

MARIA CRISTINA SOARES RODRIGUES

**TRANSPORTE DE HORMÔNIOS TIREOIDEANOS EM HEMÁCIAS DE
PACIENTES COM INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA
EM HEMODIÁLISE**

Tese apresentada ao Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde. Área: Farmacologia Molecular – Terapêutica Endocrinológica.

Orientador: Luiz Alberto Simeoni, Ph.D.

BRASÍLIA, 2004

TERMO DE APROVAÇÃO

MARIA CRISTINA SOARES RODRIGUES

TRANSPORTE DE HORMÔNIOS TIREOIDEANOS EM HEMÁCIAS DE PACIENTES COM INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA EM HEMODIÁLISE

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção de grau de Doutor no Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, pela seguinte Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni – Presidente
Universidade de Brasília – UnB

Prof Dr. Francisco de Assis Rocha Neves – 1º Membro
Universidade de Brasília - UnB

Prof. Dr. Aluízio da Costa e Silva – 2º Membro
Sociedade de Clínica Médica - DF

Prof. Dr. Rogério Baumgratz de Paula – 3º Membro
Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF

Prof. Dr^a. Luciana Ansaneli Naves – 4º Membro
Universidade de Brasília - UnB

Brasília, 03 de março de 2004

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, artífice do nosso destino, pela vida. À minha mãe Therezinha de Jesus Soares Rodrigues pela amizade, carinho e incentivo constante.

Pelas orientações esclarecedoras e apoio efetivo, sou grata ao Professor Dr. Carlos Alberto Bezerra Tomaz, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Entre minhas dívidas maiores, está aquela com o Professor Dr. Ralff Carvalho Justiniano Ribeiro (*in memoriam*), primeiro orientador deste estudo, pela amizade, confiança depositada e encorajamento inicial, e com o Professor Dr. Luiz Alberto Simeoni, seu sucessor, pela orientação segura durante o desenvolvimento da pesquisa e a revisão do estudo.

Tenho uma dívida especial com o Dr. Aluizio da Costa e Silva, Diretor do Centro de Hemodiálise da Sociedade de Clínica Médica – SOCLIMED -, grande incentivador deste estudo. Meu sincero agradecimento pela oportunidade que me foi concedida e pelo carinho e amizade.

Proveitosas orientações me foram concedidas pelo Professor Dr. Francisco de Assis Rocha Neves, Dr. Nouredine Lomri, Dr. Paul Webb e Dr. John D. Baxter. Pelas suas críticas e sugestões que proporcionaram maior aprofundamento às questões polêmicas da pesquisa, meu muito obrigada.

Pela compreensão, agradeço aos colegas do Departamento de Enfermagem da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, e em especial à Professora Enf^a Ana Lúcia da Silva por sua efetiva colaboração.

Meu abraço afetivo à Rilva G. P. Soares do Laboratório de Farmacologia Molecular da Faculdade de Ciências de Saúde da Universidade de Brasília, e aos funcionários do Centro de Hemodiálise, pela preciosa cooperação.

Pela atenção e gentileza dispensada pelas funcionárias da Secretaria da Pós-Graduação da Faculdade de Ciências da Saúde Vanessa, Vânia, Silvia e Grace, meu abraço.

Para os amigos do Laboratório de Farmacologia Molecular, pelo alegre convívio, meu abraço saudoso.

Meu afeto e eterna gratidão às pessoas que colaboraram como sujeitos da pesquisa, sem as quais seria impossível concretizá-la.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	V
RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
LISTA DE ANEXOS	XI
CAPÍTULO 1	
1.1. Rim: considerações anatômicas e fisiológicas.....	1
1.2. Insuficiência Renal Crônica.....	3
1.2.1. Fatores de risco, incidência e prevalência.....	3
1.2.2. Fisiopatologia	4
1.2.3. Terapia Renal Substitutiva.....	6
1.3. Hormônios Tiroideanos.....	9
1.3.1. Síntese, secreção, circulação, metabolismo e ação celular.....	9
1.3.2. Transporte transmembrana.....	15
1.3.2.1. A hemácia como modelo de estudo do transporte transmembrana de hormônios tiroideanos.....	17
1.4. Hemácias.....	19
1.5. Função Tiroideana na Insuficiência Renal Crônica.....	21
1.6. Justificativa e Objetivos.....	23
1.7. Materiais e Métodos.....	24
CAPÍTULO 2	
Thyroid Hormone Transport is Disturbed in Erythrocytes from Patients with Chronic Renal Failure on Hemodialysis.....	28
CAPÍTULO 3	
LT ₃ Uptake and Efflux Mechanisms are Altered in Erythrocytes from Patients with Chronic Renal Failure on Hemodialysis and are Triac, rT ₃ and Verapamil Sensitive.....	41
CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
REFERÊNCIAS	56
ANEXOS	66

APRESENTAÇÃO

Este estudo trata do mecanismo de transporte de hormônios tireoideanos em hemácias de pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise e o efeito inibitório do Verapamil e de análogos do LT_3 (rT_3 e Triac) nesse transporte. O trabalho está organizado em capítulos, sendo que no Capítulo 1 são apresentadas considerações gerais sobre anatomia e fisiologia do rim, insuficiência renal crônica – fatores de risco, incidência e prevalência, fisiopatologia da doença e o tratamento dialítico disponível na atualidade. Ainda neste capítulo, apresenta-se uma descrição sobre hormônios tireoideanos, com destaque ao transporte transmembrana dos mesmos em hemácias e a função tireoideana na insuficiência renal crônica. Finalizando este capítulo apresentam-se a justificativa e os objetivos propostos à pesquisa, bem como materiais e métodos empregados. As referências bibliográficas deste capítulo acham-se indicadas no final do trabalho. O Capítulo 2 corresponde ao artigo “*Thyroid Hormone Transport is Disturbed in Erythrocytes from Patients with Chronic Renal Failure on Hemodialysis*”, aceito à publicação no periódico *Renal Failure* – Editora Dekker, EUA. O Capítulo 3 trata do artigo “*LT₃ Uptake and Efflux Mechanisms are Altered in Erythrocytes from Patients with Chronic Renal Failure on Hemodialysis and are Triac, rT₃ and Verapamil Sensitive*”, submetido à publicação no *Renal Failure*. Nestes artigos, são mencionados materiais e métodos utilizados nos experimentos, resultados obtidos, discussão, conclusões e referências dos mesmos. Nas conclusões e considerações finais são apresentadas hipóteses explicativas aos resultados encontrados, sendo indicadas novas questões investigativas que se originaram do estudo realizado. Os anexos constam da Análise do Projeto de Pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FS – e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aplicado aos sujeitos participantes, encerrando a apresentação da pesquisa.

RESUMO

Pacientes com Insuficiência Renal Crônica (IRC) freqüentemente apresentam nível plasmático de triiodotironina (LT₃) diminuído, tiroxina (LT₄) normal ou diminuído e o hormônio estimulante da tireóide (TSH) normal. Estudos sobre o transporte de hormônios tireoideanos (HTs) em diferentes células de mamíferos indicam que a membrana citoplasmática constitui um ponto regulatório na modulação da concentração intracelular e conseqüentemente na ação celular. Entretanto, não há estudos examinando se o transporte de HTs tem algum papel na disfunção tireoideana observada na IRC. O propósito dessa investigação foi caracterizar o influxo e efluxo de HTs em hemácias de pacientes com IRC antes e depois de uma sessão de hemodiálise e verificar os efeitos de análogos ao LT₃ (rT₃ e Triac) e Verapamil (VRP) no transporte de LT₃ em eritrócitos de pacientes com IRC. As hemácias obtidas de sujeitos controles e de pacientes urêmicos em pré-hemodiálise (pré-HD) e pós-hemodiálise (pós-HD) foram submetidas a experimentos de influxo e efluxo utilizando-se HTs marcados com ¹²⁵I. Os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e aplicado o teste Newman-Keuls Multiple Comparison. Os resultados demonstraram que o influxo de LT₃ em pacientes urêmicos pré-HD foi 50% e 55% maior em relação aos sujeitos controles aos 1 e 5 minutos, respectivamente. Entretanto, o influxo de LT₄ em hemácias de pacientes urêmicos foi significativamente menor após 1 minuto (88%) e 5 minutos (63%). O influxo de LT₃ foi menor e o de LT₄ foi significativamente maior nos sujeitos controles. Após 60 minutos de efluxo, o LT₃ remanescente nos eritrócitos foi 80% maior e de LT₄ foi 57% menor em relação aos sujeitos controles. A hemodiálise não corrigiu o influxo e efluxo de LT₃ e LT₄ nas hemácias de pacientes urêmicos em relação aos sujeitos controles. A adição de análogos ao LT₃ (rT₃ e Triac) e VRP diminuiu o influxo de LT₃ em hemácias de sujeitos controles em 45%, 26% e 8%, respectivamente, e em 24%, 24% e 23% em hemácias de pacientes urêmicos pré-HD e ainda 32%, 37% e 35% pós-HD. Ainda, os análogos ao LT₃ e o VRP mostraram um significativo efeito inibitório no efluxo de LT₃ em hemácias de sujeitos controles assim como de pacientes urêmicos pré e pós-HD. Concluindo, estes achados representam a primeira demonstração que a diferença no transporte dos HTs em hemácias pode indicar um mecanismo compensatório mantendo o eutiroidismo em pacientes com IRC. Outro aspecto relevante é que a sensibilidade do influxo e efluxo de LT₃ ao rT₃, Triac e VRP difere entre os pacientes urêmicos e sujeitos controles. Os resultados indicam que o transporte de HTs em hemácias de pacientes urêmicos e sujeitos controles ocorre por meio de mecanismos distintos. O estudo destes mecanismos abre novos caminhos farmacológicos que podem ser desenvolvidos para o controle da concentração intracelular dos hormônios tireoideanos em hemácias de urêmicos.

Palavras-chaves: Insuficiência Renal Crônica; Transporte de Hormônios Tireoideanos; Hemácias Humanas.

ABSTRACT

Patients with Chronic Renal Failure (CRF) frequently show diminished levels of triiodothyronine (LT₃), normal or low thyroxine (LT₄) and normal thyroid-stimulating hormone (TSH). Studies on the transport of thyroid hormones (THs) in different mammalian cells indicate that the cytoplasmic membrane constitutes a regulatory point in the modulation of intracellular concentration and consequently in cellular action. However, there are no studies examining whether THs transport plays a role in the thyroid dysfunction observed in CRF. The aim of this investigation was to characterize the uptake and efflux in erythrocytes of patients with CRF before and after hemodialysis and to investigate whether LT₃ analogs (rT₃ and Triac) and Verapamil (VRP) have an effect or not on thyroid hormone uptake and efflux of LT₃ in red blood cells from uremic patients on hemodialysis. Erythrocytes obtained from the control subjects and uremic patients in pre-hemodialysis (pre-HD) and in post-hemodialysis (post-HD) were submitted to uptake and efflux experiments using THs labeled with ¹²⁵I. The data were analyzed by one-way variance analyses (ANOVA) and Newman-Keuls Multiple Comparison. The results obtained demonstrated that LT₃ uptake in erythrocytes from uremic patients pre-HD was 50% and 55% higher than control subjects at 1min and 5 min respectively. However, LT₄ uptake in erythrocytes from uremic patients was significantly lower at 1min (88%) and 5 min (63%). The LT₃ efflux rate was lower and LT₄ efflux was significantly higher than in control subjects. After 60-min of efflux, the LT₃ which remained in erythrocytes was 80% higher and that of LT₄ was 57% lower than in control individuals. Hemodialysis did not correct the LT₃ and LT₄ uptake and efflux in RBC from uremic patients. The addition of LT₃ analogs (Triac and rT₃) and VRP decreased LT₃ uptake by 45%, 26% and 8% in red blood cells from the control group, respectively, and by 24%, 24% and 23% in red blood cells from uremic patients pre-HD and by 32%, 37% and 35% in erythrocytes from uremic patients post-HD respectively. Also, LT₃ analogs and Verapamil showed significant inhibitory effects on LT₃ efflux in red blood cells from normal, pre- and post-HD patients. These results show that LT₃ entry and exit in red blood cells of uremic patients and from the control group occur through distinct mechanisms, and that the sensitivity to LT₃ analogs and VRP differs between uremic and control subjects. In conclusion, these findings represent the first demonstration that the difference in transport in erythrocytes can indicate a compensatory mechanism which maintains euthyroidism in patients with CRF. Another relevant aspect is that the sensitivity of efflux and uptake of LT₃ to rT₃, Triac and VRP differs between uremic patients and the control group. Results show that THs transport in red blood cells from uremic patients and from the control group occurs through distinct mechanisms. The study of these mechanisms can indicate novel pharmacological pathways to control the intracellular amount of the thyroid hormones in erythrocytes from uremic patients.

Key-words: Chronic Renal Failure; Thyroid Hormone Transport; Human Erythrocytes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - ESTRUTURA RENAL.....	1
QUADRO 1 - PRINCIPAIS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA IRC.....	5
FIGURA 2 - ESTRUTURA QUÍMICA DO LT_4 , LT_3 e rT_3	10
FIGURA 3 - QUÍMICA DA FORMAÇÃO DE TRIIODOTIRONINA (LT_3) E TIROXINA (LT_4).....	11
FIGURA 4 - GÊNESE DAS HEMÁCIAS.....	20

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	–	Análise de Variância
ANVISA	–	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
cDNA	–	DNA complementar
CMPF	–	Ácido 3-carboxi-4-metil-5-propil-furanopropiônico
Da	–	Dalton
DBD	–	Domínio de ligação ao DNA
DMSO	–	Dimetilsulfóxido
DRs	–	Repetições diretas de seqüência AGGTCA espaçadas por 1 a nucleotídeo(s) (DR1 – DR5)
DT₃	–	3,5,3'-D-triiodotironina
DT₄	–	3,5,3',5'-D-tetraiodotironina
EDTA	–	Ácido etilenodiaminotetraacético
EtOH	–	Etanol
FRTL-5	–	Células de tiróide de rato
HRE	–	Elemento responsivo ao hormônio tireoideano
HT	–	Hormônio tireoideano
HTC	–	Células derivadas de hepatoma de ratos pouco diferenciadas
HTC-R	–	Células derivadas de hepatoma resistentes a ácidos biliares de ratos
[¹²⁵I]T₃	–	3,5,3'-L-triiodotironina marcada com iodo 125
[¹²⁵I]T₄	–	3,5,3',5'-L-tetraiodotironina marcada com iodo 125
IRC	–	Insuficiência renal crônica
Kd	–	Constante de dissociação
Km	–	Constante de Michaelis
LBD	–	Domínio de ligação ao ligante
LT₂	–	3,3'-L-diiodotironina
LT₃	–	3,5,3'-L-triiodotironina
LT₄	–	3,5,3',5'-L-tetraiodotironina ou tiroxina
NIH 3T3	–	Células fibroblastos de camundongos
OMS	–	Organização Mundial de Saúde

PBS	–	Phosphate Buffered Saline – tampão fisiológico
Pré-HD	–	Pré-hemodiálise
Pós-HD	–	Pós-hemodiálise
PPAR	–	Receptor de proliferadores peroxissomais
PTH	–	Hormônio paratireóideo
RAR	–	Receptor do ácido retinóico
RFG	–	Ritmo de filtração glomerular
RPMI	–	Meio de cultura desenvolvido por Moore et al., no Roswell Park Memorial Institute
rT₃	–	3,3',5'-L-triiodotironina ou T ₃ reverso
SFB	–	Soro fetal bovino
SUS	–	Sistema Único de Saúde
TBG	–	Globulina transportadora de tiroxina
TBPA	–	Pré-albumina de ligação a tiroxina
Tetrac	–	Ácido 3,5,3',5'-L-tetraiodotiroacético
Tg	–	Tireoglobulina
TNF	–	Fator de necrose tumoral
TR	–	Receptor do hormônio tireoideano
Triac	–	Ácido 3,5,3'-L-triiodotiroacético
TR/RXR	–	Complexo receptor do hormônio tireoideano/receptor do ácido retinóico X
TRS	–	Terapia renal substitutiva
TRSE	–	Terapia renal substitutiva extracorpórea
TRH	–	Hormônio de liberação da tireotropina
TSH	–	Hormônio estimulante da tireóide
UCF-E	–	Unidade formadora de colônia de eritrócitos
VDR	–	Receptor da vitamina D
VRP	–	Verapamil

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 - PROCESSO DE ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA.....	67
ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	68

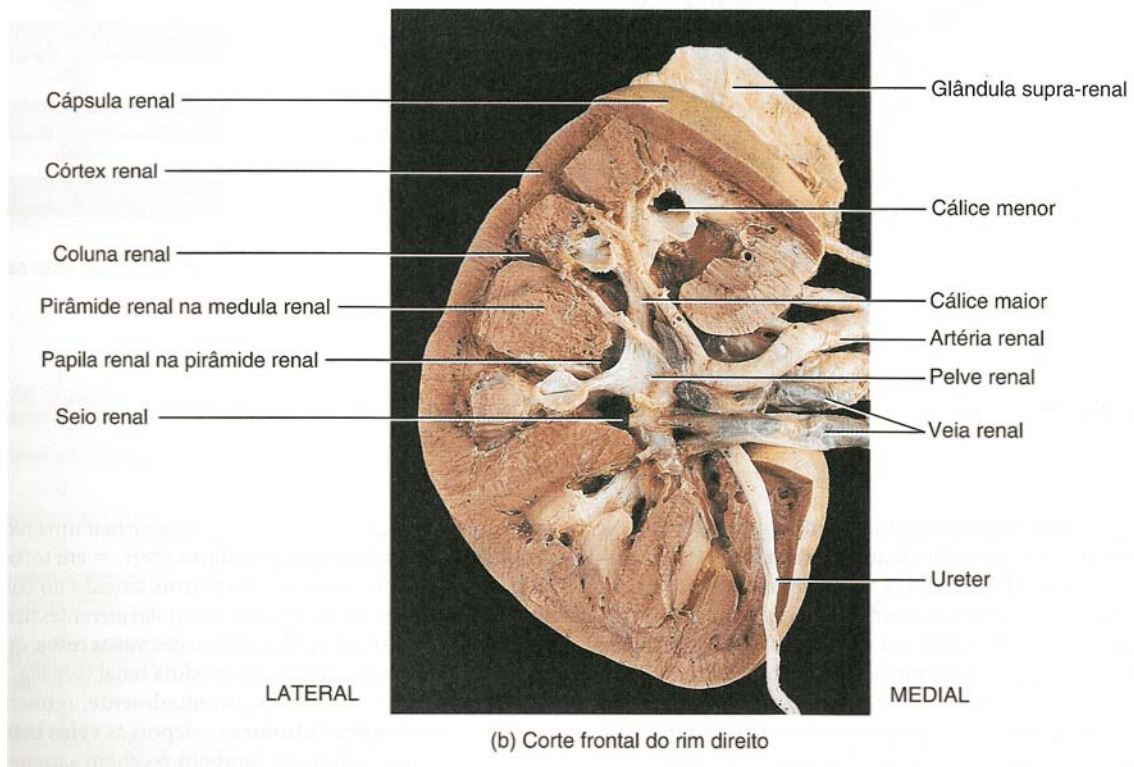
CAPÍTULO 1

1.1. Rim: considerações anatômicas e fisiológicas

O sistema urinário normalmente é formado por dois rins, dois ureteres, uma bexiga e uma uretra (1).

O rim está envolvido por uma fina membrana denominada cápsula renal. Ao redor dele existe a gordura peri-renal e, acima, estão localizadas as glândulas supra-renais. No hilo renal existe uma série de estruturas: a artéria renal, a veia renal, o ureter, os nervos renais e os vasos linfáticos renais. A *Figura 1* mostra as estruturas que compõem o rim (1).

FIGURA 1 – ESTRUTURA RENAL



FONTE: TORTORA, C.J.; GRABOWSKI, S.R. Princípios de anatomia e fisiologia, 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, p.837.

Todas as complexas funções do sistema renal são realizadas simultaneamente e de forma coordenada pelos néfrons, unidades funcionais dos rins, que filtram o sangue a partir dos vasos sanguíneos que têm origem nas artérias renais. Os néfrons são compostos de um corpúsculo renal (glomérulo e cápsula de Bowman). O corpúsculo renal está ligado a uma seqüência de estruturas tubulares -

túbulo proximal, alça de Henle, túbulo distal, segmento conector e ducto colector - que têm a capacidade de reabsorver e de secretar substâncias. Um aglomerado de células secretoras do hormônio renina compõe o aparelho justaglomerular (2).

Os glomérulos realizam o processo de ultrafiltração do plasma, no qual a água, os eletrólitos e as pequenas moléculas passam ao espaço de Bowman, enquanto os elementos figurados do sangue e as proteínas dissolvidas no plasma ficam retidos. A energia para essa ultrafiltração provém do trabalho cardíaco. Em indivíduos adultos normais existe cerca de 1 milhão de glomérulos que constituem cada rim. O RFG aproxima-se de 120 mL/min, o que corresponde a 170 litros por dia. Isso significa que, considerando um volume plasmático de três litros, a totalidade do plasma é filtrada mais de 50 vezes no decorrer de um único dia. Essa imensa quantidade de fluido, depois de reabsorvida na sua quase totalidade pelos túbulos, permite aos rins depurar continuamente o plasma de catabólitos indesejáveis, bem como reagir prontamente a excesso ou carência de água e eletrólitos, tornando-os assim, capazes de manter a homeostase do meio interno (3). Dessa forma, os rins desempenham papel de suma importância na regulação e manutenção da homeostase em todas as formas superiores da vida animal, inclusive no homem. São responsáveis pela eliminação de produtos indesejáveis, como também por manter constante o volume extracelular, a concentração extracelular de potássio, a pressão osmótica e o equilíbrio ácido-base e na regulação da pressão arterial. Desempenham funções endócrinas, como a produção de eritropoetina e da forma ativa da vitamina D (4).

A importância dos rins torna-se evidente quando se observam as conseqüências da perda da função renal. O indivíduo com insuficiência renal retém progressivamente os produtos do metabolismo nitrogenado, como a uréia, acumula líquidos sob a forma de edema, perde a capacidade de diluir e concentrar a urina e torna-se incapaz de regular o equilíbrio ácido-base ou de manter o balanço e os níveis plasmáticos de eletrólitos como sódio, potássio, magnésio, cálcio e fósforo. Se a perda da função renal ocorrer lentamente devido à perda progressiva dos néfrons (nefropatias progressivas), os néfrons remanescentes podem adaptar-se e manter a homeostasia durante um longo período. Assim, o indivíduo desenvolve a IRC. Portanto, IRC é um termo genérico que abrange diversas condições clínicas resultantes da deterioração progressiva e irreversível da função renal (4).

1.2. Insuficiência Renal Crônica

1.2.1. Fatores de risco, incidência e prevalência

Há diversas patologias que estão associadas com o desenvolvimento da falência renal. Os fatores de risco responsáveis pela progressão da doença renal foram estudados intensivamente a partir da década de 1980. As pesquisas apontam como principais fatores de risco: glomerulonefrites, hipertensão, diabetes *mellitus*, dislipidemia, obesidade, síndrome nefrótica, alta ingestão protéica, fumo, alto peso ao nascer, síndrome metabólica X e fatores genéticos. A compreensão dos fatores responsáveis pela progressão da doença renal tem permitido o desenvolvimento de intervenções de saúde pública apropriadas (5, 6, 7).

