CAROLINE SERRANO DO NASCIMENTO

BASES MOLECULARES ENVOLVIDAS NA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE DO CO-TRANSPORTADOR SÓDIO-IODETO (NIS) PELO IODETO EM TIREÓCITOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para *obtenção do Título de Doutor em* Ciências.

São Paulo
2013

CAROLINE SERRANO DO NASCIMENTO

BASES MOLECULARES ENVOLVIDAS NA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE DO CO-TRANSPORTADOR SÓDIO-IODETO (NIS) PELO IODETO EM TIREÓCITOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia Humana.

Orientadora: Profª. Drª. Maria Tereza Nunes.

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Nascimento, Caroline Serrano do.
Bases moleculares envolvidas na regulação da expressão do co-transportador sódio-iodeto (NIS) pelo iodeto em tireócitos / Caroline Serrano do Nascimento. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Maria Tereza Nunes.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Bases moleculares da ação de hormônios tireoideanos, substratos metabólicos e íons (iodo e o ferro) no controle da expressão de genes específicos.

Versão do título para o inglês: Molecular basis involved in the regulation of sodium-iodide symporter (NIS) expression by iodide in thyrocytes.

1. Iodo 2. Glândula Tireoide 3. Expressão Gênica I. Nunes, Profa. Dra. Maria Tereza II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB018/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Caroline Serrano do Nascimento.

Título da Tese: Bases moleculares envolvidas na regulação da expressão do co-transportador sódio-iodeto (NIS) pelo iodeto em tireócitos.

Orientador(a): Profa. Dra. Maria Tereza Nunes.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **379/10** referente ao projeto intitulado: ***"Bases moleculares envolvidas na regulação da expressão do gene do co-transportador de sódio-iodeto (NIS) pelo iodeto"*** sob a responsabilidade de **Caroline Serrano do Nascimento,** foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSH- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 20 de abril de 2010.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Vice-Coordenador da CEPsh - ICB/USP

À minha **MÃE**, a mulher mais forte, íntegra e fantástica que conheço...

Pelo amor, pela torcida, pela confiança, pelo apoio incondicional...

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Marlene e Aguinaldo, e ao meu irmão, Bruno, pelo exemplo de todos os dias e pelo amor que me dedicam.

Ao Eduardo, meu amor, meu melhor amigo, meu companheiro, meu elo forte, meu porto seguro...

À minha orientadora, Maria Tereza Nunes pela amizade, pelo exemplo, pelos conselhos. Agradeço a oportunidade e a confiança. E mais do que isso, pela liberdade e pelo apoio que sempre me proporcionou... Ser sua aluna é e sempre será uma honra! Espero que nossos laços perdurem por muitos e muitos anos...

À Leonice Lourenço Poyares, pelo carinho e pela amizade, fundamentais no dia a dia do laboratório. Você é um anjinho que colocaram no meu caminho! Agradeço muito por ter te conhecido e ter você como uma amiga tão querida e presente!

Aos meus amigos de todos os dias, que estão e que já foram do laboratório 131 (agora 129): Jamile, Silvania, Ana Carolina, Lucas, Rafael Salgueiro, Rafael Croffi, Rafael Prévide, Paula, Frederico, Caio, Nicole, Aline, Raquel, Fran, Janaína, Renata, Érika, Bruna, Thais, Gisele, Marta Verônica. Vocês contribuíram MUITO, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho!

Às minhas amigas-irmãs de todas as horas, Aline e Renata, pela presença constante na minha vida.

À Profª. Drª Edna Teruko Kimura e seus alunos, pela simpatia, atenção e disposição que sempre me concederam.

À Dra Ana María Masini-Repiso e seus alunos, por disponibilizar seu laboratório para que eu aprendesse novas técnicas e realizasse experimentos que contribuíram muito para o meu estudo.

À Dra Nancy Carrasco, por ter me recebido tão bem em seu laboratório, e por ter aumentado ainda mais a minha paixão pela NIS!

À todos os professores e alunos do Departamento de Fisiologia e Biofísica, que contribuíram diretamente ou indiretamente para a conclusão deste trabalho, permitindo o uso de seus laboratórios ou simplesmente estando disponíveis para ajudar em momentos de dúvida.

À Paloma e José Maria, sem os quais não saberíamos as datas, os prazos, os informes! Pela disponibilidade e simpatia que sempre me foi oferecida.

Ao pessoal da secretaria e da informática, Celso, Luciana, Itamar, Leila, Patrícia, Tarcísio e Claudia, por todo o suporte nas questões burocráticas e pela gentileza.

À FAPESP, pelo apoio financeiro essencial para o desenvolvimento deste estudo e para a minha formação acadêmica e científica.

Às instituições de fomento CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro aos projetos desenvolvidos no laboratório.

"É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias, mesmo expondo-se à derrota, do que formar fila com os pobres de espírito que nem gozam muito, nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta que não conhece vitória nem derrota."

Theodore Roosevelt

RESUMO

Serrano-Nascimento C. Bases moleculares envolvidas na regulação da expressão do co-transportador sódio-iodeto (NIS) pelo iodeto em tireócitos. [tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

O iodo é essencial para a biossíntese de hormônios tireoidianos e para a regulação da função da tireoide, uma vez que interfere com a expressão de uma série de genes nesta glândula, dentre os quais, o que codifica a proteína denominada co-transportador sódio-iodeto (NIS). Nossos estudos anteriores demonstraram, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, que o excesso de iodeto reduz a expressão e o comprimento da cauda poli(A) do mRNA da NIS, efeitos que foram identificados a partir de 30 min de tratamento. Além disso, células PCCl3 tratadas com excesso deste oligoelemento apresentaram menor recrutamento do mRNA da NIS para os ribossomos, indicando um comprometimento da tradução deste transcrito. Nosso atual objetivo foi identificar e caracterizar as bases moleculares, transcricionais e pós-transcricionais, envolvidas no efeito inibitório do iodeto sobre a expressão e função da proteína NIS. Para tanto, células PCCl3 foram tratadas com NaI (10^{-3} M) e realizaram-se ensaios para: determinar a meia-vida do transcrito de NIS; analisar o papel das porções 3'UTR e 5'UTR deste transcrito nos eventos pós-transcricionais estudados; avaliar os eventos transcricionais desencadeados pelo excesso de iodeto; investigar a organização e o papel do citoesqueleto nos eventos desencadeados pelo iodeto; analisar o conteúdo total, meia-vida, localização subcelular, via de degradação, via de internalização e atividade da NIS após o tratamento; investigar a ativação da via de sinalização PI3K/Akt. Os resultados evidenciaram que o excesso de iodeto: (a) reduz a meia-vida do mRNA de NIS; (b) interage com a porção 3'UTR, mas não com a 5'UTR deste transcrito; (c) diminui a taxa de transcrição do promotor do gene da NIS; (d) desorganiza o citoesqueleto de actina dos tireócitos; (e) reduz o conteúdo total, de membrana, a meia-vida e a atividade da NIS; (f) aumenta a internalização da NIS, pela via da clatrina, e sua degradação, pela via lisossomal; (g) ativa a via da PI3K/Akt através da produção de espécies reativas de oxigênio. Conclui-se que assim como outros oligoelementos, o iodeto desencadeia uma série de mecanismos, transcricionais e pós-transcricionais, que podem ou não estar relacionados uns aos outros, mas que em conjunto, são responsáveis pela inibição da expressão e função da NIS em tireócitos expostos agudamente ao excesso de iodeto. Desta maneira, o conjunto de dados apresentados adiciona à literatura, uma série de novas evidências dos mecanismos envolvidos na regulação da NIS durante o efeito Wolff-Chaikoff e seu escape.

Palavras-chave: Iodeto. Co-transportador sódio-iodeto. Tireócitos. Efeito Wolff-Chaikoff. Regulação pós-transcricional. Regulação transcricional. Tratamento agudo.

ABSTRACT

Serrano-Nascimento C. Molecular basis involved in the regulation of sodium-iodide symporter (NIS) expression by iodide in thyrocytes. [thesis (Ph. D. thesis in Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Iodine is essencial for thyroid hormones biosynthesis and thyroid function regulation, since this trace element interferes with the expression of different genes in this gland, as the one that codify for the sodium-iodide symporter (NIS). Our previous studies demonstrated that, both *in vitro* and *in vivo*, iodide reduces the expression and the poly(A) tail length of NIS transcript, effects triggered after 30 min of treatment. Moreover, PCCl3 cells treated with iodide excess presented reduced association of NIS mRNA and ribosomes, indicating the impairment of the translation process. Our actual objective was identify and characterize the molecular basis, transcriptional and post-transcriptional, involved in the inhibitory effect of iodide on NIS expression and function. PCCl3 cells were treated with NaI (10^{-3} M) and assays were performed to: determine the half-life of NIS transcript; analyze the role of 3'UTR e 5'UTR in the post-transcriptional events studied; evaluate the involvement of transcriptional events in the iodide effects; investigate the organization and the role of cytoskeleton in the events triggered by iodide; analyze the total content, plasma membrane content, half-life, degradation pathway, internalization pathway and activity of NIS after iodide treatment; investigate the activation of PI3K/Akt signalling pathway. The results indicated that iodide excess: (a) reduces the half-life of NIS mRNA; (b) interacts with 3'UTR, but not with 5'UTR of NIS transcript; (c) inhibits the transcription rate of NIS promoter; (d) disrupts the actin cytoskeleton of thyrocytes; (e) reduces the total content, the plasma membrane content, the half-life and the activity of NIS; (f) induces NIS internalization, through clathrin pathway, and NIS degradation, through lysosomal pathway; (g) activates the PI3K/Akt signalling pathway through the generation of reactive oxygen species. We conclude that like other oligoelements, iodide triggers different mechanisms, transcriptional and pos-transcriptional, that are responsible for the inhibition of NIS expression and fuction after acute exposure of thyrocytes to iodide excess. Therefore, the data presented herein add new evidences of the mecanisms involved in the regulation of NIS during the Wolff-Chaikoff effect and its escape phenomenon.

Keywords: Iodide. Sodium-iodide symporter. Thyrocytes. Wolff-Chaikoff Effect. Post-transcriptional regulation. Transcriptional regulation. Acute treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração esquemática da anatomia da glândula tireoide. 22
Figura 2 – Representação dos folículos tireoidianos. 23
Figura 3 – Representação esquemática da biossíntese e secreção de hormônios tireoidianos pelas células foliculares tireoidianas. 24
Figura 4 – Figura esquemática do modelo da estrutura secundária de NIS. 25
Figura 5 – Análise imuno-histoquímica da expressão de NIS em tecidos que apresentam transporte de iodeto. 27
Figura 6 – Desenho esquemático do plasmídeo peGFP-C2 e do construto da região 3' não traduzível do mRNA de NIS (904 pb) inserido *downstream* a região codificadora do eGFP. 38
Figura 7 – Desenho esquemático das diferentes porções da região 3' não traduzível do mRNA de NIS geradas e inseridas no plasmídeo peGFP-C2. 42
Figura 8 – Desenho esquemático do plasmídeo peGFP-N2 e do construto da região 5'UTR do mRNA de NIS (84 pb) inserido *upstream* a região codificadora de eGFP. 43
Figura 9 – Desenho esquemático do plasmídeo pGL3 básico e do construto da região promotora de NIS *upstream* ao gene da luciferase. 44
Figura 10 – Desenho esquemático dos vetores pNUE e mutantes. 45
Figura 11 – Decaimento do mRNA de NIS frente ao excesso de iodeto. 56
Figura 12 – Representação esquemática da análise, por citometria de fluxo, das células transfectadas com plasmídeos peGFP-C2 e selecionadas com antibiótico G418. 57
Figura 13 – Efeito do excesso de iodeto sobre a expressão do mRNA de eGFP em células eGFP-3'UTR e células eGFP. 58
Figura 14 – Efeito do excesso de iodeto sobre a expressão proteica de eGFP em células eGFP-3'UTR e células eGFP. 58
Figura 15 – Decaimento do mRNA de eGFP frente ao excesso de iodeto. 59
Figura 16 – Perfil polissomal de células eGFP-3'UTR e células eGFP. 60
Figura 17 – Análise da expressão de eGFP em células transfectadas com vetores peGFP-C2 contendo diferentes porções da região 3'UTR do mRNA de NIS. 61
Figura 18 – Efeito do excesso de iodeto sobre a expressão protéica de eGFP em células transfectadas com plasmídeos contendo porções da região 3' não traduzível do mRNA de NIS. 62
Figura 19 – Expressão de eGFP em células PCCl3 transfectadas com plasmídeos peGFP-N2. 63
Figura 20 – Efeito do excesso de iodeto sobre a expressão do mRNA de eGFP em células 5'UTR-eGFP. 64
Figura 21 – Efeito do excesso de iodeto sobre a expressão proteica de eGFP em células 5'UTR-eGFP. 64
Figura 22 – Efeito do tratamento com excesso de iodeto sobre a atividade do promotor completo de NIS (pNIS-2.8kb). 65
Figura 23 – Efeito do tratamento com excesso de iodeto sobre a atividade da porção *enhancer* do promotor de NIS (NUE). 66

Figura 24 – O efeito inibitório do iodeto sobre a atividade do promotor de NIS depende da região NUE e envolve os sítios de ligação de Pax8 e p65. 67
Figura 25 – Efeito do excesso de iodeto sobre o conteúdo total de Pax8 e p65 em células PCCl3. 68
Figura 26 – Efeito do excesso de iodeto sobre a localização subcelular de Pax8 e p65. 69
Figura 27 – Avaliação da localização subcelular de Pax8 frente ao excesso de iodeto, por ensaio de imunofluorescência. 70
Figura 28 – Avaliação da localização subcelular de p65 frente ao excesso de iodeto, por ensaio de imunofluorescência. 70
Figura 29 – Efeito do excesso de iodeto sobre a associação entre os fatores transcricionais Pax8 e p65 e seus sítios de ligação específicos na região *enhancer* do promotor de NIS (NUE). 71
Figura 30 – Avaliação do conteúdo total, e das frações polimerizada e não polimerizada de β-actina de células PCCl3 tratadas com excesso de iodeto por 30 min. 72
Figura 31 – Avaliação do conteúdo total, e das frações polimerizada e não polimerizada de β-actina de células PCCl3 tratadas com excesso de iodeto por 12 h. 73
Figura 32 – Efeito do excesso de iodo sobre a distribuição e conteúdo de filamentos de actina em células PCCl3. 74
Figura 33 – Avaliação do conteúdo total de eEF1α e do conteúdo deste fator associado às frações polimerizada e não polimerizada de β-actina, em células PCCl3 tratadas com excesso de iodeto por 30 min. 75
Figura 34 – Avaliação do conteúdo total de eEF1α e do conteúdo deste fator associado às frações polimerizada e não polimerizada de β-actina, em células PCCl3 tratadas com excesso de iodeto por 12 h. 76
Figura 35 – Avaliação da associação do mRNA de NIS aos filamentos de actina de células PCCl3 tratadas com excesso de iodeto. 77
Figura 36 – Avaliação do conteúdo total de NIS frente ao tratamento de células PCCl3 com excesso de iodeto. 78
Figura 37 – Avaliação do conteúdo de NIS na membrana plasmática de células PCCl3 tratadas com iodeto de sódio. 79
Figura 38 – Avaliação localização subcelular de NIS frente ao excesso de iodeto, por ensaios de imunocitoquímica. 80
Figura 39 – Captação de ^{125}I por células PCCl3 tratadas com iodeto de sódio. 81
Figura 40 – Efeito da inibição da via de internalização por clatrina sobre a ação inibitória do iodo na captação de ^{125}I e expressão de NIS na membrana plasmática dos tireócitos. 82
Figura 41 – Efeito da inibição da via de internalização por cavéolas sobre a ação inibitória do iodo na captação de ^{125}I pelos tireócitos. 83
Figura 42 – Análise da meia-vida da proteína NIS frente ao excesso de iodeto. 84
Figura 43 – Análise do conteúdo total de NIS em células tratadas com inibidores da via de degradação lisossomal e iodeto de sódio, por 30 min. 85
Figura 44 – Análise do conteúdo de NIS em células tratadas com inibidores da via de degradação lisossomal e iodeto de sódio, por 24 h. 85

