rápido *clearance* do rT_3 e na inativação das iodotironinas sulfatadas.

1.4.2 - Iodotironina Desiodase Tipo II

A D2 é encontrada principalmente na hipófise, sistema nervoso central e tecido adiposo marrom de ratos⁽¹⁵⁾. Em humanos, além destes tecidos, recentemente, foram detectados altos níveis de mRNA da D2 na tireóide⁽⁴⁸⁾, placenta, músculos cardíaco e esquelético e pele^(15,38). Esta enzima cataliza unicamente a desiodação do anel fenólico das iodotironinas, convertendo T_4 a T_3 e rT_3 a T_2 , e possui uma maior afinidade por T_4 do que rT_3 como substrato. O K_m para o T_4 é de aproximadamente 2 ηM . Ao contrário da D1, ela não cataliza a desiodação das iodotironinas sulfatadas e sua atividade catalítica é relativamente resistente a inibição por PTU e AhTG⁽⁴⁶⁾. A D2 desempenha um importante papel na produção local de T_3 fornecendo quantidades adequadas do hormônio tireoidiano ao núcleo das células. A ampla expressão desta enzima, em tecidos humanos, sugere que a D2 possa contribuir significativamente para a produção de T_3 circulante além de gerar o T_3 intracelular como ocorre no rato .

1.4.3 - Iodotironina Desiodase Tipo III

A D3, terceira enzima envolvida no metabolismo das iodotironinas, cataliza exclusivamente a desiodação do anel interno destes compostos tendo, portanto, o papel fisiológico de inativar os hormônios tireoidianos.

Esta enzima possui alta afinidade por T_4 e T_3 , embora o substrato preferencial seja o T_3 sulfatado, e de forma similar a D2 é também resistente a inibição por PTU e AhTG. Em mamíferos, os mais altos níveis de atividade da D3 foram identificados no sistema nervoso central⁽¹³⁾ e pele⁽⁴⁹⁾, mas também níveis elevados de atividade foram detectados na placenta⁽⁵⁰⁾ e útero⁽⁵¹⁾. Estudos recentes demonstraram que, em ratos, a D3 é a desiodase predominantemente expressa na maioria dos tecidos fetais com um declínio significativo nesta expressão após o nascimento⁽⁵²⁾. Além disso, a presença desta enzima em útero e placenta, inativando T_4 e T_3 , provavelmente, represente uma barreira a passagem dos hormônios tireoidianos da mãe para o feto, evitando desta forma, que os tecidos fetais sejam expostos prematuramente ou de forma excessiva aos hormônios tireoidianos^(5,53).

1.5 - Regulação das Iodotironinas Desiodases em Resposta a Alterações no *Status* dos Hormônios Tireoidianos

A regulação da atividade das desiodases é um processo complexo e vários fatores e/ou situações fisiopatológicas podem alterar a atividade de desiodação em um determinado tecido⁽⁴⁶⁾. Dentre os vários fatores, de particular importância são os efeitos dos hormônios tireoidianos sobre os processos de desiodação. Alterações no *status* dos hormônios tireoidianos são acompanhadas de mudanças significativas na atividade das desiodases⁽⁵⁴⁾. Do ponto de vista fisiológico, estas mudanças parecem ser coordenadas de forma a manter os níveis circulantes e intracelulares de T_3 o mais próximo

possível do normal. Especula-se que este seja um mecanismo protetor que tenha evoluído em resposta a deficiência de iodo. Assim, no hipotireoidismo, a atividade da D1 e D3 estão diminuídas e, da mesma forma, a degradação do T_3 por essas enzimas. Por outro lado, a atividade da D2 está aumentada preservando os níveis teciduais de T_3 apesar da hipotiroxinemia. Uma exceção a este padrão é o aumento da expressão da D1 da tireóide, no hipotireoidismo, estimulada pelos altos níveis de TSH⁽⁵⁵⁾. Este aumento de atividade, provavelmente, serve para elevar a proporção de T_3 que é secretada na circulação. No hipertireoidismo, mudanças opostas na atividade das desidases são observadas estando as atividades da D1 e D3 aumentadas e da D2 diminuída nos tecidos extratireoidianos⁽⁹⁾.

1.6 - Regulação Transcricional e Pós-Transcricional das Desiodases

Os efeitos regulatórios diretos que os hormônios tireoidianos exercem sobre a atividade das desidases, podem ocorrer tanto ao nível transcricional quanto pós-transcricional. O aumento da atividade da D1 e D3, por exemplo, no hipertireoidismo é acompanhado por um aumento nos níveis do mRNA e proteína demonstrando que o T_3 tem um efeito estimulatório direto sobre a taxa de transcrição dos genes destas enzimas^(56,57,58,59). Recentemente, foi demonstrado que a região promotora do gene da D1 humana, de fato, possui dois TREs funcionais localizados a 100 e 700 pares de bases acima do sítio de início da transcrição⁽⁴³⁾.

Por outro lado, a regulação da expressão da D2 é um processo mais complexo que envolve ambos os mecanismos, transcricional e pós-transcricional. Estudos recentes demonstraram que a expressão do mRNA da D2 no cérebro e hipófise de ratos é inversamente proporcional ao *status* tireoidiano^(15,60,61,62). No tecido adiposo marrom os níveis de mRNA da D2 são significativamente aumentados pela estimulação adrenérgica durante a exposição dos ratos ao frio⁽¹⁵⁾, e na glândula pineal o aumento noturno da atividade da D2 é precedido pelo aumento no seus níveis de mRNA⁽⁶³⁾. Ao nível pós-transcricional, foi demonstrado que os substratos dessa enzima, rT₃ e T₄, quando administrados agudamente a animais hipotireoideos reduzem significativamente a atividade da D2 e são mais potentes na produção desse efeito do que o T₃, sugerindo um mecanismo de ação extra-nuclear^(60,64,65,66,67,68). Embora, o exato mecanismo celular envolvido neste processo ainda não seja bem conhecido, alguns estudos sugerem que a redução da atividade da D2 é induzida pelo substrato e mediada por um mecanismo pós-tradução, uma vez que, ele ocorre na presença de inibidores da transcrição e síntese proteica^(69,70,71).

1.7 - Modelo Animal com Deficiência Inata para Desiodase Tipo I

Desde a identificação do T₃ no plasma humano⁽⁸⁾ e a demonstração da sua maior potência biológica quando comparado ao T₄, as reações de desiodação dos hormônio tireoidianos tem recebido crescente atenção.

Existem alguns casos de resistência ao hormônio tireoidiano em humanos que podem ser atribuídos à deficiência da desidase tipo I^(72,73,74). Nestes indivíduos, a fração livre e total do T₄ estão elevadas, o T₃ sérico é normal ou discretamente diminuído e o TSH normal. Até recentemente, nenhum modelo animal havia sido identificado para o estudo fisiopatológico da deficiência dessa enzima, visto que tanto a administração de PTU como a deficiência do selênio provocam outros efeitos bioquímicos e/ou fisiológicos no animal. No entanto, observou-se em estudos do metabolismo da [¹²⁵I]- 2-iodo-3,7,8-triclorodibenzo-p-dioxina (iododioxina) que certas linhagens de camundongos distribuíam-se em grupos, exibindo alta ou baixa atividade de desidase da iododioxina a nível hepático. Em particular, observou-se que a desidase hepática da iododioxina nos camundongos C3H/HeJ (C3H) era cerca de 20 vezes menor do que a dos camundongos C57BL/6J (C57), considerados fenotipicamente normais^(41,75). Em estudos subsequentes, as mesmas diferenças no padrão de atividade enzimática foram observadas quando se utilizou [¹²⁵I]-T₄ como substrato. Portanto, aparentemente, a iododioxina seria um substrato para a D1 e esta enzima se expressaria em diferentes níveis nestas duas linhagens de camundongos. Posteriormente, demonstrou-se, também, que o decréscimo nos níveis de atividade da D1 nos animais C3H estava associada a um decréscimo nos níveis do mRNA desta enzima⁽⁴¹⁾ e congrega com um fragmento de restrição de tamanho variável (RFLV) identificado entre os camundongos C3H e C57^(41,75).

O gene da D1 dos camundongos foi isolado e parcialmente seqüenciado⁽²⁷⁾. A estrutura dos genes da D1 dos camundongos C3H e C57 é bastante similar. O RFVL foi identificado e estudos subsequentes *in vitro* demonstraram que este segmento não é a causa da deficiência da D1 nos camundongos C3H⁽²⁷⁾. Uma outra diferença estrutural foi identificada na região do promotor do gene dos animais C3H, uma inserção de 21 pb com 5 repetições da seqüência de nucleotídeos CTG que também congrega com a baixa atividade da D1 e com o RFLV *in vivo* e *in vitro*. Estudos *in vitro*, utilizando transfecção transiente em células mamárias, associaram esta diferença com uma diminuição da potência do promotor, sugerindo ser esta a provável causa da deficiência da desidase tipo I nestes animais⁽²⁷⁾. A possibilidade de o gene da D1 dos camundongos C3H ter perdido a capacidade de responder ao hormônio tireoídiano endógeno, devido a uma mutação gênica, foi também investigada. Entretanto, esta hipótese foi afastada quando observou-se que a administração de T₃ promove um aumento significativo nos níveis de atividade e mRNA dessa enzima nos animais C3H⁽⁵⁸⁾. Estes resultados indicam que a baixa atividade da D1 nos camundongos deficientes não se deve a produção de uma proteína alterada ou problemas na tradução do mRNA, mas a um decréscimo na taxa de transcrição do gene ou na estabilidade do mRNA⁽⁴¹⁾.

Assim, o nível de expressão do mRNA da D1 dos animais C3H é de apenas 10% daquela observada nos animais C57, que apresentam fenótipo normal. O impacto fisiológico desta diferença nos animais C3H é um aumento nos níveis circulantes de T₄ total e livre, que é o dobro do observado nos animais C57⁽⁴¹⁾. Por outro lado, os níveis de T₃ livre e TSH no soro

permanecem normais o que confere a estes animais um fenótipo eutireoideo⁽⁴¹⁾. Presume-se que os níveis de T_3 permaneçam normais, embora a conversão de T_4 a T_3 diário esteja reduzida, devido a elevada concentração de T_4 livre no soro, o que aumenta a disponibilidade de substrato⁽⁵⁸⁾. Além disso, alterações na atividade das demais desidases poderiam contribuir no mecanismo compensatório da deficiência da D1. De fato, foi demonstrado que os elevados níveis de T_4 reduzem em 50% a atividade da D2 no cérebro e hipófise dos animais C3H, quando comparados a linhagem de camundongos normais C57⁽⁴¹⁾. Observou-se, também, que a administração de T_3 aos animais resultou em níveis mais elevados de T_3 nos camundongos C3H, sugerindo que a deficiência da D1 possa exacerbar os efeitos tireotóxicos através da redução da taxa de clearance do T_3 ⁽⁵⁸⁾. Assim, a linhagem de camundongos C3H é um excelente modelo para a avaliação dos efeitos de um severo e persistente decréscimo da atividade hepática e renal da D1 sobre a expressão das demais desidases e fisiologia da tireóide, na ausência de doença sistêmica.

2 - JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2 - JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Uma nova fase na investigação dos processos de desiodação dos hormônios tireoidianos começou em 1991, com a clonagem do cDNA da desiodase tipo I do rato. Posteriormente, outros estudos de clonagem molecular identificaram cDNAs para as três isoformas destas enzimas, provenientes de múltiplas espécies. A disponibilidade dos cDNAs das três isoformas das desiodases, além de revelar as importantes características estruturais desta família de selenoproteínas, forneceu, também, um importante meio para estudos adicionais que estão permitindo uma melhor definição do papel destas enzimas na regulação coordenada da ativação e inativação dos hormônios tireoidianos em vertebrados.

Além disso, o padrão de regulação da atividade da D2 tem sido alvo de diversos estudos. Os camundongos C3H, cujas características específicas foram discutidas anteriormente, representam um excelente modelo animal para a avaliação do complexo padrão de regulação desta enzima, uma vez que estes animais estão submetidos a níveis cronicamente elevados de T_4 e mantém T_3 e TSH normais.

Assim, os objetivos do presente estudo são:

- Caracterizar o padrão de expressão das iodotironinas desiodases tipos I e II, em diferentes tecidos de camundongos, e investigar os efeitos das alterações no *status* dos hormônios tireoidianos sobre os níveis do mRNA destas enzimas.
- Investigar o papel da D2, no mecanismo compensatório na deficiência da D1, através da avaliação dos níveis de mRNA da D2 em diferentes tecidos de camundongos normais e deficientes.
- Avaliar, comparativamente, os efeitos da administração de T₃ sobre a expressão do gene da D2 nos animais C57 e C3H.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Animais

Camundongos C57 (controles) e/ou C3H com, aproximadamente, sete semanas de vida, provenientes da Divisão de Produção e Experimentação Animal da FEPPS (Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde), foram utilizados no presente estudo. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em grupos, controle e tratado, e utilizados de 4-6 animais por grupo por experimento, repetidos no mínimo duas vezes. Após os períodos adequados de tratamento, os camundongos foram anestesiados através da inalação de éter, o sangue foi coletado e os animais foram, então, sacrificados por decaptação. O tecido adiposo marrom, cérebro, cerebelo, hipófise, coração, fígado, rins, músculo esquelético, pulmão, baço e testículos foram rapidamente removidos, congelados em nitrogênio líquido e estocados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o isolamento do RNA. O sangue, após a coleta, foi centrifugado e o soro estocado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior dosagem dos hormônios tireoidianos

3.2 - Tratamento dos Animais

Para avaliar os efeitos do hormônio tireoidiano, sobre os níveis de expressão das desidases, os animais foram tratados com doses de 5 ou 10 μg de T_3 x animal x dia, administração intraperitoneal, em intervalos de 24 horas, durante 3 dias. Os camundongos controle (eutireoideos) receberam injeções intraperitoneais de solução salina fisiológica 0,9%. Para induzir o hipotireoidismo adicionou-se à água de beber dos animais 0,03% de metilmazole (MMI), obtido comercialmente, durante 8 semanas. O T_3 injetável foi obtido através da diluição do 3,3',5-triiodo-L-tironina (Sigma) em soro fisiológico 0,9% com pH ajustado para 9,5 utilizando-se uma solução de NaOH 0,25 M.

3.3 - Dosagens Hormonais

As concentrações plasmáticas de tiroxina total (T_4) foram determinadas pelo método de radioimunoensaio de fase sólida, através da utilização de *kits* do Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, California, USA (Coat-a-Count Total T_4), em duplicata, em um mesmo ensaio. Os coeficientes de variação intra-ensaio nas faixas de hipotireoidismo, eutireoidismo e hipertireoidismo foram de 6 a 8%, 3 a 8% e 6 a 13%, respectivamente. Os resultados estão expressos em $\mu\text{g}/\text{dl}$ e o limite de detecção foi de 1,0 $\mu\text{g}/\text{dl}$.