A incidência e a prevalência da IRC estão aumentando mundialmente. Há cerca de 1 milhão e 200 mil pessoas sob tratamento dialítico. Somente nos Estados Unidos no ano de 2000 havia 372.000 pacientes renais crônicos requerendo terapia dialítica, e há uma expectativa para elevar-se para 650.000 no ano de 2010. A tendência na Europa e Japão tem prognóstico de curso similar (8, 9). No Brasil, são aproximadamente 54.500 pacientes dos quais 48.874 em hemodiálise e 5.649 em diálise peritoneal. O número de pacientes em programa dialítico cresce no Brasil a média de 10% às custas de uma incidência de mais de 100 casos novos por milhão de habitante/ano. Na maioria dos países, o tratamento dialítico é feito por meio do sistema público de saúde. No Brasil, apenas 6% são financiados por seguros ou planos de saúde privados, e 94% são financiados pelo SUS, por meio de tabelas de remuneração de procedimentos (10). No Distrito Federal há sete hospitais públicos e sete centros de diálise para atender aos pacientes portadores de IRC. Em maio de 2003, estavam cadastrados 670 pacientes no Programa de Hemodiálise da Secretaria de Saúde. Destes, 559 (84,4%) são atendidos nos centros conveniados ao SUS, e os demais (16,5%) nos hospitais públicos (11).

O grave cenário mundial representa um ônus na saúde pública dos países, não somente devido aos custos financeiros relativos ao tratamento requerido, mas também devido ao prejuízo na produtividade e à significativa morbidade e mortalidade para os pacientes afetados.

1.2.2. Fisiopatologia

Richard Bright foi o primeiro a descrever, em meados do século passado, uma enfermidade letal que reunia vários elementos clínicos aparentemente desconexos. Os pacientes apresentavam edema e vários sinais associados à hipertensão arterial, tais como hipertrofia ventricular esquerda e hemorragia cerebral. Seus rins tinham freqüentemente aspecto contraído e granular. O desenvolvimento de técnicas histológicas e de biópsia renal permitiu demonstrar que a doença de Bright consistia na esclerose progressiva dos glomérulos, ou seja, a oclusão de alças capilares por material hialino, com aderência ao folheto parietal da cápsula de Bowman e posterior fibrose do tufo glomerular e do parênquima renal (12).

A maioria das enfermidades renais progressivas mostra uma histologia final comum onde, usualmente, o rim aparece como uma massa fibrótica reduzida de tamanho. Os glomérulos perdem os capilares e mostram áreas localizadas de proliferação celular e cicatrização progressiva que, eventualmente, causam colapso do leito capilar. Os túbulos, particularmente aqueles unidos aos glomérulos cicatrizados, estão atrofiados e rodeados por células inflamatórias. Há fibrose difusa caracterizada por aumento da deposição de colágeno e, na matriz extracelular, grande quantidade de depósitos lipídicos e aumento do número de fibroblastos. A microscopia eletrônica mostra espessamento da membrana basal glomerular e tubular nos estágios precoces da enfermidade e condensação de material amorfo nas etapas tardias (13). Portanto, a história natural da IRC ocorre por um processo extremamente insidioso, podendo evoluir assintomaticamente durante anos até atingir a fase terminal.

Uma das explicações para a prolongada evolução da IRC repousa sobre uma propriedade fundamental do parênquima renal, ou seja, a capacidade funcional dos rins é vastamente superior ao mínimo necessário à sobrevivência do organismo. Isso permite que seres humanos, cães e ratos possam manter-se vivos com 10% ou menos de sua função renal normal quando sua massa renal é drasticamente reduzida por processos mórbidos ou mesmo por retirada cirúrgica. A manutenção de níveis funcionais apropriados em face da redução considerável da massa renal deve-se ainda a uma outra propriedade básica do parênquima renal, isto é, os néfrons remanescentes são capazes de adaptar-se à nova condição biológica, multiplicando em várias vezes seu ritmo de trabalho (13). Entretanto, a totalidade

dos pacientes com doença renal crônica acaba, a partir de um certo nível de destruição renal, progredindo inevitavelmente à fase terminal, sendo necessário substituir sua função por diálise ou transplante.

Na fase terminal da IRC, em que predominam sinais e sintomas da uremia (síndrome urêmica), ocorre um distúrbio metabólico causado pela presença de inúmeras toxinas que se acumulam progressivamente comprometendo múltiplos órgãos e sistemas fisiológicos. A intensidade e gravidade do quadro clínico da IRC são diretamente proporcionais à quantidade de massa renal perdida. O *Quadro 1* mostra as principais manifestações clínicas da IRC.

QUADRO 1 – PRINCIPAIS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA IRC

SISTEMAS E ÓRGÃOS	SINAIS E SINTOMAS
Endócrino	Hiperparatireoidismo secundário e terciário, resistência à insulina, hiperlipidemia, amenorréia e dismenorréia, infertilidade, impotência, disfunção sexual, anormalidades da função tireoideana.
Nervoso Central	Alterações do sono, cefaléia, tontura, confusão, convulsões, obnubilação e coma. Perda da atenção e déficit cognitivo, memória imprecisa, distúrbios da fala, asterixis e mioclonias.
Nervoso Periférico	Neuropatia sensorio-motora; aumento da fadiga muscular com câimbras.
Cardiovascular	Hipertensão arterial, insuficiência cardíaca, coronariopatia, pericardite, miocardite e aumento da incidência da arteriosclerose.
Respiratório	Pleurites, edema pulmonar, pneumonite.
Gastrointestinal	Anorexia, náuseas e vômitos, desnutrição protéico-calórica, hálito urêmico, estomatite, gengivite e parotidite, gastrite, duodenite e maior incidência de úlceras; enterocolite, pancreatite, ascite.
Hematológico	Anemia, alteração da quimiotaxia dos neutrófilos, diminuição da função dos linfócitos, tendência hemorrágica com disfunção das plaquetas.
Musculoesquelético	Fraqueza, retardo no crescimento, osteodistrofia renal, osteomalácia.
Ocular	Retinopatia hipertensiva, calcificações de conjuntiva e córnea.
Dermatológico	Pele seca, prurido, escoriações, palidez, equimoses, púrpura, depósitos de cristais de cálcio de uréia (orvalho urêmico).
Psicológicas	Depressão, ansiedade, psicose.

FONTE: NOGUERIA, P.C.K.; CARVALHAES, J.T.A.C. Insuficiência renal crônica. *Ciência Hoje*, v. 18, n. 105, nov./dez. 1994.

O termo uremia significa urina no sangue indicando, portanto, que certas substâncias, normalmente excretadas na urina, são retidas na circulação. Acredita-se que o quadro clínico da uremia seja decorrente da ação de uma ou de várias

toxinas sobre os mais diversos órgãos, ou que haja um ou mais mecanismos da função celular alterados no conjunto de células do organismo. Também, existe a possibilidade de que estes dois fatores ocorram juntos, ou seja, que na origem do quadro clínico coexistam toxinas urêmicas com alterações celulares generalizadas. Assim, na IRC ocorrem profundas modificações na composição química dos líquidos do organismo. Algumas toxinas presentes no sangue de pacientes urêmicos já identificadas são: uréia, guanidinas, mioinositol e outros polióis, moléculas médias (500 - 3000 Da), β_2 – microglobulina e PTH. Entretanto, outras toxinas específicas ainda não foram identificadas. Há, também, a possibilidade de interação entre as várias substâncias que se acumulam, bem como, bactérias presentes no trato gastrointestinal produzirem ou modificarem substâncias potencialmente tóxicas. Portanto, o acúmulo de inúmeras substâncias de potencial lesivo compõe o quadro de toxemia química (14).

A síndrome urêmica pode ainda ser explicada por uma alteração no metabolismo celular condicionado à ausência da função renal. Há a possibilidade de existir uma alteração localizada na composição ou na função das membranas que envolvem as células, modificando o equilíbrio dos íons no conjunto das células. Essa alteração resulta na menor saída de sódio do compartimento intracelular para o extracelular com conseqüente acúmulo de íon acompanhado de cloro nas células, redução da concentração intracelular de potássio e edema celular, perturbando o metabolismo de forma global (14).

1.2.3. Terapia Renal Substitutiva

O princípio dos métodos dialíticos foi elucidado pelo escocês Thomas Graham (1805-1869) ao verificar a passagem de cristalóides da urina para um banho aquoso, por meio de um pergaminho. A esse fenômeno ele deu o nome de diálise. Por volta de 1913, os pesquisadores John J. Abel, Rowntree e Turner da Johns Hopkins Medical School em Baltimore (EUA) desenvolveram um sistema de diálise e o testaram em animais. Seus trabalhos demonstraram que quantidades substanciais de nitrogênio não-protéico podiam ser depuradas do sangue. A primeira hemodiálise foi realizada pelo físico germânico Georg Haas, em 1926, em Gieszen na Alemanha, em pacientes com IRC. Embora o procedimento terapêutico estivesse correto, os pacientes foram a óbito. Em 1928, Haas repetiu sua hemodiálise usando heparina

como anticoagulante. A primeira hemodiálise eficiente para o tratamento da insuficiência renal foi realizada por Dutchman Willen Kolff, em Kampen, na Holanda, em 1945. Ele utilizou heparina como anticoagulante e tubos de celofane envoltos em um tambor rotatório parcialmente submerso em uma solução de diálise. No início da década de 1960, surgiu um aparelho que substituíria as funções renais com acentuada qualidade, que recebeu o nome de rim artificial (14). A americana Clyde Shields viveu por 11 anos submetida ao tratamento com o rim artificial, falecendo em 1971 de infarto do miocárdio. Destaca-se que o custo-benefício foi extremamente alto, no que se refere ao desenrolar do tratamento dialítico.

Atualmente, pacientes renais crônicos podem ser tratados por meio de métodos dialíticos, como a diálise peritoneal e a hemodiálise, ou serem submetidos a transplante renal.

Diálise consiste na depuração sangüínea por meio de membranas semipermeáveis naturais (peritônio) ou extracorpóreas (filtros de hemodiálise/hemofiltração), aplicada à substituição da função renal. A diálise permite a remoção de substâncias tóxicas e de fluidos (ultrafiltrado), a fim de manter o equilíbrio ácido-base, eletrolítico e volêmico. A remoção das toxinas e fluidos se faz por difusão e/ou por convecção (15).

A TRSE consiste em fazer passar o sangue do paciente por uma máquina, a qual utiliza uma bomba (que movimenta o sangue) e uma membrana artificial que separa o sangue da solução de diálise. O transporte de solutos por difusão (do sangue ao banho) ocorre pela diferença de concentração, tendo interferência o tamanho da molécula do soluto e do poro da membrana e a concentração do soluto nos meios. Já o movimento de fluido (desprovido de proteína) ocorre pela diferença de pressão hidráulica que se estabelece entre os dois sistemas, a qual pode ser ajustada pelo operador (processo de ultrafiltração). Há três modalidades de TRSE. A hemodiálise, que é o procedimento mais comum, é configurada de tal modo a permitir simultaneamente a remoção de solutos por difusão e convecção e a retirada de fluido por ultrafiltração. A hemofiltração é necessária quando se torna prioritário remover fluido do organismo. Utilizam-se, para isso, membranas de alta condutância hidráulica, que permitem uma alta taxa de ultrafiltração. Neste caso, o sangue não é exposto a uma solução de diálise e, portanto, não há transporte difusional. A hemodiafiltração utiliza membranas de alta condutância hidráulica, que permitem a

passagem rápida do fluido do sangue à solução de diálise. Além disso, a exposição do sangue a uma solução de diálise possibilita o transporte de solutos por difusão e convecção (15).

Pacientes com IRC em hemodiálise realizam, no mínimo, 3 sessões por semana com duração de 4 horas, de maneira a garantir um equilíbrio hidroeletrólítico e a eliminação dos metabólitos indesejáveis ao organismo. O acesso vascular para a realização do procedimento dialítico pode ser permanente (Fístula Artério-Venosa – FAV) ou temporário (punção percutânea de um grande vaso sanguíneo ou Shunt Artério-Venoso – SAV).

O transplante renal é outro meio de tratamento. Este melhora a qualidade de vida do indivíduo, e por outro lado, custos socioeconômicos são reduzidos. Entretanto, dificuldades relativas à doação do órgão, bem como da infra-estrutura física, organizacional e orçamentária do Sistema Nacional de Transplantes tornam esta opção ainda limitada.

Considerando a importância epidemiológica das doenças renais e da IRC no Brasil, bem como as repercussões sociais, psicológicas, econômico-financeiras e de restrição de qualidade de vida dos seus portadores, o Ministério da Saúde tem estabelecido normas e regulamentações. A Portaria nº 82, de 2000, estabelece o regulamento técnico para o funcionamento dos serviços de diálise e as normas para cadastramento destes junto ao SUS. Conforme esta Portaria, o ingresso do paciente renal crônico em programa de tratamento dialítico continuado dá-se por indicação médica, mediante avaliação clínica. O principal parâmetro de avaliação laboratorial é a depuração (clearance) da creatinina com valor igual ou inferior a 10 mL/min. A escolha e a indicação do tipo de tratamento dialítico a que deve submeter-se cada paciente são efetuadas ponderando-se o seu estado de saúde e o benefício terapêutico pretendido, em relação ao risco intrínseco de cada opção terapêutica. O paciente deve ser informado sobre as diferentes alternativas de tratamento, seus benefícios e riscos (16). Em 2002, foi estabelecida a Portaria nº 1589 - que define o sistema de cadastramento de pacientes submetidos às modalidades de tratamento dialítico nos estabelecimentos de saúde integrantes do SUS -, e a Portaria nº 1654 - que instituiu o Programa Nacional de Assistência aos Portadores de Doenças Renais. O que se pretende é detectar e tratar precocemente as doenças renais, para prevenir a perda da função renal ou retardar a necessidade de Terapia Renal

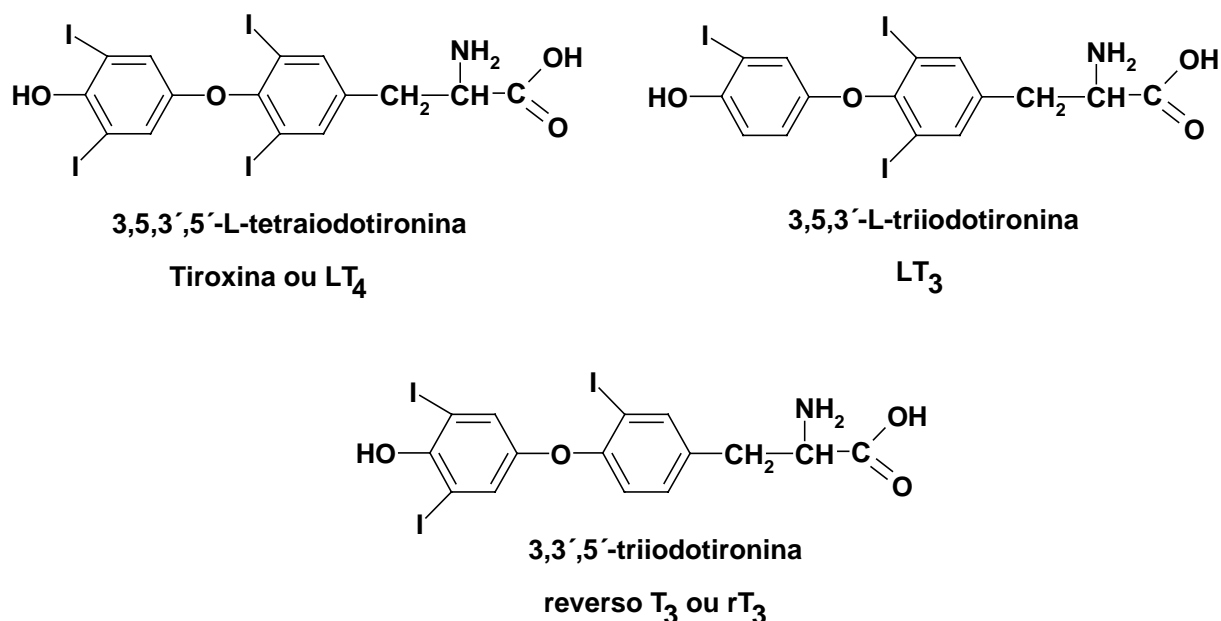
Substitutiva. Este Programa propõe o desenvolvimento de ações de prevenção, educação, vigilância sanitária, além do apoio psicológico aos portadores de doenças renais. O principal instrumento de execução do Programa é a criação das Redes Estaduais de Assistência em Nefrologia (17,18). Mais recentemente, a Portaria nº 82 (2003) instituiu, no âmbito da Secretaria de Assistência à Saúde, um Grupo de Trabalho com a finalidade de proceder a revisão, atualização e o aperfeiçoamento da atual Política Nacional de Assistência aos Portadores de Doenças Renais, as normas técnicas/indicações relativas a TRS, assim como os critérios de cadastramento de serviços que realizem TRS no âmbito do SUS (19). Por outro lado, há um efetivo movimento de organizações não governamentais envolvidas para o enfrentamento da problemática em escala nacional.

1.3. Hormônios Tireoideanos

1.3.1. Síntese, secreção, circulação, metabolismo e ação celular

A tireóide é uma glândula endócrina, está situada na região cervical, adiante da traquéia, e constitui-se de dois lobos unidos pelo istmo. É o maior órgão especializado da função endócrina no organismo humano. Sua função é sintetizar e secretar os hormônios tireoideanos (HTs), primariamente 3,5,3',5'-L-tetraiodotironina (LT₄ ou tiroxina) e em menor quantidade 3,5,3'-L-triiodotironina (LT₃) e 3,3',5'-triiodotironina (rT₃ ou T₃ reverso) (20). A *Figura 2* mostra a estrutura química dos HTs.

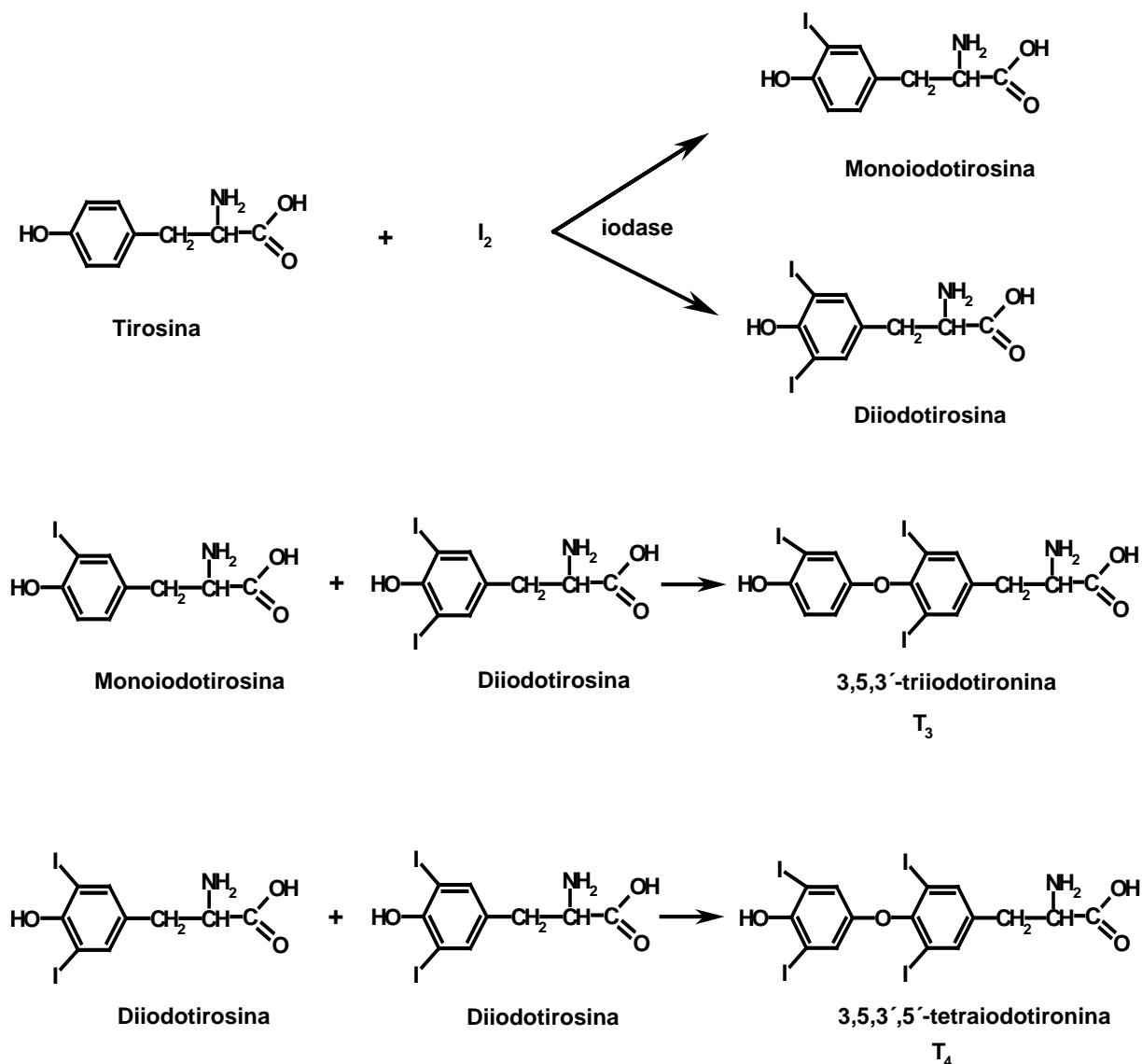
O íon iodeto é um componente indispensável para a síntese dos HTs, constituindo 65% do peso molecular do LT₄ e 58% do LT₃. A OMS recomenda a ingestão diária de 100-150 µg de iodo sob a forma de iodeto (21). O sal é reconhecido como efetivo agente de suplementação de iodo. A ANVISA, considerando a recomendação da Comissão Interinstitucional para Controle dos Distúrbios por Deficiência de Iodo do Ministério da Saúde, determina que o sal para consumo humano deve conter teor igual ou superior a 20 mg até o limite máximo de 60 mg de iodo por quilograma do produto (22).

FIGURA 2 - ESTRUTURA QUÍMICA DO LT_4 , LT_3 e rT_3 

O processo de síntese dos HTs ocorre na glândula tireóide, que está composta por um grande número de folículos fechados preenchidos por uma substância denominada colóide e revestidos por células epitelóides cúbicas. O componente principal do colóide é uma glicoproteína de alto peso molecular (660.000 Da) denominada tireoglobulina (Tg) (23).

O primeiro estágio na formação dos HTs ocorre pela transferência do iodeto do líquido extracelular para as células glandulares da tireóide e, daí, para o folículo. A membrana basal da célula da tireóide tem a capacidade específica de transporte ativo do iodeto para o interior da célula - isto é designada bomba de iodeto ou seqüestro de iodo. O retículo endoplasmático e o aparelho de Golgi das células da tireóide sintetizam e secretam para dentro dos folículos a Tg. Cada molécula de Tg contém 70 aminoácidos tirosina e estes constituem o principal substrato que se combina com o iodo para formar os HTs (23). Sumariamente, as etapas da biossíntese dos HTs são as seguintes: (1) seqüestro de iodeto; (2) oxidação do íon iodeto; (3) iodação da tirosina e formação dos hormônios - isto é designado organificação da Tg (24). A *Figura 3* mostra os estágios sucessivos de iodação da tirosina e formação final dos HTs, tiroxina e triiodotironina.

