JAMILE CALIL SILVEIRA

***EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE IODO SOBRE A
EXPRESSÃO DO GENE DA PENDRINA: ESTUDO IN VIVO E IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia humana.

Orientador: Prof^a. Dra. Maria Tereza Nunes

São Paulo

2010

SILVEIRA, J. C. Efeito da administração aguda de iodo sobre a expressão do gene da pendrina: estudo *in vivo* e *in vitro*. 68 f. Dissertação (Mestrado em fisiologia humana)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

RESUMO

Pendrina é um transportador de ânions, codificado pelo gene PDS. Ela é expressa em vários tecidos, bem como na tireóide, onde está inserida na membrana apical de células foliculares. A mutação desse gene provoca surdez, bócio e prejuízo na organificação do iodeto, sendo os dois últimos eventos sugestivos de um possível envolvimento da pendrina no transporte de iodeto na membrana apical da célula folicular tireoidiana. Estudos subsequentes demonstraram que a proteína pode mediar o transporte do iodeto em células de mamíferos, o que fortaleceu a possibilidade da pendrina em mediar o efluxo apical do iodeto dos tireócitos no folículo. Sabendo-se que o iodo é fundamental para a síntese de hormônios tireoidianos e considerando-se que a estabilidade de alguns mRNAs que codificam proteínas envolvidas com o transporte de oligominerais é modificada por alterações no aporte dos mesmos, foi objetivo deste estudo avaliar, por meio de estudos *in vivo* e *in vitro*, o efeito da administração aguda de iodo na expressão do mRNA que codifica a proteína pendrina, em curtos períodos de tempo (30 min à 24h). Foram utilizados ratos machos Wistar (~200 g), que foram divididos nos grupos: controle e iodo, os quais receberam injeção ip de salina (0,9% NaCl) ou NaI (2 mg de NaI em 0,5 ml de salina), respectivamente, sendo decapitados após 30', 1, e 24 h da administração do iodo/salina. O RNA total da tireóide foi extraído para a análise da expressão e migração do mRNA da Pendrina por Real Time PCR e Northern Blot. Para o estudo *in vitro* foi utilizada a linhagem celular de tireóide normal de rato PCCl3, que ao atingir 70% de confluência, foi tratada ou não com 10^{-3} M de NaI. O experimento foi realizado em triplicata; as células permaneceram sob tratamento por 30 min, 1 h, e 24 h, e, após esses períodos de tempo, foram removidas e o RNA extraído, para análise da expressão do mRNA da Pendrina por Real Time PCR. Houve um aumento significativo do mRNA da Pendrina em todos os grupos estudados, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, indicando que, frente ao excesso de iodeto, houve ativação da transcrição do gene da Pendrina, o que sugere que mecanismos foram desencadeados visando o seu efluxo da célula, o que poderia ser um ajuste fisiológico direcionado à proteção do tireócito frente aos efeitos deletérios da alta concentração de iodeto intracelular.

Palavras-chave: Iodo. Pendrina. Expressão gênica. Efeito Wolff-Chaikoff. Tireóide.

SILVEIRA, J. C. Effect of acute administration of iodide in pendrin gene expression: study in vivo and in vitro. 68 f. Master thesis (Physiology)- Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2010.

ABSTRACT

Pendrin- a chloride/iodide exchange, is codified by PDS gene and It's expressed in different tissues. In thyroid, it's located at the apical membrane of thyrocytes. Mutations in the PDS gene lead to sensorineural deafness, goiter, and a partial defect in iodide organification. This suggested that pendrin could function as an apical iodide transporter in thyroid cells. The results obtained from a number of independent studies performed in heterologous systems support the role of pendrin in mediating, at least in part, apical iodide efflux. Since iodine is essential for thyroid hormone synthesis and this element is known to regulate the expression of different genes in thyroid that are related to its transport, this study attempted to investigate that possibility by evaluating whether the acute iodide administration, from 30 min up to 24 h, could regulate the Pendrin mRNA expression, by studies *in vivo* e *in vitro*. Rats (~200 g) subjected or not to MMI treatment (0.03%) received NaI (2 mg/0.5 ml saline) or saline ip (0,9% NaCl), and were sacrificed 30', 1 and 24 h later. Thyroid total RNA extraction was extracted and Pendrin mRNA content was evaluated by Northern Blotting and Real-Time PCR. For *in vitro* study, PC Cl3 rat thyroid cells were cultured and, when the cells reached 70% confluence, they were treated or no with 10^{-3} M NaI. After 30 min, 1h and 24h of treatment, untreated cells and iodide-treated cells were harvested and total RNA was extracted. Pendrin mRNA content was evaluated by Real-Time PCR. The Pendrin mRNA increased in all groups of study, in vivo and in vitro, indicating that excess of iodide leads to an activation of Pendrin gene transcription and as consequence increased efflux of this element. This date shows iodine regulating its own concentration within the gland, and thus assuring adequate iodide uptake for thyroid hormone synthesis, and protecting the thyroid from the detrimental effects of its excess.

Key-words: Iodine. Pendrin. Gene expression. Wolff-Chaikoff Effect. Thyroid.

1 INTRODUÇÃO

Os principais produtos de secreção tireoidiana são as iodotironinas (triiodotironina – T3 e tiroxina T4), compostos que resultam do acoplamento de duas moléculas iodadas de tirosina. Tais compostos são de grande importância fisiológica, pois modificam a expressão de vários genes/proteínas envolvidos no crescimento, desenvolvimento e processos metabólicos (SAMUELS et al., 1989). Assim, o iodo é fundamental para o organismo, uma vez que a sua falta compromete a síntese desses hormônios.