As concentrações de triiodotironina (T_3) no plasma foram determinadas pelo método de quimioluminescência, System Immullite-2000, Diagnostic Products Corporation (DPC), Los Angeles, California, USA, em duplicata, em um mesmo ensaio. Os resultados estão expressos em $\eta\text{g/dl}$ e o limite de detecção foi de $40 \eta\text{g/dl}$. Os coeficientes de variação intra-ensaio nas faixas de hipotireoidismo, eutireoidismo e hipertireoidismo foram de 13,2%, 10,3% e 5,7%, respectivamente.

3.4 - Preparação do RNA

O RNA total, utilizado para o estudo da expressão das desidases, foi extraído dos diferentes tecidos com o reagente Trizol (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), de acordo com as instruções do fabricante. O método do Trizol é uma adaptação do método original de extração de RNA com tiocianato de guanidíneo-fenol-clorofórmio descrito por Chomczynski e Sacchi, 1987⁽⁷⁶⁾. Quantidades apropriadas dos tecidos, de 50 a 100 mg, foram homogeneizadas (Polytron, Brinkmann, USA e Marconi, Brasil) com 1 ml do reagente e incubadas por 5 min à temperatura ambiente (15-30 °C). A cada homogenado foram adicionados 0,2 ml de clorofórmio, as amostras foram, então, agitadas vigorosamente e centrifugadas (12000 x g, 4 °C, 15 min) para a completa separação das fases aquosa e orgânica. A fase aquosa (aproximadamente 0,6 ml), que continha o RNA, foi transferida para um novo tubo e o RNA precipitado com 0,5 ml de álcool isopropílico à

temperatura ambiente por 10 min. Após centrifugação (12000 x g, 4 °C, 10 min), o *pellet* formado pela precipitação do RNA foi lavado com 1 ml de etanol 75% e novamente centrifugado (7500 x g, 4 °C, 5 min).

O precipitado final de RNA foi diluído com água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e incubado a 60 °C por 10 min para sua completa dissolução e desnaturação. Para a quantificação, alíquotas de 2-5 µl das soluções de RNA total foram diluídas em 0,5 ml de água tratada com DEPC e lidas em espectrofotômetro para ácidos nucleicos (GeneQuant, Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) a 260 e 280 nm. A pureza do RNA foi considerada satisfatória quando a razão das absorvâncias 260/280 nm era superior a 1,6. A concentração de RNA na solução original foi calculada pela fórmula:

$$[\text{RNA}] = A_{260} \times D \times 40 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

onde A= absorvância, D= diluição da alíquota de RNA e 40 µg/ml é a quantidade de RNA que corresponde a uma unidade de absorvância a 260 nm.

Todo o procedimento de extração do RNA e os procedimentos que serão descritos a seguir foram feitos sob rígidas condições de controle para se evitar a contaminação dos materiais e soluções com RNase. A vidraria utilizada nos experimentos foi esterilizada por 4 horas a 250 °C e o material

plástico foi lavado apropriadamente com água contendo DEPC e autoclavado 25 minutos a 120 °C.

3.5 - Avaliação dos Níveis de mRNA da Iodotironina Desiodase

Tipo II por *Northern Blot*

Os níveis de expressão do RNA mensageiro (mRNA) da desiodase tipo II, em diferentes tecidos de camundongos, foi avaliado por *Northern blot*. Essa técnica permite que seqüências específicas nas preparações de RNA sejam detectadas por hibridização com sondas de DNA ou RNA, normalmente, marcadas com ³²P. O protocolo da técnica é dividido em três etapas: (1) eletroforese das amostras de RNA, sob condições desnaturantes, em gel de agarose contendo formaldeído; (2) transferência, por capilaridade, do RNA do gel para uma membrana de *nylon* e, (3) análise das seqüências de RNA de interesse por hibridização com sonda de DNA ou RNA marcada.

3.5.1 - Preparação das Amostras de RNA e Eletroforese

Amostras com 30 µg de RNA total foram ressuspendidas em 15 µl de tampão de desnaturação, contendo 40 µl de MOPS 10X, 65 µl de formaldeído, 180 µl de formamida deionizada e 40 µl de azul de bromofenol 10%, e desnaturadas a 55-60 °C por 10 minutos antes de serem aplicadas ao gel.

As amostras de RNA total foram então, submetidas a eletroforese em gel de agarose 1% contendo 5% de formaldeído, MOPS 1X e 2 µg de brometo

de etídeo. Utilizou-se MOPS 1X como tampão de corrida e corrente constante de 110 Volts (30mA) à temperatura ambiente. Após a separação por eletroforese, o gel foi examinado em um transiluminador UV (254 nm), para visualização do RNA, e fotografado.

3.5.2 - Transferência do RNA do Gel para a Membrana

Antes da transferência do RNA, o gel foi lavado duas vezes com água deionizada por 10 minutos à temperatura ambiente, sob agitação, para remoção do formaldeído. Em seguida, o sistema capilar para a transferência do RNA do gel para a membrana de nylon foi montado utilizando-se folhas de papel filtro Whatman 3MM e toalhas de papel em uma cuba plástica. O gel foi, então, colocado sobre o sistema de transferência e sobre este a membrana de nylon (Hybond N+ , Amershan) cortada no tamanho exato do gel e previamente equilibrada, durante 5 minutos, em uma solução de SSC 10X. Sobre estes, foram colocadas folhas de papel Whatman 3MM, previamente submersas em solução de SSC 10X, e folhas de papel toalha até uma altura de aproximadamente 8 cm. Uma lâmina de vidro era colocada no topo do sistema de transferência e sobre ela um peso para manter a estrutura estável. A transferência foi realizada em uma solução de SSC 10X por, aproximadamente, 16 horas e, em seguida, a membrana foi cuidadosamente recolhida e a posição dos *wells* e frente e verso identificados. A membrana foi, então, lavada com SSC 2X, para remoção do excesso de sal e restos de agarose, seca ao ar, e o RNA fixado a ela através da irradiação com luz ultra

violeta (UV) de comprimento de onda de 254 nm durante 3 minutos. As membranas, obtidas para os diferentes experimentos, foram seladas em sacos plásticos e estocadas a 4 °C para posterior hibridização.

3.5.3 - Hibridização

As membranas foram pré-hibridizadas por 30 minutos (novas) ou 16 horas (previamente utilizadas) a 42 °C em uma solução contendo 1% de SDS, 10% de solução de Denhardt's, 100 µg/ml de DNA de esperma de salmão desnaturado e SSC 6X. A hibridização transcorreu por 16 horas a 42 °C em uma solução contendo 50% de formamida, 1% de SDS, 5% de dextran sulfato, 100 µg/ml de DNA de esperma de salmão desnaturado, SSC 6X e uma sonda de cDNA específica marcada com $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP, aproximadamente 1×10^6 cpm/ml de solução de hibridização.

3.5.4 - Preparação e Marcação das Sondas de cDNA

Fragmentos de 368 e 590 pb da D1 do camundongo e D2 do rato, respectivamente, foram amplificados por PCR, a partir de vetores contendo os cDNAs destas enzimas, marcados com $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP e utilizados como sondas para a análise da expressão das desidases por *Northern blot*

Para a marcação das sondas foi utilizado o kit *Random Primers DNA Labeling System* (Gibco BRL). Seguindo as instruções do fabricante, alíquotas de 100 ng (modificado) de cDNA purificado foram diluídos em até 20 µl de

água, fervidos por 5 min e em seguida imersos em gelo. Ao cDNA desnaturado foram adicionados 2 μ l (0,5 mM) de cada um dos nucleotídeos não marcados, 15 μ l (50 μ Ci) de α -³²PdCTP, água até o volume de 49 μ l e 1 μ l da DNA polimerase I (*Klenow Fragment*). A reação foi incubada por 1 h a 25 °C e interrompida pela adição de 5 μ l de 0,2 M de Na₂EDTA pH 8,0. A sonda marcada foi purificada através de uma coluna de Sephadex G-50 (Pharmacia Biotech) e uma alíquota quantificada com líquido de cintilação em um contador β .

Após o período de hibridização, com as sonda específicas, as membranas foram lavadas duas vezes em uma solução contendo SSC 2X e 0,1% de SDS por 10 minutos à temperatura ambiente; duas vezes com SSC 0,1X e 0,1% de SDS a 52 °C por 30 minutos e duas vezes com SSC 0,1X por 10 minutos à temperatura ambiente. Após as lavagens, todas feitas sob agitação, as membranas foram montadas sobre suporte adequado e expostas a filmes de raio-X e mantidas a - 70 °C por períodos de 1 a 8 dias. Os tempos de exposição foram escolhidos de forma a se evitar a saturação das bandas para as análises densitométricas.

Após os períodos apropriados de exposição, os filmes foram revelados manualmente com revelador e fixador Kodak. As autoradiografias foram analisadas e as bandas específicas quantificadas, por densitometria óptica, com o sistema de análise de imagens ImageMaster VDS (Pharmacia Biotech).

As intensidades das bandas de interesse foram normalizadas pelas intensidades das bandas do RNA ribossomal 18S.

3.6 - Avaliação dos Níveis de mRNA das Iodotironinas Desiodases Tipos I e II por RT-PCR

Os níveis de mRNA da D1 e D2 nas amostras de RNA total dos diferentes tecidos de camundongos foram avaliadas pela técnica da reação em cadeia da polimerase a partir da transcrição reversa, conhecida como RT-PCR. Este é um método qualitativo, muito sensível, bastante utilizado para a análise da expressão gênica. Esta técnica permite que os níveis relativos de mRNA, transcritos nos diferentes tecidos ou células, sejam avaliados sem a utilização de radioatividade, *blotting* ou outras técnicas mais laboriosas. O princípio da técnica de RT-PCR baseia-se, inicialmente, na síntese do DNA complementar (cDNA), reversamente transcrito das moléculas de mRNA, contidas nas amostras de RNA total, e posterior amplificação do cDNA de interesse por PCR com utilização de uma DNA polimerase termoestável e um par de oligonucleotídeos (*primers*) específico.

3.6.1 - Síntese de cDNA

Amostras de 3 µg de RNA total, dos diferentes tecidos, foram utilizadas para a síntese de cDNA com o SuperScript Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Life Technologies, Gibco BRL, Gaithersburg MD, USA). O RNA total foi inicialmente desnaturado a 70 °C

por 10 min juntamente com os oligonucleotídeos (OligodT) complementares a cauda de poli-A⁺ das moléculas de mRNA. Em seguida, esta mistura foi incubada com a transcriptase reversa (SuperScript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase) na presença do tampão apropriado a 42 °C por 55 min. Após este período, a reação foi terminada por desnaturação a 70 °C por 15 min e, em seguida, a mistura foi incubada com RNase H por 20 min a 37 °C para remoção das cadeias de RNA das moléculas híbridas cDNA:RNA resultantes das reações de síntese de cDNA. O volume final da reação foi de 21 µl os quais continham, aproximadamente, 60 ng de cDNA.

3.6.2 - Oligonucleotídeos Específicos

Oligonucleotídeos específicos, desenhados a partir das seqüências publicadas dos genes da D1 do camundongo⁽²⁷⁾ (*sense*: 5' GCC ACT TCT GCC CCG TGC TGA G 3' *antisense*: 5' AAT GAA ATC CCA GAT GT 3') e D2 do rato⁽¹⁵⁾ (*sense*: 5' ACT CGG TCA TTC TGC TCA AG 3' *antisense*: 5' TTC AAA GGC TAC CCC ATA AG 3'), foram utilizados para hibridização com o cDNA alvo resultando na amplificação dos fragmentos esperados de 368 e 590 pares de bases (pb), respectivamente. Um par de oligonucleotídeos da β actina do camundongo (*sense*: 5' TGT GAT GGT GGG AAT GGG TCA G 3' *antisense*: 5' TTT GAT GTC ACG CAC GAT TTC C 3') foram obtidos da Clontech e utilizados como controlador interno das reações de PCR, gerando um fragmento esperado de 515 pb. Os oligonucleotídeos, utilizados neste

trabalho, foram sintetizados pela Life Technologies Gibco BRL segundo os critérios padrão para a síntese dessas estruturas.

3.6.3 - Amplificação por PCR do cDNA Alvo

Para cada tecido analisado, amplificações preliminares foram feitas para determinar a concentração adequada de cDNA e o número de ciclos sob os quais cada amostra de tecido deveria ser examinada, antes que um *plateau* de amplificação fosse atingido. Nos estudos da comparação da expressão das desidases entre camundongos normais e deficientes e dos efeitos do hipo e hipertireoidismo sobre os níveis de expressão das enzimas, as amostras do tecido adiposo marrom, cérebro, testículo e fígado foram avaliadas utilizando-se, aproximadamente, 0,4 η g de cDNA e 35 ciclos de amplificação. O coração, nestes experimentos, foi avaliado utilizando-se, aproximadamente, 6 η g de cDNA. As reações de PCR foram feitas separadamente para D1 e D2. Os fragmentos de cada uma das enzimas foram co-amplificados com os fragmentos da β actina, dentro do mesmo tubo de reação, com o objetivo de evitar variações no conteúdo de cDNA entre as amostras quando da normalização da expressão das enzimas. Os *primers* da β actina eram adicionados após 10 ciclos de amplificação da D1 ou D2.

Nos experimentos que traçaram o perfil de expressão da D1 e D2, em diferentes tecidos de camundongos, quantidades idênticas de cDNA, 6 η g x amostra, foram utilizadas para todos os tecidos avaliados com 30 e 35 ciclos

de amplificação para D1 e D2, respectivamente. A β actina, nestes experimentos, foi amplificada separadamente utilizando-se cDNA diluído 32 vezes e 30 ciclos de amplificação.

As PCRs foram feitas em um volume final de 50 μ l e continham 0,4 ou 6 ng de cDNA, tampão 1X (20 mM Tris-HCl pH 8,4 + 50 mM KCl), 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTP *mix*, 0,2 μ M de cada *primer* e 25 mUI/ μ l de Taq DNA polimerase (Gibco BRL). Estas concentrações se referem a cada reação de 50 μ l. Uma mistura com todos os reagentes, com exceção do cDNA, foi preparada de acordo com o número de reações para cada experimento e pipetadas nos tubos. Cada tubo recebeu 2 μ l de cDNA e 48 μ l da mistura de reação. As condições de amplificação foram as seguintes: 94 °C x 3 min, 30 ou 35 ciclos de 94 °C x 1 min, 58 °C x 1 min, 72 °C x 2 min e um período final de extensão de 5 minutos.

3.6.4 - Controle da Especificidade da Amplificação

A especificidade dos fragmentos amplificados pelas PCRs foi assegurada pelo posicionamento dos *primers* da D1 entre áreas de transição intron-éxon e pela dupla digestão dos fragmentos da D2 com as enzimas de restrição AccI e HincII. Esta digestão resultou nos fragmentos esperados de 280, 100 e 210 pb garantindo, desta forma, a autenticidade dos fragmentos da D2 amplificados. Em todas as séries das PCRs, reações em que se omitiu o cDNA foram utilizadas como controles negativos.