FIGURA 3 – QUÍMICA DA FORMAÇÃO DE TRIIODOTIRONINA (LT₃) E TIROXINA (LT₄).



Após a síntese dos HTs ter seguido seu curso, o LT₄ e LT₃ são armazenados nos folículos em quantidade suficiente para suprir o organismo em suas necessidades normais por dois a três meses (24).

O processo da síntese e secreção dos HTs é controlado por mecanismo de *feedback* pelo eixo hipotálamo - hipófise - tireóide. O hipotálamo produz TRH, que estimula a síntese e liberação do TSH, assim sinalizando à glândula tireóide na auto-regulação da maquinaria da síntese e secreção dos HTs (24).

Os HTs circulam na forma livre ou ligado a proteínas. No plasma sanguíneo as principais proteínas de ligação aos HTs, em ordem decrescente de afinidade, são: TBG, TBPA e albumina. Assim, cerca de 70% de LT₄ e 60% de LT₃ ligam-se à TBG,

15% de LT_4 e 5% de LT_3 ligam-se à TBPA, e à albumina ligam-se em pequenas proporções. Na forma livre no plasma, há aproximadamente 0,03% de LT_4 e 0,3% de LT_3 (25).

Os HTs estão envolvidos em numerosos aspectos da diferenciação celular, desenvolvimento e crescimento, e processos metabólicos dos mamíferos (20). A deficiência dos HTs, hipotireoidismo, durante o desenvolvimento fetal resulta em deficiência mental (cretinismo) e do crescimento na infância. Em adultos, os efeitos primários dos HTs são manifestados por alterações no metabolismo. Estes efeitos incluem mudanças no consumo de oxigênio e no metabolismo protéico, lipídico, de carboidratos e de vitaminas. Assim, o hipotireoidismo leva à diminuição do metabolismo, decréscimo da temperatura corporal e da frequência cardíaca, mixedema, ganho de peso e elevação do nível sérico de colesterol. Ao contrário, a elevação dos níveis dos HTs, hipertireoidismo, provoca taquicardia, aumento do metabolismo e da temperatura corporal, perda de peso e diminuição nos níveis séricos de colesterol (26).

Na célula ocorre a regulação de um maior suprimento do LT_3 , que é a principal forma ativa dos HTs, a partir da conversão enzimática do LT_4 . A conversão do LT_4 em LT_3 é realizada por três enzimas denominadas 5' desidase tipo 1, 2 e 3. A enzima tipo 1 tem alta capacidade e baixa afinidade pelo LT_4 . A enzima tipo 2 tem alta afinidade pelo substrato, e a regulação dos níveis desta enzima pode ter um efeito significativo na conversão global do LT_4 em LT_3 . A degradação do LT_4 e LT_3 em formas menos ativas também inclui um importante mecanismo de controle dos níveis dos HTs. A 5' desidase tipo 1 e tipo 3 podem remover iodo do anel da tiroxina para degradar LT_4 em rT_3 e LT_3 a LT_2 . Outras vias de degradação têm menor papel no metabolismo dos HTs. Elas incluem a produção de tironina glucoronada e sulfato, por meio da conjugação de anéis fenílicos e formação de derivados do ácido acético, como o Tetrac e Triac (27, 28).

Nas células-alvo os HTs interagem com receptores nucleares, que são fatores de transcrição que controlam a expressão de genes alvo ao se ligar usualmente na região promotora destes genes. Estes receptores pertencem à superfamília dos receptores nucleares. Esta superfamília abriga subclasses de receptores que diferem nos detalhes de suas ações. Uma subclasse está representada pelo TR,

RAR, VDR, PPAR e de diferentes receptores órfãos de ligante desconhecido (29,30, 31).

Os TRs são proteínas modulares, com três domínios principais: domínio amino-terminal, que desempenha função de transativação; o DBD , responsável pela ligação do receptor ao DNA; e o LBD , responsável pela ligação do TR ao hormônio. O LBD é essencial para a dimerização do TR e sua associação com proteínas co-reguladoras são essenciais para repressão ou ativação de genes pelo TR. Há uma seqüência de aminoácidos conectando o DBD e LBD que não é conservada e supostamente age como uma dobradiça (“*hinge*”) permitindo o movimento entre os dois módulos (29). A identificação dos domínios funcionais dos membros da superfamília dos receptores nucleares foi baseada na comparação da seqüência dos receptores e análises mutacionais. No entanto, a determinação de estruturas cristalográficas tem sido importante para confirmar esses domínios, bem como as mudanças estruturais induzidas pela ligação ao ligante e ao DNA (32, 33).

O TR liga-se a seqüências específicas de DNA dos genes responsivos ao HT, denominado elementos responsivos (HREs), geralmente localizados no promotor dos genes alvos promovendo *in vivo* a resposta hormonal. Os HREs são constituídos por duas cópias do hexanucleotídeo AGGTCA “N”AGGTCA onde “N” representa o número de bases que separa cada hexâmero, determinando a especificidade da ligação. Orientam-se na forma de repetições diretas (DRs). Os HREs podem estar dispostos como repetições diretas espaçadas por uma a cinco bases (DR – AGGTCA “N”AGGTCA), como palíndromo (5'-TGACCT AGGTCA – 3'), sem espaçamento entre os hexâmeros ou como palíndromos invertidos (5'-TGACCT “N”TGGTCA – 3') onde as cópias são espaçadas por 6 bases (34, 35).

Os TRs são codificados por genes, α e β , que nos humanos localizam-se nos cromossomos 17 e 3 respectivamente. Cada um desses TRs apresenta duas isoformas, isto é, $\alpha 1$ e $\alpha 2$, e $\beta 1$ e $\beta 2$ (36). A expressão dos TRs varia com o desenvolvimento e com a diferenciação celular. O TR $\alpha 1$, TR $\alpha 2$ e TR $\beta 1$ são expressos em quase todos os tecidos, ainda que em níveis diferentes. Assim, o TR $\alpha 1$ é expresso nos músculos esqueléticos, gordura marrom e no coração, o TR $\alpha 2$ é abundante no cérebro, enquanto o TR $\beta 1$ encontra-se no fígado, rim e cérebro. A expressão do TR $\beta 2$ ocorre somente na glândula pituitária e em outras regiões do

cérebro. A expressão variada dos TRs pode constituir um mecanismo usado pelo LT_3 para a regulação dos tecidos de forma seletiva (35, 36, 37).

Para modular a transcrição dos genes alvos, os receptores nucleares interagem com proteínas co-regulatórias. A ligação do LT_3 aos TRs ocorre com grande afinidade e especificidade. Na ausência do LT_3 , os TRs encontram-se associados à cromatina em um complexo com proteínas co-repressoras (complexo de deacetilase das histonas). Estas proteínas têm a ação de deacetilação das histonas, promovendo uma organização compactada no estado repressivo da cromatina. Na presença do LT_3 , o complexo repressor dissocia-se do receptor e ocorre o recrutamento de proteínas co-ativadoras. As proteínas co-ativadoras possuem atividade de acetilação das histonas, promovendo o relaxamento da cromatina e facilitando a interação desse complexo com os componentes da maquinaria transcricional no promotor dos genes alvos. Portanto, o modelo de regulação transcricional dos receptores nucleares inclui três estados da cromatina: (1) cromatina na ausência do receptor que manifesta o nível basal da acetilação da histona e transcrição; (2) cromatina no estado repressivo com histonas deacetiladas e não ocorre a transcrição na presença do receptor não ligado; e, (3) cromatina ativa com altos níveis de acetilação de histonas e atividade transcricional na presença do ligante ao receptor. Entretanto, somente a ruptura da cromatina não é suficiente para ativação transcricional, indicando que interações adicionais entre receptores nucleares e a maquinaria transcricional são requeridas para regular a expressão gênica (38).

Dessa forma, tanto para a conversão do LT_4 em LT_3 , quanto para efetivar seu efeito farmacológico, os HTs necessitam entrar na célula através da membrana plasmática das células-alvo. Anteriormente, acreditava-se que o transporte de HT ocorresse simplesmente por difusão facilitada. Essa concepção estava embasada no fato dos HTs serem pequenas moléculas lipofílicas que deveriam atravessar a membrana citoplasmática por esta ser constituída por uma camada lipídica. No entanto, estudos mais recentes demonstram que os mecanismos envolvidos neste transporte são mais complexos e possivelmente envolvem algumas proteínas ainda não caracterizadas.

1.3.2. Transporte transmembrana

Os mecanismos de entrada de HTs em células têm sido controversos. Alguns autores postulam que a entrada é por difusão passiva (39,40), enquanto outros argumentam que o transporte do LT_3 é ativo (41-47). Embora exista um grande número de estudos sobre a entrada e distribuição de HTs (41-51), não existe ainda uma definição clara sobre a presença de transporte ativo ou sobre a importância do transporte regulando a disponibilidade de HTs aos seus receptores nucleares. Por exemplo, em estudos *in vivo*, Oppenheimer e Schwartz demonstraram que a entrada do LT_3 no fígado de rato ocorria contra um gradiente de concentração, isto é, a concentração de LT_3 livre no citosol era 3 vezes superior à plasmática e a nuclear 58 vezes superior a citosólica (52). Entretanto, estudos posteriores em hepatócitos isolados não mostraram qualquer diferença entre as concentrações plasmática e citosólica (53). Há outros exemplos que indicam que a entrada de LT_3 exibe um componente saturável que é abolido com inibidores da produção de ATP (54) e é sensível à temperatura (55). Cheng e colaboradores identificaram e clonaram o cDNA para uma proteína localizada no retículo endoplasmático que se liga ao HT, mas nenhum envolvimento com o transporte de HT foi apresentado (56).

Há indicações que a família de proteínas ATP-binding cassette (ABC)/multidrug-resistance (mdr) pode transportar hormônios esteróides. Várias células que superexpressam proteínas da família mdr exibiram um efluxo aumentado de dexametasona, corticosterona e aldosterona, assim como uma atenuação da apoptose induzida por glucocorticóide (57-61). Além disso, a potência biológica da dexametasona em leveduras foi modulada pelo efluxo seletivo deste esteróide por uma proteína da família ABC (62,63). Entretanto, não há evidência publicada de que proteínas da família mdr transportem ou alterem a função dos HTs em células de mamíferos.

Há outras sugestões que o transporte de HTs regule a ação final destes. Estudos com DT_3 , um enantiômero do LT_3 com afinidade para o receptor semelhante à do LT_3 , tem apenas 5-30% da atividade de LT_3 *in vivo* devido a sua incapacidade de entrar no núcleo. Portanto, tanto no fígado como no coração, a presença nuclear de LT_3 é 5 a 6 vezes maior do que a de DT_3 (64). Estes resultados mostram que compostos com alta afinidade pelo receptor não são necessariamente agonistas

potentes e que outros com baixa afinidade podem ser agonistas potentes sugerindo que outros fatores, como o transporte, têm que ser contabilizados para aferir o efeito biológico final do HT. Também, é possível que uma deficiência no transporte possa explicar síndromes de resistência a hormônios que ocorrem na ausência de mutações nos receptores (65), e possam explicar a heterogeneidade da resposta de diferentes tecidos à ação do hormônio em pacientes com hipotireoidismo subclínico e com síndrome de resistência ao HT (66-68). O transporte de hormônios pode também explicar porque a terapia de reposição para corrigir o hipotireoidismo em ratos tireoidectomizados com várias doses de tiroxina (inclusive com doses suprafisiológicas) não restabelece o eutireoidismo em todos os tecidos (69).

Anteriormente foi estudado se o transporte de HT pode ser um fator regulador de sua ação em células HTC, derivadas de hepatoma pouco diferenciada de ratos, e em células HTC, que adquiriram resistência a ácidos biliares (células HTC-R) (70,71). As células HTC-R exibiram uma capacidade aumentada de exportar ácidos biliares e superexpressam diversas proteínas da membrana plasmática que representam novos membros da família ABC/mdr (70). Estes estudos demonstraram que as células HTC-R, mas não as HTC, secretam ativamente HTs por meio de um mecanismo saturável, sensível ao frio, bloqueado por VRP e, provavelmente, mediado por proteínas da família mdr (72). Experimentos posteriores em células de tireóide de ratos (FRTL-5) e fibroblastos de camundongos (NIH 3T3) (71-73) mostraram que tanto o influxo quanto o efluxo de HTs estão presentes em todos os tipos celulares, porém a atividade destes processos varia amplamente.

Mais recentemente foi observado por Neves et al. que o efluxo de LT_3 varia consideravelmente entre os diversos tecidos. Assim, enquanto a placenta exporta aproximadamente 90% do conteúdo de LT_3 , células renais exportam somente 50%. Além disso, foi observado que alguns análogos como o DT_4 e DT_3 influenciam a saída do LT_3 de ventriculócitos de forma diferente que os atriócitos e que o transportador responsável pela entrada do LT_3 é diferente do envolvido na saída do LT_3 , pois o Triac inibe a captação de LT_3 sem interferir com sua saída (73).

1.3.2.1. A hemácia como modelo de estudo do transporte transmembrana de hormônios tireoideanos.

O estudo do transporte de HTs em hemácias humanas e de ratos tem sido alvo de pesquisadores desde a década de 1970 (74). Os primeiros relatos sobre a especificidade na ligação de HTs à membrana plasmática de células-alvo foram feitos em 1975 por Tata (75) e em 1976 por Shing et al. (76). O estudo de Tata detectou saturabilidade na ligação de HTs a diferentes constituintes celulares, entretanto, o pesquisador questionou a relevância biológica desses sítios de ligação. Shing e seu grupo estudaram o efeito inibitório à ligação do LT_3 e LT_4 por seus análogos, em membrana de hemácias livres de hemoglobina. Demonstraram que a membrana da hemácia tem maior afinidade para os análogos de LT_3 do que de LT_4 , embora fosse similar para o LT_3 e LT_4 . Nesse sentido, estudos subsequentes foram realizados por Holm e Jacquemin (1979) (77), Botta et al. (1983) (78), Botta e Farias (1985) (79), Holm (1987) (80), Angel et al. (1987, 1989) (81,82), Samson et al. (1992, 1993) (83,84). Nesses estudos foram identificados dois sítios de ligação saturável para o LT_3 : um de alta afinidade e baixa capacidade e outro de baixa afinidade e alta capacidade. Os valores de K_d encontrados em sítios de alta afinidade de ligação em hemácias humanas variaram entre 0,2nM e 140nM, enquanto que para sítios de baixa afinidade variaram entre 5nM e 26 μ M (77, 79, 80, 82). Também foi demonstrado no estudo de Botta e Farias (1985) que a especificidade dessa ligação é dependente da reduzida presença de grupos proteína-SH (79). Em hemácias de ratos, os estudos demonstram que os valores de K_d para o LT_3 variaram entre 9pM e 21nM para sítios de alta afinidade, e entre 0,4nM e 50 μ M para sítios de baixa afinidade, sendo também dependente de um estado reduzido de grupos proteína-SH (78, 81-84). A considerável variação nos valores de K_d relatados nos diversos estudos de ligação, tanto em membrana de hemácias humanas quanto de ratos, é, provavelmente, devida às diferenças nas condições e técnicas empregadas, mas também pode ser devido ao envolvimento de múltiplos transportadores.

A análise de proteínas envolvidas na ligação de HTs à membrana plasmática pela técnica de marcação por fotoafinidade foi realizada por Samson et al. (1996). O estudo identificou uma proteína com massa molecular aparente de 55 KDa em membrana de hemácia de ratos. Além disso, os dados sugerem que a ligação do LT_3 àquela proteína é criticamente dependente da presença de fosfolipídios, indicando

estereoespecificidade e uma possível relação com um sistema específico para o transporte do LT_3 (85).

Parâmetros cinéticos do influxo de HTs em hemácias humanas e de ratos *in vitro* foram relatados por diferentes grupos de pesquisadores. Os estudos evidenciaram que o transporte de LT_3 não é dependente do gradiente de Na^+ (77, 86-89) e do gasto de energia (86, 88). Os dados de K_m , que reflete a afinidade do ligante ao carreador, indicam variação nos valores. Assim, o K_m de LT_3 encontrado em hemácias de ratos foi de 53nM e 160nM (90-92), e em hemácias humanas foi de 248nM a 3,3 μ M (77, 86-89). Quanto à influência do pH, não foram encontrados resultados demonstrando ser importante este fator para o transporte de LT_3 em hemácias de ratos (90, 91). Em relação a estereoespecificidade, os estudos, em geral, demonstram que os diferentes análogos de LT_3 e os D-isômeros de LT_3 e LT_4 são menos potentes em inibição do influxo de LT_3 e LT_4 do que de LT_3 e LT_4 (88, 90, 91). O estudo do transporte de LT_4 , ao contrário de LT_3 , tem sido menos investigado em diferentes células. Osty et al. (1990) sugerem que o influxo de LT_4 ocorre por difusão em hemácias humanas (91). Observa-se que estas discrepâncias podem estar relacionadas a diferentes necessidades de energia para o transporte de LT_4 e LT_3 , ou pode ser devido a outros fatores, como por exemplo, o uso de diferentes técnicas empregadas.

Pouco é conhecido sobre o papel do efluxo na regulação da concentração intracelular dos HTs. Há estudos em hepatócitos de ratos (92-94), placenta humana (95-96), célula pituitária de ratos (98), células tireoideanas de ratos (FRTL-5) (72), fibroblastos de camundongos (NIH - 3T3) (72), timócitos de camundongos (99), linfócitos humanos (100), células tumorais de líquido ascítico (Erich) (101). Os dados disponíveis sugerem que a extrusão é rápida, saturável e estereoespecífica. Quanto ao efluxo de LT_3 em hemácias humanas e de ratos, os dados demonstram que ocorre por um processo saturável que é estimulado por aminoácidos aromáticos (90, 91), entretanto, foi demonstrado que, em hemácias humanas, a extrusão de LT_4 ocorre por livre difusão (91). Inter-relações entre o transporte de aminoácidos aromáticos e o transporte de HTs têm sido investigadas em diferentes tipos de células de variadas espécies. Rosenberg et al. (1980) demonstraram que em hemácias humanas existe relação entre o transporte de LT_3 e o transporte de aminoácidos aromáticos, isto é, o sistema T (102). Este sistema consiste num

processo independente do gradiente de Na^+ , sendo específico para o transporte de fenilalanina, tirosina e particularmente do triptofano (103, 104). Zhou et al. (1990) demonstraram que, em hemácias de ratos, estes aminoácidos competitivamente inibiram o transporte de LT_3 . Portanto, sugerem que o sistema T em hemácias de ratos é similar ao sistema T em hemácias humanas inicialmente descrita. Assim, os resultados indicam que o LT_3 e o triptofano possuem um sistema de transporte comum ou que são transportados por um sistema estritamente articulado e interativo na membrana da hemácia (105,106).

Considerados conjuntamente, os estudos realizados sugerem que os HTs são acumulados, mas não metabolizados em hemácias. Estas células associam-se aos HTs circulantes e têm papel no transporte interórgãos. Dessa forma, a membrana da hemácia regula a entrada e saída de HTs e, conseqüentemente, o controle da concentração intracelular. A maior contribuição dessas pesquisas é que hemácias maduras constituem em reservatório e carreador de HTs no sangue, possibilitando pesquisas em condições fisiológicas e patológicas.

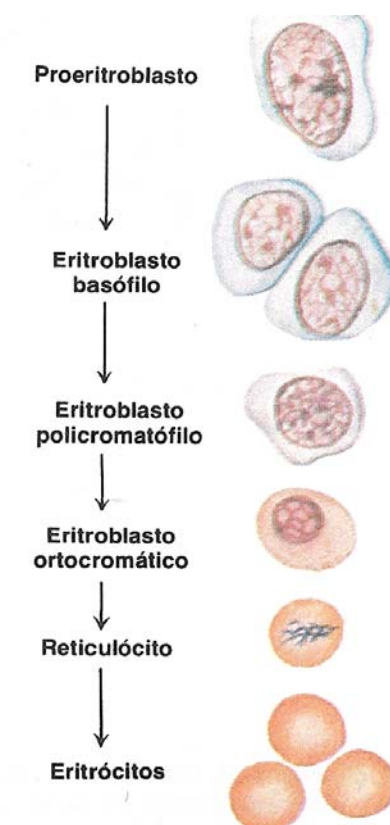
1.4. Hemácias

O sangue contém diversos tipos de células com funções diferentes. As células vermelhas, hemácias ou eritrócitos, permanecem nos vasos sanguíneos e transportam O_2 e CO_2 ligados à hemoglobina (107).

A formação das células sanguíneas, hematopoese, envolve controles complexos, nos quais a produção de cada tipo de célula é regulada individualmente. Na medula óssea, existem células-tronco denominadas hemapoieticas pluripotentes das quais derivam as células sanguíneas. A célula primordial comprometida com a produção das hemácias é designada UFC-E. A primeira célula que pode ser identificada como pertencente à série eritrocitária é o proeritroblasto. Sob estimulação apropriada, grande número dessas células é formado a partir das células-tronco UFC-E. Após ter sido formado, o proeritroblasto divide-se várias vezes, acabando por formar muitas hemácias maduras. As células da primeira geração são denominadas eritroblastos basófilos. Nas gerações subseqüentes, as células se enchem de hemoglobina até uma concentração aproximada de 34%; o núcleo se condensa e seu remanescente final é expelido da célula. Neste ponto, a célula penetra nos capilares por diapedese. Portanto, a hemácia não pode crescer

ou se dividir; a única forma possível de se ter novas hemácias é a partir das células-tronco (107, 108). A *Figura 4* mostra a gênese das hemácias.

FIGURA 4 – GÊNESE DAS HEMÁCIAS



FONTE: GUYTON, A.C. Hemácias, leucócitos e resistência do corpo à infecção. Fisiologia humana e mecanismos das doenças. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993, p.212.

A maioria das moléculas associadas com a membrana de hemácias humanas está constituída por proteínas periféricas de membrana, associadas com o lado citoplasmático da bicamada lipídica. As principais proteínas já reconhecidas – espectrina, glicoforina e banda 3 – são responsáveis por mais de 60% (em massa) do total de proteínas da membrana, com funções específicas. A espectrina mantém a integridade estrutural e a forma bicôncava da membrana, enquanto que a banda 3 é essencial no transporte de CO_2 dos tecidos para os pulmões. A função da glicoforina permanece desconhecida, entretanto, esta pertence a uma representativa classe de proteínas de membrana que atravessam a bicamada lipídica com uma única α -hélice. Muitos receptores da superfície celular, por exemplo, pertencem a essa classe (108).

A massa total de hemácias no sistema circulatório é regulada dentro de limites muito estreitos, de modo que há número adequado disponível para proporcionar oxigenação tecidual suficiente. A falta de oxigênio ou uma diminuição de hemácias estimula as células do rim a sintetizarem e secretarem quantidades aumentadas do hormônio eritropoetina. Também, a vitamina B12 e o ácido fólico são essenciais à síntese de DNA e, conseqüentemente, à maturação e divisão dos núcleos das células progenitoras (107, 109).