Uma vez ingerido, o iodo é convertido a iodeto no trato gastrointestinal antes de ser absorvido. Quando na corrente sanguínea, o iodeto é transportado para o interior das células foliculares através do co-transportador sódio/iodeto (NIS) presente na membrana basolateral do tirócito (CAVALIERI, 1997; SPITZWEG et al., 2002), dirigindo-se, a seguir, para o lúmen folicular através da Pendrina - um transportador de iodeto/cloreto presente na membrana apical. A oxidação do iodeto e sua organificação ocorrem na superfície apical da célula folicular, sendo essas reações catalisadas pela tireoperoxidase (TPO), na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Assim, a organificação tireoideana do iodo depende da atividade da TPO e de um sistema gerador de H_2O_2 , o Duox (ROYAUX et al., 2000; VAISMAN et al., 2004). A passagem do iodeto da corrente sanguínea até sua oxidação pela TPO pode ser observada na figura 1.

Figura 1: Representação do trajeto do iodeto desde quando ele entra na célula (através da NIS), sua passagem para o colóide (através da Pendrina), e sua oxidação pela TPO

A biossíntese dos hormônios da tireoide depende, portanto, não somente de uma ingestão adequada de iodo, mas também da expressão de diversos genes nesse tecido, incluindo o gene da tireoglobulina (TG), da tireoperoxidase (TPO), do co-transportador sódio/iodeto (NIS), do gene da Síndrome de Pendred (PDS), do sistema gerador de H_2O_2 (Duox) e do receptor do hormônio tireotrófico (TSHR) (SUZUKI et al., 2006).

Sabe-se, todavia, que a ingestão crônica de altas quantidades de iodo pode causar diversos danos na função tiroideana, como tiroidites, doenças auto-imunes, hipotireoidismo e hipertireoidismo (BURMAN e WARTOFSKY, 2000; ENG et al., 1999; FERREIRA et al., 2005; KNOBEL e MEDEIROS-NETO, 2004; LI et al., 2007;

MEDEIROS-NETO, 2009; ZIMMERMANN, 2008). Sabe-se também que, agudamente, a glândula possui uma capacidade de autorregulação bastante eficiente, que independe de TSH, mas depende de iodo. Essa autorregulação foi mostrada pela primeira vez por Morton, et al. (1944) que observaram que a administração de altas doses de iodeto inibe a síntese dos hormônios tiroideanos. Pouco tempo depois, Wolff e Chaikoff (1948) demonstraram que a organificação do iodeto é bloqueada quando este se encontra em concentrações elevadas no plasma (efeito Wolff-Chaikoff). Estes mesmo autores demonstraram que após determinado período de tempo, essa organificação retoma a sua normalidade, ao que denominaram de **Escape** do efeito agudo de Wolff-Chaikoff.

O Efeito Wolff-Chaikoff e o seu escape constituem um sistema altamente especializado de autorregulação da tiróide, que a protege dos efeitos deletérios do excesso de iodo. Clinicamente, já é bastante aceito que algumas das condições geradas pela exposição a altas doses desse oligoelemento se devem à incapacidade da tiróide em superar tal efeito inibitório agudo (ou bloqueio adaptativo) que a sobrecarga de iodo exerce sobre a síntese e a liberação dos hormônios tiroidianos, impedindo que a glândula reassuma uma síntese hormonal normal (BURMAN, WARTOFSKY, 2000; DOHÁN et al., 2003; PAVAN et al., 2004).

Tem sido postulado que o mecanismo responsável pelo efeito inibitório Wolff Chaikoff seja a formação de iodolípides, que causariam uma inibição na glândula em várias etapas da síntese dos hormônios. Isso foi cogitado uma vez que na presença de bloqueadores da TPO, onde não haveria formação de iodolípides, os efeitos supressores do iodo deixam de ser observados (CARDOSO et al., 2002; DENEFF et al., 1996); contudo, não se descarta uma ação rápida exercida pelo iodeto *per se* (MORAND et al., 2003).

Os mecanismos moleculares envolvidos no Escape, por sua vez, são muito menos conhecidos. Braverman e Ingbar (1965) sugeriram que esse escape ocorreria devido a uma diminuição da captação de iodeto, e que esse fenômeno seria intrínseco da glândula, ocorrendo independentemente de TSH. Após a clonagem da NIS (DAÍ et al., 1996), estudos vêm demonstrando que, de fato, o iodeto intracelular desencadeia mecanismos que levam à redução da sua própria captação, bem como do conteúdo do mRNA e da proteína NIS (DOHÁN et al., 2003; ENG et al. 1999; ENG et al. 2001).

Vale comentar que o conteúdo de um determinado mRNA na célula depende da sua taxa de transcrição, bem como de sua estabilidade, e que, estudos realizados no nosso laboratório têm sugerido que a diminuição da expressão de NIS ocorreria porque seu mRNA apresenta-se instável nessas condições, o que reduziria a taxa de síntese dessa proteína (SERRANO-NASCIMENTO, 2008). A instabilidade ocorre possivelmente devido a uma diminuição do comprimento da cauda poli-A do transcrito, já que se sabe que a estabilidade bem como a eficiência de tradução de um transcrito estão diretamente relacionadas ao comprimento da sua cauda poli-A (ROBINSON, 1988; SERAPHIM et al. 2007).

Desta maneira, cada vez mais é comprovada a hipótese de Braverman e Ingbar (1965) de que o Escape adaptativo ocorra, pelo menos em parte, devido a uma inibição de NIS pelo iodo, causando uma menor capação deste oligoelemento e reduzindo-o a níveis intracelulares incapazes de sustentar o efeito de Bloqueio. Uma outra possibilidade que poderia contribuir para esse Escape, ainda não avaliada, seria não somente diminuir a entrada, mas também aumentar a saída do iodeto da célula para o lúmen folicular, processo que, como comentado anteriormente, se dá principalmente através da Pendrina.