3.6.5 - *Análise dos Produtos da PCR*

Após a amplificação, os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídeo. Em seguida, o gel foi fotografado e as bandas específicas delimitadas e quantificadas por densitometria óptica com a utilização do sistema de análise de imagens ImageMaster VDS (Pharmacia Biotech). A intensidade das bandas de interesse (fragmentos de 368 e 590 pb) foram normalizadas pelas intensidades das bandas de β actina (515 pb).

3.7 - **Análise Estatística**

Para o estudo comparativo da expressão do gene da D2, em diferentes tecidos de camundongos normais e deficientes, foram realizados 3 experimentos com pelo menos duas repetições das reações de PRC. Os dados foram descritos através de média \pm desvio padrão e nos diversos experimentos realizados optamos, preferencialmente, pela realização de modelos de análise de variância (ANOVA) fatorial com dois critérios de classificação, com inclusão de termos de interação. Nas situações que não se adequavam à realização de ANOVA, utilizamos o teste *t* de Student para amostras independentes. Os dados foram processados e analisados com o auxílio dos programas Epi Info v6.04b, PEPI v3.0, SPSS v10 e SigmaPlot v2.0.

4 - RESULTADOS

4 - RESULTADOS

4.1 - Determinação do Padrão de Expressão dos Genes das Iodotironinas Desiodases Tipos I e II em Diferentes Tecidos de Camundongos

Amostras de RNA total isoladas de diferentes tecidos de camundongos foram analisadas por RT-PCR e *Northern blot*, conforme descrito em Material e Métodos, para a determinação do perfil de expressão da D1 e D2 nestes animais. Como esperado, altos níveis de mRNA da D1 foram detectados no fígado, rim e, em menor quantidade, no testículo e hipófise (Figura 2). Bandas de baixa intensidade foram observados, também, na maioria dos tecidos analisados. Transcritos da D2 foram encontrados, predominantemente, no tecido adiposo marrom, cérebro, cerebelo, hipófise e testículo, enquanto níveis relativamente mais baixos do mRNA desta enzima foram observados no coração, pulmões e rins por RT-PCR (Figura 2). A co-expressão da D1 e D2 foi observada somente em testículo e hipófise.

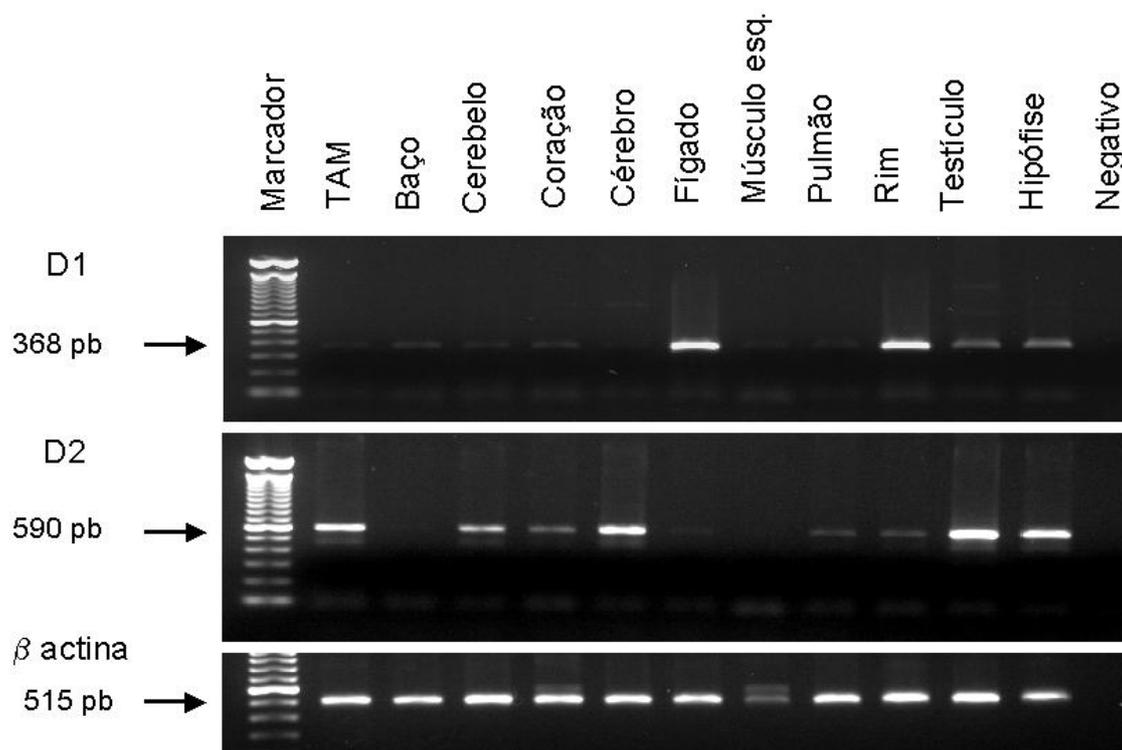


Figura 2: Análise por RT-PCR do padrão de expressão do mRNA da D1 e D2 em diferentes tecidos de camundongos. Os produtos da PCR de 11 tecidos (como indicado) e uma reação controle sem cDNA (Negativo) foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%. Os fragmentos amplificados da D1, D2 e β actina de 368, 590 e 515 pb, respectivamente, estão indicados.

Amostras do RNA total, dos diferentes tecidos, foram avaliadas também por *Northern blot* (Figura 3) para confirmar se o padrão de expressão da D2, observado na análise por RT-PCR, poderia ser reproduzido também por esta técnica. Bandas de hibridização de aproximadamente 7,5 kb, compatíveis com o tamanho do mRNA da D2 descrito em estudos prévios^(15,38), foram observadas nas amostras de RNA total do tecido adiposo marrom, cérebro, cerebelo, testículo e hipófise. Nenhum sinal de hibridização foi observado na amostra de RNA do coração, provavelmente, devido aos baixos níveis de expressão da D2 neste órgão. A análise por *Northern blot* mostra um padrão de expressão muito similar ao observado por RT-PCR.

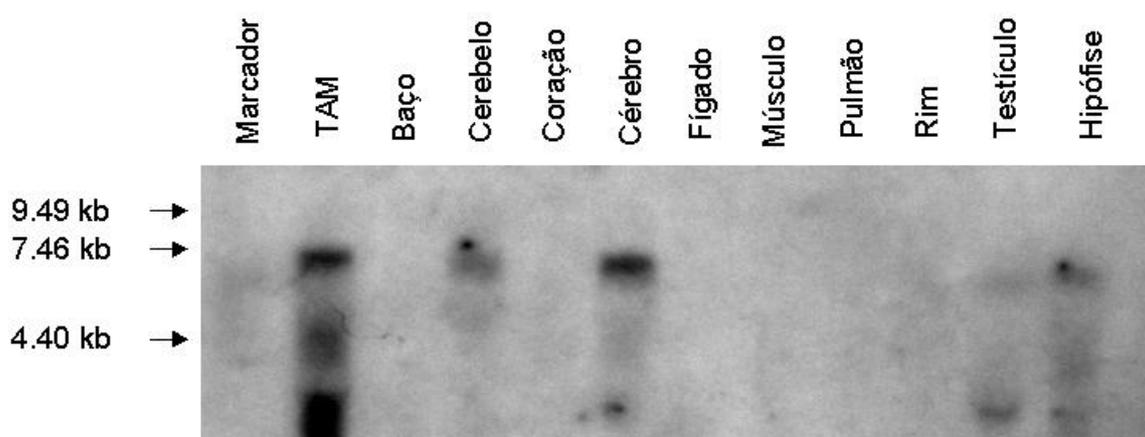


Figura 3: Análise por *Northern blot* do padrão de expressão do mRNA da D2 em diferentes tecidos de camundongos. As bandas de hibridização de, aproximadamente, 7,5 kb indicadas correspondem ao mRNA da D2. A equivalência das quantidades de RNA total aplicadas ao gel ($30 \mu\text{g} \times \text{well}$) foi corrigida pela densidade das bandas do RNA ribossomal 28 e 18 S reveladas por brometo de etídeo.

4.2 - Níveis Séricos dos Hormônios Tireoidianos

A tabela 1 mostra os resultados das dosagens para a determinação das concentrações de T₃ e T₄ totais no soro dos camundongos C57 e C3H controles e tratados com T₃ ou MMI. Não foram observadas diferenças nas concentrações de T₃ total no soro entre ambas as linhagens de camundongos. Por outro lado, os níveis de T₄ dos camundongos C3H é, aproximadamente, o dobro daqueles observados nos camundongos C57. Como esperado, os níveis de T₃ estavam aumentados em ambas as linhagens de camundongos 24 horas após a última injeção de T₃. Apesar do tratamento com MMI, os níveis de T₄ total no soro dos animais C57 e C3H foram reduzidas apenas em 50% daquela dos animais controle, indicando que o hipotireoidismo não foi completo.

Tabela 1: Concentrações de T₃ e T₄ totais no soro de camundongos C57 e C3H, controles e tratados com MMI ou T₃. Os animais receberam água contendo 0,03% de MMI por 8 semanas ou 5 µg de T₃ x animal x dia, ip, por 3 dias. O soro foi obtido 24 h após a última injeção de T₃. Os valores representam a média±DP de três a quatro camundongos.

<i>Status</i> tireoidiano do animal	C57		C3H	
	T ₃ (ng /dl)	T ₄ (µg/dl)	T ₃ (ng /dl)	T ₄ (µg/dl)
Tratado com MMI		2,0±0,4 ^a		2,3±0,3 ^a
Controle	44,5±3,0	3,7±0,3	44,4±3,8	5,3±0,9 ^b
Eutireoideo tratado com T ₃	173,5±158,1	1,0±0,0	245,0±151,6	1,0±0,0

a: diferente do controle (P<0,05); b: diferente do C57 (P<0,05).

4.3 - Efeitos das Alterações no *Status* dos Hormônios Tireoidianos Sobre os Níveis de mRNA das Desiodases Tipos I e II

Para avaliar os efeitos de alterações no *status* dos hormônios tireoidianos, sobre a regulação dos níveis de mRNA da D1 e D2, amostras de RNA total extraídas de diferentes tecidos de camundongos eutireoideos (controles) e tratados com MMI e/ou T₃ foram analisadas por RT-PCR.

A administração de T₃ (5 µg x animal x dia, ip, por 3 dias) a camundongos eutireoideos promoveu uma redução significativa nos níveis de mRNA da D2 no tecido adiposo marrom e coração (Figura 4). Por outro lado, nenhuma alteração significativa nos níveis de mRNA desta enzima foi observada no testículo (Figura 4) e cérebro (Figura 5A) em respostas ao tratamento com T₃. A hipótese de que a dose de T₃, inicialmente administrada aos animais, não tivesse sido suficiente para saturar os receptores de T₃ do tecido cerebral foi testada através da análise por *Northern blot* (Figura 5B) do RNA extraído do cérebro de animais eutireoideos tratados com doses mais elevadas de T₃ (10 µg x animal x dia, ip, por 3 dias). Também, por este método, não se observou redução dos níveis de mRNA da D2 no cérebro, achados compatíveis com aqueles obtidos por RT-PCR. Uma possível explicação para estes resultados, seria que, no estado eutireoideo os receptores de T₃ do tecido cerebral provavelmente estejam quase totalmente ocupados não sendo possível desta forma se observar nenhuma mudança nos níveis de mRNA da D2 pela administração adicional de T₃. Para

investigarmos esta possibilidade, foram administradas doses de 10 μg de T_3 x animal x dia, ip, durante 3 dias a camundongos previamente tratados com MMI. A análise por RT-PCR, do RNA total extraído do cérebro destes animais, demonstrou que o tratamento promoveu uma redução, que não atingiu significância estatística, nos níveis de mRNA da D2 neste tecido (Figura 5C), resultado que talvez possa ser explicado pelo hipotireoidismo parcial obtido nestes animais

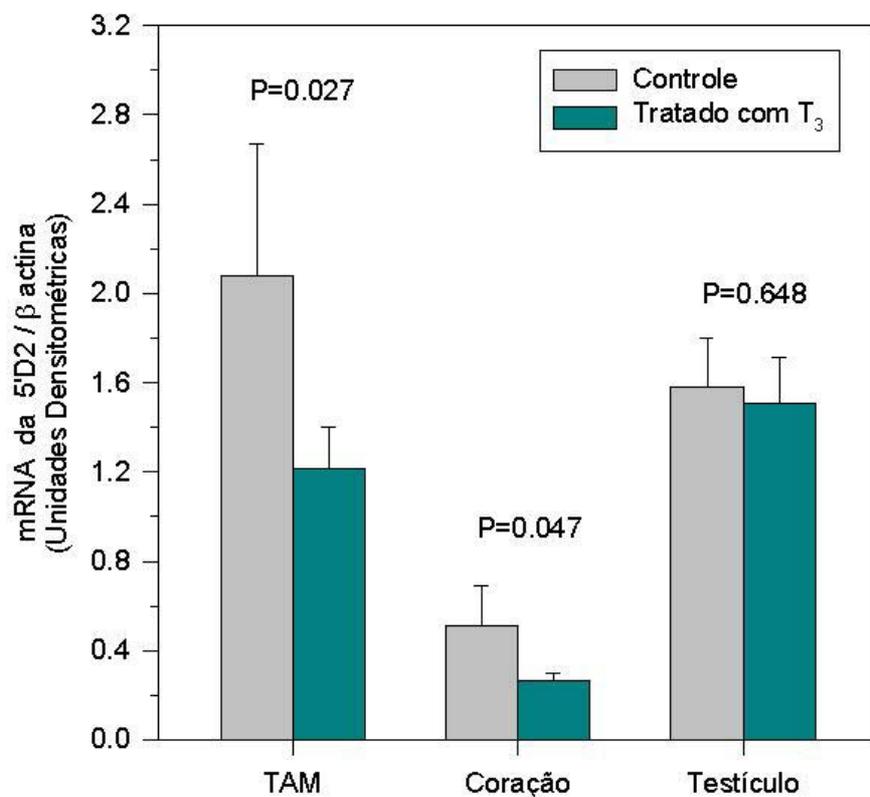


Figura 4: Efeito do tratamento com T₃ sobre os níveis de mRNA da D2 em diferentes tecidos de camundongos. Amostras de RNA total do tecido adiposo marrom (TAM), coração e testículo de animais controle e tratados com T₃ (5 µg × animal × dia, ip, por 3 dias), foram analisadas por RT-PCR. Os valores representam as médias ± DP resultantes da análise densitométrica das bandas formadas pela amplificação do fragmento da D2 corrigidos pela expressão do mRNA da β actina (mRNA D2/mRNA β actina). Os valores P estão indicados.