Figura 45 – Efeito da inibição da via de degradação lisossomal sobre a ação inibitória do iodo na captação de ^{125}I pelos tireócitos. 86
Figura 46 – Efeito da inibição da via de degradação proteassomal sobre a ação inibitória do iodo na expressão de NIS e captação de ^{125}I pelos tireócitos. 87
Figura 47 – Análise da meia-vida de NIS em células previamente tratadas com inibidores da via de degradação lisossomal, submetidas ao tratamento com excesso de iodeto. 88
Figura 48 – Análise da fosforilação de Akt em células PCCl3 tratadas com iodeto de sódio. 89
Figura 49 – A ativação de PI3K é necessária para que o tratamento de tireócitos com iodeto de sódio desencadeie a fosforilação de Akt. 90
Figura 50 – O excesso de iodeto induz a produção de superóxido em células PCCl3. 91
Figura 51 – O excesso de iodeto induz a fosforilação de Akt, em tireócitos, através da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) 92
Figura 52 – Avaliação da inibição da via de sinalização PI3K/Akt sobre os efeitos inibitórios do iodeto na expressão e função de NIS em células PCCl3. 93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Primers utilizados na avaliação da expressão dos mRNAs de NIS e RPL19, em células PCCl3 por Real-Time PCR. 37
Tabela 2 – Primers utilizados na avaliação da expressão dos mRNAs de eGFP e neomicina, em células eGFP e eGFP-3'UTR por *Real-Time PCR*.. 39

LISTA DE ABREVIATURAS

Akt – do inglês *Alpha Serine/Threonine Protein Kinase*, também conhecida como PKB ou proteína quinase B

AMPc – monofosfato de adenosina cíclico

BSA – albumina de soro bovino

cDNA – ácido desoxirribonucléico complementar

ChIP – do inglês *Chromatin Immunoprecipitation* – imunoprecipitação da cromatina

CHX – ciclohexamida

ClO_4^- - perclorato

CO_2 – gás carbônico

Ct – do inglês *Treshold Cycle*

DEHAL – dehalogenase

DEPC – dietilpirocarbonato

DHE – dihidroetídeo

DIT – 3,5-diiodotirosina

DNA – ácido desoxirribonucléico

dNTP – deoxinucleotídeo trifosfatado

DPA – difenilalanina

DTT – ditiotreitol

Duox – oxidase dual tireoidiana

EDTA – ácido etilenodiamino tetracético

eEF1α – do inglês *Elongation Factor 1 Alpha* – fator de alongamento 1 alfa

eGFP – do inglês *Enhanced Green Fluorescent Protein*

EGTA – ácido etilenoglicol tretacético

FITC – isotiocianato de fluoresceína

G418 – antibiótico neomicina

GAPDH – do inglês *Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase* – gliceroaldeído 3-fosfato desidrogenase

GPx – glutationa peroxidase

H_2O_2 – peróxido de hidrogênio

HAM F12 – do inglês *Ham's Nutrient Mixture F-12*

hNIS – co-transportador sódio-iodeto humano

HTs – hormônios tireoidianos

IDD – do inglês *Iodine Deficiency Disorders* – moléstias relacionadas à deficiência de iodo

IL-1α – interleucina 1-alfa

INF-γ – interferon gama

Kb – quilobase

KCl – cloreto de potássio

$MgCl_2$ – cloreto de magnésio

miRNA – microRNA

MIT – 3-monoiodotirosina

MMI – 1-metil-2-mercaptoimidazol ou metimazol

mNIS – co-transportador sódio-iodeto de camundongo

mRNA – ácido ribonucléico mensageiro

NAC – *N*-acetil-cisteína

NaCl – cloreto de sódio

NaI – iodeto de sódio

NAPDH – do inglês *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate* – fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

NIS – do inglês *Natrium-Iodide Symporter* – co-transportador sódio iodeto

NUE – do inglês *NIS Upstream Enhancer*

OMS – organização mundial de saúde

ONPG – orto-nitrofenil-β-galactosídeo

ORF – do inglês *Open Reading Frame* – fase de leitura aberta

PABP – do inglês *Poly-A Binding Protein* – proteína ligante à cauda poli(A)

PAP – do inglês *Poly-A Polimerase* – poli(A) polimerase

Pax8 – do inglês *Paired Box 8*

pb – par de bases

PBS – tampão salina fosfato

PBS/CM – tampão salina fosfato com cloreto de cálcio e cloreto de magnésio

PBST – tampão salina fosfato com tween

PCR – reação em cadeia da polimerase

PDS – pendrina

PI3K – do inglês *Phosphoinositide 3-kinase* – fosfatidilinositol-3-quinase

PMSF – do inglês *Phenylmethylsulfonyl fluoride* – fluoreto de fenil-metil-sulfonil

PTU – 6-propil-2-tiouracil

RNA – ácido ribonucléico

rNIS – co-transportador sódio-iodeto de rato

ROS – do inglês *Reactive Oxigen Species* – espécies reativas de oxigênio

RPL19 – proteína ribossomal L19

RPM – rotação por minuto

RT – reação de transcrição reversa

SEM – erro padrão da média

SOD-peg – superóxido dismutase-polietileno glicol

T_3 – triiodotironina

T_4 – tetraiodotironina ou tiroxina

TA – temperatura ambiente

TCA – ácido tricloroacético

Tg – tireoglobulina

TGF-β – fator transformante de crescimento-beta

TNF-α – fator-alfa de necrose tumoral

TPO – tireoperoxidase

TRH – hormônio liberador de tireotrofina

TRITC – isotiocianato de tetrarodamina

TSH – hormônio tireoestimulante ou tireotrofina

TSHR – receptor do hormônio tireotrofina

TTF-1 – fator de transcrição tireoidiano 1

TTF-2 – fator de transcrição tireoidiano 2

u.a. – unidade arbitrária

UTR – região não traduzível

UV – ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 21

1.1 Importância do iodo 21

1.2 Biossíntese e secreção de hormônios tireoidianos 22

1.3 Co-transportador sódio-iodeto (NIS) 25

1.3.1 Caracterização molecular de NIS 25

1.3.2 Mecanismo de transporte de iodeto 26

1.3.3 Expressão de NIS em tecidos extratireoidianos 26

1.3.4 Regulação da expressão e função de NIS em tireoide 28

1.4 Objetivos 33

2 MATERIAL E MÉTODOS 35

2.1 Avaliação da meia-vida (t1/2) do mRNA da NIS frente ao excesso de iodo 36

2.2 Avaliação da responsividade da região 3'UTR do mRNA de NIS ao excesso de iodo 37

2.2.1 Células eGFP e eGFP-3'UTR 37

2.2.2 Avaliação da expressão de eGFP frente ao tratamento com excesso de iodeto 39

2.2.3 Avaliação da meia-vida do mRNA de eGFP frente ao tratamento com excesso de iodeto 40

2.2.4 Avaliação da taxa de tradução do mRNA de eGFP frente ao tratamento com excesso de iodeto 40

2.2.5 Identificação da porção da região 3' não traduzível do mRNA de NIS responsiva ao excesso de iodeto 41

2.3 Avaliação da responsividade da região 5'UTR do mRNA de NIS ao excesso de iodo 42

2.3.1 Células 5'UTR-eGFP 42

2.3.2 Avaliação da expressão de eGFP frente ao tratamento com excesso de iodeto 43

2.4 Avaliação do efeito do iodo sobre a atividade transcricional do promotor de NIS 44

2.4.1 Transfecção transitória do promotor completo de NIS (pNIS 2.8) 44

2.4.2 Transfecção transitória da região enhancer de NIS (pNUE) e de mutantes desta região 45

2.4.3 Análise da expressão dos fatores transcricionais Pax8 e p65 46

2.4.4 Fracionamento de proteínas citoplasmáticas e nucleares para determinação da localização subcelular dos fatores transcricionais Pax8 e p65 46

2.4.5 Análise da localização subcelular dos fatores transcricionais Pax8 e p65 por imunofluorescência 46

2.4.6 Ensaio de imunoprecipitação da cromatina (ChIP Assay) 47

2.5 Avaliação do efeito do iodo na organização do citoesqueleto dos tireócitos 48

2.5.1 Avaliação do conteúdo total de actina e da expressão da actina polimerizada e não polimerizada 48

2.5.2 Avaliação da organização do citoesqueleto de actina por ensaios de imunocitoquímica 49

2.5.3 Avaliação do conteúdo total de eEF1α e da taxa de ligação deste fator com o citoesqueleto 49

2.5.4 Avaliação do conteúdo de mRNA de NIS ligado ao citoesqueleto 49

2.6 Avaliação do efeito do iodo no conteúdo total, localização subcelular e função de NIS 50

2.6.1 Análise do conteúdo total de NIS 50

2.6.2 Análise do conteúdo de NIS na membrana plasmática 50

2.6.3 Imunocitoquímica 51

2.6.4 Ensaios de captação de iodeto ____ 51
2.6.5 Avaliação da via de internalização da proteína NIS ____ 52
2.6.6 Análise da meia-vida da proteína NIS ____ 52
2.6.7 Avaliação da via de degradação de NIS ____ 53
2.6.8 Análise da meia-vida da proteína NIS frente ao excesso de iodeto e inibidores da degradação protéica 53
2.7 Avaliação do efeito do iodo na via da sinalização PI3K-Akt ____ 54
2.7.1 Avaliação da fosforilação de Akt pelo excesso de iodeto ____ 54
2.7.2 Dosagem de ROS e seu papel na ativação da via de sinalização PI3K-Akt pelo excesso de iodeto ____ 54
2.7.3 Avaliação da inibição da atividade da via PI3K-Akt e suas conseqüências sobre a expressão e função de NIS frente ao excesso de iodeto ____ 55
2.7.4 Análise Estatística ____ 55
3 RESULTADOS ____ 56
3.1 Avaliação da meia-vida (t1/2) do mRNA da NIS frente ao excesso de iodo ____ 56
3.2 Avaliação da responsividade da região 3'UTR do mRNA de NIS ao excesso de iodo ____ 56
3.2.1 Células eGFP e eGFP-UTR ____ 56
3.2.2 Avaliação da expressão de eGFP frente ao tratamento com excesso de iodeto ____ 57
3.2.3 Avaliação da meia-vida do mRNA de eGFP frente ao tratamento com excesso de iodeto ____ 59
3.2.4 Avaliação da taxa de tradução do mRNA de eGFP frente ao tratamento com excesso de iodeto ____ 60
3.2.5 Identificação da porção da região 3' não traduzível do mRNA de NIS responsiva ao excesso de iodeto 61
3.3 Avaliação da responsividade da região 5'UTR do mRNA de NIS ao excesso de iodo ____ 63
3.3.1 Avaliação da expressão de eGFP frente ao tratamento com excesso de iodeto ____ 63
3.4 Avaliação do efeito do iodo sobre a atividade transcricional do promotor de NIS ____ 65
3.4.1 Transfecção transitória do promotor completo de NIS (pNIS 2.8) ____ 65
3.4.2 Transfecção transitória da região enhancer de NIS (pNUE) e de mutantes desta região ____ 65
3.4.3 Análise da expressão dos fatores transcricionais Pax8 e p65 ____ 67
3.4.4 Fracionamento de proteínas citoplasmáticas e nucleares para determinação da localização subcelular dos fatores transcricionais Pax8 e p65 ____ 68
3.4.5 Análise da localização subcelular dos fatores transcricionais Pax8 e p65 por imunofluorescência ____ 69
3.4.6 Ensaio de imunoprecipitação da cromatina (ChIP Assay) ____ 71
3.5 Avaliação do efeito do iodo na organização do citoesqueleto dos tireócitos ____ 72
3.5.1 Avaliação da expressão da actina polimerizada e não polimerizada ____ 72
3.5.2 Avaliação da organização do citoesqueleto de actina por ensaios de imunocitoquímica ____ 74
3.5.3 Avaliação do conteúdo total de eEF1α e da taxa de ligação deste fator com o citoesqueleto ____ 74
3.5.4 Avaliação do conteúdo de mRNA de NIS ligado ao citoesqueleto ____ 76
3.6 Avaliação do efeito do iodo no conteúdo total, localização subcelular e função de NIS ____ 77
3.6.1 Conteúdo total de NIS ____ 77
3.6.2 Análise do conteúdo de NIS na membrana plasmática ____ 78
3.6.3 Imunocitoquímica ____ 79
3.6.4 Avaliação da captação de iodeto ____ 80

3.6.5 Avaliação da via de internalização da proteína NIS 81
3.6.6 Análise da meia-vida da proteína NIS 83
3.6.7 Avaliação da via de degradação de NIS 84
3.6.8 Análise da meia-vida da proteína NIS frente ao excesso de iodeto e inibidores da degradação protéica 87
3.7 Avaliação do efeito do iodo na via de sinalização PI3K-Akt 89
3.7.1 Avaliação da fosforilação de Akt pelo excesso de iodeto 89
3.7.2 Dosagem de ROS e seu papel na ativação da via de sinalização PI3K-Akt pelo excesso de iodeto 90
3.7.3 Avaliação da inibição da atividade da via PI3K-Akt e suas conseqüências sobre a expressão e atividade de NIS frente ao excesso de iodeto 92
4 DISCUSSÃO 94
5 CONCLUSÕES 104
REFERÊNCIAS 105
APÊNDICE – *LISTA DE TRABALHOS PUBLICADOS*

1 INTRODUÇÃO

1.1 Importância do iodo

O iodo é um oligoelemento indispensável para o organismo, uma vez que é essencial para a biossíntese de hormônios tireoidianos (HTs), os quais exercem importantes efeitos sobre a regulação do metabolismo, desenvolvimento e crescimento (Farwell, Braverman, 2001). Desta maneira, torna-se evidente que tanto a produção de HTs quanto a função da glândula tireoide, dependem de um suprimento adequado de iodo na dieta (Carrasco, 1993).

No entanto, o iodo é escasso no ambiente, sendo a fonte mais abundante, alimentos de origem marinha. Além disso, alimentos provenientes de regiões próximas ao ambiente marinho, onde o solo é rico em iodo, também servem de fonte deste oligoelemento (Preddy et al., 2009). Contudo, o acesso ao iodo para a população em geral decorre da sua adição ao sal de cozinha, em quantidades adequadas para garantir produção hormonal tireoidiana suficiente.

Além disso, o iodo é usualmente utilizado como estabilizante de alimentos e componente de corantes vermelhos presentes em salgadinhos, *snacks*, *fast-foods*, cujo consumo vem aumentando na população ocidental nas últimas décadas, nas mais variadas faixas etárias, por conta da mudança dos hábitos alimentares, principalmente nas grandes metrópoles (Camargo et al., 2008; Duarte et al., 2004; Duarte et al, 2009; Medeiros-Neto, 2009). Alguns fármacos, complexos vitamínicos e suplementos alimentares também apresentam iodo em sua composição (Leung et al., 2012; Leung, Braverman, 2012).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) preconiza um aporte diário de 150 µg de iodo pela dieta em indivíduos adultos. Sabe-se que tanto a falta quanto o excesso de iodo provocam alterações na função tireoidiana, que podem ocasionar graves consequências nos indivíduos, dependendo da fase do desenvolvimento na qual eles se encontram.

