LUCIANE PORTAS CAPELO

**OS HORMÔNIOS TIREOIDEANOS E O
DESENVOLVIMENTO ESQUELÉTICO FETAL E
PÓS-NATAL: ESTUDO DO PADRÃO DE
EXPRESSÃO DOS TRANSPORTADORES E DAS
SELENODESIODASES DAS IODOTIRONINAS**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular
e Tecidual do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para obtenção do Título
de Doutor em Ciências.

São Paulo
2008

LUCIANE PORTAS CAPELO

**OS HORMÔNIOS TIREOIDEANOS E O
DESENVOLVIMENTO ESQUELÉTICO FETAL E PÓS-
NATAL: ESTUDO DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DOS
TRANSPORTADORES E DAS SELENODESIODASES DAS
IODOTIRONINAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora:

Profa. Dra. Cecília Helena de Azevedo Gouveia Ferreira.

Co-orientadora:

Profa. Dra. Telma Maria Tenório Zorn.

São Paulo
2008

Aos meus avós Albertina e Joaquim, Aristides e Isabel que enxergaram além do mar bravio e o cruzaram com coragem e esperança;
Aos meus pais, Manuel e Maria da Conceição que aqui construíram a “minha aldeia” sobre as bases sólidas do trabalho, da educação e do amor;

Mar Português

(Fernando Pessoa)

*Ó mar salgado, quanto do teu sal
São lágrimas de Portugal!
Por te cruzarmos, quantas mães choraram,
Quantos filhos em vão rezaram!
Quantas noivas ficaram por casar
Para que fosses nosso, ó mar!*

*Valeu a pena? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.
Quem quer passar além do Bojador
Tem que passar além da dor.
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,
Mas nele é que espelhou o céu.*

AGRADECIMENTOS

À Dra. Telma Maria Tenório Zorn, por toda a dedicação e carinho. Obrigada por me oferecer a primeira oportunidade e por acreditar que poderia dar certo. Sempre lhe serei grata por todas as conversas, científicas ou não, e por estares sempre ao meu lado. Tudo o que sou e almejo ser, tem como base os teus exemplos.

À minha orientadora, Dra. Cecília H. A. Gouveia Ferreira, pela confiança e por tantas oportunidades que me foram dadas. Agradeço pelo incentivo incondicional e grande amizade. A tua orientação foi fundamental para a realização desta tese e em muitos outros momentos especiais da minha vida.

À Dra. Chao Yun Irene Yan por incentivar e propiciar meu aprendizado sobre Biologia do Desenvolvimento e por todo o apoio, paciência e tempo dedicados a mim durante este último ano de tese. Serei sempre grata por sua dedicação e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Metabolismo Ósseo: Cristiane C. Costa, Eduardo H. Beber, Fatima R.S. Freitas e Tatiana L. Fonseca. Agradeço por toda a ajuda durante a elaboração e realização dos experimentos, pela companhia agradável, conversas animadas e por todo o carinho e amizade. “A gente não larga o osso”.

Aos amigos do LBR-MEC: Renato M. Salgado, Rodolfo F. Ribeiro, Fernanda Barrence e Cleusa R. Pelegrini; e aos egressos Luciane Candeloro, Fabiano Costa, Diene Tenório, Karen Spies e ao Dr. Paulo Abrahamson pelo companheirismo e ensinamentos. Agradeço especialmente ao amigo Sebastián San Martín Henriques pela ótima tutoria, sempre paciente e disposto em ajudar.

Aos demais colegas da pós-graduação pela solidariedade e convívio tão prazeroso.

À Cristiane Lopes, excelente cientista, minha orientadora durante a Iniciação Científica na Universidade Metodista de São Paulo.

Ao Dr. Antônio Carlos Bianco por me receber em seu laboratório e permitir que eu convivesse com cientistas do mundo todo. A permanência em seu laboratório foi de fundamental importância para o meu desenvolvimento pessoal e científico. Agradeço também à equipe do laboratório, em especial à Mônica Dentice, Marcelo Christoffolete e Wagner Seixas da Silva pelos momentos inesquecíveis que passamos juntos, por toda a ajuda e por cada explicação.

Ao Dr. Jackson C. Bittencourt, Dr. Carlos F. Menck, Dra. Maria Luiza Barreto Chaves e Dr. Anselmo S. Moriscot por terem permitido a utilização de seus laboratórios para o desenvolvimento de parte desta tese.

Aos demais funcionários do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento e do Departamento de Anatomia, em especial à Iracema (“Ceminha”), pelo carinho, atenção e pelo excelente café, companheiro de todas as horas e fator determinante para as minhas longas estadas no laboratório.

Agradeço a todos os funcionários do Instituto de Ciências Biomédicas pelo carinho, pela atenção e pela presteza em ajudar.

Ao meu pai, Manuel S. F. Capelo, e minha irmã, Maria Cristina P. Capelo que aceitaram o meu “retiro” científico e sempre respeitaram as minhas decisões. Agradeço por todo o amor e pelo apoio incondicional. Trago vocês sempre comigo, no meu coração e pensamento.

Aos meus tios queridos, Deolinda P. B da Luz e Paulo B da Luz.

Às minhas primas-irmãs Clarissa Portas B. da Luz e Fabiana Portas Carbonari, pelas excelentes conversas e orientações. Por tantos momentos divertidos e inesquecíveis e, acima de tudo, pelo exemplo de determinação e perseverança que vocês me dão sempre.

À amiga Roberta Giampani de Lima e família por todo o amor e amizade, e por cada “puxão de orelhas” carinhoso e necessário. Vocês são parte da minha família.

Às amigas Roberta Cravo e Patrícia Kato, por tornarem a pós-graduação mais leve e muito mais colorida. Agradeço por todos os esquemas desenhados em guardanapos de papel. Cada um tem uma história.

À Camila L. Stumm, grande amiga e cientista promissora. Agradeço por teres me recebido na sua casa e ter permitido que eu por lá ficasse até hoje. A nossa amizade e companheirismo fizeram de nós uma família. Obrigada, minha irmã, pelas risadas matinais, pelos jantares *light*, pela companhia no laboratório e por todo o carinho, sempre.

Ao Marco C. Uchida por todo o amor, por me fazer uma pessoa melhor, por compreender os meus limites e pela dedicação que tens a mim e à minha família.

RESUMO

Capelo LP. Os hormônios tireoideanos e o desenvolvimento esquelético fetal e pós-natal: estudo do padrão de expressão dos transportadores e das selenodesiodases das iodotironinas [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Os hormônios tireoideanos (HT) atuam sobre o desenvolvimento, crescimento e metabolismo ósseo pós-natal. Entretanto, o papel dos hormônios tireoideanos no desenvolvimento ósseo fetal ainda não está bem estabelecido. As ações nucleares dos hormônios tireoideanos são dependentes (i) das suas concentrações plasmáticas; (ii) do influxo desses hormônios nas células alvo, determinado por transportadores de iodotironinas; (iii) da metabolização local das iodotironinas pelas selenodesiodases; e, finalmente, (iv) da presença das diferentes isoformas de TRs. Várias classes de transportadores de membrana se mostraram capazes de promover o influxo e efluxo de iodotironinas, incluindo diferentes famílias de transportadores de ânions orgânicos (NTCP e OATP) e de transportadores de aminoácidos (LAT1, LAT2 e MCT8). As selenodesiodases do tipo I e II (D1 e D2, respectivamente) convertem tiroxina (T4) em triiodotironina (T3), enquanto a selenodesiodase de iodotironina do tipo III (D3) converte T4 e T3 a reverso T3 e T2, respectivamente. Tanto os transportadores quanto a D1, D2 e D3 estão entre os fatores capazes de regular localmente a exposição dos tecidos alvo a níveis apropriados de iodotironinas. O principal objetivo desta tese foi o de investigar os efeitos dos HT no esqueleto durante o desenvolvimento fetal. Para tanto, induzimos o hipotireoidismo materno e fetal através da adição de metimazol (0,1%) e perclorato de sódio (1%) à água de beber dos camundongos prenhes. A análise histológica do fêmur e da vértebra mostrou que, até 16,5E, o hipotireoidismo não induziu efeitos deletérios importantes. Somente a partir de 18,5E os fetos hipotireoideos apresentaram graves alterações morfológicas. Em 18,5E observou-se a redução significativa do comprimento e área das zonas proliferativa e hipertrófica, do número de condrócitos proliferativos por coluna e do número de condrócitos hipertróficos, além de redução da expressão dos genes dos colágenos I, II e X e da osteocalcina nos fêmures fetais. Esses resultados sugerem que, antes de 16,5E, a concentração das iodotironinas deve ser mínima. Apesar da falta de efeitos deletérios durante o início da gestação, receptores nucleares dos hormônios tireoideanos (TRs), LAT1, LAT2 e MCT8 foram expressos nos fêmures dos grupos EUT e HIPO, enquanto OATP e NTCP não foram detectados. Esse resultado indica que os transportadores de aminoácidos possam favorecer a ação das iodotironinas no tecido ósseo em desenvolvimento, principalmente o MCT8, que

teve sua expressão gênica regulada pelo T3. Porém, é a análise da expressão de D2 e D3 que explica parcialmente os resultados morfológicos encontrados. A expressão do RNAm da D3 foi detectado em 14,5E. Sua expressão foi reduzida 10 vezes até 18,5E e ainda mais até 14 dias de idade pós-natal (PN). Contrariamente, a expressão do RNAm da D2 aumentou significativamente entre 14,5E e 18,5E (~2,5 vezes) até atingir um pico de expressão em 14PN. O padrão de expressão dos genes da D2 e D3 durante o desenvolvimento ósseo fetal, somado à ausência de efeitos deletérios causados pela redução da oferta dos hormônios tireoideanos, sugere que essas enzimas sejam responsáveis por manter baixos os níveis das iodotironinas no esqueleto fetal durante o início da gestação e, assim, garantir seu desenvolvimento normal.

Palavras-chave: Desenvolvimento ósseo; Hipotireoidismo (congenito); Selenodesiodases das iodotironinas tipo 3; Selenodesiodase das iodotironinas tipo 2; Hormônios tireoideanos; Transportador de monocarboxílicos 8.

ABSTRACT

Capelo LP. Thyroid hormone and skeletal development at fetal and postnatal ages the expression pattern of iodothyronine transporters and deiodinases [Thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

It is well established that appropriate levels of thyroid hormone (TH) are essential for developmental and metabolic physiological processes. During bone development, TH was demonstrated to have a key role on post-natal normal bone development and metabolism, while its relevance in fetal bone development is less clear. The recently described iodothyronine transporters and deiodinases are among the factors that regulate the exposure of different tissues to appropriate levels of TH. Several plasma membrane transporter families have been shown to mediate the cellular influx and/or efflux of iodothyronines, including the organic anion transporter families (NTCP and OATP) and amino acid transporter families (LAT and MCT). The iodothyronine deiodinases type I and II (D1 and D2, respectively) convert thyroxine (T₄) into triiodothyronine (T₃), while iodothyronine deiodinase type III (D3) converts T₄ and T₃ to rT₃ and T₂, respectively. To determine the effects of TH on skeleton during the fetal development, we induced maternal and fetal hypothyroidism by adding metimazole (0,1%) and sodium perchlorate (1%) to the drinking water of pregnant mice. The fetuses were harvested at 12,5, 14,5, 16,5 and 18,5 embryonic days (E). Histological analysis of the distal epiphyseal growth plate of the femur and vertebra showed that hypothyroidism barely affected the bone development until E16.5. Only at E18.5, the hypothyroid fetuses exhibited a reduction in femoral type I and type X collagen and osteocalcin mRNA levels, in the length and area of the proliferative and hypertrophic zones, in the number of chondrocytes per proliferative column, and in the number of hypertrophic chondrocytes, in addition to a slight delay in endochondral and intramembranous ossification. This suggests that up to E16.5, thyroid hormone signaling in bone is kept to a minimum. It is noteworthy that the thyroid hormone nuclear receptors (TR α 1 and TR β 1), as well as the iodothyronine transporters LAT1, LAT2 and MCT8 were expressed in all fetal ages analyzed, but OATP and NTCP were not. These results suggest that the amino acid transporters may have a role on bone development. In fact, the analysis of D2 and D3 expression pattern helped to understand how the morphological defects were achieved. D3 mRNA was readily detected as early as E14.5 and its expression decreased markedly (~10-fold) at E18.5, and even more at 14 days after birth (P14). In contrast, D2 mRNA expression increased significantly by E18.5

and markedly (~2.5-fold) by P14. The reciprocal expression levels of D2 and D3 genes during early bone development along with the absence of a hypothyroidism-induced bone phenotype at this time suggest that coordinated reciprocal deiodinase expression keeps thyroid hormone signaling in bone to very low levels at this early stage of bone development.

Key words: Bone development; Congenital hypothyroidism; Deiodinase type 3; Deiodinase type 2; Thyroid hormones; Monocarboxylate transporter 8.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Esquema da atividade das selenodesiodases das iodotironinas do tipo I, II e III	21
Figura 2: Esquema da distribuição das estruturas embrionárias participantes da ossificação intramembranosa e endocondral	24
Figura 3: Esquema da lâmina epifisial	29
Figura 4: Curvas padrão de T3 e T4.....	54
Figura 5: Concentração de T3 e T4 totais no soro materno, soro dos filhotes (2PN-35PN) e no homogenato de tecidos fetais (12,5E-18,5E)	65
Figura 6: Efeito da redução de T3 e T4 sobre o crescimento e o ganho de massa corporal durante o desenvolvimento fetal e pós-natal	67
Figura 7: Preparados totais dos fetos de 14,5E, 16,5E e 18,5E.....	69
Figura 8: Preparado total dos membros posteriores dos fetos de 14,5E, 16,5E e 18,5E.....	69
Figura 9: Preparado total do crânio	70
Figura 10: Preparado total do esqueleto de camundongos entre 2PN e 35PN.....	72
Figura 11: Preparado total da vértebra e fêmur de camundongos entre 2PN e 35PN.....	73
Figura 12: Análise histológica das vértebras durante o desenvolvimento fetal	76
Figura 13: Análise histológica do membro posterior de fetos de 12,5E	76
Figura 14: Análise histológica do fêmur de fetos de 14,5E	77
Figura 15: Análise histológica do fêmur de fetos de 16,5E	79
Figura 16: Análise histológica do fêmur de fetos de 18,5E	81
Figura 17: Análise histológica do fêmur de camundongos com 2PN	84
Figura 18: Análise histológica do fêmur de camundongos com 4PN	84
Figura 19: Análise histológica do fêmur de camundongos com 7PN	85
Figura 20: Análise histológica do fêmur de camundongos com 14PN	85

Figura 21: Análise histológica do fêmur de camundongos com 21PN	86
Figura 22: Análise histológica do fêmur de camundongos com 35PN	86
Figura 23: Expressão relativa do RNAm de Col1, Col2, Col10 e OC	88
Figura 24: Expressão relativa do RNAm de Trα1 e TRβ1	90
Figura 25: Expressão relativa do RNAm de MCT8 durante o desenvolvimento pré e pós-natal	92
Figura 26: Regulação da expressão relativa do RNAm do MCT8 pelo T3 no esqueleto de camundongos jovens.....	92
Figura 27: Expressão relativa do RNAm de LAT1 e LAT2 durante o desenvolvimento pré e pós-natal	93
Figura 28: Determinação do padrão de expressão de D1, D2 e D3 no esqueleto eutiroideo durante o desenvolvimento fetal e pós-natal	95
Figura 29: Determinação do padrão de expressão de D2 e D3 no esqueleto eutiroideo durante o desenvolvimento fetal e pós-natal	95
Figura 30: Regulação da atividade e da expressão relativa de D2 e D3 pela redução da oferta das iodotironinas no fêmur fetal	96
Figura 31: Regulação da expressão relativa de WSB-1 e VDU-1 no fêmur fetal.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Seqüência dos primers para PCR em tempo-real	60
Tabela 2: Morfometria da LE distal do fêmur dos fetos	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

T3 – triiodotironina

T4 – tiroxina

TR – receptor nuclear dos hormônios tireoideanos

HC – hipotireoidismo congênito

TSH – hormônio tireoestimulante

LE – lâmina epifisial

OATP – *Organic anion transporting polypeptide*

MCT8 – transportador de monocarboxílicos 8 (*Monocarboxilate transporter 8*)

rT3 – reverso T3

T2 – diiodotironina

D1 – selenodesiodase das iodotironinas do tipo I

D2 – selenodesiodase das iodotironinas do tipo II

D3 – selenodesiodase das iodotironinas do tipo III

Shh – *Sonic hedgehog*

DIO3 – gene que codifica D3

RUNX2 – *Run-related transcription 2*

SOX9 – (*sex determining region Y*)-box 9

CLO – *Chondrocyte-like osteoblasts*

BMP – *Bone morphogenetic protein*

WNT - *wingless*

FGFR – receptor do fator de crescimento fibroblástico

FGF – fator de crescimento fibroblástico

MEC – Matriz extracelular

VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial

Ihh – *Indian hedgehog*

PTH-RP – *Parathyroid-related peptide*

GH – Fator de crescimento

IGF – Fator de crescimento semelhante à insulina

SLRP – Pequenos proteoglicanos ricos em leucina

TGF- β – Fator de crescimento transformante

TPO – Tireoperoxidase

TG – Tireoglobulina

TSHR – Receptor de hormônio tireoestimulante

TRH – Hormônio liberador da tireotrofina

NTCP – *Na⁺ taurocholate co-transporting polypeptide*

LAT – *L-type aminoacid transporter*

DIO2 – Gene que codifica D2

VDU-1 – *pVHL-interacting deubiquitinating enzyme-1*

WSB-1 – WD-40 SOCS Box 1

MC3T3-E1 – Linhagem de células osteoblásticas de camundongos

DBD – Domínio de ligação ao DNA

TRE – Elemento responsivo ao hormônio tireoideano

LBD – Domínio de ligação ao ligante

MMI – Metimazol

P – Perclorato de Sódio

E – Dias embrionários

PN – Dias de idade pós-natal

EUT – Eutiroideo (grupo controle)

HIPO – Hipotiroideo (grupo tratado com MMI + P)

RIE – Radioimunoensaio

PTU – Propiltiouracil

WM – *Whole mount* (Preparação total)

PCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real

Col - Colágeno

OC - Osteocalcina

RNA_m – RNA mensageiro

DNA_c – DNA complementar

ZR – Zona de reserva

ZP – Zona proliferativa

ZH – Zona hipertrófica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 O Esqueleto	23
2.1.1 Osteogênese	24
<i>2.1.1.1 Ossificação Intramembranosa</i>	24
<i>2.1.1.1 Ossificação Endocondral</i>	26
2.1.2 Crescimento ósseo	29
2.2 Hormônios tireoideanos	32
2.2.1 Desenvolvimento da glândula tireóide	32
2.2.2 Síntese e regulação hormonal	33
2.2.3 Mecanismo de ação dos hormônios tireoideanos	35
<i>2.2.3.1 Transportadores de iodotironinas</i>	36
<i>2.2.3.1.1 Transportadores de íons orgânicos</i>	36
<i>2.2.3.1.2 Transportadores de aminoácidos</i>	38
<i>2.2.3.2 Selenodesiodases das iodotironinas</i>	39
<i>2.2.3.2.1 Selenodesiodase das iodotironinas do tipo 1 (D1)</i>	41
<i>2.2.3.2.2 Selenodesiodase das iodotironinas do tipo 2 (D2)</i>	42
<i>2.2.3.2.2 Selenodesiodase das iodotironinas do tipo 3 (D3)</i>	44
<i>2.2.3.3 Receptores nucleares</i>	46
2.3 Hormônios tireoideanos e o tecido ósseo	47
3 OBJETIVOS	51
4 MATERIAL E MÉTODOS	52
4.1 Animais e acasalamento	52
4.2 Tratamento	52

4.3 Coleta de amostras	53
4.4 Determinação da concentração de T4 e T3 no soro e em homogeneizados de fetos de camundongos.....	54
4.4.1 Aferição dos níveis séricos de T3 e T4 nos camundongos prenhes e nos filhotes.....	55
4.4.2 Preparação dos homogeneizados de fetos para aferição das concentrações fetais totais de T3 e T4.....	55
4.5 Avaliação morfológica.....	56
4.5.1 Protocolo para avaliação histológica	56
4.5.2 Protocolo para avaliação da ossificação em preparados totais (<i>whole mount</i>; WM).....	57
4.6 Análise Morfométrica.....	57
4.7 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR).....	58
4.8 Determinação da atividade de D2 e D3.....	61
4.9 Análise estatística.....	62
5 RESULTADOS	63
5.1 Concentração de T3 e T4 no soro e nos homogeneizados de fetos	63
5.1.1 Níveis maternos de T3 e T4.....	63
5.1.2 Concentração de T3 e T4 nos homogeneizados dos fetos de camundongos	64
5.1.3 Níveis séricos de T3 e T4 durante o desenvolvimento pós-natal	64
5.2 Parâmetros reprodutivos	65
5.3 Comprimento e massa corporal	65
5.4 Análise do processo de ossificação endocondral e intramembranosa.....	68
5.5 Análise histológica e morfométrica	74
5.6 Análise da expressão relativa da Osteocalcina (OC) e Colágenos tipo I, II e X (Col1, Col2 e Col10, respectivamente) no fêmur fetal.....	87

5.7 Expressão dos Receptores Nucleares (TRs), Transportadores dos hormônios tireoideanos e das Selenodesiodases das Iodotironinas no fêmur fetal.....	89
5.7.1 Expressão relativa dos TRs no fêmur fetal	89
5.7.2 Expressão relativa dos transportadores MCT8, LAT1 e LAT2 no fêmur durante o desenvolvimento fetal e pós-natal	91
5.7.3 Expressão relativa do RNAm da D1, D2, D3, WSB-1 e VDU-1	94
6 DISCUSSÃO	98
7 CONCLUSÃO.....	107
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
9 ANEXOS	130
9.1 Artigo 1: Deiodinase-mediated thyroid hormone inactivation minimizes thyroid hormone signaling in the early development of fetal skeleton.....	130
9.2 Artigo 2: The Monocarboxylate Transporter 8 (MCT8) and L-type Amino Acid Transporters 1 and 2 (LAT1 and LAT2) are Expressed in the Skeleton of Mice and in Osteoblastic MC3T3-E1 Cells	139

1 INTRODUÇÃO

Os principais produtos secretórios da glândula tireóide são as iodotironinas, compostos resultantes da ligação de duas moléculas de tirosina iodadas. Nos mamíferos, cerca de 60-90% da produção tireoideana corresponde a 3,5,3',5'-tetraiodotironina (tiroxina ou T4), 10-40% corresponde a 3,5,3'-triiodotironina (T3) e menos do que 1% é representado por outras iodotironinas.

Os hormônios tireoideanos exercem uma ampla variedade de efeitos no desenvolvimento, crescimento e metabolismo de diferentes sistemas, mas têm o tecido ósseo como um dos seus principais alvos. Tanto a diminuição quanto o aumento da oferta de hormônios tireoideanos são deletérios ao tecido ósseo. Sabe-se que os hormônios tireoideanos agem direta e indiretamente no tecido ósseo. Acredita-se que a maioria das suas ações diretas sejam mediadas por receptores nucleares de T3 (TRs). Existem quatro isoformas clássicas de TRs, o TR α 1, TR α 2, TR β 1 e TR β 2 [1, 2]. Dentre essas isoformas, apenas o TR α 2 não permite a ligação do T3 e atua, pelo menos *in vitro*, como um antagonista dos outros TRs [2]. As isoformas TR α 1, TR α 2 e TR β 1 foram identificadas em células osteoblásticas [3-6], osteoclásticas [7, 8] e em condrócitos das lâminas epifisiais (ou placas epifisárias de crescimento) [8, 9]. Durante o desenvolvimento pós-natal, o aumento das concentrações hormonais resulta em maturação esquelética acelerada e diminuição do crescimento [10-12]. Por outro lado, a diminuição das concentrações hormonais provoca o atraso da ossificação e afeta negativamente a lâmina epifisial (LE). Essas alterações geram atraso na maturação do esqueleto, evidenciada por redução do crescimento e anomalias esqueléticas [10, 13-15].

O hipotireoidismo congênito (HC), definido pelo aumento da concentração de TSH e diminuição de T3 e T4 plasmáticos, ocorre em 1:3500 nascidos vivos, enquanto a ocorrência de hipertireoidismo congênito é ainda mais rara, 1:40000 [16]. Crianças recém-nascidas com HC apresentam severas alterações no desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) e grave atraso da ossificação endocondral e intramembranosa [17], enquanto a exposição prematura a altos níveis hormonais induz a ocorrência de taquicardia, maturação óssea acelerada, craniossinostose, baixo peso corporal e retardo do crescimento intra-uterino [18, 19]. Portanto, tanto níveis insuficientes de T3 quanto a exposição prematura do embrião aos hormônios tireoideanos podem ser deletérios, resultando em desenvolvimento anormal ou morte [20-23].

Apesar da alta incidência de casos de HC e da presença de alterações esqueléticas detectadas ao nascimento decorrentes dessa condição, [20, 24-27], o papel dos hormônios tireoideanos no desenvolvimento ósseo fetal ainda não está bem estabelecido. Por outro lado, sabe-se que o HC causa atraso grave e até interrupção do desenvolvimento do SNC. É importante ressaltar que grande parte dos efeitos deletérios resultantes do hipotireoidismo durante a gestação pode ser revertida com a administração de T4 logo após o nascimento, o que evidencia a importância do diagnóstico precoce do HC através do “teste do pezinho” (aferição dos níveis séricos de TSH) [28].

Como dito anteriormente, os hormônios tireoideanos são essenciais para o desenvolvimento ósseo pós-natal, mas o seu papel no desenvolvimento esquelético fetal é menos claro. Pouco se sabe sobre seus efeitos na formação do molde cartilaginoso, no início da ossificação primária ou sobre a LE durante o desenvolvimento fetal, apesar de serem observadas alterações esqueléticas ao nascimento, resultantes de alterações na concentração hormonal plasmática durante a gestação. Além disso, pouco se sabe sobre os mecanismos de ação dos hormônios tireoideanos no osso em desenvolvimento, tanto no período fetal quanto no período pós-natal.

É digno de nota que as ações nucleares dos hormônios tireoideanos são dependentes (i) das suas concentrações plasmáticas; (ii) do influxo desses hormônios nas células alvo, determinado por transportadores de membrana de T3 e T4; (iii) da metabolização local das iodotironinas pelas selenodesiodases e; finalmente, (iv) da presença das diferentes isoformas de TRs. Assim sendo, o mecanismo de ação nuclear dos hormônios tireoideanos é composto de múltiplos passos, sendo importante ressaltar que cada um deles pode interferir diretamente sobre o efeito do T3 no tecido alvo. Estes são aspectos biológicos importantes que pouco foram investigados no tecido ósseo.

Até pouco tempo, acreditava-se que o influxo celular dos hormônios tireoideanos se dava por difusão passiva, porém, várias classes de transportadores de membrana, capazes de promover o transporte de iodotironinas através da membrana plasmática [29]. São exemplos, a família dos transportadores de ânions orgânicos (*organic anion transporting polypeptides*, OATP) e a família dos transportadores de aminoácidos monocarboxílicos (monocarboxylate transporters, MCT), dentre outros [29, 30]. Há evidências de que esses transportadores de membrana são expressos de forma tempo e tecido dependente e que têm funções

complementares, uma vez que cada transportador apresenta algum grau de especificidade para uma das iodotironinas (T2, T3, rT3, T3 ou T4) [31-33].

A atividade dos transportadores de iodotironinas podem ser cruciais para as células alvo, determinando sua sensibilidade aos hormônios tireoideanos, bem como a outros substratos (e.g. aminoácidos) [34]. Vale ressaltar que o papel dos transportadores de iodotironinas no desenvolvimento esquelético ou metabolismo ósseo ainda não havia sido estudado.

De uma maneira geral, a importância dos transportadores de iodotironinas pôde ser avaliada através da identificação de famílias portadoras de mutações ou deleções dos genes que codificam tais transportadores. A mutação do MCT8 causa alterações na tireóide, graves alterações psico-motoras e atraso do desenvolvimento cerebral, além de outras anomalias [33]. Recentemente, foi elucidado que portadores da síndrome *Alan-Herdon-Dudley* apresentam diferentes mutações no gene MCT8, o que induz diferentes graus de acometimento psico-motor e aumento do T3 sérico. Os portadores dessa síndrome apresentam graves alterações esqueléticas que certamente são decorrentes das alterações psico-motoras e dos altos níveis de T3, porém, podem ainda refletir um importante papel desse transportador no tecido ósseo [35-37]. Diferentes famílias portadoras de alguma mutação do MCT8 já foram identificadas, inclusive no Brasil [38]. A análise de gerações de animais com deleção do gene do Mct8 demonstrou que este transportador tem distribuição e atividade tecido-específica, assim como as selenodesiodases [31].

Levando-se em conta as ações genômicas dos hormônios tireoideanos, o T4 é considerado um pró-hormônio e o T3, o hormônio ativo, dada a sua maior concentração nuclear e maior afinidade pelos TRs [39, 40]. Assim sendo, as ações nucleares dos hormônios tireoideanos dependem da conversão do T4 a T3 por ação de enzimas, as selenodesiodases das iodotironinas. Essa conversão ocorre na própria tireóide e, principalmente, nos tecidos alvo dos hormônios tireoideanos [41].

Existem três isoformas dessas enzimas, as desiodases do tipo I, II e III (D1, D2 e D3). A D1 converte T4 a T3, T4 a T3 reverso (T3r) e T3 a T2, sendo, portanto, ativadora e inativadora do T4. A D2 converte, principalmente, T4 a T3, além de T3r a T2, o que faz dela uma enzima prioritariamente ativadora do hormônio. A D3 é a principal inativadora dos hormônios tireoideanos, convertendo T4 a T3r, e T3 a T2. O hipotireoidismo regula positivamente a atividade da D2 e negativamente a atividade da D3, o oposto sendo observado

em casos de tireotoxicose [42] (Fig. 1).

Figura 1: Esquema da atividade das selenodesiodases das iodotironinas do tipo I, II e III (D1, D2 e D3, respectivamente).

Durante o desenvolvimento de diferentes estruturas, como o cérebro, cóclea e retina e durante a metamorfose de girinos, D2 e D3 são responsáveis por manter localmente níveis adequados de T3, controlando assim sua ação [25, 43-45]. A ação da D2 também foi identificada no tecido ósseo adulto, em múltiplas linhagens de osteoblastos e condrócitos, em células da medula óssea, em ossos fetais mantidos em cultura e em estruturas correlatas, como o periósteo/pericôndrio [46, 47]. Dentice *et al.* demonstraram que o *Sonic hedgehog* (Shh) induz a degradação da D2 no pericôndrio/periósteo próximo à LE de embriões de galinha, levando à inativação da D2 o que, juntamente com a ação da D3, gera a redução relativa e local da oferta de T3. Isso favoreceria a proliferação dos condrócitos da LE e retardaria a sua diferenciação induzida pelo T3 [48]. O mesmo grupo demonstrou que a expressão da D3 em queratinócitos também é induzida pelo Shh durante o desenvolvimento, sugerindo que a regulação da expressão da D2 e D3 seja importante para o desenvolvimento embrionário normal [49].

Estudos têm demonstrado que a D3 tem papel fundamental na prevenção da exposição prematura dos tecidos fetais ao T3, além de ser a enzima predominantemente expressa nos tecidos de ratos jovens e de fetos de camundongos [43, 50, 51]. Recentemente, foram gerados animais com deleção do gene *Dio3* (D3KO) [51, 52]. A ausência da D3 reduziu o *clearance* dos hormônios tiroideanos, levando a uma tireotoxicose fetal e pós-natal (até 15 dias de vida), o que elevou a mortalidade pré-natal e promoveu retardo no crescimento e infertilidade [50,

51]. Em contrapartida, a D1 não parece ter papel fundamental durante o desenvolvimento fetal, tendo papel mais relevante após o nascimento e no adulto [53].

A presença dos transportadores e das selenodesiodases das iodotironinas durante o desenvolvimento e na vida adulta chama a atenção para a importância desses no sentido de manter níveis adequados sistêmicos e teciduais dos hormônios tireoideanos. Porém, é importante enfatizar que, a atividade e expressão das selenodesiodases e dos transportadores das iodotironinas, assim como sua regulação pelos hormônios tireoideanos ainda não havia sido demonstrada no tecido ósseo *in vivo* nos diferentes estágios do desenvolvimento pré e pós-natal.