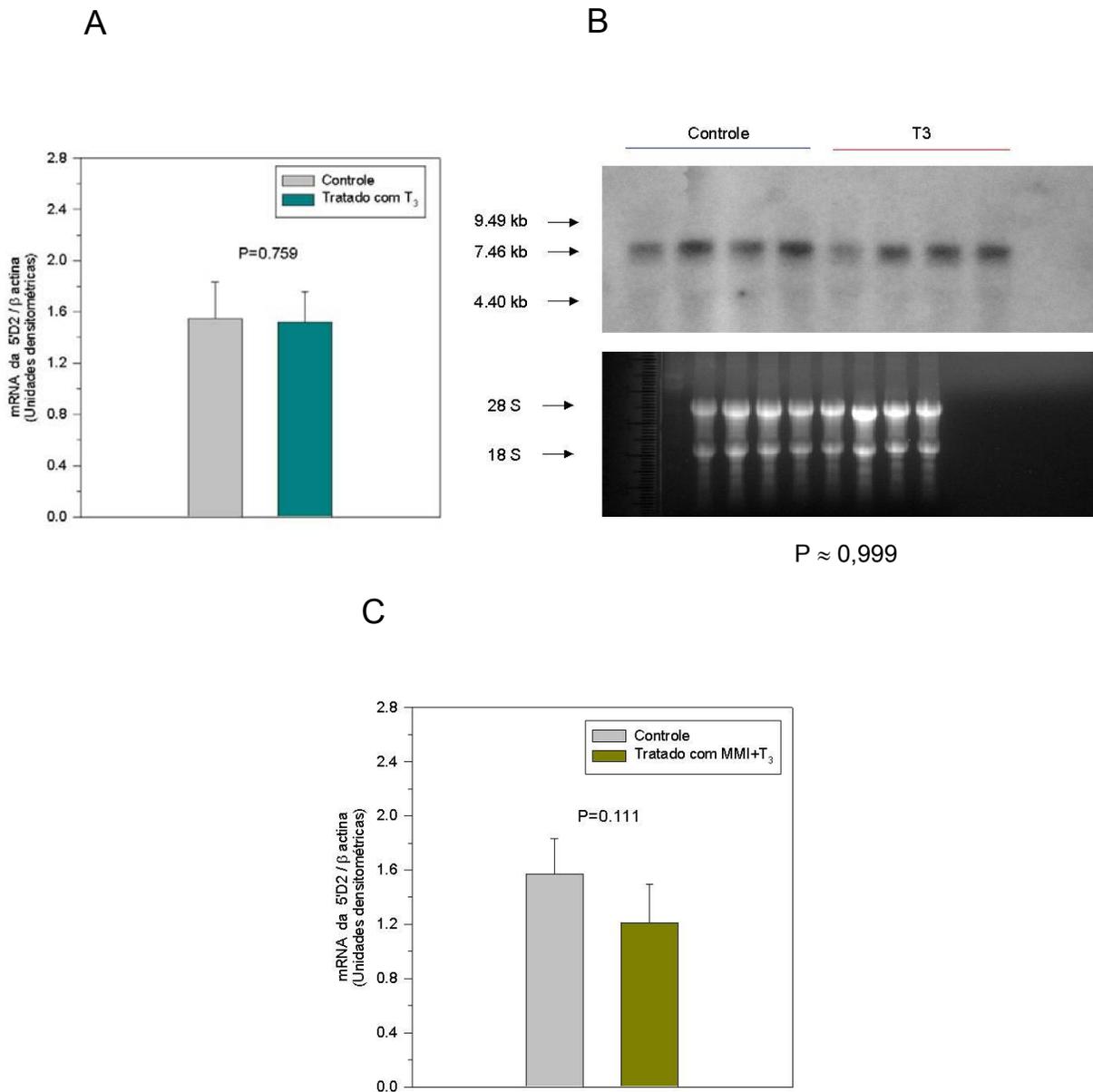


Figura 5: Análise por RT-PCR (A e C) e *Northern blot* (B) dos níveis de mRNA da D2 no cérebro de camundongos controle e tratados com (A) T₃ (5 μg × animal × dia, ip, por 3 dias) ou (B) T₃ (10 μg × animal × dia, ip, por 3 dias) e com (C) 0,03% de MMI + T₃ (10 μg × animal × dia, ip, por 3 dias). Os resultados são apresentados como média±DP e os valores P estão indicados.

Sabe-se que a redução nos níveis dos hormônios tireoidianos promove um aumento na expressão dos transcritos da D2 em vários tecidos. No presente estudo, avaliamos os efeitos do hipotireoidismo sobre os níveis de expressão do mRNA da D2 recentemente identificados no coração e testículo. Observou-se que o hipotireoidismo, ainda que incompleto, promoveu um aumento significativo nos níveis de mRNA da D2 no testículo e teve um menor efeito sobre os níveis de expressão desta enzima no coração (Figura 6). Com base nestes resultados, que sugerem uma maior sensibilidade do testículo à queda dos níveis plasmáticos do T₄, avaliamos também os efeitos do hipo e hipertireoidismo sobre os níveis de expressão do mRNA da D1 neste órgão. As mudanças no *status* dos hormônios tireoidianos não alteraram, significativamente, os níveis de expressão da D1 no testículo, embora tenha-se observado uma queda acentuada nos níveis do mRNA desta enzima, no hipotireoidismo (Figura 7). A não significância estatística deste resultado pode-se dever em parte ao hipotireoidismo incompleto e/ou número insuficiente de amostras analisadas.

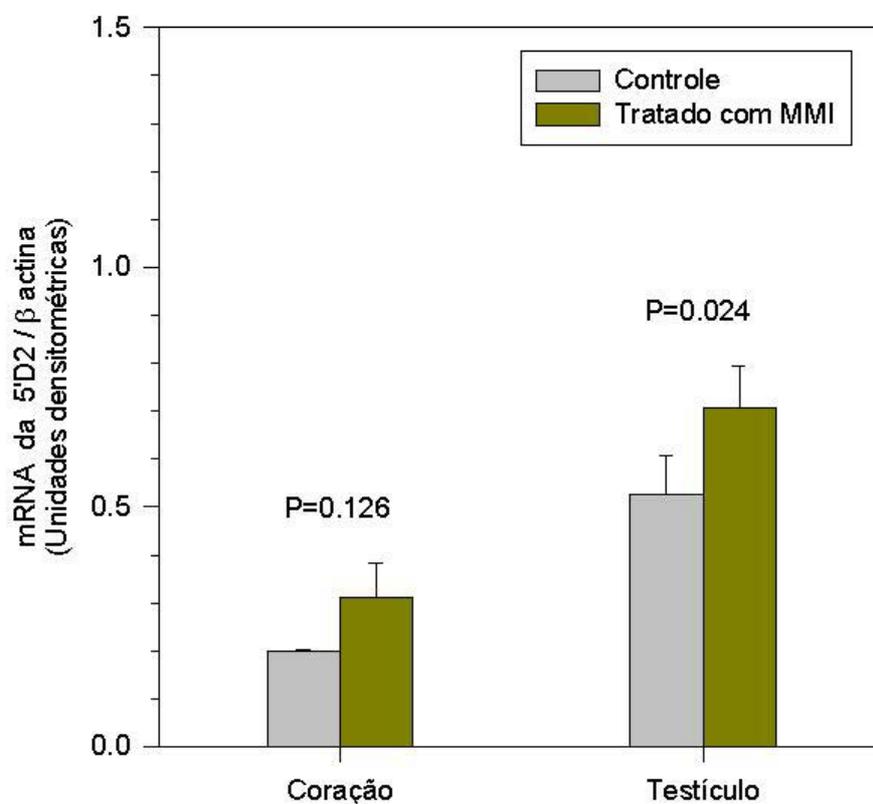


Figura 6: Efeito do hipotireoidismo sobre os níveis de mRNA da D2 em tecidos de camundongos. Amostras de RNA do coração e testículo de animais controle e tratados com 0,03% de MMI foram analisadas por RT-PCR. Os valores são apresentados como média±DP resultantes da análise densitométrica das bandas formadas pela amplificação do fragmento da D2 corrigidas pela expressão da β actina (mRNA D2/mRNA β actina).

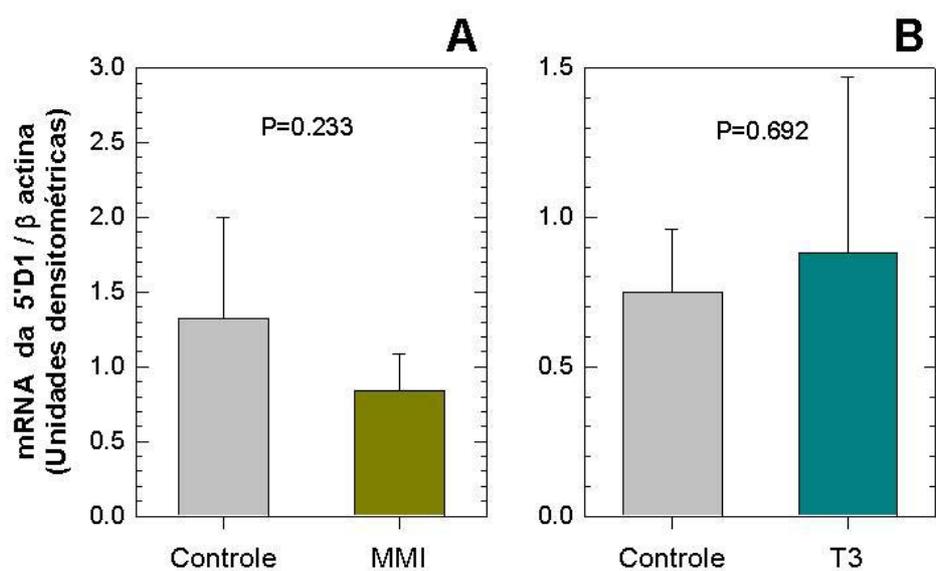


Figura 7: Efeitos dos tratamentos com (A) MMI (0,03%, por 8 semanas) ou (B) T₃ (5 μ g x animal x dia, ip, durante 3 dias) sobre os níveis de mRNA da D1 no testículo de camundongos avaliados por RT-PCR. Os valores são apresentados como média \pm DP. Os valores P estão indicados.

4.4 - Estudo Comparativo dos Níveis de Expressão do mRNA da D2 em Diferentes Tecidos de Camundongos Normais e com Deficiência Inata para Desiodase Tipo I

No presente estudo, avaliamos comparativamente, por RT-PCR, os níveis de expressão do gene da D1, no fígado, e D2, no tecido adiposo marrom, coração, cérebro e testículo, entre os camundongos normais (C57) e com deficiência inata para D1 (C3H).

Inicialmente, avaliamos os níveis de expressão da D1 no fígado dos animais normais e deficientes com o objetivo de nos assegurarmos que a linhagem dos camundongos C3H, obtida aqui no Brasil, mantinha as mesmas características da linhagem de camundongos com a qual os trabalhos anteriores haviam sido realizados^(27,41,58).

Como esperado, os níveis de mRNA da D1 no fígado dos animais deficientes são, significativamente, menores do que a dos animais normais (Figura 8). A administração de T₃ promoveu um aumento substancial na expressão da D1 hepática, em ambas as linhagens de camundongos, da mesma forma como foi descrito previamente⁽⁵⁸⁾. A resposta relativa do gene da D1 do animal C3H ao T₃ parece ser maior do que a do animal controle, uma vez que, o nível basal de expressão do camundongo deficiente é muito menor.

Para avaliarmos se a expressão do gene da D2 era de alguma forma afetado pelo mecanismo compensatório, secundário à deficiência da D1, nos

animais C3H, comparamos os níveis de mRNA desta enzima em diferentes tecidos de camundongos normais e deficientes. Os resultados demonstraram que não há diferença significativa nos níveis de mRNA da D2 no tecido adiposo marrom, coração, cérebro e testículo entre os camundongos C57 e C3H (Figuras 9, 10, 11 e 12).

O tratamento com T_3 promoveu uma redução significativa nos níveis de mRNA da D2 no tecido adiposo marrom, avaliado também por *Northern blot* (Figura 9), e no coração (Figura 10) dos animais C3H e C57. O efeito do tratamento, nestes tecidos, foi similar entre as duas linhagens de camundongos. Por outro lado, o mesmo tratamento não alterou significativamente os níveis de expressão da D2 no cérebro (Figura 11) e testículo (Figura 12).

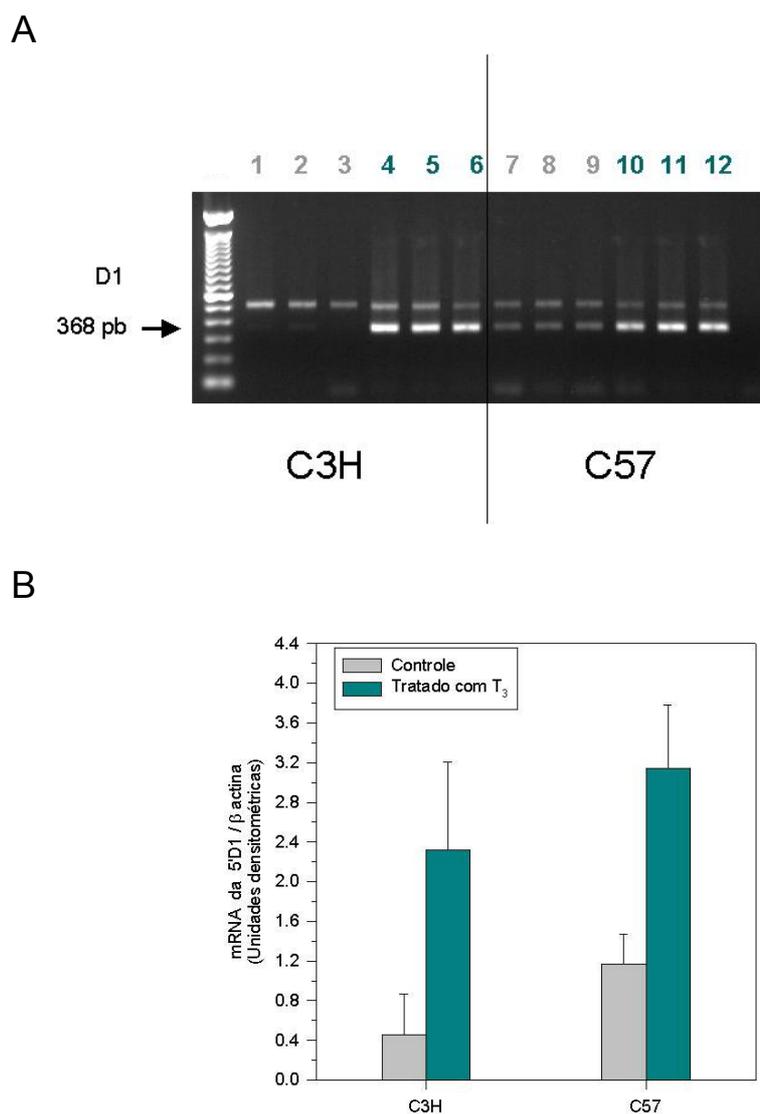


Figura 8: Avaliação, por RT-PCR, dos níveis de expressão do mRNA da D1 no fígado de camundongos normais (C57) e com deficiência inata para esta enzima (C3H). Os produtos da PCR de 3 animais controle (1-3 e 7-9) e 3 tratados com T₃ (4-6 e 10-12) de ambos os grupos de animais foram separados em gel de agarose 1,5% (A). As bandas correspondentes ao fragmento de 368 pb da D1 estão indicadas e as bandas que formam a linha superior correspondem a β actina. No gráfico (B) são apresentados os valores da média \pm DP resultantes da análise densitométrica das bandas da D1 corrigidas pela expressão da β actina. ANOVA C3H x C57, P= 0,006; T₃ x Controle, P< 0,001.