As hemácias têm vida média de 120 dias. Após este período são fagocitadas e digeridas no fígado e no baço, que removem mais de 10^{11} hemácias senescentes por dia (109).

1.5. Função Tireoideana na Insuficiência Renal Crônica

A IRC afeta a função da tireóide em múltiplos caminhos, incluindo baixos níveis circulantes de HTs, alterações no metabolismo periférico, decréscimo na ligação a proteínas carreadoras e possível redução do conteúdo hormonal nos tecidos (110).

Parâmetros clínico-laboratoriais da função tireoideana têm sido extensivamente investigados em doentes renais crônicos em hemodiálise e diálise peritoneal. Diversos estudos demonstram anormalidades nos testes de função tireoideana, evidenciando nível sérico total de LT_3 e LT_3 livre diminuído, tiroxina total diminuído, embora em menor magnitude, e o índice de tiroxina livre, uma estimativa indireta de LT_4 livre, reduzido proporcionalmente ao LT_4 total. O nível sérico de rT_3 total é normal, enquanto que a concentração do rT_3 livre está elevada devido a sua reduzida taxa de depuração. Entretanto, os níveis séricos do TSH e TBG são normais (111-121). Apesar dessas características bioquímicas, a maioria dos pacientes urêmicos é considerada clinicamente eutiroidea, embora os mesmos sinais e sintomas observados na síndrome urêmica também sejam descritos no hipotireoidismo, como pele seca, sonolência, letargia, fadiga, intolerância à condição de frio e hipercolesterolemia.

O nível sérico baixo de LT_3 é resultante do prejuízo extra-tireoideano da conversão de LT_4 a LT_3 , e o baixo nível de LT_4 é atribuído à presença de inibidores circulantes. Os estudos de Docter et al. (1993) e Lim C-F et al. (1993) relatam que inibidores de ligação de LT_4 a proteínas séricas carreadoras, como o CMPF, indoxil

e ácido hipúrico estão comumente elevados no soro urêmico (122, 123). Segundo Pereira et al. (1994) os níveis séricos elevados de interleucina - 1β (IL-1 β), TNF- α e seus respectivos inibidores específicos também inibem a ligação de LT₄ a proteínas carreadoras em pacientes urêmicos eutiroideos (124). Em indivíduos normais, níveis elevados do ácido oléico, interleucina-6 (IL-6) e TNF α podem reduzir a ligação de LT₄ a proteínas carreadoras, bem como níveis elevados de bilirrubina e ácidos graxos não esterificado em associação com hipoalbuminemia na falência hepática (125-128). Além disso, inibidores exógenos como furosemida, drogas antiinflamatórias e heparina podem deslocar a ligação do LT₄ (129). Portanto, esses fatores acarretam prejuízos na conversão de LT₄ a LT₃, reduzindo a concentração de LT₃. Santos (2000) demonstrou que toxinas urêmicas inibem a ligação do complexo TR/RxR ao DNA *in vitro* sugerindo que esta alteração poderia explicar a resistência à ação do LT₃ (130).

Não há nenhuma informação sobre conteúdo tecidual de LT₃ em humanos, e o estudo de Lim et al. (1984) mostra que em ratos urêmicos o conteúdo nuclear de LT₃ está reduzido no fígado, mas inalterado na glândula pituitária, indicando heterogeneidade tecidual (131).

Quanto ao efeito de terapias na IRC, segundo Kaptein (1996), a diálise minimamente afeta o metabolismo dos HTs, enquanto que a administração de zinco e eritropoetina podem parcialmente reverter à disfunção da tireóide. O metabolismo dos HTs normaliza com o transplante renal, entretanto, a terapia com glicocorticóides pode induzir a alterações adicionais (132).

Pacientes com IRC podem ter freqüência aumentada de bócio, nódulos tireoideanos, carcinoma tireoideano e hipotireoidismo. O bócio e hipotireoidismo podem ser induzidos pelo excesso de iodeto, devido à redução da excreção renal, e pode ser reduzido pela restrição de iodeto. O aumento na freqüência de nódulos tireoideanos e tumores podem estar relacionados a hiperparatireoidismo secundário. Após o transplante renal, a maior freqüência de tumores pode estar relacionada ao estado imunossuprimido (132).

Portanto, múltiplos fatores podem estar determinando a disfunção tireoideana na IRC. Entretanto, até o momento, não há estudos avaliando se o transporte de HTs em células de pacientes urêmicos em hemodiálise pode influenciar este quadro.

1.6. Justificativa e Objetivos

Pacientes com IRC frequentemente apresentam baixos níveis circulantes de LT_3 e LT_4 , entretanto, não há elevação do TSH. A explicação para este quadro, TSH normal com LT_4 e LT_3 diminuídos, tem sido um enigma. Além disso, por apresentarem níveis normais de TSH, estes doentes são considerados clinicamente eutiroideos. Considerando que para exercer seu efeito farmacológico, os HTs necessitam entrar nas células, é possível que o seu conteúdo intracelular, e não os níveis plasmáticos reflitam melhor o quadro tireoideano do paciente. Dessa forma, a atividade de transporte de HTs em diferentes células de pacientes urêmicos pode oferecer uma explicação para a associação entre níveis normais de TSH, apesar da diminuição na concentração plasmática dos HTs. Estudos sobre o transporte de HTs em células humanas e de outras espécies têm confirmado que a membrana citoplasmática constitui um ponto regulatório na modulação da concentração intracelular e, conseqüentemente, na ação hormonal em tecidos-alvo. Considerando este novo enfoque analítico-experimental é que se propõe o estudo do transporte de HTs em células de urêmicos. A hemácia madura é um bom modelo, uma vez que pesquisas realizadas em ratos e humanos demonstram que esta célula é um reservatório e carreador de HTs no sangue. É interessante observar que não há nenhum estudo no mundo científico avaliando o transporte de HTs em células de urêmicos, bem como o estudo do efeito de drogas na modulação da concentração intracelular.

Considerando a relevância científica da problemática apresentada e pela possibilidade de se examinar esta questão a partir de um modelo experimental, foram traçados os objetivos da investigação.

Objetivo geral

Estudar o transporte de hormônios tireoideanos em hemácias de pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise.

Objetivos específicos

- Caracterizar o influxo e efluxo de hormônios tireoideanos.
- Verificar se o rT_3 , Triac e Verapamil inibem o influxo e/ou o efluxo de LT_3 .
- Verificar se a hemodiálise modifica o transporte de hormônios tireoideanos.

1.7 Materiais e Métodos

Reagentes

$[^{125}\text{I}]\text{T}_3$ (2200 Ci/mmol) e $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ (969 Ci/mmol) foram adquiridos da Amersham Pharmacia Biotech UK Limited (Reino Unido). O Verapamil e os análogos ao LT_3 - rT_3 e Triac - foram obtidos da SIGMA (EUA). O meio RPMI 1640 foi adquirido da Life Technologies (EUA) e o SFB da GIBCO™ (EUA). EtOH absoluto foi adquirido da MERCK (Brasil) e o DMSO foi adquirido da SIGMA (EUA).

Características do Campo de Pesquisa

O estudo, em sua primeira etapa, realizou-se no Centro de Diálise da Sociedade de Clínica Médica (SOCLIMED), em Brasília – DF, que tem finalidade primariamente assistencial, como de pesquisa e ensino. Iniciou suas atividades em 1981, a fim de prestar assistência a pacientes renais crônicos e agudos que necessitassem ser submetido à terapia de substituição renal. Presta serviços a pacientes do SUS, de convênios e particulares.

Estruturalmente, está planejada e organizada para atender a 132 pacientes. Sua infra-estrutura física compreende: área de recepção dos pacientes, sala para 18 pacientes com sorologia negativa para hepatite B e C, sala para 4 pacientes portadores de hepatite B, sala para 2 pacientes portadores de hepatite C, sanitários para pacientes, posto de enfermagem, sala para reprocessamento de material (reuso), sala para depósito de materiais, copa, sanitário para funcionários, consultórios médicos, área de registro e arquivo.

A assistência é prestada por equipe multidisciplinar de saúde, isto é, oito médicos nefrologistas, nutricionista, três enfermeiros e vinte auxiliares de enfermagem e funcionários administrativos.

Na segunda etapa, a investigação desenvolveu-se no Laboratório de Farmacologia Molecular da Faculdade de Ciências da Saúde, que serve de local de ensino e pesquisa aos alunos de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e Patologia Molecular e Graduação em Farmácia da Universidade de Brasília.

Amostra

Cinco pacientes foram selecionados no Programa de Hemodiálise do Centro de Diálise da SOCLIMED, sendo 2 do sexo feminino e 3 do sexo masculino, com idade entre 25 e 50 anos, constituindo o grupo caso. Eram clinicamente eutiroideos e nenhum deles tinha história de doença tireoideana ou receberam terapia com hormônios tireoideanos ou tratamento com amiodarona e agentes contrastantes à base de iodo. Os pacientes eram dialisados 3 vezes por semana por 4 horas, sendo utilizado filtro de Polissulfona – F8 - (Fresenius®). Encontravam-se sob terapia dialítica por um período de 48 a 96 semanas. O grupo controle consistia de 3 sujeitos, sendo 2 do sexo feminino e 1 masculino, com idade entre 25 e 40 anos. Todos os sujeitos participantes eram voluntários e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (Anexos 1 e 2).

Obtenção de Hemácias

Três mililitros de amostra de sangue dos sujeitos participantes foram obtidos por venopunção e colocados em tubos contendo EDTA (BD Vacutainer System) e imediatamente colocados em gelo. Dos pacientes urêmicos, a amostra venosa foi obtida antes e imediatamente após a sessão de hemodiálise. As amostras foram centrifugadas (2200 x g, 5 min, 4^o C), o plasma e *buffy coat* foram removidos e o concentrado de hemácias lavado 3 vezes por ressuspensão/centrifugação (2200 x g, 5 min, 4^o C) com 3 mL de PBS gelado (16g NaCl, 0,4g KCl, 1,44g Na₂HPO₄ e 0,24g KH₂PO₄, pH 7,4). As células foram ressuspensas em até 4 mL com PBS gelado e realizada diluição 1:200 com Líquido de Gower , seguida de contagem.

Estudo do Influxo e do Efluxo

Para os estudos de influxo e efluxo foram usados:

Tracer - Meio RPMI 1640 contendo [¹²⁵I]T₃ ou [¹²⁵I]T₄ (aproximadamente 200.000cpm) e 0,01% de SFB (usado nesta concentração para manter as condições de cultura porém sem uma grande quantidade de proteínas plasmáticas que possam complexar-se com [¹²⁵I]T₃ ou [¹²⁵I]T₄).

Meio de efluxo - Meio RPMI 1640 com 10% SFB (usado nesta concentração com grande quantidade de proteínas plasmáticas, para que estas

possam complexar-se com [^{125}I]T₃ ou [^{125}I]T₄ que são expulsos das células, evitando-se assim o refluxo dos HTs nas hemácias).

Soluções de rT₃, Triac e Verapamil - As soluções de drogas não marcadas - os análogos ao LT₃ (rT₃ e Triac) e o VRP – foram preparadas usando-se a mistura de solventes EtOH:DMSO 3:2 como diluente. A solução estoque destas drogas era de 10⁻²M.

Veículo - Controle para as experiências em que foram usadas as soluções das drogas (rT₃, Triac e VRP). O veículo continha, além do [^{125}I]T₃ ou [^{125}I]T₄, o diluente (EtOH:DMSO 3:2), em quantidade igual à das soluções dos análogos e o VRP que foram adicionadas ao *tracer* e ao meio de efluxo.

Quantificação do [^{125}I]T₃ ou [^{125}I]T₄: A determinação da quantidade de [^{125}I]T₃ ou [^{125}I]T₄ que entrou ou saiu das células foi feita em Contador Gama – Cobra II – Packard. O volume ideal para leitura neste aparelho é de 1mL, por este motivo foi adicionado 1mL de água destilada às hemácias ao final dos experimentos.

Estudo do Influxo

As células (10⁸ por ensaio) foram incubadas com o *tracer* a 37°C na ausência ou presença das soluções das drogas não marcadas (concentração final 10⁻⁴M). O influxo foi interrompido ao 1 e 5 minutos pela adição de 500µL de PBS gelado e as amostras foram centrifugadas (2200 x g, 1min, 4°C) e, em seguida, lavadas com 1 mL de PBS gelado por 4 vezes. As hemácias foram recolhidas e determinado o conteúdo intracelular de [^{125}I]T₃ ou [^{125}I]T₄.

Estudo do Efluxo

Pré-incubação - As células (10⁸ por ensaio) foram inicialmente pré-incubadas com o *tracer* por 180 minutos a 37°C, na presença ou ausência das soluções das drogas não marcadas (concentração final 10⁻⁴M). O controle foi feito usando-se o veículo. Nesta etapa as células foram carregadas com os hormônios marcados. Ao final da pré-incubação as células foram lavadas por 4 vezes com PBS gelado por ressuspensão/centrifugação (2200 x g, 1 min, 4°C) para retirada do hormônio marcado não incorporado às hemácias.

Efluxo – No tempo zero do efluxo foi adicionado 1 mL/microtubo de meio de efluxo e deixado por 5 min a 37°C, ao final deste tempo as células foram

centrifugadas (aqui e adiante: 2200 x g, 1 min, 4°C) e o meio foi retirado e separado para contagem do radioisótopo que foi extrusado das células. Ao microtubo com as hemácias foi adicionado 1mL de meio de efluxo e deixado por mais 5 min a 37°C (totalizando assim 10 min de efluxo). As células foram centrifugadas e o meio recolhido para contagem. Ao microtubo com as células foi adicionado 1mL de meio de efluxo e deixado por 20 min a 37°C (totalizando 30 min de efluxo) seguido de centrifugação e recolhimento do meio para contagem. Por fim, às hemácias foi adicionado 1mL de meio de efluxo e deixado por 30 min a 37°C (totalizando os 60 min de efluxo). As hemácias foram centrifugadas, o meio recolhido para contagem. Foi adicionado 1mL de água destilada às hemácias para contagem do radioisótopo remanescente nas células.

Com a contagem de radioisótopo que foi exportado em cada tempo e com o remanescente celular após 60 min de efluxo pode-se calcular a porcentagem remanescente em cada tempo do efluxo.

Análise Estatística

Os dados foram submetidos a ANOVA complementado com o teste de significância Student Newman-Keuls Multiple Comparison. O programa Graph Pad Prism foi usado para análise estatística e construção das curvas do efluxo.

CAPÍTULO 2

Este capítulo, apresentado na forma de artigo, refere-se ao objetivo de caracterizar o influxo e efluxo de hormônios tireoidianos em hemácias de pacientes renais crônicos em hemodiálise.

THYROID HORMONE TRANSPORT IS DISTURBED IN ERYTHROCYTES FROM PATIENTS WITH CHRONIC RENAL FAILURE ON HEMODIALYSIS.*

RUNNING TITLE: Thyroid Hormones Transport In Erythrocytes in Chronic Renal Failure

Maria C. S. Rodrigues¹, Guilherme M. Santos¹, Aluizio da C. Silva², John D. Baxter³, Paul Webb³, Noureddine Lomri⁴, Francisco A. R. Neves¹, Ralff C. J. Ribeiro^{1†}, Luiz A. Simeoni¹

¹Department of Pharmaceutical Sciences, University of Brasilia, Brasilia, Brazil

²SOCLIMED-Dialysis Unit, Brasilia, Brazil.

³Metabolic Research Unit, Department of Medicine, UCSF, San Francisco, USA.

⁴UFR des Sciences et Techniques, University of Cergy-Pontoise, Cergy-Pontoise, France

† R.C.J.R.--Deceased

Correspondence to:

Luiz A. Simeoni, Ph.D.

Department of Pharmaceutical Sciences - University of Brasilia

P.O. Box 4473 - 70919-970, Brasilia, DF, Brazil

tel. +55 61 3072098, fax +55 61 3474622, e-mail: lsimeoni@unb.br

* Artigo aceito para publicação no *Renal Failure*, Editora Dekker, EUA.

KEY WORDS: Chronic Renal Failure, Thyroid Function, Thyroid Hormones Transport, Human Erythrocytes.

ABSTRACT

Aims: To now, there are no studies reporting whether thyroid hormones (THs) transport play a role in thyroid hormone dysfunction observed in chronic renal failure (CRF). Therefore, the aim of this study was to investigate the transport of THs in erythrocytes from patients with CRF on hemodialysis (HD). *Methods:* [^{125}I]-L-triiodothyronine ([^{125}I]T₃) and [^{125}I]-L-thyroxine ([^{125}I]T₄) erythrocytes uptake was measured at 1 min and 5 min. To study L-triiodothyronine (LT₃) and L-thyroxine (LT₄) efflux from erythrocytes, we preloaded the cells during 180 min with [^{125}I]T₃ or [^{125}I]T₄ and measured their [^{125}I]T₃ or [^{125}I]T₄ efflux during 60 min. *Results:* [^{125}I]T₃ uptake in erythrocytes from uremic patients pre-HD was higher than control subjects by 50% at 1 min and by 55% at 5 min. However, [^{125}I]T₄ uptake in erythrocytes from uremic patients was significantly lower at 1min (88%) and at 5 min (63%). LT₃ efflux rate was lower and LT₄ efflux was significantly higher than in control subjects. After 60-min of efflux, LT₃ remained in erythrocytes was 80% higher and LT₄ was 57% lower than in normal individuals. Neither [^{125}I]T₃ and [^{125}I]T₄ uptake, nor efflux rates were changed by hemodialysis. *Conclusion:* Despite the fact that uremic patients on hemodialysis show low serum levels of LT₃, changes in LT₃ influx and efflux could act as a compensatory mechanism that neutralize thyroid hormone dysfunction in order to maintain the euthyroid state.

INTRODUCTION

Clinical and biochemical parameters of thyroid function in hemodialysis patients with chronic renal failure (CRF) have been extensively examined. Several studies (1-10) demonstrated different abnormalities in thyroid function in patients with CRF on long-term hemo and peritoneal dialysis, including low circulating thyroid hormone (TH) concentration, altered peripheral hormone metabolism, disturbed binding to carrier proteins, increased iodine store in thyroid glands and reduction in thyroid receptor binding to DNA (11,12). Total serum L-thyroxine (LT₄) level, LT₄ binding to serum carrier proteins and serum free LT₄ are reduced in euthyroid patients with CRF (13). In addition, total and free L-triiodothyronine (LT₃)

concentrations are frequently reduced in those patients (14,15). Reduced LT_3 levels may be explained by decreased peripheral tissue conversion of LT_4 to LT_3 (2). This abnormality is not associated with increased conversion of LT_4 to metabolic inactive reverse L-triiodothyronine (rT_3), since rT_3 plasma levels are typically normal and distinguish the uremic patient from patients with chronic illnesses (16). The low LT_4 level is attributed to the presence of circulating inhibitors that impair binding of this form of TH to thyroxine-binding globulin (TBG). Taken together, these findings suggest that CRF affects thyroid function in multiple ways.

The absence of thyroid-stimulating hormone (TSH) elevation in face of low circulating levels of LT_3 and LT_4 in uremic patients has been an enigma and raises the issue as to whether there might have be a concomitant hypothalamo-pituitary adjustment to low TH levels (11). In 1996, we demonstrated that LT_3 efflux plays an important role in LT_3 action (17). Furthermore, in a reported study from our laboratories, we demonstrated that LT_3 efflux activity varies significantly in different tissues and suggested that THs transport in these tissues can modulate THs effects by regulating their intracellular contents in accordance to their needs (18). However, it is not known if abnormalities in thyroid hormone transport can play a role in thyroid dysfunction in uremic patients and whether alterations in TH transport could act as a compensatory mechanism to maintain a euthyroid environment in the face of altered serum THs levels. In order to improve our knowledge regarding the mechanisms involved in thyroid hormone dysfunction observed in CRF patients, we decided to examine THs transport in uremic cells.

In this study, we report the transport of THs in red blood cells (RBC) from patients with CRF on hemodialysis (HD). In comparison to normal individuals LT_3 uptake in RBC was higher and LT_3 efflux was reduced. We also found that, in the RBC of these patients, LT_4 uptake was reduced and LT_4 efflux was increased.

MATERIALS AND METHODS

Enrollment of Patients and Clinical Procedures

Patients (3 men and 2 women) from the Chronic Dialysis Program of Soclimed Dialysis Clinic were enrolled. Their age ranged from 25 to 50. All patients appeared well nourished and clinically euthyroid; none had a history of thyroid disease, thyroid

hormone therapy, treatment with amiodarone or a clinically detectable goiter. The patients were on hemodialysis 3 times a week for a period of 48-96 months. Hemodialysis therapy was performed with Fresenius® Polysulfone filter. The control group consisted of 3 healthy subjects (2 women and 1 man - 25 to 40 years old). The Institution's Committee on Human Rights in Research approved the protocol, and all patients and normal individuals gave informed consent.

Reagents

[¹²⁵I]T₃ (2200 Ci/mmol) and [¹²⁵I]T₄ (969 Ci/mmol) were purchased from Amersham Pharmacia Biotech UK Limited, United Kingdom. Medium RPMI 1640 was purchased from Life Technologies, and Newborn Bovine Serum (NBS) from GIBCO™, Invitrogen Corporation, Grand Island, N.Y, USA.

Erythrocytes Procedures

Three milliliters of blood were withdrawn by venipuncture on glass tubes containing EDTA (BD Vacutainer System) and immediately placed in an ice bath. In the uremic patients, venous blood was obtained before and immediately after HD. The protocol used was a modification of a described method (19). In brief, the blood samples were centrifuged (2200 x g, 5 min, 4°C), the plasma and buffy coat were removed, and the RBC pellet was washed three times by resuspension/centrifugation (2200 x g, 1 min, 4°C) with 3 mL ice-cold Phosphate Buffer Saline (PBS) (16g NaCl, 0.4g KCl, 1.44g Na₂HPO₄ and 0.24g KH₂PO₄, pH 7.4). The erythrocyte pellet was resuspended in 3 mL of PBS and cells were counted.

Cellular Uptake

Cells (10⁸ per assay) were incubated at 37°C in RPMI 1640 medium containing [¹²⁵I]T₃ or [¹²⁵I]T₄ (approximately 200,000 cpm) and 0.01% NBS. Uptake was stopped at 1 and 5 min by adding 500µL ice-cold PBS and centrifuged (2200 x g, 1 min, 4°C). Cells were washed four times with ice-cold PBS. Previous experiments in our laboratory established that this washing procedure efficiently removes extracellular labeled THs while causing minimal loss of intracellular tracer. Cellular radioactivity was determined.

Efflux Studies

Cells (10^8 per assay) were first preloaded with [^{125}I]T₃ or [^{125}I]T₄ in preincubation medium containing 0.01% NBS at 37°C for 180min, after which cells were washed four times with ice-cold PBS by resuspension/centrifugation (2200 x g, 1 min., 4°C). Efflux was initiated by adding to each microcentrifuge tube, 1mL of prewarmed (37°C) medium containing 10% NBS without tracer. Incubation continued at 37°C, and the medium was collected and replaced by fresh, without tracer, prewarmed efflux medium at 5, 15, 30 and 60 min. The addition of 10% NBS to the medium effectively prevented reuptake of [^{125}I]T₃ and [^{125}I]T₄ during the efflux study (20). At the end of the efflux period, the cellular radioactivity of cells was determined.