Assim sendo, nossos objetivos neste trabalho foram: (i) a avaliação morfológica dos efeitos da redução da oferta das iodotironinas sobre a formação do molde cartilaginoso, ossificação e sobre a lâmina epifisial; (ii) a caracterização da expressão da D1, D2 e D3 no osso fetal desde o início da formação do molde cartilaginoso até o pleno desenvolvimento da ossificação secundária; e (iii) a investigação da expressão de transportadores de iodotironinas no osso fetal e jovem.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O Esqueleto

O sistema esquelético é formado pelos tecidos ósseo, cartilaginoso, hematopoiético, adiposo e nervoso, portanto, por diferentes tipos celulares, oriundos de diferentes folhetos embrionários, distribuídos por todo o corpo em elementos esqueléticos diferentes. O tecido ósseo é o seu componente mais abundante, que apesar da sua aparência inerte, possui alta atividade metabólica. Esse tecido apresenta três funções clássicas: (1) mecânica, provendo sustentação e ancoragem para os músculos; (2) protetora, para órgãos e medula óssea; e (3) metabólica, servindo como uma reserva de íons, particularmente o cálcio, além de interagir diretamente com outros sistemas para a manutenção da homeostase mineral [54-59]. O tecido ósseo é um tecido extremamente dinâmico que é renovado através de um processo complexo de remodelamento que envolve suas células e sua matriz extracelular. A formação óssea, ou anabolismo ósseo, é regulada por fatores sistêmicos e locais que atuam sobre células osteoprogenitoras, osteoblastos e osteócitos. A formação é antagonizada pela reabsorção óssea, ou catabolismo ósseo, efetuado pelos osteoclastos. O balanço homeostático entre formação e reabsorção é determinante para a manutenção da massa e qualidade ósseas. A descontinuidade desse equilíbrio pode levar a situações patológicas (e.g. osteoporose, quando a reabsorção é maior que a formação, e osteopetrose, quando o oposto ocorre) [54].

O osso em desenvolvimento apresenta grandes porções de tecido cartilaginoso, composto por condrócitos em diferentes fases de diferenciação [60]. O tecido cartilaginoso é ainda o formador da lâmina epifisial, responsável pelo crescimento longitudinal ósseo e permanece no adulto na superfície articular das diartroses. Ambos os tecidos apresentam matrizes extracelulares (MEC) ricas em colágenos, proteoglicanos e glicoproteínas adesivas, porém, cada tecido expressa uma MEC própria, com composição e função específicas [60].

O desenvolvimento e crescimento ósseos e a manutenção da integridade óssea no adulto são processos cuidadosamente regulados por uma afinada orquestra molecular. Embora ainda incompleto, o conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos nesses processos vem aumentando consideravelmente, através, por exemplo, da identificação de novos genes e fatores de transcrição relacionados à osteogênese, e da elucidação da ação de diferentes hormônios sobre o osso em desenvolvimento [61].

Por ser o osso em formação e crescimento o objeto de estudo desta tese, os itens a seguir resumem informações consideradas relevantes sobre o desenvolvimento ósseo.

2.1.1 Osteogênese

A osteogênese tem início no período embrionário e é o processo pelo qual os diferentes segmentos ósseos são formados. As células responsáveis pela formação óssea são derivadas de três diferentes linhagens celulares, oriundas de dois folhetos embrionários diferentes. A crista neural, oriunda do ectoderma, dá origem aos arcos branquiais e seus derivados, que formam o esqueleto craniofacial; o mesoderma dá origem aos somitos, que formam o esqueleto axial, e às células da placa mesodérmica lateral, que dão origem ao esqueleto apendicular (Fig. 2) [62, 63].

Há duas maneiras diferentes de ocorrer a osteogênese e ambas envolvem a diferenciação de células mesenquimais. A diferenciação direta de células mesenquimais derivadas da crista neural em tecido ósseo é chamada de ossificação intramembranosa. Porém, a maior parte dos ossos é formada através da diferenciação das células mesenquimais do mesoderma em tecido cartilaginoso, sendo este substituído posteriormente pelo tecido ósseo. Esse processo indireto de ossificação é denominado ossificação endocondral [62, 64-66].

Figura 2: Esquema ilustrando a distribuição das estruturas embrionárias participantes da ossificação intramembranosa e endocondral. P: placa.

2.1.1.1 Ossificação Intramembranosa

A ossificação intramembranosa é assim chamada por ocorrer no interior de membranas conjuntivas de origem ectodérmica ou mesodérmica. É o processo pelo qual se formam os ossos frontal, parietal e de partes do occipital, do temporal e dos maxilares superior e inferior

[67]. Contribui também para o crescimento dos ossos curtos e para a regeneração e o crescimento radial dos ossos longos [60], o que será abordado no item 2.1.1.2 desta revisão.

A estrutura óssea da cabeça, compreendendo a face e o crânio, tem a anatomia mais sofisticada e complexa dentre todas as estruturas ósseas dos vertebrados [62]. O desenvolvimento ósseo dessa estrutura tão perfeitamente complexa tem início com a diferenciação e migração de células oriundas da porção cefálica da crista neural [66, 68-70]. Todavia, há estudos que afirmam que o crânio é composto por uma “mistura” bem organizada de cartilagens e ossos procedentes do mesoderma e também da crista neural [66, 68, 71].

Classicamente, o início da ossificação intramembranosa ocorre quando as células mesenquimais diferenciam-se em osteoblastos, células formadoras do tecido ósseo [62]. A ossificação intramembranosa da cabeça ocorre da mesma forma, tendo início quando as células mesenquimais originárias da crista neural cefálica proliferam e se condensam em nódulos. Algumas dessas células mudam sua forma e função e se diferenciam em osteoblastos [62].

Recentemente, Abzhanov *et al.*, demonstraram que, a diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos ocorre através de múltiplos passos [70]. Através da análise de marcadores de células osteoprogenitoras (Runx2 e osteopontina) e condroprogenitoras (colágenos II e IX e Sox9), foi caracterizada uma nova linhagem celular intermediária entre pré-osteoblastos e osteoblastos maduros. Essas células foram chamadas de osteoblastos condrócitos-like (CLO; *chondrocyte-like osteoblasts*), por serem pré-osteoblastos que expressam não apenas marcadores da diferenciação osteoblástica (e.g. Runx2), mas também marcadores da diferenciação condroblástica (colágenos II e IX). Essa linhagem parece ser específica da ossificação intramembranosa. Esse estudo propõe que a transição de pré-osteoblastos proliferativos para células CLO seja particularmente importante na transição da fase de expansão para a fase de diferenciação celular durante a ossificação intramembranosa [70]. As células CLO se diferenciam em osteoblastos maduros que passam a secretar proteínas da MEC características do tecido ósseo, como o colágeno tipo I e diferentes proteoglicanos, e glicoproteínas adesivas que formam o osteóide, porção imatura e, portanto, ainda não mineralizada da matriz óssea.

Quando o osteóide passa a ser mineralizado, através da deposição de cálcio e fósforo, espículas ósseas irradiam do centro de ossificação. Ao entorno dessas espículas, mais células mesenquimais se organizam e formam o perióstio, uma membrana conjuntiva que reveste o osso externamente [62]. As células que povoam a região mais interna do perióstio se diferenciam em osteoblastos e iniciam o processo de formação óssea. Dessa forma, várias

camadas/ lâminas ósseas vão sendo formadas. Todo esse processo parece ser finamente regulado pela sinalização proveniente da dura-máter, através das proteínas morfogenéticas do osso (BMP; *bone morphogenetic proteins*) e da ativação de um fator de transcrição denominado CBFA1 ou Runx2, responsável pela diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos [69, 71, 72]. Recentemente foi demonstrado que células osteoprogenitoras são responsivas a sinalização por Wnt (*wingless*), que estimularia a diferenciação em osteoblastos [73]. Uma vez que todo o processo de ossificação é finamente controlado por moléculas específicas, produzidas e secretadas de forma tecido e tempo dependente, qualquer alteração que perturbe a homeostase desse processo pode levar a sérias alterações da formação do crânio e da face [66]. Fatores endógenos como mutações nos genes dos receptores dos fatores de crescimento de fibroblasto (FGFR) são responsáveis por graves alterações na formação e crescimento da cabeça. Porém, alguns fatores exógenos, como o álcool [74, 75] e a ciclopamina também são notoriamente teratogênicos [76].

As suturas do crânio são os pontos onde duas ou mais estruturas ósseas do crânio se unem. Por determinarem a união, isto é, o “fechamento dos espaços”, entre os ossos occipital, interparietal, parietal e frontal, o crescimento do crânio é diretamente dependente do tempo de fechamento das suturas. Tanto o fechamento prematuro quanto o não fechamento das suturas pode causar severas alterações morfológicas do crânio e podem levar a alterações neurológicas graves [66]. A principal molécula envolvida com a sinalização intercelular que determina o desenvolvimento das suturas é a família dos fatores de crescimento fibroblástico (FGF) e das BMPs. Porém, além dos fatores mencionados, alterações nos níveis plasmáticos de hormônios tireoideanos afetam diretamente o fechamento das suturas, assim como o desenvolvimento dos ossos do crânio, como observado por nós e por outros grupos [11, 14, 77].

2.1.1.2 Ossificação Endocondral

Vértebras, costelas e ossos dos membros são formados através da ossificação endocondral.

O molde cartilaginoso que dá origem às vértebras é formado a partir do esclerótomo dos somitos. Para que ocorra a passagem dos nervos motores que emergem do tubo neural, o esclerótomo divide-se em porção rostral e porção caudal, ou anterior e posterior, respectivamente. O esclerótomo anterior de um segmento se une ao posterior do segmento seguinte e assim formam-se os moldes cartilaginosos dos corpos vertebrais [62].

A ossificação endocondral dos membros se inicia com o comprometimento das células mesenquimais da placa mesodérmica lateral em se tornarem condrócitos [78]. Essas células condroblásticas serão responsáveis pela formação do esqueleto apendicular [62].

As células mesenquimais comprometidas com a diferenciação em condrócitos se aderem entre si e formam nódulos (*clusters*). Foi demonstrado que BMPs estimulam a produção de moléculas de adesão, N-caderinas, pelos condrócitos, propiciando a formação dos clusters [79, 80]. Os condrócitos passam a produzir e secretar uma MEC rica em colágeno tipo II e proteoglicanos, principalmente o agregam [62, 78]. As células localizadas na periferia do *cluster* formam o pericôndrio.

A cartilagem recém formada cresce, toma forma, e passa a ser denominada **molde cartilaginoso**. Esse crescimento ocorre através da proliferação dos condrócitos e do aumento de deposição de MEC. Os condrócitos proliferativos localizados no centro do molde cartilaginoso aumentam de volume e se diferenciam em condrócitos hipertróficos. Além disso, passam a expressar genes que determinam mudanças fundamentais na sua função, como a síntese e secreção de colágeno tipo X e de fibronectina [81]. O principal desses genes é o *run-related transcription 2* (Runx2 ou Cbfa1).

Os condrócitos hipertróficos são peça fundamental na formação do osso, são “a principal engrenagem da formação e do crescimento ósseo”, como disseram Noonan *et al.* [82]. São os condrócitos hipertróficos que primeiramente mineralizam a MEC em torno deles, atraem vasos sanguíneos através da secreção do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e também atraem condroclastos (células que reabsorvem MEC) [82]. Uma das hipóteses aceitas para explicar o processo de mineralização é de que os condrócitos hipertróficos secretam vesículas contendo enzimas que acabam por atrair e concentrar cálcio e fósforo na MEC [83]. Também são os condrócitos hipertróficos que induzem a diferenciação das células adjacentes ao pericôndrio em osteoblastos. Os condrócitos pré-hipertróficos secretam Indian hedgehog (Ihh), um fator que induz a produção de Runx2 pelas células adjacentes ao pericôndrio, fazendo com que estas se diferenciem em osteoblastos [84].

Os osteoblastos iniciam a ossificação da região adjacente ao pericôndrio/periósteo e formam um colar ósseo na região da futura diáfise óssea. Nesse momento, os osteoblastos passam a ser sensíveis a sinalização pelo Wnt e expressam Osterix, fator determinante para que a célula adquira o fenótipo de osteoblasto maduro [73]. Essa ossificação é intramembranosa, uma vez que as células mesenquimais adjacentes ao pericôndrio se diferenciaram diretamente em osteoblastos e passam a produzir camadas de osso compacto. Essas camadas de osso compacto formam um colar ósseo ao redor da região média do osso,

constituída de condrócitos hipertróficos e proliferativos. Alguns consideram que esse evento promova uma modificação do metabolismo dos condrócitos hipertróficos, de aeróbico para anaeróbico [85], o que altera sua função mitocondrial e os induziria à apoptose [86, 87]. Outros sugerem que a apoptose, migração de vasos, deposição de MEC óssea e a formação do colar ósseo sejam processos concomitantes [88, 89].

A matriz cartilaginosa deixada pelos condrócitos hipertróficos passa a ser invadida por vasos sangüíneos que trazem consigo osteoblastos e condroclastos. A inibição da proliferação dos vasos sangüíneos causa atraso significativo da ossificação [64]. Esses osteoblastos se depositam sobre a MEC e começam a secretar a “verdadeira” matriz óssea, enquanto se desenvolve o periósteo - camada de tecido conjuntivo e capilares - na região média do osso em desenvolvimento. Ao mesmo tempo, ocorre a formação de uma cavidade interna que abrigará a medula óssea. Essa reabsorção é feita por osteoclastos originados de monócitos vindos da corrente sanguínea [82].

Enquanto se desenvolve a ossificação primária no centro do molde cartilaginoso, formando a diáfise óssea, condrócitos proliferativos garantem o crescimento longitudinal e a continuidade da ossificação em direção às porções distais do osso. Neste momento, a diáfise encontra-se ossificada e as epífises ainda são totalmente cartilaginosas.

A ossificação das epífises ocorre durante o desenvolvimento fetal humano e durante o desenvolvimento pós-natal de camundongos e ratos. Essa ossificação é chamada de secundária por ser mais tardia que a primária, que ocorre na diáfise. A ossificação secundária é um evento essencial para a função óssea normal e tem início com a hipertrofia dos condrócitos localizados na porção mediana das epífises. Assim como na ossificação da diáfise, os condrócitos hipertróficos secretam fatores atrativos para vasos sangüíneos que trazem consigo osteoblastos [82]. Para que os vasos atinjam o centro de ossificação, os condrócitos de reserva e proliferativos que residem em volta do centro de ossificação secretam enzimas proteolíticas que permitem que canais sejam feitos entre eles. É através desses canais que passam os vasos que irrigarão a ossificação secundária [90].

Entre a ossificação primária e secundária, portanto entre diáfise e epífise ossificadas, residem condrócitos remanescentes que formam a lâmina epifisial, fundamental para o crescimento ósseo longitudinal. Consideraremos também como lâmina epifisial a porção de condrócitos limitada à região da epífise óssea, mesmo antes da ossificação secundária ocorrer (Fig. 3).

Todos os eventos relacionados ao desenvolvimento e crescimento ósseo devem ocorrer de maneira organizada e controlada para que o resultado final seja um adulto que não

apresente alterações esqueléticas. Tanto o desenvolvimento ósseo quanto seu crescimento e remodelação são eventos de extrema importância durante a vida do indivíduo. Alterações do crescimento longitudinal ósseo raramente estão relacionadas a alterações psicomotoras ou neurológicas, porém, apesar de serem parcialmente “limitantes”, alterações esqueléticas são particularmente traumatizantes e mal aceitas pela sociedade, resultando em preconceito e exclusão. O conhecimento detalhado dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento e crescimento ósseo e nas suas alterações é importante não apenas pelas consequências biológicas causadas por imprecisões no desenvolvimento e crescimento ósseo, mas também pelas limitações sociais ainda implícitas nessa condição.

Figura 3: Esquema representativo da organização da lâmina epifisial.

2.1.2 Crescimento ósseo

O crescimento longitudinal dos ossos é particularmente rápido durante a vida fetal e é dependente da taxa de diferenciação de condrócitos proliferativos em hipertróficos que, junto com os condrócitos de reserva, formam a lâmina epifisial (LE) [82].

A LE é uma estrutura cartilaginosa altamente organizada, situada entre a diáfise e a epífise ossificadas. Pode ser dividida em zonas horizontais de condrócitos em diferentes estágios de diferenciação: zona de reserva (mais distal em relação a diáfise), zona proliferativa, zona pré-hipertrófica e zona hipertrófica (adjacente a diáfise) [91].

A zona de reserva é formada por condrócitos distribuídos na MEC rica em colágeno tipo II. Essas células parecem ser cruciais para a orientação das colunas de condrócitos na zona proliferativa e conseqüente crescimento ósseo unidirecional. Por um estímulo ainda não

conhecido, os condrócitos da zona de reserva sofrem divisões na direção longitudinal e se organizam em colunas, formando a zona proliferativa. Os condrócitos proliferativos sintetizam uma grande quantidade de proteínas da MEC essenciais para a estrutura da LE [82].

Num dado momento, em função de um número definido de divisões ou em função da exposição a determinados fatores (e.g. estrógeno, para meninos e meninas), os condrócitos proliferativos perdem sua capacidade de divisão, diferenciam-se e hipertrofiam, tornando-se condrócitos pré-hipertróficos [92]. Os condrócitos pré-hipertróficos localizam-se na zona pré-hipertrófica e têm função determinante para a ossificação. Em seguida, estas células se diferenciam em condrócitos hipertróficos, formando a zona hipertrófica [62].

Como dito anteriormente, os condrócitos hipertróficos secretam MEC específica, promovem sua mineralização e estimulam a diferenciação das células mesenquimais do pericôndrio. Em seguida, os condrócitos hipertróficos sofrem apoptose e os septos deixados pelos condrócitos são reabsorvidos pelos condroclastos e osteoclastos, enquanto osteoblastos formam o novo osso.

Vale ressaltar que diferentes fatores influenciam o crescimento ósseo através da ação direta sobre a LE. O estabelecimento da zona de reserva, a taxa de proliferação celular, assim como a diferenciação dos condrócitos hipertróficos são fenômenos altamente regulados por diferentes fatores de crescimento e hormônios que recrutam vias intracelulares e fatores de transcrição específicos. O Sox9 é um fator de transcrição que ativa a expressão de uma variedade de genes que são importantes para a função dos condrócitos, como colágeno tipo II, e que determina a diferenciação de células mesenquimais em condrócitos [93].

A sinalização intracelular induzida pelos FGFs também tem um importante papel em diferentes funções exercidas pelos condrócitos da LE, principalmente inibindo sua proliferação. Há uma grande variedade de FGFs e FGFR na LE, o que sugere que as vias por eles estimuladas são cruciais para o crescimento normal dos segmentos ósseos. A mutação ativadora do FGFR3 é a causa da forma mais comum de nanismo, o nanismo acondroplásico. A acondroplasia ocorre em 1:15000 nascidos vivos e consiste na redução grave da proliferação dos condrócitos da placa de crescimento e diferenciação prematura dos mesmos, o que leva a baixa estatura, entre outras complicações que podem existir [62, 94].

O PTH-RP (*parathyroid-related peptide*) e o Ihh regulam a diferenciação dos condrócitos proliferativos em hipertróficos. A zona pré-hipertrófica secreta Ihh que se difunde até as células do pericôndrio e induz a expressão e secreção de PTH-RP. Este, por sua vez, difunde-se entre os condrócitos da LE, retarda a diferenciação dos condrócitos proliferativos e

inibe parcialmente a expressão de Ihh [95-100]. Há também estudos demonstrando que o PTH-RP é produzido e secretado pelos condrócitos da zona de reserva, de onde ele difundiria para a zona proliferativa e regularia sua diferenciação [82, 97, 100].

O Runx2 regula a diferenciação dos condrócitos, a migração de vasos e o início da ossificação primária na região da metáfise. Runx2 codifica um fator de transcrição determinante para a diferenciação dos osteoblastos e seu silenciamento inibe totalmente o desenvolvimento de ossificação [101, 102]. Biglicam e decorim são SLRPs (*small leucine-rich proteoglycan*) que estão diretamente relacionados à proliferação e diferenciação dos osteoblastos. O biglicam é expresso na MEC durante a fase de mineralização e o decorim é expresso na MEC desde o início da deposição da matriz óssea não mineralizada, o osteóide [103]. Animais com deleção do gene do biglicam apresentam restrições quanto a sua capacidade em formar osso. Isso pode dever-se ao fato das células ósseas oriundas desses animais serem menos responsivas ao TGF- β (BMPs), produzirem menos colágeno, expressarem baixos níveis de osteocalcina e apresentarem menor habilidade em acumular cálcio a ser depositado na MEC [104].

As diferentes BMPs, assim como os FGFs, são um vasto número de ligantes e receptores que atuam na LE. É importante observar, que as diferentes BMPs atuam na cartilagem de forma tempo dependente, podendo a mesma isoforma desempenhar papéis diferentes de acordo com a maturidade do tecido [82].

A LE também é responsiva ao hormônio do crescimento (GH) e aos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF-1 e 2). Camundongos com deleção do gene IGF-1 mostram severo retardo no crescimento entre 14,5E e 18,5E, acompanhado de atraso da ossificação das vértebras, esterno e patas. Foram ainda detectados redução da proliferação e aumento da apoptose na vértebra e fêmur dos camundongos [105]. Além disso, esses animais apresentam LE com condrócitos menores [106, 107]. Já os animais sem o receptor de IGF-1 são afetados mais profundamente e não são compatíveis com a vida. Esses achados sugerem que a expressão normal de IGF-1 e do seu receptor é de extrema importância para o desenvolvimento e crescimento normais [106].

É digno de nota que a interação entre os fatores acima descritos é uma constante na manutenção da LE e do crescimento. O papel do hormônio tireoideano sobre a LE será abordado em numa seção específica (item 2.3 desta revisão), mas cabe dizer que os hormônios tireoideanos têm agem sobre os condrócitos da LE de forma direta, através da interação com TRs [9], e indireta, através da regulação da expressão de FGFRs, IGF-I, PTH-RP, bem como os proteoglicanos [13, 108-110].

2.2 Hormônio Tireoideano

2.2.1 Desenvolvimento da glândula tireóide

A glândula tireóide é a primeira glândula a se desenvolver no embrião humano. Em humanos, de forma geral, aos 24 dias de gestação (dg) ocorre o espessamento ectodérmico mediano no assoalho da faringe primitiva e forma-se aí uma evaginação denominada divertículo tireoideano (primórdio glandular). Aos 50 dg, a glândula tireoideana migra para o seu local definitivo posicionando-se ventralmente ao hióide e às cartilagens laríngeas. O divertículo, inicialmente oco torna-se maciço e divide-se em dois lobos unidos pelo istmo. Aos 70 dg, as estruturas clássicas da glândula tireóide já podem ser identificadas histologicamente. Na sétima semana de gestação, a tireóide já apresenta a sua forma definitiva, mas ainda não é funcional. A concentração de TSH na hipófise e no plasma começa a aumentar a partir do segundo trimestre de gestação, assim como os níveis de T4. Neste momento, o eixo hipotálamo-hipófise-tireóide está em plena maturação e já é funcional [111-113]. Com 20 semanas de gestação, as concentrações fetais de TSH, T4, tireoglobulina e T4 livre começam a aumentar até alcançarem níveis adultos em 36 semanas.

Em camundongos, o período de gestação varia entre 19 e 20 dias [114]. Nestes animais, a glândula tireóide inicia seu desenvolvimento por volta do 8º dia de gestação e, por volta do 14º dia, detecta-se a expressão de tireoperoxidase (TPO), tireoglobulina (TG) e do receptor do hormônio tireoestimulante (TSH-R) no tecido tireoideano. A formação folicular e a produção hormonal estão bem estabelecidas por volta do 16º ou 17º dias [114, 115].

A glândula tireóide madura é composta por dois lobos e cada um deles se divide em 20-40 folículos. Cada folículo é composto por colóide, material rico em glicoproteínas, circundado por células foliculares, que são as responsáveis pela síntese e secreção dos hormônios tireoideanos ou iodotironinas [60].

Desde 1960, há um consenso sobre a importância dos hormônios tireoideanos maternos no desenvolvimento fetal [116, 117]. Embora a relação materno-fetal venha sendo estudada, há ainda questões a serem elucidadas com relação aos efeitos das variações hormonais maternas sobre o desenvolvimento fetal.

Em humanos, o T4 e T3 maternos cruzam a barreira placentária, mas não o TSH. Em estudos utilizando ratos, foi observado que a mãe fornece ao feto todo o hormônio necessário antes do início da função tireoideana fetal. O mesmo foi observado em gestações humanas.

Neste período, os hormônios tireoideanos encontrados na placenta, membranas, cavidades e tecidos embrionários jovens são de origem materna, estando sua concentração relacionada ao nível hormonal materno [118-120]. A mãe também oferta ao feto TRH, iodo, propiltiouracil (PTU), metimazol e perclorato de sódio, sendo estes últimos, drogas bloqueadoras da função tireoideana. Mesmo iniciada a função tiroideana fetal, a transferência materna de T3 e T4 não é interrompida e representa uma importante fração do suprimento de hormônios tireoideanos necessários para o desenvolvimento fetal adequado [119, 121, 122]. De fato, acredita-se que o T4 ofertado pela mãe seja suficiente para manter as concentrações hormonais fetais adequadas [123], uma vez que o feto, útero e placenta expressam selenodesiodases de iodotironinas, enzimas capazes de converter T4 em T3 ou reverso T3 e, assim, regular localmente a oferta hormonal aos tecidos em desenvolvimento [17, 20, 42, 43, 53, 121, 124, 125]

2.2.2 Síntese e regulação hormonal

Os hormônios tireoideanos são produzidos na glândula tireóide em um processo que envolve o transporte ativo do iodo para dentro da célula folicular, sua oxidação e incorporação em resíduos tirosina na molécula de tireoglobulina [126, 127]. Esta iodinação de tirosinas resulta em resíduos monoiodinados (MIT) e diiodinados (DIT) que são enzimaticamente ligados para formar tiroxina (T4) e triiodotironina (T3). A tireoglobulina iodinada que contém MIT, DIT, T4 e T3 é armazenada no colóide, próximo ao lúmen das células foliculares da tireóide. A liberação dos hormônios é feita na célula folicular através da endocitose e digestão lisossomal da tireoglobulina. Embora a tireóide produza preferencialmente T4, acredita-se que muitos dos efeitos dos hormônios tireoideanos sejam fruto da ligação do T3 com os receptores nucleares (TRs) [111, 126].

O iodo é um elemento essencial para a atividade tireoideana. Desse elemento, depende diretamente a produção das iodotironinas (tirosina + iodo). Tendo em vista que as iodotironinas são fundamentais para o desenvolvimento, maturação e função adequada de diferentes sistemas, incluindo o sistema nervoso central e o sistema esquelético, fica claro porque uma dieta inadequada em iodo está associada a alterações tireoideanas e conseqüentes alterações sistêmicas. Exemplos são as doenças agrupadas sob o termo de Moléstias Decorrentes da Carência Crônica de Iodo (MCCI). Bócio difuso ou multinodular, hipertireoidismo induzido por iodo, hipotireoidismo neonatal ou adulto, diminuição da fertilidade, aumento da mortalidade perinatal, retardo do crescimento, deficiência mental, surdo-mudez, variantes clínicas do cretinismo endêmico, são alguns exemplos de alterações

causadas pela persistência de carência do iodo nutricional [128, 129]. Essas alterações podem ser corrigidas eficientemente através da iodação do sal ou, em certas condições específicas, pelo uso de óleo iodado parenteral ou oral [130-134].

As iodotironinas são compostos resultantes da ligação de duas moléculas de tirosina iodinadas. Nos mamíferos, 60-90% da produção tireoideana corresponde a 3,5,3',5'-tetraiodotironina (tiroxina ou T4) e 10-40% corresponde a 3,5,3'-triiodotironina (T3). Menos de 1% da produção tireoideana é representado por outras iodotironinas, o T3 reverso (rT3) e a diiodotironina (T2) [111].

A síntese e secreção dos hormônios tireoideanos é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-tireóide. Resumidamente, o hipotálamo produz e secreta o hormônio liberador de tireotrofina (TRH; *thyrotropin-releasing hormone*), que atinge a hipófise e estimula a produção do hormônio tireotrófico (TSH; *thyroid stimulating hormone*). O TSH estimula a captação de iodo pela glândula tireóide e, portanto, estimula a produção tireoideana de hormônios. Por outro lado, a secreção de TSH é regulada negativamente pelos próprios produtos da glândula tireóide, ou seja, por *feedback* negativo [111, 135]. Quando um indivíduo apresenta níveis aumentados de TSH e níveis diminuídos de T3 e T4 abaixo dos níveis normais, tem-se uma situação patológica denominada hipotireoidismo. Contrariamente, o hipertireoidismo se caracteriza por níveis aumentados de T3 e T4 e reduzidos de TSH [111].

A afinidade dos TRs é aproximadamente 10 vezes maior pelo T3 em relação ao T4. Por conta disso, considerando-se os efeitos genômicos dos hormônios tireoideanos, o T4 atua como um pró-hormônio, e o T3 como o hormônio ativo, ligando-se aos receptores nucleares [1, 26, 42]. O T4, produto secretado em maior abundância pela glândula tireóide é convertido a T3 por ação das selenodesiodases das iodotironinas na própria tireóide ou nas células dos tecidos alvo. As ações genômicas do T3 são resultado da interação de T3 e TR e, em seguida da ligação dos T3-TR com regiões específicas dos genes alvo do hormônio tireoideano, os elementos responsivos dos TRs (TRE), o que leva a modulação da transcrição gênica. Para tanto, o T3 deve entrar nas células alvos através de transportadores ou ser produzido localmente pelas selenodesiodases (T4 convertido a T3 na célula).

É digno de nota, entretanto, que alguns efeitos dos hormônios tireoideanos ocorrem muito rapidamente e não são afetados por inibidores da transcrição gênica ou tradução, demonstrando que esses hormônios também atuam via mecanismos não genômicos [136]. Tais ações têm sido descritas em vários tecidos e tipos celulares [137, 138]. O rT3, assim como o T2, eram considerados isoformas biologicamente inativas por não desempenharem uma ação genômica direta através da ligação com os TRs. Porém, estudos vêm demonstrando

que o rT3 e T2 também desempenham importantes ações biológicas por mecanismos não genômicos [137, 139].

O receptor de TSH (TSHR) é primariamente expresso nas células foliculares da glândula tireóide, mas também foi identificado no cérebro, rins, testículos, coração, osso, tecido adiposo, fibroblastos e em células do sistema imune, hematopoiéticas e ósseas [140-143]. Ao contrário do que se pensava anteriormente, o TSH parece atuar diretamente sobre tecidos não tireoideanos, entre esses, o tecido ósseo. Williams e Bassett concluem em sua última revisão sobre o tema, que os resultados *in vitro* e *in vivo* obtidos até agora são conflitantes ou demonstram que o TSH não teria um papel importante no osso em casos de hipo ou hipertireoidismo [144-146]. Por outro lado, o TSHR é expresso nas células ósseas e o tratamento com TSH melhora a qualidade óssea em animais controle (níveis normais de TSH, T3 e T4) [145, 147]. Esse estudo sugere que o TSH tenha um papel positivo no metabolismo ósseo em condições normais. Segundo Williams e Bassett, o TSH poderia determinar o comprometimento de células mesenquimais com a diferenciação em células osteoprogenitoras e evitaria a diferenciação de monócitos em osteoclastos, agindo assim como um regulador fino do remodelamento ósseo, regulando a oferta de células responsivas ao hormônio tireoideano [148]. Porém, em casos de hipotireoidismo ou hipertireoidismo, os efeitos observados no osso se devem a alteração dos níveis dos hormônios tireoideanos e não dos níveis de TSH [146, 148].

2.2.3 Mecanismo de ação dos hormônios tireoideanos

Um dos determinantes dos efeitos biológicos dos hormônios tiroideanos é a sua concentração intracelular. Esta, por sua vez, é determinada não apenas pelos níveis séricos de T3 e T4, regulados pelo eixo hipotálamo-hipófise-tireóide, mas, também por outros mecanismos reguladores localizados nas suas células alvo. Dessa forma, os transportadores e as selenodesiodases de iodotironinas passaram a ser considerados parte importante e determinante da ação hormonal. Nesta revisão, os mecanismos de regulação local da ação tireoideana serão abordados considerando sua localização celular. Desta forma, serão explorados alguns pontos relevantes sobre os transportadores, selenodesiodases e receptores das iodotironinas desde da membrana plasmática, passando pelo citoplasma e finalizando no núcleo.

2.2.3.1 Transportadores de iodotironinas

Inicialmente, e durante décadas, acreditou-se que os hormônios tireoideanos se difundiam passivamente pela membrana plasmática das células alvo. Esse raciocínio era fundamentado na característica lipofílica dos hormônios e na composição da membrana plasmática, onde a bicamada lipídica favoreceria a difusão passiva. A difusão passiva dos hormônios seria controlada pela diferença entre a concentração hormonal fora e dentro da célula, que tenderia a se equilibrar. Porém, na década de 70 diferentes pesquisadores mostraram que o influxo celular dos hormônios implicava em gasto energético e era um mecanismo saturável [149], o que sugeria que a entrada não se dava por difusão passiva e sim por transporte ativo. Com o evoluir dos estudos, foi demonstrado que o influxo e efluxo celular das iodotironinas são efetuados ativamente por proteínas transportadoras.

Durante os anos 80, começaram a ser identificadas as proteínas transportadoras envolvidas com o transporte das iodotironinas em hepatócitos [149]. Desde então, várias proteínas foram caracterizadas como sendo transportadores dos hormônios tireoideanos em diferentes tecidos. O tecido ósseo, entretanto, não foi utilizado como modelo em nenhum desses estudos.