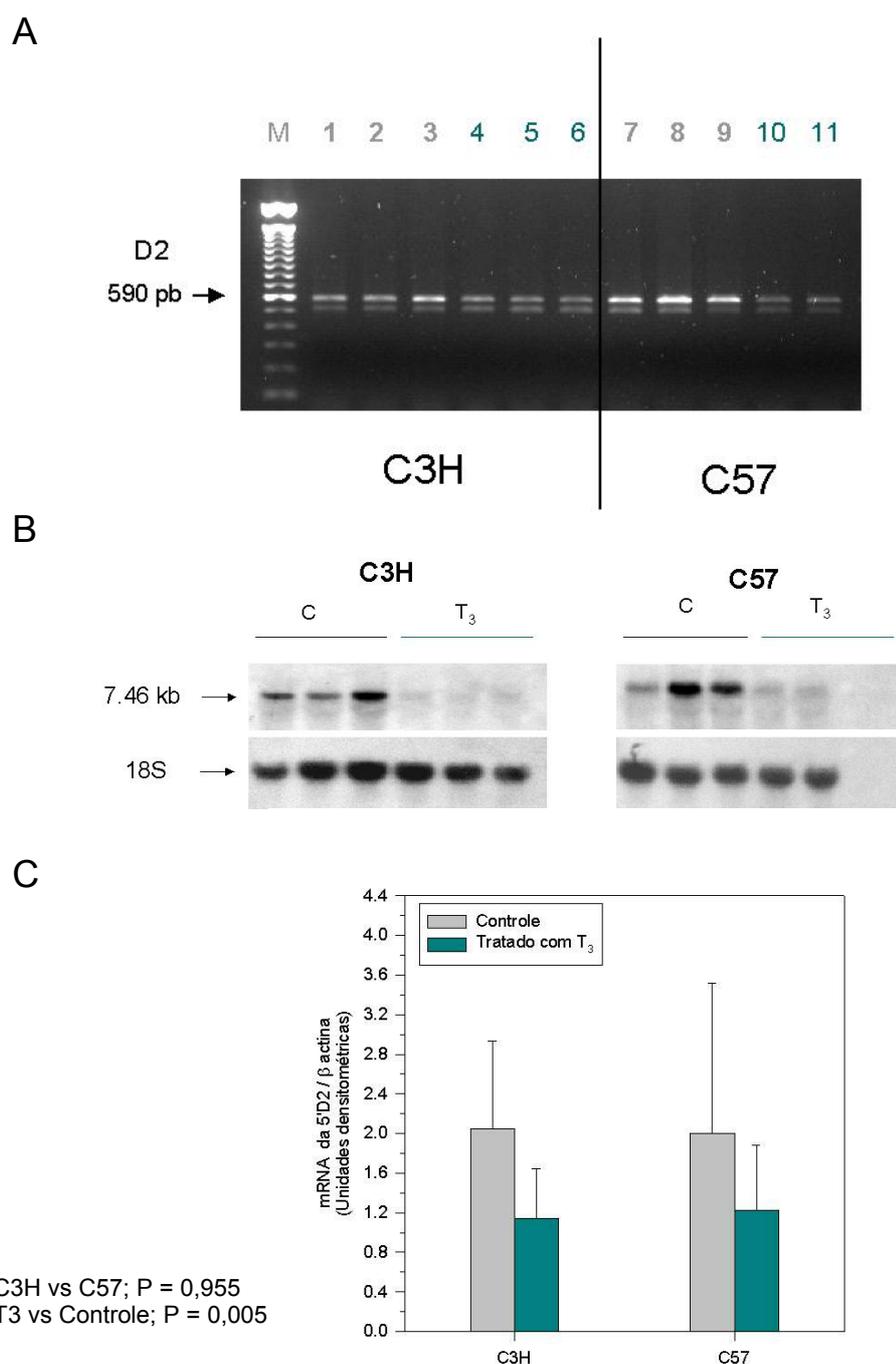


Figura 9: Avaliação por RT-PCR (A) e Northern blot (B) dos níveis de expressão do mRNA da D2 no tecido adiposo marrom dos animais C57 e C3H, controles (1-3 e 7-9) e tratados com T₃ (4-6 e 10-11). Os valores da análise densitométrica das bandas, obtidas por RT-PCR, são apresentados como média±DP (C).

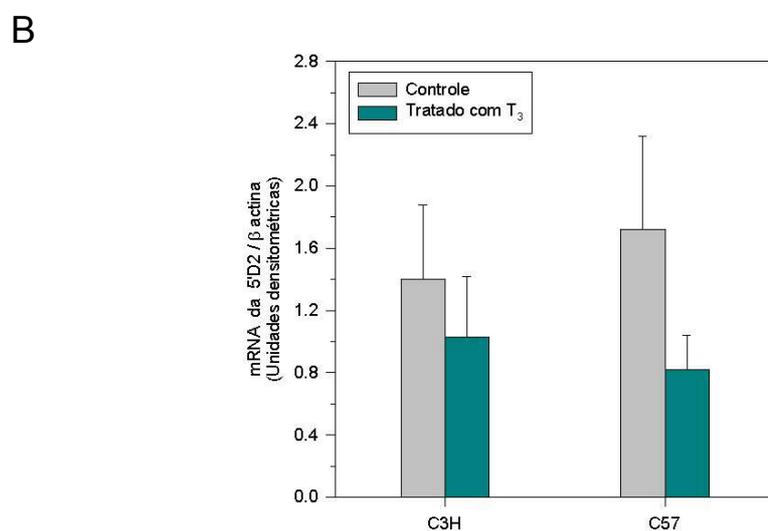
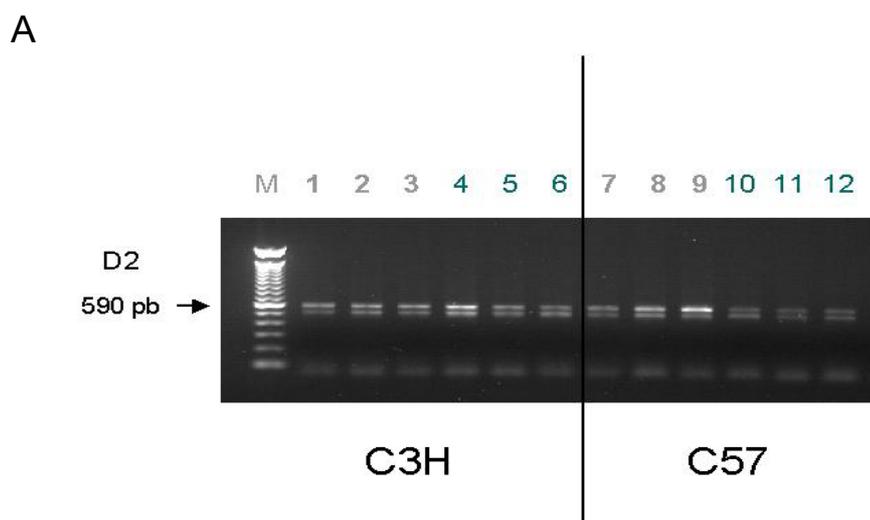


Figura 10: Avaliação por RT-PCR dos níveis de expressão do mRNA da D2 no coração de camundongos normais (C57) e deficientes (C3H), controles (1-3 e 7-9) e tratados com T₃ (4-6 e 10-12) (A). Os valores da análise densitométrica das bandas são apresentados como média±DP (B). ANOVA C3H x C57: P= 0,698; T₃ x Controle, P< 0,001.

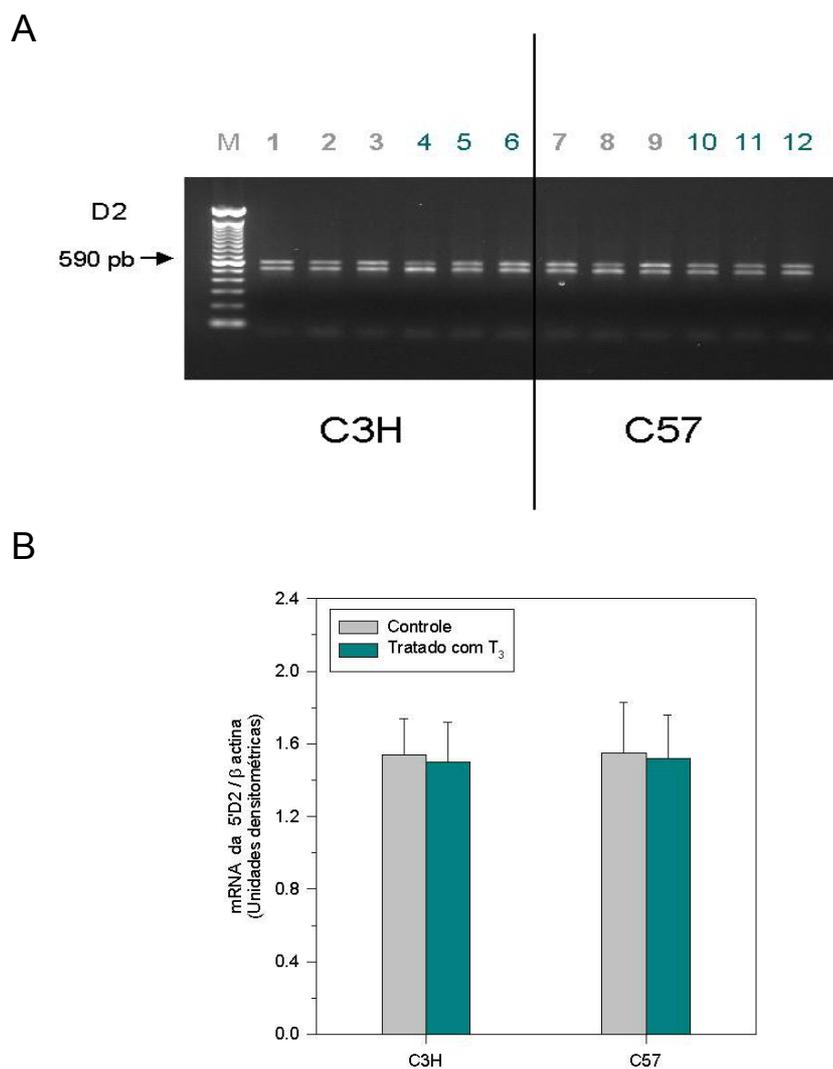


Figura 11: Avaliação por RT-PCR dos níveis de expressão do mRNA da D2 no cérebro de camundongos normais (C57) e deficientes (C3H), controles (1-3 e 7-9) e tratados com T₃ (4-6 e 10-12) (A). Os valores da análise densitométrica das bandas são apresentados como média±DP (B). ANOVA C3H x C57: P= 0,854; T₃ x Controle, P= 0,602.

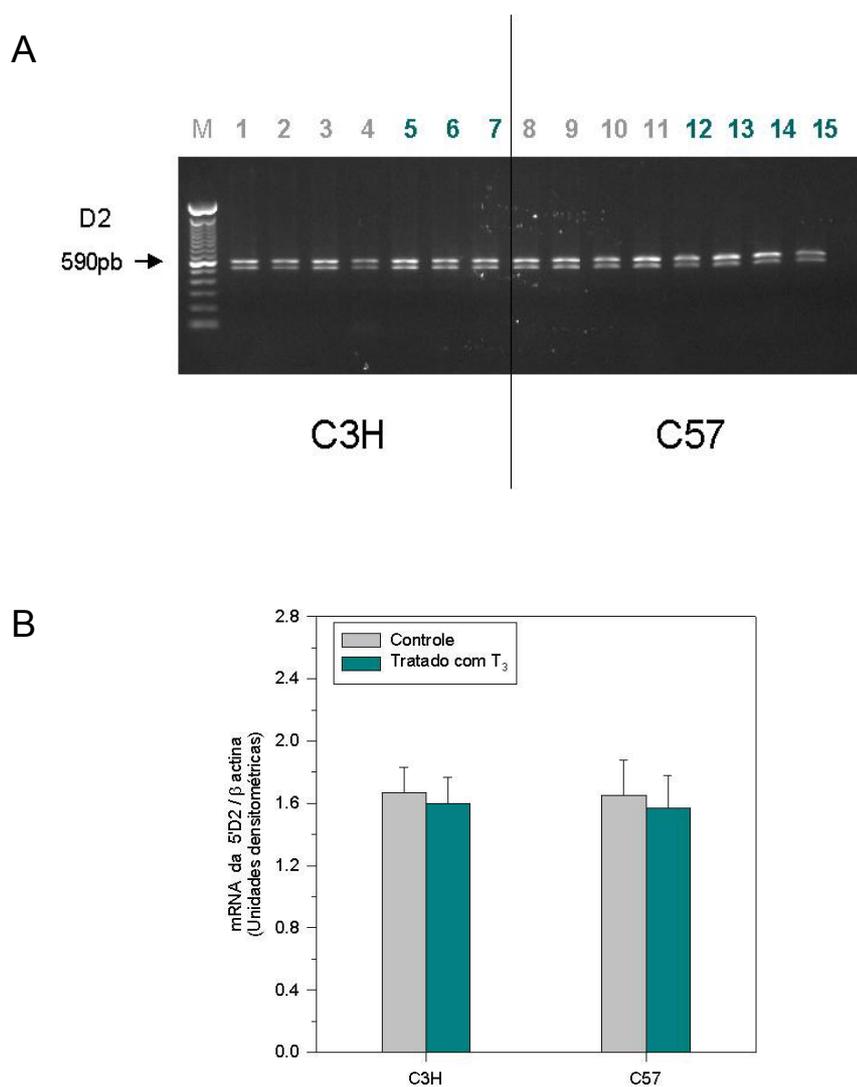


Figura 12: Avaliação por RT-PCR dos níveis de expressão do mRNA da D2 no testículo de camundongos normais (C57) e deficientes (C3H), controles (1-4 e 8-11) e tratados com T₃ (5-7 e 12-15) (A). Os valores da análise densitométrica das bandas são apresentados como média±DP (B). ANOVA C3H x C57: P=0,776; T₃ x Controle, P=0,488.