Percentages of the tracer remaining in the cells at each time were computed, and efflux curves were constructed using a curve-fitting algorithm, as described previously (17), using the GraphPad Prism Program.

Statistics

Data were analyzed by one-way ANOVA complemented with the Newman-Keuls Multiple Comparison Test. $P < 0.05$ was considered statistically significant. Graph Pad Prism Program was used for statistical analysis and to draw the curves.

RESULTS

 $[^{125}\text{I}]\text{T}_3$ and $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ Uptake in the Erythrocytes

To study whether $[^{125}\text{I}]\text{T}_3$ and $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ influx can be modified in HD patients, we measured $[^{125}\text{I}]\text{T}_3$ and $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ uptake in RBC collected before and after HD. Fig. 1 shows the uptake of $[^{125}\text{I}]\text{T}_3$ and $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ at 1 min and 5 min (fig. 1A and 1B respectively) in erythrocytes from uremic patients and control subjects. As shown at 1 min, the uptake of $[^{125}\text{I}]\text{T}_3$ in erythrocytes from uremic patients pre-HD ($2.1 \pm 0.15\%$, $n=15$) and post-HD ($2.0 \pm 0.22\%$, $n=15$) was significantly higher than in RBC from control subjects ($1.4 \pm 0.11\%$, $n=9$), $P<0.05$, and there is no difference between the values pre and post-HD. The same result was observed at 5 min, when the pre-HD ($3.1 \pm 0.16\%$, $n=15$) and post-HD ($3.5 \pm 0.22\%$, $n=15$) values were significantly higher than the values found in the control group ($2.0 \pm 0.05\%$, $n=9$), $P<0.05$.

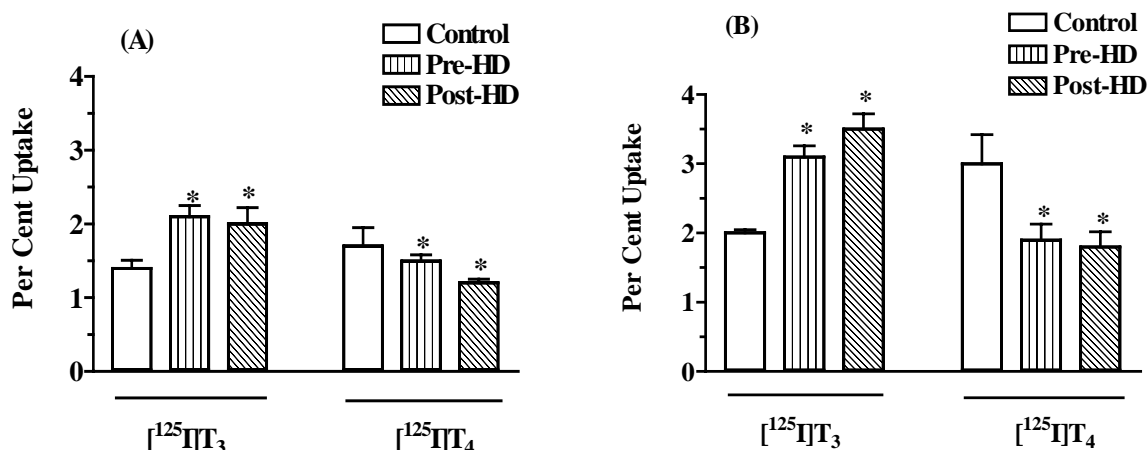


FIGURE1 – Uptake of $[^{125}\text{I}]\text{T}_3$ and $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ in human erythrocytes from control subjects and uremic patients pre-hemodialysis and post-hemodialysis. Uptake was studied as described in *Material and Methods*, at 1 min (A) and at 5 min (B). In both (A) and (B), the results are representative of at least nine (control) and fifteen (uremic patients) independent experiments and show the mean \pm SEM. * $P<0.05$ for uremic patient vs control.

On the other hand, the uptake of $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ at 1 min and 5 min were significantly reduced when compared to controls. Therefore, at 1 min, the $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ uptake in erythrocytes from uremic patients were $1.5 \pm 0.08\%$ pre-HD ($n=15$) and $1.2 \pm 0.05\%$, post-HD ($n=15$) and $1.7 \pm 0.25\%$ ($n=9$) in erythrocytes of control subjects, $P<0.05$ and at 5 min the values were $1.9 \pm 0.23\%$, pre-HD ($n=15$), $1.8 \pm 0.22\%$, post-HD ($n=15$) and for subject controls, $3.0 \pm 0.42\%$ ($n=9$), $P<0.05$. Consequently, these results

show that erythrocytes collected from uremic patient's pre and post-HD capture more LT_3 and less LT_4 , and hemodialysis does not affect THs transport. Additionally, $[^{125}I]T_3$ and $[^{125}I]T_4$ uptakes, either at 1 min or at 5 min, were very similar in control subjects but not in uremic patients in which LT_4 uptake was significantly smaller than LT_3 at 1min and 5 minutes ($P<0.03$).

Efflux of $[^{125}I]T_3$ and $[^{125}I]T_4$ in the Erythrocytes

Considering that RBC has different transport mechanisms to take in LT_3 and LT_4 and uremia modifies these transport, we decided to address whether thyroid hormone efflux could also be altered in hemodialysis patients.

To study LT_3 and LT_4 efflux in erythrocytes, we preloaded the cells with $[^{125}I]T_3$ and $[^{125}I]T_4$ and measured their $[^{125}I]T_3$ or $[^{125}I]T_4$ efflux over 60 min.

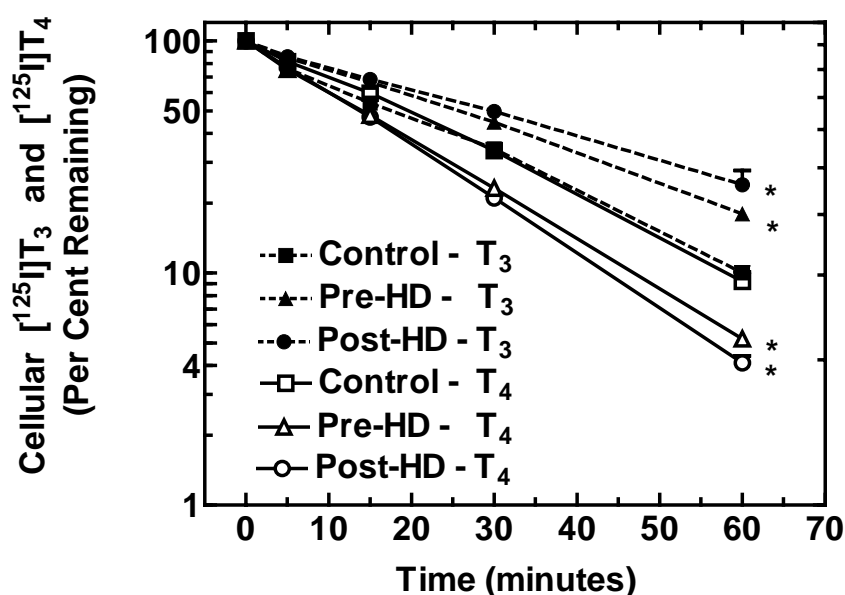


FIGURE 2 – Efflux of $[^{125}I]T_3$ and $[^{125}I]T_4$ from human erythrocytes. The efflux was studied as described in *Material and Methods*. Efflux of $[^{125}I]T_3$ in erythrocytes from control subjects (*closed squares*), pre-hemodialysis (*closed triangles*) and post-hemodialysis (*closed circles*). Efflux of $[^{125}I]T_4$ in erythrocytes from control subjects (*open squares*), pre-hemodialysis (*open triangles*) and post-hemodialysis (*open circles*). These results are representative of at least nine (control) and fifteen (pre- and post-hemodialysis) independent experiments. * $P<0.05$ for uremic patients vs control.

Figure 2 show that the capacity of RBC to export $[^{125}I]T_3$ and $[^{125}I]T_4$ varies significantly among different groups. The RBC from uremic patients exported LT_4 faster than the RBC from control individuals. We observed that the efflux of LT_4 was higher at 15 min and 30 min, and at 60 min the $[^{125}I]T_4$ remaining inside the cells was

only $5.2 \pm 0.35\%$ (pre-HD, $n=15$) and $4.1 \pm 0.30\%$ (post-HD, $n=15$) against $9.2 \pm 0.9\%$ remaining in the cells of the controls subjects ($n=9$), $P<0.05$. Differently, the $[^{125}\text{I}]\text{T}_3$ remaining inside the RBC from uremic patients (from 30 min) was higher than the control group and at 60 min was $18.0 \pm 1.2\%$ (pre-HD, $n=15$) and $24.0 \pm 3.7\%$ (pos-HD, $n=15$) against $10.0 \pm 0.73\%$ ($n=9$) from controls subjects ($P<0.05$), suggesting that the rate of LT_3 efflux in RBC from uremic patients occurs at a slower rate than in normal individuals. When we analyzed LT_4 and LT_3 efflux activities in normal individuals and in patients on hemodialysis, we observed that in uremic patients, after 60 min (Figure 3), the percent of LT_4 remaining inside the erythrocytes before and after dialysis were significantly lower than the values observed in control subjects. Moreover, it is interesting to note that in normal subjects there is no difference between the RBC LT_3 and LT_4 efflux rate. On the contrary, in uremic patients LT_3 efflux from erythrocytes is greatly reduced when compared to LT_4 , and hemodialysis did not correct this difference.

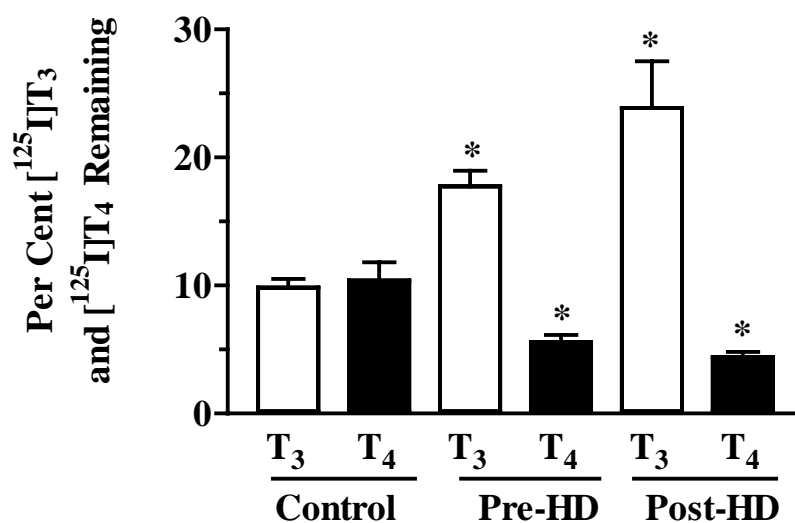


FIGURE 3 – Efflux of $[^{125}\text{I}]\text{T}_3$ and $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ in erythrocytes from subjects control and uremic patient's pre-hemodialysis and post-hemodialysis. Per cent of $[^{125}\text{I}]\text{T}_3$ and $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ remaining in the erythrocytes after 60min-efflux. These results are representative of at least nine (control) and fifteen (pre-hemodialysis and post-hemodialysis) independent experiments and show the mean \pm SEM. * $P<0.05$ for T_3 and T_4 uremic patients vs control.

Thus, our results demonstrate that RBC from uremic patients retain LT_3 inside the cells and export LT_4 to the outside.

DISCUSSION

Based on the concept that the transport through the cellular membrane is essential in the modulation of the concentration and action of the THs, we decided to characterize the influx and efflux of thyroid hormones in erythrocytes of uremic patients on hemodialysis.

Our results showed that uptake of [125 I]T₃ in erythrocytes from uremic patients at 1 and 5 min (pre-HD and post-HD) was higher than from healthy volunteers. In contrast, [125 I]T₄ uptake by erythrocytes from the same patients, pre-HD and post-HD, at 1 min and 5 min, was significantly reduced in comparison with control subjects. In addition, there was no correlation between THs transport disturbances and dialysis or other parameters such as urea and creatinine blood levels (data not shown). The inhibition of LT₄ uptake observed in CRF patients may be attributed to impairment of LT₄ binding to its transporter, which is located in the erythrocyte plasma membrane. It has been shown that low total LT₄ values in CRF patients are primarily related to a decrease of LT₄ binding to serum carrier proteins (11). Also, inhibitors of LT₄ binding to serum carrier proteins have been described in euthyroid uremic patients and may include elevated serum levels of 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid (CMPF), indoxyl sulfate, and hippuric acid in uremic serum (21,22), as well as increased serum levels of interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor (TNF- α), and their respective specific inhibitors (23). In addition, some drugs taken by uremic patients can behave as exogenous inhibitors of LT₄ binding to serum carrier proteins, such as furosemide, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and heparin (24). The reason why LT₃ uptake by erythrocytes from uremic patients in this study is greatly increased is not known.

Despite the normal production of LT₃ by the thyroid gland (11), the serum concentration of LT₃ and the peripheral conversion of LT₄ to LT₃ are decreased in CRF patients. In this study we also observed: 1) that erythrocytes from uremic patients exported LT₄ more rapidly than control subjects as demonstrated by a significant diminishing percentage of LT₄ remaining within these cells, and 2) that RBC of uremic patients exported LT₃ more slowly than RBC from controls, as demonstrated by the high percent of LT₃ remained inside the erythrocytes. Moreover, hemodialysis therapy did not modify the transport of THs. Therefore, the presence of non-dialyzable toxins or modifications in the expression of some THs transporters

may be implicated in these differences that were observed in RBC from patients with CRF.

Collectively, these results show that THs transport in RBC from patients with CRF is modified. These changes in carrier-mediated influx of LT_3 could be seen as a compensatory mechanism that counteracts the disturbances in the TH availability for the target tissues. This is in agreement with similar findings from studies performed on RBC from thyroidectomized rats which also show that the low serum levels of TH are associated with a significantly increased LT_3 uptake in erythrocytes and that administration of high doses of LT_4 to achieve a large increase in serum TH levels significantly decreases LT_3 uptake by erythrocytes (25).

In conclusion, these findings represent the first demonstration that differences in LT_3 and LT_4 transport in erythrocytes from patients with CRF might play a role of a compensatory mechanism to maintain a euthyroid environment within the cell despite the low levels of LT_3 and the reduced conversion of LT_4 to LT_3 .

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by the Brazilian Research Council, CNPq, grant 471204/01-3 to L.A.S. and CAPES-COFECUB Program, grant 434/03 to G.M.S., F.A.R.N., N.L. and L.A.S. The authors wish to thank Soclimed Dialysis Unit's staff, Mrs. Rilva G. P. Soares for technical assistance and Mrs. Evelyne Ribeiro for her assistance with the English manuscript.

REFERENCES

1. Spector, D.A.; Davis, P.J.; Helderman, J.H.; Bell, B.; Utiger, R.D. Thyroid Function and Metabolic State in Chronic Renal Failure. *Ann. Intern. Med.* **1976**, *85* (6), 724-730.
2. Lim, V.S.; Fang, V.S.; Katz, A.I.; Refetoff, S. Thyroid Dysfunction in Chronic Renal Failure. A Study of the Pituitary- Thyroid Axis and Peripheral Turnover Kinetics of Thyroxine and Triiodothyronine. *J. Clin. Invest.* **1977**, *60* (3), 522-534.
3. Hershman, J.M.; Krugman, L.G.; Kopple, J.D.; Reed, A.W.; Azukizawa, M.; Shinaberger, J.H. Thyroid Function in Patients Undergoing Maintenance Hemodialysis: Unexplained Low Serum Thyroxine Concentration. *Metabolism* **1978**, *27* (7), 755-759.
4. Gomez-Pan, A.; Alvarez-Ude, F.; Yeo, P.P.; Hall, R.; Evered, D.C.; Kerr, D.N. Function of the Hypothalamo-Hypophysial-Thyroid Axis in Chronic Renal Failure. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* **1979**, *11* (5), 567-574.
5. Muschmov, D.; Zacharieva, B. [the Metabolism of Thyroid Hormones in Chronic Renal Insufficiency]. *Z. Urol. Nephrol.* **1982**, *75* (4), 269-274.
6. Beckett, G.J.; Henderson, C.J.; Elwes, R.; Seth, J.; Lambie, A.T. Thyroid Status in Patients with Chronic Renal Failure. *Clin. Nephrol.* **1983**, *19* (4), 172-178.
7. Faber, J.; Heaf, J.; Kirkegaard, C.; Lumholtz, I.B.; Siersbaek-Nielsen, K.; Kolendorf, K.; Friis, T. Simultaneous Turnover Studies of Thyroxine, 3,5,3' and 3,3',5'-Triiodothyronine, 3,5-, 3,3'-, and 3',5'- Diiodothyronine, and 3'-Monoiodothyronine in Chronic Renal Failure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1983**, *56* (2), 211-217.
8. Hegedus, L.; Andersen, J.R.; Poulsen, L.R.; Perrild, H.; Holm, B.; Gundtoft, E.; Hansen, J.M. Thyroid Gland Volume and Serum Concentrations of Thyroid Hormones in Chronic Renal Failure. *Nephron* **1985**, *40* (2), 171-174.
9. Pagliacci, M.C.; Pelicci, G.; Grignani, F.; Giammartino, C.; Fedeli, L.; Carobi, C.; Buoncristiani, U.; Nicoletti, I. Thyroid Function Tests in Patients Undergoing Maintenance Dialysis: Characterization of the 'Low-T4 Syndrome' in Subjects on Regular Hemodialysis and Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis. *Nephron* **1987**, *46* (3), 225-230.
10. Tang, W.W.; Kaptein, E.M.; Massry, S.G. Diagnosis of Hypothyroidism in Patients with End-Stage Renal Disease. *Am. J. Nephrol.* **1987**, *7* (3), 192-197.
11. Lim, V.S. Thyroid Function in Patients with Chronic Renal Failure. *Am. J. Kidney Dis.* **2001**, *38* (4 Suppl 1), S80-84.

12. Toell, A.; Degenhardt, S.; Grabensee, B.; Carlberg, C. Inhibitory Effect of Uremic Solutions on Protein-DNA-Complex Formation of the Vitamin D Receptor and Other Members of the Nuclear Receptor Superfamily. *J. Cell. Biochem.* **1999**, *74* (3), 386-394.
13. Kaptein, E.M. Thyroid Hormone Metabolism and Thyroid Diseases in Chronic Renal Failure. *Endocr. Rev.* **1996**, *17* (1), 45-63.
14. Medri, G.; Carella, C.; Padmanabhan, V.; Rossi, C.M.; Amato, G.; De Santo, N.G.; Beitins, I.Z.; Beck-Peccoz, P. Pituitary Glycoprotein Hormones in Chronic Renal Failure: Evidence for an Uncontrolled Alpha-Subunit Release. *J. Endocrinol. Invest.* **1993**, *16* (3), 169-174.
15. Kaptein, E.M.; Quion-Verde, H.; Chooljian, C.J.; Tang, W.W.; Friedman, P.E.; Rodriguez, H.J.; Massry, S.G. The Thyroid in End-Stage Renal Disease. *Medicine (Baltimore)* **1988**, *67* (3), 187-197.
16. Wartofsky, L.; Burman, K.D. Alterations in Thyroid Function in Patients with Systemic Illness: The "Euthyroid Sick Syndrome". *Endocr. Rev.* **1982**, *3* (2), 164-217.
17. Ribeiro, R.C.; Cavalieri, R.R.; Lomri, N.; Rahmaoui, C.M.; Baxter, J.D.; Scharschmidt, B.F. Thyroid Hormone Export Regulates Cellular Hormone Content and Response. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (29), 17147-17151.
18. Neves, F.A.; Cavalieri, R.R.; Simeoni, L.A.; Gardner, D.G.; Baxter, J.D.; Scharschmidt, B.F.; Lomri, N.; Ribeiro, R.C. Thyroid Hormone Export Varies among Primary Cells and Appears to Differ from Hormone Uptake. *Endocrinology* **2002**, *143* (2), 476-483.
19. Osty, J.; Valensi, P.; Samson, M.; Francon, J.; Blondeau, J.P. Transport of Thyroid Hormones by Human Erythrocytes: Kinetic Characterization in Adults and Newborns. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1990**, *71* (6), 1589-1595.
20. Cavalieri, R.R.; Simeoni, L.A.; Park, S.W.; Baxter, J.D.; Scharschmidt, B.F.; Ribeiro, R.C.; Lomri, N. Thyroid Hormone Export in Rat FRTL-5 Thyroid Cells and Mouse NIH-3T3 Cells Is Carrier-Mediated, Verapamil-Sensitive, and Stereospecific. *Endocrinology* **1999**, *140* (11), 4948-4954.
21. Lim, C.F.; Bernard, B.F.; de Jong, M.; Docter, R.; Krenning, E.P.; Hennemann, G. A Furan Fatty Acid and Indoxyl Sulfate Are the Putative Inhibitors of Thyroxine Hepatocyte Transport in Uremia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1993**, *76* (2), 318-324.
22. Docter, R.; Krenning, E.P.; de Jong, M.; Hennemann, G. The Sick Euthyroid Syndrome: Changes in Thyroid Hormone Serum Parameters and Hormone Metabolism. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* **1993**, *39* (5), 499-518.

23. Pereira, B.J.; Shapiro, L.; King, A.J.; Falagas, M.E.; Strom, J.A.; Dinarello, C.A. Plasma Levels of Il-1 Beta, Tnf Alpha and Their Specific Inhibitors in Undialyzed Chronic Renal Failure, Capd and Hemodialysis Patients. *Kidney Int.* **1994**, *45* (3), 890-896.
24. Munro, S.L.; Lim, C.F.; Hall, J.G.; Barlow, J.W.; Craik, D.J.; Topliss, D.J.; Stockigt, J.R. Drug Competition for Thyroxine Binding to Transthyretin (Prealbumin): Comparison with Effects on Thyroxine-Binding Globulin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1989**, *68* (6), 1141-1147.
25. Moreau, X.; Lejeune, P.J.; Jeanningros, R. Kinetics of Red Blood Cell T3 Uptake in Hypothyroidism with or without Hormonal Replacement, in the Rat. *J. Endocrinol. Invest.* **1999**, *22* (4), 257-261

CAPÍTULO 3

Este capítulo, apresentado na forma de artigo, refere-se ao objetivo de estudar o efeito do Verapamil, rT₃ e Triac no influxo e efluxo do [¹²⁵I]T₃ em hemácias de pacientes renais crônicos em hemodiálise.

LT₃ UPTAKE AND EFFLUX MECHANISMS ARE ALTERED IN ERYTHROCYTES FROM PATIENTS WITH CHRONIC RENAL FAILURE ON HEMODIALYSIS AND ARE TRIAC, rT₃ AND VERAPAMIL SENSITIVE.*

RUNNING TITLE: Effect of Verapamil, Triac and rT₃ on Thyroid Hormone Transport in Erythrocytes.

Maria C. S. Rodrigues¹, Aluizio da C. Silva², Ralff C. J. Ribeiro^{1†}, Nouredine Lomri³, Francisco A. R. Neves¹, Luiz A. Simeoni¹

¹Department of Pharmaceutical Sciences, University of Brasilia, Brasilia, Brazil

²SOCLIMED-Dialysis Unit, Brasilia, Brazil.