Os transportadores foram classificados de acordo com suas características cinéticas e quanto ao substrato transportado. Sendo assim, conhecidas famílias de carreadores de solutos passaram a ser reconhecidas também como transportadoras de iodotironinas, incluindo a família dos transportadores de ânions orgânicos e a família dos transportadores de aminoácidos.

2.2.3.1.1 Transportadores de ânions orgânicos

O NTCP (do inglês, *sodium (Na⁺) taurocholate co-transporting polypeptide*) é um membro da família carreadora de soluto (SLC) 10 (SLC10; *solute carrier family 10*), identificado apenas em hepatócitos [150, 151]. Sua principal função está relacionada ao transporte sódio-dependente de ácidos biliares [29]. O influxo celular de hormônios tireoideanos (T4 ~T3 > rT3 - T2, em ordem de preferência pelo substrato) e das isoformas sulfatadas (T4S e T3S) foi demonstrado através da injeção do RNA mensageiro (mRNA) de NTCP humano em ovócitos de *Xenopus laevis* [29]. O transporte de iodotironinas pelo NTCP ainda não foi demonstrado *in vivo*.

Os OATPs (*organic anion transporting polypeptides*) fazem parte de uma grande família de proteínas homólogas com distribuição ubíqua, dentre as quais, algumas atuam como transportadores dos hormônios tireoideanos [29, 150]. Inicialmente, os genes referentes a esses transportadores foram classificados como parte da família SLC12. Recentemente, uma nova nomenclatura fundamentada, na homologia entre os membros da família, classificou os OATPs como membros da família SLC0. Aproximadamente quarenta genes diferentes, pertencentes à família SLC0, codificam proteínas que facilitam o transporte independente de sódio (Na⁺) de ânions orgânicos, incluindo sais biliares, bilirrubina, oligopeptídeos, diferentes drogas, esteróides e iodotironinas [152]. A expressão desses transportadores foi identificada no fígado, rim, cérebro (barreira hemato-encefálica, plexo coróide), pulmão, coração, testículo, retina, intestino delgado e na placenta [151]. Os transportadores da família SLC0 são denominados OATP1, 2, 3 ou 4, sendo ainda complementados por A, B ou C e numerados de 1 a 6 (e.g. OATP1C1).

O OATP1C1 apresenta alta especificidade e afinidade pelas iodotironinas, especialmente pelo T4 e rT3, e parece ser o transportador de iodotironinas mais estudado da família SLC0. Sua expressão e função foram detectadas nas células endoteliais dos capilares cerebrais e no plexo coróide sugerindo que esse transportador seja importante no transporte de T4 através da barreira hemato-encefálica [151, 153-155]. Segundo estudos recentes, o OATP1C1 tem a função de transportar T4 do sangue para o parênquima cerebral e do parênquima para os astrócitos, onde o T4 seria convertido a T3 por ação da D2 [154]. Outro papel do OATP1C1 é o de transportar T4 através do plexo coróide para o líquido cefalorraquidiano, de onde o T4 seria transportado para os astrócitos através das células ependimárias [154].

Um outro transportador muito estudado é o OATP4A1. O OATP4A1 foi detectada na placenta, especificamente na porção fetal (sincitiotrofoblasto), o que sugere que esse transportador possa facilitar a passagem das iodotironinas do sangue materno para a placenta [150]. Esse sistema, assim como já identificado na barreira hemato-encefálica, necessitaria de outro transportador para permitir que as iodotironinas atingissem a circulação fetal, cruzando assim a barreira placentária [150]. A injeção de mRNA de OATP4A1 em ovócitos de *Xenopus laevis* revelou que essa proteína é capaz de transportar T3, T4 e rT3 para dentro da célula com grande afinidade [156].

2.2.3.1.2 Transportadores de aminoácidos

Dentre os transportadores de iodotironinas está a família dos transportadores de aminoácidos, identificados em diversos tecidos. Foram até agora identificados dois tipos diferentes de transportadores, os LATs (*L-type amino acid transporter*) e os MCTs (*monocarboxylate transporters*) [157-162].

Recentemente, dois LATs (LAT1 e LAT2) foram identificados como membros da família de aminoácidos heterodiméricos (HAT; *heterodimeric amino acid transporters*). Os HATs são heterodiméricos porque são compostos de uma cadeia leve e uma cadeia pesada [163]. A 4F2hc, uma das possíveis cadeias pesadas a fazer parte do transportador, forma HATs funcionais através da ligação com outras seis das sete possíveis cadeias leves, incluindo LAT1 e LAT2 [163]. LAT1 é expresso no cérebro, baço, timo, testículo, pele, fígado, placenta, músculo esquelético e estômago [164]. Já o LAT2 é altamente expresso no epitélio intestinal [165]. Vale ressaltar que a transfecção dos genes que codifica 4F2hc ou LAT1/LAT2 separados, em células que não expressam transportadores da família HAT, não favorece o influxo hormonal. Entretanto, quando estes genes são transfectados em conjunto, o influxo hormonal é observado [166].

O transporte de T₄, T₃, rT₃ e 3,3'-T₂ pelos HATs formados por 4F2hc humano e LAT1 humano ou LAT2 de camundongo foi demonstrado em ovócitos de *Xenopus laevis* [167]. O influxo de T₃ via 4F2hc/Lat1 em linhagem celular de carcinoma placentário humano BeWo foi também demonstrado, sugerindo que esse transportador pode ser importante para o influxo hormonal através da placenta [160].

Os MCTs transportam aminoácidos aromáticos e aminoácidos monocarboxílicos, isto é, aminoácidos com carga positiva. Dentre esses, o MCT8 e mais recentemente, o MCT10 (também conhecido por TAT1) foram identificados como sendo os mais específicos transportadores de iodotironinas capazes de facilitar a entrada e a saída de T₄ e, principalmente, de T₃ [168]. Alta expressão de MCT8 foi encontrada no cérebro, fígado, coração, placenta e em outros tecidos alvo dos hormônios tireoideanos [30, 31, 169].

A família MCT tem diversos membros, mas apenas MCT1-4, MCT8 e MCT10 tiveram seus substratos identificados [30, 155]. Curiosamente, apesar da similaridade entre MCT8 e 10 (49% de homologia entre os dois genes), acreditava-se que apenas o MCT8 transportasse iodotironinas, enquanto o MCT10 transportaria apenas outros aminoácidos [30].

Recentemente, foi demonstrado que o MCT10 transporta eficientemente T3 e T4 [170], além de transportar seus outros substratos conhecidos, fenilalanina, tirosina e triptofano [171, 172]. Por outro lado, o MCT8 não transporta aminoácidos aromáticos, apenas iodotironinas e em diferentes tecidos, como placenta e cérebro [150, 169, 173].

A importância do MCT8 como transportador de iodotironinas foi identificada a partir da observação e estudo de indivíduos portadores da síndrome ligada ao cromossomo X, Allan-Herdon-Dudley. A síndrome é causada por mutação do cromossomo X, que afeta o gene do MCT8. O quadro clínico dos indivíduos portadores da síndrome parece ser dependente do tipo de mutação no gene do MCT8 [38, 173-175]. Os portadores dessa síndrome apresentam alterações na glândula tireóide (geralmente, aumento da concentração de T3), severas alterações psico-motoras e atraso do desenvolvimento cerebral [30, 31, 33, 36, 38]. Um estudo recente demonstrou que o MCT8 desempenha um importante papel no desenvolvimento do sistema nervoso central por ser responsável pela entrada de T3 nos neurônios, e possivelmente, pela saída de T3 dos astrócitos [33, 154]. Entretanto, a função observada no SNC não pode ser estendida a outros tecidos e sistemas. O MCT8 parece ter expressão e cinética diferente em cada tecido. Um exemplo é o fato do camundongo gerado com deleção do MCT8 apresentar baixos níveis de T3 no cérebro, mas não no fígado, sugerindo que as características cinéticas e de distribuição tecidual do MCT8 sejam tecido específicas, assim como as desidases, que serão abordadas a seguir [31].

OATP1C1 e MCT8 parecem efetuar ações complementares no SNC. Heuer *et al.* sugerem que o OATP1C1 transporta T4 do sangue para os astrócitos, onde a D2 o converte a T3, que é exportado para os neurônios, onde o MCT8 seria responsável pela sua entrada na célula [154]. Na placenta, o mesmo modelo se aplica, mas o OAPT4A1 e/ou 4F2hc/LAT1 transportariam o T4 do sangue materno para a placenta [150, 176].

Embora o MCT8 tenha sido identificado recentemente em osteoblastos, osteoclastos e condrócitos em todos os períodos de desenvolvimento estudados, seu papel no desenvolvimento esquelético ou metabolismo ósseo ainda não foi estudado diretamente [177].

2.2.3.2 Selenodesidases das iodotironinas

Como dito anteriormente, o T3 é o principal efetor da ação dos hormônios tiroideanos. Isso se deve à maior afinidade dos TRs pelo T3 em relação às outras isoformas, T4, rT3 e T2.

Considerando que a maior parte da produção tireoideana corresponde ao T4 e que a maior parte da ação hormonal é efetuada por T3, parece lógico que haja a conversão de T4 a T3 entre a sua produção na glândula tireóide e a ação no tecido alvo.

As selenodesiodases das iodotironinas do tipo I, II e III (D1, D2 e D3, respectivamente) regulam a atividade dos hormônios tireoideanos através da remoção de uma molécula de iodo dos precursores [42, 177]. Estas três enzimas constituem um grupo de proteínas diméricas integrais de membrana que possuem o raro aminoácido selenocisteína no seu sítio catalítico [178].

O T4 é considerado um pró-hormônio que deve ser convertido a T3, através da retirada do iodo na posição 5' do anel fenólico, ou desiodação do anel externo. Essa conversão é catalizada por D1 e D2. A retirada do iodo da posição 5 do anel tirosil, ou desiodação do anel interno, resulta na inativação de T4 e T3. Dessa forma, tanto T4 quanto T3 são inativados, resultando na geração de 3, 5', 3'- triiodotironina (T3 reverso; rT3) e 3, 3'- diiodotironina (T2), respectivamente. Essa conversão é catalizada por D1 e D3, prioritariamente [42, 178-184].

As três desiodases apresentam grande similaridade estrutural (~50% de homologia) e peso molecular semelhante, 29-33 KDa [185]. Apesar de terem estrutura molecular tão parecidas, essas enzimas são distintas com relação às suas propriedades cinéticas, especificidade pelo substrato, inibição por drogas tireostáticas, distribuição tecidual e resposta à concentração dos hormônios tireoidianos [42, 179]. O hipotireoidismo regula positivamente a atividade da D2 e negativamente a atividade da D3, o oposto sendo observado em casos de tireotoxicose [42].

Considerando a ação genômica hormonal, a D1 é uma enzima que ativa e inativa o T4 com a mesma eficiência, e o seu papel sistêmico ainda necessita ser identificado. A D2 é a principal ativadora do T4, convertendo-o a T3. Já a D3, em oposição às outras duas, é a principal inativadora do T3, e também previne a conversão de T4 a T3, transformando-o em reverso T3 [42]. A expressão das desiodases pode ser concomitante em alguns tecidos, de acordo com o grau de maturação tecidual [42, 178]. A atividade das desiodases é mais um mecanismo de regulação local do efeito dos hormônios tireoideanos. Assim como os transportadores já descritos, a atividade das desiodases pode alterar a sinalização dos hormônios tireoideanos na célula-alvo.

Apesar do importante papel na regulação local dos níveis hormonais aos quais a célula está exposta, as desiodases também desempenham importante papel na geração de T3

sistêmico. Estudos demonstraram que 80% do T3 circulante em humanos se deve à 5'-desiodação [111].

É bem estabelecido que, durante o desenvolvimento fetal, os níveis séricos dos hormônios tireoideanos são mais baixos e que, sua concentração tecidual pode ser regulada pelas selenodesiodases das iodotironinas [43, 44, 186]. Enquanto D2 converte T4 a T3, D3 converte T4 a rT3 e T3 a T2 de forma tempo e tecido dependente. Durante o desenvolvimento de vários tecidos como cérebro, cóclea, retina e durante a metamorfose dos girinos, D2 e D3 demonstram ser de fundamental importância no controle da oferta hormonal local [25, 43-45]. A expressão de todas as 3 enzimas, D1, D2 e D3, foi detectada no tecido ósseo em desenvolvimento e adulto. Porém, estudos indicam que a D2 seja a principal enzima ativadora e que a D3 seja a principal inativadora do hormônio tireoideano nesse sistema [46-48, 177, 187, 188].

A expressão concomitante das três enzimas parece ser uma regra nos tecidos em desenvolvimento, o que sugere que as desiodases sejam responsáveis pelo controle fino da oferta hormonal a esses tecidos, atividade extremamente importante para o desenvolvimento normal [25, 42, 43, 189]. A ação do T3 é altamente regulada durante o desenvolvimento de forma tempo e tecido dependente, devido ao padrão de expressão das desiodases, que é singular durante o desenvolvimento fetal.

2.2.3.2.1 Selenodesiodase das iodotironinas do tipo I (D1)

A D1 foi a primeira desiodase a ser caracterizada bioquimicamente como conversora de T4 a T3 e foi a primeira também a ser clonada. A D1 localiza-se na membrana plasmática das células-alvo e tem seu sítio ativo voltado para o citoplasma [42, 190, 191].

Em adultos, a conversão de T4 a T3 dependente de D1 é responsável por uma fração considerável do T3 plasmático em indivíduos normais. Uma importante característica da desiodação por D1 é a sua sensibilidade ao PTU [192]. A D1 catalisa a conversão de T4 a T3, isoforma preferencial dos receptores nucleares, através da remoção da molécula de iodo ligado ao carbono 5' do anel fenólico ou anel externo. Porém, também é capaz de remover o iodo do carbono 5 do anel tirosil, ou anel interno, produzindo assim rT3 [42]. A D1 apresenta Km T4 em torno de 1 μ M [42].

A D1 é expressa em vários tecidos. Em humanos, a D1 não é expressa no SNC, mas foi identificada no fígado, rins, tireóide e hipófise anterior (18). Em ratos, durante o

desenvolvimento fetal, a D1 foi detectada no fígado, rins, SNC, hipófise anterior, tireóide, intestino, pele, ovário, testículo e placenta [25, 43]. Apesar da distribuição ubíqua, a D1 não parece ter papel fundamental no desenvolvimento, tendo papel importante após o nascimento e no adulto [25, 47, 53, 189].

2.2.3.2.2 Selenodesiodase das iodotironinas do tipo II (D2)

A D2 é uma proteína residente do retículo endoplasmático cujo centro catalítico localiza-se no citosol [191, 193]. A D2 é a principal ativadora do T4, convertendo-o a T3, mas também converte rT3 a T2 através da remoção do iodo da posição 5' do anel externo. A D2 apresenta Km T4 de ~1nM e meia vida de 20 minutos [185]. A D2 é transcrita a partir do gene DIO2.

Por localizar-se numa região perinuclear, acredita-se que a geração de T3 via D2 contribua significativamente para a saturação dos receptores nucleares e subsequente estimulação ou inibição da transcrição de genes alvo. Entretanto, não pode ser descartado o efluxo de hormônio da célula que contribui com os níveis séricos de T3 e faz da D2 uma enzima não apenas geradora de T3 destinado à ação local, mas também à ação sistêmica [193-195].

Por ser uma proteína residente do retículo endoplasmático, a D2 é degradada pelo mecanismo de degradação associada ao retículo endoplasmático (ERAD) [184]. A ubiquitinação inativa a D2 e marca a proteína para que seja degradada pelo proteassoma, um processo que é acelerado durante a desiodação de T4. Como consequência, a meia-vida da D2 pode variar entre 12 e 300 minutos, dependendo da taxa de desiodação de T4. Zeold *et al.* mostraram que a instabilidade da D2 é intrínseca, não dependente de sua localização subcelular [196]. A D2 inativada pela ubiquitinação pode ser reativada pela enzima *pVHL-interacting deubiquitinating enzyme-1* (VDU-1) [183].

O processo de degradação da D2 pelo complexo ubiquitina-proteassoma é dependente de uma via composta por enzimas ativadoras da ubiquitina (E1), seguida por uma família de proteínas denominadas conjugases (E2), responsáveis por conjugar a ubiquitina ativada (pelas E1) às ligases (E3). Recentemente, Dentice *et al.* demonstraram que a WD-40 SOCS Box 1 (WSB-1), uma proteína da família SOCS Box [197], é uma E3 específica para a D2 [48].

Por outro lado, há meios de estimular a expressão e atividade de D2 nas células dos tecidos alvo. A exposição ao frio [198, 199], catecolaminas [200, 201], ácidos biliares [202],

adenosina monofosfato cíclico (AMPc) [171, 202, 203], lipopolisacarídeos (via NFkappaB) [204] e a desubiquitinação pela VDU-1/VDU-2 [183] são situações e agentes indutores da expressão e atividade de D2 em humanos.

Em adultos, a expressão de D2 foi identificada em diferentes tecidos, tanto em mamíferos quanto em anfíbios, aves e peixes. Em humanos e roedores, a expressão e atividade da D2 foi detectada na hipófise, cérebro, tecido adiposo marrom (BAT), testículo, timo, útero gravídico, glândula mamária, artéria coronária e músculo liso da aorta e placenta [195, 205-211]. Em um estudo do nosso grupo, a expressão e atividade da D2 foram detectadas em diferentes segmentos ósseos de camundongos adultos, medula óssea e em células MC3T3-E1, uma linhagem de células osteoblásticas de camundongo. O sítio de maior atividade da D2 foi a tibia, seguida pelo fêmur, rádio e ulna, úmero, escápula, vértebras e calvária [47].

Por ter sido a D2 a última desidase descoberta e por ser, aparentemente, a desidase com maior possibilidade de uso terapêutico [179], centenas de novos trabalhos sobre esta enzima foram publicados nos últimos anos. Hoje sabemos que mamíferos, aves, peixes e anfíbios expressam D2 em condições normais e patológicas. Conhecemos diferentes tecidos em que é expressa e diferentes meios de regulação transcricional e pós traducional. Porém, ainda perduram muitas questões, dentre elas, qual o papel da D2 durante o desenvolvimento de diferentes tecidos. Muito se sabe sobre a sua fundamental relevância no desenvolvimento do SNC onde é responsável pela geração da maior fração de T3 presente no cérebro fetal [212]. Em contrapartida, pouco se sabe sobre sua ação no tecido ósseo, por exemplo. Sabemos que a D2 está relacionada à metarmofose dos anfíbios, momento de maior transformação metabólica e morfológica, mas não sabemos exatamente o que ocorre durante a transição da vida intra- para a vida extra- uterina, após o nascimento de mamíferos.

Durante o desenvolvimento fetal Galton *et al.* detectaram atividade da D2 em diferentes regiões do cérebro em desenvolvimento, incluindo o córtex, cerebelo, gânglios basais, tronco encefálico, bulbo olfatório, hipotálamo, hipocampo e pineal, e em todas estas regiões, a atividade da D2 aumenta gradativamente do período neonatal até 30 dias de idade pós-natal [25]. Huang *et al.* demonstraram que a D2 é expressa na maioria dos tecidos fetais por um período restrito de tempo, que varia entre os tecidos [53].

A expressão de D2 já foi identificada em diferentes linhagens celulares provenientes do tecido ósseo. Culturas primárias de células osteoblásticas provenientes da calvária, assim como células ST2, provenientes da medula óssea de camundongos, que apresentam fenótipo de osteoblastos e osteoclastos [46, 177, 187], expressam D2. O mesmo é observado na

linhagem de células osteoblásticas de camundongos MC3T3-E1, em tíbias de fetos de camundongos mantidas em cultura e em células ATDC5, uma linhagem de células condrogênicas oriundas de camundongo e na cóclea [21, 46, 47].

Dentice *et al.*, como já mencionado, foram os responsáveis pela identificação do WSB-1 como E3 ligase específica da D2 [48]. Interessantemente, a descoberta foi feita em um estudo utilizando a tíbia de embriões de galinha, durante estágios avançados de seu desenvolvimento. O grupo demonstrou que a inativação da D2 mediada pela ubiquitinação era estimulada pelo Sonic Hedgehog (Shh) na região do pericôndrio/periósteo, adjacente à lâmina epifisial. Os resultados observados, somados à indução da D3, sugerem que esse mecanismo seja responsável pela criação de um microambiente com baixos níveis hormonais, o que favoreceria a secreção do PTH-RP e, conseqüentemente, a proliferação dos condrócitos da lâmina epifisial e retardaria sua diferenciação [48]. Um cenário semelhante foi identificado na pele, onde Shh, D2 e D3 parecem ser fundamentais para o equilíbrio entre a proliferação e diferenciação de queratinócitos [49].

O papel das desidases parece ser fundamental para o desenvolvimento normal e crescimento dos ossos longos. A condrodysplasia tibial, patologia que afeta muitos frangos de corte e, portanto, tem um impacto econômico relevante, está relacionada à expressão reduzida do Dio2 na LE e parece contribuir diretamente para a ocorrência da doença [213]. Animais com deleção do gene Dio2 (D2KO), aparentemente, não apresentam qualquer alteração óssea. Porém, ainda não foram desenvolvidos estudos que avaliem apropriadamente as funções biológicas nos ossos desses animais.

2.2.3.2.3 Selenodesiodase das iodotironinas do tipo III (D3)

A D3 é a principal enzima catalizadora da remoção do iodo da posição 5 do anel interno das iodotironinas. Dessa forma, a D3 é a principal inativadora da ação gênica do hormônio tireoideano, convertendo T4 a rT3 e T3 a T2 [42, 214]. Assim como D1 e D2, a D3 tem em seu sítio ativo o raro aminoácido selenocisteína, fundamental para sua função catabólica. A D3 tem 32 KDa, não é sensível ao PTU e tem o T3 como substrato preferencial [42].

A D3 localiza-se na membrana plasmática das células alvo, assim como a D1, porém seu sítio ativo é voltado para o meio extra celular [178]. Não se pode deixar de referir que a D3 co-localiza com clatrin, proteínas marcadoras do sistema endossomo-lisossomo, o que sugere que a D3 seja “reciclada” no citoplasma da célula e devolvida à sua membrana

plasmática [215]. Isso explica o fato da meia vida da D3 ser de 12 horas [179]. Por ter o sítio ativo voltado ao meio extracelular, a D3 tem livre acesso ao T4 e T3 plasmáticos.

Pouco se sabe sobre o papel fisiológico da D3 em adultos, porém, o fato da D3 ser regulada positivamente pelos hormônios tireoideanos sugere que seu papel seja o de proteger os tecidos de níveis inadequadamente altos desses hormônios em situações de hipertireoidismo [181, 216]. A D3 também é regulada positivamente pelo fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF), retinóides, AMPc, fator de transformação de crescimento β (TGF β) e estradiol, enquanto o hormônio do crescimento (GH) e a dexametasona regulam negativamente a expressão do gene da D3 (Dio3) de forma tecido específica [42, 179, 217-224]. Já se demonstrou que no útero e placenta a D3 regula a transferência do hormônio materno ao feto tendo, portando, papel fundamental na prevenção da exposição prematura dos tecidos fetais a níveis inadequados de T3, além de ser a enzima predominantemente expressa na maioria dos tecidos de ratos durante o desenvolvimento intra-uterino [53]. Por outro lado, a atividade de D3 foi identificada em poucos tecidos durante o desenvolvimento pós-natal [225].

A alta atividade de D3, detectada em tipos específicos de tumores, pode induzir hipotiroxinemia grave em adultos e crianças [226-228].

Os hormônios tireoideanos são considerados fundamentais para o desenvolvimento fetal normal de vertebrados [111, 214, 229]. Entretanto, tão importante quanto sua presença durante o desenvolvimento fetal é a regulação fina de sua oferta aos tecidos em desenvolvimento, e a D3 tem função determinante nessa regulação. Animais com deleção do gene Dio3 (D3KO) manifestam anormalidades graves relacionadas ao controle do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide, desenvolvimento e reprodução, incluindo hipertireoidismo congênito, retardo do crescimento e infertilidade[51].

Diferentes estudos têm mostrado que tecidos embrionários e fetais apresentam atividade e expressão de D3 muito maiores que qualquer tecido adulto. Galton *et al.* demonstraram que a atividade da D3 encontrada em tecidos fetais é significativamente maior que a atividade encontrada em tecidos de ratos adultos, mas é menor que a atividade encontrada no útero grávidico e placenta [230]. A atividade de D3 foi detectada no fígado, cérebro, gônadas, pulmão, coração, pele, intestinos e músculos esqueléticos de fetos de mamíferos e aves [43, 231-234], além da área neurogênica, membros e cauda de *Xenopus laevis* [229, 235]. Vale ressaltar que, apesar de ser altamente expressa em vários tecidos fetais, em cada um deles a D3 apresenta um padrão específico de expressão [230].

Um recente estudo demonstrou haver atividade de D3 em condrócitos, osteoblastos e osteoclastos em diferenciação em cultura primária de células, enquanto a D2 foi identificada apenas em osteoblastos maduros [177]. Estes resultados sugerem que, assim como em outros tecidos, a D3 deve limitar a produção local de T3, controlando deste modo, os níveis de hormônios tireoideanos disponíveis ao esqueleto durante o desenvolvimento fetal. É importante notar que no fígado fetal, a D3 apresenta um padrão de expressão parecido com o observado no esqueleto: alta expressão no período fetal e redução durante a maturação tecidual e desenvolvimento pós-natal [43, 234].

É consenso que a expressão concomitante de D2 e D3 nos tecidos fetais sugere que haja um controle local extremamente agudo dos níveis de T3, o que é fundamental para o desenvolvimento fetal normal e coordenado [25, 42, 43, 189].

2.2.3.3 Receptores nucleares

Os receptores nucleares de hormônios tireoideanos (TRs) são fatores de transcrição pertencentes a uma superfamília de receptores nucleares, que abrange os receptores dos hormônios esteróides (hormônios do córtex da adrenal, sexuais e a vitamina D3), não-esteróides (retinóides e hormônio tireoideano) e receptores órfãos, cujos ligantes são desconhecidos [39, 236-238].

Todos os receptores da superfamília de receptores nucleares apresentam similaridades quanto à sua estrutura e mecanismos de ação. Estruturalmente, os receptores nucleares apresentam similaridades. Uma delas é a porção que interage com o DNA, denominada “domínio de ligação ao DNA” (DBD; *DNA-binding domain*). Essa porção do TR é a responsável por reconhecer seqüências específicas no gene alvo chamadas de elemento responsivo ao hormônio tireoideano (TER; *thyroid responsive element*) [239]. Permanecendo ligados aos TRE, os TRs podem controlar a expressão gênica independente do ligante. A segunda característica comum aos receptores nucleares é o “domínio de ligação ao ligante” (LBD; *ligand-binding domain*), que confere especificidade a um determinado ligante [239].

Existem dois genes que codificam TRs, α e β . O gene α , além de codificar a isoforma funcional TR α 1, que se liga ao DNA e ao T3, pode sofrer *splicing* alternativo resultando em duas outras isoformas, TR α 2 e TR α 3, que se ligam ao DNA, mas não ao T3, provavelmente, por não apresentar os aminoácidos finais no LBD, existentes na isoforma TR α 1 [39]. Devido a essa característica, o TR α 2 e o TR α 3 funcionam, pelo menos *in vitro*, como antagonistas da transcrição gênica mediada pelos outros TRs [2]. O gene TR α pode codificar, também, por

splicing alternativo, outras duas isoformas truncadas, o TR $\Delta\alpha$ 1 e o TR $\Delta\alpha$ 2. Essas isoformas, além de não permitirem a ligação do T3, também não se ligam ao DNA, atuando como antagonistas, cujos mecanismos ainda não foram totalmente elucidados [2, 237].

O gene TR β codifica as isoformas funcionais TR β 1, TR β 2 e TR β 3, que se ligam ao DNA e ao T3. Outra variação de TR β resultado de *splicing* alternativo é a isoforma truncada TR $\Delta\beta$ 3, que liga-se ao T3, mas não ao DNA [237].

Os TRs são expressos basicamente em todos os tecidos, embora a distribuição desses receptores seja heterogênea. O TR α 1 é altamente expresso no músculo esquelético, tecido adiposo marrom [237], tecido cardíaco [240], cerebelo [241], e tecido ósseo [8, 242]. O TR α 1 foi demonstrado em células de osteossarcoma de ratos [243], em osteoblastos de humanos [8] e em camundongos [244], em osteoclastos [245] e em condrócitos de lâmina epifisial de humanos [8] e de ratos [242]. O TR α 2 é expresso no cérebro, coração, testículos, rins, tecido adiposo marrom e músculo esquelético [246]. Assim como o TR α 1, o TR α 2 também é encontrado nos osteoblastos, osteoclastos e condrócitos [7, 8]. O TR β 1 é a isoforma mais homogeneamente distribuída, porém, é encontrada em altas concentrações no cérebro, fígado e rins [246]. Os osteoblastos, osteoclastos e condrócitos da lâmina epifisial também expressam o TR β 1. A isoforma TR β 2 é expressa quase que exclusivamente na adenohipófise [246], no hipotálamo, no hipocampo em desenvolvimento e no corpo estriado [247]. A isoforma TR β 3 possui uma distribuição homogênea pelos tecidos [22]. Considerando a variada distribuição entre as isoformas de TR e suas diferentes ações, faz-se necessário desvendar o papel funcional de cada uma delas.

2.3 Hormônios tireoideanos e o tecido ósseo

Os hormônios tireoideanos são essenciais para o desenvolvimento, maturação e metabolismo ósseos normais [248]. O excesso desses hormônios no adulto leva a um aumento da atividade de osteoblastos e de osteoclastos, com predomínio da atividade osteoclástica. Como resultado, o metabolismo ósseo é acelerado, favorecendo a reabsorção óssea, balanço negativo do cálcio e perda de massa óssea [249]. Já no hipotireoidismo, o metabolismo ósseo é reduzido e a massa óssea pode estar ligeiramente aumentada em indivíduos adultos [250].

Durante o desenvolvimento pós-natal, a deficiência dos hormônios tireoideanos causa atraso generalizado na ossificação intramembranosa e endocondral, somando-se importantes alterações na lâmina epifisial, tais como redução da sua espessura, desorganização das colunas de condrócitos, redução da diferenciação de condrócitos proliferativos em

hipertróficos e síntese anormal de matriz extracelular [13, 14, 26, 109], resultando em redução do crescimento e anormalidades esqueléticas [10, 14]. Por outro lado, o excesso de hormônios tireoideanos resulta em maturação esquelética acelerada com fechamento prematuro da lâmina epifisial, e subsequente diminuição do crescimento ósseo [10, 11]. Os hormônios tireoideanos também exercem efeitos sobre a LE que são independentes do eixo GH/IGF-1, como a organização das colunas de condrócitos proliferativos e a diferenciação dos condrócitos hipertróficos [14].

Apesar da reconhecida importância dos hormônios tireoideanos no desenvolvimento pós-natal e metabolismo ósseo adulto, seu papel no desenvolvimento esquelético fetal é menos claro. Sabe-se, entretanto, que o T3 atua no tecido ósseo de maneira direta, através da interação com os TRs e que, alterações da concentração dos hormônios tiroideanos maternos afeta a prole durante a gestação.

Modelos animais com deleção e mutação dos diferentes TRs têm sido fundamentais para estabelecer quais as funções de cada isoforma de TR durante o desenvolvimento e manutenção do osso adulto. Poucos modelos mostraram alterações ósseas notáveis durante o desenvolvimento fetal, mas é comum que as alterações se agravem e passem a ser identificadas durante o desenvolvimento pós-natal. Estes estudos são, na sua grande maioria, focalizados no desenvolvimento ósseo no período pós-natal e adulto, e apenas alguns poucos analisaram o desenvolvimento fetal, mesmo que tardio (~17E) [251, 252].

É importante relatar que alguns modelos animais mimetizam condições de hipo ou hipertireoidismo tecidual, desde o início da formação embrionária. Camundongos com a deleção do TR α 1 (TR α 1^{-/-}) ou TR β (TR β ^{-/-}) isoladamente apresentam tênues alterações ósseas, muito provavelmente devido ao *overlap* de funções. Já camundongos com deleção simultânea de TR α 1 e TR α 2 (TR α ^{-/-}) e camundongos com deleção dos receptores α e β (TR α 1^{-/-}TR β ^{-/-}; TR α ^{-/-}TR β ^{-/-}) apresentam fenótipo muito parecido com o observado em camundongos com hipotireoidismo congênito: desorganização das LEs, retardo do crescimento e da ossificação. O mesmo fenótipo é observado também em camundongos com deleção de todos os receptores α , inclusive das isoformas truncadas (TR $\Delta\alpha$ 1 e TR $\Delta\alpha$ 2). Esses camundongos com deleção completa de TR α (TR α ^{0/0}) apresentam redução do crescimento longitudinal, atraso da ossificação e conseqüente atraso da maturação óssea, mantendo níveis séricos de hormônios tireoideanos normais e níveis hipofisários normais de GH. Isso sugere que os efeitos observados se devam a falta de sinalização dos hormônios tireoideanos no esqueleto independente do eixo GH/IGF-1 [253].