5 - DISCUSSÃO

5 - DISCUSSÃO

Um dos objetivos do presente trabalho foi determinar o perfil de expressão das desidases de ativação, D1 e D2, em camundongos. Para isso, avaliamos os níveis de mRNA destas enzimas em 11 tecidos de animais adultos. Como esperado, níveis elevados de mRNA da D1 estão presentes no fígado e rim e, níveis relativamente mais baixos, na hipófise e testículo. A avaliação da expressão da D2 nos diferentes tecidos de camundongos demonstrou que o mRNA desta enzima está presente não somente nos tecidos classicamente descritos como cérebro, cerebelo, hipófise e tecido adiposo marrom, mas também no testículo e, em menores quantidades, no coração, pulmões e rins. Nossos resultados demonstraram que os padrões de expressão da D1 e D2, no camundongo, são distintos e apresentam um predomínio tecido específico.

Até recentemente, acreditava-se que a expressão da D2 estivesse restrita a um grupo específico de tecidos tais como, hipófise, sistema nervoso central e tecido adiposo marrom nos quais a manutenção da homeostasia intracelular do T_3 desempenha um papel crítico. Esses conceitos foram baseados, principalmente, em estudos de atividade enzimática em

homogenizados de tecidos de ratos⁽¹¹⁾. Os primeiros estudos realizados após a clonagem dos cDNAs da D2 humana e do rato revelaram, de forma surpreendente, que o mRNA desta enzima se expressa em grandes quantidades nos músculos cardíaco e esquelético em humanos^(15,38), mas não em ratos⁽¹⁵⁾. Altos níveis de expressão da D2 foram observados também na tireóide⁽⁴⁸⁾, placenta⁽³⁸⁾ e, mais recentemente, nos rins e pâncreas humano⁽³⁹⁾, embora em níveis relativamente mais baixos.

A comparação do perfil de expressão da D2 no camundongo, obtida no presente trabalho, com os dados atualmente disponíveis na literatura sobre a distribuição tecidual desta enzima em diferentes espécies de mamíferos, demonstra que a D2 se expressa de forma ampla não somente em tecidos humanos, mas também em camundongos. O perfil de expressão da D2, nestes animais, apresenta-se bastante diferente do descrito em humanos^(15,38,39), mas muito similar ao que vem sendo descrito em ratos⁽¹⁵⁾. Há diferenças marcantes entre espécies de roedores e humanos, no que diz respeito às quantidades de mRNA da D2 presentes nos diferentes tecidos. Os altos níveis de mRNA desta enzima detectados na tireóide e músculos cardíaco e esquelético humanos^(38,48), por exemplo, não são observados em camundongos e ratos⁽¹⁵⁾. Pode-se especular que estas diferenças tenham evoluído de forma a melhor adaptar os diferentes organismos a alterações ambientais e internas e, em decorrência, é possível que existam diferenças

significativas no metabolismo dos hormônios tireoidianos entre espécies de mamíferos.

De acordo com nossos resultados, transcritos da D2 foram detectados em 8 dos 11 tecidos avaliados. Este perfil de expressão, observado por RT-PCR, foi confirmado por *Northern blot*. Recentemente, Song e cols, 2000⁽⁷⁷⁾ descreveram a presença do mRNA da D2 na glândula mamária de camundongos. No mesmo estudo, através da avaliação por RT-PCR da expressão da D2 em outros tecidos de camundongos, os autores detectaram mRNA desta enzima em músculo esquelético, baço e fígado, transcritos que não foram detectados no presente trabalho. Provavelmente, as discrepâncias observadas, entre os nossos resultados e as do estudo anterior, devam-se às diferenças na metodologia adotada, como a utilização de *random hexamers* para direcionar a síntese de cDNA e temperatura de hibridização (*annealing*) mais baixa (55 °C), para a realização das reações da PCR, do que a utilizada no presente trabalho. No nosso estudo, procuramos aumentar a especificidade do método utilizando oligo(dT) para direcionar a transcrição reversa somente das moléculas de mRNA presentes no RNA total, o que diminui bastante a quantidade e a complexidade do cDNA a ser analisado, e temperatura de *annealing* mais elevada, 58 °C.

No rato, atividade da D2 foi detectada em vários tecidos, não previamente descritos como possuidores de mRNA ou atividade, como

timo⁽⁷⁸⁾, glândula pineal⁽⁶³⁾, glândula Harderiana^(79,80), útero⁽⁸¹⁾, testículo e tireóide⁽⁵²⁾.

Uma importante característica do nosso estudo foi a avaliação da expressão de ambas as desidases na mesma amostra de tecido facilitando, desta forma, a comparação dos perfis de expressão das enzimas entre os diferentes tecidos dos camundongos. Nossos resultados demonstraram que a D2, além de se expressar de forma ampla entre os diversos tecidos de camundongos, apresenta um padrão de distribuição tecidual que parece ser complementar ao apresentado pela D1, ou vice-versa, onde a maioria dos tecidos expressa uma ou outra isoforma das 5' desidases. A co-expressão destas enzimas, em quantidades relativamente altas, está restrita a apenas dois dos tecidos avaliados, hipófise e testículo.

Fortes evidências sugerem que a co-expressão da D1 e D2 na hipófise, que contribuem de forma significativa para a produção local de T_3 a partir de T_4 , é essencial para o mecanismo de *feedback* negativo que regula a produção e secreção de TSH e, conseqüentemente, os níveis dos hormônios tireoidianos^(37,82,83). Da mesma forma, pode-se sugerir que a co-expressão da D1 e D2 no testículo desempenhe um papel importante na manutenção de níveis adequados do hormônio tireoidiano, neste órgão, preservando assim a função reprodutiva nos estados de hipo e hipertireoidismo.

A atividade da D2 é um importante ponto de controle do mecanismo de ação dos hormônios tireoidianos uma vez que ela aumenta em situações de baixos níveis de T_4 , preservando, desta forma, as concentrações de T_3 nos tecidos onde ela se expressa. Estudos anteriores demonstraram que mudanças significativas nos níveis de mRNA da D2 no tecido adiposo marrom, hipófise, cérebro e músculo esquelético são observadas em resposta a alterações nos níveis dos hormônios tireoidianos^(15,60,61,84).

No curso do estudo da comparação da expressão do mRNA da D1 e D2, nos diferentes tecidos de camundongos, observamos que os níveis de mRNA destas enzimas no testículo são consideravelmente altos. Embora, as atividades de ambas as desidases já tenham sido descritas no testículo de ratos adultos⁽⁵²⁾, até onde sabemos, não se conhecem os efeitos das alterações nos níveis dos hormônios tireoidianos sobre a regulação do mRNA da D1 e D2 neste órgão. Da mesma forma, a expressão da D2 no coração de camundongos, embora em níveis significativamente mais baixos do que os detectados em humanos^(15,38), nos levou a investigar a possibilidade do mRNA desta enzima no coração, órgão bastante sensível ao aumento nos níveis de T_3 ⁽⁸⁵⁾, ser regulado por alterações nos níveis plasmáticos dos hormônios tireoidianos.

Os hormônios tireoidianos exercem seus efeitos nos diferentes tecidos alvo através da sua ligação a receptores nucleares específicos, de modo que, o número de receptores disponíveis no núcleo das células e a concentração de

T₃ são os principais determinantes do mecanismo de ação destes hormônios. Há considerável variação, entre os diferentes tecidos, em termos de número de receptores de T₃ disponíveis, com alguns apresentando alta capacidade enquanto outros possuem, relativamente, um menor número de sítios específicos para a ligação do T₃⁽⁸⁶⁾. Além da variação no número de receptores, diferenças entre os tecidos ocorrem também em termos de número de sítios de ligação ocupados e o grau com o qual o T₃ derivado do plasma ou o produzido localmente contribuem para a ocupação dos receptores⁽⁸²⁾. Na maioria dos tecidos, o T₃ ligado aos receptores é derivado do plasma, entretanto em tecidos como córtex cerebral e hipófise o T₃ produzido intracelularmente, pela 5' desiodação local, contribui significativamente para o fornecimento de T₃ ao núcleo. Cerca de 80% do T₃ presente no tecido cerebral é gerado pela atividade da D2, este T₃ não substitui o proveniente do plasma mas é aditivo a ele⁽⁸²⁾. Assim o grau de saturação dos receptores nestes tecidos é, substancialmente, mais elevado do que os dos demais tecidos.

No presente estudo, focalizamos nossa investigação nos efeitos do hipo e hipertireoidismo, especificamente, sobre a regulação dos níveis de mRNA da D2 em diferentes tecidos de camundongos e sobre os níveis de expressão do mRNA da D1 no testículo. Nossos resultados demonstraram que o hipertireoidismo, induzido pela administração de T₃ a animais eutireoideos, reduziu significativamente os níveis de mRNA da D2 no tecido

adiposo marrom e coração, mas teve pouco ou nenhum efeito sobre a expressão da D2 no cérebro e testículos. Neste último, o tratamento com T₃ também não alterou os níveis do mRNA da D1, ao contrário do hipotireoidismo, estado no qual se observou uma pequena redução na expressão do mRNA desta enzima. A indução do hipotireoidismo em camundongos resultou em um aumento na expressão do mRNA da D2 no coração e testículos.

Em ratos, estudos apresentam resultados controversos a respeito dos efeitos das alterações no *status* dos hormônios tireoidianos sobre os níveis do mRNA da D2 no córtex cerebral. Alguns relatam alterações significativas nos níveis da D2 em respostas ao hipo e hipertireoidismo^(60,62) enquanto outros descrevem pouco ou nenhum efeito⁽¹⁵⁾. No presente estudo, não observamos alterações nos níveis do mRNA da D2 no cérebro de camundongos eutireoideos tratados com doses elevadas de T₃. O córtex cerebral, no estado eutireoideo, parece possuir virtualmente todos os receptores de T₃ ocupados⁽⁸⁷⁾, o que explicaria o fato de a elevação dos níveis plasmáticos desse hormônio não ter resultado em redução significativa nos níveis de mRNA da D2, como descrito em outros estudos^(60,62). Nos animais tratados com MMI e posteriormente com T₃, observamos uma pequena redução dos transcritos da D2 no cérebro. Embora este efeito não tenha sido estatisticamente significativo, acreditamos que ele possa ser explicado pelo hipotireoidismo parcial obtido nestes animais, uma vez que, o tratamento

com MMI reduziu em apenas 50% os níveis de T₄ circulantes, de modo que, os receptores provavelmente apresentem, ainda, um grau considerável de saturação.

Os hormônios tireoidianos desempenham um papel importante no sistema cardiovascular atuando na regulação da frequência e débito cardíacos e conteúdo lipídico. O hipotireoidismo em humanos e modelos animais resulta em baixa frequência e débito cardíacos e hiperlipidemia tendo o hipertireoidismo efeitos opostos⁽⁸⁸⁾. Estudos tem demonstrado que o T₃ regula a transcrição de genes específicos nos cardiomiócitos^(89,90). Estes genes codificam importantes proteínas estruturais e regulatórias que incluem as isoformas α e β da cadeia de miosina pesada, Ca²⁺-ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA 2), adenilciclase V e VI e vários canais iônicos de membrana⁽⁹¹⁾. Estes e outros estudos demonstraram que o coração é um dos órgãos mais sensíveis ao aumento nos níveis dos hormônios tireoidianos⁽⁹¹⁾. Os altos níveis de expressão do mRNA da D2 recentemente detectados no coração, em humanos^(15,38), sugeriu a possibilidade do tecido cardíaco responder não somente a mudanças nos níveis plasmáticos de T₃ mas também aos do T₄.

Recentemente, Pachucki e cols, 2001⁽⁹²⁾, utilizando camundongos transgênicos, avaliaram os efeitos da expressão da D2 humana no miocárdio de camundongos em termos de função cardíaca e expressão gênica. Os resultados demonstraram que a expressão da D2 teve muito pouco efeito

sobre vários parâmetros da função cardíaca no camundongo. Apesar dos altos níveis de atividade da D2, os animais permaneceram com níveis de T_3 minimamente aumentados no miocárdio. Assim, o papel fisiológico dos transcritos da D2 no coração de humanos e roedores ainda não está estabelecido.

No presente trabalho identificamos mRNA da D2 no coração de camundongos e demonstramos que, embora estes transcritos apareçam em níveis bem mais baixos do que os previamente descritos em humanos, eles são regulados pelos hormônios tireoidianos. Os níveis de mRNA da D2 no miocárdio de camundongos foram, significativamente, reduzidos pelo aumento nos níveis plasmáticos de T_3 . Observamos um aumento na expressão da D2 quando os níveis de T_4 caem, embora sem significância estatística.

O testículo adulto em vertebrados é descrito, classicamente, como um órgão pouco responsivo aos hormônios tireoidianos o que é, normalmente, atribuído ao baixo número de sítios de ligação específicos para o T_3 ^(93,94). Entretanto, o testículo é um órgão heterogêneo, formado por diferentes tipos celulares, e o pequeno número de sítios de ligação para o T_3 , no órgão inteiro, pode ser devido a diluição das células positivas, para presença de receptores, pelo abundante número de células negativas para esta característica. Assim, o número de receptores em um tipo celular específico pode ser muito mais alto do que a média, dependendo da porcentagem destas células dentro do

tecido⁽⁸⁶⁾. Estudos têm descrito, a presença de receptores dos hormônios tireoidianos no testículo adulto, em ratos e humanos^(95,96,97). Recentemente, Buzzard e cols, 2000⁽⁹⁸⁾ demonstraram a presença do receptor de T_3 , $TR\alpha 1$, em células germinativas sob diferenciação espermatogênica sugerindo um possível papel dos hormônios tireoidianos no testículo de ratos adultos. Esta idéia ganha ainda maior sustentação, pelos recentes resultados de estudos que demonstram a presença de níveis significativos de atividade da D1, D2 e D3 no testículo de ratos adultos⁽⁵²⁾.

Há evidências na literatura indicando que o hipotireoidismo não altera a espermatogênese e a função esteroidogênica testicular, quando induzido em ratos adultos^(99,100). No presente estudo demonstramos que a expressão do mRNA da D2, no testículo de camundongos, aumenta significativamente após a indução do hipotireoidismo. Em diferentes tecidos, a expressão da D2 forma um importante mecanismo protetor contra o hipotireoidismo, uma vez que, sua atividade e mRNA aumentam em situações em que os níveis de T_4 caem, aumentando desta forma a eficiência na produção de T_3 ^(15,60,101,102). Este mecanismo protetor foi demonstrado em tecidos criticamente dependentes de T_3 como o córtex cerebral⁽⁶⁰⁾, hipófise⁽⁶²⁾ e tecido adiposo marrom⁽¹⁵⁾. É provável, baseados nos resultados obtidos no presente estudo, que mecanismo similar esteja operando também no testículo, o único órgão além da hipófise a co-expressar elevados níveis de mRNA da D1 e D2, em roedores. O aumento dos níveis de mRNA da D2 e a

queda discreta do mRNA da D1 em resposta ao hipotireoidismo parcial obtido no presente estudo, são indicativos da necessidade da manutenção de níveis relativamente estáveis de T_3 no testículo adulto. Estudos adicionais são necessários para investigar se o aumento nos níveis do mRNA da D2, observados no hipotireoidismo, são acompanhados por um aumento da atividade desta enzima no testículo adulto e se, o hipotireoidismo mais completo, altera de forma significativa a expressão da D1.