Pendrina é um transportador de ânions, codificado pelo gene PDS. É bastante expresso na glândula tireóide, rins e ouvido interno, bem como na glândula mamária, útero, testículos e placenta (LACROIX et al., 2001).

Mutações no gene humano da PDS causam a síndrome de Pendred (OMIM 274600), que foi descrita em 1896 pelo médico Vaughan Pendred. Ele foi o primeiro a relacionar o bócio não endêmico de alguns pacientes com a surdez que os mesmos apresentavam. No entanto havia dificuldades de estudá-la devido principalmente à apresentação clínica variável e à ausência de um teste de diagnóstico específico (REARDON e TREMBATH, 1996).

A incidência dessa síndrome é de 7,5 a 10 a cada 100.000 indivíduos. Tem-se estimado que é causa de ~10 % dos casos de surdez hereditária. Se isso for confirmado, a síndrome de Pendred pode ser a forma mais comum de surdez sindrômica (CAMPBELL et al., 2001; REARDON et al., 1997). Também no Brasil,

estudos já foram realizados visando identificar famílias com mutações no PDS (KOPP et al, 1999; LOFRANO-PORTO et al, 2008).

Diversos trabalhos buscaram explicar a surdez apresentada na síndrome. Os locais de expressão da Pendrina envolvem regiões importantes para a reabsorção do fluido endolinfático (EVERETT, et al.,2001). Estudos radiológicos do ouvido interno revelam um alargamento do sistema endolinfático, que é melhor detectado por um alargamento do aqueduto vestibular (EVA). Outro problema que pacientes dessa síndrome podem apresentar é a má-formação de Mondini, onde a cóclea não é eficientemente formada (CREMERS et al.,1998; FUGAZZOLA et al., 2000; JOHNSEN et al.,1986; PHELPS et al.,1998; PRYOR et al., 2005).

Exatamente 100 anos depois que Vaughan Pendred descreveu a síndrome, dois grupos encontraram a possível região do genoma em que estaria o gene PDS. No entanto, ainda não era possível relacionar a surdez com o bócio, chegando a ser postulado que seriam dois defeitos recessivos, que poderiam acontecer juntos em casos de consangüinidade (COYLE et al., 1996; SHEFFIELD et al., 1996).

Em 1997 Everett, et al. clonaram o gene da Pendrina, localizado no cromossomo 7q22-31.1, sendo inserido na família SLC26 (transportadores de ânions). Devido à alta similaridade com transportadores de sulfato, foi equivocadamente classificado como tal. Já era sabido que a TG contém sulfato na sua composição (NLEND et al., 1999, 2005), então a deficiente organificação do iodo, observada nos pacientes com síndrome de Pendred, poderia apontar um papel da pendrina na sulfatação da TG (KOPP et al, 1999).

Dois anos depois da clonagem de pendrina, SCOTT, et al. (1999) utilizando duas linhagens de oócitos (*xenopus laevis* oocytes e Sf9) mostraram que sulfato não era substrato para pendrina. Ao contrário, ela transportava de maneira muito eficiente iodeto e cloreto. Os autores propuseram ainda um efeito direto da pendrina no ouvido interno, uma vez que a surdez na síndrome de Pendred não poderia ser somente devido a um hipotireoidismo, já que mutações no gene de TPO não causam surdez.

A causa do bócio parece ser a deficiente iodação da TG do lúmen folicular devido a uma taxa reduzida do transporte de iodeto através da membrana apical das células epiteliais da glândula tireóide (REARDON et al., 2000).

Provavelmente, o efluxo de iodeto ocorre por mais de uma via (GOLSTEIN et al., 1992; OHANA et al., 2009; VAN DEN HOVE et al., 2006). Estudos eletrofisiológicos sugeriram a existência de dois canais na porção apical do tireócitos envolvidos no efluxo de iodeto (GOLSTEIN et al., 1992). Um deles possui alta permeabilidade ao iodeto ($K_m \sim 70$ mM) em relação ao outro ($K_m \sim 33$ mM). A identidade desses canais não havia sido determinada num nível molecular, no entanto cada vez mais estudos sugerem que a Pendrina pode tratar-se de um desses canais. Estudos funcionais em células transfectadas demonstraram que realmente, ela pode mediar o transporte do iodeto em células de mamíferos. Estas descobertas, junto com a organificação deficiente do iodeto nos pacientes com síndrome de Pendred sugeriram um possível papel da pendrina em mediar o efluxo apical do iodeto dos tireócitos para a luz do folículo (BIDART et al., 2000; ROYAUX et al., 2000; SCOTT e KARNISKI, 2000; SOLEIMANI et al., 2001; SHCHEYNIKOV et al., 2008; YOSHIDA et al., 2002).

Levando-se em consideração o que foi exposto, a pendrina poderia trabalhar em parceria com a NIS, o co-transportador Na^+/I^- localizado na membrana basolateral, que é responsável pela transferência do iodeto do líquido extracelular para o tireócito, possibilitando o efluxo de iodeto para o lúmen folicular, onde, sob a ação da tireoperoxidase, é oxidado a iodo e organificado (ROYAUX et al., 2000).

GILLAM, et al. (2004) realizaram um estudo bastante interessante para determinar se Pendrina era capaz de realizar o transporte apical de iodeto em células MDCK (Madin-Darby canine kidney). Para tanto, montaram um sistema com duas câmaras e uma camada de células entre elas, de maneira a formar um compartimento apical e um basal. As células expressavam: apenas NIS, apenas Pendrina ou ambas as proteínas. Mediu-se o iodeto intracelular, bem como o dos dois compartimentos, comprovando-se então que células que expressavam pendrina apresentavam iodeto em baixa concentração no meio intracelular e alta na câmara apical.