³UFR des Sciences et Techniques, Laboratoire ERRMECe, Université de Cergy-Pontoise, Cergy-Pontoise, France

† R.C.J.R.--Deceased

Correspondence to:

Luiz A. Simeoni, Ph.D.

Department of Pharmaceutical Sciences - University of Brasilia

P.O. Box 4473 - 70919-970, Brasilia, DF, Brazil

tel. +55 61 3072098, fax +55 61 3474622, e-mail: lsimeoni@unb.br

*Artigo em fase de submissão para publicação.

KEY WORDS: Chronic renal failure, Thyroid function, Thyroid hormones transport, Human erythrocytes.

ABSTRACT

Aim: Thyroid function is altered in patients with chronic renal failure. We previously showed that [^{125}I]T₃ uptake in erythrocytes from uremic patients pre-hemodialysis was higher than control subjects by 55% at 5 min and LT₃ efflux rate was lower than in control. The aim of this study was to investigate whether LT₃ analogs (rT₃ and Triac) and Verapamil have or not an effect on thyroid hormone uptake and efflux in red blood cells from uremic patients on hemodialysis. *Methods:* [^{125}I]T₃ uptake by erythrocytes was measured at 5 min in the absence or in the presence of LT₃ analogs and Verapamil. [^{125}I]T₃ efflux from erythrocytes was measured during 60 min after 3 hours of preincubation with [^{125}I]T₃ and in the absence or the presence of LT₃ analogs and Verapamil. *Results:* Triac, rT₃ and Verapamil decreased LT₃ uptake by 45, 26 and 8% in red blood cells from normal subjects, by 24, 24 and 23% in red blood cells from uremic patients pre-hemodialysis and by 32, 37 and 35% in erythrocytes from uremic patients post-hemodialysis respectively. Also, LT₃ analogs and Verapamil showed significant inhibitory effects on LT₃ efflux in red blood cells from normal, pre- and post-hemodialysis patients. *Conclusion:* Collectively, these results show that LT₃ entry and exit in red blood cells of uremic patients and normal subjects occur through distinct mechanisms and that the sensitivity to LT₃ analogs and Verapamil differs from uremic to normal subjects. We suggest that because uremic patients on hemodialysis show low serum levels of LT₃, changes in LT₃ influx and efflux could act as a compensatory mechanism that neutralizes thyroid hormone dysfunction to maintain the euthyroid state.

INTRODUCTION

In most patients with chronic renal failure (CRF), L-triiodothyronine (LT₃) and L-thyroxine (LT₄) serum levels are low (1). This abnormality is not associated with increased conversion of LT₄ to metabolic inactive reverse L-triiodothyronine (rT₃), since plasma levels are typically normal. Despite these findings, most CRF patients are considered to be euthyroid as evidenced by normal thyroid-stimulating hormone (TSH) levels (2). Although TSH levels are normal in most CRF patients, the

prevalence of thyroid diseases including goiter and hypothyroidism is higher than in the general population (3).

The relationships between thyroid dysfunctions and uremia are known, however, the biological mechanism underlying these interactions remain unclear. The role of cellular transport in modulating intracellular hormone concentration has been the focus of the many groups. Until two decades ago, it was presumed that the plasma membrane transport of thyroid hormones (THs) consist of passive diffusion as THs are lipophilic, enabling diffusion through the lipid-rich plasma membrane. However, it has now been established by many laboratories using different cell types from various tissues that THs are transported across the plasma membrane of target cells by carrier-mediated process that are often found to be temperature, sodium, and energy dependent (4,5). In 1996, we demonstrated that LT_3 efflux plays an important role in LT_3 action (6). Furthermore, in a reported study from our laboratories, we demonstrated that LT_3 efflux activity varies significantly in different tissues and suggested that THs transport in these tissues can modulate THs effects by regulating their intracellular contents in accordance to their needs (7).

Also, it has been suggested that mature red blood cells (RBC) might act as a circulating pool of thyroid hormones in humans, especially in newborns (8). Therefore, the RBC could be used as a model system to study the transport of thyroid hormones under various physiological and pathological conditions. Recent studies in our laboratory (9) showed THs uptake and efflux in RBC from patients with CRF occur through distinct mechanisms.

In the present work, we have expanded these studies to assess the effects of LT_3 analogs (rT_3 and Triiodothyroacetic acid (Triac)) and Verapamil (VRP), known as TH efflux inhibitor that reverses TH resistance (6), on both influx and efflux of LT_3 in RBC from normal and uremic subjects. Our results indicate that LT_3 entry and exit in red blood cells of uremic patients and normal subjects occur through distinct mechanisms that are sensitive to LT_3 analogs and VRP. Taken together, these findings suggest that changes in LT_3 influx and efflux may act as a compensatory mechanism that neutralizes thyroid hormone dysfunction to maintain the euthyroid state.

MATERIAL AND METHODS

Enrollment of Patients and Clinical Procedures

Five patients (3 men and 2 women) were enrolled from the chronic dialysis programs of Soclimed Dialysis Clinic. They ranged in age from 25 to 50 years. All patients appeared well nourished and clinically euthyroid; none had a history of thyroid disease, thyroid hormone therapy or treatment with amiodarone or a clinically detectable goiter. The patients were dialyzed 3 times a week for a period from 48 to 96 months long. Hemodialysis (HD) therapy was performed with Fresenius® Polysulfone filter. The control group consisted of 3 healthy subjects (2 women and 1 man) with age from 25 to 40 years. The Institution's Committee on Human Rights in Research approved the protocol, and all patients and normal individuals gave informed consent.

Reagents

[¹²⁵I]T₃ (2200 Ci/mmol) was purchased from Amersham Pharmacia Biotech UK Limited, United Kingdom. Verapamil, rT₃ and Triac were obtained from SIGMA (St. Louis, MO). Medium RPMI 1640 was purchased from Life Technologies, and Newborn Bovine Serum (NBS) from GIBCO™, Invitrogen Corporation, Grand Island, N.Y, USA.

Erythrocytes Procedures

Three milliliters of blood were withdrawn by venipuncture on glass tubes containing EDTA (BD Vacutainer System) and immediately placed in an ice bath. In the uremic patients, venous blood was obtained before hemodialysis (pre-HD) and immediately after hemodialysis (post-HD). The protocol used was a modification of described method (8). In brief, the blood samples were centrifuged (2200 x g, 5 min, 4°C), the plasma and buffy coat were removed, and the erythrocyte pellet was washed three times (resuspension/centrifugation at 2200 x g, 1 min, 4°C) with 3 mL ice-cold Phosphate Buffer Saline (PBS) (16g NaCl, 0.4g KCl, 1.44g Na₂HPO₄ and 0.24g KH₂PO₄, pH 7.4). The erythrocytes pellet was resuspended in 3 mL of PBS and cells were counted.

Cellular uptake

Cells (10^8 per assay) were incubated at 37°C in RPMI 1640 medium containing [^{125}I]T₃ (approximately 200,000 cpm) and 0.01% NBS, without [vehicle – ethanol:dimethylsulfoxide (DMSO) 3:2] or with 10^{-4}M unlabelled T₃ analogs and VRP. Uptake was stopped at 5 minutes by adding 500 μL ice-cold PBS and centrifuged (2200 x g, 1 min, 4°C). Cells were washed four times with ice-cold PBS. Previous experiments in our laboratory established that this washing procedure efficiently removes extracellular labeled [^{125}I]T₃ while causing minimal loss of intracellular tracer. Cellular radioactivity was determined and express as percentage of [^{125}I]T₃ uptake relative to the control (vehicle treated).

Efflux studies

Cells (10^8 per assay) were first preloaded with [^{125}I]T₃ in preincubation medium containing 0.01% NBS at 37°C for 180min, without (vehicle – ethanol:DMSO 3:2) or with 10^{-4}M unlabelled T₃ analogs and VRP. After 3 hours incubation, cells were washed four times with ice-cold PBS (ressuspension / centrifugation at 2200 x g, 1 min., 4°C). Efflux was initiated by adding to each micro centrifuge tube 1 mL of prewarmed (37°C) medium containing 10% NBS without tracer (efflux medium). Incubation was continued at 37°C and the medium was collected and replaced by fresh efflux medium at 5, 15, 30 and 60min. The addition of 10% NBS to the medium effectively prevented reuptake of [^{125}I]T₃ during the efflux study (10). At the end of the efflux period, the intracellular radioactivity was determined. The amount of the tracer remaining were computed and expressed as percentage of [^{125}I]T₃ in the cells after 60-min efflux. The accumulation of [^{125}I]T₃ in the cells, after 3 hours of incubation, was expressed as percentage of the initial amount of tracer used during the incubation time.

Statistics

Data were analyzed by one-way ANOVA complemented with the Newman-Keuls Multiple Comparison Test for significance. $P < 0.05$ was considered statistically significant. Graph Pad Prism Program was used for statistical analysis and to perform the graphics.

RESULTS AND DISCUSSION

There are extensive studies demonstrating different abnormalities in thyroid function tests in patients on long-term hemo and peritoneal dialysis (11-16). These include low circulating thyroid hormone concentration, altered peripheral hormone metabolism, disturbed binding to carrier proteins, increased iodine store in the thyroid glands and reduction thyroid receptor binding to DNA (16,3). Despite all these disturbances and some symptoms that were also described in hypothyroidism, most uremic patients are considered to be euthyroid as evidenced by normal TSH levels (2,1).

Several studies have investigated the effect of LT_3 analogs and VRP on uptake and efflux of LT_3 in variety of cell lines (17-24) but only few were done in RBC from uremic patients (9). Because mature human erythrocytes constitute a large reservoir for the thyroid hormone in blood and play important role in TH homeostasis (8,25), we investigated the sensitivity of both influx and efflux of LT_3 to several drugs in erythrocytes from normal and uremic subjects. As shown in *Figure 1* and *Table 1*, cellular uptake of LT_3 at 5 minutes, expressed as percentage of [^{125}I]T₃ accumulation per 10^8 cells, was inhibited by rT_3 , Triac and VRP (final concentration, $100\mu M$) in RBC from both normal subjects and uremic patients group. Triac, rT_3 and VRP added to the incubation media at the same time than the tracer, decreased LT_3 uptake by 45, 26 and 8% in RBC from normal subjects respectively, by 24, 24 and 23% in RBC from uremic patient's pre-HD and by 32, 37 and 35% from uremic patient's post-HD. Although VRP inhibited LT_3 uptake in RBC from both normal and uremic patients, LT_3 influx in RBC from normal subject was less sensitive to this inhibitory effect.

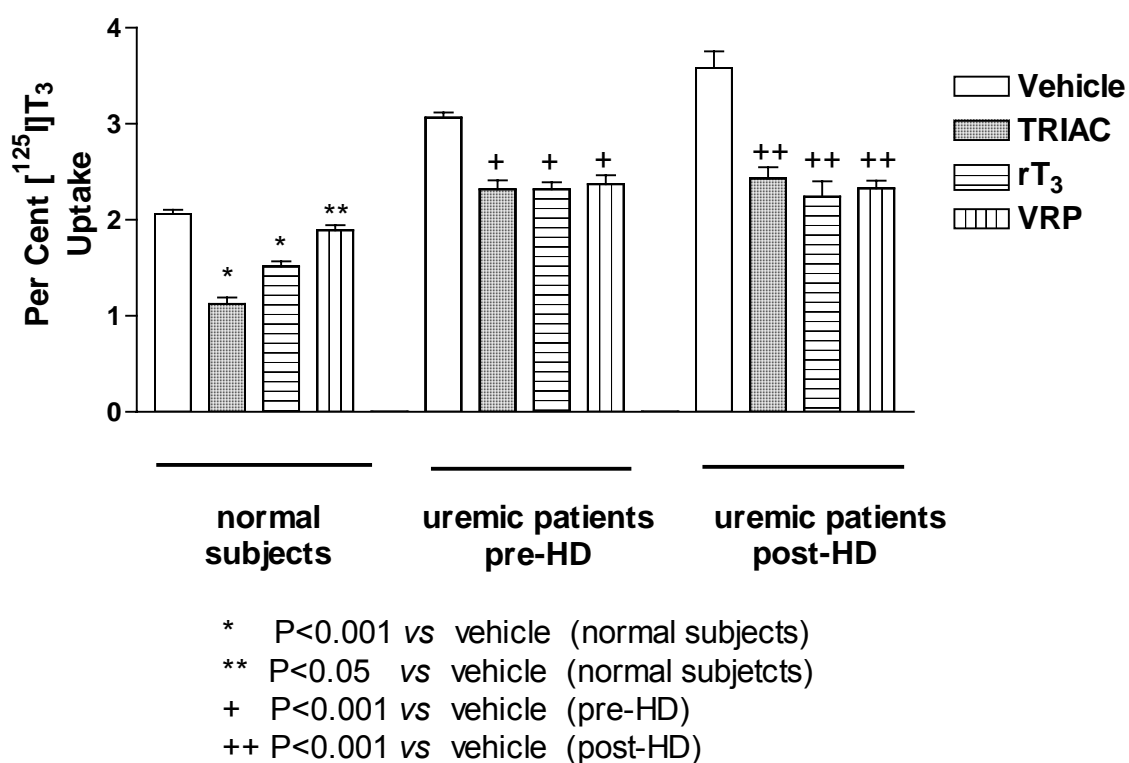


Figure 1 - Uptake of $^{125}\text{I}T_3$ in erythrocytes from subjects control and uremic patients pre-HD and post-HD. Uptake of LT_3 was measured at 5 minutes in the absence or in the presence of rT_3 , Triac and Verapamil (VRP) (10^{-4}M). These results are representative of at least nine (control) and fifteen (uremic patients) independent experiments and show the mean \pm SEM. * $P < 0.05$ significance for rT_3 , Triac and VRP vs vehicle.

Table 1 – Percentage of $^{125}\text{I}T_3$ uptake in RBC from both normal and uremic patients after 5 minutes. The percentage of inhibition represents the reduction of LT_3 uptake in the presence of inhibitors as compared to the vehicle.

Study subjects	Per cent of $^{125}\text{I}T_3$ Uptake				% inhibition		
	Vehicle (0,1mM)	TRIAC (0,1mM)	rT_3 (0,1mM)	VRP (0,1mM)	TRIAC	rT_3	VRP
Normal subjects	2.060 \pm 0.044	1.125 \pm 0.066*	1.515 \pm 0.053*	1.893 \pm 0.051**	45	26	8
Uremic patients pre-HD	3.067 \pm 0.051	2.320 \pm 0.093 ⁺	2.318 \pm 0.074 ⁺	2.371 \pm 0.094 ⁺	24	24	23
Uremic patients post-HD	3.583 \pm 0.170	2.431 \pm 0.116 ⁺⁺	2.243 \pm 0.157 ⁺⁺	2.329 \pm 0.080 ⁺⁺	32	37	35

Values are the mean \pm SEM

* $P < 0.001$ vs. vehicle (normal subjects)

** $P < 0.001$ vs. vehicle (normal subjects)

+ $P < 0.001$ vs. vehicle (pre-HD)

++ $P < 0.001$ vs. vehicle (post-HD)

Results from previous studies (9) and also from this study show an increase of LT_3 uptake in RBC from uremic patients, when they are compared to normal subjects, without a difference between pre-HD and post-HD patients. In this study, the inhibitory effects of LT_3 analogs and VRP were identical in RBC from both pre-HD and post-HD, but different in RCB from normal subject. These findings are in agreement with a previous observations (8) where it was reported that LT_3 uptake in human RBC was significantly sensitive to Triac and rT_3 .

Since LT_3 uptake in RBC cells from uremic patients was altered, we wondered if LT_3 efflux in these patients was also affected. We therefore, studied LT_3 efflux in RBC from normal subjects and uremic patients. Cells were preloaded with $[^{125}I]T_3$ and their content was measured after 60-min efflux period. The results from *Figure 2* and *Table 2* indicate that the capacity to export $[^{125}I]T_3$ varies significantly between both normal and uremic groups. They also show that LT_3 efflux sensitivity (inhibition) to LT_3 analogs and VRP is greater in RBC from normal subjects than from uremic patients.

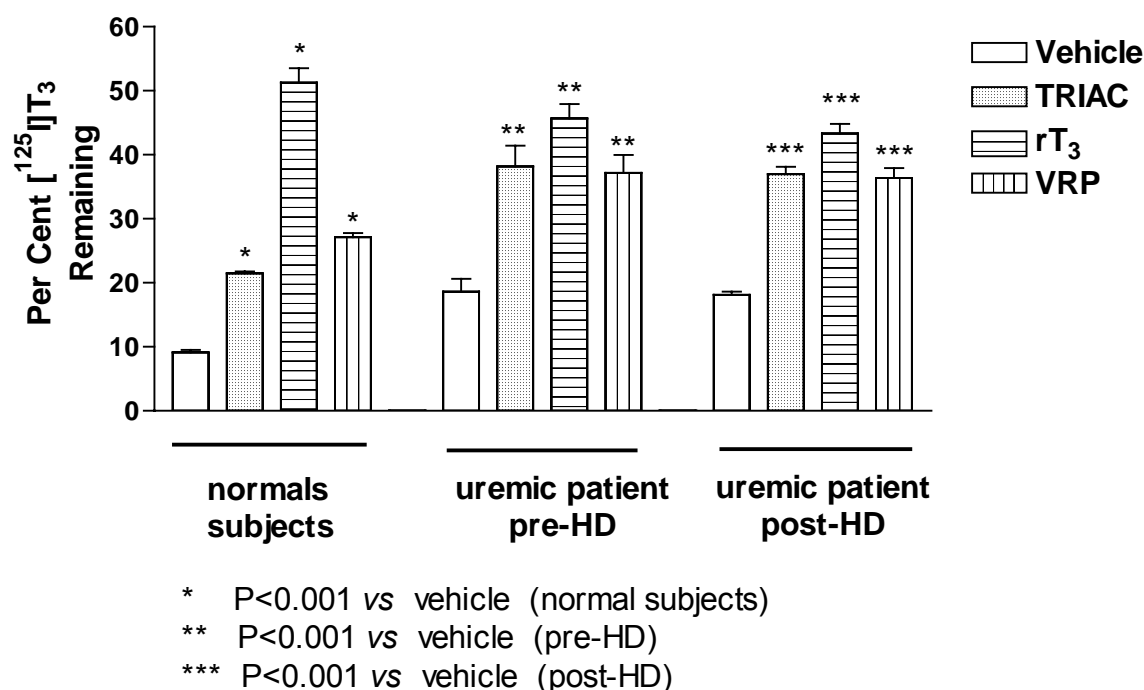


Figure 2 – Efflux of $[^{125}I]T_3$ in erythrocytes from subjects control and uremic patient's pre-HD and post-HD in the absence or in the presence of excess unlabeled rT_3 , Triac and VRP. The efflux of T_3 was measured in the absence or in the presence of analogs and VRP ($10^{-4}M$) added during the 3-hour preincubation and in the efflux periods. These results are representative of at least nine (control) and fifteen (uremic patients) independent experiments and show the mean \pm SEM. *P<0.001 significance for rT_3 , Triac and VRP vs vehicle.

Table 2 – Percentage of remaining [125 I]T₃ in the RBC from different study subjects after 60min-efflux under various conditions.

Study subjects	Efflux (% of cellular [125 I]T ₃ remaining at 60 min)			
	Vehicle	TRIAC (0,1mM)	rT ₃ (0,1mM)	VRP (0,1mM)
Normal subjects	9.12±0.39	21.48±0.30*	51.28±2.23*	27.12±0.67**
Uremic patients Pre-HD	18.62±1.98	38.16±3.25*	45.68±2.23*	37.16±2.83*
Uremic patients Post-HD	18.14±0.50	36.96±1.17*	43.33±1.51*	36.38±1.53*

Values are the mean ± SEM

* P<0.001 vs. vehicle (normal subjects)

** P<0.001 vs. vehicle (normal subjects)

+ P<0.001 vs. vehicle (pre-HD)

++ P<0.001 vs. vehicle (post-HD)

As shown in *Table 3*, the cellular accumulation of [125 I]T₃ during prolonged incubation is the net result of uptake and efflux. The accumulation of [125 I]T₃ by RBC from uremic patients (pre- and post-HD) during a 3-hours preincubation was not significantly changed when Triac, rT₃ and VRP were present in the medium. The same observation was obtained with RBC from normal subjects except for rT₃, which did show a significant increase in LT₃ accumulation.

Table 3 – Percentage of [125 I]T₃ cellular accumulation (the net result of uptake and efflux) in the RBC from different study subjects after 3-h preincubation under various conditions.

Accumulation of [125 I]T ₃ in cells after 3h of incubation (%)				
Study subjects	Vehicle	TRIAC (0,1mM)	rT ₃ (0,1mM)	VRP (0,1mM)
Normal subjects	12.8	11.8	20.8	12.0
Uremic patients Pre-HD	19.5	21.0	19.4	20.1
Uremic patients Post-HD	17.8	19.1	17.0	18.4

These results demonstrate clearly that export of LT_3 in erythrocytes from uremic patient is slowed down. The significance of these differences could be attributed to the existence of uremic factors, either toxins or proteins, that modify directly or indirectly LT_3 influx and efflux activities.

Data analysis of LT_3 accumulation in uremic patients and control subjects revealed no inhibitory effect of VRP and LT_3 analogs, except rT_3 which did increase LT_3 accumulation only in RBC from normal subjects.

Also, LT_3 accumulation in RBC, in the absence of LT_3 analogs and VRP (vehicle group), was significantly different between normal (12.8%) and both pre- and post-HD patients (19.5% and 19.1%, respectively). These results indicate that LT_3 uptake is different in both populations and that this difference is maintained even after 3h of incubation and the steady state does not compensate for the difference whether the inhibitors are present or absent.

Collectively, these findings suggest that LT_3 entry and efflux in red blood cells of uremic patients and normal subjects occurs through distinct mechanisms, which are sensitive to LT_3 analogs and VRP. Taken together, these findings demonstrate that LT_3 uptake and efflux are different from normal to uremic subjects and that the most striking difference reside in the sensitivity of LT_3 transporters to rT_3 .