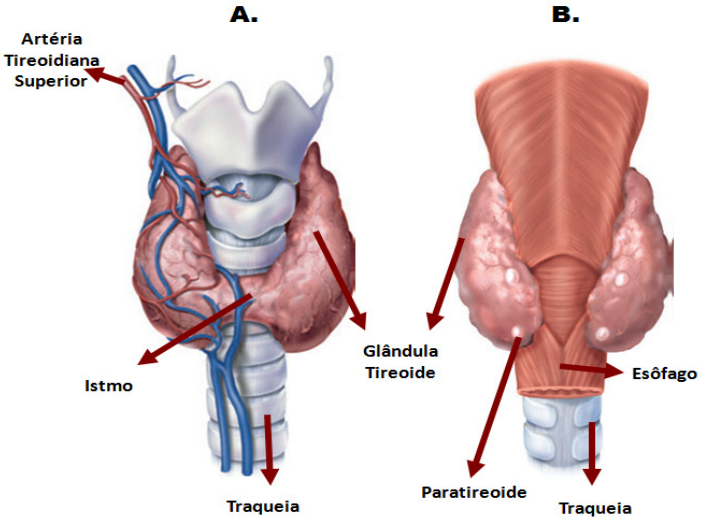
Apesar de a tireoide possuir um sistema altamente especializado de transporte de iodo, as doenças geradas a partir da deficiência de iodo na dieta ainda são um grave problema de saúde pública mundial, com múltiplas e severas conseqüências para o organismo, todas devidas à inadequada produção de hormônios tireoidianos (Zimmermann, Anderson, 2012a e 2012b). Essas doenças incluem hipotireoidismo, bócio, cretinismo, entre outras, e foram agrupadas como moléstias relacionadas à deficiência de iodo ou *iodine deficiency disorders – IDD* (Knobel, Medeiros-Neto, 2004; Li, Eastman, 2012).

Todavia, atualmente a oferta de iodo pela dieta vem crescendo grandemente, o que parece ter relação com os efeitos lesivos gerados sobre a tireoide. Dados recentes da OMS corroboram essas observações, uma vez que indicaram um elevado consumo de iodo em muitos países, como Japão e China. Brasil, Algéria, Zimbabwe e Uganda, também apresentam elevada média de concentração do iodo urinário (300 µg/L), assim como o Chile e Congo (500 µg/L), comparando-se com a iodúria normal que é de 100 µg/L. De fato, quando em excesso, este elemento traço tem sido classificado como um disruptor da função tireoidiana, uma vez que se associa ao desenvolvimento de disfunções tireoidianas, como tireoidites, hipertireoidismo, hipotireoidismo e bócio (Bartalena et al., 1994; Duarte et al., 2009; Zimmermann et al., 2005).

1.2 Biossíntese e secreção de hormônios tireoidianos

A glândula tireoide está localizada na região cervical anterior e é o maior órgão endócrino do corpo humano (Greenspan, 2006). Possui dois lobos lateralizados unidos por um istmo de parênquima glandular, que se apóia sobre a traquéia anterior um pouco abaixo da cartilagem cricoide (Kimura, 2012; Saladin, 2003) (**Figura 1**).

Figura 1 – Ilustração esquemática da anatomia da glândula tireoide.

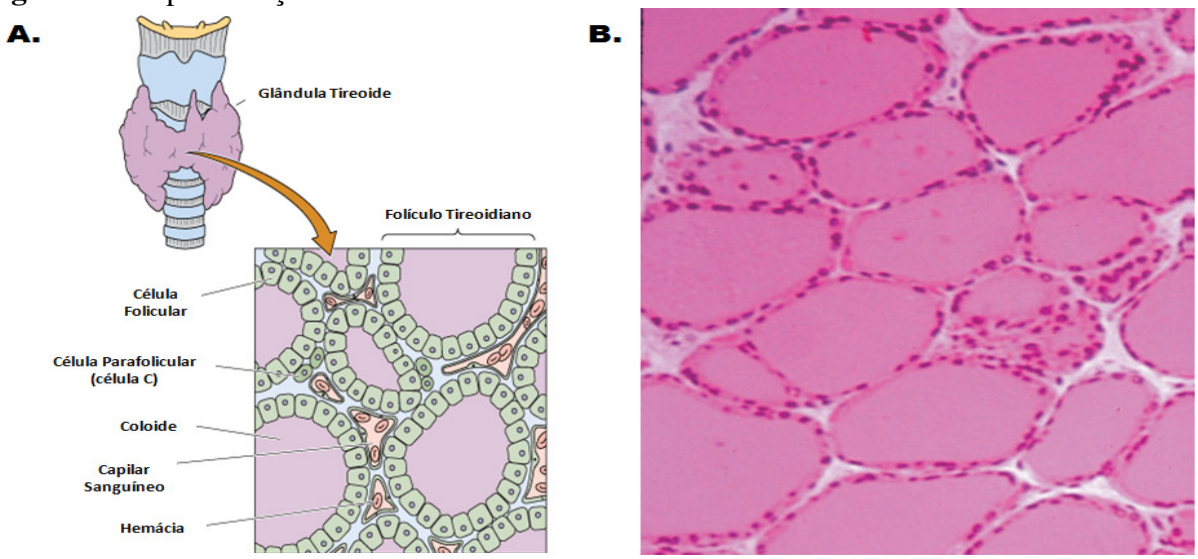


A. Visão Anterior da Tireoide. B. Visão Posterior da Tireoide
Fonte: Modificado de (Saladin, 2003).

Ao exame microscópico, a glândula consiste de uma série de folículos de tamanhos variados, que são a unidade funcional da tireoide, onde o processo de síntese, armazenamento e secreção dos HTs acontece. Cada folículo é formado por uma camada única de células, os

tireócitos, que delimitam um espaço interno, denominado lúmen, preenchido por material coloidal, produzido e secretado pelos próprios tireócitos. Estas células são polarizadas, com a membrana basal próxima aos capilares, e a membrana apical contendo microvilosidades voltadas para o lúmen. Além das células foliculares, a tireoide apresenta células C, dispersas entre os folículos, e que são responsáveis por produzir e secretar calcitonina, hormônio relacionado com o metabolismo do cálcio (Greenspan, 2006; Kimura, 2012; Saladin, 2003). (**Figura 2**).

Figura 2 – Representação dos folículos tireoidianos.



A. Representação esquemática da organização do tecido tireoidiano, com destaque para os folículos tireoidianos; B. Corte histológico da glândula tireoide.
Fonte: Modificado de (Boron, Boulpaep, 2005; Saladin, 2003).

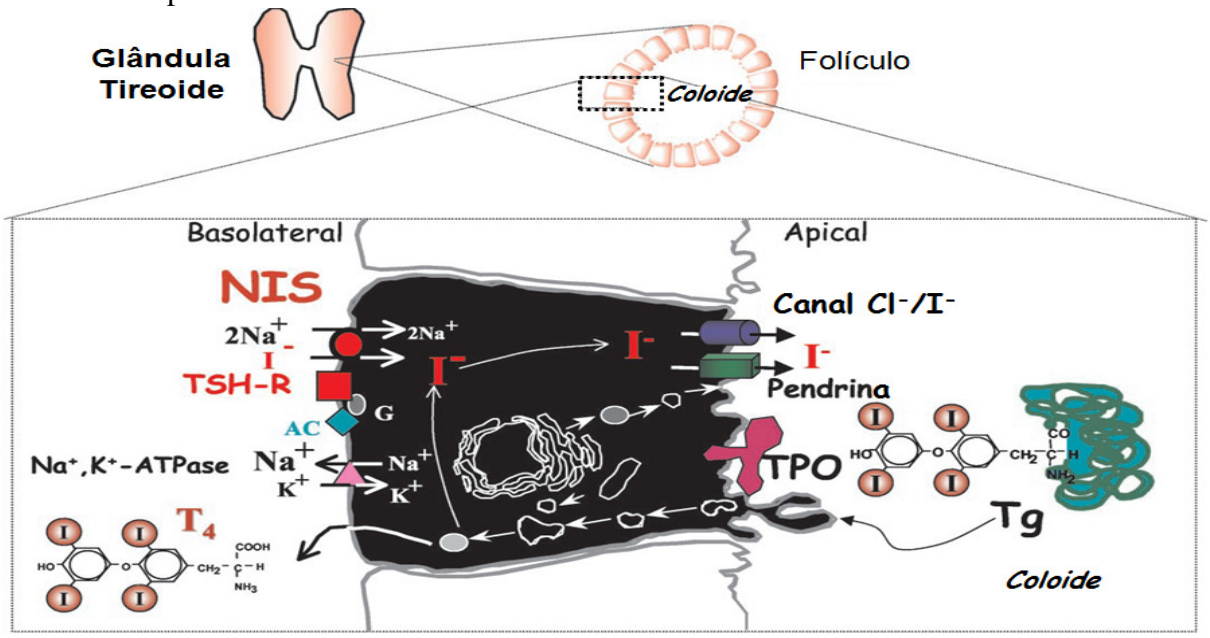
Como já explicitado anteriormente, o iodo é fundamental para a biossíntese dos HTs, e após ter sido obtido pela dieta, é reduzido a iodeto, absorvido pelo trato gastrointestinal e transportado pela corrente sangüínea, a partir da qual a tireoide tem acesso a este oligoelemento e é capaz de captá-lo, graças à proteína existente na membrana basolateral das células tireoidianas, o co-transportador sódio-iodeto (NIS) (Carrasco, 1993; Daí et al., 1996; Smanik et al., 1996).

O iodeto captado é então transportado para o lúmen do folículo, principalmente, por um trocador de ânions presente na membrana apical, a pendrina (PDS) (Bizhanova, Kopp, 2011; Bidart et al., 2000b; Kopp, 1999; Royaux et al., 2000; Yoshida et al., 2002). Segue-se a sua oxidação e incorporação nos resíduos de tirosina da molécula de tireoglobulina (Tg), processos catalisados por uma enzima presente também na membrana apical, a tireoperoxidase (TPO) (Alexander, 1977; Kotani, Ohtaki, 1987). A ação desta enzima

depende do substrato peróxido de hidrogênio (H_2O_2) gerado por outra enzima, a oxidase tireoidiana (Duox ou ThOx), que utiliza os substratos cálcio e NADPH (Ameziane-El-Hassani et al., 2005; Bjorkman, Ekholm, 1992; Caillou et al., 2001; Dupuy et al., 2000). A TPO também é responsável por conjugar as moléculas de 3-monoiodotirosina (MIT) e 3,5-diiodotorisina (DIT), formando os hormônios T_3 (triiodotironina), T_4 (tiroxina), T_2 e T_3 reverso (Nunes, 2003; Vaisman et al., 2004).

Para que ocorra a secreção destes hormônios, a Tg contendo HTs é endocitada pelas microvilosidades apicais e a partir de seu processamento por enzimas lisossomais, que a hidrolisam, as iodotironinas são liberadas (Greenspan, 2006; Kimura, 2012; Larsen et al., 1998). A maioria das DITs e MITs que foram liberadas sofre a ação da enzima dehalogenase (DEHAL), que remove o iodo associado às moléculas de tirosina, reciclando iodeto para ser reutilizado na síntese de novos HTs (Gnidehou et al., 2004; Green, 1971) (**Figura 3**).

Figura 3 – Representação esquemática da biossíntese e secreção de hormônios tireoidianos pelas células foliculares tireoidianas.



A captação de iodeto (I^-) pelos tireócitos é mediada pela proteína NIS, presente na membrana basolateral. O I^- é então transportado para o lúmen do folículo pela pendrina, presente na membrana apical. Através da atividade da TPO, o iodeto é oxidado a iodo e incorporado aos resíduos de tirosina da molécula de Tg, formando iodotirosinas (DIT e MIT), que são posteriormente acopladas formando iodotironinas (T_2, T_3, T_4). A partir de um estímulo de secreção, a Tg contendo HTs é endocitada pelas microvilosidades apicais, e hidrolisada por enzimas lisossomais, levando à liberação de HTs na circulação. Fonte: Modificado de (Dohán et al., 2003).

Desta maneira, o metabolismo do iodeto na célula folicular tireoidiana e, conseqüentemente, a produção de HTs, depende de uma série de proteínas e processos bioquímicos, mas ainda assim, tem como passo limitante a captação do iodeto por meio da NIS.

1.3 Co-transportador sódio-iodeto (NIS)

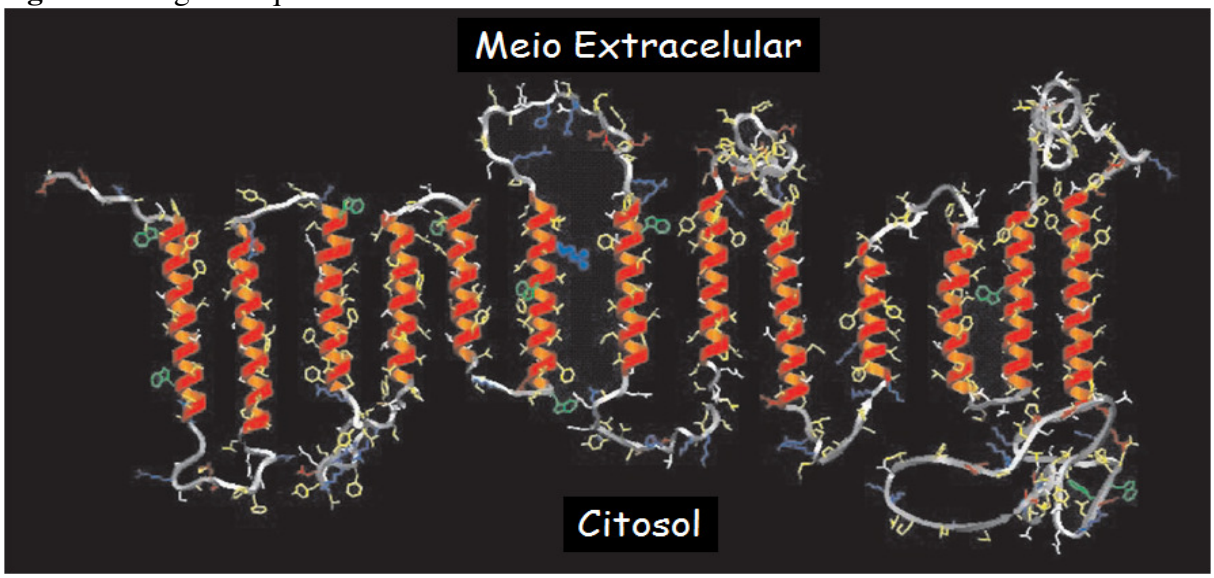
1.3.1 Caracterização molecular de NIS

Em 1996, o gene SLC5A5, que codifica NIS em humanos e o gene Slc5a5, que codifica NIS em ratos, foram clonados (Daí et al., 1996; Smanik et al., 1996). Posteriormente, a clonagem do gene Slc5a5 de camundongo também foi realizada (Pinke et al., 2001).

O gene SLC5A5 está presente no cromossomo 19p13, enquanto o Slc5a5 (de rato), no cromossomo 16p14, e em ambas as espécies é composto por 15 éxons separados por 14 íntrons (Smanik et al., 1997). Apesar disso, o tamanho dos mRNAs gerados a partir da transcrição destes genes é diferente, o de humanos possui 3.9 kb, enquanto que o de ratos 2.9 kb (Smanik et al., 1997; Spitzweg et al., 2000). Adicionalmente, a análise da fase de leitura aberta (ORF – *open reading frames*) dos genes de ratos e humanos demonstrou uma grande homologia (75%) entre estas espécies (Dohán et al., 2003).

A proteína NIS de rato (rNIS) e camundongo (mNIS) possui 618 aminoácidos, enquanto que a humana (hNIS) apresenta 643. Estes aminoácidos encontram-se organizados numa estrutura secundária de treze domínios transmembrana, com terminação amino extracelular e terminação carboxil intracelular (Dai et al., 1996; Levy et al., 1998; Spitzweg et al., 2000) (**Figura 4**).

Figura 4 – Figura esquemática do modelo da estrutura secundária de NIS.



A proteína NIS é formada por 13 domínios transmembrânicos, com porção N-terminal extracelular, e carboxi-terminal intracelular.
Fonte: (Dohán et al., 2003).

Assim como a sequência de DNA, existe alta identidade (84%) e similaridade (93%) entre as proteínas rNIS e hNIS. É importante ressaltar, que alguns destes aminoácidos apresentam um papel fundamental para a atividade e especificidade de NIS no transporte de iodeto (De La Vieja et al., 2004; De La Vieja et al., 2005; De La Vieja et al., 2007; Dohán et al., 2002; Paroder-Belenitsky et al., 2011; Reed-Tsur et al., 2008). Ainda, outros aminoácidos foram apresentados como potenciais sítios de fosforilação, que podem interferir com a velocidade de transporte de iodeto e localização de NIS na membrana plasmática dos tireócitos (Vadysirisack et al., 2007).