Muito interessantes são os camundongos com deleção do gene Pax8, que codifica uma proteína essencial para o desenvolvimento da glândula tireóide. Esses animais apresentam agenesia da glândula e, portanto, nenhuma produção de T3 e T4. Aparentemente, esses animais têm fenótipo normal ao nascimento, mas durante o desenvolvimento pós-natal, apresentam atraso grave da ossificação, redução do comprimento dos ossos e ausência da ossificação secundária, todas características observadas em animais hipotireoideos durante o desenvolvimento pós-natal [189]. A comparação dos camundongos Pax8^{-/-} com os camundongos TRα^{0/0}β^{-/-}, que não expressam todos os TRs, revela fenótipos similares; entretanto, alguns defeitos são mais pronunciados nos camundongos Pax8^{-/-}, incluindo defeitos ósseos, tais como desorganização das lâminas epifisiais, diminuição do número de condrócitos hipertróficos, atraso na ossificação do esqueleto e atraso no crescimento [254]. Isto é interpretado como um resultado do efeito negativo de TRs não ligados pelo ligante no gene alvo do T3, os quais são denominados aporreceptores [255]. O interessante é que animais com deleção do Pax8 associada à deleção do TRβ apresentam fenótipo similar aos animais Pax8^{-/-}, enquanto animais com deleção dupla do Pax8 e TRα (Pax8^{-/-} TRα^{0/0}) apresentam reversão do fenótipo observado no animal Pax8^{-/-}, o que indica que o aporreceptor α tem efeitos deletérios sobre o desenvolvimento do esqueleto.

Camundongos com mutação inativadora do TRα1 (TRα1^{PV}), que o torna incapaz de se ligar ao T3, apresentam fenótipo ósseo de hipotireoidismo congênito. É importante notar que animais TRα^{PV} apresentam todos esses defeitos ósseos a partir de 17,5E, porém esses defeitos se agravam muito durante o desenvolvimento pós natal quando os animais apresentam fenótipo de hipotireoidismo esquelético [77]. Ao contrário dos mutantes hipotireoideos congênitos, há um animal com mutação do gene do TRβ que mimetiza o quadro de pacientes com resistência generalizada ao hormônio tireoideano [11]. Esse receptor β, denominado PV, não é capaz de se ligar ao T3. Esses camundongos TRβ^{PV} apresentam crescimento longitudinal ósseo fetal acelerado associado com ossificação intramembranosa e endocondral prematuras, levando à quiescência prematura das placas epifisárias de crescimento, o que, por sua vez, resulta em retardo no crescimento pós-natal, menor comprimento corporal, além de craniossinostose. Assim sendo, o esqueleto de camundongos TRβ^{PV} é tireotóxico e apresenta características fenotípicas típicas do hipertireoidismo juvenil [11].

Apesar da reconhecida importância dos hormônios tireoideanos no desenvolvimento, crescimento e metabolismo ósseos durante o desenvolvimento pós-natal, pouco se sabe a respeito dos efeitos destes hormônios no desenvolvimento esquelético embrionário e fetal. Não é sabido, por exemplo, quais os efeitos da redução da oferta hormonal, materna e fetal,

que mimetiza o hipotireoidismo congênito humano, sobre a morfologia dos ossos nos diferentes estágios do desenvolvimento esquelético. Além disso, outra questão que ainda requer ser elucidada é o mecanismo de ação do T3 no tecido ósseo. Neste contexto, o estudo das selenodesiodases das iodotironinas e dos transportadores de T3 e T4 no esqueleto em desenvolvimento poderá trazer contribuições importantes para um melhor entendimento deste conjunto complexo de interações moleculares como mostrado nesta revisão da literatura.

3 OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

- a- Caracterizar morfolologicamente o desenvolvimento esquelético pré e pós-natal, entre 12,5 dias embrionários (E) até 35 dias de idade pós-natal (PN), em camundongos eutireoideos¹ e hipotireoideos²;
- b- Caracterizar o padrão da expressão gênica de D1, D2 e D3 no esqueleto de camundongos durante o desenvolvimento fetal e pós-natal e investigar sua regulação pela diminuição da oferta de T3 e T4;
- c- Investigar a expressão dos transportadores das iodotironinas, MCT8, LAT1, LAT2, OATP e NTCP e sua regulação pela diminuição da oferta de hormônios tireoideanos no esqueleto de camundongos, durante o desenvolvimento fetal e pós-natal, entre 14,5E e 35PN.

- 1- Espécimes mantidos sem qualquer tratamento, utilizados como parâmetro de normalidade.
- 2- Espécimes tratados com drogas bloqueadoras da função tireoideana (metimazol e perclorato de sódio) que apresentaram redução efetiva dos níveis de T3 e T4 totais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e acasalamento

Todos os protocolos aplicados ao uso e manuseio de animais estão de acordo com os termos estabelecidos pelo Comitê de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas (autorização nº118, fls.29, livro 2).

Camundongos C57/Bl6J adultos (entre 60 e 120 dias) foram mantidos no Biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas sob ciclo claro/ escuro de 12h/12h, com acesso à água e ração *ad libitum*. As fêmeas foram separadas em pares e cada macho foi mantido em gaiola individual. As gaiolas foram intercaladas nas prateleiras (macho-fêmeas) para que as fêmeas não ficassem isoladas dos machos por muito tempo e, assim, não tivessem alterações do ciclo estral.

Inicialmente, o método utilizado para favorecer o acasalamento foi a colocação de duas fêmeas em cada gaiola onde havia um macho, por 12 horas. No dia seguinte, a avaliação da presença de rolha vaginal identificava as fêmeas que haviam copulado e esse dia foi considerado dia 0 de gestação. Todavia, esse método não se mostrou preciso na determinação da idade embrionária e fetal.

Passamos então a utilizar o procedimento adotado no Laboratório de Biologia da Reprodução & Matriz Extracelular (ICB-USP), que limita o período de acasalamento dos animais em 3 horas. A constatação do coito foi feita a partir da detecção de rolha vaginal, e este momento foi considerado a hora 0 (zero) de gestação. As horas de gestação foram convertidas em dias embrionários (E), permitindo maior precisão na determinação da idade fetal.

Algumas fêmeas prenhes foram separadas para que as ninhadas fossem utilizadas após o nascimento. Nesse caso, o acasalamento foi feito de forma controlada e a idade da prole foi estimada considerando o dia do nascimento como 1º dia pós-natal (PN).

4.2 Tratamento

O bloqueio da função tireoideana, com conseqüente redução dos níveis séricos de T3 e T4 maternos e fetais foi induzido através da administração de metimazol (MMI) e perclorato de sódio (P) [256]. As mães, fetos e prole, tratadas com esses fármacos, formaram o grupo

HIPO. Tanto o MMI quanto o P atravessam a barreira placentária, bloqueando efetivamente a glândula tireóide fetal, e também são passados para a prole através do leite materno [256].

Metimazol a 0,05% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) foi adicionado à água de beber das mães imediatamente após a detecção da rolha vaginal, entre E1 e E5. Em 6E, MMI a 0,1% e P a 1% (Merck, Darmstadt, Alemanha) (MMI+P) foram adicionados à água de beber das mães e sua administração foi mantida até a data da coleta dos fetos nos estágios 12,5E, 14,5E, 16,5E e 18,5E ou das ninhadas. A redução mais severa dos níveis de T3 e T4 foi induzida após 6E porque o hipotireoidismo materno diminui a implantação embrionária, que em camundongos, ocorre em 5E. Os animais destinados à análise pós-natal foram mantidos com as mães até a data da coleta, realizada em 2PN, 4PN, 7PN, 14PN, 21PN e 35PN. Mesmo após a fase de amamentação (25PN), a prole foi mantida com a mãe e ambos recebiam as drogas bloqueadoras da função tireoideana (MMI+P) através da água. É importante informar que tanto o metimazol quanto o perclorato de sódio atravessam a barreira placentária, bloqueando efetivamente a glândula tireóide fetal, e também são passados para a prole através do leite materno [256].

Os animais do grupo EUT foram acasalados e mantidos sem qualquer tratamento até a data da coleta dos espécimes, durante o período fetal e pós-natal.

Os animais 4PN, 14PN e 35PN foram também tratados com 20 vezes a dose fisiológica de T3 (0,35 µg/100g) a partir de 1PN. O hormônio foi administrado diariamente através de injeção subcutânea. Essa via de administração não é comumente usada para o tratamento com T3, mas o tamanho reduzido dos filhotes impossibilitou a administração pela via intraperitoneal. As doses foram calculadas de acordo com o peso de cada animal e foram corrigidas com intervalo de dois dias.

4.3 Coleta de amostras

As fêmeas prenhes EUT e HIPO foram sacrificadas em câmara de CO₂ e em seguida foram submetidas à laparotomia para a retirada dos fetos de 12.5E, 14.5E, 16.5E e 18.5E.

As mães tiveram o sangue coletado diretamente do coração após a morte. Os fetos foram retirados do útero materno e colocados imediatamente em placa fria ou em papel filtro sobre a placa fria, onde foram dissecados. Todos os fetos tiveram a pele e as vísceras retiradas. Alguns espécimes tiveram sua massa corporal mensurada em balança analítica e foram medidos imediatamente após a coleta. A medição do comprimento longitudinal dos fetos e de seus segmentos (tíbia, fêmur e úmero) foi feita com o auxílio de um paquímetro

digital (Vonder, 0-150mm). A avaliação do comprimento dos segmentos foi feita em um número elevado de amostras (13-15), por estudo cego, onde o avaliador não sabia qual a idade de cada espécime ou o grupo experimental ao qual pertencia.

Os animais com 2 dias de vida pós-natal (PN), 4PN, 7PN, 14PN, 21PN e 35PN foram sacrificados em CO₂ e tiveram o sangue coletado diretamente do coração. A massa corporal e o comprimento longitudinal foram aferidos logo após a morte. Os fêmures, tíbias, cérebro, coração e fígado foram retirados de acordo com o ensaio ao qual eram destinados.

4.4 Determinação da concentração de T4 e T3 no soro e em homogeneizados de fetos de camundongos

A concentração de T4 e T3 totais foi aferida no soro materno, no soro dos filhotes e em homogeneizados de fetos por radioimunoensaio (RIE). Para tanto, foram utilizados *kits* comerciais para humanos RIA-gnost T3 e T4 (Cis bio Internacional – Schering, Paris, França). Como esses *kits* são desenhados para utilização em humanos, foi necessário fazer curvas-padrão de T4 e T3, de acordo com os níveis hormonais da espécie a ser estudada, para que os níveis hormonais dos camundongos pudessem ser estimados corretamente (Fig. 4). Este método de RIE vem sendo largamente utilizado por nosso grupo e por outros, e tem demonstrado acurácia nos resultados [14, 257, 258].

Figura 4: Gráficos das curvas-padrão de (A) T3 e (B) T4 utilizadas para a aferição das concentrações hormonais totais no soro das mães e nos tecidos dos fetos.

4.4.1 Aferição dos níveis séricos de T3 e T4 nos camundongos prenhes e nos filhotes

Os camundongos prenhes tiveram os fetos coletados através de laparotomia e o sangue puncionado diretamente do átrio direito com o auxílio de uma seringa. O sangue materno foi então mantido a 37 °C por 30 minutos e centrifugado a 3000 rpm em temperatura ambiente (TA), por 10 minutos para a obtenção do soro. O soro materno foi isolado e imediatamente congelado.

Os filhotes com 2PN, 4PN, 7PN, 14PN, 21PN e 35PN foram igualmente sacrificados em câmara de CO₂ e tiveram seu sangue puncionado diretamente do átrio direito. O sangue foi processado conforme descrito anteriormente. Por ter sido obtido um volume insuficiente de soro em 2PN e 4PN, o soro dos animais dessas idades foi agrupado em um *pool* de 4-8 animais. O soro foi imediatamente congelado.

Quando da realização do RIE, o soro foi descongelado e utilizado de acordo com as instruções do fabricante dos kits utilizados. Os resultados foram expressos em nanograma de T3 e T4 por mililitro de soro (ng/ml).

4.4.2 Preparação dos homogeneizados de fetos para aferição das concentrações fetais totais de T3 e T4

Quando da coleta dos fetos, inicialmente, parte do grupo era decapitada e tinha o sangue coletado. Contudo, este método não se mostrou eficiente por ser necessário um excessivo número de fetos para que fosse obtido um volume adequado de soro a ser utilizado no RIE. Assim que este viés foi notado, optamos por medir a concentração total de T3 e T4 em homogeneizados de fetos, seguindo protocolos utilizados em trabalhos muito elegantes desenvolvidos na década de 80 pelo grupo da Dra. Gabriela Morreale de Escobar [118]. Foram necessárias algumas modificações para que o protocolo se tornasse adequado às nossas condições de estudo. Estas alterações nos permitiram padronizar um protocolo específico para aferição dos níveis de T3 e T4 em homogeneizados de fetos e, também, em segmentos ósseos de camundongos adultos, como descrito a seguir.

Os fetos congelados foram macerados com o auxílio de um mortar e de um pistilo de metal (Fisher Scientific International, Inc, Hampton, EUA) mantidos em gelo seco. O "pó" dos fetos macerados foi transferido para tubos de microcentrífuga previamente pesados (peso 1) e resfriados. Tubo + pó foram pesados novamente (peso 2) e a diferença entre o peso 2 e o peso 1 foi utilizada como peso fetal real. A cada amostra foi adicionada solução salina com 1

mM de propiltiouracil (PTU), num volume duas vezes maior que o peso obtido anteriormente (peso2-peso1) [118]. O PTU foi adicionado para evitar que houvesse geração tecidual de T3 por desidratação (artefato). Após serem homogeneizadas e mantidas a 4 °C por 15 min, as amostras foram centrifugadas (30 min, 2000 rpm, 4 °C) e o sobrenadante foi reservado. O procedimento foi repetido duas vezes. Em seguida, o sobrenadante contendo o extrato dos tecidos fetais foi concentrado com o auxílio de um equipamento de concentração de amostras (Vacofuge™ Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburg, Alemanha). As amostras foram processadas por diferentes intervalos de tempo, a 45 °C, até que as amostras estivessem completamente secas. Estas foram então ressuspensas em 80 µl (12,5E e 14,5E), 130 µl (14,5E) e 200 µl (16,5E e 18,5E) em solução salina com PTU (1 mM) e mantidas a -20 °C.

O produto final foi submetido ao RIE, conforme as instruções do fabricante. Os valores obtidos foram corrigidos pelo peso real dos fetos e os resultados foram expressos em nanogramas de T3 e T4 por grama de peso fetal (ng/g).

4.5 Avaliação morfológica

Dois diferentes protocolos foram utilizados para a avaliação morfológica das amostras.

4.5.1 Protocolo para avaliação histológica

Fetos, membros posteriores dos fetos e membros posteriores dos animais PN foram coletados, lavados em PBS e fixados em formalina 10% por 24- 72 horas. Fetos destinados à análise morfológica das vértebras foram seccionados sagitalmente antes de serem fixados em formalina 10% e processados apropriadamente. Para a avaliação dos fêmures fetais e PN, os membros posteriores foram isolados, aderidos ao papel filtro, e imersos na solução fixadora. Os ossos e caracas de fetos de 18,5E e membros posteriores dos animais PN foram descalcificados em solução de ácido acético 10% e formalina 10% em temperatura ambiente e em agitação por tempo variado. Após a descalcificação, os ossos foram lavados em água corrente por 16 horas (*overnight*) e desidratados lentamente em bateria crescente de álcoois (álcool 50%, 2 vezes por 30 min a 4 °C; álcool 70%, 2 vezes por 30 min a 4 °C; álcool 95%, 3 vezes por 30 min TA e álcool 100%, 4 vezes por 30 min TA), diafanizados em xilol (xilol I, 15 min; xilol II, 15 min e xilol III, 15 min) e embebidos em Paraplast (Fischer, Pittsburg, PA) a 60 °C (I, 30 min; II, 30 min e III, 30 min). Após serem incluídos em Paraplast, os blocos permaneceram estocados a 4 °C.

Os blocos foram seccionados (5 μ m e 10 μ m), aderidos a lâminas de vidro recobertas por Poly-L-lisine (Sigma) e em seguida foram mantidos a 60 °C por 30 minutos. Foram, então, processados rotineiramente para retirada da parafina e hidratação. Os cortes foram lavados com solução de ácido acético 3% por 2 min e imediatamente imersos na solução de azul de alcian (AA) 1% (em água destilada). Esta solução tem pH 2.5 para que sejam marcados especificamente os glicosaminoglicanos sulfatados, abundantes na matriz extracelular cartilaginosa. Após 20 min, os cortes foram lavados novamente com solução de ácido acético 3% e, em seguida, com água destilada por 5 minutos. Os núcleos celulares foram corados com hematoxilina, e a floxina foi utilizada como contra-coloração. Os cortes foram lavados em álcool 95% para retirada do excesso de floxina e, em seguida, foram desidratados, diafanizados e recobertos por lamínula. As amostras foram analisadas em um microscópio de luz e submetidas a análises morfométricas.

4.5.2 Protocolo para avaliação da ossificação em preparados totais (*whole mount*; WM)

Os espécimes com idade entre 4PN e 35PN tiveram toda a pele, vísceras e músculos removidos com cautela para que nenhum segmento ósseo sofresse qualquer lesão. A calota craniana foi parcialmente removida para que o cérebro e cerebelo fossem removidos. Em seguida, foram fixados em álcool 95% e corados com azul de alcian e vermelho de alizarina (2%; pH 4.2). Os espécimes foram lavados em álcool 95% e diafanizados em KOH (1%). Os fetos e animais de 2PN tiveram a pele, vísceras e alguns músculos removidos, mas a maior parte dos músculos foi deixada para que não se soltassem os segmentos ósseos durante a diafanização. As preparações foram mantidas em glicerol, onde foram fotografadas com o auxílio de um microscópio estereoscópico.

Antes da dissecação, o comprimento longitudinal, a massa corporal e o comprimento dos fêmures, tíbias e úmeros dos espécimes de ambos os grupos foram aferidos.

4.6 Análise Morfométrica

A análise morfométrica dos fetos de 14,5E, 16,5E e 18,5E foi realizada nos fêmures, uma vez que esse segmento é bastante sensível aos hormônios tiroideanos [14, 47, 259, 260]. As imagens das amostras foram capturadas com o auxílio de um microscópio Eclipse E-600 (Nikon, Dusseldorf, Alemanha) utilizando-se objetivas de 4x, 10x e 20x e mensuradas através do programa Image-pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Foram aferidos

os seguintes parâmetros: área, comprimento e número de colunas de condrócitos proliferativos da zona proliferativa, área, comprimento e número de condrócitos hipertróficos da zona hipertrófica.

4.7 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR)

Para a análise da expressão gênica os fêmures foram cuidadosamente dissecados com o auxílio de um microscópio estereoscópico, sobre placa fria, para que o tecido muscular fosse retirado sem causar danos ao osso fetal e PN e para que o RNA fosse preservado. Após a coleta, as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e mantido a -80 °C.

Às amostras fetais congeladas, adionou-se Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) (500 µl) e os ossos foram triturados dentro de tubos para microcentrifuga com o auxílio de um pistilo plástico adaptado a uma furadeira comum. O RNA total dos fêmures direitos dos espécimes de cada grupo experimental foi extraído e tratado com DNase I (Fermentas, Hanover, MD, USA), segundo a indicação do fabricante. O DNA complementar (DNAc) foi sintetizado a partir do RNA total extraído (1,0 µg), utilizando transcriptase reversa *ReverAid-H-Minus M-MuLV Reverse Transcriptase* (Fermentas, Hanover, MD, USA). O DNAc transcrito foi utilizado para a avaliação da expressão do RNA mensageiro dos seguintes genes por PCR em tempo real: 18srRNA (18S) e da ciclofilina-A (Cyclo-A), usados como controle interno; D1, D2 e D3 (Dio1, Dio2 e Dio3, respectivamente), VDU-1, WSB-1, colágeno tipo I, II e X (Col1, Col2 e Col10, respectivamente), osteocalcina (OC), TRα1, TRβ1, MCT8, LAT1, LAT2, OATP e NCTP. As seqüências dos *primers* utilizados são apresentadas na Tabela 1.

O valor relativo à amplificação do RNA mensageiro (RNAm) referente a cada gene estudado foi avaliado através da mensuração da fluorescência, quantificada por um termociclador e detector ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), comparando todas as amostras e o controle em duplicatas. As reações foram preparadas com diferentes volumes de *primers* e DNAc, dependendo do gene avaliado, sempre somando 25 µl. A quantificação relativa da expressão gênica foi expressa como indução em vezes e determinada pelo método do $\Delta\Delta C_t$, como previamente descrito por Livak (1997) [261].

Para a comparação da expressão relativa do RNAm do TRα1 vs. TRβ1 e D1 vs. D2 e D3 nos fêmures dos fetos também foi utilizado o método do $\Delta\Delta C_t$. A quantificação relativa do TRα1, D2 e D3 foi determinada designando-se a expressão do TRβ1 e D1 como 1 (um), ou

seja, a expressão do TR β 1 e D1 foi utilizada como a amostra calibradora. Para estes estudos, foi necessário determinar a eficiência das amplificações, uma vez que as comparações foram feitas entre genes distintos. Para cada gene, foram realizadas amplificações utilizando-se 5, 10, 20, 40, 80 e 160 ng de DNAc como *template*. A quantidade de DNAc, em escala logarítmica, foi plotada *vs.* Ct (*threshold cycle*). As regressões lineares entre esses dois parâmetros foram então determinadas e os *slopes* (inclinação das retas) das regressões foram calculados e comparados. De acordo com Liu e Saint [262], os *slopes* (Ct *vs.* *template*) são considerados parâmetros de eficiência das reações, ou seja, *slopes* iguais indicam que a eficiência de amplificação é a mesma. Não houve diferença entre os *slopes* de TR α e TR β , assim como também não houve diferença entre os *slopes* das três desidases.

As condições das reações foram as seguintes: 50 °C por 2 min e 95 °C por 10 min, seguidos por 40 ciclos de 95 °C por 15 seg e 60 °C por 1 minuto. Ou ainda, 50 °C por 2 min e 95 °C por 10 min, seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 30 seg, 58 °C por 30 seg e 72 °C por 45 seg. Os valores de Ct obtidos foram normalizados com o controle interno e os resultados foram expressos em “vezes de indução” (*fold-induction*).

Tabela 1: sequência dos *primers* para PCR em tempo real.

<i>Gene</i>	<i>Forward primer</i>	<i>Reverse primer</i>	<i>Gene bank #</i>
18S	GTAACCCGTTGAACCCCAT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG	M11188
CycloA	GCCGATGACGAGCCCTTG	TGCCGCCAGTGCCATTATG	NM008907.1
Dio1	CCACCTTCTTCAGCATCC	AGTCATCTACGAGTCTCTTG	NM007860
Dio2	TTCTCCAACGCTCTTCCTG	CCCATCAGCGGTCTTCTCC	NM010050
Dio3	CGCTCTCTGCTGCTTCAC	CTCCTCGCCTTCACTGTTG	NM172119
VDU-1	CCCGACTGTTCTATGCTGTGTTG	CTCCATCAGAAGGTCTCCATTGTG	NM019653
WSB-1	AATTCCTTCGCTGTCTAATGG	GCTGATAACCGTGGAATAAC	AF383174
Col2a1	GGTGGCTTCCACTTCAGCTATG	GATGTTCTGGGAGCCCTCAGT	NM031163.2
Col10a1	CCTTTCTGCTGCTAATGTTCTTGA	GCGTATGGGATGAAGTATTGTGTCT	NM009925.3
Col1a1	GCGAAGGCAACAGTCGCT	CTTGGTGGTTTTGTATTGATGAC	NM007742
OC	CTCACAGATGCCAAGCCCA	CCAAGGTAGCGCCGGAGTCT	U11542
TR α 1	GCTGTGCTGCTAATGTCAACAGA	GCCTCCTGACTCTTCTCGATCTT	NM178060
TR β 1	AAGCCACAGGGTACCACTATCG	GGAGACTTTTCTGAATGGTTCTTCTAA	NM009380
MCT8	CCCTGGACTTAAGAAGATATACTTGCA	CCCGAAGTCCCGGCATA	NM020516
LAT1	CTACTTCTTTGGTGTCTGGTGAA	GAGGTACCACCTGCATCAACTTC	NM014387
LAT2	GACATCGGCTCGTTGCT	TGTAAGGATCCACAAGTCCTCAGT	NM01014987
OATP	GTGAAGACAATGCTGCTTTCTACATC	GCCCCAAAAGGAAGCCAAAA	NM013797
NCTP	TTCCTGATGGGCTACATTCTCTCT	GAATCCTGTTTCCATGCTGATG	NM011387

4.8 Determinação da atividade de D2 e D3

A atividade de D2 e D3 foi mensurada na tíbia e fêmur dos fetos de camundongos com 18,5E. Os fêmures e tíbias foram dissecados ainda congelados (n=6), macerados com o auxílio de um mortar e de um pistilo de metal (Fisher) mantidos em gelo seco. O pó foi ressuspensionado e sonificado em 100 µl de tampão PE (0,1 fosfato de potássio, 1 mM EDTA) contendo 0,25% de sucrose e 10 mM de ditioneitol (DTT). Assim como descrito por Christoffolete *et al.* [263] e Steinsapir *et al.* [264], com algumas pequenas modificações. Para o ensaio da atividade de D2 foram utilizados 15 µg de proteína extraída dos ossos fetais e 300 µl de PE suplementado com 100.000 contagens de T4-I¹²⁵ (2 nM); 0,1 nM ou 100 nM de T4 e 20 mM de DTT. Essas concentrações são não-saturante e saturante da atividade de D2, respectivamente. A utilização das duas concentrações, em ensaios paralelos, permite que a atividade de D2 seja avaliada. Considerando que 100 nM é uma dose saturante da atividade de D2, entendemos que o produto dessa desiodação não é fruto da atividade da D2, mas sim de outra 5'-desiodase, a D1, que tem sua ação otimizada nessa ordem de grandeza. Já a concentração de 0,1 nM é ideal para a aferição da atividade de D2, que tem sua ação otimizada quando exposta a essa concentração de substrato. De acordo com Christoffolete *et al.* [263], a conversão específica de T4 a T3 pela D2 é calculada através da subtração das contagens obtidas com a desiodação da concentração saturante (100 nM), das contagens obtidas com a desiodação da concentração não saturante (0,1 nM).

O ensaio foi realizado a 37 °C, por 16 horas. A reação foi interrompida com a adição de soro fetal bovino (200 µl) (Invitrogen) e ácido tricloroacético 50% (100 µl). Após centrifugação (13.000 rpm, 5 min.), o sobrenadante foi coletado e levado ao contador-γ (Cobra II; Packard, Meriden CT), onde foi feita a leitura da radioatividade. Ao soro fetal bovino liga-se todo o T4 livre não convertido pela D2. O ácido tricloroacético promove a precipitação das proteínas, permitindo que o iodo livre, produto da desiodação seja aferido no sobrenadante. A atividade de D2 foi expressa em fentomoles de T3 gerados através da desiodação por D2 por hora, por miligrama de proteína (fmol/h*mg proteína) [43, 124].

A desiodação de T3-I¹²⁵ por D3 foi avaliada utilizando 4 µg de proteína do osso fetal, na presença de 0,1 nM de T3 não marcado, 10 mM de PTU e 100 nM de DTT por 24h a 37 °C. Após este período, as amostras foram colocadas em gelo e a reação foi interrompida com a adição de metanol (4 °C). As amostras foram centrifugadas (13.000 rpm, 5min.) parte do sobrenadante foi adicionados ao *HPLC- MIX* (0,02 M acetato de amônio pH 4; PE 50% e

metanol 50%). As amostras foram analisadas por HPLC (HPLC Waters 1525, Waters Corporation, MA, EUA) para detecção dos produtos da desiodação de T3 [265]. Os resultados foram expressos em fentomoles de T3 desiodado por hora, por miligrama de proteína (fmol/h*mg proteína).

4.9 Análise estatística

A significância estatística da diferença entre os valores médios dos grupos foi testada pelo teste-t de Student (*Student t-test*) ou pela análise de variância (ANOVA). Este último foi sempre seguido pelo teste de comparação múltipla Student-Newman-Keuls. Para a realização dos testes estatísticos e construção dos gráficos foi utilizado o software Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Os dados foram considerados diferentes quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Concentração de T3 e T4 no soro e nos homogeneizados de fetos

5.1.1 Níveis maternos de T3 e T4

Os resultados referentes à avaliação da concentração total de T3 e T4 em diferentes idades gestacionais no soro de mães pertencentes aos grupos EUT ou HIPO estão ilustrados na Fig. 5A e 5B.

Os níveis séricos de T3 e T4 mantiveram-se praticamente inalterados durante a gestação dos camundongos do grupo controle (eutireoideo; EUT), e foram utilizados como parâmetro de normalidade para a avaliação dos outros grupos. Neste grupo, os valores de T3 e T4 obtidos foram $0,282 \pm 0,015$ ng/ml e $16,5 \pm 1,8$ ng/ml, respectivamente. Todos os espécimes pertencentes grupo tratado com metimazol e perclorato de sódio (HIPO) apresentaram níveis significativamente mais baixos de T3 e T4 em todas as idades gestacionais avaliadas, quando comparadas ao grupo EUT, confirmando o acerto do protocolo experimental (Fig. 5A e 5B).

Em decorrência do tratamento, em 12,5E e 14,5E, os níveis de T4 e T3 foram significativamente diminuídos. Constatou-se uma redução de 60,7% e 64,4% ($p < 0,01$ vs. EUT) dos níveis de T4, e de 92,2% e 91,3% ($p < 0,01$ vs. EUT) dos níveis de T3, respectivamente. Em 16,5E, houve um aumento de 1,6 vezes (vs. 14,5 EUT) na concentração de T4 plasmático em mães EUT. O mesmo comportamento foi observado no grupo HIPO, no qual o T4 total foi aumentado 4,5 vezes em comparação aos valores obtidos em 14,5E. Porém, apesar do aumento, a concentração de T4 no grupo HIPO permaneceu 68% menor do que no grupo EUT ($p < 0,01$) (Fig. 5A). Ainda em 16,5E, observou-se que os níveis de T3 foram reduzidos 73% no grupo HIPO, em comparação ao EUT ($p < 0,01$) (Fig. 5B).

Após 18,5 dias de bloqueio parcial da glândula tireóide, os níveis séricos de T3 e T4 foram significativamente reduzidos em 90% e 88,6%, respectivamente, em mães HIPO ($p < 0,001$ vs. EUT).

5.1.2 Concentração de T3 e T4 nos homogeneizados dos fetos de camundongos

As concentrações de T3 e T4 nos homogeneizados dos fetos de camundongos estão representadas na Fig. 5C e 5D.

As concentrações de T4 e T3 totais foram indetectáveis em fetos de 12,5E de ambos os grupos, e em fetos de 14,5E do grupo HIPO (Fig. 5C e 1D). Os níveis de T3 e T4 foram significativamente maiores em fetos de 14,5E do grupo EUT, em comparação com o grupo HIPO ($p<0,05$ e $p<0,001$). Com 16,5E, após o início da função tireoideana fetal, os níveis de T3 e T4 aumentaram 4x (vs. 14,5E) no grupo EUT. No grupo HIPO, fetos da mesma idade apresentaram níveis detectáveis, mas significativamente menores de T3 e T4 do que os observados no grupo EUT ($p<0,05$ e $p<0,01$, respectivamente). Fetos de 18,5E do grupo EUT tiveram o nível de T4 aumentado, enquanto o T3 foi diminuído, quando comparados aos níveis aferidos na idade anterior. O mesmo padrão foi observado no grupo HIPO. Contudo, a concentração de T4 e T3 foi reduzida em 40% e 62,7% ($p<0,05$) nos fetos HIPO, respectivamente, em relação aos fetos EUT de 18,5E (Fig. 5C e 5D).

5.1.3 Níveis séricos de T3 e T4 durante o desenvolvimento pós-natal

Como mostra a Fig. 5E e 1F, o grupo HIPO apresentou níveis séricos de T4 significativamente diminuídos entre 4PN e 35PN, enquanto foram encontrados níveis indetectáveis de T3 em todas as idades avaliadas (2, 4, 7, 14, 21 e 35 dias de vida pós-natal), com exceção de 2PN. Ainda em 2PN, não houve diferença entre os níveis séricos de T3 e T4 entre o grupo EUT e HIPO.

Os níveis séricos de T4 aumentaram significativamente em função da idade no grupo EUT, mas mantiveram-se constantes no grupo HIPO (Fig. 5E). Nos animais EUT, observa-se um pico dos níveis de T4 por volta de 14PN, e uma estabilização desses níveis entre 21PN e 35PN. Com relação ao T3, houve apenas uma tendência ao aumento dos seus níveis séricos em função da idade entre 2PN e 35PN (Fig. 5F).