A proteína codificada possui uma massa molecular de 110-115 kDa (PORRA et al., 2002). Tem sido proposto que a pendrina possui 12 domínios transmembrânicos, sendo que ambas as terminações (carboxil e amino) localizam-se no citosol (GILLAM et al., 2004).

A presença de cloreto no lúmen folicular é necessária para que ocorra o efluxo

de iodeto pela pendrina, sendo que a estequiometria dessa troca é de 1Iodo/1cloreto (SHCHEYNIKOV et al. 2008; YOSHIDA et al. 2004). Van Den Hove, et al. (2006) constataram que a inativação do canal específico de cloreto CIC-5 na membrana apical de tireócitos de camundongos diminui o efluxo apical de iodeto, uma vez que esse evento depende de um gradiente de Cl que favorece a sua troca com o iodeto através da pendrina. Esse estudo sugere uma importante participação do cloreto acumulado no lúmen folicular para a funcionalidade de Pendrina na troca Cl/I. Os animais apresentaram também bócio eutiroideo, uma vez que o efluxo deficiente é altamente compensado pelo aumento no número de células. Esse fenótipo assemelha-se aos casos da Síndrome de Pendred.

Royaux, et al. (2000) trataram células de tireóide de ratos FRTL-5 com componentes que conhecidamente modulam a função tireoideana (TG, Iodo, TSH, T3, T4) e analisaram a expressão de mRNA de pendrina e outros genes por *Northern Blot*. Dos vários agentes adicionados ao meio de cultura, apenas a TG aumenta significativamente a Pendrina (a partir de 3 horas), em contraste com NIS e com a própria TG, que são fortemente inibidas por altas concentrações de TG. Uma possível explicação para a elevada expressão de pendrina é que uma vez que esta é necessária para assegurar uma quantidade suficiente de iodo no folículo, seria adaptativamente positivo seu aumento quando a concentração de TG se eleva.

Mais tarde Suzuki e Kohn (2006) demonstraram que TSH e altas doses de iodo são capazes de aumentar o mRNA de pendrina quando na presença de TG, em células FRTL-5. Mostraram também que na ausência de TSH, o aumento de pendrina pela TG é transitório, possivelmente por esse estímulo ocorrer via TSH/cAMP.

É interessante o fato de que o TSH é o hormônio que estimula a glândula como um todo (inclusive a expressão de NIS), mas não exerce a mesma ação estimulatória na Pendrina. Por outro lado, a TG é um inibidor geral da glândula, uma vez que inibe a expressão de diversos genes: TG, TSHr, TPO e NIS (SUZUKI et al., 1998), no entanto, ela estimula a pendrina. Isso mostra que apesar da pendrina poder trabalhar em parceria com a NIS, elas são reguladas por diferentes vias (BIDART et al., 2000; ROYAUX et al., 2000; SUZUKI e KOHN, 2006).

Na tiróide nunca foi demonstrado se o iodo *per se* causa alterações na expressão da pendrina. Por outro lado, estudos desenvolvidos no nosso laboratório demonstraram que após a administração de iodo por curtos períodos de tempo (30' a 24 h) ocorre diminuição da expressão do mRNA da NIS e do seu peso molecular na tiróide, sugerindo um comprometimento da estabilidade desse mRNA, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Demonstramos que isso pode ser devido a uma redução da cauda poli-A desse transcrito, o que se relaciona, na maioria das vezes com maior instabilidade do mRNA.

Muscella, et al. (2008) utilizaram a linhagem de tiróide de rato PC Cl3 para investigar ações do TSH e insulina na expressão e translocação de Pendrina. Tanto a via da PKA como da PKC quando ativadas aumentam a expressão do mRNA e proteína pendrina. No entanto, para que ocorra translocação da proteína para a membrana é necessária a presença de insulina. Tal translocação foi vista a partir de 10 minutos da administração de insulina, e parece ocorrer pela ativação da via da PKC, uma vez que quando esta é inibida, o processo é revertido. Inibidores de PKA não afetam a translocação.

Esses autores concluem então que a expressão e a função de pendrina em células PC Cl3 seja regulada por TSH e por insulina; assim essa linhagem celular pode constituir um modelo apropriado para examinar a rede complexa das proteínas envolvidas na regulação do transporte do iodeto.

A linhagem PC Cl3 possui vantagens em relação à FRTL-5 por ser mais similar à tiróide nativa, expressando marcadores típicos dessas células. Além disso, é mais sensível à controles endócrinos, condição esta perdida na linhagem FRTL-5. Mesmo assim, ambas as linhagens são imortalizadas, podendo então ter perdido alguns dos mecanismos básicos de controle do ciclo celular (Fusco et al., 1987; Kimura et al., 1999).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ADLER, L.; EFRATI, E.; ZELIKOVIC, I. Molecular mechanisms of epithelial cell-specific expression and regulation of the human anion exchanger (pendrin) gene. **Am. J. Physiol Cell Physiol.**, v. 294, p.1261-1276, 2008.

BENOIST, B.; ANDERSSON, M.; EGLI, I.; TAKKOUICHE, B.; ALLEN, H. Iodine status worldwide. WHO database on iodine deficiency. **Department of Nutrition for Health and Development**: World Health Organization, 2004.

BIDART, J. M.; MIAN, C.; LAZAR, V.; RUSSO, D.; FILETTI, S.; CAILLOU, B.; SCHLUMBERGER, M. Expression of pendrin and the Pendred syndrome (PDS) gene in human thyroid tissues. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.85, p.2028-2033, 2000.