1.3.2 Mecanismo de transporte de iodeto

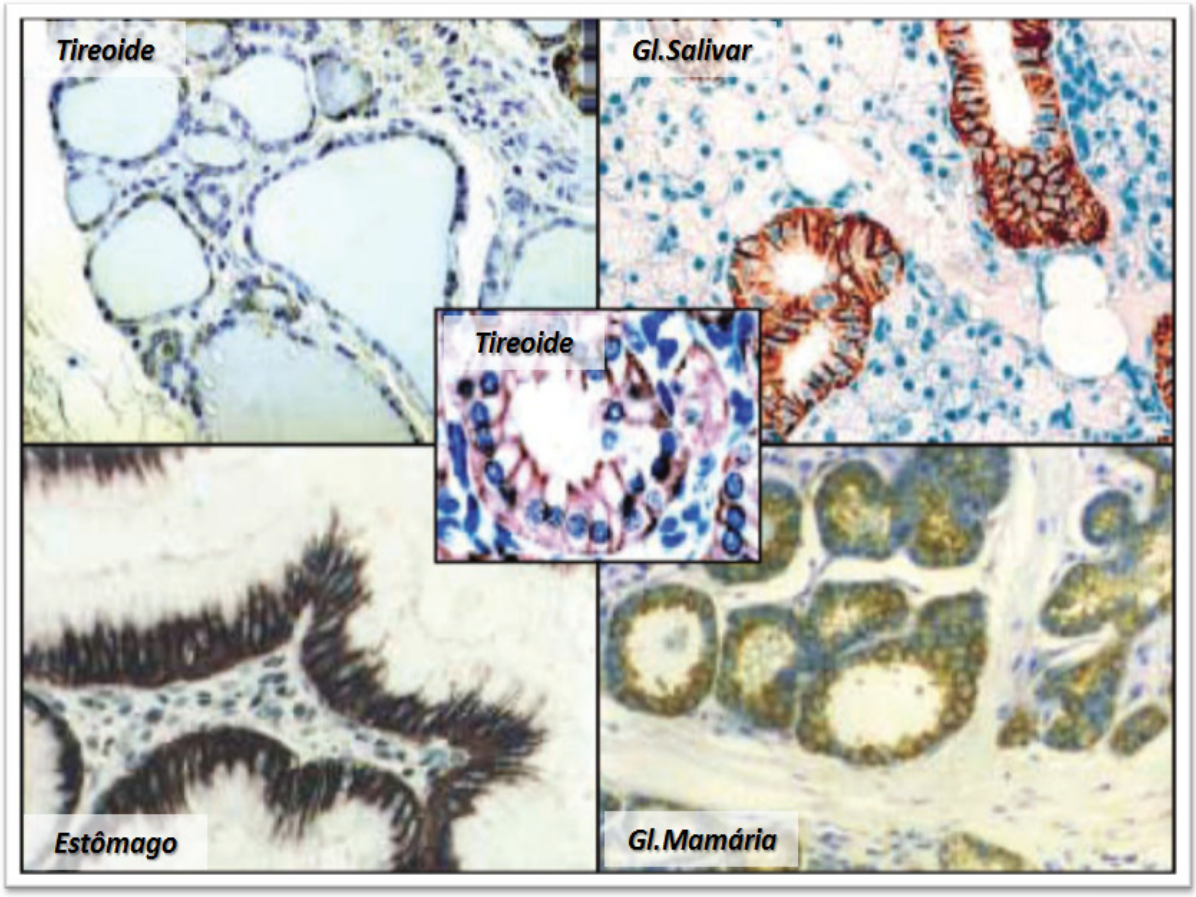
Considerando que o interior das células foliculares tireoidianas mantém um potencial elétrico negativo e uma concentração de iodeto maior do que aquela apresentada pelo plasma, a captação de iodeto pela tireoide mediada pela NIS, somente é possível, graças a um transporte ativo secundário, o qual ocorre a favor do gradiente eletroquímico de Na+ gerado pela Na+/K+ ATPase (Kaminsky et al.,1994).

Estudos estequiométricos determinaram que o fluxo de íons para o interior das células foliculares tireoidianas ocorre numa proporção de dois íons sódio para um de iodeto, confirmando que a atividade da NIS é eletrogênica. Além disso, embora o transporte de sódio e iodeto seja simultâneo, a ligação dos íons é organizada e sequencial, desta maneira, os dois íons sódio se ligam à NIS antes que o iodeto se ligue à mesma (Eskandari et al., 1997; Smanik et al., 1996).

1.3.3 Expressão de NIS em tecidos extratireoidianos

A tireoide divide a capacidade de transportar iodeto com uma série de outros tecidos que também expressam NIS, como glândulas salivares, mamárias e lacrimais, plexo coróide, intestino, rim, mucosa gástrica, pele e placenta (Ajjan et al., 1998a; Bidart et al., 2000a; Cho et al., 2000; Lacroix et al., 2001; Jhiang et al., 1998; Mitchell et al. 2001; Nicola et al., 2009; Spitzweg et al., 1998; Spitzweg et al., 1999a; Spitzweg et al., 2001; Tazebay et al., 2000; Vayre et al., 1999) (**Figura 5**).

Figura 5 – Análise imuno-histoquímica da expressão de NIS em tecidos que apresentam transporte de iodeto.



Fonte: Modificado de (Dohán et al, 2003).

Nestes tecidos, assim como na tireoide, a NIS é responsável pelo transporte de iodeto, e este transporte é inibido pelo tratamento com perclorato ou tiocianato, conhecidos competidores do iodeto pelo seu sítio de ligação em NIS (Dohán et al., 2007)

Todavia, aparentemente não há organificação ou acúmulo de iodeto nestes tecidos e os mecanismos de regulação da expressão e função de NIS são diferentes em cada deles (Dohán et al., 2003). Mais ainda, em alguns deles a proteína NIS é expressa na membrana apical das células (plexo coróide e intestino delgado), diferentemente da sua expressão característica na membrana basolateral dos tireócitos (Nicola et al., 2009; Nicola et al., 2012).

As modificações pós-traducionais, como o padrão de glicosilação de NIS, também são diferentes em alguns tecidos, como na mama, por exemplo, onde NIS apresenta menor padrão de glicosilação do que aquele apresentado na tireoide (Tazebay et al., 2000). Entretanto, já se demonstrou que os três sítios de glicosilação apresentados pela NIS, expressa em tireócitos, não interferem com a atividade, estabilidade e/ou conteúdo desta proteína (Levy et al., 1998).

1.3.4 Regulação da expressão e função de NIS em tireoide

Antes mesmo de sua clonagem em 1996 (Daí et al., 1996; Smanik et al., 1996) a regulação da expressão e atividade de NIS já eram investigadas. Atualmente sabe-se que vários hormônios e drogas são capazes de regular a expressão, a localização subcelular e a função de NIS na captação de iodeto.

1.3.4.1 TSH

O hormônio tireotrófico (TSH) é uma glicoproteína sintetizada pelos tireotrofos da adeno-hipófise, cuja secreção é regulada pelos próprios HTs, e pelo hormônio liberador de TSH (TRH), sintetizado e secretado pelo hipotálamo (Greenspan, 2006; Nunes, 2012).

O TSH é o principal hormônio regulador e estimulador da função tireoidiana, e desempenha suas funções a partir da sua interação com um receptor de membrana específico, o TSHR, que está associado à proteína G (Vassart, Dumont, 1992; Zaballos et al., 2008).

A maioria dos estudos relata o papel estimulador do TSH sobre a atividade de transporte de iodeto na glândula tireoide, via adenilil-ciclase e AMPc. Muitos estudos também indicam que o TSH ativa o processo de transcrição do gene da NIS, aumentando o conteúdo de mRNA e, consequentemente, da proteína nos tireócitos, *in vivo* e *in vitro* (Carrasco, 1993; Kogai et al., 1997; Levy et al., 1997; Saito et al., 1997; Spitzweg et al., 2000; Weiss et al., 1984).

Os mecanismos de regulação positiva de NIS pelo TSH envolvem tanto os eventos transcricionais (Kogai et al., 1997; Marcocci et al., 1984), quanto pós-transcricionais. Neste sentido, Riedel et al. (2001) demonstraram que ocorrem modificações na meia-vida, fosforilação, atividade e localização subcelular de NIS na ausência de TSH.

No entanto, além dos efeitos estimulatórios desencadeados pela ativação da via da adenilil-ciclase/AMPc, o TSH também desencadeia eventos inibitórios nos tireócitos. Atualmente se sabe que após interação do TSH com seu receptor, e subsequente ativação da adenilil-ciclase pela subunidade α da proteína G, as subunidades Gβγ desta proteína ativam a via de sinalização da PI3K/Akt, que inibe a atividade/expressão de NIS (García, Santisteban, 2002; de Souza et al., 2010; Zaballos et al., 2008). Sugere-se que este efeito inibitório, que envolve a diminuição da transcrição do gene da NIS pela menor translocação de Pax8 para o núcleo, funcionaria como um mecanismo auto-regulatório frente ao forte efeito estimulatório

do TSH sobre NIS, garantindo um ajuste fino de sua expressão nos tireócitos (García, Santisteban, 2002; Kogai et al., 2008; Zabalos et al., 2008).

1.3.4.2 Citocinas

As citocinas, produzidas pelos próprios tireócitos ou por infiltrados de células imunológicas, regulam negativamente NIS. Demonstrou-se, por exemplo, que o fator de necrose tumoral-α (TNFα), interferon-γ (IFNγ) e interleucina 1-α (IL-1α) diminuem o efeito estimulatório do TSH sobre o conteúdo do mRNA e atividade de NIS (Ajjan et al., 1998b; Pekary et al., 1997; Pekary et al., 1998; Spitzweg et al., 1999b). Mais ainda, ratos transgênicos cujos tireócitos expressavam constitutivamente INFγ desenvolveram um quadro de hipotireoidismo, derivado de uma intensa redução da expressão do gene de NIS (Caturegli et al., 2000).

O TGFβ também é um potente inibidor do crescimento e proliferação das células tireoidianas. Dentre suas ações, descreveu-se que esta citocina suprime a ação do TSH em células FRTL-5, promovendo inibição da expressão do mRNA da NIS, redução do conteúdo total dessa proteína e diminuição da atividade de captação de iodo radioativo (Kawaguchi et al., 1997; Pekari et al., 1998). O mecanismo de ação do TGFβ envolve a diminuição da expressão do fator transcricional Pax8, através das Smad2 e Smad4, levando à diminuição da expressão de NIS e de outros genes tireoidianos, como Tg e TPO (Nicolussi et al., 2003).

1.3.4.3 Tireoglobulina

A Tg é a principal proteína sintetizada e secretada pelos tireócitos, e a precursora dos HTs. O estudo de Suzuki et al. (1998) demonstrou que esta proteína regula negativamente a expressão de NIS e de outros genes tireoidianos, como a própria Tg, a TPO e o TSHR. Sugere-se que este efeito desencadeado pela Tg contrabalanceia o efeito estimulatório do TSH sob os genes acima especificados. O mesmo grupo ainda sugere que a regulação destes genes pela Tg envolve a fosforilação desta proteína e sua interação com o receptor de asialoglicoproteína, presente na membrana apical dos tireócitos, além da redução da expressão dos fatores transcricionais Pax8, TTF-1 e TTF-2 (Nakazato et al. 2000; Suzuki et al., 1998; Ulianich et al., 1999).

Estudos recentes demonstraram que estes efeitos inibitórios da Tg também dependem do padrão de iodação desta molécula. Desta maneira, quanto maior a quantidade de iodo nas moléculas de Tg, maior a inibição sobre a expressão destes genes tireoidianos (Huang et al., 2011).

1.3.4.4 Estradiol e flavonóides

Estudos demonstraram que apesar de aumentar a proliferação celular, o estradiol reduz a expressão de NIS e sua atividade de captar iodo radioativo em células FRTL5 (Furlanetto et al., 1999; Furlanetto et al., 2001). É interessante ressaltar este efeito inibitório foi observado tanto na presença quanto na ausência de TSH (Furlanetto et al., 2001).

Além disso, alguns flavonóides, que são polifenóis hidroxilados presentes em vegetais e frutas, também regulam a expressão gênica, a proliferação de tireócitos e a função tireoidiana (de Souza dos Santos et al., 2011; Schröder-van der Elst et al., 2003; Schröder-van der Elst et al., 2004). Demonstrou-se, por exemplo, que a quercetina diminui a taxa de proliferação celular e reduz a expressão de NIS em células FRTL5 (Giuliani et al., 2008), enquanto que a miricetina aumenta o influxo de iodo radioativo em tireócitos humanos (Schröder-van der Elst et al., 2004).

1.3.4.5 Propiltiouracil (PTU) e Metimazol (MMI)

As conhecidas drogas antitireoidianas, 6-propil-2-tiouracil (PTU) e 1-metil-2-mercaptoimidazol (MMI), são utilizadas principalmente no tratamento da doença de Graves, uma vez que ambas as drogas inibem a síntese de hormônios tireoidianos por bloquearem a atividade da TPO (Nagasaka, Hidaka, 1976; Nakashima et al., 1978; Shiroozu et al., 1983 Taurog, 1976)

Estudos recentes relataram um efeito estimulador do PTU (5 mM) sobre a atividade do promotor, expressão do mRNA e proteína, além da atividade de NIS em células FRTL5 cultivadas na ausência de TSH, enquanto o MMI não provocou alterações (Sue et al., 2012). Todavia, estes efeitos parecem depender da dose utilizada, uma vez que estudos anteriores, desenvolvidos por Spitzweg et al. (1999b), utilizando a mesma linhagem celular descrita acima, tanto o PTU (100 µM) quanto o MMI (100 µM) reduziram a expressão do mRNA de NIS e sua atividade na captação de iodo radioativo.

1.3.4.6 Perclorato e tiocianato

Tanto o perclorato quanto o tiocianato são conhecidos inibidores da atividade de transporte do iodeto pela NIS (Halmi, Suelke, 1956; Wolff, 1964). Estudos de Spitzweg et al. (1999b) confirmaram que o transporte de iodeto é praticamente abolido quando as células são tratadas com perclorato (10 μM), sem que a expressão do mRNA de NIS fosse alterada. O mecanismo de inibição destas drogas envolve a similaridade de tamanho e carga entre o iodeto e estes ânions; e o bloqueio exercido pelo perclorato é 10-100 vezes mais eficiente do que pelo tiocianato (Dohán et al., 2003).

Tanto o perclorato quanto o tiocianato parecem interagir com o sítio de ligação do iodeto na molécula de NIS, competindo com este ânion, e levando à diminuição de seu transporte para o interior dos tireócitos (Yoshida et al., 1997; Yoshida et al., 1998).

Adicionalmente, estes estudos sugeriram que o perclorato apesar de bloquear o transporte de iodeto, não era transportado para o interior dos tireócitos, uma vez que o tratamento de células tireoidianas ou células CHO com perclorato não induzia a geração da corrente característica observada durante o transporte de iodeto pela NIS (Yoshida et al., 1997; Yoshida et al., 1998). Contudo, estudos de Dohán et al. (2007) demonstraram que o perclorato é transportado de maneira eletroneutra pela NIS, numa proporção de íons diferente ($1Na^+:1ClO_4^-$) daquela observada durante o transporte de iodeto ($2Na^+:1I^-$). Desta maneira, esse estudo sugeriu que NIS transporta diferentes íons a partir do gradiente de Na^+, mas com uma estequiometria específica para cada substrato transportado.

1.3.4.7 Iodo

Além de ser fundamental para a síntese de HTs, o iodo é um importante agente regulador da atividade da glândula tireoide. Numa perspectiva histórica indicativa de seu papel na regulação da função tireoidiana, Plummer, em 1923, foi o primeiro a administrar altas doses deste íon para bloquear a atividade da tireoide em pacientes com doença de Basedow-Graves (Plummer, 1993 apud Dohán et al., 2003). Posteriormente, Morton et al. (1944) demonstraram que altas doses de iodo inorgânico inibiam a biossíntese e secreção de HTs em culturas de tireócitos de ovelha. Finalmente, em 1948, Wolff e Chaikoff relataram, que a organificação do iodeto é bloqueada quando este se encontra em níveis plasmáticos elevados (efeito agudo Wolff-Chaikoff). Já em 1949, Raben demonstrou que, bloqueando o

transporte de iodeto com tiocianato, o efeito inibitório gerado a partir de seu excesso no plasma era suprimido. Sendo assim, comprovou que a inibição aguda provocada pelo excesso de iodeto, depende primariamente de mecanismos intra-tireoidianos desencadeados por esse íon.