Figura 5: Concentração de T4 e T3 totais no soro materno, no soro dos filhotes (de 2PN até 35PN) e no homogenato de tecidos fetais (de 12,5E até 18,5E). **(A e B)** Níveis séricos maternos de T4 e T3, respectivamente. **(C e D)** Níveis de T4 e T3 totais encontrados nos tecidos fetais em diferentes idades. **(E e F)** Concentração de T4 e T3 total no soro de filhotes com diferentes idades. EUT: grupo controle ; HIPO: grupo hipotireoide. Os valores representam a média $\pm$ SEM (n= 4-12). *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001 vs. EUT, por teste-t de Student.

5.2. Parâmetros reprodutivos

As mães HIPO tiveram a gestação mais longa, de aproximadamente 1 dia a mais e ,um número menor de filhotes por ninhada (5 a 8 filhotes das mães HIPO vs. 8 a 12 filhotes das mães EUT).

5.3 Comprimento e massa corporal

Durante o desenvolvimento pós-natal, sabe-se que a redução dos níveis dos hormônios tireoideanos induz atraso na ossificação e no crescimento. Para avaliar se o mesmo efeito ocorria no nosso modelo experimental de hipotireoidismo, avaliamos o comprimento longitudinal (distância entre a cabeça e o início da cauda dos fetos e filhotes em desenvolvimento pós-natal), massa corporal, bem como o comprimento do úmero, fêmur e tíbia.

Nossas aferições mostraram um aumento significativo do comprimento corporal dos fetos entre 12,5E e 18,5E em ambos os grupos. Porém, fetos pertencentes ao grupo HIPO são significativamente menores (6-13%) e têm menor massa corpórea (9-26%) que os fetos do grupo EUT de mesma idade (Fig. 6A e 6B, respectivamente). Após o nascimento, especialmente entre 7PN e 35PN, o crescimento e ganho de peso foram maiores no grupo EUT do que no grupo HIPO.

As medidas do comprimento do úmero, fêmur e tíbia mostraram que em 14,5E e 16,5E não há diferença entre o comprimento dos segmentos entre os grupos EUT e HIPO (Fig. 6C, 6D e 6E). Entretanto, a partir de 18,5E, as diferenças entre os grupos EUT e HIPO foram detectadas. Interessantemente, essas diferenças foram mais acentuadas após o nascimento. O grupo HIPO apresentou uma redução do comprimento dos segmentos entre 6 e 16% em 2PN e 25 a 30% em 35PN (Fig. 6C, 6D e 6E). Esse resultado indica que o atraso do crescimento causado pela diminuição da oferta dos hormônios tireoideanos ocorre quase que exclusivamente durante o período pós-natal.

Figura 6: Efeito do hipotireoidismo sobre o crescimento e o ganho de massa corporal durante o desenvolvimento fetal e pós-natal. (A) Comprimento longitudinal, (B) massa corporal (C, D e E) o comprimento do úmero, fêmur e tibia, respectivamente, foram avaliados em espécimes de 12,5E até 35PN. Os resultados foram expressos como a média $\pm$ SEM de 13-15 amostras. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs. EUT, por teste-t de Student.

5.4 Análise do processo de ossificação endocondral e intramembranosa

Após verificarmos que a indução do hipotireoidismo tinha sido efetiva, mas que os segmentos ósseos fetais não apresentavam diferença de comprimento entre os grupos, decidimos observar o desenvolvimento da ossificação primária. Como exposto na Revisão da Literatura (item 2), a ossificação é um processo controlado pelo hormônio tireoideano durante o desenvolvimento pós-natal e, no adulto, é responsável pela manutenção da massa óssea. Sabe-se ainda que a redução dos níveis hormonais afeta negativamente o desenvolvimento da ossificação durante o desenvolvimento pós-natal.

A análise dos preparados totais de fetos de 12,5E demonstrou que, nessa idade, ainda não havia sítios corados com vermelho de alizarina, que identifica depósitos de cálcio, mas apenas sítios que reagiram com azul de alcian, um marcador de moléculas aniônicas como os proteoglicanos, que caracterizam a matriz do tecido cartilaginoso. Diante destas observações, dedicamos maior atenção ao estudo da ossificação de fetos de 14,5E, 16,5E e 18,5E, que já apresentavam sítios de ossificação em desenvolvimento em diferentes pontos do esqueleto.

Surpreendentemente, não foi observado qualquer atraso na ossificação do esqueleto dos espécimes do grupo HIPO em comparação ao EUT em todas as idades fetais (Fig 7). Também não houve diferença entre a região da ossificação ou entre a extensão da ossificação primária observada em diferentes sítios do esqueleto de fetos de ambos os grupos, EUT e HIPO.

A análise das patas posteriores mostrou resultados similares àqueles obtidos em outros sítios do esqueleto (Fig. 8). Fetos de 14,5E, de ambos os grupos, apresentam ossificação em estágio inicial na região média do osso femoral, enquanto fetos de 16,5E e 18,5E apresentam ossificação avançada do osso ilíaco, fêmur, tíbia, fibula e metatarsos, aparentemente igual entre os grupos (Fig. 8).

A análise da ossificação intramembranosa demonstrou haver um pequeno atraso no fechamento dos fontículos anterior e posterior e atraso da ossificação da sutura escamosa e sagital nos animais HIPO de 18,5E (Fig. 9B), mas não em 16,5E (Fig. 9A).

Figura 7: Fetos inteiros (WM) submetidos à reação com azul de alcian e vermelho de alizarina para a análise da ossificação endocondral. Fetos de 14,5E, 16,5E e 18,5E. E: dias embrionários; EUT: grupo controle; HIPO: grupo hipotireoideo.

Figura 8: Análise da ossificação endocondral das patas posteriores de fetos de 14,5E, 16,5E e 18,5E. Fetos obtidos de mães tratadas com metimazol e perclorato de sódio durante a gestação (HIPO) e de mães não tratadas (EUT). F: fêmur; T: tíbia; I: ilíaco; f: fíbula; M: metatarso.

Figura 9: Ossificação intramembranosa durante o desenvolvimento fetal e pós-natal. Análise da ossificação intramembranosa do crânio de espécimes corados com azul de alcian e vermelho de alizarina. **(A)** Vista lateral do crânio de fetos de 16,5E (1,2x de aumento). **(B)** Vista lateral e superior do crânio de fetos de 18,5E (1,2x de aumento). **(C)** Vista lateral e superior de filhotes de 14PN (0,8x de aumento). **(D)** Diagrama da anatomia dos ossos, suturas e fontículos do crânio durante o desenvolvimento. EUT: animais controle; HIPO: animais tratados com bloqueadores da função tireoideana; E: dias embrionários; PN: dias de idade pós-natal; FM: fontículo mastóideo; Es: sutura escamosa; seta: atraso do fechamento das suturas; asterisco: atraso do fechamento dos fontículos.

As discretas alterações encontradas nos fetos submetidos à restrição da oferta dos hormônios tireoideanos levantaram dúvidas sobre a efetividade do hipotireoidismo induzido com o tratamento com MMI e P, uma vez que se esperava observar as alterações já descritas nas idades pós-natais. Por conta disso, passamos a estudar o desenvolvimento pós-natal dos espécimes induzidos ao hipotireoidismo desde o início da gestação, para avaliarmos se os efeitos do tratamento utilizado mimetizariam os efeitos do hipotireoidismo congênito sobre o esqueleto.

A análise dos animais de 2PN e 4PN em preparados totais, não evidenciou nenhuma diferença significativa entre os animais EUT e HIPO (Fig. 10 e 11). Conforme o desenvolvimento PN transcorre, maiores são as alterações morfológicas causadas pela redução da oferta hormonal ao esqueleto.

Os animais de 7PN do grupo EUT, além de terem seu comprimento longitudinal nitidamente maior que o dos animais do grupo HIPO (Fig. 10), apresentam ossificação bem desenvolvida da coluna vertebral, onde já se observa a fusão do corpo vertebral com o pedículo e lâmina do arco vertebral, o que não é observado no grupo HIPO (Fig. 11A). No fêmur, observa-se uma pequena diferença no comprimento do segmento ósseo no grupo HIPO quando comparado ao grupo EUT, mostrando o atraso do crescimento causado pelo hipotireoidismo (Fig. 11B).

Em camundongos de 14PN, observa-se não apenas a redução do comprimento longitudinal dos animais do grupo HIPO, mas também o atraso na ossificação da coluna vertebral, evidenciado pela ausência dos processos espinhosos, observados nos animais do grupo EUT (Fig. 10 e 11A). O grupo HIPO, em 14PN, apresenta ossificação da coluna vertebral no mesmo estágio de desenvolvimento em que se encontra a coluna vertebral dos animais com 7PN do grupo EUT, evidenciando um claro atraso no desenvolvimento esquelético do grupo HIPO (Fig. 11A). Entre 7PN e 14PN ocorre o início do desenvolvimento da ossificação secundária do fêmur, localizada na porção distal da epífise femoral, adjacente à LE. A partir de 14PN os efeitos deletérios da diminuição da oferta de T3 se refletem na ausência da ossificação secundária na epífise distal do fêmur (Fig. 11B). A diminuição da oferta hormonal impediu o desenvolvimento da ossificação secundária, não sendo esta observada de 14PN até 35PN no grupo HIPO, enquanto o grupo EUT teve seu desenvolvimento normal, observando-se, ao final de 35PN, a ossificação secundária plenamente desenvolvida (Fig. 11B).

Os efeitos deletérios causados pela redução da oferta dos hormônios tireoideanos ao desenvolvimento esquelético descritos em 14PN foram os mesmos observados nos espécimes de 21PN e 35PN que também foram submetidos à restrição hormonal. Porém, com o avançar do desenvolvimento, os efeitos deletérios promovidos pela redução da ofertas das iodotironinas foram mais graves e evidentes (Fig. 10 e 11).

Figura 10: Esqueleto de camundongos entre 2PN e 35PN. Os camundongos foram submetidos à reação com azul de alcian e vermelho de alizarina para a análise da ossificação endocondral durante seu desenvolvimento pós-natal. EUT: grupo controle; HIPO: grupo tratado com bloqueadores da função tireoideana desde a gestação até o dia da coleta; PN: dias de idade pós-natal.

Figura 11: Ossificação endocondral das vértebras (A) e fêmur (B) durante o desenvolvimento pós-natal. Os espécimes foram corados com azul de alcian e vermelho de alizarina. EUT: grupo controle; HIPO: grupo tratado com bloqueadores da função tireoideana desde a gestação até o dia da coleta; PN: dias de idade pós-natal; seta: atraso do (A) desenvolvimento do arco vertebral e (B) da ossificação secundária do fêmur; a barra equivale a 1mm.

Como esperado, o hipotireoidismo induziu um atraso significativo das ossificações intramembranosa e endocondral durante o desenvolvimento pós-natal (Fig. 9C, 10 e 11). Observamos também que as alterações causadas pela redução da oferta dos hormônios tireoideanos se tornaram mais graves com o decorrer do desenvolvimento pós-natal. Esse fato é claramente demonstrado pela observação de que em 2PN e 4PN, primeiros dias após o nascimento, não são detectadas diferenças evidentes entre os grupos. Porém, com o decorrer do desenvolvimento e manutenção do hipotireoidismo, passaram a ser observadas graves alterações morfológicas, como a ausência da ossificação secundária.

A observação dos fetos em preparação total certamente ofereceu informações de interesse, mas não suficientemente conclusivas sobre a ação dos hormônios tireoideanos no sobre a ossificação endocondral durante o desenvolvimento fetal. Para isto, é necessária a utilização da análise histológica, mais minuciosa e detalhada, como ferramenta. Todavia, a análise dos preparados totais permitiu observar que houve atraso na ossificação intramembranosa a partir de 18,5E até idades PN, mas não nos estágios entre 14,5E e 16,5E.

5.5 Análise histológica e morfométrica

A análise histológica da coluna e dos membros posteriores dos fetos de 12,5E não revelou qualquer diferença notável entre os grupos EUT e HIPO. A região vertebral de fetos de 12,5E de ambos os grupos apresentou condensações de células oriundas do esclerótomo dos somitos. Essas células se diferenciarão em condrócitos para que seja dado início à formação do molde cartilaginoso das vértebras e subsequente ossificação desse molde. Em 12,5E foi possível diferenciar as células oriundas da porção anterior do esclerótomo e as células oriundas da porção posterior de outro esclerótomo, que formarão a vértebra e o anulo fibroso do disco intervertebral (Fig. 12A e 12B).

Os membros posteriores dos fetos de 12,5E também foram analisados. Fetos HIPO apresentaram as mesmas características morfológicas observadas nos fetos EUT. Dentre as características observadas destacam-se a formação do blastema do fêmur, tíbia, fibula e metatarsos, nitidamente observados em ambos os grupos. Nesta etapa do desenvolvimento, em cortes corados pela hematoxilina, floxina e azul de alcian, observa-se apenas a condensação de células condrogênicas na região da futura formação dos moldes cartilaginosos desses segmentos. O azul de alcian, entretanto, permitiu observar a MEC discretamente corada em azul em torno destas células condrogênicas, indicando a deposição de MEC

cartilaginosa (Fig. 13). Não foi observada qualquer diferença entre os grupos EUT e HIPO, tanto na região vertebral quanto no membro posterior em fetos de 12,5E.

Fetos de 14,5E também não apresentaram qualquer alteração morfológica evidente decorrente da redução da oferta hormonal. Apenas as vértebras dos fetos apresentaram uma discreta diferença entre os grupos (Fig. 12C e 12D). Em 14,5E o molde cartilaginoso do corpo vertebral já está bem desenvolvido e os condrócitos estão distribuídos de maneira diferenciada, relacionada com o futuro estabelecimento da zona proliferativa e hipertrófica. Os condrócitos localizados na porção média do corpo vertebral apresentam distribuição difusa e maior extensão da área da MEC. Os condrócitos mais próximos das regiões dos futuros discos intervertebrais apresentam-se mais condensados e entremeados por uma quantidade menor de MEC (Fig. 12C). Os animais do grupo HIPO não apresentam essa organização diferenciada dos condrócitos no corpo vertebral. Nesses animais observa-se apenas a distribuição difusa dos condrócitos em toda a extensão do corpo vertebral (Fig. 12D).

Os fetos de 14,5E, quando observados em preparados totais (WM), apresentaram marcação com vermelho de alizarina na região medial da diáfise femoral, resultado da deposição de cálcio no local (Fig. 8). A análise histológica dos fêmures evidenciou que, nessa idade, há apenas a ossificação do colar ósseo em torno da região da diáfise do molde cartilaginoso, indicando o início do processo de ossificação (Fig. 14). O molde cartilaginoso do fêmur apresenta condrócitos em proliferação nas regiões das epífises, enquanto na região da diáfise há condrócitos hipertróficos (Fig. 14A e 14B). Não há diferenças notáveis entre o grupo EUT e HIPO nesta idade (Fig. 14).

Figura 12: Efeito do hipotireoidismo sobre a morfologia das vértebras durante o desenvolvimento fetal. (A e B) Fetos de camundongo com 12,5 dias embrionários (E), (C e D) 14,5E, (E e F) 16,5E e (G e H) 18,5E, eutireoideos (EUT) e hipotireoideos (HIPO). a: esclerótomo anterior; p: esclerótomo posterior; n: notocorda; V: corpo vertebral; ZP: zona proliferativa; ZH: zona hipertrófica; O: centro de ossificação. O colchete delimita a região da futura zona proliferativa (C). A barra equivale a 50 μm (A-H).

Figura 13: Efeito do hipotireoidismo fetal sobre o desenvolvimento do membro posterior de fetos de 12.5E. Os fetos foram obtidos de (A) mães eutireoideas (EUT) e (B) mães hipotireoideas (HIPO). F: blastema do fêmur; T: blastema da tíbia; f: blastema da fibula; m: blastema do metatarso. A barra equivale a 100 μm .

Figura 14: Efeito do hipotireoidismo materno e fetal sobre o desenvolvimento do fêmur de fetos de 14,5E. Fetos do (A, B e C) grupo eutireoideo (EUT) e (D, E e F) grupo hipotireoideo foram submetidos À reação com azul de alcian e floxina. (B e E) Detalhes da região hipertrófica de A e D (linha cheia). (C e F) Detalhes da região proliferativa de A e D (linha pontilhada). MC: molde cartilaginoso; CH: condrócitos hipertróficos. CP: condrócitos proliferativos; seta: colar ósseo. A barra equivale a 100 μ m.

As vértebras de fetos de 16,5E encontram-se no início do processo de ossificação, caracterizado pela presença de condrócitos hipertróficos na região média (futura diáfise) (Fig. 12E e 12F). Não há diferença morfológica evidente entre o desenvolvimento vertebral de fetos HIPO e EUT que sugira um atraso significativo da ossificação endocondral. Entretanto, uma análise mais cuidadosa mostra que, nos fetos EUT, os condrócitos começam a se organizar em colunas, o que não é observado nos fetos HIPO. A ausência das colunas proliferativas na vértebra de fetos HIPO sugere que há um pequeno atraso na maturação das vértebras, mas que, nitidamente, não afeta a diferenciação dos condrócitos hipertróficos e o início do processo de ossificação (Fig. 12E e 12F).

A figura 15 apresenta a morfologia dos fêmures de fetos de 16,5E. Nessa idade, observa-se, em ambos os grupos, ossificação bem desenvolvida das diáfises femorais. A

diáfise encontra-se formada por osso compacto envolvendo o canal medular, preenchido pela medula óssea e ainda por algumas trabéculas compondo a espongiosa primária (Fig. 15). No fêmur, é possível determinar discretos efeitos negativos do hipotireoidismo materno e fetal no desenvolvimento ósseo. O grupo EUT apresenta os condrócitos proliferativos organizados em colunas facilmente distinguíveis na zona proliferativa (Fig. 15A, 15B e 15C). O grupo HIPO apresenta a zona proliferativa composta por células distribuídas randomicamente e de forma desorganizada, com exceção de algumas poucas colunas que puderam ser observadas na região lateral da placa (Fig. 15E, 15F e 15G). Outra notável diferença se dá na clara manutenção da MEC cartilaginosa nas trabéculas ósseas presentes na espongiosa primária, localizada na região da diáfise do fêmur dos fetos do grupo HIPO. O grupo HIPO apresenta coloração com azul de alcian, histoquímica específica para detecção de glicosaminoglicanos, moléculas abundantes na MEC cartilaginosa, nas trabéculas ósseas da região da diáfise óssea, enquanto o grupo EUT apresenta coloração notavelmente menor desta estrutura, o que evidencia um osso mais maduro (Fig. 15D e 15H). Dessa forma, em 16,5E, o hipotireoidismo materno e fetal afetou negativamente a ossificação do fêmur e alterou a organização dos condrócitos proliferativos no fêmur e na vértebra.

Figura 15: Efeito do hipotireoidismo sobre a morfologia do fêmur de fetos de 16,5E. Fetos (A, B, C e D) eutireoideos e (E, F, G e H) hipotireoideos foram submetidos à reação com azul de alcian e floxina. (A e E) Região da epífise femoral distal. (B e F) Região das zonas proliferativa e hipertrófica da epífise. (C e G) Detalhes em maior aumento da região da zona proliferativa. (D e H) Diáfise femoral. ZH: zona hipertrófica; ZP: zona proliferativa; ZR: zona de reserva; Di: diáfise femoral; setas: osso compacto; seta cheia: periósteo. A barra equivale a 100 μ m (A-H).

Fetos com 18,5E, já no final da gestação, também tiveram a vértebra e o fêmur analisados. Nessa idade fetal, as alterações causadas pelo hipotireoidismo foram mais evidentes do que as até aqui as observadas em 16,5E.

A comparação entre o grupo EUT e HIPO mostrou que ambos os grupos apresentam centros de ossificação bem desenvolvidos no fêmur e na vértebra (Fig. 12G e 12H; Fig. 16). Entretanto, espécimes do grupo HIPO apresentam reminiscências de matriz cartilaginosa ainda não reabsorvida no centro de ossificação das vértebras e desorganização discreta das colunas proliferativas, o que não é observado nos fetos do grupo EUT de 18,5E (Fig. 12D e 12H).

No fêmur dos fetos de 18,5E do grupo EUT, a região da epífise contém uma grande área de reserva. A zona proliferativa encontra-se repleta de condrócitos proliferativos organizados em colunas distintas, zona pré-hipertrófica bem desenvolvida e a zona hipertrófica pode ser facilmente identificada por conter um grande número de condrócitos hipertróficos, cuja imagem negativa do citoplasma é característica (Fig. 16A, 16B e 16C). A análise histológica das zonas que compõem a LE dos fetos de 18,5E do grupo HIPO demonstrou haver clara redução da zona hipertrófica, assim como aumento da zona pré-hipertrófica e desorganização da zona proliferativa (Fig. 16D, 16E e 16F).

A avaliação morfológica qualitativa nos permitiu identificar que a redução da oferta dos hormônios tireoideanos afeta negativamente o desenvolvimento ósseo fetal, mesmo que discretamente. Porém, frente a esse resultado, a análise morfométrica se fez necessária para que pudessem ser “quantificadas” as alterações observadas.

Figura 16: Efeito do hipotireoidismo sobre a morfologia do fêmur de fetos de 18,5E. (A-C) Fetos eutireoideos e (D-F) fetos hipotireoideos foram submetidos á reação com azul de alcian. (C e F) Detalhes em maior aumento da placa de crescimento de B e E, conforme indicado. df: diáfise; E: epífise; ZH: zona hipertrófica; ZPh: zona pré-hipertrófica; ZP: zona proliferativa; ZR: zona de reserva. A barra equivale a 100 μ m (A, B, D e E) e 50 μ m (C e F).

A análise morfométrica da região da LE distal do fêmur fetal de 14,5E, 16,5E e 18,5E foi realizada com o objetivo de determinar quantitativamente os efeitos da redução da oferta das iodotironinas sobre este tecido durante o desenvolvimento intra-uterino. Para tanto, foram utilizados de três a cinco animais de cada um dos grupos estudados, EUT e HIPO. Microsecções semi-seriadas (1 corte a cada 50 μ m) foram feitas dos fêmures, de forma que todo o osso fosse submetido à avaliação.

Os animais de 14,5E tiveram o comprimento da futura diáfise, rica em condrócitos hipertróficos, medido, porém não foi detectada diferença significativa entre os grupos. Os animais de 16,5E do grupo HIPO apresentaram redução significativa do número de condrócitos hipertróficos em relação ao grupo EUT. Um maior número de alterações foi encontrado nos animais de 18,5E. Nesta idade, o hipotireoidismo afetou negativamente o desenvolvimento da zona proliferativa e hipertrófica. A área, comprimento e número de condrócitos proliferativos foram reduzidos no grupo HIPO, quando comparado ao grupo EUT. O mesmo ocorre com a área e o número de condrócitos hipertróficos, também reduzidos no grupo HIPO (Tabela 2).

Tabela 2: Morfometria da LE distal do fêmur dos fetos.

	16,5E		18,5E	
	<i>EUT</i>	<i>HIPO</i>	<i>EUT</i>	<i>HIPO</i>
Zona Proliferativa				
Área (mm ²)	124,1 $\pm$ 1,7	107,9 $\pm$ 12,4	175,7 $\pm$ 12,3	147,0 $\pm$ 9,5*
Comp. (mm)	286,0 $\pm$ 50,2	252,3 $\pm$ 54,0	352,1 $\pm$ 19,8	315,3 $\pm$ 7,8*
¹ CP/ coluna	+++	+++	10,6 $\pm$ 1,1	7,8 $\pm$ 0,8*
Zona Hipertrófica				
Área (mm ²)	78,5 $\pm$ 8,3	72,3 $\pm$ 3,4	70,1 $\pm$ 11,9	53,7 $\pm$ 5,9*
Comp. (mm)	174,5 $\pm$ 4,8	167,9 $\pm$ 7,7	141,8 $\pm$ 5,4	136,2 $\pm$ 5,2
¹ CH	104,9 $\pm$ 2,6	91,5 $\pm$ 5,4*	99,6 $\pm$ 7,4	84,8 $\pm$ 6,8*

Medidas realizadas na PEC femoral distal de fetos de 16.5E e 18.5E. EUT: Eutiroideo; HIPO: hipotiroideo; Comp: comprimento; ¹CP: número de condrócitos proliferativos; ¹CH: número de condrócitos hipertróficos. +++: não formação de colunas. Os resultados são expressos como média $\pm$ SEM, n=3-5 por grupo. *p<0.05 por *Student t-test*.

Os resultados obtidos através da análise histológica e morfométrica do desenvolvimento ósseo fetal demonstram que a redução da oferta hormonal ao feto, antes e depois do início da função da glândula tireóide fetal, afeta o desenvolvimento ósseo através da ação negativa sobre a ossificação, organização e diferenciação dos condrócitos da zona proliferativa e hipertrófica da LE. Porém, vale ressaltar que as alterações aqui relatadas são infinitamente menores e mais discretas do que as alterações observadas durante o desenvolvimento pós-natal.

Sabe-se que, durante o início do desenvolvimento pós-natal, entre 2PN e 7PN, os condrócitos das zonas de reserva, proliferativa, pré-hipertrófica e hipertrófica estão prestes a formar a lâmina epifisial de fato. A partir de 14PN ocorre a ossificação secundária da epífise femoral, o que faz com que a zona de reserva seja agudamente reduzida e que, junto com as outras zonas de condrócitos, forme uma lâmina de tecido cartilaginoso entre as duas superfícies ósseas. A formação e a manutenção da função adequada da LE são determinantes para o crescimento normal dos indivíduos e qualquer alteração desses processos induz alterações do crescimento.

No início do desenvolvimento pós-natal, nenhuma diferença morfológica foi observada na diáfise ou epífise do fêmur entre os grupos EUT e HIPO em 2PN (Fig. 17). Já a análise da epífise femoral em 4PN mostrou discreta, porém visível, redução do comprimento da zona proliferativa e hipertrófica (Fig. 18). A análise histológica mostrou que o hipotireoidismo continua afetando negativamente o desenvolvimento da LE em 7PN. Nesta idade, foi observada a redução importante da zona proliferativa e hipertrófica, assim como a diminuição das colunas proliferativas, aparentemente compostas por menos condrócitos que o grupo EUT (Fig. 19).

Em 14PN, a análise histológica mostrou que o hipotireoidismo impediu o desenvolvimento da ossificação secundária, além de aparentemente reduzir a espessura da zona proliferativa e hipertrófica, quando comparadas ao grupo EUT (Fig. 20). Com o desenvolvimento da ossificação secundária da epífise, a LE passa a ser delimitada proximalmente pela diáfise ossificada e distalmente pela epífise ossificada.

Com o avançar do crescimento pós-natal, a manutenção dos baixos níveis de T3 e T4 continuou impedindo o desenvolvimento da ossificação secundária, o que promoveu a manutenção da epífise cartilaginosa, a não formação adequada da LE e conseqüente redução do crescimento ósseo. Esse efeito pode ser observado em 21PN e 35PN (Fig. 21 e 22,

respectivamente). Vale ressaltar que a LE, em 21PN e 35PN, não aparece reduzida pelo HIPO, e sim aumentada. Este dado reitera a ação do hipotiroidismo no atraso da ossificação se considerarmos que a redução da LE no grupo EUT, e não o aumento da mesma no HIPO, está relacionado com a diferenciação dos condrócitos proliferativos e apoptose dos hipertróficos, eventos necessários para que a ossificação da diáfise seja desenvolvida normalmente.

Figura 17: Corte longitudinal de fêmures de camundongos com 2 dias de vida pós-natal (PN) submetidos à reação com azul de alcian. (A, B e C) Animal eutiroides. (D, E e F) Animal hipotiroideo. Ep: epífise distal do fêmur; ZP: zona proliferativa; ZH: zona hipertrófica. A barra equivale a 100 μ m.

Figura 18: Corte longitudinal de fêmures de camundongos com 4 dias de vida pós-natal (PN) submetidos à reação com azul de alcian. (A, B e C) Animal eutiroides. (D, E e F) Animal hipotiroideo. Ep: epífise distal do fêmur; ZP: zona proliferativa; ZH: zona hipertrófica. A barra equivale a 100 μ m.

Figura 19: Corte longitudinal de fêmures de camundongos com 7 dias de vida pós-natal (PN) submetidos à reação com azul de alcian. (A e B) Animal eutireoideo. (C e D) Animal hipotireoideo. ZP: zona proliferativa; ZH: zona hipertrófica. A barra equivale a 100 μ m.

Figura 20: Corte longitudinal de fêmures de camundongos com 14 dias de vida pós-natal (PN) submetidos à reação com azul de alcian. (A e B) Animal eutireoideo. (C e D) Animal hipotireoideo. LE: lâmina epifisial propriamente dita; ZP: zona proliferativa; ZH: zona hipertrófica; seta: ossificação secundária. A barra equivale a (A e C) 200 μ m e (B e D) 100 μ m.

Figura 21: Corte longitudinal de fêmures de camundongos com 21 dias de vida pós-natal (PN) submetidos à reação com azul de alcian. (A e B) Animal eutireoideo. (C e D) Animal hipotireoideo. LE: lâmina epifisial; Di: diáfise; ZP: zona proliferativa; ZH: zona hipertrófica; seta: ossificação secundária. A barra equivale a (A e C) 200 μ m e (B e D) 100 μ m.

Figura 22: Corte longitudinal de fêmures de camundongos com 35 dias de vida pós-natal (PN) submetidos à reação com azul de alcian. (A e B) Animal eutireoideo. (C e D) Animal hipotireoideo. LE: lâmina epifisial; D: diáfise; ZP: zona proliferativa; ZH: zona hipertrófica; seta: ossificação secundária; cabeça de seta: início da ossificação secundária. A barra equivale a (A e C) 200 μ m e (B e D) 100 μ m.

5.6 Análise da expressão relativa da Osteocalcina (OC) e Colágenos tipo I, II e X (Col1, Col2 e Col10, respectivamente) no fêmur fetal

Com o objetivo de caracterizar melhor o efeito do hipotireoidismo sobre o tecido ósseo, durante o desenvolvimento pré-natal, foi avaliada a expressão gênica de alguns genes marcadores da maturação osteoblástica (OC e Col1), da diferenciação e função dos condrócitos (Col10 e Col2) por PCR em tempo real.

A OC é uma proteína não colágena da MEC, sintetizada e secretada por osteoblastos maduros, assim como o Col1. A expressão do RNAm do Col1 e da OC aumentou significativamente em ambos os grupos de acordo com o crescimento e amadurecimento ósseos, sendo afetada negativamente pelo hipotireoidismo apenas em 18,5E (Fig. 23A e 23B).

Em 14,5E e 16,5E, a expressão do RNAm do Col1 foi igual entre os grupos EUT e HIPO. Nos fêmures dos fetos com idade ente 14,5E e 16,5E, pertencentes ao grupo EUT, foi observado um aumento da expressão relativa do Col1 de 3,6 vezes ($p<0,01$). Em 18,5E, a expressão de Col1 no grupo EUT não foi alterada, enquanto o hipotireoidismo reduziu em 1,9 vezes ($p<0,01$) a expressão de Col1 nos fêmures fetais (Fig.23A).

O mesmo padrão de expressão foi observado com relação ao RNAm da OC (Fig.23B). A análise da expressão do RNAm da OC nos fêmures dos fetos do grupo EUT revelou que, entre 14,5E e 16,5E, a expressão aumentou 32 vezes ($p<0,001$), e mais 1,9 vezes ($p<0,001$) entre 16,5E e 18,5E. A avaliação da expressão de OC no grupo HIPO, em comparação ao grupo EUT, mostrou que não há diferença entre os grupos em 14,5E e 16,5E, porém, foi observada a redução da expressão de OC no fêmur dos fetos de 18,5E (~ 2 vezes; $p<0.001$) (Fig. 23B).

O Col10 é expresso exclusivamente por condrócitos hipertróficos, fundamentais para a ossificação e crescimento do segmento ósseo. A expressão do RNAm do Col10 não variou em função do desenvolvimento ou da indução do hipotireoidismo em fetos de 14,5E e 16,5E. Todavia, fetos de 18,5E pertencentes ao grupo HIPO apresentaram redução significativa da expressão de Col10 (~ 2 vezes; $p<0,05$) no fêmur (Fig. 23C).

O Col2 é predominantemente sintetizado pelos condrócitos proliferativos, mas também é sintetizado pelos condrócitos hipertróficos. A expressão do RNAm do Col2 não foi modulada pelo desenvolvimento e crescimento ósseos. Por outro lado, foi afetada negativamente pelo hipotireoidismo, que induziu um aumento significativo da expressão de

Col2 no esqueleto fetal em 16,5E ($p<0,05$), ao passo que reduziu a sua expressão em 18,5E ($p<0,001$), quando comparado ao grupo EUT (Fig. 23D).

A redução da oferta de T3 e T4 diminuiu a expressão dos genes da OC, Col1 e Col10 apenas em fetos com 18,5E, mas não antes dessa idade. Esses genes são de especial importância nessa fase por estarem diretamente relacionados à ossificação e crescimento do osso fetal. Vale lembrar que as alterações morfológicas decorrentes do hipotireoidismo fetal e materno também foram mais evidentes em 18,5E e não antes dessa data. Esses resultados sugerem que haja alguma diferença entre o início e o final do período gestacional que determine a sensibilidade do feto às iodotironinas.