BRAVERMAN, L. E.; INGBAR, S. H. Changes in thyroidal function during adaptation to large doses of iodide. **J. Clin. Invest.**, v.42, n.8, p.1216-31, 1965.

BURMAN, K. D.; WARTOFSKY, L. Iodine Effects on the thyroid gland: biochemical and clinical aspects. **Rev. Endocr. Metab. Dis.**, v.1, p.19-25, 2000.

CALVO, R. M.; JAUNIAUX, E.; GULBIS, B.; ASUNCIÓN, M.; GERVY, C.; CONTEMPRÉ, B.; ESCOBAR, G. M. Fetal tissues are exposed to biologically relevant free thyroxine concentrations during early phases of development. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.87, n.1, p.1768–1777, 2002.

CAMPBELL, C.; CUCCI, R. A.; PRASAD, S.; GREEN, G. E.; EDEAL, J. B.; GALER, C. E.; KARNISKI, L. P.; SHEFFIELD, V. C.; SMITH, R. J. H. Pendred syndrome, DFNB4, and PDS/SLC26A4 identification of eight novel mutations and possible genotype-phenotype correlations, **Hum. Mutat.**, v.17, p. 403–411, 2001.

CARDOSO, L. C.; MARTINS, D. C. L.; CAMPOS, D. V. B.; SANTOS, L. M.; COSTA, V. M. C.; ROSENTHAL, D.; VAISMAN, M.; VIOLANTE, A. H. D.; CARVALHO, D. P. Effect of iodine or iopanoic acid on thyroid Ca²⁺/NADPH-dependent H₂O₂-generating activity and thyroperoxidase in toxic diffuse goiters. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 147, p. 293–298, 2002.

CARDOSO, L. C.; MARTINS, D. C. L.; FIGUEIREDO, M. D. L.; ROSENTHAL, D.; VAISMAN, M.; VIOLANTE, A. H. D.; CARVALHO, D. P. Ca²⁺/Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Dependent H₂O₂ Generation Is Inhibited by Iodide in Human Thyroids. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.86, n.9, p.4339-4343, 2001.

CARRASCO, N. Iodide transport in the thyroid gland. **Biochem. Biophys. Acta**, v.1154, p.65-82, 1993.

CAVALIERI, R. R. Iodine Metabolism and thyroid physiology: Current concepts. **Thyroid**, v.7, n.2, p.177-181, 1997.

CHIN, E. R., OLSON, E. N., RICHARDSON, J. A., YANG, Q., HUMPHRIES, C., SHELTON, J. M., WU, H., ZHU, W., BASSEL-DUBY, R., WILLIAMS, R. S. A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. **Genes Dev.**, v. 12, p. 2499-2509, 1998.

CHOMCZYNSKI P. and SACCHI N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal. Biochem.**, v. 162, p.156-9, 1987.

COYLE, B.; COFFEY, R.; ARMOUR, J. A. L.; GAUSDEN, E.; HOCHBERG, Z.; GROSSMAN, A.; BRITTON, K.; PEMBREY, M.; REARDON, W.; TREMBATH, R. Pendred syndrome (goitre and sensorineural hearing loss) maps to chromosome 7 in the region containing the nonsyndromic deafness gene *DFNB4*. **Nat. Genet.**, v. 12, p. 421 – 423, 1996.

CREMERS, C. W. R. J.; BOLDER, C.; ADMIRAAL, R. J. C.; EVERETT, L. A.; JOOSTEN, F. B. M.; VAN HAUWE, P. GREEN, E. D.; OTTEN, B.J. Progressive sensorineural hearing loss and a widened vestibular aqueduct in pendred syndrome. **Arch. Otolaryngol. Head. Neck. Surg.**, v. 124, p. 501-505, 1998.

DAÍ, G.; LEVY, O.; CARRASCO, N. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. **Nature**, v.379, n.6564, p. 458-460, 1996.

DENEFD, J. F.; MANY, M. C.; VAN DEN HOVEB, M. F. Iodine-induced thyroid inhibition and cell necrosis: two consequences of the same free-radical mediated mechanism? **Mol. Cell. Endocrinol.**,v.21, p.101-103, 1996.

DENTICE, M.; LUONGO, C.; ELEFANTE, A.; AMBROSIO, R.; SALZANO, S.; ZANNINI, M.; NITSCH, R.; DI LAURO, R.; ROSSI, G.; FENZI, G.; SALVATORE, D. Pendrin is a novel in vivo downstream target gene of the ttf-1/nkx-2.1 homeodomain transcription factor in differentiated thyroid cells. **Mol. Cell. Biol.**,v.25, n. 22, p. 10171–10182, 2005.

DOHAN, O.; DE LA VIEJA, A.; PARODER, V.; RIEDEL, C.; ARTANI, M.; REED, M.; GINTER, C.S.; CARRASCO, N. The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. **Endocrine Reviews**, v.24, n.1, p.48-77, 2003.

ELSHAL, M. F; MCCOY, J. P. Multiplex Bead Array Assays: Performance Evaluation and Comparison of Sensitivity to ELISA. **Methods**, v.38, p.317–323, 2006.

ENG, P. H.; CARDONA, G. R.; FANG, S. L.; PREVITI, M.; ALEX, S.; CARRASCO, N.; CHIN, W. W.; BRAVERMAN, L. E. Escape from the acute Wolff-Chaikoff effect is associated with a decrease in thyroid sodium/iodide symporter messenger ribonucleic acid and protein. **Endocrinology**, v.140, n.8, p.3404-3410, 1999.

ENG, P. H.; CARDONA, G. R.; PREVITI, M. C.; CHIN, W. W.; BRAVERMAN, L. E. Regulation of the sodium iodide symporter by iodide in FRTL-5 cells. **Eur. J. Endocrinol.**, v.144, n.2, p.139-144, 2001.