Sabe-se também que, se a alta dose de iodo for mantida por um período de tempo mais prolongado ocorre um escape desse efeito inibitório (Woff, Chaikoff, 1949). Acredita-se que a glândula tireoide sofra uma adaptação frente ao excesso de iodeto, diminuindo sua captação, e tornando o conteúdo intracelular deste oligoelemento insuficiente para sustentar o bloqueio da síntese e secreção de HTs, que retomam à normalidade, demonstrando a transitoriedade desse bloqueio (Wolff, Chaikoff et al., 1949; Braverman, Ingbar, 1963).

Acredita-se que o efeito Wolff-Chaikoff e seu escape constituem um sistema altamente especializado de auto-regulação da tireoide, que a protege dos efeitos deletérios do excesso de iodo, ao mesmo tempo em que garante um aporte adequado deste oligoelemento para a biossíntese de HTs.

De fato, muitos trabalhos demonstraram que o excesso de iodeto é capaz de reduzir o conteúdo de mRNA e/ou proteína NIS, assim como sua atividade de captação de iodeto, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Eng et al., 1999; Eng et al., 2001; Leoni et al., 2008; Leoni et al., 2011; Serrano-Nascimento et al., 2010; Serrano-Nascimento et al., 2012; Spitzweg et al., 1999b; Uyttersprot et al., 1997).

Contudo, os mecanismos moleculares desencadeados pelo iodeto durante a inibição da expressão e função de NIS não estão completamente esclarecidos.

Alguns estudos indicam que o iodo interfere com a via de sinalização do TSH, principalmente a partir da geração intracelular de iodolípides pela TPO (Denef et al., 1996; Ferreira, et al. 2005; Grollman, et al., 1986; Morand et al., 2003). Porém, dados recentes evidenciaram que o iodeto *per se* desencadeia rápidos mecanismos pós-transcricionais de regulação da expressão de NIS, como a redução do comprimento da cauda poli(A) do transcrito de NIS, e o comprometimento da sua taxa de tradução (Serrano-Nascimento et al., 2010; Serrano-Nascimento et al., 2012).

Além dos estudos que relatam a regulação da expressão gênica de NIS pelo iodeto, Takasu et al. (1985) demonstraram que culturas primárias de células tireoidianas submetidas ao excesso de iodeto apresentaram alterações em sua morfologia, indicando um possível efeito deste tratamento sobre a organização do citoesqueleto de actina. Estudos *in vitro* corroboraram essa possibilidade, uma vez que células tratadas com amiodarona (fármaco rico

em iodo), também apresentaram modificações estruturais (Yamanaki et al., 2007). Estas alterações morfológicas se somam aos eventos desencadeados pelo iodo na regulação da expressão de genes e da função da glândula tireoide, uma vez que o transporte de proteínas intracelulares, a mobilidade de fatores transcricionais e a secreção de hormônios, são eventos que dependem do arranjo do citoesqueleto de actina.

O efeito inibitório do iodeto sobre a função de NIS também é observada na clínica e é denominado efeito *stunning*. Descreve-se que este efeito seja causado pela irradiação prévia da tireoide com iodo radioativo, em procedimentos pré-terapêuticos, que influenciam a eficácia do tratamento posterior com iodo radioativo em terapias de câncer e hipertireoidismo (Lundh et al., 2009). Estudos demonstraram que o tratamento de células tireoidianas com iodo radioativo ^{131}I e ^{123}I diminuiu a expressão de NIS (proteína e mRNA) e a captação de iodeto, ainda que a integridade dos tireócitos não tenha sido afetada pela radiação (Lundh et al., 2007; Lundh et al., 2009; Meller et al., 2008; Nordén et al., 2007; Postgård et al., 2002).

Sendo assim, embora vários estudos demonstrem o envolvimento do iodeto na inibição da expressão/função de NIS, poucos avaliaram as vias deflagradas, por este oligoelemento, para a efetivação dessas alterações. Este estudo, portanto, se justificou pela busca da melhor compreensão dos mecanismos e eventos desencadeados pelo iodo na regulação da NIS, uma proteína extremamente versátil e importante tanto na área básica, pelo fato de sua atividade ser o passo limitante para a biossíntese de HTs, quanto na área clínica, uma vez que a atividade de NIS é fundamental para a efetividade do tratamento de cânceres com iodo radioativo, assim como, é uma importante ferramenta para terapia gênica.

1.4 Objetivos

Considerando os resultados anteriores, que demonstraram a existência de um mecanismo rápido de regulação da expressão de NIS pelo excesso de iodeto, os objetivos deste estudo desenvolvido em cultura de células tireoidianas PCCl3, foram:

a) Avaliar a meia-vida do mRNA da NIS frente ao excesso de iodo;
b) Identificar se o mRNA de NIS possui regiões regulatórias (elementos *cis*) responsivas à presença de iodeto intracelular;
c) Investigar o efeito do iodo sobre a regulação transcricional de NIS;

d) Analisar o envolvimento da organização do citoesqueleto nos efeitos inibitórios do iodeto sobre a tireoide e sobre a expressão de NIS;
e) Avaliar as repercussões do efeito do excesso de iodo no conteúdo, localização subcelular, internalização, meia-vida, degradação e função da proteína NIS, por meio de western blotting e/ou imunocitoquímica e captação de ^{125}I;
f) Investigar se a via de sinalização da PI3K (inibitória para a expressão/atividade de NIS) é ativada quando há excesso de iodeto.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados utilizando-se a linhagem celular de tireoide normal de rato, PCCl3 – gentilmente doada pela professora Dra. Edna Teruko Kimura (ICB/USP, São Paulo, Brasil).

As células foram cultivadas em garrafas de 75 cm^2 e mantidas em meio HAM F12 contendo 5% de soro fetal bovino, e os antibióticos: penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 μg/ml). O meio de cultura foi suplementado com 1 mU/ml de TSH, 10 μg/ml de insulina, 5 μg/ml de apotransferrina e 10 ng/ml de hidrocortisona (Leoni et al., 2008). Todos os hormônios foram obtidos da Sigma (SIGMA, St.Louis, MO, USA). As culturas foram mantidas em atmosfera umidificada com 5% de CO_2, a 37 ^oC. Após atingirem a confluência necessária as células foram tripsinizadas e semeadas em garrafas pequenas (25 cm^2) ou placas de 6, 12, 24 poços, dependendo do procedimento experimental utilizado. Ao atingirem 70% de confluência foram gerados basicamente dois grupos experimentais distintos:

I. Grupo Controle: Culturas mantidas sob as condições anteriormente especificadas, cujo meio foi substituído por meio fresco contendo todos os suplementos necessários, mas **sem** a adição de iodeto de sódio – grupo controle (**C**).

II. Grupo Iodo: Culturas mantidas sob as mesmas condições descritas no grupo controle, com exceção de que ao meio fresco foi adicionado 10^{-3} M de NaI – grupo iodo (**I**) (Eng et al., 2001; Leoni et al., 2008; Leoni et al., 2011). O tratamento foi mantido por diferentes períodos de tempo (de 30 min a 24 h), dependendo do protocolo experimental realizado.

Em alguns estudos, que serão especificados em momento oportuno, foram gerados grupos experimentais adicionais, nos quais as células PCCl3 foram submetidas ao tratamento prévio com drogas/inibidores específicos (actinomicina D, ciclohexamida, nistatina, clorpromazina, Z-leu-leu-leu-al, bafilomicina, cloroquina, AKTi1/2, wortmanina, LY2940002, SOD-peg, *N*-acetil-cisteína, Ebselen). Todos reagentes foram obtidos da Sigma.

Protocolo Experimental

2.1 Avaliação da meia-vida (t1/2) do mRNA da NIS frente ao excesso de iodo

Já foi demonstrado que o excesso de iodo diminuiu o comprimento da cauda poli(A) do mRNA de NIS, parâmetro que está diretamente relacionado com a estabilidade de transcritos, interferindo com sua meia-vida (Robinson, 1988; Ross, 1995). Desta maneira, a partir do protocolo descrito a seguir, objetivou-se avaliar se de fato, a meia-vida do mRNA de NIS encontrava-se comprometida, frente ao tratamento com excesso de iodo.

Células PCCl3 foram tratadas com actinomicina D (4 μM), conhecido bloqueador de transcrição gênica , 1 h antes do tratamento ou não com excesso de NaI (10^{-3} M). Após 0, 30 min, 2 e 6 h do tratamento, o meio foi removido, e o RNA total das células foi extraído utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), seguindo instruções do fabricante. Brevemente, adicionou-se 0,2 ml de clorofórmio, e as amostras foram centrifugadas a 12.000 g, a 4 °C por 15 min. A fase aquosa foi coletada e precipitada com isopropanol; seguiu-se a incubação em temperatura ambiente e nova centrifugação a 12.000 g, a 4 °C por 10 min. O sobrenadante foi removido, e o precipitado, que corresponde ao RNA total, foi lavado com etanol 95% e centrifugado a 6.000 g, a 4 °C, por 5 min. O sobrenadante foi removido, o precipidado ressuspenso em 30 μl de água DEPC autoclavada. A concentração de RNA de cada amostra foi obtida a partir de leitura em *Nanodrop*.

A análise da expressão do mRNA da NIS foi feita por *Real-Time PCR*. Para isso, primeiramente, foi feita a reação de transcrição reversa a partir de 1 μg do RNA total de cada amostra, com volume total de reação de 20 μl. Foram adicionados: oligo dT (100 μg/ml), 10 mM de cada dNTP, 5X *First-Strand buffer* e 1 μl de enzima (200 U/μl) *M-MLV Reverse Transcriptase* (Invitrogen). A reação foi realizada num ciclo de 65 ºC por 10 min, seguido de 42 ºC por 60 min e 95 ºC por 10 min.

Para a realização do ensaio de *Real-Time PCR*, utilizou-se 1 μl do produto de RT em 12 μl de reação final, contendo 200 nM de cada par de *primers* designados para os gene da NIS e RPL19 (**Tabela 1**), que foi utilizado como controle endógeno em cada reação.

Tabela 1: Primers utilizados na avaliação da expressão dos mRNAs de NIS e RPL19, em células PCCl3 por *Real-Time PCR*.

Gene	Primer	Referência GenBank
RPL19	FWD - 5′-GGCCCGCAAGAAGCTACTG-3′ REV - 5′-TTTCGTGCTTCCTTGGTCTTAGA-3′	NM_031103
NIS	FWD – 5´-AGCCTCGCTCAGAACCATTC-3´ REV – 5´-GTGTACCGGCTCCGAGGAT-3´	NM_052983

Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013)

A reação de PCR foi realizada em aparelho *Corbett Rotor-Gene 6000* (Qiagen, Valencia, CA, US) nas seguintes condições: 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min, e 40 repetições de um ciclo de 95 °C por 20 s e 60 °C por 1 min.

A reação de cada amostra foi realizada em duplicata. Para as análises quantitativas, os resultados foram calculados usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak, Schmittgen, 2001).

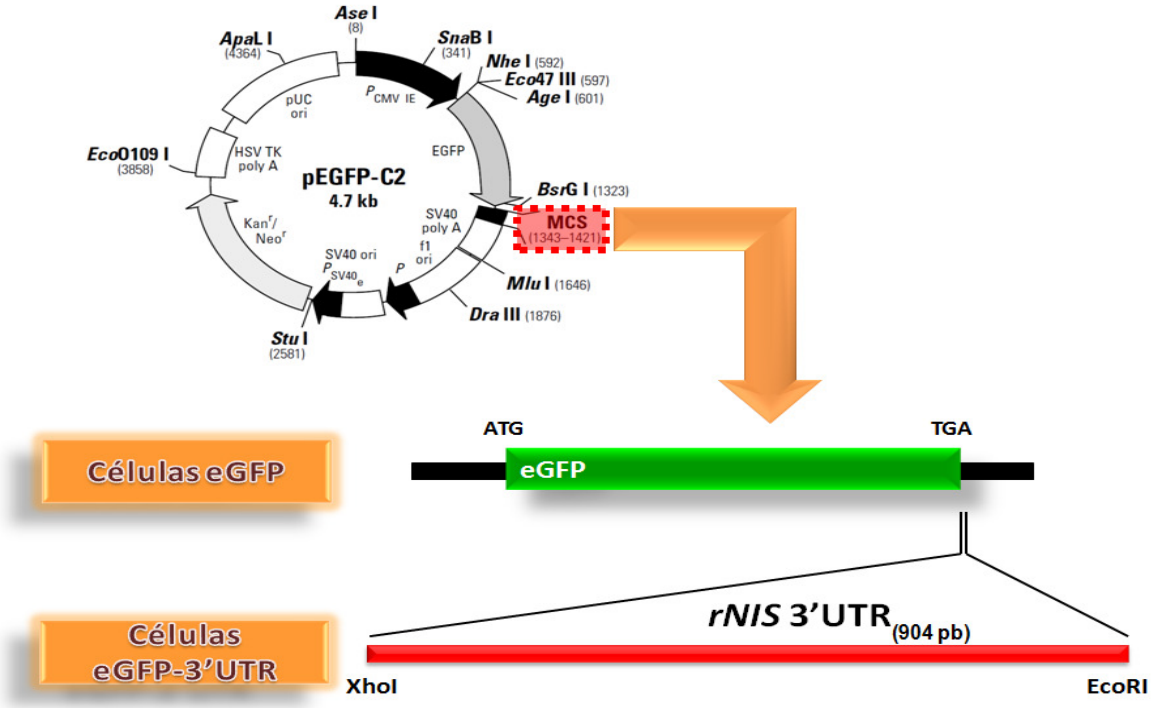
2.2 Avaliação da responsividade da região 3'UTR do mRNA de NIS ao excesso de iodo

2.2.1 Células eGFP e eGFP-3'UTR

Células PCCl3 foram permanentemente transfectadas com plasmídeos peGFP-C2 (Promega, Madison, WI, USA) contendo ou não a região 3'UTR do mRNA de NIS após a região codificadora do gene do eGFP (e*GFP = Enhanced green fluorescent protein*).

Estas células foram respectivamente identificadas como células eGFP-3'UTR e células eGFP (**Figura 6**).

Figura 6 – Desenho esquemático do plasmídeo peGFP-C2 e do construto da região 3' não traduzível do mRNA de NIS (904 pb) inserido *downstream* a região codificadora do eGFP.



As células PCCl3 que foram transfectadas com o plasmídeo contendo a porção 3'UTR completa de NIS após a região codificadora do gene eGFP foram denominadas células eGFP-3'UTR, enquanto que as células que foram transfectadas com o plasmídeo sem modificações, foram denominadas células eGFP.
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

A transfecção foi realizada utilizando-se o reagente Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Resumidamente, células PCCl3 foram plaqueadas em placas de 6 poços, e ao atingirem 80-90% de confluência, o meio das células foi trocado pelo meio Optimem (Invitrogen), específico para ensaios de transfecção. Logo depois, cada poço recebeu um mix de lipofectamina (10 µL) e 4 µg dos plasmídeos peGFP-C2 contendo ou não a região 3'UTR do mRNA de NIS *downstream* ao gene do eGFP. As células foram mantidas em estufa por 6 horas, e após este período o meio foi novamente trocado por meio HAM-F12 suplementado com hormônios e soro. Após a transfecção, iniciou-se o procedimento de seleção das células transfectadas, com o antibiótico G418 (neomicina) 1 mg/ml (Sigma).

Após 20 dias de seleção, as células foram tripsinizadas e ensaios de citometria de fluxo foram realizados para confirmação da eficiência de transfecção e seleção. Resumidamente, após tripsinizadas, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X. Posteriormente, as células foram fixadas utilizando-se paraformaldeído 2%, por 20 min. As amostras foram ressuspendidas em PBS e analisadas no aparelho de citometria de fluxo, *FACSCalibur Flow Cytometer* (Becton–Dickinson, San Juan, CA, USA).