Figura 23: Expressão relativa do RNA de colágeno tipo I (Col1), osteocalcina (OC), colágeno tipos II e X (Col2 e Col10, respectivamente) no fêmur dos fetos de 14,5, 16,5 e 18,5 dias embrionários. Expressão do RNA de (A) Col1, (B) OC, (C) Col10 e (D) Col2. A expressão gênica foi analisada por PCR em tempo real e a expressão relativa foi determinada designando-se a expressão do grupo eutiroides (EUT) em 14,5E como 1. Os valores correspondem à média $\pm$ SEM obtida entre 3-5 amostras. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ vs. EUT, por *Student t-test*.

5.7 Expressão dos Receptores Nucleares (TRs), Transportadores dos hormônios tireoideanos e das Selenodesiodases das Iodotironinas no fêmur fetal

O fato da restrição da oferta de T3 e T4 afetar o esqueleto apenas no final da gestação, em 18,5E, levantou a hipótese de que antes desse período, em 14,5E e 16,5E, os receptores, transportadores e enzimas envolvidos com o mecanismo de ação dos hormônios tireoideanos ainda não fossem expressos ou fossem pouco expressos, apesar de haver oferta hormonal materna ao feto desde o início da gestação. Para testar essa hipótese, avaliou-se a expressão do RNAm dos TRs, dos transportadores e das selenodesiodases das iodotironinas.

5.7.1 Expressão relativa dos TRs no fêmur fetal

A análise da expressão relativa do RNAm do TR α 1 e do TR β 1 nos permitiu caracterizar a dinâmica da expressão dos TRs no tecido ósseo durante o desenvolvimento fetal. Permitiu ainda observar a regulação da expressão desses genes frente à variação dos níveis hormonais.

O RNAm do TR α 1 e TR β 1 foi expresso no esqueleto fetal em todas as idades estudadas, entre 14,5E, início da ossificação endocondral, e 18,5E, quando ossificação já está bem desenvolvida (Fig. 24C). A expressão gênica dos receptores não se alterou durante o desenvolvimento, mas foi modulada pela redução dos níveis das iodotironinas em 18,5E (Fig. 24A e 24B). Nessa idade, a expressão do RNAm do TR α 1 foi reduzida significativamente (1,9 vezes; $p < 0,001$) no grupo HIPO, da mesma forma que a expressão de TR β 1 foi aumentada significativamente (5 vezes; $p < 0,05$) (Fig. 24A e 24B). A análise da expressão de TR α 1 vs. TR β 1 no grupo EUT mostrou que o RNAm do TR α 1 é significativamente mais expresso no tecido ósseo fetal em todas as idades estudadas (Fig. 24C), não sendo esta condição alterada pelo hipotireoidismo (dado não mostrado). Em 14,5E, a expressão de TR α 1 é 216,3 vezes maior que a expressão de TR β 1 na mesma idade e condição. Em 16,5E, a diferença entre os genes é de 135,87 vezes, e 288,8 vezes em 18,5E.

Figura 24: Expressão relativa do TR α 1 e TR β 1 no fêmur dos fetos de 14,5E, 16,5E e 18,5E. (A) Expressão do TR α 1. (B) Expressão do TR β 1. (C) Expressão de TR α 1 vs. TR β 1. A expressão relativa do mRNA dos TRs (A e B) foi determinada designando-se a expressão do grupo eutiroides (EUT) em 14,5E como 1. A expressão relativa de TR α 1 vs. TR β 1 foi analisada determinando a expressão de TR β 1 em 14,5E como 1. Cada ponto ou barra representa a média $\pm$ SEM (n=5). *p<0.05, ***p<0.001 vs. EUT, por Student t-test.

5.7.2 Expressão relativa dos transportadores MCT8, LAT1 e LAT2 no fêmur durante o desenvolvimento fetal e pós-natal

A expressão do RNAm do MCT8, LAT1, LAT2, NTCP e OATP foi analisada por PCR em tempo real no fêmur de camundongos durante o desenvolvimento fetal e pós-natal (Fig. 25, 26 e 27). A expressão dos transportadores de ânions orgânicos, NTCP e OATP, não foi detectada em nenhuma das idades avaliadas (14,5E, 16,5E, 18,5E, 2PN, 4PN, 7PN, 14PN, 21PN e 35PN) (dados não mostrados).

A expressão relativa do RNAm do MCT8 no fêmur apresentou tendência a redução durante o desenvolvimento fetal, mas não foi modulada pelo hipotireoidismo nessa fase (Fig. 25A). Interessantes resultados foram obtidos com a análise dos fêmures de camundongos após o nascimento. Durante o desenvolvimento pós-natal, a expressão do MCT8 no fêmur foi reduzida ~5vezes ($p < 0,001$) entre 4PN e 35PN nos grupos EUT e HIPO (Fig. 25B). Todavia, a redução da oferta de T3 e T4 induziu o aumento da expressão do MCT8 em 4PN, 7PN, 14PN e 35PN (Fig. 25B). Em outro experimento, os camundongos foram tratados com 20x a dose fisiológica de T3 ($0,35\mu\text{g}/100\text{g}$) a partir de 1PN, enquanto outros foram mantidos hipotireoideos ou eutireoideos, desde o início do desenvolvimento fetal. O tratamento com T3 induziu a redução da expressão do MCT8 no fêmur de camundongos em todas as idades PN estudadas (~1,5 vezes; $p < 0,05$), enquanto a expressão do MCT8 foi aumentada no grupo HIPO, conforme descrito anteriormente (Fig. 26). Esses resultados sugerem que os hormônios tireoideanos regulem a expressão do RNAm do MCT8.

Os transportadores LAT1 e LAT2 tiveram sua expressão detectada no fêmur fetal e pós-natal, porém não houve qualquer modulação da expressão gênica em função do desenvolvimento ósseo ou dos níveis de hormônios tireoideanos. Entretanto, em 35PN, a expressão de LAT1 foi reduzida igualmente nos grupos EUT e HIPO ($p < 0,001$), em comparação com as outras idades pós-natais avaliadas (Fig. 27).

Figura 25: Regulação da expressão do MCT8 pelo hormônio tireoideano no esqueleto em desenvolvimento. **(A)** Expressão relativa de MCT8 no esqueleto fetal de camundongos. **(B)** Expressão relativa de MCT8 no esqueleto de camundongos jovens. A expressão relativa do MCT8 foi determinada designando-se a expressão do grupo EUT em 14,5E (A) e em 4 dias de idade pós-natal (PN) (B) como 1. EUT: grupo eutireoideo; HIPO: grupo hipotireoideo; E: dias embrionários. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (n=5). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 vs. EUT, por Student t-test.

Figura 26: Regulação da expressão relativa do RNAm do MCT8 pelo hormônio tireoideano no esqueleto de camundongos jovens. A expressão relativa do MCT8 foi determinada designando-se a expressão do grupo EUT em cada idade (7PN, 14PN e 35PN) como 1. Os resultados foram comparados entre os grupos eutireoideo (EUT), hipotireoideo (HIPO) e hipertireoideo (HIPER) em cada idade estudada. PN: idade pós-natal. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (n=5). **p<0,01, ***p<0,001 vs. EUT; #p<0,01 vs. HIPO, por Student t-test.

Figura 27: Regulação da expressão relativa do RNAm de LAT1 e LAT2 pelo hormônio tireoideano no esqueleto em desenvolvimento. **(A)** Expressão relativa de LAT1 no esqueleto fetal de camundongos. **(B)** Expressão relativa de LAT1 no esqueleto de camundongos jovens. **(C)** Expressão relativa de LAT2 no esqueleto fetal de camundongos. **(D)** Expressão relativa de LAT2 no esqueleto de camundongos jovens. A expressão relativa de LAT1 e LAT2 foi determinada designando-se a expressão do grupo EUT em 14,5E (A e C) e em 4 dias (B e D) como 1. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (n=5). #p<0.05 vs. 4PN, 7PN e 14PN de ambos os grupos, por *Student t-test*.

Os resultados obtidos através da análise da expressão gênica dos transportadores demonstram que tanto o MCT8 quanto LAT1 e LAT2 são expressos em todas as idades fetais. Interessantemente, a expressão do MCT8 parece ser regulada negativamente em função do desenvolvimento ósseo.

5.7.3 Expressão relativa do RNAm da D1, D2, D3, WSB-1 e VDU-1

A expressão relativa das selenodesiodases das iodotironinas (D1, D2 e D3) foi estudada no esqueleto de camundongos com 14,5E, 16,5E, 18,5E, 4PN, 7PN, 14PN e 35PN. Nossos experimentos detectaram que o RNAm de D1, D2 e D3 é expresso no esqueleto em todas as idades estudadas durante o desenvolvimento fetal e pós-natal. A única exceção ocorreu em 35PN, quando a expressão da D1 e D3 não foi detectada nos fêmures de ambos os grupos experimentais (Fig. 28).

A Fig. 28A mostra a relação entre a expressão das três desiodases e define seu padrão de expressão no esqueleto fetal. A D3 é a desiodase mais expressa (150 vezes *vs.* D1 e ~7 vezes *vs.* D2; $p < 0,05$) em 14,5E e 16,5E, tendo sua expressão significativamente reduzida durante o desenvolvimento fetal. Em 18,5E, a expressão da D3 foi igual à expressão da D2, que durante todo o desenvolvimento foi maior que a expressão da D1 (~17 vezes) e menor que a expressão da D3. A D1 é a desiodase menos expressa durante o desenvolvimento ósseo fetal. A Fig. 28B mostra a expressão das desiodases durante o desenvolvimento ósseo pós-natal. A expressão do RNAm da D2 é maior que a expressão da D1 e D3 (~100 vezes e ~5 vezes, respectivamente; $p < 0,05$) em todas as idades estudadas. A expressão do RNAm da D1 e D3 se mantém baixa em 4PN, 7PN e 14PN, até não serem mais detectadas em 35PN.

Por ser a D1 pouco expressa no esqueleto em todas as idades fetais e pós-natais estudadas, nossos esforços foram direcionados aos estudos da D2 e D3.

A Fig. 29A compara o padrão da expressão do RNAm da D2 e D3 no fêmur fetal de animais eutireoideos em função do desenvolvimento, comparando a expressão em 16,5E e 18,5E com a expressão inicial, determinada em 14,5E. A expressão do RNAm da D3 decresce aproximadamente 10 vezes com o decorrer do desenvolvimento, entre 14,5E e 18,5E. Esse padrão se mantém durante o desenvolvimento pós-natal, quando o RNAm da D3 é reduzido 3 vezes entre 4PN e 14PN, atingindo níveis indetectáveis em 35PN (Fig. 29B). Diferentemente, a expressão do RNAm da D2 parece ser estável durante o mesmo período, apresentando um pico em 14PN (~3 vezes) (Fig. 29B).

O padrão de expressão do Dio3 sugere que a D3 possa limitar a ação hormonal no osso fetal em 14,5E. Conforme a expressão gênica vai sendo reduzida, teoricamente, a quantidade de D3 ativa seria também reduzida e a conversão de T4 a rT3 e de T3 a T2 seria reduzida localmente, aumentando a exposição do tecido fetal ao T3, com decorrer do desenvolvimento.

Figura 28: Determinação do padrão de expressão da D1, D2 e D3 no esqueleto eutireoideo durante o desenvolvimento (A) fetal e (B) pós-natal. A expressão relativa do mRNA de cada desidase foi determinado designando-se a expressão da D1 em (A) 14,5E ou (B) 4PN como 1. Cada ponto representa a média $\pm$ SEM (n=5). $^x p < 0,001$, todos são diferentes; $^+ p < 0,05$, D1 vs. D2 e D3; $^# p < 0,05$, D3 vs. D1 e D2; $^* p < 0,05$, D2 vs. D3 e D1.

Figura 29: Padrão de expressão do RNAm da D2 e D3 no fêmur eutireoideo durante o desenvolvimento (A) fetal e (B) pós-natal. A expressão relativa do mRNA de cada desidase foi determinado designando-se a expressão em (A) 14,5E ou (B) 4PN como 1 para cada gene, separadamente. Cada ponto representa a média $\pm$ SEM (n=5). $^a p < 0,05$, 14,5E vs. 16,5E; $^b p < 0,05$, 14,5E vs. 18,5E; $^c p < 0,01$, 18,5E vs. todas as idades; $^d p < 0,05$, 4PN vs. 7PN; $^e p < 0,01$, 14PN vs. todas as idades pós-natais.

A Fig. 30 mostra a modulação da expressão do RNAm e da atividade da D2 e D3 em resposta à redução da oferta de iodotironinas durante o desenvolvimento fetal. A expressão relativa do RNAm da D2 foi significativamente aumentada no fêmur de fetos do grupo HIPO em 14,5E (1.7 vezes; $p < 0,05$) e 16,5E (1.6 vezes; $p < 0,05$), e manteve-se igual ao grupo EUT

em 18,5E (Fig. 30A). A expressão da D3 foi diminuída no grupo HIPO em 14,5E (2.5 vezes; $p<0.05$) e 16,5E, porém manteve-se igual ao grupo controle em 18,5E (Fig. 30C).

Como esperado, a atividade de D2 foi regulada positivamente no grupo HIPO enquanto a atividade de D3 foi regulada negativamente na mesma situação, nos fêmures dos camundongos após o nascimento (Fig. 30B e 30D).

Figura 30: Efeito da redução da oferta hormonal sobre a expressão relativa do RNAm da D2 e D3 no fêmur de camundongos durante o desenvolvimento fetal. **(A)** Expressão relativa de D2. **(B)** Atividade de D2. **(C)** Expressão relativa de D3. **(D)** Atividade de D3. A expressão relativa do mRNA de cada desidase foi determinado designando-se a expressão da D2 e D3 em 14,5E como 1 **(A e C)**. A atividade de D2 e D3 foram avaliadas nos fêmures de fetos de 18,5E. E: dias embrionários. Cada ponto representa a média $\pm$ SEM (n=5). * $p<0,05$, ** $p<0,001$ vs. EUT, por teste-t de Student.

A expressão do RNAm de WSB-1 e VDU-1, moléculas comprometidas com a via de degradação da D2 pelo sistema ubiquitina-proteassoma, foi detectada em 18,5E. A expressão relativa do RNAm de WSB-1 foi regulada negativamente no grupo HIPO (Fig. 31A), enquanto a expressão relativa da VDU-1 não foi modulada nas mesmas condições (Fig. 31B). Esse resultado é importante por indicar que exista regulação pós-traducional da atividade de

D2 nesse modelo, assim como em outros, uma vez que, a atividade enzimática foi regulada, apesar da expressão do RNAm da D2 não variar de acordo com os níveis hormonais em 18,5E. Outros estudos são necessários para que se chegue a uma conclusão.

Figura 31: Efeito da redução da oferta hormonal sobre a expressão relativa do RNAm de WSB-1 e VDU-1 no fêmur de camundongos durante o desenvolvimento fetal. **(A)** Expressão relativa de WSB-1. **(B)** Expressão relativa de VDU-1. A expressão relativa do mRNA foi determinada designando-se a expressão do grupo EUT como 1. A expressão de WSB-1 e VDU-1 foi avaliada nos fêmures de fetos de 18,5E. E: dias embrionários. Cada ponto representa a média $\pm$ SEM (n=5). * $p < 0,05$ vs. EUT, por teste-t de Student.

6 DISCUSSÃO

Como apresentado ao longo desta tese, as iodotironinas são fundamentais para o desenvolvimento esquelético pós-natal e para a manutenção da massa e da qualidade ósseas na idade adulta [248, 250, 266]. A redução da oferta dos hormônios tireoideanos durante o período pós-natal afeta negativamente a ossificação secundária das epífises, o estabelecimento da lâmina epifisial e, também, sua função, resultando em atraso na ossificação e retardo no crescimento ósseo [13, 14, 26, 109]. Em humanos, a ausência da ossificação secundária é uma característica *sine qua non* do hipotireoidismo congênito, que acomete 1:3500 nascidos vivos [16, 17]. Contudo, apesar da relevância epidemiológica, pouco se sabe sobre o papel das iodotironinas sobre a formação e desenvolvimento do esqueleto fetal.

Para elucidar essa questão, induzimos farmacologicamente o hipotireoidismo em camundongos prenhes e em seus fetos, e seus esqueletos foram submetidos à análise morfológica e à avaliação do padrão de expressão de genes diretamente relacionados ao desenvolvimento esquelético, à maturação óssea e aos mecanismos de ação do T3. Nossos resultados sugerem que o desenvolvimento esquelético fetal depende de baixos níveis de hormônios tireoideanos para ocorrer normalmente, o que pode ser determinado, pelo menos em parte, pelo padrão de expressão das selenodesiodases.

Os camundongos prenhes foram tratados com MMI e P (grupo HIPO), drogas bloqueadoras da função tireoideana materna e fetal, desde o início da gestação, uma vez que essas drogas cruzam a barreira placentária [256, 267]. A determinação dos níveis séricos e fetais de T3 e T4 mostrou que o bloqueio farmacológico da função tireoideana foi efetivo, resultando em animais hipotiroideos (HIPO) (Fig. 5).

Tanto as mães quanto os fetos do grupo HIPO apresentaram redução significativa das concentrações de T3 e T4, na ordem de 60-80% em relação ao grupo EUT, embora mantivessem níveis detectáveis de T3 e T4 (Fig. 5A e 5B). O início da função tireoideana fetal, entre 16,5E e 18,5E, causou um aumento da concentração de T3, já o T4 teve sua concentração aumentada de forma linear no mesmo período, em ambos os grupos (Fig. 5C e 5D). Mesmo após o início da função tireoideana fetal [119], a concentração de T3 e T4 nos fetos foi significativamente reduzida, o que evidencia a inibição eficiente da função tireoideana fetal, mimetizando o hipotireoidismo congênito. O fato do T3 e T4 não terem sido detectados em 12,5E em ambos os grupos, e do T4 não ter sido detectado em 14,5E em

animais do grupo HIPO pode se dever ao limite da sensibilidade do kit utilizado (1 ng/ml para T4 e 0,01 ng/ml para T3) e não à real ausência desses hormônios. Tanto o T3 quanto o T4 já foram detectados por outros grupos em idades fetais ainda mais precoces, como em 9E [25, 121, 122, 268, 269]. Antes do início da função tireoideana fetal, a grande parte dos hormônios tireoideanos encontrados nos tecidos fetais são de origem materna [21, 268].

Por ser o T3 notoriamente importante para o crescimento longitudinal normal, o comprimento total e segmentar, assim como a massa corporal dos fetos, foram avaliados [10, 11, 13, 14, 26, 109]. O crescimento longitudinal (comprimento) e o ganho de massa corporal dos fetos foram significativamente reduzidos pelo hipotireoidismo, mas não totalmente interrompidos (Fig. 6A e 6B). Os fetos de ambos os grupos apresentaram crescimento e ganho de massa corporal linear entre 12,5E e 18,5E. Curiosamente, a redução da oferta das iodotironinas levou à redução do comprimento do úmero, fêmur e tíbia apenas no final do período gestacional, em 18,5E (Fig. 6C, 6D e 6E).

A redução dos segmentos ósseos nos levou a avaliar o processo de ossificação do esqueleto fetal. Conforme mostrado nas figuras 7 e 8, a ossificação endocondral se desenvolveu igualmente em ambos os grupos, nas diferentes idades fetais avaliadas. A avaliação da ossificação intramembranosa (Fig. 9A e 9B) mostra que o hipotireoidismo causou atraso do fechamento das suturas e fontículos em 18,5E, mas não em 16,5E. Esses resultados motivaram o estudo do desenvolvimento ósseo no período pós-natal. Embora os resultados obtidos com o RIE tenham demonstrado haver redução dos níveis séricos de T3 e T4, a ausência de atraso evidente da ossificação endocondral nos fetos do grupo HIPO nos fez questionar a eficiência do tratamento com MMI e P. A inclusão das idades pós-natais no presente estudo foi feita com o objetivo de confirmar a eficiência do tratamento com MMI e P em reduzir a concentração das iodotironinas de forma que afetasse negativamente a LE, gerando as clássicas alterações ósseas descritas como características do hipotireoidismo congênito em idades pós-natais (e.g. disgênese das epífises) [13, 14, 26, 109]. Caso as alterações não fossem observadas nas idades PN, a ausência de efeitos deletérios induzidos pelo hipotireoidismo durante o desenvolvimento ósseo fetal poderia ser resultado da ineficiência do tratamento utilizado no nosso modelo experimental. As figuras 9C, 10 e 11 mostram, claramente que o tratamento com MMI e P induziu alterações esqueléticas graves no grupo PN. Deste modo, a ausência de alterações esqueléticas no grupo HIPO durante o

desenvolvimento fetal sugere a existência, nesta etapa do desenvolvimento, de outro ou de outros mecanismos de controle da ação hormonal.

Com o objetivo de avaliar mais detalhadamente a formação e o desenvolvimento ósseo fetal e pós-natal, foi realizada a avaliação histológica dos fêmures de espécimes entre 12,5E e 35PN.

Entre 12,5E e 16,5E, discretas alterações morfológicas foram detectadas na vértebra e no fêmur dos fetos do grupo HIPO, em comparação ao grupo EUT (Fig. 12, 13, 14 e 15). Em 16,5E a exposição dos fetos a baixos níveis de T3 e T4 causou discreto atraso na ossificação endocondral, reduziu o número de condrócitos hipertróficos e afetou negativamente a organização das colunas de condrócitos proliferativos na vértebra (Fig. 12E e 12F) e no fêmur (Fig. 15; Tabela 2). Em 18,5E, já no final do período gestacional, as alterações morfológicas causadas pelo hipotireoidismo na vértebra e no fêmur fetal foram mais graves e evidentes. Nessa idade, não apenas o número de condrócitos foi reduzido, mas também a área hipertrófica, o número de condrócitos proliferativos por coluna, a área e o comprimento da zona proliferativa (Fig. 12G, 12H e 16; Tabela 2). Notavelmente, a expressão dos genes marcadores da maturação osteoblástica, OC e Col1, e de marcadores da proliferação e diferenciação de condrócitos, Col2 e Col10, também tiveram sua expressão gênica significativamente reduzida apenas em 18,5E (Fig. 23), o que certamente contribuiu para as alterações observadas na análise morfológica dos fetos de 18,5E [13, 108].

Os efeitos deletérios do hipotireoidismo no desenvolvimento esquelético, que começaram a ser evidentes em 18,5E, foram indetectáveis em 2PN (Fig. 17), mas voltaram a ser observados em 4PN (Fig. 18). Os níveis séricos de T3 e T4 foram idênticos entre os grupos em 2PN, o que pode justificar a ausência de efeitos deletérios. A partir de 4PN os níveis de T4 aumentaram gradativamente no grupo EUT, atingindo níveis máximos em 14PN, sendo o mesmo observado com relação aos níveis de T3. O grupo HIPO teve os níveis de T4 reduzidos significativamente em 4PN, 7PN, 14PN, 21PN e 35PN, enquanto os níveis de T3 nas mesmas idades foram indetectáveis (Fig. 5E e 5F). A análise morfológica do esqueleto durante o desenvolvimento pós-natal nos grupos EUT e HIPO demonstrou que os efeitos deletérios causados pela redução da oferta de T3 e T4 se agravam proporcionalmente ao desenvolvimento ósseo.

A redução do tamanho do fêmur, das zonas de ossificação vertebral, e a redução da zona hipertrófica e a desorganização da zona proliferativa da LE dos fêmures foram evidentes

nos espécimes de 4PN e 7PN (Fig. 10, 11, 18 e 19). Em 14PN, as mesmas alterações se mantiveram no grupo HIPO, e foram ainda mais severas. No fêmur dos animais de 14PN do grupo EUT, foi observado o centro de ossificação secundária em desenvolvimento, enquanto o grupo HIPO tinha a epífise femoral ainda cartilaginosa (Fig. 20). Em 21PN e 35PN as zonas proliferativas e hipertróficas da LE do grupo HIPO são nitidamente maiores que as do grupo EUT (Fig. 21 e 22). Esse resultado pode dever-se ao fato de o grupo EUT ter a LE reduzida pelo avanço da ossificação endocondral da diáfise e da epífise, o que não ocorre no grupo HIPO [60, 82]. O atraso no desenvolvimento esquelético, femoral e vertebral, condiz com as alterações observadas em humanos portadores de hipotireoidismo congênito não tratado [270].

Apesar dos TRs ($TR\alpha 1$ e $TR\beta 1$) e dos transportadores das iodotironinas serem expressos no esqueleto fetal em todas as idades estudadas (14,5E até 18,5E) (Fig. 24), os efeitos deletérios causados pelo hipotireoidismo na morfologia óssea fetal e no padrão de expressão da OC, Col1 e Col10 foram detectados claramente somente no final da gestação, em 18,5E. Esses resultados sugerem fortemente que a ação de T3 e T4 assume um papel mais importante no desenvolvimento fetal apenas no final da gestação e durante o desenvolvimento pós-natal.

Essas observações são corroboradas por diferentes estudos desenvolvidos em modelos animais com deleções variadas do $TR\alpha$, associadas ou não com deleções do $TR\beta$, que apresentam fenótipo de hipotireoidismo ósseo fetal ou juvenil [15, 77, 189, 271]. Esses animais não apresentam redução do comprimento longitudinal total ou segmentar significativo ao final da gestação ou ao nascimento, mas apresentam discreto atraso do desenvolvimento ósseo endocondral e intramembranoso, que se agrava durante o desenvolvimento pós-natal, levando ao fenótipo ósseo característico do hipotireoidismo em 14PN [15, 77, 189, 271]. Por outro lado, um modelo animal de resistência aos hormônios tireoideanos ($TR\beta^{PV}$) [11] apresenta fenótipo esquelético de hipertireoidismo, oposto ao descrito anteriormente. Esses animais apresentam desenvolvimento fetal precoce e acelerado da ossificação endocondral e intramembranosa, que resulta em idade óssea fetal avançada. Após o nascimento, as alterações esqueléticas fetais se refletem no fechamento prematuro das lâminas epifisiais, mineralização aumentada dos membros e cranossinostose [11, 77, 271]. Esses achados sustentam a hipótese de que o T3 e T4 desempenham um papel importante no desenvolvimento ósseo no período final da gestação e durante o desenvolvimento pós-natal.

Os achados também sugerem que a manutenção de baixos níveis de T3 e T4 durante o início da gestação seja um mecanismo natural e necessário para o desenvolvimento adequado do esqueleto, uma vez que, na fase inicial do desenvolvimento esquelético, níveis aumentados de hormônios tireoideanos parecem ser mais deletérios do que a deficiência hormonal. [11, 77, 271].

Sabe-se que os diferentes transportadores de membrana e as selenodesiodases das iodotironinas são capazes de modular o nível intracelular e das iodotironinas, assim, regulando localmente seus efeitos nos tecidos alvo. [25, 42, 43, 149, 151, 164, 168]. Porém, pouco se sabe sobre a participação desses mecanismos regulatórios no desenvolvimento ósseo fetal.

A expressão gênica dos transportadores de membrana, caracterizados como mediadores do influxo e efluxo das iodotironinas (LAT1, LAT2, MCT8, NTCP e OATP) [177], foi investigada no fêmur dos fetos durante o desenvolvimento fetal e pós-natal por PCR em tempo-real. O RNAm do MCT8, LAT1 e LAT2 foi detectado em todas as idades estudadas, tanto durante o período pré quanto pós-natal (14,5E, 16,5E e 18,5E; 4PN, 7PN, 14PN e 35PN) (Fig. 25, 26 e 27). Vale ressaltar que esta é a primeira vez que a expressão do RNAm desses transportadores é descrita no tecido ósseo *in vivo*.

A expressão relativa do RNAm do LAT1 (Fig. 27A e 27B) e do LAT2 (Fig. 27C e 27D) no esqueleto foi estável durante o desenvolvimento fetal e pós-natal em ambos os grupos, isto é, não foi modulada em função do grau de maturação tecidual ou pelo nível reduzido das iodotironinas. A única exceção foi o LAT1, cuja expressão gênica foi regulada negativamente em 35PN (Fig. 27B). Outros estudos são necessários para que se determine a real participação dos LATs na ação dos hormônios tireoideanos sobre o tecido ósseo. Os transportadores de aminoácidos LAT1 e LAT2 foram previamente identificados em uma série de outros tecidos adultos [165], mas ainda não tinham sido detectados no tecido ósseo.

A expressão do RNAm do MCT8 no fêmur foi regulada negativamente em função da maturação tecidual (Fig. 25). Durante o desenvolvimento fetal, a expressão gênica do MCT8 apresentou uma tendência à redução entre 14,5E e 18,5E. Porém, durante o desenvolvimento pós-natal, a redução da expressão foi crescente e significativa (~5-fold; $p < 0,001$) entre 4PN e 35PN, em ambos os grupos (Fig. 25). Igualmente interessante foi o fato da expressão do RNAm do MCT8 ter sido modulada pelo T3 no fêmur durante o desenvolvimento pós-natal. A redução dos níveis de T3 e T4 promoveu o aumento do RNAm do MCT8, enquanto o

tratamento com dose suprafisiológica de T3 (20xT3) reduziu a expressão do RNAm no esqueleto dos camundongos, entre 4PN e 35PN (Fig. 25B e 26). Esses resultados estão de acordo com experimentos *in vitro* desenvolvidos pelo nosso grupo, onde o tratamento de células de linhagem osteoblástica (MC3T3-E1) com T3 reduziu significativamente a expressão do RNAm do MCT8 após 6 e 9 dias de tratamento (dados não publicados). Considerando-se que a sequência do gene do MCT8 foi analisada com o auxílio de ferramentas de bioinformática e resultados preliminares demonstraram não haver TRE no promotor do gene, é possível que a regulação da expressão gênica do MCT8 pelo T3 ocorra a nível pós-transcricional (e.g. aumentado a estabilidade do RNAm), ou que ocorra de maneira indireta, ou seja, é possível que o T3 induza ou reprima a expressão de outros genes que participem da regulação da expressão do MCT8. De qualquer forma, o mecanismo de regulação através do qual o T3 regula a expressão gênica do MCT8 permanece para ser estudado.

Aparentemente, modelos animais com deleção do MCT8 (MCT8^{-y}) não apresentam alteração óssea notável, entretanto, o esqueleto desses modelos ainda não foi estudado [31]. Sabe-se que, apesar do MCT8 ser expresso em condrócitos, osteoblastos e osteoclastos [177], animais MCT8^{-y} não apresentam sequer alteração do crescimento longitudinal. Uma possibilidade é a de que outros transportadores (e.g. LAT1 e LAT2) possam compensar a ausência do MCT8 no tecido ósseo, impedindo assim que seja gerada qualquer alteração evidente. Os transportadores de ânions orgânicos, OATP e NTCP, não tiveram seu RNAm detectado no esqueleto fetal, mas sua expressão foi detectada no cérebro e fígado dos fetos, respectivamente, utilizados como controles positivos (dados não mostrados).

Embora não conheçamos ainda a expressão protéica ou atividade funcional dos transportadores das iodotironinas nos tecidos, demonstramos a expressão do RNAm dos transportadores de aminoácidos no fêmur em desenvolvimento e sugerimos que estes tenham um papel relevante no desenvolvimento ósseo fetal. De fato, acreditamos que esses resultados contribuam para o melhor entendimento da ação dos hormônios tireoideanos no osso em desenvolvimento. Recentemente, Williams *et al.* demonstraram a expressão protéica do MCT8 em osteoblastos em diferenciação, em osteoclastos e condrócitos, o que reafirma a hipótese de que o MCT8 contribua para a ação das iodotironinas no desenvolvimento ósseo [177].

A expressão do RNAm da D1, D2 e D3 também foi investigada por PCR em tempo-real no esqueleto fetal e pós-natal (Fig. 28 e 29). O padrão de expressão do RNAm das três desidases no osso forneceu informações que contribuíram grandemente para o melhor entendimento do mecanismo de ação das iodotironinas no processo de formação e desenvolvimento ósseo durante a gestação e no desenvolvimento ósseo pós-natal.

A expressão do RNAm da selenodesiodase do tipo I (D1) foi detectado em todas as idades fetais e pós-natais avaliadas (14,5E, 16,5E e 18,5E; 4PN, 7PN, 14PN e 35PN). Curiosamente, durante o desenvolvimento fetal, a expressão gênica do *Dio1* (gene que condifica a D1) no osso foi significativamente menor que a expressão do *Dio2* e *Dio3* (genes que codificam a D2 e D3, respectivamente) (Fig. 28A). O mesmo padrão de expressão foi observado durante o desenvolvimento ósseo pós-natal (Fig. 28A). Bates *et al.* também observaram a menor expressão do RNAm da D1 nos tecidos fetais em comparação à expressão do RNAm da D2 e D3 [43]. Os nossos resultados, somados à literatura existente, sugerem que a D1 tenha função determinante após o nascimento e durante a vida adulta, sendo a D2 e D3 as desidases com função mais relevante durante o desenvolvimento ósseo fetal [25, 47, 53, 189].