ESCOBAR, G. M.; OBREGÓN, M. J.; REY, F. E. Is neuropsychological development related to maternal hypothyroidism or to maternal hypothyroxinemia?. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.85, n.11, p. 3975–3987, 2000.

EVERETT, L. A.; MORSLI, H.; WU, D. K.; GREEN, E. D. Expression pattern of the mouse ortholog of the Pendred's syndrome gene (Pds) suggests a key role for pendrin in the inner ear. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.96, p.9727–9732, 1999.

EVERETT, L.A.; BELYANTSEVA, I.A.; NOBEN-TRAUTH, K.; CANTOS, R.; CHEN, A.; THAKKAR, S.I.; HOOGSTRATEN-MILLER, S.L.; KACHAR, B.; WU, D.K.; GREEN, E.D. Targeted disruption of mouse Pds provides insight about the inner-ear defects encountered in Pendred syndrome. **Hum. Mol. Genet.**, v.10, p.153–161, 2001.

FERREIRA, A.C.; LIMA, L.P.; ARAÚJO, R.L.; MÜLLER, G.; ROCHA, R.P.; ROSENTHAL, D.; CARVALHO, D. P. Rapid regulation of thyroid sodium-iodide symporter activity by thyrotrophin and iodine. **J. Endocrinol.**, v.184, n.1, p.69-76, 2005.

FUGAZZOLA, L.; MANNAVOLA, D.; CERUTTI, N.; MAGHNIE, M.; PAGELLA, F.; BIANCHI, P.; WEBER, G.; PERSANI, L.; BECK-PECCOZ, P. Molecular analysis of the pendred's syndrome gene and magnetic resonance imaging studies of the inner ear are essential for the diagnosis of true pendred's syndrome. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 85, n.7.

FUSCO, A.; BERLINGIERI, M. T; DI FIORE, P. P.; PORTELLA, G.; GRIECO, M.; VECCHIO, G. One- and two-step transformations of rat thyroid epithelial cells by retroviral oncogenes. **Mol. Cell. Biol.**, v.7, n.9, p. 3365-3370, 1987.

GILLAM, M. P.; SIDHAYE, A. R.; LEE, E. J.; RUTISHAUSER, J.; STEPHAN, C. W.; KOPP, P. Functional characterization of pendrin in a polarized cell system.evidence for pendrin-mediated apical iodide efflux. **J. Biol. Chem.**, v.279, n13, p.13004-13010, 2004.

GOLSTEIN, P.; ABRAMOW, M.; DUMONT, J. E.; BEAUWENS, R. The iodide channel of the thyroid: a plasma membrane vesicle study. **Am. J. Physiol.**, v. 263, p. 590–597, 1992.

HALMI, N. S.; SUELKE, R. G. Problems of thyroidal self-regulation. **Metabolism**, v.5, p.646–651, 1956.

JOHNSEN, T.; JØRGENSEN, M. B.; JOHNSEN, S. Mondini cochlea in pendred's syndrome: a histological study. **Acta Otolaryngol.**, v. 102, p. 239–247, 1986.

KIM, Y. H.; PHAM, T. D.; ZHENG, W.; HONG, S.; BAYLIS, C.; PECH, V.; BEIERWALTES, W.H.; FARLEY, D.B.; BRAVERMAN, L.E.; VERLANDER, J.W.; WALL, S.M. Role of pendrin in iodide balance: going with the flow. **Am. J. Physiol. Renal. Physiol.**, v.297, n.4, p.F1069–F1079, 2009.

KIMURA, T.; DUMONT, J. E.; FUSCO, A.; GOLSTEIN, J. Insulin and TSH promote growth in size of PC Cl3 rat thyroid cells, possibly via a pathway different from DNA synthesis: comparison with FRTL-5 cells. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 140, p. 94–103, 1999.

KNOBEL, M.; MEDEIROS-NETO, G. Moléstias associadas à carência crônica de iodo. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v.48, n.1, p. 53–61, 2004.

KOPP, P.; ARSEVEN, O. K.; SABACAN, L.; KOTLAR, T.; DUPUIS, J.; CAVALIERE, H.; Phenocopies for deafness and goiter development in a large inbred Brazilian Kindred with Pendred's Syndrome Associated with a novel mutation in the PDS Gene. **J. Clin Endocrinol. Metab.**, v.84, n.1, p.336–41, 1999.

LACROIX, L.; MIAN, C.; CAILLOU, B.; TALBOT, M.; FILETTI, S.; SCHLUMBERGER, M.; BIDART, J. M. Na(+)/I(-) symporter and Pendred syndrome gene and protein expressions in human extra-thyroidal tissues. **Eur. J. Endocrinol.**, v.144, p. 297–302, 2001.

LI, H. S.; CARAYANNIOTIS, G. Induction of goitrous hypothyroidism by dietary iodide in SJL mice. **Endocrinology**, v.10, 1210/en.2007-0082. 2007.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$. **Methods**, v. 25, p.402–408, 2001.

LOFRANO-PORTO, A; BARRA, G. B; NASCIMENTO, P. P; COSTA, P. G; GARCIA, E. C; VAZ, R. F; BATISTA, A. R; FREITAS, A. C; CHERULLI, B. L; BAHMAD, F. J. R, FIGUEIREDO, L. G; NEVES, F. A; CASULARI, L. A. Pendred syndrome in a large consanguineous Brazilian family caused by a homozygous mutation in the SLC26A4 gene. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v.52, n.8, p. 1296–303, 2008.