A manutenção dos plasmídeos nas células PCCl3 foi garantida, pelo tratamento das mesmas com antibiótico G418 0,2 mg/ml.

2.2.2 Avaliação da expressão de eGFP frente ao tratamento com excesso de iodeto

Após a geração das linhagens celulares, as mesmas foram divididas em dois grupos experimentais: controle (**C**) e iodo (**I**), neste último as células foram tratadas com NaI (10^{-3} M) por 30 min, 1, 2, 12 e 24 h. O RNA total foi extraído por Trizol, conforme descrito anteriormente, e a expressão de eGFP foi avaliada por *Real-Time PCR*, sendo a normalização de cada reação realizada através da expressão do gene neomicina (**Tabela 2**).

Tabela 2: Primers utilizados na avaliação da expressão dos mRNAs de eGFP e neomicina, em células eGFP e eGFP-3'UTR por *Real-Time PCR*.

Gene	Primer
Neomicina	FWD - 5′-ACTGAAGCGGGAAGGGACTG-3′ REV - 5′-CGATGTTTCGCTTGGTGGTC-3′
eGFP	FWD – 5´- ACCACATGAAGCAGCACGAC-3´ REV – 5´- TGTAGTTGCCGTCGTCCTTG -3´

Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013)

Além disso, avaliou-se a expressão protéica de eGFP por *Western Blotting*. Resumidamente, após a homogeneização, a concentração de proteínas das amostras foi determinada pelo método de Bradford, e 60 μg de proteínas totais foram submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE 12%. Após este procedimento, as proteínas presentes no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi então bloqueada com leite desnatado (5%) em PBST, a temperatura ambiente (TA) por 1 h. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com anticorpo específico anti-eGFP (*BD Biosciences*), gerado em camundongo, diluído na solução de bloqueio e mantido em uma concentração de 1:1000. Ao final da incubação com anticorpo primário, a membrana foi lavada 3X por 10 min a TA, com PBST, e incubada com anticorpo secundário (anti-camundongo, conjugado com peroxidase) por 1 h a TA. Seguiram-se três lavagens por 10 min com PBST. A membrana foi tratada com reagentes quimioluminescentes (ECL) e então exposta a um filme auto-radiográfico, cuja análise densitométrica foi realizada por meio do software Image J (*National Institutes of Health*, Bethesda, MD, USA). Os dados foram normalizados a partir da análise densitométrica de imunoblots de uma proteína constitutiva α-tubulina (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

2.2.3 Avaliação da meia-vida do mRNA de eGFP frente ao tratamento com excesso de iodeto

Para identificar se a região 3' não traduzível do mRNA de NIS é a responsável pela rápida diminuição do conteúdo deste transcrito frente ao excesso de iodeto, células eGFP e eGFP-3'UTR foram tratadas com actinomicina D (4 μM) por 1 h. Posteriormente, fez-se o tratamento das células do grupo iodo com NaI (10^{-3} M) por 0, 30 min, 2, 4 e 6 h. As células do grupo controle foram tratadas apenas com actinomicina D e após os mesmos períodos descritos anteriormente, o meio de cultura dos poços de ambos os grupos foi removido, e o RNA total das células foi extraído utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen). A expressão do mRNA de eGFP foi analisado por *Real-Time PCR*, utilizando-se primers específicos para eGFP e neomicina (**Tabela 2**).

2.2.4 Avaliação da taxa de tradução do mRNA de eGFP frente ao tratamento com excesso de iodeto

Para avaliar se a região 3' não traduzível do mRNA de NIS também está relacionada com a menor taxa de tradução deste transcrito em condições de excesso de iodeto, realizou-se ensaio de perfil polissomal nas células eGFP e eGFP-3'UTR. A análise do perfil polissomal tem como objetivo central determinar a parcela de um determinado mRNA que está sendo traduzido no momento estudado.

As células eGFP e eGFP-3'UTR (10 garrafas para cada n) foram divididas em grupos controle e iodo (tratamento com NaI 10^{-3} M por 30 min). As células foram posteriormente tratadas por 10 min com ciclohexamida (100 μg/mL) e mantidas na estufa com temperatura e CO_2 controlados. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com PBS acrescido de ciclohexamida (100 μg/m) e homogeneizadas (baixa rotação) com 1 ml de tampão de lise (250 mM sacarose, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM KCl, 25 mM $MgCl_2$, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 4 mg/ml heparina, 1% Triton X-100) (modificado de Chebath et al., 1977).

O extrato total foi centrifugado a 10.000 g por 10 min à 4º C. O sobrenadante foi removido, transferido para outro tubo *eppendorf*, devidamente identificado e aplicado no topo do gradiente de sacarose (que se iniciou com 7%, passando por 7.1%, 7.2% até 47%) contendo: Tris-HCl 15 mM pH 7.4, $MgCl_2$ 15 mM, NaCl 300 mM, ciclohexamida (1 mg/ml), DTT 0,33 mM. Os tubos com as amostras foram balanceados, colocados no rotor SW41Ti

(Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) e submetidos a ultracentrifugação a 36.000 rpm por 2 h a 4º C.

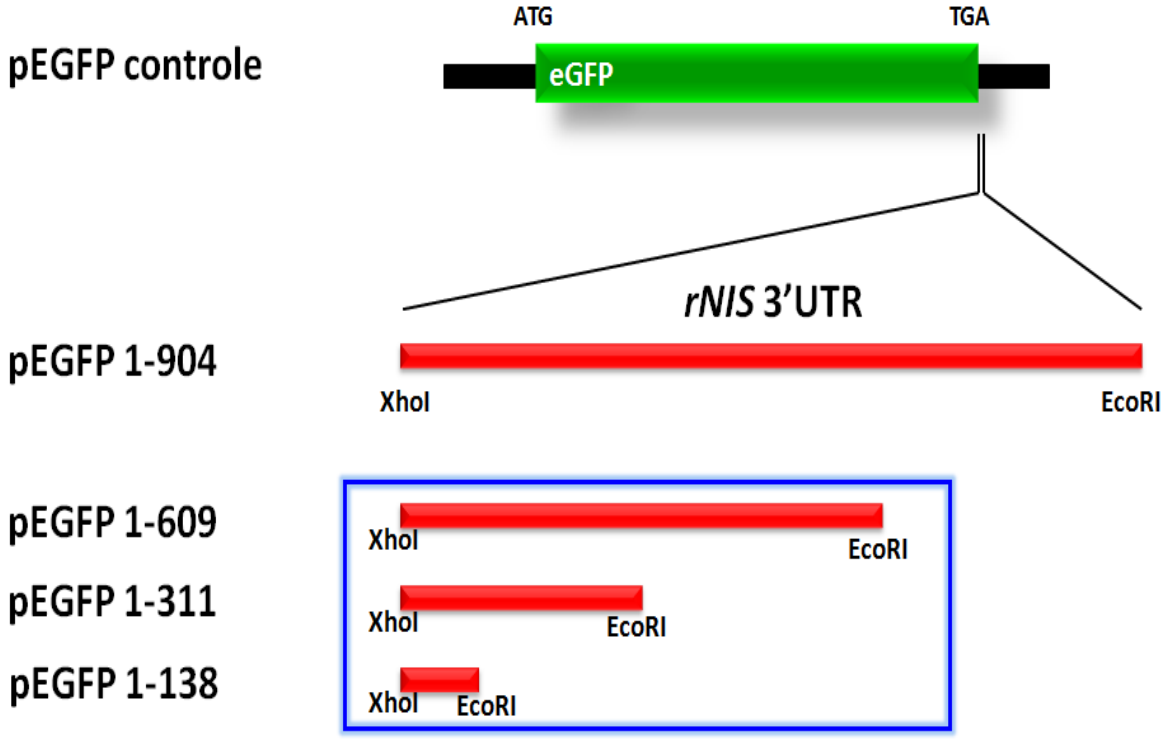
Após a ultracentrifugação, as diferentes frações do gradiente foram coletadas em alíquotas de 1 ml, a partir do topo, por meio de um coletor de frações (modelo 2110, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), acoplado a um detector de UV, em um comprimento de onda de 260 nm, com auxílio de uma bomba peristáltica que injetava sacarose a 60 % na base do tubo (que continha sacarose a 47%). As amostras coletadas do gradiente de sacarose (aproximadamente 1 ml), que correspondiam a fração dos ribossomos associados aos mRNAs, foram diluídas em 2,25 ml de tiocianato de guanidina 4 M e 3,35 ml de etanol 100 %, e incubadas a -20 ºC durante toda a noite. Os RNAs foram precipitados através de centrifugação a 10.000 g, por 20 min a 4 ºC; o sobrenadante foi desprezado e os pellets foram lavados com etanol (75 %) e novamente centrifugados a 10.000 g por 5 min a 4 ºC. O precipitado foi reconstituído com 400 µl de H_2O DEPC por agitação mecânica, aquecido a 65 ºC por 15 min e transferido para um tubo *eppendorf* devidamente identificado, onde foi acrescentado 50 µl de acetato de sódio 2 M pH 4 e 1 ml de etanol 100%.

As amostras em suspensão foram submetidas à centrifugação a 12.000 g por 20 min a 4 ºC. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado reconstituído com 1 ml de cloreto de lítio 2 M e incubado a 4 ºC durante toda a noite. Este processo garantiu que a heparina, presente nas amostras, fosse removida, o que é essencial para a transcrição reversa do mRNA (del Prete et al., 2007). As amostras contendo os RNAs foram centrifugadas a 12.000 g, por 15 min a 4 ºC, o sobrenadante desprezado e lavado duas vezes, com etanol 75% (500 µl). Em seguida, as amostras foram secas por 10 min em speed-vac. Finalmente, as amostras foram diluídas em água DEPC e submetidas aos ensaios de transcrição reversa e de *Real-Time PCR* descritos anteriormente.

2.2.5 Identificação da porção da região 3' não traduzível do mRNA de NIS responsiva ao excesso de iodeto

A partir dos resultados obtidos com as células eGFP e eGFP-3'UTR, foram construídos novos plasmídeos, contendo diferentes tamanhos da região 3' não traduzível do mRNA de NIS (904, 609, 311 e 138 pb). Uma série de construtos com diferentes tamanhos foram gerados por PCR tradicional, utilizando primers específicos, conforme ilustrado na **Figura 7**.

Figura 7 – Desenho esquemático das diferentes porções da região 3' não traduzível do mRNA de NIS geradas e inseridas no plasmídeo peGFP-C2.



Os plasmídeos contendo foram então, permanentemente transfectados em células PCCl3.
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

As eficiências de transfecção e seleção foram confirmadas por ensaios de citometria de fluxo. Posteriormente, as células foram tripsinizadas e cultivadas em placas de 6 poços, e seguiu-se o tratamento das mesmas com iodeto de sódio (10^{-3} M) por 2 h e 12 h. Avaliou-se a expressão proteica de eGFP através de *Western Blotting*, metodologia detalhada anteriormente.

2.3 Avaliação da responsividade da região 5'UTR do mRNA de NIS ao excesso de iodo

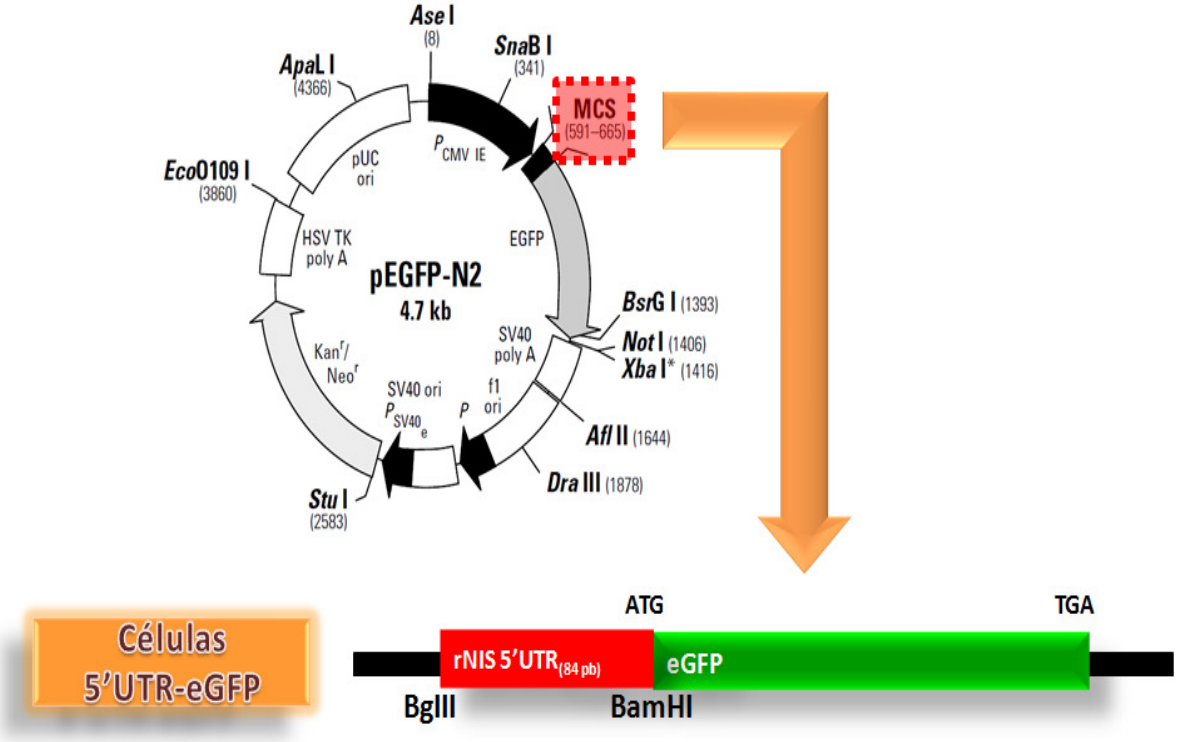
2.3.1 Células 5'UTR-eGFP

Muitos trabalhos indicam regiões responsivas à elementos traço em ambas as regiões não-traduzíveis (5'UTR e 3'UTR) de transcritos relacionados ao transporte/metabolismo dos mesmos (Bermano et al., 1996a; Bermano et al., 1996b; Eisenstein, 2000; Kilav et al., 2001; Lodish et al., 1999; Moallem et al., 1998; Naveh-Many et al., 2002; Rouault, 2002; Sela-Brown et al., 2000; Wallander et al., 2006;).

Por este motivo, células PCCl3 foram permanentemente transfectadas com plasmídeos peGFP-N2 (Promega) contendo a região 5' não traduzível do mRNA de NIS *upstream* a

região codificadora de eGFP. Estas células foram identificadas como células 5'UTR-eGFP (**Figura 8**).

Figura 8 – Desenho esquemático do plasmídeo peGFP-N2 e do construto da região 5'UTR do mRNA de NIS (84 pb) inserido *upstream* a região codificadora de eGFP.



As células PCCl3 transfectadas com este plasmídeo foram denominadas células 5'-UTR-eGFP.
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013)

Após os 20 dias de tratamento com o antibiótico G418 (1 mg/ml), foram realizados ensaios de citometria de fluxo para confirmação da eficiência de transfecção e seleção.