Como descrito anteriormente, no presente trabalho, a maioria dos tecidos de camundongos expressa apenas uma das isoformas das desidases de ativação, com apenas dois tecidos apresentando níveis elevados de co-expressão da D1 e D2. Este padrão de expressão complementar apresentado pelas desidases, provavelmente, permita regular de maneira tecido específica os níveis dos hormônios tireoidianos nos diferentes órgãos. A importância das desidases na regulação tecido específica dos níveis dos hormônios tireoidianos é sugerida em estudos que mediram os níveis teciduais desses hormônios em ratos hipotireoideos cronicamente tratados com doses variadas de T_3 , T_4 ou uma combinação de ambos⁽¹⁰³⁾. Os resultados demonstraram que apenas a combinação de doses apropriadas de ambos os hormônios permite que o eutireoidismo seja alcançado em todos os tecidos simultaneamente⁽¹⁰³⁾. Resultados como estes sugerem que as atividades das desidases estejam integradas com as atividades secretórias e

de *feed-back* da glândula tireóide no sentido de manter a homeostasia hormonal.

Embora, alguns aspectos funcionais das iodotironinas desiodases tenham sido claramente delineados, o exato papel fisiológico e os mecanismos moleculares envolvidos na função e regulação dessas enzimas ainda não são bem compreendidos. A escassez de modelos animais, identificados até o momento, com deficiência natural para estas enzimas, com exceção dos camundongos C3H, e a inexistência de inibidores específicos para D2 e D3, fazem com que o papel fisiológico dessas enzimas seja inferido a partir de suas propriedades catalíticas, padrão de distribuição tecidual e regulação. Assim, os camundongos C3H que possuem uma deficiência genética inata da D1⁽⁴¹⁾, representam um importante modelo animal que permite avaliar o impacto da deficiência da D1 sobre as demais desiodases.

Nos camundongos C3H a deficiência da D1 é compensada com o aumento dos níveis séricos de T₄ que nestes animais é, aproximadamente, o dobro daquele observado nos animais normais, C57⁽⁴¹⁾. A atividade da D2 no cérebro e hipófise dos camundongos C3H está reduzida à metade e, portanto, a contribuição do T₃ produzido por esta via para o *pool* nuclear permanece, aproximadamente, igual ao dos camundongos normais, apesar das altas concentrações de T₄ nestes tecidos. Estas mudanças compensatórias internas resultam em níveis similares de secreção de TSH, demonstrada entre

as duas linhagens de camundongos estudadas⁽⁴¹⁾, e no fenótipo eutireoideo observado na linhagem C3H.

No presente estudo avaliamos, comparativamente, os níveis de expressão do mRNA da D2 em tecidos de camundongos normais e deficientes para determinarmos se os transcritos da D2, como os da D1, estavam alterados nos animais deficientes. Procuramos, também, através da avaliação dos níveis de mRNA, determinar o mecanismo pelo qual o T₄ regula a atividade da D2 nos animais C3H, cronicamente expostos a níveis elevados deste hormônio. Além disso, estudamos o efeito do T₃ sobre a regulação da expressão do gene da D2 nos camundongos C3H.

Nossos resultados demonstraram, que a deficiência da D1 não altera, ao contrário da atividade, os níveis basais de expressão do mRNA da D2 nos tecidos dos animais C3H quando comparados aos animais C57. A regulação da atividade da D2 pelos hormônios tireoidianos, ao contrário da D1 e D3, é complexa e envolve ambos os mecanismos transcricional^(15,60,61) e pós-transcricional^(64,65,66,67). O efeito melhor caracterizado é o do T₄ que parece atuar acelerando a taxa de degradação da proteína^(69,70). O T₄ é muito mais potente do que o T₃ na produção deste efeito sugerindo um mecanismo regulatório extra-nuclear T₃-independente^(60,62). Este mecanismo pós-transcricional, envolvido na regulação da D2, representa uma via autorregulatória adicional para o controle da atividade dessa importante enzima. Nossos resultados confirmam que o T₄ regula a atividade da D2, também nos

camundongos deficientes, através de um mecanismo exclusivamente pós-transcricional.

A resposta relativa do gene da D1 no animal C3H, ao tratamento com T_3 , é muito maior do que a do animal C57, uma vez que a diferença marcante no nível basal de expressão entre as duas linhagens foi virtualmente eliminada pelo tratamento com T_3 ⁽⁵⁸⁾. Ao avaliarmos o efeito do tratamento com T_3 , sobre os níveis de mRNA da D2 nos camundongos deficientes, observamos que, nos tecidos que tiveram seus níveis de mRNA reduzidos por este tratamento como o tecido adiposo marrom e coração, o efeito foi similar entre ambas as linhagens de camundongos.

Os resultados desses estudos, indicam que a deficiência da D1 não modifica o nível basal de expressão do mRNA da D2 nos camundongos deficientes. O gene da D2 responde de forma similar ao tratamento com T_3 , em ambas as linhagens de camundongos, sugerindo nenhuma alteração na forma como este gene é regulado pelo hormônio tireoidiano nos animais deficientes. Além disso, o T_3 regula de maneira tecido específica o gene da D2 em ambas as linhagens de camundongos.

6 - CONCLUSÕES

6 - CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo nos permitem concluir que:

- O mRNA da D2 se expressa de forma ampla, em diferentes tecidos de camundongos, apresentando um padrão de expressão similar ao descrito em ratos.
- A co-expressão de níveis relativamente altos da D1 e D2 no testículo de camundongos e o aumento nos níveis de mRNA da D2, em resposta ao hipotireoidismo, sugerem que estas enzimas possam desempenhar um papel importante no controle homeostático do hormônio tireoidiano neste órgão.
- O mecanismo fisiológico compensatório, decorrente da deficiência da desidase tipo I, não altera os níveis basais de expressão do mRNA da desidase tipo II nos tecidos dos camundongos C3H, confirmando que o T₄ atua ao nível pós-transcricional na regulação da atividade da D2 nestes animais.
- O gene da D2 responde de forma similar ao tratamento com T₃ em ambas as linhagens de camundongos e seu padrão de regulação é tecido específico.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Silva JE. Thyroid hormone control of thermogenesis and energy balance. **Thyroid** 1995; 5: 481-492.
2. Oppenheimer JH, Schwartz HL. Molecular basis of thyroid hormone-dependent brain development. **Endocrine Reviews** 1997; 18: 462-475.
3. Campos-Barros A, Amma LL, Faris JS, Shailam R, Kelley MW, Forrest D. Type 2 iodothyronine deiodinase expression in the cochlea before the onset of hearing. **Neurobiology** 2000; 97: 1287-1292.
4. Guadano-Ferraz A, Escámez MJ, Rausell E, Bernal J. Expression of type 2 iodothyronine deiodinase in hypothyroid rat brain indicates an important role of thyroid hormone in the development of specific primary sensory systems. **Journal of Neuroscience** 1999; 19: 3430-3439.
5. St.Germain DL. Development effects of thyroid hormone: the role of deiodinases in regulatory control. **Biochemical Society Transactions** 1999; 27: 83-88.
6. Brent GA. The molecular basis of thyroid hormone action. **New England Journal of Medicine** 1994; 331: 847-853.
7. Ribeiro RCJ, Apriletti JW, Wagner RL, et al. Mechanisms of thyroid hormone action: insights from X-ray crystallographic and functional studies. **Recent Progress in Hormone Research** 1998; 53: 351-393.
8. Engler D, Burger AG. The deiodination of the iodothyronines and their derivatives in man. **Endocrine Reviews** 1984; 5: 151-184.

9. St.Germain DL, Galton VA. The deiodinase family of selenoproteins. **Thyroid** 1997; 7: 655-668.
10. St.Germain DL. Iodothyronine deiodinase. **Trends in Endocrinology & Metabolism** 1994; 5: 36-42.
11. Leonard JL, Visser TJ: Biochemistry of deiodination. In: Hennemann G. *Thyroid Hormone Metabolism*. New York: Marcel Dekker, 1986; 189-229.
12. Visser TJ, Leonard JL, Kaplan MM, Larsen PR. Kinetic evidence suggesting two mechanisms for iodothyronine 5' - deiodination in rat cerebral cortex. **Proceedings of the National Academy of Science** 1982; 79: 5080-5084.
13. Kaplan MM, Visser TJ, Yaskoski KA, Leonard JL. Characteristics of iodothyronine tyrosyl ring deiodination by rat cerebral cortical microsomes. **Endocrinology** 1983; 112: 35-42.
14. Berry MJ, Banu L, Larsen PR. Type I iodothyronine deiodinase is a selenocysteine-containing enzyme. **Nature** 1991; 349: 438-440.
15. Croteau W, Davey JC, Galton VA, St.Germain DL. Cloning of the mammalian type II iodothyronine deiodinase. A selenoprotein differentially expressed and regulated in human and rat brain and other tissues. **Journal of Clinical Investigation** 1996; 98: 405-417.
16. Wang Z, Brown DD. Thyroid hormon-induced gene expression program for amphibian tail resorption. **Journal of Biological Chemistry** 1993; 268: 16270-16278.
17. Jakobs TC, Koehler MR, Schmutzler C, Glaser F, Schmid M, Köhrle J. Structure of the human type I iodothyronine 5' - deiodinase gene and localization to chromosome 1p32-p33. **Genomics** 1997; 42: 361-363.
18. Hernandez A, Park JP, Lyon GJ, Mohandas TK, St.Germain DL. Localization of the type 3 iodothyronine deiodinase (*DIO3*) gene to human chromosome 14q32 and mouse chromosome 12F1. **Genomics** 1998; 53: 119-121.

19. Celi FS, Canetieri G, Yarnall DP, Burns DK, Andreoli M, Schuldiner AR, Centanni M. Genomic characterization of the coding region of the human type II 5' - deiodinase gene. **Molecular & Cellular Endocrinology** 1998; 14: 49-52.
20. Berry MJ, Maia AL, Kieffer JD, Harney JW, Larsen PR. Substitution of cysteine for selenocysteine in type I iodothyronine deiodinase reduces the catalytic efficiency of the protein but enhances its translation. **Endocrinology** 1992; 131: 1848-1852.
21. Buettner C, Harney JH, Larsen PR. The role of selenocysteine 133 in human type 2 deiodinase for kinetic properties *in vivo* and *in vitro*. **Program of the 71st meeting of the American Thyroid Association** 1999; 83.
22. Berry MJ, Banu L, Chen Y, Mandel SJ, Kieffer JD, Harney JW, Larsen PR. Recognition of UGA as a selenocysteine codon in type I deiodinase requires sequences in the 3' untranslated region. **Nature** 1991; 353: 273-276.
23. Behne D, Kyriakopoulos A, Meinhold H, Köhrle J. Identification of type I iodothyronine 5' - deiodinase as a selenoenzyme. **Biochemical & Biophysical Research Communications** 1990; 173: 1143-1149.
24. Arthur JR, Nicol F, Beckett GJ. Hepatic iodothyronine 5' - deiodinase: the role of selenium. **Biochemical Journal** 1990; 272: 537-540.
25. Mandel SJ, Berry MJ, Kieffer JD, Harney JW, Warne RL, Larsen PR. Cloning and *in vitro* expression of the human selenoprotein, type I iodothyronine deiodinase. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism** 1992; 75: 1133-1139.
26. Toyoda N, Harney JW, Berry MJ, Larsen PR. Identification of critical amino acids for 3, 5, 3' - triiodothyronine deiodination by human type I deiodinase based on comparative functional-structural analysis of the human, dog, and rat enzymes. **Journal of Biological Chemistry** 1994; 269: 20329-20334.

27. Maia AL, Berry MJ, Sabbag R, Harney JW, Larsen PR. Structural and functional differences in the *dio1* gene in mice with inherited type 1 deiodinase deficiency. **Molecular Endocrinology** 1995; 9: 969-980.
28. Van der Geyten S, Sanders JP, Darra VM, Kuhn ER, Visser TJ. Cloning of chicken type I and III iodothyronine deiodinases and study of their expression during embryonic liver development. **Program of 3rd meeting of the European Thyroid Association** 1996; 92.
29. Sanders JP, Van der Geyten S, Kaptein E, Darras VM, Kuhn ER, Visser TJ. Cloning of iodothyronine deiodinase from fish. **Program of the 69th Meeting of the American Thyroid Association** 1996; 173.
30. Croteau WC, Whittemore SL, Schneider MJ, St.Germain DL. Cloning and expression of a cDNA for a mammalian type III iodothyronine deiodinase. **Journal of Biological Chemistry** 1995; 270: 16569-16575.
31. Salvatore D, Low SC, Berry L, Maia AL, Harney JW, Croteau W, St.Germain DL, Larsen PR. Type 3 iodothyronine deiodinase: cloning, *in vitro* expression, and functional analysis of the placental selenoenzyme. **Journal of Clinical Investigation** 1995; 96: 2421-2430.
32. Becker KB, Schneider MJ, Davey JC, Galton VA. The type III 5-deiodinase in *Rana catesbeiana* tadpoles is encoded by a thyroid hormone-responsive gene. **Endocrinology** 1995; 136: 4424-4431.
33. Davey JC, Becker KB, Schneider MJ, St.Germain DL, Galton VA. Cloning of a cDNA for the type II iodothyronine deiodinase. **Journal of Biological Chemistry** 1995; 270: 26786-26789.
34. Valverde RC, Croteau W, Lafleur Jr GL, Orozco A, St.Germain DL. Cloning and expression of a 5' - iodothyronine deiodinase from the liver of *Fundulus heteroclitus*. **Endocrinology** 1997; 138: 642-648.
35. Davey JC, Schneider MJ, Becker KB, Galton VA. Cloning of a 5.8 kb cDNA for a mouse type 2 deiodinase. **Endocrinology** 1999; 140: 1022-1025.

36. Gereben B, Bartha T, Tu HM, Harney JW, Rudas P, Larsen PR. Cloning and expression of the chicken type 2 iodothyronine 5' - deiodinase. **Journal of Biological Chemistry** 1999; 274: 13768-13776.
37. Köhrle J. Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family. **Molecular & Cellular Endocrinology** 1999; 151: 103-119.
38. Salvatore D, Bartha T, Harney JW, Larsen PR. Molecular biological and biochemical characterization of the human type 2 selenodeiodinase. **Endocrinology** 1996; 137: 3308-3315.
39. Bartha T, Kim SW, Salvatore D, Gereben B, Tu HM, Harney JW, Rudas P, Larsen PR. Characterization of the 5'-flanking and 5'-untranslated regions of the cyclic adenosine 3', 5' - monophosphate-responsive human type 2 iodothyronine deiodinase gene. **Endocrinology** 2000; 141: 229-237.
40. Mc Caughan KK, Brown CM, Dalphin ME, Berry MJ, Tate WP. Translational termination efficiency in mammals is influenced by the base following the stop codon. **Proceedings of the National Academy of Science** 1995; 92: 5431-5435.
41. Berry MJ, Grieco D, Taylor BA, Maia AL, Kieffer JD, Beamer W, Glover E, Poland A, Larsen PR. Physiological and genetic analyses of inbred mouse strains with a type I iodothyronine 5' deiodinase deficiency. **Journal of Clinical Investigation** 1993; 92: 1517-1528.
42. Toyoda N, Berry MJ, Harney JW, Larsen PR. Topological analysis of the integral membrane protein, type 1 iodothyronine deiodinase (D1). **Journal of Biological Chemistry** 1995; 270: 12310-12318.
43. Toyoda N, Zavacki AM, Maia AL, Harney JW, Larsen PR. A novel retinoid X receptor-independent thyroid hormone response element is present in the human type 1 deiodinase gene. **Molecular & Cellular Biology** 1995; 15: 5100-5112.