REFERENCES

1. Lim, V.S. Thyroid Function in Patients with Chronic Renal Failure. *Am J Kidney Dis* **2001**, *38* (4 Suppl 1), S80-84.
2. Medri, G.; Carella, C.; Padmanabhan, V.; Rossi, C.M.; Amato, G.; De Santo, N.G.; Beitins, I.Z.; Beck-Peccoz, P. Pituitary Glycoprotein Hormones in Chronic Renal Failure: Evidence for an Uncontrolled Alpha-Subunit Release. *J Endocrinol Invest* **1993**, *16* (3), 169-174.
3. Kaptein, E.M. Thyroid Hormone Metabolism and Thyroid Diseases in Chronic Renal Failure. *Endocr Rev* **1996**, *17* (1), 45-63.
4. Hennemann, G.; Docter, R.; Friesema, E.C.; de Jong, M.; Krenning, E.P.; Visser, T.J. Plasma Membrane Transport of Thyroid Hormones and Its Role in Thyroid Hormone Metabolism and Bioavailability. *Endocr Rev* **2001**, *22* (4), 451-476.
5. Hennemann, G.; Everts, M.E.; de Jong, M.; Lim, C.F.; Krenning, E.P.; Docter, R. The Significance of Plasma Membrane Transport in the Bioavailability of Thyroid Hormone. *Clin Endocrinol (Oxf)* **1998**, *48* (1), 1-8.
6. Ribeiro, R.C.; Cavalieri, R.R.; Lomri, N.; Rahmaoui, C.M.; Baxter, J.D.; Scharschmidt, B.F. Thyroid Hormone Export Regulates Cellular Hormone Content and Response. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (29), 17147-17151.
7. Neves, F.A.; Cavalieri, R.R.; Simeoni, L.A.; Gardner, D.G.; Baxter, J.D.; Scharschmidt, B.F.; Lomri, N.; Ribeiro, R.C. Thyroid Hormone Export Varies among Primary Cells and Appears to Differ from Hormone Uptake. *Endocrinology* **2002**, *143* (2), 476-483.
8. Osty, J.; Valensi, P.; Samson, M.; Francon, J.; Blondeau, J.P. Transport of Thyroid Hormones by Human Erythrocytes: Kinetic Characterization in Adults and Newborns. *J Clin Endocrinol Metab* **1990**, *71* (6), 1589-1595.
9. Rodrigues, M.C.S.; Santos, G.M.; Silva, A.C.; Baxter, J.D.; Webb, P.; Lomri, N.; Neves, F.A.R.; Ribeiro, R.C.J.; Simeoni, L.A. Thyroid Hormones Transport Is Disturbed in Erythrocytes from Patients with Chronic Renal Failure on Hemodialysis. submitted **2003**.
10. Cavalieri, R.R.; Simeoni, L.A.; Park, S.W.; Baxter, J.D.; Scharschmidt, B.F.; Ribeiro, R.C.; Lomri, N. Thyroid Hormone Export in Rat FRTL-5 Thyroid Cells and Mouse NIH-3T3 Cells Is Carrier-Mediated, Verapamil-Sensitive, and Stereospecific. *Endocrinology* **1999**, *140* (11), 4948-4954.
11. Lim, V.S.; Fang, V.S.; Katz, A.I.; Refetoff, S. Thyroid Dysfunction in Chronic Renal Failure. A Study of the Pituitary- Thyroid Axis and Peripheral Turnover Kinetics of Thyroxine and Triiodothyronine. *J Clin Invest* **1977**, *60* (3), 522-534.

12. Tang, W.W.; Kaptein, E.M.; Massry, S.G. Diagnosis of Hypothyroidism in Patients with End-Stage Renal Disease. *Am J Nephrol* **1987**, *7* (3), 192-197.
13. Pagliacci, M.C.; Pelicci, G.; Grignani, F.; Giammartino, C.; Fedeli, L.; Carobi, C.; Buoncristiani, U.; Nicoletti, I. Thyroid Function Tests in Patients Undergoing Maintenance Dialysis: Characterization of the 'Low-T4 Syndrome' in Subjects on Regular Hemodialysis and Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis. *Nephron* **1987**, *46* (3), 225-230.
14. Muschmov, D.; Zacharieva, B. [the Metabolism of Thyroid Hormones in Chronic Renal Insufficiency]. *Z Urol Nephrol* **1982**, *75* (4), 269-274.
15. Beckett, G.J.; Henderson, C.J.; Elwes, R.; Seth, J.; Lambie, A.T. Thyroid Status in Patients with Chronic Renal Failure. *Clin Nephrol* **1983**, *19* (4), 172-178.
16. Spector, D.A.; Davis, P.J.; Helderman, J.H.; Bell, B.; Utiger, R.D. Thyroid Function and Metabolic State in Chronic Renal Failure. *Ann Intern Med* **1976**, *85* (6), 724-730.
17. Cavalieri, R.R.; Simeoni, L.A.; Park, S.W.; Baxter, J.D.; Scharschmidt, B.F.; Ribeiro, R.C.; Lomri, N. Thyroid Hormone Export in Rat FRTL-5 Thyroid Cells and Mouse Nih-3t3 Cells Is Carrier-Mediated, Verapamil-Sensitive, and Stereospecific. *Endocrinology* **1999**, *140* (11), 4948-4954.
18. Lim, C.F.; Loidl, N.M.; Kennedy, J.A.; Topliss, D.J.; Stockigt, J.R. Drug Effects on Triiodothyronine Uptake by Rat Anterior Pituitary Cells in Vitro. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **1996**, *104* (2), 151-157.
19. Neves, F.A.; Cavalieri, R.R.; Simeoni, L.A.; Gardner, D.G.; Baxter, J.D.; Scharschmidt, B.F.; Lomri, N.; Ribeiro, R.C. Thyroid Hormone Export Varies among Primary Cells and Appears to Differ from Hormone Uptake. *Endocrinology* **2002**, *143* (2), 476-483.
20. Powell, K.A.; Mitchell, A.M.; Manley, S.W.; Mortimer, R.H. Different Transporters for Tri-Iodothyronine (T(3)) and Thyroxine (T(4)) in the Human Choriocarcinoma Cell Line, *Jar. J Endocrinol* **2000**, *167* (3), 487-492.
21. Ribeiro, R.C.; Cavalieri, R.R.; Lomri, N.; Rahmaoui, C.M.; Baxter, J.D.; Scharschmidt, B.F. Thyroid Hormone Export Regulates Cellular Hormone Content and Response. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (29), 17147-17151.
22. Verhoeven, F.A.; Moerings, E.P.; Lamers, J.M.; Hennemann, G.; Visser, T.J.; Everts, M.E. Inhibitory Effects of Calcium Channel Blockers on Thyroid Hormone Uptake in Neonatal Rat Cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2001**, *281* (5), H1985-1991.
23. Verhoeven, F.A.; Van der Putten, H.H.; Hennemann, G.; Lamers, J.M.; Visser, T.J.; Everts, M.E. Uptake of Triiodothyronine and Triiodothyroacetic Acid in Neonatal Rat Cardiomyocytes: Effects of Metabolites and Analogs. *J Endocrinol* **2002**, *173* (2), 247-255.

24. Yan, Z.; Hinkle, P.M. Saturable, Stereospecific Transport of 3,5,3'-Triiodo-L-Thyronine and L-Thyroxine into Gh4c1 Pituitary Cells. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268* (27), 20179-20184.
25. Sakata, S.; Komaki, T.; Nakamura, S.; Ohshima, M.; Sagisaka, K.; Yoshioka, N.; Atassi, M.Z.; Miura, K. Binding of Thyroid Hormones to Human Hemoglobin and Localization of the Binding Site. *J Protein Chem* **1990**, *9* (6), 743-750.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A IRC afeta praticamente todos os sistemas e órgãos. Uma manifestação clínica decorrente da doença é a disfunção tireoideana caracterizada pela diminuição dos níveis plasmáticos de LT_4 e LT_3 associada à secreção normal do TSH. A compreensão dessa anormalidade ainda não está totalmente esclarecida. Modificações na atividade de transporte de HTs pela membrana celular podem modular alguns destes achados. Entretanto, apesar dos avanços na compreensão dos mecanismos envolvidos na entrada e saída de HTs nas células, até o momento, não há estudos sobre o transporte transmembrana dos HTs em células de pacientes urêmicos. Assim, este estudo propõe-se a investigar a entrada e saída do LT_3 e LT_4 em hemácias de pacientes urêmicos em diferentes situações, como por exemplo, antes e após uma sessão de hemodiálise.

Os resultados obtidos demonstram que o transporte transmembrana (influxo e efluxo) dos HTs em hemácias de urêmicos é distinto do transporte em hemácias dos indivíduos controles. Isto é evidenciada pela maior captação do LT_3 e menor do LT_4 em hemácias dos urêmicos em relação à captação por hemácias dos sujeitos controles. Ao contrário, o efluxo do LT_3 é reduzido e do LT_4 é aumentado. Além disso, observamos que a hemodiálise não modifica esta diferença. Especula-se que, para compensar os baixos níveis circulantes dos HTs, ocorra um incremento intracelular, especificamente do LT_3 , e a hemácia funcione como reservatório e carreador para células-alvo. É possível que este fenômeno não ocorra em todas as células, isto é, que ele seja tecido-específico. Outro aspecto relevante refere-se aos resultados obtidos pela adição de análogos ao LT_3 (rT_3 , Triac) e Verapamil, pois estes compostos inibiram o transporte do LT_3 em hemácias de sujeitos controles e pacientes urêmicos. Considerados conjuntamente, os resultados mostram que a uremia modifica o mecanismo de transporte dos HTs, promovendo o acúmulo de LT_3 intracelular. Para isto, favorece o mecanismo que transporta LT_3 para dentro das células e inibe o efluxo do LT_3 . Ao contrário, o ambiente urêmico inibe a entrada e aumenta a saída do LT_4 . Estes resultados sugerem que existem mecanismos específicos para entrada e saída de LT_3 e LT_4 . Além disso, no que se refere à entrada de LT_3 , quando se utilizou análogos ao hormônio observa-se que o mecanismo molecular envolvido no aumento do transporte (nos pacientes urêmicos)

não inclui os transportadores que também carregam Triac, rT_3 ou Verapamil, pois a adição destes reduziu a entrada de LT_3 nas hemácias dos sujeitos controles de forma semelhante aos pacientes urêmicos. Desta forma, sugere-se que haja mais de um sistema de transporte dos HTs, com diferentes afinidades e que podem ser expressos distintamente em células-alvo. A maior importância deste achado está na possibilidade do desenho de drogas que possam aumentar o conteúdo intracelular dos HTs seletivamente nos tecidos-alvo.

Assim, este estudo representa a primeira demonstração que a membrana citoplasmática de hemácias de urêmicos constitui um ponto regulatório no transporte dos HTs, modulando sua concentração intracelular. Este fenômeno pode representar um mecanismo de adaptação do organismo à diminuição dos níveis plasmáticos de LT_3 . Os tecidos que o fizerem conseguirão manter um estado eutiroideo. Assim, é possível que células hipofisárias, de forma semelhante às hemácias, regulem seu conteúdo intracelular de LT_3 e por este mecanismo a secreção de TSH é mantida dentro de níveis normais, apesar da diminuição dos níveis plasmáticos do LT_3 . Por outro lado, células que não se adaptarem a esta situação, poderão ficar em estado de hipotireoidismo. Assim, alguns sintomas de hipotireoidismo presentes na uremia, como, por exemplo, hipercolesterolemia, poderiam ser explicados pela diminuição de LT_3 nos hepatócitos. Por estes motivos é necessário investigar o transporte transmembrana dos HTs em outras células de pacientes urêmicos, assim como é importante identificar que proteínas transportadoras estão envolvidas nesse transporte. O esclarecimento destas e outras questões trará benefícios à compreensão da fisiopatogenia da disfunção tireoideana em pacientes portadores de IRC em terapia dialítica, podendo contribuir significativamente para o estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na modulação da ação dos hormônios tireoideanos.

REFERÊNCIAS

1. TORTORA, G. J.; GRABOWSKI, S. R. **Princípios de anatomia e fisiologia**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.837.
2. NOGUEIRA, P. C. K.; CARVALHAES, J. T. A. Insuficiência renal crônica. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 18, n. 105, p. 38-41, nov./dez. 1994.
3. ZATZ, R. Distúrbio da filtração glomerular. In:_____. **Fisiopatologia renal**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2002. p. 3-20.
4. YU, L.; BURDMANN, E.; SEGURO, A. C.; HELOU, C. M. B.; ZATZ, R. Insuficiência renal aguda. In: ZATZ, R. **Fisiopatologia renal**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2002. p. 261-282.
5. KLHAR, S. Progression of chronic renal disease. **Heart Dis**, v. 3, n. 3, p. 205-209, 2001.
6. ALEBIOSOU, C. O. An update on 'progression promoters' in renal diseases. **J Natl Med Assoc**, v. 95, n. 1, p. 30-42, 2003.
7. KLAHR, S.; MORRISSEY, J. Progression of chronic renal disease. **Am J Kidney Dis**, v. 41, n. 3, Suppl 2, p. S3-7, 2003.
8. BOMMER, J. Prevalence and socio-economic aspects of chronic kidney disease. **Nephrol Dial Transplant**, v. 17, Suppl 11, p. 8-12, 2002.
9. CAMPBELL, R.C.; RUGGENENTI, P.; REMUZZI, G. Healing the progression of chronic nephropathy. **J Am Soc Nephrol**, n. 13, Suppl 3, p. S190-195, 2002.
10. ROMÃO Jr, João Egídio. **A dramática situação da saúde**. Disponível em: <<http://www.sbn.org.br>>. Acesso em: 30 abr. 2003.
11. SBN – Sociedade Brasileira de Nefrologia. **Centros de Nefrologia. Distrito Federal**. Disponível em: <http://www.sbn.org.br/centros>>. Acesso em: 28 mai.2003.
12. ZATZ, R. Insuficiência renal crônica. In:_____. **Fisiopatologia renal**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2002. p. 283-297.
13. ARRIZURIETA, E. E. Insuficiência renal crônica: fisiopatologia y perspectivas de tratamento. **Medicina**, Buenos Aires, v. 61, n. 5, p. 648-651, 2001.
14. DRAIBE, S.; CENDOROGLO, M.; CANZIANI, M. E. F.; CARVALHO, A. L.; AJZEN, H. Os processos dialíticos. **Ciências Hoje**, São Paulo, v. 18, n. 105, p. 42-47, nov./dez. 1994.
15. STONE, J. C. V. Aparelho de hemodiálise. In: Daugirdas, J. T.; Ing, T. S. **Manual de diálise**. 2. ed. Rio de Janeiro: Médica e Científica, 1996. p. 28-49.
16. BRASIL. **Ministério da Saúde**. Portaria n. 82, de 3 de janeiro de 2000. Disponível em:<<http://www.sbn.org.br/Portarias>>. Acesso em: 1 mai. 2003.

17. BRASIL. **Ministério da Saúde**. Portaria n. 1589, de 3 de setembro de 2002. Disponível em: <<http://www.sbn.org.br/Portarias>>. Acesso em: 1 mai. 2003.
18. BRASIL. **Ministério da Saúde**. Portaria n. 1654, de 17 de setembro de 2002. Disponível em: <<http://www.sbn.org.br/Portarias>>. Acesso em: 1 mai. 2003
19. BRASIL. **Ministério da Saúde**. Portaria n. 82, de 16 de abril de 2003. Disponível em: <<http://www.sbn.org.br/Portarias>>. Acesso em: 1 mai. 2003
20. GREENSPAN, F.S. The thyroid gland. In: GREENSPAN, F.S.; GARDNER, D.G. **Basic and clinical endocrinology**. 6. ed. Stamford: McGraw Hill, 2001. p. 201-272.
21. DUNN, J. T. **Thyroid hormone synthesis and secretion**. In: De Groot L. J.; Hennemann, G., eds. Disponível em: <<http://www.thyroidmanager.org>>, Endocrine Education, Inc., chap. 2. Acesso em: 3 ago. 2002.
22. BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução RDC n. 32, de 25 de fevereiro de 2003. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 1 mai. 2003.
23. GUYTON, A.C. ; HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 859-866.
24. JUNQUEIRA E CARNEIRO. **Histologia básica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. p. 339-343.
25. VISSER, T. J. **Thyroid hormone metabolism**. In: De Groot L. J.; Hennemann, G., eds. Disponível em: <<http://www.thyroidmanager.org>>, Endocrine Education, Inc., chapt. 3C. Acesso em: 13 ago. 2002.
26. JAMESON, L. **Cellular action of thyroid hormone**. In: De Groot L. J.; Hennemann, G.; eds. Disponível em: <<http://www.thyroidmanager.org>>, Endocrine Education, Inc., chapt. 2. Acesso em: 13 ago. 2002.
27. KELLY, Greg. Peripheral metabolism of thyroid hormones: a review. **Altern Med Rev**, v. 5, n. 4, p. 306-332, 2000.
28. REFETTOFF, S. **Thyroid hormone serum transport proteins**. In: De Groot L. J.; Hennemann, G., eds. Disponível em: <<http://www.thyroidmanager.org>>, Endocrine Education, Inc., chapt. 3A. Acesso em: 13 ago. 2002.
29. RIBEIRO, R. C. J.; KUSHNER, P. J.; BAXTER, J. D. The nuclear hormone receptor gene superfamily. **Annu Rev Med**, v. 46, p. 443-453, 1995.
30. MANGELSDORF, D.J.C.; THUMEL, M.B.; HERRLICH, P.; SCHUTZ, G.; UMESONO, K.; BLUMBERG, B.; KASTNER, P.; MARK, M.; CHAMBON, P.; AND EVANS, R.M. The nuclear receptor superfamily: the second decade. **Cell**, v.83, n.6, p. 835-9, 1995.
31. GUIGUÈRE, V. Orphan nuclear receptors: from gene to function. **Endocr Rev**, v. 20, n. 5, p. 689-725, 1999.
32. RIBEIRO, R. C. J.; APRILETTI, J. W.; WAGNER, R. L.; WEST, B. L.; FENG, W.; HUBBER, R.; KUSHNER, P. J.; NILSSON, S.; SCANLAN, T. S.; FLETTERICK, R. J.; SCHAUFLELE, F.; BAXTER, J. D. Mechanisms of thyroid hormone action: insights from x-ray crystallographic and functional studies. **Rec Prog Horm Res**, v. 53, p. 351-394, 1998

33. RIBEIRO, R. C. J.; APRILETTI, J. W.; WAGNER, R. L.; FENG, W.; KUSHNER, P. J.; NILSSON, S.; SCANLAN, T. S.; WEST, B. L.; FLETTERICK, R. J.; BAXTER, J. D. X-ray crystallographic and functional studies of thyroid hormone receptor. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 65, n. 1-6, p. 133-141, 1998.
34. APRILETTI, J.W.; RIBEIRO, R.C.J.; WAGNER, R.L.; FENG, W.; WEBB, P.; KUSHNER, P.J.; WEST, B.L.; NILSSON, S.; SCANLAN, T.S.; FLETTERICK, R.J.; BAXTER, J.D. Molecular and structural biology of thyroid hormone receptors. **Clin Exp Pharm Physiol**, v.25, Sup. S2-S11, 1998.
35. BRENT, G.A. The molecular basis of thyroid hormone action. **N Engl J Med**, v. 331, n. 13, p.847-853, 1994.
36. LAZAR, M.A. Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. **Endocr Rev**, v. 14, p. 184-193, 1993.
37. RIBEIRO, R.C.J.; APRILETTI, J.W.; WEST, B.L.; WAGNER, R.L.; FLETTERICK, R.J.; SCHAUFEL, F.; BAXTER, J.D. The molecular biology of thyroid hormone action. **Ann N Y Acad Sci**, v. 758, p. 366-389, 1995.
38. ARANDA, A.; PASCUAL, A. Nuclear hormone receptors and gene expression. **Physiol Rev**, v. 81, n. 3, p. 1269-1304, 2001.
39. GREENSPAN, F.S. The thyroid gland. In: Greenspan, F.S.; Baxter, J. D. **Basic & Clinical Endocrinology**. 4th edit. Norwalk, CT, Appleton & Lange, 1994. v. 1, p.160-226.
40. URTIGER, R.D. The thyroid: physiology, thyrotoxicosis, hypothyroidism, and the painful thyroid. In: Felig, P.F.; Baxter, J.D.; Frohman, C.A. **Endocrinology and Metabolism**. 3rd edit. New York, NY: MacGraw-Hill, 1995. v. 1, p. 435-553.
41. KRENNING, E.P.; DOCTER, R.; BERNARD, H.F.; VISSER, T.J.; HENNEMANN, G. Active transport of triiodothyronine (T3) into isolated rat liver cells. **Febs Letters**, v. 91, p.113-116, 1978.
42. ECKEL, J.; RAO, G.S.; RAO, M.L.; BREUER, H. Uptake of L-tri-iodothyronine by isolated rat liver cells. A process partially inhibited by metabolic inhibitors; attempts to distinguish between uptake and binding to intracellular proteins. **Biochem J**, v. 182, p. 473-491, 1979.
43. HALPERN, J.; HINKLE, P.M. Evidence for an active step in thyroid hormone transport to nuclei: drug inhibition of L-125I-triiodothyronine binding to nuclear receptors in rat pituitary tumor cells. **Endocrinology**, v. 110, p.1070-1072, 1982.
44. MITCHELL, A.M.; MANLEY, S.W.; MORTIMER, R.H. Uptake of L-tri-iodothyronine by human cultured trophoblast cells. **J Endocrinol**, v. 133, p.483-486, 1992.
45. CHABNTOUX, F.; BLONDEAU, J.P.; FRANCON, J. Characterization of the thyroid hormone transport system of cerebrocortical rat neurons in primary culture. **J Neurochem**, v. 65, p.2549-2554, 1995.
46. McLEESE, J.M.; EALES, J.G. 3,5,3'-Triiodo-L-thyronine and L-thyroxine uptake into red blood cells of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Gen Comp Endocrinol**, v. 102, p. 47-55, 1996.

47. POWELL, K.A.; MITCHELL, A. M.; MANLEY, S.W.; MORTIMER, R.H. Different transporters for tri-iodothyronine (T3) and thyroxine (T4) in the human choriocarcinoma cell line, JAR. **J Endocrinol**, v. 167, p. 487-492, 2000.
48. KRENNING, E.; DOCTER, R.; BERNARD, B.; VISSER, T.; HENNEMANN, G. Characteristics of active transport of thyroid hormone into rat hepatocytes. **Biochim Biophys Acta**, v. 676, p.314-320, 1981.
49. KRENNING, E.P.; DOCTER, R.; BERNARD, B.; VISSER, T.; HENNEMANN, G. Decreased transport of thyroxine (T4), 3,3',5-triiodothyronine (T3) and 3,3',5'-triiodothyronine (rT3) into rat hepatocytes in primary culture due to a decrease of cellular ATP content and various drugs. **FEBS Letters**, v. 140, p.229-233, 1982.
50. CHENG, S.Y. Characterization of binding and uptake of 3,3',5-triiodo-L-thyronine in cultured mouse fibroblasts. **Endocrinology**, v. 112, p. 1754-1762, 1983.
51. RAO, G.S.; RAO, M.L.; THILMANN, A.; QUEDNAU, H. D. Study of fluxes at low concentrations of L-tri-iodothyronine with rat liver cells and their plasma-membrane vesicles. Evidence for the accumulation of the hormone against a gradient. **Biochem J**, v. 198, p. 457-466, 1981.
52. OPPENHEIMER, J.H.; SCHWARTZ, H.L. Stereospecific transport of triiodothyronine from plasma to cytosol and from cytosol to nucleus in rat liver, kidney, brain, and heart. **J Clin Invest**, v. 75, p. 147-154, 1985.
53. MOORADIAN, A.D.; SCHWARTZ, H.L.; MARIASH, C.N.; OPPENHEIMER, J.H. Transcellular and transnuclear transport of 3,5,3'-triiodothyronine in isolated hepatocytes. **Endocrinology**, v. 117, p. 2449-2456, 1985.
54. GONÇALVES, E.; LAKSHMANAN, M.M.; ROBBINS, J. Triiodothyronine transport into differentiated and undifferentiated mouse neuroblastoma cells (NB41A3). **Endocrinology**, v. 124, p. 293-300, 1989.
55. BLONDEAU, J.P.; OSTY, J.; FRANCON, J. Characterization of the thyroid hormone transport system of isolated hepatocytes. **J Biol Chem**, v. 263, p. 2685-2692, 1988.
56. CHENG, S.Y.; GONG, Q.H.; PARKISON, C.; ROBINSON, E.A.; APELLA, E.; MERLINO, G.T.; PASTAN, I. The nucleotide sequence of a human cellular thyroid hormone binding protein present in endoplasmic reticulum. **J Biol Chem**, v. 262, p. 11221-11227, 1987.
57. UEDA, K.; OKAMURA, N.; HIRAI, M.; TANIGAWARA, Y.; SAEKI, T.; KIOKA, N.; KOMANO, T.; HORI, R. Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone. **J Biol Chem**, v. 267, p. 24248-24252, 1992.
58. WOLF, D.C.; HORWITZ, S.B. P-glycoprotein transports corticosterone and is photoaffinity-labeled by the steroid. **Intern J Cancer**, v. 52, p.141-146, 1992.
59. van KALKEN, C.K.; BROXTERMAN, H.J.; PINEDO, H.M.; FELLER, N. DEKKER, H.; LANKELMA, J.; GIACCONE, G. Cortisol is transported by the multidrug resistance gene product P-glycoprotein. **British J Cancer**, v. 67, n. 2, p. 284-289.
60. NELSON, E. J.; HINKLE, P. M. Characterization of multidrug-resistant pituitary tumor cells. **Endocrinology**, v. 130, p. 3246-3256, 1992.