Os maiores níveis do RNAm da D3, principal inativadora do T4 e T3 (se considerarmos a ação genômica dos hormônios tiroideanos), foram encontrados em 14,5E. A expressão relativa do RNAm da D3 foi reduzido ~5 vezes entre 14,5E e 16,5E, e mais 3 vezes entre 16,5E e 18,5E (Fig. 29A). No mesmo período, a expressão do RNAm da D2 manteve-se estável (Fig. 29A). A alta expressão do *Dio3* em 14,5E e a falta de efeitos deletérios causados pelo hipotireoidismo sugerem que a oferta reduzida de iodotironinas neste estágio do desenvolvimento seja necessária para o desenvolvimento normal do osso, que nessa idade ainda é um molde cartilaginoso em início de ossificação (Fig. 14). Nossas observações corroboram os achados de outros grupos que demonstraram que a D3 presente nos tecidos fetais, e não apenas no útero e placenta, tem a função de impedir a exposição prematura desses tecidos aos hormônios tiroideanos e evitar que a concentração hormonal aumentada afete negativamente o decorrer do desenvolvimento [43, 51, 53, 230]. De fato, animais com deleção do gene *Dio3* (D3KO) manifestam anormalidades graves relacionadas ao controle do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide, ao desenvolvimento e reprodução, incluindo hipotireoidismo congênito, retardo do crescimento e infertilidade [51]. Curiosamente, a redução da expressão do RNAm da D3, detectada entre 14,5E e 18,5E (~10 vezes) (Fig. 29A),

coincide com a observação das primeiras evidências de efeitos deletérios causados pelo hipotireoidismo, entre 16,5E e 18,5E (Fig. 15 e 16), período no qual ocorre o aumento dos níveis de T3 e T4 durante o desenvolvimento fetal (Fig. 5C e 5D). Esses achados sugerem que os hormônios tireoideanos atuem no osso fetal de maneira crescente e diretamente proporcional ao avanço do desenvolvimento intra-uterino e que, a diminuição da expressão do Dio3 favoreça a ação dos hormônios tireoideanos no osso em desenvolvimento.

O estudo das desidrases nas idades pós-natais mostrou que, entre 4PN e 35PN, quando os hormônios tireoideanos assumem um papel essencial no desenvolvimento e crescimento ósseo, a expressão do RNAm da D3 diminui significativamente (~3 vezes), não sendo mais detectada em 35PN (Fig. 29B). No mesmo período, a expressão do RNAm da D2 é detectada em todas as idades PN, sendo observado um pico de expressão em 14PN (~3 vezes), período em que a ossificação secundária das epífises está em franco desenvolvimento (Fig. 29B). Esse fato chama a atenção e sugere que, assim como a D3 parece ser fundamental para o desenvolvimento ósseo fetal normal, talvez a D2 também o seja para o desenvolvimento e crescimento ósseo pós-natal.

A expressão do Dio2 e Dio3 e a atividade de D2 e D3 foram reguladas de acordo com os níveis de T3 e T4, conforme descrito em outros tecidos (Fig. 30) [42, 183]. Uma observação importante foi a de que, em 18,5E, a expressão do RNAm da D2 é idêntica nos fêmures do grupo HIPO e EUT. Entretanto, a atividade enzimática foi estimulada no grupo HIPO. A detecção da expressão do RNAm de WSB-1 e VDU-1, duas moléculas envolvidas com a regulação da D2 pelo sistema ubiquitina-proteassoma, e a redução da expressão do WSB-1 no grupo HIPO sugerem que haja um mecanismo de regulação pós-traducional da D2 no osso fetal de camundongos, assim como demonstrado por outros autores na tíbia de embriões de galinha (Fig.31) [48].

Nosso estudo mostrou que, apesar da presença de TRs e de transportadores de membrana de iodotironinas em todas as idades fetais estudadas, a redução dos níveis de T3 e T4 afetaram apenas minimamente o desenvolvimento ósseo até 18,5E. O padrão de expressão gênica da D3, associado à falta de efeitos deletérios antes dessa idade, indica que os níveis de T3 e T4 devam ser mantidos baixos no esqueleto durante o desenvolvimento fetal, e que é a D3 quem atua em prol dessa condição. Enquanto a expressão da D3 é reduzida, entre 16,5E e 18,5E, o aumento da ação das iodotironinas parece ser fundamental, uma vez que a redução dos níveis séricos de T3 e T4 induziu efeitos deletérios, como redução da diferenciação de

condrócitos e desorganização da zona proliferativa nas LEs, observados claramente em 18,5E. O aumento do RNAm da D2 durante o desenvolvimento pós-natal destaca sua importância na regulação dos efeitos das iodotironinas no desenvolvimento e crescimento ósseos.

Acreditamos que este seja o primeiro estudo a demonstrar *in vivo* que a D2 e D3 apresentam um padrão temporal de expressão gênica no osso fetal. Este dado sugere fortemente que, a D2 e D3 tenham um importante papel no desenvolvimento esquelético fetal, regulando finamente a exposição dos tecidos a níveis apropriados dos hormônios tireoideanos para assegurar um desenvolvimento ósseo fetal normal.

7 CONCLUSÃO

a- Por não terem sido observadas alterações no esqueleto de fetos hipotireoideos durante as fases de formação do molde cartilaginoso e início da ossificação endocondral e intramembranosa, concluimos que os hormônios tireoideanos não desempenham um papel fundamental durante essas fases do desenvolvimento, mas passem a ter função determinante no final da gestação e durante o desenvolvimento ósseo pós-natal, quando a redução da oferta dos hormônios tireoideanos teve efeito deletério sobre a morfologia óssea e a expressão de genes envolvidos com a ossificação, causando grave atraso do desenvolvimento e crescimento ósseo.

b- Considerando-se o padrão de expressão das selenodesiodases das iodotironinas no osso em desenvolvimento, concluimos que a D3 possa ser responsável por manter baixos os níveis das iodotironinas na fase de formação do molde cartilaginoso e início da ossificação endocondral, aproximadamente entre 12,5E e 16,5E. Dessa forma, a D3 limitaria a exposição prematura do tecido ósseo fetal a níveis inadequados dos hormônios tireoideanos, garantindo assim o desenvolvimento esquelético fetal normal. Por outro lado, o fato da expressão da D2 ser estável no osso durante o desenvolvimento fetal e aumentar significativamente durante o desenvolvimento pós-natal nos leva a concluir que a D2 seja importante para a manutenção local de níveis adequados de T3 no osso ao longo do desenvolvimento, principalmente no período pós-natal, durante o desenvolvimento da ossificação secundária.

c- A expressão do LAT1, LAT2 e MCT8 foi detectada no esqueleto em todas as idades estudadas, entre 14,5E e 35PN. Entretanto, OATP e NTCP não foram detectados no esqueleto em desenvolvimento. Esses achados sugerem que transportadores de aminoácidos façam parte do mecanismo de ação dos hormônios tireoideanos no osso, mas não os transportadores de ânions orgânicos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Brent GA, Moore DD, Larsen PR. Thyroid hormone regulation of gene expression. *Annu Rev Physiol.* 1991;53:17-35.
- [2] Katz D, Lazar MA. Dominant negative activity of an endogenous thyroid hormone receptor variant (alpha 2) is due to competition for binding sites on target genes. *J Biol Chem.* 1993 Oct 5;268(28):20904-10.
- [3] Rizzoli R, Poser J, Burgi U. Nuclear thyroid hormone receptors in cultured bone cells. *Metabolism.* 1986 Jan;35(1):71-4.
- [4] Sato K, Han DC, Fujii Y, Tsushima T, Shizume K. Thyroid hormone stimulates alkaline phosphatase activity in cultured rat osteoblastic cells (ROS 17/2.8) through 3,5,3'-triiodo-L-thyronine nuclear receptors. *Endocrinology.* 1987 May;120(5):1873-81.
- [5] LeBron BA, Pekary AE, Mirell C, Hahn TJ, Hershman JM. Thyroid hormone 5'-deiodinase activity, nuclear binding, and effects on mitogenesis in UMR-106 osteoblastic osteosarcoma cells. *J Bone Miner Res.* 1989 Apr;4(2):173-8.
- [6] Kasono K, Sato K, Han DC, Fujii Y, Tsushima T, Shizume K. Stimulation of alkaline phosphatase activity by thyroid hormone in mouse osteoblast-like cells (MC3T3-E1): a possible mechanism of hyperalkaline phosphatasia in hyperthyroidism. *Bone Miner.* 1988 Sep;4(4):355-63.
- [7] Allain TJ, Matenga JA, Gomo Z, Adamchak DJ, Wilson AO. Determinants of happiness and life satisfaction in elderly Zimbabweans. *Cent Afr J Med.* 1996 Nov;42(11):308-11.
- [8] Abu EO, Bord S, Horner A, Chatterjee VK, Compston JE. The expression of thyroid hormone receptors in human bone. *Bone.* 1997 Aug;21(2):137-42.
- [9] Robson H, Siebler T, Stevens DA, Shalet SM, Williams GR. Thyroid hormone acts directly on growth plate chondrocytes to promote hypertrophic differentiation and inhibit clonal expansion and cell proliferation. *Endocrinology.* 2000 Oct;141(10):3887-97.
- [10] Allain TJ, McGregor AM. Thyroid hormones and bone. *J Endocrinol.* 1993 Oct;139(1):9-18.
- [11] O'Shea PJ, Harvey CB, Suzuki H, Kaneshige M, Kaneshige K, Cheng SY, et al. A thyrotoxic skeletal phenotype of advanced bone formation in mice with resistance to thyroid hormone. *Mol Endocrinol.* 2003 Jul;17(7):1410-24.
- [12] Harvey CB, Stevens DA, Williams AJ, Jackson DJ, O'Shea P, Williams GR. Analysis of thyroid hormone responsive gene expression in osteoblastic cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2003 Dec 31;213(1):87-97.

- [13] Stevens DA, Hasserjian RP, Robson H, Siebler T, Shalet SM, Williams GR. Thyroid hormones regulate hypertrophic chondrocyte differentiation and expression of parathyroid hormone-related peptide and its receptor during endochondral bone formation. *J Bone Miner Res.* 2000 Dec;15(12):2431-42.
- [14] Freitas FR, Capelo LP, O'Shea PJ, Jorgetti V, Moriscot AS, Scanlan TS, et al. The thyroid hormone receptor beta-specific agonist GC-1 selectively affects the bone development of hypothyroid rats. *J Bone Miner Res.* 2005 Feb;20(2):294-304.
- [15] Bassett JH, Nordstrom K, Boyde A, Howell PG, Kelly S, Vennstrom B, et al. Thyroid status during skeletal development determines adult bone structure and mineralization. *Mol Endocrinol.* 2007 Aug;21(8):1893-904.
- [16] Radetti G, Zavallone A, Gentili L, Beck-Peccoz P, Bona G. Foetal and neonatal thyroid disorders. *Minerva Pediatr.* 2002 Oct;54(5):383-400.
- [17] Morreale de Escobar G, Obregon MJ, Escobar del Rey F. Fetal and maternal thyroid hormones. *Horm Res.* 1987;26(1-4):12-27.
- [18] Schwab KO, Sohlemann P, Gerlich M, Broecker M, Petrykowski W, Holzapfel HP, et al. Mutations of the TSH receptor as cause of congenital hyperthyroidism. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 1996;104 Suppl 4:124-8.
- [19] Nishihara E, Fukata S, Hishinuma A, Kudo T, Ohye H, Ito M, et al. Sporadic congenital hyperthyroidism due to a germline mutation in the thyrotropin receptor gene (Leu 512 Gln) in a Japanese patient. *Endocr J.* 2006 Dec;53(6):735-40.
- [20] Morreale de Escobar G, Obregon MJ, Escobar del Rey F. Role of thyroid hormone during early brain development. *Eur J Endocrinol.* 2004 Nov;151 Suppl 3:U25-37.
- [21] Ng L, Goodyear RJ, Woods CA, Schneider MJ, Diamond E, Richardson GP, et al. Hearing loss and retarded cochlear development in mice lacking type 2 iodothyronine deiodinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Mar 9;101(10):3474-9.
- [22] Bassett JH, Harvey CB, Williams GR. Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. *Mol Cell Endocrinol.* 2003 Dec 31;213(1):1-11.
- [23] Steele RE, Wekstein DR. Influence of thyroid hormone on homeothermic development of the rat. *Am J Physiol.* 1972 Jun;222(6):1528-33.
- [24] Williams GR. Neurodevelopmental and neurophysiological actions of thyroid hormone. *J Neuroendocrinol.* 2008 Jun;20(6):784-94.
- [25] Galton VA. The roles of the iodothyronine deiodinases in mammalian development. *Thyroid.* 2005 Aug;15(8):823-34.

- [26] Lewinson D, Harel Z, Shenzer P, Silbermann M, Hochberg Z. Effect of thyroid hormone and growth hormone on recovery from hypothyroidism of epiphyseal growth plate cartilage and its adjacent bone. *Endocrinology*. 1989 Feb;124(2):937-45.
- [27] Shao YY, Wang L, Ballock RT. Thyroid hormone and the growth plate. *Rev Endocr Metab Disord*. 2006 Dec;7(4):265-71.
- [28] LaFranchi SH, Austin J. How should we be treating children with congenital hypothyroidism? *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2007 May;20(5):559-78.
- [29] Friesema EC, Docter R, Moerings EP, Stieger B, Hagenbuch B, Meier PJ, et al. Identification of thyroid hormone transporters. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Jan 19;254(2):497-501.
- [30] Friesema EC, Ganguly S, Abdalla A, Manning Fox JE, Halestrap AP, Visser TJ. Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *J Biol Chem*. 2003 Oct 10;278(41):40128-35.
- [31] Dumitrescu AM, Liao XH, Weiss RE, Millen K, Refetoff S. Tissue-specific thyroid hormone deprivation and excess in monocarboxylate transporter (mct) 8-deficient mice. *Endocrinology*. 2006 Sep;147(9):4036-43.
- [32] Peeters RP, Friesema EC, Docter R, Hennemann G, Visser TJ. Effects of thyroid state on the expression of hepatic thyroid hormone transporters in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002 Dec;283(6):E1232-8.
- [33] Heuer H, Maier MK, Iden S, Mittag J, Friesema EC, Visser TJ, et al. The monocarboxylate transporter 8 linked to human psychomotor retardation is highly expressed in thyroid hormone-sensitive neuron populations. *Endocrinology*. 2005 Apr;146(4):1701-6.
- [34] Taylor PM, Ritchie JW. Tissue uptake of thyroid hormone by amino acid transporters. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2007 Jun;21(2):237-51.
- [35] Dumitrescu AM, Liao XH, Best TB, Brockmann K, Refetoff S. A novel syndrome combining thyroid and neurological abnormalities is associated with mutations in a monocarboxylate transporter gene. *Am J Hum Genet*. 2004 Jan;74(1):168-75.
- [36] Friesema EC, Grueters A, Biebermann H, Krude H, von Moers A, Reeser M, et al. Association between mutations in a thyroid hormone transporter and severe X-linked psychomotor retardation. *Lancet*. 2004 Oct 16-22;364(9443):1435-7.
- [37] Schwartz CE, May MM, Carpenter NJ, Rogers RC, Martin J, Bialer MG, et al. Allan-Herndon-Dudley syndrome and the monocarboxylate transporter 8 (MCT8) gene. *Am J Hum Genet*. 2005 Jul;77(1):41-53.
- [38] Maranduba CM, Friesema EC, Kok F, Kester MH, Jansen J, Sertie AL, et al. Decreased cellular uptake and metabolism in Allan-Herndon-Dudley syndrome (AHDS) due to a novel mutation in the MCT8 thyroid hormone transporter. *J Med Genet*. 2006 May;43(5):457-60.

- [39] Lazar MA. Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocr Rev.* 1993 Apr;14(2):184-93.
- [40] Motomura K, Brent GA. Mechanisms of thyroid hormone action. Implications for the clinical manifestation of thyrotoxicosis. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1998 Mar;27(1):1-23.
- [41] Engler D, Burger AG. The deiodination of the iodothyronines and of their derivatives in man. *Endocr Rev.* 1984 Spring;5(2):151-84.
- [42] Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev.* 2002 Feb;23(1):38-89.
- [43] Bates JM, St Germain DL, Galton VA. Expression profiles of the three iodothyronine deiodinases, D1, D2, and D3, in the developing rat. *Endocrinology.* 1999 Feb;140(2):844-51.
- [44] Bates JM, Spate VL, Morris JS, St Germain DL, Galton VA. Effects of selenium deficiency on tissue selenium content, deiodinase activity, and thyroid hormone economy in the rat during development. *Endocrinology.* 2000 Jul;141(7):2490-500.
- [45] Becker KB, Stephens KC, Davey JC, Schneider MJ, Galton VA. The type 2 and type 3 iodothyronine deiodinases play important roles in coordinating development in *Rana catesbeiana* tadpoles. *Endocrinology.* 1997 Jul;138(7):2989-97.
- [46] Miura M, Tanaka K, Komatsu Y, Suda M, Yasoda A, Sakuma Y, et al. Thyroid hormones promote chondrocyte differentiation in mouse ATDC5 cells and stimulate endochondral ossification in fetal mouse tibias through iodothyronine deiodinases in the growth plate. *J Bone Miner Res.* 2002 Mar;17(3):443-54.
- [47] Gouveia CH, Christoffolete MA, Zaitune CR, Dora JM, Harney JW, Maia AL, et al. Type 2 iodothyronine selenodeiodinase is expressed throughout the mouse skeleton and in the MC3T3-E1 mouse osteoblastic cell line during differentiation. *Endocrinology.* 2005 Jan;146(1):195-200.
- [48] Dentice M, Bandyopadhyay A, Gereben B, Callebaut I, Christoffolete MA, Kim BW, et al. The Hedgehog-inducible ubiquitin ligase subunit WSB-1 modulates thyroid hormone activation and PTHrP secretion in the developing growth plate. *Nat Cell Biol.* 2005 Jul;7(7):698-705.
- [49] Dentice M, Luongo C, Huang S, Ambrosio R, Elefante A, Mirebeau-Prunier D, et al. Sonic hedgehog-induced type 3 deiodinase blocks thyroid hormone action enhancing proliferation of normal and malignant keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Sep 4;104(36):14466-71.
- [50] Hernandez A, Martinez ME, Liao XH, Van Sande J, Refetoff S, Galton VA, et al. Type 3 deiodinase deficiency results in functional abnormalities at multiple levels of the thyroid axis. *Endocrinology.* 2007 Dec;148(12):5680-7.

- [51] Hernandez A, Martinez ME, Fiering S, Galton VA, St Germain D. Type 3 deiodinase is critical for the maturation and function of the thyroid axis. *J Clin Invest.* 2006 Feb;116(2):476-84.
- [52] Hernandez A, Fiering S, Martinez E, Galton VA, St Germain D. The gene locus encoding iodothyronine deiodinase type 3 (Dio3) is imprinted in the fetus and expresses antisense transcripts. *Endocrinology.* 2002 Nov;143(11):4483-6.
- [53] Huang TS, Chopra IJ, Boado R, Solomon DH, Chua Teco GN. Thyroxine inner ring monodeiodinating activity in fetal tissues of the rat. *Pediatr Res.* 1988 Feb;23(2):196-9.
- [54] Baron R. General Principles of Bone Biology. In: Favus MJ, ed. *Primer on the bone metabolic bone disease and disorders of mineral metabolism.* 5th ed. Washington ASBMR 2003:1-8.
- [55] Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, et al. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell.* 2000 Jan 21;100(2):197-207.
- [56] Takeda S, Eleftheriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, et al. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell.* 2002 Nov 1;111(3):305-17.
- [57] Papaioannou A, Kennedy CC, Freitag A, O'Neill J, Pui M, Ioannidis G, et al. Longitudinal analysis of vertebral fracture and BMD in a Canadian cohort of adult cystic fibrosis patients. *BMC Musculoskelet Disord.* 2008 Sep 19;9(1):125.
- [58] Bar-Shavit Z. Taking a toll on the bones: regulation of bone metabolism by innate immune regulators. *Autoimmunity.* 2008 Apr;41(3):195-203.
- [59] Wu Y, Humphrey MB, Nakamura MC. Osteoclasts - the innate immune cells of the bone. *Autoimmunity.* 2008 Apr;41(3):183-94.
- [60] Junqueira LCC, J. *Histologia básica.* 9th ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan 1999.
- [61] Karsenty G. The complexities of skeletal biology. *Nature.* 2003 May 15;423(6937):316-8.
- [62] Gilbert SF, ed. *Developmental biology.* 8th ed. Sunderland: Sinauer Associates 2006.
- [63] Olsen BR. Bone morphogenesis and embryological development. In: Favus MJ, ed. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism.* 5th ed. Washington: ASBMR 2003.
- [64] Karsenty G, Wagner EF. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell.* 2002 Apr;2(4):389-406.
- [65] Olsen BR, Reginato AM, Wang W. Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000;16:191-220.

- [66] Helms JA, Schneider RA. Cranial skeletal biology. *Nature*. 2003 May 15;423(6937):326-31.
- [67] Williams PLW, R.; Dyson, M.; Bannister, L.H., ed. *Gray Anatomia*. 30th ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan 1995.
- [68] Jiang X, Iseki S, Maxson RE, Sucov HM, Morriss-Kay GM. Tissue origins and interactions in the mammalian skull vault. *Dev Biol*. 2002 Jan 1;241(1):106-16.
- [69] Hall BK. Tissue interactions and the initiation of osteogenesis and chondrogenesis in the neural crest-derived mandibular skeleton of the embryonic mouse as seen in isolated murine tissues and in recombinations of murine and avian tissues. *J Embryol Exp Morphol*. 1980 Aug;58:251-64.
- [70] Abzhanov A, Rodda SJ, McMahon AP, Tabin CJ. Regulation of skeletogenic differentiation in cranial dermal bone. *Development*. 2007 Sep;134(17):3133-44.
- [71] Gagan JR, Tholpady SS, Ogle RC. Cellular dynamics and tissue interactions of the dura mater during head development. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2007 Dec;81(4):297-304.
- [72] Hall BK. Patterning of connective tissues in the head: discussion report. *Development*. 1988;103 Suppl:171-4.
- [73] Leucht P, Minear S, Ten Berge D, Nusse R, Helms JA. Translating insights from development into regenerative medicine: The function of Wnts in bone biology. *Semin Cell Dev Biol*. 2008 Sep 7.
- [74] Hu D, Helms JA. The role of sonic hedgehog in normal and abnormal craniofacial morphogenesis. *Development*. 1999 Nov;126(21):4873-84.
- [75] Ahlgren SC, Thakur V, Bronner-Fraser M. Sonic hedgehog rescues cranial neural crest from cell death induced by ethanol exposure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Aug 6;99(16):10476-81.
- [76] Keeler RF, Binns W. Teratogenic compounds of *Veratrum californicum* (Durand). V. Comparison of cyclopic effects of steroidal alkaloids from the plant and structurally related compounds from other sources. *Teratology*. 1968 Feb;1(1):5-10.
- [77] O'Shea PJ, Bassett JH, Sriskantharajah S, Ying H, Cheng SY, Williams GR. Contrasting skeletal phenotypes in mice with an identical mutation targeted to thyroid hormone receptor alpha1 or beta. *Mol Endocrinol*. 2005 Dec;19(12):3045-59.
- [78] Lefebvre V, Smits P. Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2005 Sep;75(3):200-12.

- [79] Bandyopadhyay A, Tsuji K, Cox K, Harfe BD, Rosen V, Tabin CJ. Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. *PLoS Genet.* 2006 Dec;2(12):e216.
- [80] Hall BK, Miyake T. Divide, accumulate, differentiate: cell condensation in skeletal development revisited. *Int J Dev Biol.* 1995 Dec;39(6):881-93.
- [81] Enomoto H, Enomoto-Iwamoto M, Iwamoto M, Nomura S, Himeno M, Kitamura Y, et al. *Cbfa1* is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation. *J Biol Chem.* 2000 Mar 24;275(12):8695-702.
- [82] Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature.* 2003 May 15;423(6937):332-6.
- [83] Wu LN, Wuthier MG, Genge BR, Wuthier RE. In situ levels of intracellular Ca^{2+} and pH in avian growth plate cartilage. *Clin Orthop Relat Res.* 1997 Feb(335):310-24.
- [84] Razzaque MS, Soegiarto DW, Chang D, Long F, Lanske B. Conditional deletion of Indian hedgehog from collagen type 2 α 1-expressing cells results in abnormal endochondral bone formation. *J Pathol.* 2005 Dec;207(4):453-61.
- [85] Shapiro IM, Golub EE, Kakuta S, Hazelgrove J, Havery J, Chance B, et al. Initiation of endochondral calcification is related to changes in the redox state of hypertrophic chondrocytes. *Science.* 1982 Sep 3;217(4563):950-2.
- [86] Hatori M, Klatte KJ, Teixeira CC, Shapiro IM. End labeling studies of fragmented DNA in the avian growth plate: evidence of apoptosis in terminally differentiated chondrocytes. *J Bone Miner Res.* 1995 Dec;10(12):1960-8.
- [87] Rajpurohit R, Mansfield K, Ohyama K, Ewert D, Shapiro IM. Chondrocyte death is linked to development of a mitochondrial membrane permeability transition in the growth plate. *J Cell Physiol.* 1999 Jun;179(3):287-96.
- [88] Bruder SP, Caplan AI. Cellular and molecular events during embryonic bone development. *Connect Tissue Res.* 1989;20(1-4):65-71.
- [89] St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev.* 1999 Aug 15;13(16):2072-86.
- [90] Alvarez J, Costales L, Serra R, Balbin M, Lopez JM. Expression patterns of matrix metalloproteinases and vascular endothelial growth factor during epiphyseal ossification. *J Bone Miner Res.* 2005 Jun;20(6):1011-21.
- [91] van der Eerden BC, Karperien M, Wit JM. Systemic and local regulation of the growth plate. *Endocr Rev.* 2003 Dec;24(6):782-801.
- [92] Chagin AS, Savendahl L. Estrogens and growth: review. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2007 Jun;4(4):329-34.

- [93] Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrughe B. Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet.* 1999 May;22(1):85-9.
- [94] Naski MC, Colvin JS, Coffin JD, Ornitz DM. Repression of hedgehog signaling and BMP4 expression in growth plate cartilage by fibroblast growth factor receptor 3. *Development.* 1998 Dec;125(24):4977-88.
- [95] Karaplis AC, Luz A, Glowacki J, Bronson RT, Tybulewicz VL, Kronenberg HM, et al. Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene. *Genes Dev.* 1994 Feb 1;8(3):277-89.
- [96] Lanske B, Karaplis AC, Lee K, Luz A, Vortkamp A, Pirro A, et al. PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science.* 1996 Aug 2;273(5275):663-6.
- [97] Kobayashi T, Kronenberg H. Minireview: transcriptional regulation in development of bone. *Endocrinology.* 2005 Mar;146(3):1012-7.
- [98] Kobayashi T, Kronenberg HM, Foley J. Reduced expression of the PTH/PTHrP receptor during development of the mammary gland influences the function of the nipple during lactation. *Dev Dyn.* 2005 Jul;233(3):794-803.
- [99] Kobayashi T, Lyons KM, McMahon AP, Kronenberg HM. BMP signaling stimulates cellular differentiation at multiple steps during cartilage development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Dec 13;102(50):18023-7.
- [100] Kobayashi T, Soegiarto DW, Yang Y, Lanske B, Schipani E, McMahon AP, et al. Indian hedgehog stimulates periarticular chondrocyte differentiation to regulate growth plate length independently of PTHrP. *J Clin Invest.* 2005 Jul;115(7):1734-42.
- [101] Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, et al. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell.* 1997 May 30;89(5):765-71.
- [102] Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell.* 1997 May 30;89(5):755-64.
- [103] Waddington RJ, Roberts HC, Sugars RV, Schonherr E. Differential roles for small leucine-rich proteoglycans in bone formation. *European cells & materials.* 2003 Oct 6;6:12-21; discussion
- [104] Young MF, Bi Y, Ameye L, Chen XD. Biglycan knockout mice: new models for musculoskeletal diseases. *Glycoconjugate journal.* 2002 May-Jun;19(4-5):257-62.

- [105] Wang Y, Nishida S, Sakata T, Elalieh HZ, Chang W, Halloran BP, et al. Insulin-like growth factor-I is essential for embryonic bone development. *Endocrinology*. 2006 Oct;147(10):4753-61.
- [106] Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell*. 1993 Oct 8;75(1):59-72.
- [107] Powell-Braxton L, Hollingshead P, Warburton C, Dowd M, Pitts-Meek S, Dalton D, et al. IGF-I is required for normal embryonic growth in mice. *Genes Dev*. 1993 Dec;7(12B):2609-17.
- [108] Barnard JC, Williams AJ, Rabier B, Chassande O, Samarut J, Cheng SY, et al. Thyroid hormones regulate fibroblast growth factor receptor signaling during chondrogenesis. *Endocrinology*. 2005 Dec;146(12):5568-80.
- [109] Bassett JH, Swinhoe R, Chassande O, Samarut J, Williams GR. Thyroid hormone regulates heparan sulfate proteoglycan expression in the growth plate. *Endocrinology*. 2006 Jan;147(1):295-305.
- [110] Robson H, Siebler T, Shalet SM, Williams GR. Interactions between GH, IGF-I, glucocorticoids, and thyroid hormones during skeletal growth. *Pediatr Res*. 2002 Aug;52(2):137-47.
- [111] Kronenberg HM. *Williams Textbook of Endocrinology*: Saunders, printed by Elsevier 2008.
- [112] Neale DM, Cootauco AC, Burrow G. Thyroid disease in pregnancy. *Clin Perinatol*. 2007 Dec;34(4):543-57, v-vi.
- [113] Moore K. *Embriologia Clínica*. 5 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara 2000.
- [114] Rugh R. *The mouse: its reproduction and development*. Minneapolis: Burgess Publishing Company 1968.
- [115] Brown RS, Shalhoub V, Coulter S, Alex S, Joris I, De Vito W, et al. Developmental regulation of thyrotropin receptor gene expression in the fetal and neonatal rat thyroid: relation to thyroid morphology and to thyroid-specific gene expression. *Endocrinology*. 2000 Jan;141(1):340-5.
- [116] Choufoer JC, Vanrhijn M, Querido A. Endemic Goiter in Western New Guinea. II. Clinical Picture, Incidence and Pathogenesis of Endemic Cretinism. *J Clin Endocrinol Metab*. 1965 Mar;25:385-402.
- [117] de Escobar GM, Obregon MJ, del Rey FE. Maternal thyroid hormones early in pregnancy and fetal brain development. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2004 Jun;18(2):225-48.

- [118] Obregon MJ, Morreale de Escobar G, Escobar del Rey F. Concentrations of triiodo-L-thyronine in the plasma and tissues of normal rats, as determined by radioimmunoassay: comparison with results obtained by an isotopic equilibrium technique. *Endocrinology*. 1978 Dec;103(6):2145-53.
- [119] Morreale de Escobar G, Pastor R, Obregon MJ, Escobar del Rey F. Effects of maternal hypothyroidism on the weight and thyroid hormone content of rat embryonic tissues, before and after onset of fetal thyroid function. *Endocrinology*. 1985 Nov;117(5):1890-900.
- [120] Morreale de Escobar G, Obregon MJ, Calvo R, Escobar del Rey F. Effects of iodine deficiency on thyroid hormone metabolism and the brain in fetal rats: the role of the maternal transfer of thyroxine. *Am J Clin Nutr*. 1993 Feb;57(2 Suppl):280S-5S.
- [121] Morreale de Escobar G, Obregon MJ, Ruiz de Ona C, Escobar del Rey F. Transfer of thyroxine from the mother to the rat fetus near term: effects on brain 3,5,3'-triiodothyronine deficiency. *Endocrinology*. 1988 Apr;122(4):1521-31.
- [122] Calvo R, Obregon MJ, Escobar del Rey F, Morreale de Escobar G. The rat placenta and the transfer of thyroid hormones from the mother to the fetus. Effects of maternal thyroid status. *Endocrinology*. 1992 Jul;131(1):357-65.
- [123] Vulsma T, Gons MH, de Vijlder JJ. Maternal-fetal transfer of thyroxine in congenital hypothyroidism due to a total organification defect or thyroid agenesis. *N Engl J Med*. 1989 Jul 6;321(1):13-6.
- [124] Galton VA, Wood ET, St Germain EA, Withrow CA, Aldrich G, St Germain GM, et al. Thyroid hormone homeostasis and action in the type 2 deiodinase-deficient rodent brain during development. *Endocrinology*. 2007 Jul;148(7):3080-8.
- [125] Huang SA, Dorfman DM, Genest DR, Salvatore D, Larsen PR. Type 3 iodothyronine deiodinase is highly expressed in the human uteroplacental unit and in fetal epithelium. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Mar;88(3):1384-8.
- [126] Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev*. 2001 Jul;81(3):1097-142.
- [127] Wagner M, Magagin S, Maia AL. The Role of Thyroid Hormone on Testicular Development and Function. *J Endocrinol*. 2008 Aug 26.
- [128] Delange F, de Benoist B, Pretell E, Dunn JT. Iodine deficiency in the world: where do we stand at the turn of the century? *Thyroid*. 2001 May;11(5):437-47.
- [129] Verheesen RH, Schweitzer CM. Iodine deficiency, more than cretinism and goiter. *Med Hypotheses*. 2008 Aug 12.
- [130] Wiersinga WM, Podoba J, Srbecky M, van Vessel M, van Beeren HC, Platvoet-Ter Schiphorst MC. A survey of iodine intake and thyroid volume in Dutch schoolchildren:

reference values in an iodine-sufficient area and the effect of puberty. *Eur J Endocrinol*. 2001 Jun;144(6):595-603.