2.3.2 Avaliação da expressão de eGFP frente ao tratamento com excesso de iodeto

Após a geração da linhagem celular 5'UTR-eGFP, a mesma foi dividida em dois grupos experimentais: iodo (**I**) e controle (**C**), que foram respectivamente tratados ou não com NaI (10^{-3} M) por 30 min, 1, 2, 24 e 48 h. A expressão de eGFP foi avaliada por *Real-Time PCR* e citometria de fluxo. Para análise da expressão protéica por citometria de fluxo, as células 5'UTR-eGFP foram tripsinizadas e fixadas em paraformaldeído 2% por 20 min. As células foram lavadas com PBS/CM (PBS contendo $CaCl_2$ 0,1 mM e $MgCl_2$ 1 mM) 3 vezes e então permeabilizadas com 0,1% de saponina em PBS/CM contendo 0,2% BSA (PBS/CM/TB) por 30 min, a TA. Posteriormente, as células foram incubadas por 1 h com

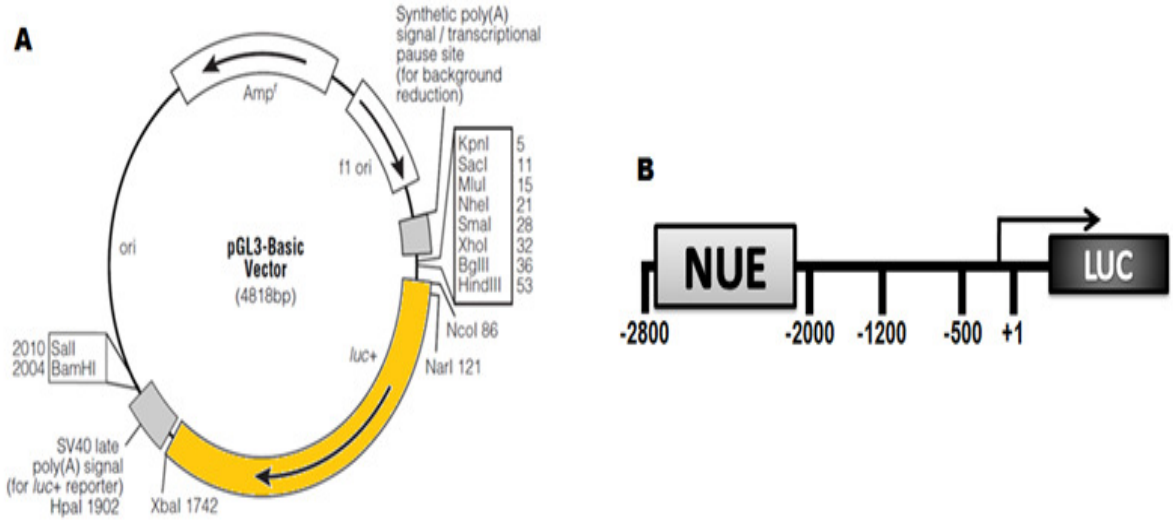
anticorpo anti-eGFP conjugado Alexa Fluor® 488 (Invitrogen), a TA. As células foram lavadas três vezes com PBS/CM e finalmente analisadas no aparelho de citometria de fluxo, *FACSCalibur Flow Cytometer* (Becton–Dickinson). Para análise dos dados, foi utilizado o software *Flowing Software 2.5* (University of Turku, Finland).

2.4 Avaliação do efeito do iodo sobre a atividade transcricional do promotor de NIS

2.4.1 Transfecção transitória do promotor completo de NIS (pNIS 2.8)

Células PCCl3 foram plaqueadas em placas de 6 poços e ao atingirem 80-90% de confluência, foram transfectadas com os plasmídeos pGL3 Luciferase Reporter (Promega) contendo a região promotora completa de NIS (pNIS 2.8) *upstream* ao gene da luciferase (**Figura 9**).

Figura 9 – Desenho esquemático do plasmídeo pGL3 básico e do construto da região promotora de NIS *upstream* ao gene da luciferase.



A. Esquema representativo do vetor pGL3-Basic, no qual foi inserido o promotor completo de NIS. Em amarelo o gene da luciferase. B. Construto gerado a partir da inserção da região promotora de NIS *upstream* ao gene da luciferase.
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

Concomitantemente, as células foram transfectadas com vetor contendo o gene da β-galactosidase, que serviu como um controle interno de cada experimento para avaliação da eficiência de transfecção. Cada procedimento de transfecção foi realizado em triplicada com igual quantidade de DNA plasmidial adicionada a cada poço. No dia seguinte, as células foram tripsinizadas e semeadas em placas de 24 poços. Os poços foram divididos nos grupos

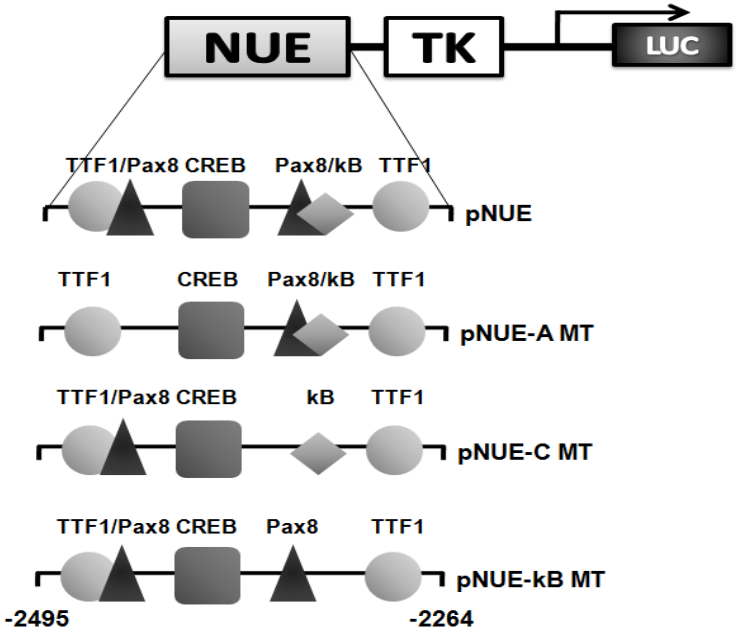
controle e iodo (NaI 10^{-3} M, por 30 min, 1, 2, 12 e 24 h) após a confirmação da aderência das células nas placas.

Seguiu-se o ensaio de atividade de luciferase, usando-se um kit específico contendo luciferina (Promega), principal substrato desta enzima. Os resultados foram normalizados pelos níveis de atividade da β-galactosidase de cada poço, realizando-se ensaio com seu substrato, ONPG (Sigma) (Nicola et al., 2010).

2.4.2 Transfecção transitória da região enhancer de NIS (pNUE) e de mutantes desta região

Primeiramente, as células foram transfectadas com plasmídeos contendo a região *enhancer* do promotor de NIS, que é uma porção do promotor que contém sítios de ligação para os principais fatores transcricionais que controlam a expressão do gene da NIS (Costamagna et al., 2004; Endo et al., 1997; Ohno et al., 1999; Tong et al., 1997). Adicionalmente, para verificar se algum destes fatores de transcrição estaria envolvido nos eventos observados frente ao tratamento com excesso de iodeto, foram utilizados plasmídeos contendo mutações/deleções nos sítios específicos de ligação destes fatores no *enhancer* de NIS, conforme especificado na **Figura 10.**

Figura 10 – Desenho esquemático dos vetores pNUE e mutantes.



Desenho esquemático do vetor contendo a região *enhancer* completa de NIS (pNUE), e dos vetores contendo mutações/deleções de alguns sítios de ligação de alguns fatores de transcrição envolvidos na regulação da expressão de NIS, Pax8 (pNUE-A e pNUE-C MT) e p65 (pNUE-kB MT).
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

As células foram tratadas por 30 min, 1, 2, 12 e 24 h com iodeto de sódio (10^{-3} M), e os ensaios de atividade da luciferase e β-galactosidase foram realizados em cada um dos poços, utilizando-se os substratos destas enzimas, luciferina e ONPG, respectivamente.

2.4.3 Análise da expressão dos fatores transcricionais Pax8 e p65

Células PCCl3 foram divididas em grupo controle ou iodo, e neste caso tratadas com excesso de iodeto de sódio (10^{-3} M) por 30 min, 12 h e 24 h. O conteúdo protéico dos fatores transcricionais Pax8 e p65 foi avaliado por ensaios de *Western Blotting*, conforme descrito anteriormente, utilizando-se anticorpos primários específicos contra ambas as proteínas. A normalização foi feita pela análise densitométrica de bandas referentes ao conteúdo de proteína GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) de cada uma das amostras.

2.4.4 Fracionamento de proteínas citoplasmáticas e nucleares para determinação da localização subcelular dos fatores transcricionais Pax8 e p65

As células PCCl3 foram tratadas com iodeto de sódio por 30 min, 12 e 24 h. O grupo controle não recebeu este tratamento. As células de ambos os grupos foram homogeneizadas em tampão frio contendo HEPES 10 mM, KCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, EGTA 0,1 mM, DTT 1 mM, PMSF 0,5 mM. O lisado foi centrifugado e o sobrenadante coletado como fração citoplasmática de proteínas. O precipitado foi lavado com o mesmo tampão descrito acima e então novamente centrifugado, a 10.000 g por 3 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em tampão contendo HEPES 20 mM, NaCl 400 mM, EDTA 1mM, EGTA 1 mM, DTT 1 mM e PMSF 1 mM. As amostras foram homogeneizadas e novamente centrifugadas a 10.000 g por 5 min. O sobrenadante foi recuperado, contendo a fração de proteínas nucleares. Seguiu-se o protocolo de *Western Blotting,* utilizando-se anticorpos específicos para Pax8 e p65 (Santa Cruz).

2.4.5 Análise da localização subcelular dos fatores transcricionais Pax8 e p65 por imunofluorescência

Células PCCl3 foram cultivadas sobre lamínulas por 24 h, e então tratadas, ou não, com NaI por 30 min, 12 e 24 h. As células foram lavadas 3X com PBS/CM, fixadas com 2%

de paraformaldeído em PBS por 20 min em TA, e lavadas novamente com PBS/CM. Seguiu-se a permeabilização das células com 0,1% de Triton em PBS/CM contendo 0,2% BSA (PBS/CM/TB) por 10 min, a TA. Fez-se a incubação das células com anticorpos primários específicos para Pax8 e p65, diluídos em PBS/CM/TB, por 3 h, à TA. Após a incubação, as células foram lavadas e incubadas com anticorpos secundários conjugados a fluoróforos (FITC – verde e TRITC – vermelho) (Sigma). A disposição das proteínas Pax8 e p65 na célula, bem como sua expressão foram analisadas pela fluorescência emitida pelo anticorpo secundário, em microscópio de fluorescência.

2.4.6 Ensaio de imunoprecipitação da cromatina (ChIP Assay)

Estes ensaios foram realizados para avaliar a taxa de ligação dos fatores transcricionais Pax8 e p65 à região promotora de NIS.

Resumidamente, as células foram fixadas com formaldeído 1% e a reação foi finalizada pela adição de glicina 125 mM. As células foram lavadas com PBS 1X frio e removidas das placas com o auxílio de um rodinho. Seguiu-se a centrifugação a 3.000 g durante 3 min. O sobrenadante foi aspirado e o precipitado, mantido em gelo, até ser reconstituído em tampão apropriado, e homogeneizado com o auxílio de uma pipeta. As amostras foram novamente centrifugadas, e o precipitado, que contém os núcleos foi reconstituído em novo tampão de lise. O lisado foi sonicado, centrifugado e transferido para um novo tubo.

Seguiu-se o estágio de *preclear*, onde as amostras foram incubadas com DNA de esperma de salmão (Sigma) e proteína A-G sepharose (Santa Cruz). As amostras foram centrifugadas, e o sobrenadante recuperado. Os anticorpos para Pax8 e p65 foram adicionados às amostras, que foram então submetidas à agitação e rotação contínua.

Posteriormente, agregou-se DNA de esperma de salmão e proteína A-G sepharose às amostras, e manteve-se a agitação e rotação por 1-4 h, a 4 ºC. As amostras foram então lavadas, e o DNA foi purificado.

O DNA obtido em cada amostra foi utilizado em ensaios de *Real-Time PCR* para avaliação da quantidade de DNA de promotor de NIS que se encontrava associado ao fator de transcrição em questão (Pax8 ou p65), após o tratamento das células com NaI (10^{-3} M).

2.5 Avaliação do efeito do iodo na organização do citoesqueleto dos tireócitos

2.5.1 Avaliação do conteúdo total de actina e da expressão da actina polimerizada e não polimerizada

Este procedimento foi desenvolvido a partir de uma readaptação do protocolo de Haller et al. (2004), com o objetivo de se avaliar o efeito do excesso de iodo no arranjo do citoesqueleto de células tireoidianas. O citoesqueleto desempenha uma série de funções relacionadas com a secreção de hormônios, movimentação de proteínas nos diferentes compartimentos celulares, e finalmente, regulação da estabilidade e eficiência da tradução de transcritos. Por este motivo, tornou-se interessante avaliar a participação deste arcabouço celular nos eventos desencadeados pelo excesso de iodeto.

Parta tanto, células PCCl3 controle ou tratadas por 30 min e 12 h com NaI (10^{-3} M) foram homogeneizadas em tampão contendo: 50 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 0,5% de Triton X-100 e 20 mM de HEPES (pH 7,9), em um volume final de 400 µl, com a finalidade de avaliar o conteúdo total de actina presente nas amostras, por *Western Blotting*.

Em uma segunda leva de experimentos, o propósito foi avaliar a organização da proteína actina em monômeros globulares ou em filamentos. Utilizou-se o mesmo tampão descrito anteriormente, ao qual foi acrescentado faloidina (132 nM), um estabilizador de microfilamentos que preserva a actina polimerizada. As células foram homogeneizadas neste tampão e o homogeneizado foi mantido em gelo por 10 min e, então, submetido à ultracentrifugação a 100.000 g por 30 min a 4 °C, ao final da qual, o sobrenadante (fração correspondente à actina monomérica) foi separado e colocado em um tubo *eppendorf* devidamente identificado. O precipitado (actina polimerizada em filamentos), por sua vez, foi ressuspendido em 100 µl de tampão de homogeneização sem faloidina, e lisado por sonicação (Sonics & Materials Inc, Newtown, CT). A solução resultante foi transferida para outro tubo *eppendorf*. As amostras foram quantificadas e 40 µg de proteínas, tanto da fração do sobrenadante quanto da fração do precipitado foram aliquotadas e submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE 10%. Seguiu-se a incubação das membranas com a solução de bloqueio e os anticorpos primário (contra β-actina) e secundário (anti-camundongo). A normalização da análise do conteúdo de proteína β-actina foi feita a partir da análise densitométrica do conteúdo de proteína α-actinina (proteína constitutiva) em cada uma das amostras.

2.5.2 Avaliação da organização do citoesqueleto de actina por ensaios de imunocitoquímica

As células PCCl3 foram plaqueadas em placas de 6 poços e cultivadas sobre lamínulas de vidro. Após o tratamento das células por 30 min e 12 h com iodeto de sódio, as mesmas foram lavadas 3X com PBS/CM (PBS contendo $CaCl_2$ 0,1 mM e $MgCl_2$ 1 mM) e fixadas com 2% de paraformaldeído em PBS por 20 min. As células foram lavadas mais duas vezes com PBS/CM. Para marcação da actina polimerizada as células foram incubadas com faloidina-rodamina (1:40), no escuro, por 1 h. As lâminas foram montadas com glicerol-carbonato e analisadas em microscópio confocal Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). O painel de imagens foi montado com o software *Adobe Photoshop CS4*.

2.5.3 Avaliação do conteúdo total de eEF1α e da taxa de ligação deste fator com o citoesqueleto

O eEF1α é um fator de alongamento da cadeia polipeptídica, mas também ancora transcritos ao citoesqueleto, protegendo-os da ação de RNAses. O conteúdo deste fator foi determinado tanto na fração correspondente à actina polimerizada quanto na de actina não polimerizada. O método usado para investigar a ligação entre o eEF1α e o citoesqueleto foi o mesmo utilizado para obtenção duas frações de actina, desta maneira, o protocolo de extração não sofreu nenhuma alteração em relação ao protocolo utilizado para a β-actina.

Após a submissão das amostras à eletroforese, seguiu-se a eletrotransferência, bloqueio da membrana com leite desnatado e incubação com anti-eEF1α (1:1000), produzido em camundongo. Um anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com peroxidase (anticorpo secundário) foi utilizado, e obteve-se um sinal da reação a partir do tratamento das membranas com ECL. A quantificação do conteúdo de eEF1α foi realizada por análise densitométrica, conforme descrito no tópico anterior. Os dados desta expressão também foram normalizados a partir da análise densitométrica de bandas referentes ao conteúdo da proteína constitutiva α-actinina.