MANIATS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed. New York:: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.. v. 3,

MARTINO, E.; BARTALENA, L.; BOGAZZI, F. ; BRAVERMAN, L. E. The effects of amiodarone on the thyroid. **Endocr. Rev.**, v.22, n.2, p.240–254, 2001.

MEDEIROS-NETO, G.. Iodo nutricional no Brasil: como estamos?. **Arq. Brás. Endocrinol. Metab.**, v.53, n.4, p. 470-474, 2009.

MORAND, S.; CHAARAOU, M.; KANIEWSKI, J.; DE` ME, D.; OHAYON, R.; NOEL-HUDSON, M. S.; VIRION, A.; DUPUY, C. Effect of iodide on nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity and duox2 protein expression in isolated porcine thyroid follicles. **Endocrinology**, v. 144, n.4, p. 1241–1248, 2003.

MORTON, M. E.; CHAIKOFF, I. L.; ROSENFELD, S. Inhibiting effect of inorganic iodide on the formation in vitro of thyroxine and diiodotyrosine by surviving thyroid tissue. **J. Biol. Chem.**, v.154, n.2, p. 381, 1944.

NLEND, M. C.; CAUVI, D.; VENOT, N.; CHABAUD, O. Role of sulfated tyrosines of thyroglobulin in thyroid hormonesynthesis. **Endocrinology**, v.146, n.11, p.4834–4843.

NLEND, M. C.; CAUVI, D.; VENOT, N.; CHABAUD, O. Sulfated tyrosines of thyroglobulin are involved in thyroid hormone synthesis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 262, p.193–197, 1999.

NUNES, M. T. Hormônios tireoideanos: mecanismo de ação e importância biológica. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v.47, p.639 – 643, 2003.

OHANA, E.; YANG, D.; SHCHEYNIKOV, N.; MUALLEM, S. Diverse transport modes by the Solute Carrier 26 family of anion transporters. **J. Physiol.**, v.587, n.10, p.2179–2185, 2009.

PAVAN, R.; JESUS, A. M. X.; MACIEL, L. M. Z. A Amiodarona e a tireóide. **Arq. Brás. Endocrinol. Metab.**, v.48, n.1, p.176-182, 2004.

PEDRAZA, P. E.; OBREGON, M. J.; ESCOBAR-MORREALE, H. F.; DEL-REY, F. E.; ESCOBAR, G. M. Mechanisms of adaptation to iodine deficiency in rats: thyroid status is tissue specific. its relevance for man. **Endocrinology**, v.147, n.5, p.2098–2108, 2006.

PHELPS, P. D.; COFFEY, R. A.; TREMBATH, R. C.; LUXON, L. M.; GROSSMAN, A. B.; BRITTON, K. E.; KENDALL-TAYLOR, P.; GRAHAM, J. M.; CADGE, B. C.; STEPHENS, S. G.

D.; PEMBREY, M. E.; REARDON, W. Radiological malformations of the ear in pendred syndrome. **Clin. Radiology.**, v. 53, p.268-273, 1998.

PORRA, V.; BERNIER-VALENTIN, F.; TROUTTET-MASSON, S.; BERGER-DUTRIEUX, N.; PEIX, J. L.; PERRIN, A.; SELMI-RUBY, S.; ROUSSET, B. Characterization and semiquantitative analyses of pendrin expressed in normal and tumoral human thyroid tissues. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 87, n. 4, p. 1700–1707, 2002.

PRYOR, S. P.; MADEO, A. C.; REYNOLDS, J. C.; SARLIS, N. J.; ARNOS, K. S.; NANCE, W. E.; YANG, Y.; ZALEWSKI, C. K.; BREWE, C. C.; BUTMAN, J. A.; GRIFFITH, A. J. SLC26A4/PDS genotype-phenotype correlation in hearing loss with enlargement of the vestibular aqueduct (EVA): evidence that Pendred syndrome and non-syndromic EVA are distinct clinical and genetic entities. **J. Med. Genet.**, v.42, p.159–165, 2005.

REARDON, W.; COFFEY, R.; PHELPS, P.D.; LUXON, L.M.; STEPHENS, D.; KENDALL-TAYLOR, P.; BRITTON, K.E.; GROSSMAN, A.; TREMBATH, R. Pendred syndrome: 100 years of underascertainment, **QJM**, v.90, p. 443–447, 1997.

REARDON, W.; OMAHONEY, C. F.; TREMBATH, R.; JAN, H.; PHELPS, P. D. Enlarged vestibular aqueduct: a radiological marker of pendred syndrome, and mutation of the PDS gene. **QJM**, v.93, p.99-104, 2000.

REARDON, W.; TREMBATH, R.C. Pendred syndrome. **J. Med. Genet.**, v.33, p.1037-1040,1996.

ROBINSON, B. G., FRIM, D. M.; SCHWARTZ, W. J.; MAJZOUN, J. A. Vasopressin mRNA in the suprachiasmatic nuclei: Daily regulation of polyadenylate tail length. **Science**, v. 24, p.342-343, 1988.

ROYAUX, I. E.; SUZUKI, K.; MORI, A.; KATOH, R.; EVERETT, L. A.; KOHN, L. D.; GREEN, E. D. Pendrin, the protein encoded by the Pendred syndrome gene (PDS), is an apical porter of iodide in the thyroid and is regulated by thyroglobulin in FRTL-5 cells. **Endocrinology**, v.141, n.2, p.839-845, 2000.

SAMUELS, H. H.; FORMAN, B. M.; HOROWITZ, Z. D.; YE, Z. S. Regulation of gene expression by thyroid hormone. **Annu. Rev. Physiol.**, v.51, p.623–39, 1989.

SCOTT, D.; WANG, R.; KREMAN, T. M.; SHEFFIELD, V. C.; KARNISKI, L.P. The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein. **Nat. Genet.**, v.21, p.440-443, 1999.