61. BOURGEOIS, S.; GRUOL, D.J.; NEWBY, R.F.; RAJAH, F. M. Expression of an mdr gene is associated with a new form of resistance to dexamethasone-induced apoptosis. **Mol Endocrinol**, v. 7, p. 840-851, 1993.
62. KRALLI, A.; BOHEN, S. P.; YAMAMOTO, K. R.; Kralli A, Bohem SP, Yamamoto KR. LEM1, an ATP-binding-cassette transporter, selectively modulates the biological potency of steroid hormones. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, p. 4701-4705, 1995.
63. KRALLI, A.; YAMAMOTO, K. R. An FK506-sensitive transporter selectively decreases intracellular levels and potency of steroid hormones. **J Biol Chem**, v. 271, p. 17152-17156, 1996.
64. SCHWARTZ, H. L.; TRENCE, D.; OPPENHEIMER, J. H.; JIANG, N. S.; JUMP, D. B. Distribution and metabolism of L-and D-triiodothyronine (T3) in the rat: preferential accumulation of L-T3 by hepatic and cardiac nuclei as a probable explanation of the differential biological potency of T3 enantiomers. **Endocrinology**, v. 113, p. 1236-1243, 1983.
65. ARAI, K.; CHROUSOS, G.P. Syndromes of glucocorticoid and mineralocorticoid resistance. **Steroids**, v. 60, n. 1, p. 173-179, 1995.
66. BECK-PECCOZ, P.; CHATTERJEE, V. K. The variable clinical phenotype in thyroid hormone resistance syndrome. **Thyroid**, v. 4, n. 2, p. 225-232, 1994.
67. MULLER, B.; ZULEWSKI, H.; HUBER, P.; RATCLIFFE, J.G.; SATUB, J. J. Impaired action of thyroid hormone associated with smoking in women with hypothyroidism. **New England J Medicine**, v. 333, n. 15, p. 964-969, 1995.
68. REFETOFF, S.; WEISS, R. E.; USALA, S.J. The syndromes of resistance to thyroid hormone. **Endocr Rev**, v. 14, p. 348-399, 1993.
69. ESCOBAR-MORREALE, H.F.; OBREGON, M. J.; ESCOBAR del REY, F.; MORREALE-ESCOBAR, G. Replacement therapy for hypothyroidism with thyroxine alone does not ensure euthyroidism in all tissues, as studied in thyroidectomized rats. **J Clin Invest**, v. 96, p. 2828-2838, 1989.
70. BROWN, R. S.; LOMRI, N.; DE VOSS, J.; RAHMAOUI, C.; XIE, M. H.; HUA, T.; LIDOFKY, S. Enhanced secretion of glycocholic acid in a specially adapted cell line is associated with over-expression of apparently novel ATP-binding cassette proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, p.5421-5425, 1995.
71. RIBEIRO, R. C. J.; CAVALIERI, R.R.; LOMRI, N.; RAHMAOUI, C.; BAXTER, J.D.; SCHARSCHMIDT, B. F. Active Thyroid Hormone Export Regulates Cellular Hormone Content and Response. **J Biol Chem**, v. 271, p. 17147-17151, 1996.
72. CAVALIERI, R. R.; SIMEIONI, L. A.; PARK, S.W.; BAXTER, J. D.; SCHARSCHMIDT, B. F.; RIBEIRO, R. C. J.; LOMRI, N. Thyroid hormone export in rat FRTL-5 thyroid cells and mouse NIH-3T3 cells is carrier-mediated, verapamil-sensitive, and stereospecific. **Endocrinology**, v. 140, p. 4948-4954, 1999.
73. NEVES, F. A. R.; CAVALIERI, R. R.; SIMEONI, L. A.; GARDNER, D. G.; BAXTER, J. D. SCHARSCHMIDT, F.G.; LOMRI, N.; RIBEIRO, R. C. J. Thyroid hormone export varies among primary cells and appears to differ from hormone uptake. **Endocrinology**, v. 143, p. 476-483. 2002.

74. HENNEMANN, G.; DOCTER, R.; FRISIEMA, E. C. H.; JONG, M.; KRENNING, E. P.; VISSER, T. J. Plasma membrane transport of thyroid hormones and its role in thyroid hormone metabolism and bioavailability. **Endocr Rev**, v. 22, n. 4, p. 451-476, 2001.
75. TATA, J. R. How specific are "nuclear" receptors for thyroid hormones? **Nature**, v. 257, p. 18-23, 1975.
76. SHING, S. P.; CARTER, A. C.; KYDD, D. M.; CONSTANZO, R. R. Interaction between thyroid hormones and erythrocyte: competitive inhibition of binding ^{131}I -L-triiodothyronine and ^{131}I -L-thyronine by their analogues. **Endocr Res Commun**, v. 3, p. 119-131, 1976.
77. HOLM, A-C.; JACQUEMIN, C. Membrane transporter of L-triiodothyronine by human red cell ghosts. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 89, n. 3, p.1006-1017, 1979.
78. BOTTA, J. A.; MENDONZA, D.; MORERO, R. D.; FARIAS, R. N. High affinity L-triiodothyronine binding sites on washed rat erythrocyte membranes. **J Biol Chem**, v. 258, n. 11, p. 6690-6692, 1983.
79. BOTTA, J. A.; FARIAS, R. N. Solubilization of L-triiodothyronine binding site from human erythrocyte membrane. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 133, p. 442-448, 1985.
80. HOLM, A-C. Active transport of L-triiodothyronine through the red cell plasma membrane – true or false? **Scand J Clin Lab Invest**, v. 47, n. 2, p. 185-189, 1987.
81. ANGEL, R. C.; BOTTA, J. A.; FARIAS, R. N. Modification of L-triiodothyronine binding sites from rat erythrocyte membrane by heating and proteinase treatments. **Biochim Biophys Acta**, v. 897, p. 488-494, 1987.
82. ANGEL, R. C.; BOTTA, J. A.; FARIAS, R. N. High affinity L-triiodothyronine binding to right-side-out and inside-out vesicles from rat and human erythrocyte membrane. **J Biol Chem**, v. 264, n. 32, p. 19143-19146, 1989.
83. SAMSON, M.; OSTY, J.; FRANCON, J.; BLONDEAU, J-P. Triiodothyronine binding sites in the rat erythrocyte membrane: involvement in triiodothyronine transport and relation to the tryptophan transport system T. **Biochim Biophys Acta**, v. 1108, p. 91-98, 1992.
84. SAMSON, M.; OSTY, J.; BLONDEAU, J-P. Identification by photoaffinity labeling of a membrane thyroid hormone-binding protein associated with the triiodothyronine transport system in rat erythrocytes. **Endocrinology**, v. 132, n. 6, p. 2470-2476, 1993.
85. SAMSON, M.; OSTY, J.; THIBOUT, H.; BLONDEAU, J-P. Solubilization, reconstitution and molecular properties of the triiodothyronine transport protein from rat erythrocyte membranes. **Eur J Endocrinol**, v. 134, p. 660-668, 1996.
86. DOCTER, R.; KRENNING, E. P.; BOS, G.; FEKKES, D. S. F.; HENNEMANN, G. Evidence that the uptake of tri-iodo-L-thyronine by human erythrocytes is carrier – mediated but not energy – dependent. **Biochem J**, v. 208, p. 27-34, 1982.

87. HOLM, A. C.; KAGEDAL, B. Kinetics of triiodothyronine uptake by erythrocytes in hyperthyroidism, hypothyroidism, and thyroid hormone resistance. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 71, p. 1589-1595, 1998.
88. OSTY, J.; ZHOU, YA; CHANTOUX, F.; FRANCON, J.; BLONDEAU J-P. The triiodothyronine carrier of rat erythrocytes: asymmetry and mechanisms of trans-inhibition. **Biochim Biophys Acta**, v. 1051, p. 46-51, 1990.
89. MOREAU, X.; AZORIN, J-M.; MANUEL, M.; JEANNINGROS, R. Increase in red blood cell triiodothyronine uptake in untreated unipolar major depressed patients compared to healthy controls. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 22, p. 293-310, 1998.
90. OSTY, J.; JEGO, L.; FRANCON, J.; BLONDEAU, J-P. Characterization of triiodothyronine transport and accumulation in rat erythrocyte. **Endocrinology**, v. 123, n. 5, p. 2303-2311, 1988.
91. OSTY, J.; VALENSI, P.; SAMSON, M.; FRANCON, J.; BLONDEAU, J-P. Transport of thyroid hormones by human: kinetic characterization in adults and newborns. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 71, n.6, p. 1589-1595, 1990.
92. HENNEMANN, G.; KRENNING, E.P.; BERNARD, B.; HUVES, F.; MOL, J.; DOCTER, R.; VISSER, T. J. Regulation of influx and efflux of thyroid hormones in rat hepatocytes: possible physiologic significance of the plasma membrane in the regulation of thyroid hormone activity. **Horm Metab Res**, Suppl 14, p. 1-6, 1984.
93. RIBEIRO, R.C.; CAVALIERI, R.R.; LOMRI, N.; RAHMAOUI, C.M.; BAXTER, J.D.; SCHARSCHMIDT, B.F. Thyroid hormone export regulates cellular hormone content and response. **J Biol Chem**, v. 271, p. 17147-17151, 1996.
94. BENVENGA, S.; ROBBINS, J. Thyroid hormone efflux from monolayer cultures of human fibroblasts and hepatocytes. Effect of lipoproteins and other thyroxine transport proteins. **Endocrinology**, v.139, p. 4311-4318, 1998.
95. MITCHELL, A.M.; MANLEY, S.W.; MORTIMER, R.H. Membrane transport of thyroid hormone in the human choriocarcinoma cell line, JAR. **Mol Cell Endocrinol**, v. 87, p.139-145,1992.
96. MITCHELL, A.M.; MANLEY, S.W.; MORTIMER, R.H. Thyroid hormone efflux from placental tissue is not stimulated during cell volume regulation. **Placenta**, v.18, p.535-540, 1997.
97. MITCHELL, A.M.; ROWAN, K.A.; MANLEY, S.W.; MORTIMER, R.H. Comparison of mechanisms mediating uptake and efflux of thyroid hormones in the human choriocarcinoma cell line, JAR. **J Endocrinol**, v. 161, p. 107-113, 1999.
98. NELSON, E.J.; HINKLE, P.M. Characterization of multidrug-resistant pituitary tumor cells. **Endocrinology**, v. 130, p. 3246-3256, 1992.

99. CENTANNI, M.; SAPONE, A.; TAGLIENTI, A.; ANDREOLI, M. Effect of extracellular sodium on thyroid hormone uptake by mouse thymocytes. **Endocrinology**, v. 129:2175-2179, 1991.
100. HOLM, A.C.; WONG, K.Y.; PLIAM, N.B.; JORGENSEN, E.C.; GOLDFINE, I.D. Uptake of L-triiodo thyronine into human cultured lymphocytes. **Acta Endocrinol**, v. 93, n. 3, p. 350-358, 1980.
101. STIZER, L.K.; JACQUEZ, J.A. Neutral amino acid transport pathways in uptake of L-thyroxine by Ehrlich ascites cells. **Am J Physiol**, v. 229, p. 172-177, 1975.
102. ROSENBERG, R.; YOUNG, J. D.; ELLORY, J. C. A kinetic analysis of L-tryptophan transport in human red blood cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 598, p. 375-384, 1980.
103. KIM, K.; KANAI, Y., CHAIROUNGDU, A.; MATSUO, H.; CHA, S. H.; ENDOU, H. Expression cloning of a Na⁺- independent aromatic amino acid transporter with structural similarity to H⁺/monocarboxylate transporter. **J Biol Chem**, vol. 276, n. 20, p. 17221-17228, 2001.
104. LAHOUTTE, T.; CAVELIERS, V.; DIERICKS, L., VEKEMAN, M.; EVERAERT, H.; MERTENS, J.; BOSSUYT, A. In vitro characterization of the influx of 3-[125I]iodo-L- α -methyltyrosine and 2-[125I]iodo-L-tyrosine into U266 myeloma cells: evidence for system T transport. **Nuclear Med Biol**, v.28, n. 2, p. 129-134, 2001.
105. ZHOU, YA; SAMSON, M.; OSTY, J.; FRANCON, J.; BLONDEAU, J-P. Evidence for a close link between the thyroid hormone transport system and the aromatic amino acid transport system in erythrocytes. **J Biol Chem**, v. 265, n. 28, p. 17000-17004, 1990.
106. ZHOU, YA; SAMSON, M.; FRANCON, J.; BLONDEAU, J-P. Thyroid hormone concentrative uptake in rat erythrocytes. Involvement of the tryptophan transport system T in countertransport of triiodothyronine and aromatic amino acids. **Biochem J**, v. 281, p. 81-86, 1992.
107. GUYTON, A.C. **Fisiologia humana e mecanismos das doenças**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. p. 210-220.
108. ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Biologia molecular da célula**, 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. cap. 22, p. 1161-1175.
109. HOKAMA, N.K.; MATSUBARA, L.S.; MACHADO, P.E.A. Fisiologia eritrocitária e hemólise. **Jornal Brasileiro de Medicina**, Rio de Janeiro, v. 72, p. 19-32, mar. 1997.
110. LIM, V. S. Thyroid function in patients with chronic renal failure. **Am J Kidney Dis**, v. 38, n. 4, Suppl. 1, p. 580-584, 2001.
111. SPECTOR, D. A.; DAVIS, P. J.; HELDERMAN, J. H.; BELL, B.; UTIGER, R. D. Thyroid function and metabolic state in chronic renal failure. **Ann Inter Med**. v. 85, p. 724-730, 1976.

112. LIM, S. L.; FANG, V. S.; KATZ, A. J.; REFETOFF, S. Thyroid dysfunction in chronic renal failure: a study of the pituitary – thyroid axis and peripheral turnover kinetics of thyroxine and triiodothyronine. **J Clin Invest**, v. 60, p. 522-534, 1977.
113. HERSHMAN, J. M.; KRUGMAN, L. G.; KOPPLE, J. D.; REED, A. W.; AZUKIZAWA, M.; SHINABERGER, J. H. Thyroid function in patients undergoing maintenance hemodialysis: unexplained low serum thyroxine concentration. **Metabolism**, v. 27, n. 7, p. 755-759, 1978.
114. GOMEZ-PAN, A.; ALVAREZ, U. F.; YEO, P. P.; HALL, R.; EVERED, D. C.; KERR, D. N. Function of the hypothalamo – hypophysial – thyroid axis in chronic renal failure. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 11, n. 5, p. 567-577, 1979.
115. BEYER, H. K.; SHUSTER, P.; PRESSLER, H. Thyroid function in patients with kidney insufficiency requiring hemodialysis. **Nuklearmedizin**, v. 19, n. 6, p. 283-287, 1980.
116. MUSCHMOV, D.; ZACHARIEVA, B. The metabolism of thyroid hormones in chronic renal insufficiency. **Z Urol Nephrol**, v. 75, n. 4, p. 269-274, 1982.
117. BECKETT, G. J., HENDERSON, C. J.; ELWES, R.; SETH, J.; LAMBIE, A. T. Thyroid status in patients with chronic renal failure. **Clin Nephrol**, n. 4, p. 172-178, 1983.
118. FABER, J.; HEAF, J.; KIRKEGAARD, C.; LUMHOLTZ, J. B.; SIERSBAEK-NIELSEN, K.; KOLEN DORF, K.; FRISS, T. Simultaneous turnover studies of thyroxine, 3,5,3'- and 3,3',5' – triiodothyronine 3,5 – 3,3' – and 3'-5' diiodothyronine, and 3' – monoiodothyronine in chronic renal failure. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 56, p. 211-217, 1983.
119. HEGEDUS, L.; ANDERSEN, J. R.; POULSEN, L. R.; PERRILD, H.; HOLM, B.; GUNDTOFT, E.; HANSEN, J. M. Thyroid gland volume and concentration of thyroid hormone in chronic renal failure. **Nephron**, v. 40, n. 2, p. 171-174, 1985.
120. PAGLIACCI, M. C.; PELICCI, G.; GRIGNANI, F.; GIAMMARTINO, C.; FEDELI, L.; CAROBI, C.; BUONCRISTIANI, V.; NICOLETTI, J. Thyroid function tests in patients undergoing maintenance dialysis: characterization of the “Low-T₄ Syndrome” in subjects on regular hemodialysis and continuous ambulatory peritoneal dialysis. **Nephron**, v. 46, p. 225- 230, 1987.
121. TANG, W. W.; KAPTEIN, E. M.; MASSRY, S. G. Diagnosis of hypothyroidism in patients with end-stage renal disease. **Am J Nephrol**, v. 7, n. 3, p. 192-197, 1987.
122. DOCTER, R.; KRENNING, E. P.; JONG, M.; HENNEMANN, G. The sick euthyroid syndrome: changes in thyroid hormone serum parameters and hormone metabolism. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 39, p. 499-518, 1993.
123. LIM, C-F.; DOCTER, R.; VISSER, T. J.; KRENNING, E. P.; BERNARD, B.; van TOOR, H.; JONG, M.; HENNEMANN, G. A furan fatty acid and indoxil sulfate are the putative inhibition of thyroxine hepatocyte transport in uremia. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 76, n. 2, p. 318-324, 1993.

124. PEREIRA, B. J. G.; SHAPIRO, L.; KING, A. J.; FALAGAS, M. E.; STROM, J. A.; DINARELLA, C. A. Plasma levels of IL- β , TNF α and their specific inhibitors in undialyzed chronic renal failure, CAPD and hemodialysis patients. **Kidney Int**, v. 45, p. 890-896, 1994.
125. LIM, C-F.; CURTIS, A. J.; BARLOW, J. W.; TOPLISS, D. J.; STOCKIGT, J. R. Interactions between oleic acid and drug competitors influence specific binding of thyroxine in serum. **J Clin Metab**, v. 73, p. 1106-1110, 1991.
126. BOELEN, A.; SCHIPHORST, M. C.; WIERSINGA, W. M. Association between serum interleukin-6 and serum 3, 5, 3'-triiodothyronine in nonthyroidal illness. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 77, p. 1695-1699, 1993.
127. CHOPRA, I. J.; SAKANE, S.; TECO, G. N. C. A study of the serum concentration of tumor necrosis factor- α in thyroidal and nonthyroidal illness. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 72, p. 1113-1116, 1991.
128. LIM, C-F.; DOCTER, R.; VISSER, T. J.; KRENNING, E. P.; BERNARD, B.; van TOOR, H.; JONG, M; HENNEMANN, G. Inhibition of thyroxine transport into cultured rat hepatocytes by serum of nonuremic critically ill patients: effects of bilirubin and nonesterified fatty acids. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 76, n. 5, p.1165-1171, 1993.
129. MUNRO, S. L.; LIM, C-F.; HALL, J. G.; BARLOW, J. W.; CRAIK, D. J.; TOPLISS, D. J.; STOCKIGT, J. R. Drug competition for thyroxine binding to transthyretin (prealbumin): comparison with effects on thyroxine – binding globulin. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 68, p. 1141-1147, 1989.
130. SANTOS, G. M. **Efeito *in vitro* de toxinas urêmicas sobre a ligação do receptor de hormônio tireoideano ao DNA**. 2000. 77f.. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) - Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília.
131. LIM, V. S.; PASSO, C.; MURATA, Y.; FERRARI, E.; NAKAMURA, H.; REFETOFF, S. Reduced triiodothyronine content in liver but not pituitary of the uremic rat model: demonstration of changes compatible with thyroid hormone deficiency in liver only. **Endocrinology**, v. 114, n. 1, p. 280-286, 1984.
132. KAPTEIN, E. M. Thyroid hormone metabolism and thyroid diseases in chronic renal failure. **Endocr Rev**, v. 17, n. 1, p. 45-63, 1996.

ANEXOS



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FS

PROCESSO DE ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do Projeto: 049/2001

Título do Projeto: *“Mecanismo de Transporte de Hormônios Tireoideanos na Insuficiência Renal Crônica”*.

Pesquisadora Responsável: Maria Cristina Soares Rodrigues

Data da Entrada: 16/09/2001

Com base nas Resoluções 196/96, do CNS/MS, que regulamenta a ética da pesquisa em seres humanos, o Comitê de ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, após análise dos aspectos éticos e do contexto técnico-científico, resolveu **APROVAR AD REFEREDUM** o projeto 049/2001 com o título: *“Mecanismo de Transporte de Hormônios Tireoideanos na Insuficiência Renal Crônica”*.

O pesquisador responsável fica, desde já, notificado da obrigatoriedade da apresentação de relatório sucinto e objetivo sobre o desenvolvimento do Projeto, no prazo de 1(um) ano a contar da presente data (item VII.13 da Resolução 196/96).

Brasília, 22 de outubro de 2001

Prof. Volnei Garrafa
Coordenador do CEP –FS/UnB

ANEXO 2**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Pesquisadores: Maria Cristina Soares Rodrigues (Doutoranda)

Ralff Carvalho Justiniano Ribeiro

Telefone de contato: 99794954

Local de Realização: Centro de Diálise da Sociedade de Clínica Médica

Laboratório de Farmacologia Molecular – FS – UnB

Eu _____,
fui informado(a) sobre a pesquisa intitulada “Transporte de Hormônios Tireoideanos em Hemácias de Pacientes com Insuficiência Renal Crônica em Hemodiálise”, e dele resolvi participar. O objetivo desse estudo é investigar o mecanismo de transporte de hormônios tireoideanos em hemácias de indivíduos urêmicos. Fui esclarecido(a) que minha participação é inteiramente voluntária (sem qualquer forma de pagamento), em que doarei 3 mL de amostra de sangue, oito vezes, antes e após a sessão de hemodiálise, em dias alternados, para análise experimental em laboratório. Dou permissão para que meus dados de exames laboratoriais, bem como as informações por mim fornecidas sejam analisadas e divulgadas. Como minha participação é voluntária, posso abandonar o estudo a qualquer momento sem que resulte em penalidades.

Voluntário(a)

Pesquisador(a) responsável

Brasília, ____/____/____