[131] Gartner R, Manz F, Grossklaus R. Representative data of iodine intake and urinary excretion in Germany. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2001;109(1):2-7.

[132] Vitti P, Rago T, Aghini-Lombardi F, Pinchera A. Iodine deficiency disorders in Europe. *Public Health Nutr*. 2001 Apr;4(2B):529-35.

[133] Laurberg P, Bulow Pedersen I, Knudsen N, Ovesen L, Andersen S. Environmental iodine intake affects the type of nonmalignant thyroid disease. *Thyroid*. 2001 May;11(5):457-69.

[134] Furnee CA, West CE, van Der Haar F, Hautvast JG. Efficacy of oral iodised oil is associated with anthropometric status in severely iodine-deficient schoolchildren in rural Malawi. *Br J Nutr*. 2000 Sep;84(3):345-52.

[135] Kopp P. The TSH receptor and its role in thyroid disease. *Cell Mol Life Sci*. 2001 Aug;58(9):1301-22.

[136] Harvey CB, Williams GR. Mechanism of thyroid hormone action. *Thyroid*. 2002 Jun;12(6):441-6.

[137] Davis PJ, Davis FB, Lawrence WD. Thyroid hormone regulation of membrane Ca^{2+} -ATPase activity. *Endocr Res*. 1989;15(4):651-82.

[138] Goulart da Silva F, Giannocco G, Santos MF, Nunes MT. Thyroid hormone induction of actin polymerization in somatotrophs of hypothyroid rats: potential repercussions in growth hormone synthesis and secretion. *Endocrinology*. 2006 Dec;147(12):5777-85.

[139] Davis PJ, Leonard JL, Davis FB. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Front Neuroendocrinol*. 2008 May;29(2):211-8.

[140] Bell A, Gagnon A, Dods P, Papineau D, Tiberi M, Sorisky A. TSH signaling and cell survival in 3T3-L1 preadipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002 Oct;283(4):C1056-64.

[141] Davies T, Marians R, Latif R. The TSH receptor reveals itself. *J Clin Invest*. 2002 Jul;110(2):161-4.

[142] Klein JR. Physiological relevance of thyroid stimulating hormone and thyroid stimulating hormone receptor in tissues other than the thyroid. *Autoimmunity*. 2003 Sep-Nov;36(6-7):417-21.

[143] Prummel MF, Brokken LJ, Meduri G, Misrahi M, Bakker O, Wiersinga WM. Expression of the thyroid-stimulating hormone receptor in the folliculo-stellate cells of the human anterior pituitary. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000 Nov;85(11):4347-53.

[144] Abe E, Marians RC, Yu W, Wu XB, Ando T, Li Y, et al. TSH is a negative regulator of skeletal remodeling. *Cell*. 2003 Oct 17;115(2):151-62.

- [145] Sampath TK, Simic P, Sendak R, Draca N, Bowe AE, O'Brien S, et al. Thyroid-stimulating hormone restores bone volume, microarchitecture, and strength in aged ovariectomized rats. *J Bone Miner Res*. 2007 Jun;22(6):849-59.
- [146] Bassett JH, Williams AJ, Murphy E, Boyde A, Howell PG, Swinhoe R, et al. A lack of thyroid hormones rather than excess thyrotropin causes abnormal skeletal development in hypothyroidism. *Mol Endocrinol*. 2008 Feb;22(2):501-12.
- [147] Sun L, Vukicevic S, Baliram R, Yang G, Sendak R, McPherson J, et al. Intermittent recombinant TSH injections prevent ovariectomy-induced bone loss. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Mar 18;105(11):4289-94.
- [148] Bassett JH, Williams GR. Critical role of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in bone. *Bone*. 2008 Sep;43(3):418-26.
- [149] Hennemann G, Docter R, Friesema EC, de Jong M, Krenning EP, Visser TJ. Plasma membrane transport of thyroid hormones and its role in thyroid hormone metabolism and bioavailability. *Endocr Rev*. 2001 Aug;22(4):451-76.
- [150] James SR, Franklyn JA, Kilby MD. Placental transport of thyroid hormone. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2007 Jun;21(2):253-64.
- [151] Jansen J, Friesema EC, Milici C, Visser TJ. Thyroid hormone transporters in health and disease. *Thyroid*. 2005 Aug;15(8):757-68.
- [152] Hagenbuch B, Meier PJ. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/ SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/ SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch*. 2004 Feb;447(5):653-65.
- [153] Sugiyama D, Kusuhara H, Taniguchi H, Ishikawa S, Nozaki Y, Aburatani H, et al. Functional characterization of rat brain-specific organic anion transporter (Oatp14) at the blood-brain barrier: high affinity transporter for thyroxine. *J Biol Chem*. 2003 Oct 31;278(44):43489-95.
- [154] Heuer H. The importance of thyroid hormone transporters for brain development and function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2007 Jun;21(2):265-76.
- [155] Friesema EC, Kuiper GG, Jansen J, Visser TJ, Kester MH. Thyroid hormone transport by the human monocarboxylate transporter 8 and its rate-limiting role in intracellular metabolism. *Mol Endocrinol*. 2006 Nov;20(11):2761-72.
- [156] Fujiwara K, Adachi H, Nishio T, Unno M, Tokui T, Okabe M, et al. Identification of thyroid hormone transporters in humans: different molecules are involved in a tissue-specific manner. *Endocrinology*. 2001 May;142(5):2005-12.

- [157] Zhou Y, Samson M, Francon J, Blondeau JP. Thyroid hormone concentrative uptake in rat erythrocytes. Involvement of the tryptophan transport system T in countertransport of tri-iodothyronine and aromatic amino acids. *Biochem J*. 1992 Jan 1;281 (Pt 1):81-6.
- [158] Lakshmanan M, Goncalves E, Lessly G, Foti D, Robbins J. The transport of thyroxine into mouse neuroblastoma cells, NB41A3: the effect of L-system amino acids. *Endocrinology*. 1990 Jun;126(6):3245-50.
- [159] Yan Z, Hinkle PM. Saturable, stereospecific transport of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and L-thyroxine into GH4C1 pituitary cells. *J Biol Chem*. 1993 Sep 25;268(27):20179-84.
- [160] Ritchie JW, Taylor PM. Role of the System L permease LAT1 in amino acid and iodothyronine transport in placenta. *Biochem J*. 2001 Jun 15;356(Pt 3):719-25.
- [161] Okamoto Y, Sakata M, Ogura K, Yamamoto T, Yamaguchi M, Tasaka K, et al. Expression and regulation of 4F2hc and hLAT1 in human trophoblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002 Jan;282(1):C196-204.
- [162] Boado RJ, Li JY, Nagaya M, Zhang C, Pardridge WM. Selective expression of the large neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Oct 12;96(21):12079-84.
- [163] Verrey F, Closs EI, Wagner CA, Palacin M, Endou H, Kanai Y. CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflügers Arch*. 2004 Feb;447(5):532-42.
- [164] Prasad PD, Wang H, Huang W, Kekuda R, Rajan DP, Leibach FH, et al. Human LAT1, a subunit of system L amino acid transporter: molecular cloning and transport function. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Feb 16;255(2):283-8.
- [165] Segawa H, Fukasawa Y, Miyamoto K, Takeda E, Endou H, Kanai Y. Identification and functional characterization of a Na⁺-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. *J Biol Chem*. 1999 Jul 9;274(28):19745-51.
- [166] Kanai Y, Segawa H, Miyamoto K, Uchino H, Takeda E, Endou H. Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J Biol Chem*. 1998 Sep 11;273(37):23629-32.
- [167] Friesema EC, Docter R, Moerings EP, Verrey F, Krenning EP, Hennemann G, et al. Thyroid hormone transport by the heterodimeric human system L amino acid transporter. *Endocrinology*. 2001 Oct;142(10):4339-48.
- [168] Friesema EC, Jansen J, Jachtenberg JW, Visser WE, Kester MH, Visser TJ. Effective cellular uptake and efflux of thyroid hormone by human monocarboxylate transporter 10. *Mol Endocrinol*. 2008 Jun;22(6):1357-69.
- [169] Chan SY, Franklyn JA, Pemberton HN, Bulmer JN, Visser TJ, McCabe CJ, et al. Monocarboxylate transporter 8 expression in the human placenta: the effects of severe intrauterine growth restriction. *J Endocrinol*. 2006 Jun;189(3):465-71.

- [170] Friesema EC, Jansen J, Jachtenberg JW, Visser WE, Kester MH, Visser TJ. Effective cellular uptake and efflux of thyroid hormone by human monocarboxylate transporter 10 (MCT10). *Mol Endocrinol*. 2008 Mar 12.
- [171] de Jesus LA, Carvalho SD, Ribeiro MO, Schneider M, Kim SW, Harney JW, et al. The type 2 iodothyronine deiodinase is essential for adaptive thermogenesis in brown adipose tissue. *J Clin Invest*. 2001 Nov;108(9):1379-85.
- [172] Kim DK, Kanai Y, Matsuo H, Kim JY, Chairoungdua A, Kobayashi Y, et al. The human T-type amino acid transporter-1: characterization, gene organization, and chromosomal location. *Genomics*. 2002 Jan;79(1):95-103.
- [173] Trajkovic M, Visser TJ, Mittag J, Horn S, Lukas J, Darras VM, et al. Abnormal thyroid hormone metabolism in mice lacking the monocarboxylate transporter 8. *J Clin Invest*. 2007 Mar;117(3):627-35.
- [174] Biebermann H, Ambrugger P, Tarnow P, von Moers A, Schweizer U, Grueters A. Extended clinical phenotype, endocrine investigations and functional studies of a loss-of-function mutation A150V in the thyroid hormone specific transporter MCT8. *Eur J Endocrinol*. 2005 Sep;153(3):359-66.
- [175] Friesema EC, Jansen J, Heuer H, Trajkovic M, Bauer K, Visser TJ. Mechanisms of disease: psychomotor retardation and high T3 levels caused by mutations in monocarboxylate transporter 8. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2006 Sep;2(9):512-23.
- [176] Rossier G, Meier C, Bauch C, Summa V, Sordat B, Verrey F, et al. LAT2, a new basolateral 4F2hc/CD98-associated amino acid transporter of kidney and intestine. *J Biol Chem*. 1999 Dec 3;274(49):34948-54.
- [177] Williams AJ, Robson H, Kester MH, van Leeuwen JP, Shalet SM, Visser TJ, et al. Iodothyronine deiodinase enzyme activities in bone. *Bone*. 2008 Jul;43(1):126-34.
- [178] Bianco AC, Larsen PR. Cellular and structural biology of the deiodinases. *Thyroid*. 2005 Aug;15(8):777-86.
- [179] Bianco AC, Kim BW. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J Clin Invest*. 2006 Oct;116(10):2571-9.
- [180] Leonard JL, Visser TJ, Leonard DM. Characterization of the subunit structure of the catalytically active type I iodothyronine deiodinase. *J Biol Chem*. 2001 Jan 26;276(4):2600-7.
- [181] Callebaut I, Curcio-Morelli C, Mornon JP, Gereben B, Buettner C, Huang S, et al. The iodothyronine selenodeiodinases are thioredoxin-fold family proteins containing a glycoside hydrolase clan GH-A-like structure. *J Biol Chem*. 2003 Sep 19;278(38):36887-96.

- [182] Curcio-Morelli C, Gereben B, Zavacki AM, Kim BW, Huang S, Harney JW, et al. In vivo dimerization of types 1, 2, and 3 iodothyronine selenodeiodinases. *Endocrinology*. 2003 Mar;144(3):937-46.
- [183] Curcio-Morelli C, Zavacki AM, Christofollete M, Gereben B, de Freitas BC, Harney JW, et al. Deubiquitination of type 2 iodothyronine deiodinase by von Hippel-Lindau protein-interacting deubiquitinating enzymes regulates thyroid hormone activation. *J Clin Invest*. 2003 Jul;112(2):189-96.
- [184] Kim BW, Zavacki AM, Curcio-Morelli C, Dentice M, Harney JW, Larsen PR, et al. Endoplasmic reticulum-associated degradation of the human type 2 iodothyronine deiodinase (D2) is mediated via an association between mammalian UBC7 and the carboxyl region of D2. *Mol Endocrinol*. 2003 Dec;17(12):2603-12.
- [185] Bianco AC. Triplets! Unexpected structural similarity among the three enzymes that catalyze initiation and termination of thyroid hormone effects. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2004 Feb;48(1):16-24.
- [186] Obregon MJ, Calvo RM, Del Rey FE, de Escobar GM. Ontogenesis of thyroid function and interactions with maternal function. *Endocr Dev*. 2007;10:86-98.
- [187] Miura M, Tanaka K, Komatsu Y, Suda M, Yasoda A, Sakuma Y, et al. A novel interaction between thyroid hormones and 1,25(OH)(2)D(3) in osteoclast formation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Mar 8;291(4):987-94.
- [188] Capelo LP, Beber EH, Huang SA, Zorn TM, Bianco AC, Gouveia CH. Deiodinase-mediated thyroid hormone inactivation minimizes thyroid hormone signaling in the early development of fetal skeleton. *Bone*. 2008 Jul 17.
- [189] Friedrichsen S, Christ S, Heuer H, Schafer MK, Mansouri A, Bauer K, et al. Regulation of iodothyronine deiodinases in the Pax8-/- mouse model of congenital hypothyroidism. *Endocrinology*. 2003 Mar;144(3):777-84.
- [190] Fekkes D, van Overmeeren-Kapteijn E, Docter R, Hennemann G, Visser TJ. Location of rat liver iodothyronine deiodinating enzymes in the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta*. 1979 Sep 20;587(1):12-9.
- [191] Baqui MM, Gereben B, Harney JW, Larsen PR, Bianco AC. Distinct subcellular localization of transiently expressed types 1 and 2 iodothyronine deiodinases as determined by immunofluorescence confocal microscopy. *Endocrinology*. 2000 Nov;141(11):4309-12.
- [192] Oppenheimer JH, Schwartz HL, Surks MI. Propylthiouracil inhibits the conversion of L-thyroxine to L-triiodothyronine. An explanation of the antithyroxine effect of propylthiouracil and evidence supporting the concept that triiodothyronine is the active thyroid hormone. *J Clin Invest*. 1972 Sep;51(9):2493-7.

- [193] Larsen PR, Silva JE, Kaplan MM. Relationships between circulating and intracellular thyroid hormones: physiological and clinical implications. *Endocr Rev.* 1981 Winter;2(1):87-102.
- [194] Bianco AC, Silva JE. Nuclear 3,5,3'-triiodothyronine (T3) in brown adipose tissue: receptor occupancy and sources of T3 as determined by in vivo techniques. *Endocrinology.* 1987 Jan;120(1):55-62.
- [195] Silva JE, Larsen PR. Contributions of plasma triiodothyronine and local thyroxine monodeiodination to triiodothyronine to nuclear triiodothyronine receptor saturation in pituitary, liver, and kidney of hypothyroid rats. Further evidence relating saturation of pituitary nuclear triiodothyronine receptors and the acute inhibition of thyroid-stimulating hormone release. *J Clin Invest.* 1978 May;61(5):1247-59.
- [196] Zeold A, Pormuller L, Dentice M, Harney JW, Curcio-Morelli C, Tente SM, et al. Metabolic instability of type 2 deiodinase is transferable to stable proteins independently of subcellular localization. *J Biol Chem.* 2006 Oct 20;281(42):31538-43.
- [197] Hilton DJ, Richardson RT, Alexander WS, Viney EM, Willson TA, Sprigg NS, et al. Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jan 6;95(1):114-9.
- [198] Silva JE, Larsen PR. Potential of brown adipose tissue type II thyroxine 5'-deiodinase as a local and systemic source of triiodothyronine in rats. *J Clin Invest.* 1985 Dec;76(6):2296-305.
- [199] Lisboa PC, Oliveira KJ, Cabanelas A, Ortiga-Carvalho TM, Pazos-Moura CC. Acute cold exposure, leptin, and somatostatin analog (octreotide) modulate thyroid 5'-deiodinase activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003 Jun;284(6):E1172-6.
- [200] Jones R, Henschen L, Mohell N, Nedergaard J. Requirement of gene transcription and protein synthesis for cold- and norepinephrine-induced stimulation of thyroxine deiodinase in rat brown adipose tissue. *Biochim Biophys Acta.* 1986 Dec 19;889(3):366-73.
- [201] Bianco AC, Carvalho SD, Carvalho CR, Rabelo R, Moriscot AS. Thyroxine 5'-deiodination mediates norepinephrine-induced lipogenesis in dispersed brown adipocytes. *Endocrinology.* 1998 Feb;139(2):571-8.
- [202] Watanabe M, Houten SM, Matakaki C, Christoffolete MA, Kim BW, Sato H, et al. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature.* 2006 Jan 26;439(7075):484-9.
- [203] Courtin F, Chantoux F, Pierre M, Francon J. Induction of type II 5'-deiodinase activity by cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate in cultured rat astroglial cells. *Endocrinology.* 1988 Sep;123(3):1577-81.

- [204] Zeold A, Doleschall M, Haffner MC, Capelo LP, Menyhart J, Liposits Z, et al. Characterization of the nuclear factor-kappa B responsiveness of the human *dio2* gene. *Endocrinology*. 2006 Sep;147(9):4419-29.
- [205] Visser TJ, Kaplan MM, Leonard JL, Larsen PR. Evidence for two pathways of iodothyronine 5'-deiodination in rat pituitary that differ in kinetics, propylthiouracil sensitivity, and response to hypothyroidism. *J Clin Invest*. 1983 Apr;71(4):992-1002.
- [206] Cheron RG, Kaplan MM, Larsen PR. Physiological and pharmacological influences on thyroxine to 3,5,3'-triiodothyronine conversion and nuclear 3,5,3'-triiodothyronine binding in rat anterior pituitary. *J Clin Invest*. 1979 Nov;64(5):1402-14.
- [207] Visser TJ, Leonard JL, Kaplan MM, Larsen PR. Kinetic evidence suggesting two mechanisms for iodothyronine 5'-deiodination in rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982 Aug;79(16):5080-4.
- [208] Leonard JL. Dibutyryl cAMP induction of type II 5'-deiodinase activity in rat brain astrocytes in culture. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988 Mar 30;151(3):1164-72.
- [209] Crantz FR, Larsen PR. Rapid thyroxine to 3,5,3'-triiodothyronine conversion and nuclear 3,5,3'-triiodothyronine binding in rat cerebral cortex and cerebellum. *J Clin Invest*. 1980 Apr;65(4):935-8.
- [210] Silva JE, Larsen PR. Adrenergic activation of triiodothyronine production in brown adipose tissue. *Nature*. 1983 Oct 20-26;305(5936):712-3.
- [211] Hidal JT, Kaplan MM. Characteristics of thyroxine 5'-deiodination in cultured human placental cells. Regulation by iodothyronines. *J Clin Invest*. 1985 Sep;76(3):947-55.
- [212] Silva JE, Larsen PR. Comparison of iodothyronine 5'-deiodinase and other thyroid-hormone-dependent enzyme activities in the cerebral cortex of hypothyroid neonatal rat. Evidence for adaptation to hypothyroidism. *J Clin Invest*. 1982 Nov;70(5):1110-23.
- [213] Shen S, Berry W, Jaques S, Pillai S, Zhu J. Differential expression of iodothyronine deiodinase type 2 in growth plates of chickens divergently selected for incidence of tibial dyschondroplasia. *Anim Genet*. 2004 Apr;35(2):114-8.
- [214] St Germain DL, Galton VA. The deiodinase family of selenoproteins. *Thyroid*. 1997 Aug;7(4):655-68.
- [215] Baqui M, Botero D, Gereben B, Curcio C, Harney JW, Salvatore D, et al. Human type 3 iodothyronine selenodeiodinase is located in the plasma membrane and undergoes rapid internalization to endosomes. *J Biol Chem*. 2003 Jan 10;278(2):1206-11.
- [216] Esfandiari A, Courtin F, Lennon AM, Gavaret JM, Pierre M. Induction of type III deiodinase activity in astroglial cells by thyroid hormones. *Endocrinology*. 1992 Oct;131(4):1682-8.

- [217] Huang SA, Mulcahey MA, Crescenzi A, Chung M, Kim BW, Barnes C, et al. Transforming growth factor-beta promotes inactivation of extracellular thyroid hormones via transcriptional stimulation of type 3 iodothyronine deiodinase. *Mol Endocrinol*. 2005 Dec;19(12):3126-36.
- [218] Hernandez A, St Germain DL, Obregon MJ. Transcriptional activation of type III inner ring deiodinase by growth factors in cultured rat brown adipocytes. *Endocrinology*. 1998 Feb;139(2):634-9.
- [219] Hernandez A, Obregon MJ. Presence of growth factors-induced type III iodothyronine 5-deiodinase in cultured rat brown adipocytes. *Endocrinology*. 1995 Oct;136(10):4543-50.
- [220] Hernandez A, St Germain DL. Dexamethasone inhibits growth factor-induced type 3 deiodinase activity and mRNA expression in a cultured cell line derived from rat neonatal brown fat vascular-stromal cells. *Endocrinology*. 2002 Jul;143(7):2652-8.
- [221] Courtin F, Liva P, Gavaret JM, Toru-Delbauffe D, Pierre M. Induction of 5-deiodinase activity in astroglial cells by 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate and fibroblast growth factors. *J Neurochem*. 1991 Apr;56(4):1107-13.
- [222] Esfandiari A, Gagelin C, Gavaret JM, Pavelka S, Lennon AM, Pierre M, et al. Induction of type III-deiodinase activity in astroglial cells by retinoids. *Glia*. 1994 Jul;11(3):255-61.
- [223] Kester MH, Kuiper GG, Versteeg R, Visser TJ. Regulation of type III iodothyronine deiodinase expression in human cell lines. *Endocrinology*. 2006 Dec;147(12):5845-54.
- [224] Van der Geyten S, Buys N, Sanders JP, Decuypere E, Visser TJ, Kuhn ER, et al. Acute pretranslational regulation of type III iodothyronine deiodinase by growth hormone and dexamethasone in chicken embryos. *Mol Cell Endocrinol*. 1999 Jan 25;147(1-2):49-56.
- [225] Huang SA. Physiology and pathophysiology of type 3 deiodinase in humans. *Thyroid*. 2005 Aug;15(8):875-81.
- [226] Lee JK, Gordon PR, Stall GM, Gilchrest BA, Kaplan MM. Phenolic and tyrosyl ring iodothyronine deiodination by the Caco-2 human colon carcinoma cell line. *Metabolism*. 1989 Dec;38(12):1154-61.
- [227] Mori K, Yoshida K, Kayama T, Kaise N, Fukazawa H, Kiso Y, et al. Thyroxine 5-deiodinase in human brain tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993 Nov;77(5):1198-202.
- [228] Huang SA, Fish SA, Dorfman DM, Salvatore D, Kozakewich HP, Mandel SJ, et al. A 21-year-old woman with consumptive hypothyroidism due to a vascular tumor expressing type 3 iodothyronine deiodinase. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Oct;87(10):4457-61.
- [229] Morvan Dubois G, Sebillot A, Kuiper GG, Verhoelst CH, Darras VM, Visser TJ, et al. Deiodinase activity is present in *Xenopus laevis* during early embryogenesis. *Endocrinology*. 2006 Oct;147(10):4941-9.

- [230] 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. *J Clin Invest.* 1999 Apr;103(7):979-87.
- [231] Van der Geyten S, Van den Eynde I, Segers IB, Kuhn ER, Darras VM. Differential expression of iodothyronine deiodinases in chicken tissues during the last week of embryonic development. *Gen Comp Endocrinol.* 2002 Aug;128(1):65-73.
- [232] Van der Geyten S, Sanders JP, Kaptein E, Darras VM, Kuhn ER, Leonard JL, et al. Expression of chicken hepatic type I and type III iodothyronine deiodinases during embryonic development. *Endocrinology.* 1997 Dec;138(12):5144-52.
- [233] Van der Geyten S, Segers I, Gereben B, Bartha T, Rudas P, Larsen PR, et al. Transcriptional regulation of iodothyronine deiodinases during embryonic development. *Mol Cell Endocrinol.* 2001 Oct 25;183(1-2):1-9.
- [234] Darras VM, Hume R, Visser TJ. Regulation of thyroid hormone metabolism during fetal development. *Mol Cell Endocrinol.* 1999 May 25;151(1-2):37-47.
- [235] Huang H, Marsh-Armstrong N, Brown DD. Metamorphosis is inhibited in transgenic *Xenopus laevis* tadpoles that overexpress type III deiodinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Feb 2;96(3):962-7.
- [236] Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science.* 1988 May 13;240(4854):889-95.
- [237] Eckey M, Moehren U, Baniahmad A. Gene silencing by the thyroid hormone receptor. *Mol Cell Endocrinol.* 2003 Dec 31;213(1):13-22.
- [238] Gloss B, Giannocco G, Swanson EA, Moriscot AS, Chiellini G, Scanlan T, et al. Different configurations of specific thyroid hormone response elements mediate opposite effects of thyroid hormone and GC-1 on gene expression. *Endocrinology.* 2005 Nov;146(11):4926-33.
- [239] Freedman LP. Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. *Endocr Rev.* 1992 May;13(2):129-45.
- [240] Gloss B, Trost S, Bluhm W, Swanson E, Clark R, Winkfein R, et al. Cardiac ion channel expression and contractile function in mice with deletion of thyroid hormone receptor alpha or beta. *Endocrinology.* 2001 Feb;142(2):544-50.
- [241] Forrest D, Sjoberg M, Vennstrom B. Contrasting developmental and tissue-specific expression of alpha and beta thyroid hormone receptor genes. *Embo J.* 1990 May;9(5):1519-28.

- [242] Ballock R, Mita BC, Zhou X, Chen DH, Mink LM. Expression of thyroid hormone receptor isoforms in rat growth plate cartilage in vivo. *J Bone Miner Res.* 1999 Sep;14(9):1550-6.
- [243] Williams GR. Hormones. Solving the specificity puzzle. *Nature.* 1994 Aug 4;370(6488):330-1.
- [244] Gruber R, Czerwenka K, Wolf F, Ho GM, Willheim M, Peterlik M. Expression of the vitamin D receptor, of estrogen and thyroid hormone receptor alpha- and beta-isoforms, and of the androgen receptor in cultures of native mouse bone marrow and of stromal/osteoblastic cells. *Bone.* 1999 May;24(5):465-73.
- [245] Allain TJ, Yen PM, Flanagan AM, McGregor AM. The isoform-specific expression of the tri-iodothyronine receptor in osteoblasts and osteoclasts. *Eur J Clin Invest.* 1996 May;26(5):418-25.
- [246] Hodin RA, Lazar MA, Chin WW. Differential and tissue-specific regulation of the multiple rat c-erbA messenger RNA species by thyroid hormone. *J Clin Invest.* 1990 Jan;85(1):101-5.
- [247] Cook CB, Kakucska I, Lechan RM, Koenig RJ. Expression of thyroid hormone receptor beta 2 in rat hypothalamus. *Endocrinology.* 1992 Feb;130(2):1077-9.
- [248] Ray RD, Asling CW, Walker DG, Simpson ME, Li CH, Evans HM. Growth and differentiation of the skeleton in thyroidectomized-hypophysectomized rats treated with thyroxine, growth hormone, and combination. *J Bone Joint Surg Am.* 1954 Jan;36-A(1):94-103.
- [249] Mosekilde L, Melsen F. A tetracycline-based histomorphometric evaluation of bone resorption and bone turnover in hyperthyroidism and hyperparathyroidism. *Acta Med Scand.* 1978;204(1-2):97-102.
- [250] Vestergaard P, Weeke J, Hoeck HC, Nielsen HK, Rungby J, Rejnmark L, et al. Fractures in patients with primary idiopathic hypothyroidism. *Thyroid.* 2000 Apr;10(4):335-40.
- [251] Fraichard A, Chassande O, Plateroti M, Roux JP, Trouillas J, Dehay C, et al. The T3R alpha gene encoding a thyroid hormone receptor is essential for post-natal development and thyroid hormone production. *Embo J.* 1997 Jul 16;16(14):4412-20.
- [252] Gothe S, Wang Z, Ng L, Kindblom JM, Barros AC, Ohlsson C, et al. Mice devoid of all known thyroid hormone receptors are viable but exhibit disorders of the pituitary-thyroid axis, growth, and bone maturation. *Genes Dev.* 1999 May 15;13(10):1329-41.
- [253] Gauthier K, Plateroti M, Harvey CB, Williams GR, Weiss RE, Refetoff S, et al. Genetic analysis reveals different functions for the products of the thyroid hormone receptor alpha locus. *Mol Cell Biol.* 2001 Jul;21(14):4748-60.

- [254] Flamant F, Poguét AL, Plateroti M, Chassande O, Gauthier K, Streichenberger N, et al. Congenital hypothyroid Pax8(-/-) mutant mice can be rescued by inactivating the TR α gene. *Mol Endocrinol*. 2002 Jan;16(1):24-32.
- [255] Hu X, Lazar MA. Transcriptional repression by nuclear hormone receptors. *Trends Endocrinol Metab*. 2000 Jan-Feb;11(1):6-10.
- [256] Mandel SJ, Cooper DS. The use of antithyroid drugs in pregnancy and lactation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Jun;86(6):2354-9.
- [257] Miyabara EH, Aoki MS, Moriscot AS. Cyclosporin A preferentially attenuates skeletal slow-twitch muscle regeneration. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica* [et al. 2005 Apr;38(4):559-63.
- [258] Carneiro-Ramos MS, Silva VB, Santos RA, Barreto-Chaves ML. Tissue-specific modulation of angiotensin-converting enzyme (ACE) in hyperthyroidism. *Peptides*. 2006 Nov;27(11):2942-9.
- [259] Freitas FR, Moriscot AS, Jorgetti V, Soares AG, Passarelli M, Scanlan TS, et al. Spared bone mass in rats treated with thyroid hormone receptor TR beta-selective compound GC-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003 Nov;285(5):E1135-41.
- [260] Gouveia CH, Jorgetti V, Bianco AC. Effects of thyroid hormone administration and estrogen deficiency on bone mass of female rats. *J Bone Miner Res*. 1997 Dec;12(12):2098-107.
- [261] Livak K. ABI Prism 7700 Sequence detection system, user bulletin 2.: Applied Biosystem 1997.
- [262] Liu W, Saint DA. Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Jun 7;294(2):347-53.
- [263] Christoffolete MA, Ribeiro R, Singru P, Fekete C, da Silva WS, Gordon DF, et al. Atypical expression of type 2 iodothyronine deiodinase in thyrotrophs explains the thyroxine-mediated pituitary thyrotropin feedback mechanism. *Endocrinology*. 2006 Apr;147(4):1735-43.
- [264] Steinsapir J, Harney J, Larsen PR. Type 2 iodothyronine deiodinase in rat pituitary tumor cells is inactivated in proteasomes. *J Clin Invest*. 1998 Dec 1;102(11):1895-9.
- [265] Huang SA, Tu HM, Harney JW, Venihaki M, Butte AJ, Kozakewich HP, et al. Severe hypothyroidism caused by type 3 iodothyronine deiodinase in infantile hemangiomas. *N Engl J Med*. 2000 Jul 20;343(3):185-9.
- [266] Mosekilde L, Melsen F. Effect of antithyroid treatment on calcium-phosphorus metabolism in hyperthyroidism. II: Bone histomorphometry. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1978 Apr;87(4):751-8.

- [267] Marchant B, Brownlie BE, Hart DM, Horton PW, Alexander WD. The placental transfer of propylthiouracil, methimazole and carbimazole. *J Clin Endocrinol Metab.* 1977 Dec;45(6):1187-93.
- [268] Obregon MJ, Mallol J, Pastor R, Morreale de Escobar G, Escobar del Rey F. L-thyroxine and 3,5,3'-triiodo-L-thyronine in rat embryos before onset of fetal thyroid function. *Endocrinology.* 1984 Jan;114(1):305-7.
- [269] Ruiz de Ona C, Morreale de Escobar G, Calvo R, Escobar del Rey F, Obregon MJ. Thyroid hormones and 5'-deiodinase in the rat fetus late in gestation: effects of maternal hypothyroidism. *Endocrinology.* 1991 Jan;128(1):422-32.
- [270] Huffmeier U, Tietze HU, Rauch A. Severe skeletal dysplasia caused by undiagnosed hypothyroidism. *European journal of medical genetics.* 2007 May-Jun;50(3):209-15.
- [271] Bassett JH, Williams GR. The molecular actions of thyroid hormone in bone. *Trends Endocrinol Metab.* 2003 Oct;14(8):356-64.

9 ANEXOS

9.1 Artigo 1: Deiodinase-mediated thyroid hormone inactivation minimizes thyroid hormone signaling in the early development of fetal skeleton.