44. Zhang CY, Kim S, Harney JW, Larsen PR. Further characterization of thyroid hormone response elements in the human type 1 iodothyronine deiodinase gene. **Endocrinology** 1998; 139: 1156-1163.
45. Hernandez A, Lyon GJ, Schneider MJ, St.Germain DL. Isolation and characterization of the mouse gene for the type 3 iodothyronine deiodinase. **Endocrinology** 1999; 140: 124-130.
46. Leonard JL, Koehrle J: Intracellular pathways of iodothyronine metabolism. In: Braverman LE, Utiger RD, eds. *Werner & Ingbar's The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996; 125-161.
47. Moreno M, Berry MJ, Horst C. Activation and inactivation of thyroid hormone by type I iodothyronine deiodinase. **FEBS Letters** 1994; 344: 143
48. Salvatore D, Tu H, Harney JW, Larsen PR. Type 2 iodothyronine deiodinase is highly expressed in human thyroid. **Journal of Clinical Investigation** 1996; 98: 962-968.
49. Huang TS, Chapra IJ, Beredo A. Skin is an active site for the inner ring monodeiodination of thyroxine to 3,3',5' - triiodothyronine. **Endocrinology** 1985; 117: 2106
50. Roti E, Fang SL, Green K, Emerson CH, Braverman LE. Human placenta is on active site of thyronine and 3, 3', 5 - triiodothyronine tyrosyl ring deiodination. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism** 1981; 53: 498-501.
51. Galton VA, Martinez E, Hernandez A, St.Germain EA, Bates JM, St.Germain DL. Pregnant rat uterus expresses high levels of the type 3 iodothyronine deiodinase. **Journal of Clinical Investigation** 1999; 103: 979-987.
52. Bates JM, St.Germain DL, Galton VA. Expression profiles of the three iodothyronine deiodinases, D1, D2, and D3, in the developing rat. **Endocrinology** 1999; 140: 844-851.

53. St.Germain DL. Selenodeiodinase: preceptor regulators of thyroid action. **Thyroid Today** 1999; 22: 1-11.
54. Kaplan MM: Regulatory influences on iodothyronine deiodination in animal tissues. In: Hennemann G, ed. *Thyroid Hormone Metabolism*. New York: Marcel Dekker, 1986; 231-253.
55. Santini F, Chiovato L, Lapi P, Lupetti M, Dolfi A, Bianchi F, Bernadini N, Bendinelli G, Mammoli C, Vitti P, Chopra IJ. The location and regulation of the type I - iodothyronine 5' - monodeiodinase (type I-MD) in the rat thyroid: studies using a specific anti-type I-MD antibody. **Molecular & Cellular Endocrinology** 1995; 110: 193-203.
56. Berry MJ, Kates AL, Larsen PR. Thyroid hormone regulates type I deiodinase messenger RNA in rat liver. **Molecular Endocrinology** 1990; 4: 743-748.
57. Maia AL, Harney JW, Larsen PR. Pituitary cells respond to thyroid hormone by discrete, gene-specific pathways. **Endocrinology** 1995; 136: 1488-1494.
58. Maia AL, Kieffer JD, Harney JW, Larsen PR. Effect of 3,5,3' - Triiodothyronine (T3) administration on *dio1* gene expression and T₃ metabolism in normal and type 1 deiodinase-deficient mice. **Endocrinology** 1995; 136: 4842-4849.
59. Tu HM, Legradi G, Bartha T, Salvatore D, Lechan RM, Larsen PR. Regional expression of the type 3 iodothyronine deiodinase messenger ribonucleic acid in the rat central nervous system and its regulation by thyroid hormone. **Endocrinology** 1999; 140: 784-790.
60. Burmeister LA, Pachucki J, St.Germain DL. Thyroid hormones inhibit type 2 iodothyronine deiodinase in the rat cerebral cortex by both pre-and posttranslational mechanisms. **Endocrinology** 1997; 138: 5231-5237.

61. Tu HM, Kim SW, Salvatore D, Bartha T, Legradi G, Larsen PR, Lechan RM. Regional distribution of type 2 thyroxine deiodinase messenger ribonucleic acid in rat hypothalamus and pituitary and its regulation by thyroid hormone. **Endocrinology** 1997; 138: 3359-3368.
62. Kim SW, Harney JW, Larsen PR. Studies of the hormonal regulation of type 2 5' - iodothyronine deiodinase messenger ribonucleic acid in pituitary tumor cells using semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. **Endocrinology** 1998; 12: 4895-4905.
63. Kamiya Y, Murakami M, Araki O, Hosoi Y, Ogiwara T, Mizuma H, Mori M. Pretranslational regulation of rhythmic type II iodothyronine deiodinase expression by beta-adrenergic mechanism in the rat pineal gland. **Endocrinology** 1999; 140: 1272-1278.
64. Obregón MJ, Larsen PR, Silva JE. The role of 3, 3', 5' - triiodothyronine in the regulation of type II iodothyronine 5' - deiodinase in the rat cerebral cortex. **Endocrinology** 1986; 119: 2186-2192.
65. St.Germain DL. The effects and interactions of substrates, inhibitors, and the cellular thiol - disulfide balance on the regulation of type II iodothyronine 5' - deiodinase. **Endocrinology** 1988; 122: 1860-1868.
66. Leonard JL, Silva JE, Kaplan MM, Mellen SA, Visser TJ, Larsen PR. Acute posttranscriptional regulation of cerebrocortical and pituitary iodothyronine 5' - deiodinases by thyroid hormone. **Endocrinology** 1984; 114: 998-1004.
67. Silva JE, Leonard JL. Regulation of rat cerebrocortical and adenohipofyseal type II 5' - deiodinase by thyroxine, triiodothyronine, and reverse triiodothyronine. **Endocrinology** 1985; 116: 1627-1635.
68. Halperin Y, Shapiro LE, Surks MI. Down-regulation of type II L-thyroxine, 5' - monodeiodinase in cultured GC cells: different pathways of regulation by L-triiodothyronine and 3, 3', 5' - triiodo - L - thyronine. **Endocrinology** 1994; 135: 1464-1469.

69. Steinsapir J, Harney J, Larsen PR. Type 2 Iodothyronine deiodinase in rat pituitary tumor cells is inactivated in proteasomes. **Journal of Clinical Investigation** 1998; 102: 1895-1899.
70. Steinsapir J, Bianco AC, Buettner C, Harney J, Larsen PR. Substrate-induced down-regulation of human type 2 deiodinase (hD2) is mediated through proteasomal degradation and requires interaction with the enzyme's active center. **Endocrinology** 2000; 141: 1127-1135.
71. Farwell AP, Lynch RM, Okulicz WC, Comi AM, Leonard JL. The actin cytoskeleton mediates the hormonally regulated translocation of type II Iodothyronine 5' - deiodinase in astrocytes. **Journal of Biological Chemistry** 1990; 265: 18546-18553.
72. Toyoda N, Kleinhaus N, Larsen PR. The structure of the coding and 5' - flanking region of the type 1 Iodothyronine deiodinase (*dio1*) gene is normal in a patient with suspected congenital *dio1* deficiency. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism** 1996; 81: 2121-2124.
73. Kleinaus N, Faber J, Kahana L, Schneer J , Scheinfeld M. Euthyroid hyperthyroxinemia due to generalized 5' - deiodinase defect. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism** 1988; 66: 684-688.
74. Maxon HR, Burman KD, Premachandra BN, Chen IW, Burger A, Levy P, Georges LP. Familial elevations of total and free thyroxine in healthy, euthyroid subjects without detectable binding protein abnormalities. **Acta Endocrinologica** 1982; 100: 224-230.
75. Schoenmakers CH, Pigmans IG, Poland A, Visser TJ. Impairment of the selenoenzyme type I Iodothyronine deiodinase in C3H/HeJ mice. **Endocrinology** 1993; 132: 357-361.
76. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry** 1987; 162: 156-159.

77. Song S, Sorimachi K, Adachi K, Oka T. Biochemical and molecular biological evidence for the presence of type II iodothyronine deiodinase in mouse mammary gland. **Molecular & Cellular Endocrinology** 2000; 160: 173-181.
78. Soutto M, Guerrero JM, Molinero P. Beta and alpha-adrenergic mechanisms are involved in regulating type II thyroxine 5' - deiodinase in rat thymus. **Life Sciences** 1996; 58: 1-8.
79. Araki O, Murakami M, Kamiya Y, Hosoi Y, Ogiwara T, Mizuma H, Iriuchijima T, Mori M. Northern analysis of type II iodothyronine deiodinase mRNA in rat harderian gland. **Life Sciences** 1998; 63: 1843-1848.
80. Garcia-Macias JF, Molinero P, Rubio A, Guerrero JM, Osuna C. Different experimental conditions which regulate type II 5' - deiodinase mRNA in rat harderian gland. **Life Sciences** 1997; 61: 181-192.
81. Galton VA, Martinez E, Hernandez A, St.Germain EA, Bates JM, St.Germain DL. The type 2 iodothyronine deiodinase is expressed in the rat uterus and induced during pregnancy. **Endocrinology** 2001; 142: 2123-2128.
82. Larsen PR, Silva JE, Kaplan MM. Relationships between circulating and intracellular thyroid hormones: physiological and clinical implication. **Endocrine Reviews** 1981; 2: 87-102.
83. Visser TJ, Kaplan MM, Leonard JL, Larsen PR. Evidence for two pathways of iodothyronine 5' deiodinase in rat pituitary that differ in kinetics, propylthiuracil sensitivity, and response to hypothyroidism. **Journal of Clinical Investigation** 1983; 71: 992-1002.
84. Hosoi Y, Murakami M, Mizuma H, Ogiwara T, Imamura M, Mori M. Expression and regulation of type II iodothyronine deiodinase in cultured human skeletal muscle cells. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism** 1999; 84: 3293-3300.

85. Larsen PR, Davies TF, Hay ID: The thyroid gland. In: Wilson ID, Kronenberg HM, Larsen PR, eds. *Williams' Textbook of Endocrinology*. 9th ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 1998; 389-515.
86. Larsen PR: Thyroid hormone transport, cellular uptake, metabolism, and molecular action. In: Degroot LJ, Larsen PR, Hennemann G, eds. *The Thyroid and its Diseases*. New York: Churchill Livingstone, ed. 1996; 61-111.
87. Crantz F, Silva J, Larsen PR. An analysis of the sources and quantity of 3,5,3' - triiodothyronine specifically bound to nuclear receptors in rat cortex and cerebellum. **Endocrinology** 1982; 110: 367-375.
88. Dillmann WH. Thyroid hormone and the heart: basic mechanistic and clinical issues. **Thyroid** 1996; 19: 1-11.
89. Dillmann WH. Biochemical basis thyroid hormone action in the heart. **American Journal of Medicine** 1990; 88: 626-630.
90. Ojamaa K, Klein I. *In vivo* regulation of recombinant cardiac myosin heavy chain gene expression by thyroid hormone. **Endocrinology** 1993; 132: 1002-1006.
91. Klein I, Ojamaa K. Thyroid hormone and the cardiovascular system. **New England Journal of Medicine** 2001; 344: 501-509.
92. Pachucki J, Hopkins J, Peeters R, et al. Type 2 iodothyronine deiodinase transgene expression in the mouse heart causes cardiac-specific thyrotoxicosis. **Endocrinology** 2001; 142: 13-20.
93. Barker S, Klitgaard H. Metabolism of tissues excised from thyroxine injected rats. **American Journal of Physiology** 1952; 170: 81-86.
94. Oppenheimer J, Schwartz H, Surks M. Tissue differences in the concentration of triiodothyronine nuclear binding sites in the rat: liver, kidney, pituitary, heart, brain, spleen and testis. **Endocrinology** 1974; 95: 897-903.

95. Tagami T, Nakamura H, Sasaki S, Mori T, Yoshioka H, Yoshida H, Imura H. Immuno histochemical localization of nuclear 3, 5, 3' - triiodothyronine receptor proteins in rat tissues studied with antiserum against C-ERB A/T₃ receptor. **Endocrinology** 1990; 127: 1727-1734.
96. Macchia E, Nakai A, Janiga A, Kakurai A, Fisfalen M, Gardner P, Soltani K, Degroot L. Characterization of site-specific polyclonal antibodies to c-erbA peptides recognizing human thyroid hormone receptors α 1, α 2, and β and native 3, 5, 3' - triiodothyronine receptor, and study of tissue distribution of antigen. **Endocrinology** 1990; 126: 3232-3239.
97. Falcone M, Miyamoto T, Fierro-Renoy F, Macchia E, Degroot L. Antipeptide polyclonal antibodies specifically recognize each human thyroid hormone receptor isoform. **Endocrinology** 1992; 131: 2419-2429.
98. Buzzard JJ, Morrison JR, O'Bryan MK, Song Q, Wreford NG. Developmental expression of thyroid hormone receptors in the rat testis. **Biology of Reproduction** 2000; 62: 664-669.
99. Maia ALS, Favaretto ALV, Antunes-Rodrigues J, Iazigi N, Lamano-Carvalho TL. Spermatogenic and steriodogenic testicular function in hypothyroid pubertal rats. **Brazilian Journal of Medical & Biological Research** 1990; 23: 625-628.
100. Jannini EA, Ulisse S, D'Armiento M. Thyroid hormone and male gonadal function. **Endocrine Reviews** 1995; 16: 443-459.
101. Calvo R, Obregón MJ, Ruiz de Oña C, Escobar Del Rey F, Morreale De Escobar G. Congenital hypothyroidism, as studied in rats: crucial role of maternal thyroxine, but not 3, 5, 3' - triiodothyronine in the protection of the fetal brain. **Journal of Clinical Investigation** 1990; 86: 889-899.
102. Obregón MJ, Ruiz de Oña C, Calvo R, Escobar Del Rey F, Morreale De Escobar G. Outer ring iodothyronine deiodinases and thyroid hormone economy: responses to iodine deficiency in the rat fetus and neonate. **Endocrinology** 1991; 129: 2663-2673.

-
103. Escobar-Morreale HF, Rey FE, Obregón MJ, Escobar GM.
Only the combined treatment with thyroxine and triiodothyronine
ensures euthyroidism in all tissues of the thyroidectomized rat.
Endocrinology 1996; 137: 2490-2502.