SCOTT, D. A.; KARNISKI, L. P. Human pendrin expressed in *Xenopus laevis* oocytes mediates chloride/formate exchange. **Am. J. Physiol. Cell Cell Physiol.**, v. 278, n.1, p.207-211, 2000.

SERAPHIM, P. M.; NUNES, M. T.; GIANNOCO, G.; MACHADO, U. F. Age related obesity-induced shortening of GLUT4 mRNA poly(A) tail length in rat gastrocnemius skeletal muscle. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 276, p.80–87, 2007.

SERRANO-NASCIMENTO, C. Efeito da administração aguda de iodo na expressão gênica do co-transportador de sódio/iodeto (NIS) e na estabilidade de seu mRNA. 2008 100f. Dissertação (Fisiologia Humana)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SHCHEYNIKOV, N.; YANG, D.; WANG, Y.; ZENG, W.; KARNISKI, L. P.; SO, I.; WALL, S. M.; MUALLEM, S. The Slc26a4 transporter functions as an electroneutral Cl⁻/I⁻/HCO₃⁻ exchanger: role of Slc26a4 and Slc26a6 in I⁻ and HCO₃⁻ secretion and in regulation of CFTR in the parotid duct. **J.Physiol.**, v.586, n.16, p.3813–3824, 2008.

SHEFFIELD, V. C.; KRAIEM, Z.; BECK, J. C.; NISHIMURA, D.; STONE, E. M.; SALAMEH, M.; SADEH, O.; GLASER, B. Pendred syndrome maps to chromosome 7q21-34 and is caused by an intrinsic defect in thyroid iodine organification. **Nat. Gene**, v.12, p.424 – 426, 1996.

SOLEIMANI, M.; GREELEY, T.; PETROVIC, S.; WANG, Z.; AMLAL, H.; KOPP, P.; BURNHAM, C.E. Pendrin: an apical Cl⁻/OH⁻/HCO₃⁻ Exchanger in the Kidney Cortex. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v.280, p.356-364, 2001.

SPITZWEG, C.; MORRIS, J.C. The sodium iodide symporter: its pathophysiological and therapeutic implications. **Clin Endocrinol.**, v. 57, p.559-574, 2002.

SUZUKI, K.; KOHN, L. D. Differential regulation of apical and basal iodide transporters in the thyroid by thyroglobulin. **J. Endocrinol.**, v.189, p. 247-255, 2006.

SUZUKI, K.; LAVARONI, S.; MORI, A.; OHTA, M.; SAITO, J.; PIETRARELLI, M.; SINGER, D. S.; KIMURA, S.; KATOH, R.; KAWAOI, A.; KOHN, L. D. Autoregulation of thyroid-specific gene transcription by thyroglobulin. **Med. Sci.**, v. 95, p. 8251–8256, 1998.

VAISMAN, M.; ROSENTHAL, D.; CARVALHO, D. P. Enzimas Envolvidas na Organificação Tireoideana do Iodo. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v.48, n.1, p.9-15, 2004.

VAN DEN HOVE, M. F.; CROIZET-BERGER, K.; JOURET, F.; GUGGINO, S. E.; GUGGINO, W. B.; DEVUYST, O.; COURTOY, P. J. The loss of the chloride channel, ClC-5, delays apical iodide efflux and induces a euthyroid goiter in the mouse thyroid gland. **Endocrinology**, v.147, p.1287-1296, 2006.

WOLFF, J. Transport of iodide and other anions in the thyroid gland. **Physiol. Rev.**, v.44, p.45–90, 1964.

WOLFF, J.; CHAIKOFF, I. L. Plasma inorganic iodide as a homeostatic regulator of thyroid function. **J. Biol. Chem.**, v. 174, p.555–564, 1948.

YOSHIDA, A.; HISATOME, I.; TANIGUCHI, S.; SASAKI, N.; YAMAMOTO, Y.; MIAKE, J.; FUKUI, H.; SHIMIZU, H.; OKAMURA, T.; OKURA, T.; IGAWA, O.; SHIGEMASA, C.; GREEN, E. D.; KOHN, L. D.; SUZUKI, K. Mechanism of iodide/chloride exchange by pendrin. **Endocrinol.**, v.145, n.9:430, p.1–8, 2004.

YOSHIDA, A.; SASAKI, N.; MORI, A.; TANIGUCHI, S.; MITANI, Y.; UETA, Y.; HATTORI, K.; SATO, R.; HISATOME, I.; MORI, T.; SHIGEMASA, C.; KOSUGI, S. Different electrophysiological character of I, ClO₄, and SCN in the transport by Na/I symporter. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.231, p.731–734, 1997.

YOSHIDA, A.; SASAKI, N.; MORI, A.; TANIGUCHI, S.; UETA, Y.; HATTORI, K.; TANAKA, Y.; IGAWA, O.; TSUBOI, M.; SUGAWA, H.; SATO, R.; HISATOME, I.; SHIGEMASA, C.; GROLLMAN, E. F.; KOSUGI, S. Differences in the electrophysiological response to I and the inhibitory anions SCN and ClO₄, studied in FRTL-5 cells. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1414, p.231–237, 1998.

YOSHIDA, A.; TANIGUCHI, S.; HISATOME, I.; ROYAUX, I. E.; GREEN, E. D.; KOHN, L. D.; SUZUKI, K. Pendrin is an iodidespecific apical porter responsible for iodide efflux from thyroid cells. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.87, p.3356–3361, 2002.

ZIMMERMANN, M. B. Iodine requirements and the risks and benefits of correcting iodine deficiency in populations. **J. Trace Elem. Med. Biol.**, v. 22, p. 81–92, 2008.