2.5.4 Avaliação do conteúdo de mRNA de NIS ligado ao citoesqueleto

O ensaio seguiu os mesmos padrões descritos nos tópicos anteriores até o momento da separação das frações sobrenadante e precipitado, em tubos *eppendorfs* diferentes. Após o

fracionamento, fez-se a extração do RNA total presente na fração de actina polimerizada (precipitado), a partir da utilização de Trizol, conforme descrito anteriormente. A análise da expressão de NIS foi realizada a partir da técnica de *Real-Time PCR*, também já descrita em tópicos anteriores.

2.6 Avaliação do efeito do iodo no conteúdo total, localização subcelular e função de NIS

2.6.1 Análise do conteúdo total de NIS

As células PCCl3 dos grupos controle e iodo – tratadas com NaI 10^{-3} M por 30 min, 1, 2, 12 e 24 h – foram homogeneizadas e lisadas em tampão RIPA (Tris 20 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM, Nonidet P-40 1%; deoxicolato de sódio 0,5%; EDTA 1 mM e SDS 0,1%) e inibidor de proteases a 10%. Após a quantificação da concentração de proteínas do homogeneizado, utilizando-se o método de Bradford, 30 μg de cada amostra foram plotados em gel SDS-PAGE 10%. Posteriormente foi feita a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose. A mesma foi bloqueada com leite desnatado (5%) diluído em PBS-Tween (PBST) a temperatura ambiente (TA) por 1 h. Seguiu-se a incubação da membrana com anticorpo policlonal anti-NIS (gentilmente cedido pela Dra. Nancy Carrasco, Yale University, USA) e GAPDH/α-tubulina (para normalização). Ao final da incubação, a membrana foi lavada com PBST, em TA, e incubada com anticorpo secundário (conjugado com peroxidase) por 1 h a TA, e lavada 3X, por 10 min, com PBST. A membrana foi tratada com reagentes quimioluminescentes (ECL) e então exposta a um filme auto-radiográfico, cuja análise densitométrica foi realizada por meio do software Image J (*National Institutes of Health*, USA).

2.6.2 Análise do conteúdo de NIS na membrana plasmática

O conteúdo de NIS presente na membrana plasmática dos tireócitos foi avaliado por ensaios de biotinilação de membrana. As células dos grupos controle e iodo foram lavadas duas vezes com PBS-CM, e então incubadas com Sulfo-NHS-SS-Biotin (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA) (1mg/ml) por 20 min. As células foram então lisadas em tampão de lise contendo inibidores de proteases. O lisado foi transferido para tubo *eppendorf* e centrifugado a 10.000 g por 5 min. A concentração de proteínas foi determinada e 200 μg de proteínas totais foram incubadas *overnight* com *beads* de Streptavidina-Agarose (Thermo

Fisher Scientific), a 4 ºC, em rotação permanente. Fez-se então, uma rápida centrifugação das amostras, e a fração sobrenadante foi removida. As *beads* foram lavadas com tampões específicos e depois, reconstituídas em 100 µl de loading buffer. As amostras foram aquecidas a 70-80 ºC por 5 min, esfriadas em gelo por 10 min e centrifugadas a 10.000 g durante 2-3 min. A fração sobrenadante foi recuperada e rotulada como fração de proteínas de membrana. Seguiram-se os processos de *Western blotting*, incubação com anticorpos (primário e secundário) e análise densitométrica, conforme descrito anteriormente.

2.6.3 Imunocitoquímica

As células PCCl3 cresceram sobre lamínulas por 48 h. As células dos grupos controle e iodo – tratadas por 30 min, 1, 2, 12 e 24 h, com iodeto de sódio (10^{-3} M) – foram lavadas três vezes com PBS/CM e fixadas com 2% de paraformaldeído em PBS por 20 min em TA . Seguiu-se a permeabilização das células com 0,1% de Triton em PBS/CM contendo 0,2% BSA (PBS/CM/TB) por 10 min, a TA. As lamínulas foram então incubadas com anticorpo anti-NIS (1:2000), diluído em PBS/CM/TB, por 1 h, a TA. Após a incubação, as células foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário anti-coelho conjugado ao FITC (Sigma). As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência e o painel de imagens criado com o software *Adobe Photoshop CS4*.

2.6.4 Ensaios de captação de iodeto

Os estudos de transporte de iodeto em células PCCl3 intactas foram realizados quando as mesmas atingiram 80% de confluência em placas de 24 poços. Os poços foram divididos nos grupos controle e iodo (células tratadas com NaI 10^{-3} M por 30 min, 2, 12 e 24 h). Após os tratamentos, o meio de cultura foi aspirado, e as células lavadas dez vezes com 0,5 ml de solução de Hanks. Seguiu-se a incubação das mesmas com solução de Hanks contendo 20 µM de ^{125}I (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) por 45 min a 37 ºC em atmosfera umidificada, 5% de CO_2. As reações foram interrompidas por aspiração da solução radioativa, e lavagem das células, por duas vezes, com solução de Hanks gelada. O conteúdo intracelular de ^{125}I foi avaliado por meio da sua quantificação em contador gama, após permeabilização das células com 500 µl de etanol 95% gelado por 30 min.

Para normalização dos dados adicionou-se 500 µl de ácido tricloroacético (TCA) 5% por 20 min, à temperatura ambiente, e determinou-se a quantidade de DNA presente em cada poço da placa utilizando-se o reagente DPA (reação de Burton) (Sigma).

2.6.5 Avaliação da via de internalização da proteína NIS

Para avaliar o envolvimento da via de internalização por clatrina, as células tireoidianas foram tratadas com um inibidor específico desse processo, a clorpromazina (20 µM), e então submetidas ao tratamento com doses excessivas de iodeto, por 30 min. As células controle deste estudo foram tratadas apenas com clorpromazina. A clorpromazina é uma droga que impede a formação de membranas endossomais e, ao mesmo tempo, previne a formação de uma depressão revestida por moléculas de clatrina na membrana plasmática (Ivanov, 2008; Wang et al., 1993).

Além disso, também foi investigado se a via de internalização por caveolinas estaria envolvida nos eventos estudados. Para tanto, as células foram tratadas apenas com nistatina (5 µM) por 1 h, ou submetidas ao tratamento subsequente de nistatina por 1 h e NaI por 30 min. A nistatina é um antifúngico conhecido por desorganizar estruturas contendo colesterol. A relação entre colesterol e caveolinas é amplamente descrita na literatura. Rothberg et al. (1992) foi o primeiro a reconhecer a importância do balanço do colesterol celular e a formação da estrutura caveolar. A nistatina é capaz de se ligar às moléculas de colesterol, resultando no achatamento das cavéolas e na ruptura do revestimento da membrana por caveolinas.

O conteúdo de NIS na membrana plasmática e sua função foram avaliados por ensaios de biotinilação de membrana e captação de iodeto radioativo, respectivamente.

2.6.6 Análise da meia-vida da proteína NIS

Para verificar se o tratamento com excesso de iodeto aumenta a degradação de NIS e o *turnover* desta proteína, afetando sua meia-vida, as células PCCl3 foram tratadas com ciclohexamida (CHX) (Sigma), droga que inibe o processo de tradução.

Células PCCl3 foram tratadas por 24 h com iodeto de sódio (10^{-3} M) e posteriormente, com CHX (10 µg/ml) pelo período de 3, 6, 9 e 12 h (Veléz et al., 2006). As proteínas totais foram extraídas com tampão de lise específico. As amostras foram submetidas ao ensaio de *Western Blotting,* conforme descrito anteriormente.

2.6.7 Avaliação da via de degradação de NIS

Atualmente são descritas duas vias principais de degradação de proteínas de membrana: a lisossomal e a proteassomal. Para determinar por qual via NIS é degradada, e se o iodeto em excesso seria capaz de ativar este processo foram utilizados inibidores específicos.

Para analisar a via de degradação lisossomal, as células foram incubadas com cloroquina (50 μM) (Sigma) e/ou bafilomicina (100 nM) (Sigma) na presença/ausência de NaI, por 30 min e 24 h. A cloroquina é uma droga que se acumula nos lisossomos de células de mamíferos (De Duve et al., 1974) interferindo com as funções desta organela por aumentar o pH dentro dos lisossomos (Ohkuma, Poole, 1978) e inibir as hidrolases lisossomais (Matsuzawa, Mostetler, 1980). Além disso, alguns trabalhos indicam que este inibidor é responsável por um aumento do volume dos lisossomos, causando seu rompimento (Michihara et al., 2005). Já a bafilomicina é um inibidor da bomba de prótons que acidifica os lisossomos, e inibe a fusão de autofagolisossomos com lisossomos (Yamamoto et al., 1998).

Para investigar o envolvimento da via de degradação proteassomal, foi utilizado o inibidor Z-leu-leu-leu-al (5 μM) (Sigma). As células foram incubadas com este inibidor na presença ou ausência de NaI, por 30 min e 24 h. O Z-leu-leu-leu-al se liga à subunidade proteassomal catalítica 20S através da subunidade proteassomal MB1, impedindo seus efeitos (Fenteany et al., 1995, Goldberg et al., 1995).

Após os tratamentos, foram realizados ensaios de *Western Blotting* para avaliar o conteúdo total de NIS, e ensaios de captação de iodo radioativo, para avaliação da função desta proteína.

2.6.8 Análise da meia-vida da proteína NIS frente ao excesso de iodeto e inibidores da degradação protéica

Células PCCl3 foram tratadas com cloroquina (50 μM), bafilomicina (100 nM), NaI (10^{-3} M), NaI (10^{-3} M)+cloroquina (50 μM) ou NaI (10^{-3} M)+bafilomicina (100 nM). Após 24 h de tratamento, as células foram submetidas ao tratamento com CHX (10 μg/μl) pelo período de 3, 6, 8, 10 e 12 h. As proteínas celulares foram extraídas com tampão RIPA e as amostras foram submetidas ao ensaio de *Western Blotting,* descrito anteriormente.

2.7 Avaliação do efeito do iodo na via da sinalização PI3K-Akt

2.7.1 Avaliação da fosforilação de Akt pelo excesso de iodeto

Células PCCl3 foram cultivadas em placas de 6 poços, e divididas em grupo controle ou iodo, e neste caso tratadas por 15 min, 30 min e 1 h com NaI 10^{-3} M. Para garantir a especificidade do ensaio, alguns poços foram tratados com NaI e o inibidor da fosforilação de Akt (AKTi1/2, 10 µM, Sigma). Após o tratamento, as células foram homogeneizadas em tampão específico contendo inibidores de proteases e fosfatases. Posteriormente, as amostras foram sonicadas e submetidas ao ensaio de *Western Blotting*, descrito anteriormente.

Para verificar se a ativação de Akt depende da ativação *upstream* de PI3K, as células foram tratadas por 1 h com Wortmanina (1 µM) ou LY294002 (10 µM) (Sigma), e posteriormente, tratadas ou não com NaI por 30 min.

2.7.2 Dosagem de ROS e seu papel na ativação da via de sinalização PI3K-Akt pelo excesso de iodeto

Células PCCl3 foram cultivadas em placas de 12 poços e quando atingiram 80% de confluência, foram incubadas com meio HAM-F12 suplementado com hormônios, soro e 5 µM dihidroetidina (DHE) por 10 min, a 37 ^{o}C. A DHE não é uma molécula fluorescente, mas ao ser oxidada emite fluorescência na região do filtro rodamina, principalmente pela formação dos compostos etídio e 2-hidroxietídio, e por este motivo é um composto amplamente utilizado em ensaios de microscopia de fluorescência (Bindokas et al., 1996).

Seguiu-se o tratamento das células do grupo iodo por 15 min, 30 min e 1 h com iodeto de sódio (10^{-3} M). A produção de superóxido ($O_2^{\bullet -}$) foi avaliada pela mensuração da intensidade da fluorescência emitida pelas células, utilizando-se o microscópio de fluorescência ZEISS Axiovert 100 M (Carl Zeiss) e o software *Image-Pro Plus* (Zuo et al., 2000; Zuo et al., 2004).

Estudos adicionais foram realizados, utilizando células PCCl3 previamente tratadas, por 30 min, com a enzima superóxido dismutase-polietileno glicol (SOD-peg – 100 U/ml), que catalisa a dismutação de superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio. As células foram então tratadas com DHE e iodeto de sódio, conforme descrito anteriormente.

Para avaliar o papel da produção das espécies reativas de oxigênio na fosforilação de Akt, as células foram tratadas por uma hora com *N*-acetil-cisteína (1 mM), um antioxidante

inespecífico (Cotgreave, 1997), ou com Ebselen (30 μM), um mimético da glutationa peroxidase (GPx) (Sies, 1993). Após estas incubações, as células do grupo iodo foram tratadas por 30 min com iodeto de sódio, e a fosforilação de Akt foi avaliada por *Western Blotting*.

2.7.3 Avaliação da inibição da atividade da via PI3K-Akt e suas conseqüências sobre a expressão e função de NIS frente ao excesso de iodeto

Para verificar se a inibição da via PI3K/Akt reflete em alguma alteração no efeito inibitório do iodeto sobre a expressão/função de NIS, inibidores da ativação de Akt (Akti1/2; 10 μM) e de PI3K (Wortmanina; 1 μM) foram utilizados. As células PCCl3 foram tratadas por 1 h com os inibidores, e então tratadas ou não com NaI, por 30 min. A expressão do mRNA de NIS, o conteúdo de NIS na membrana plasmática e a função desta proteína na captação de iodeto foram avaliados através de ensaios de *Real-Time PCR,* biotinilação de superfície e captação de iodo radioativo, respectivamente.

2.7.4 Análise Estatística

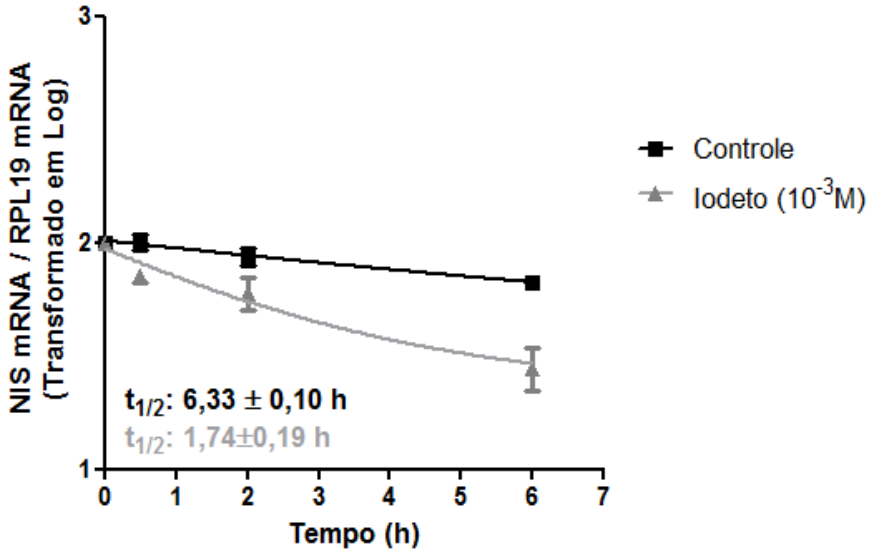
Os dados numéricos foram expressos como média ± erro padrão da média (x ± SEM) dos valores obtidos em cada experimento, e comparados através do uso do *UNPAIRED t TEST*. A análise de variância de uma via (one-way ANOVA) seguida do pós-teste Student–Newman–Keuls, também foi utilizada, bem como a análise de variância de duas vias (two-way ANOVA), quando necessário. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software *Prism Graph Pad – Version: 5.0*. A significância estatística foi definida para valores de $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Avaliação da meia-vida (t1/2) do mRNA da NIS frente ao excesso de iodo

A partir dos resultados obtidos pelo *Real-Time PCR,* foram construídas curvas de decaimento do mRNA de NIS de células tratadas e não tratadas com iodeto de sódio. De acordo com a análise destas curvas, observou-se que o tratamento com iodeto de sódio na dose de 10^{-3} M levou a um decaimento muito mais acelerado do mRNA de NIS ($t_{1/2}$: 1,74±0,19 h), do que aquele observado nas células controle ($t_{1/2}$: 6,33±0,10 h) (**Figura 11**).

Figura 11 – Decaimento do mRNA de NIS frente ao excesso de iodeto.



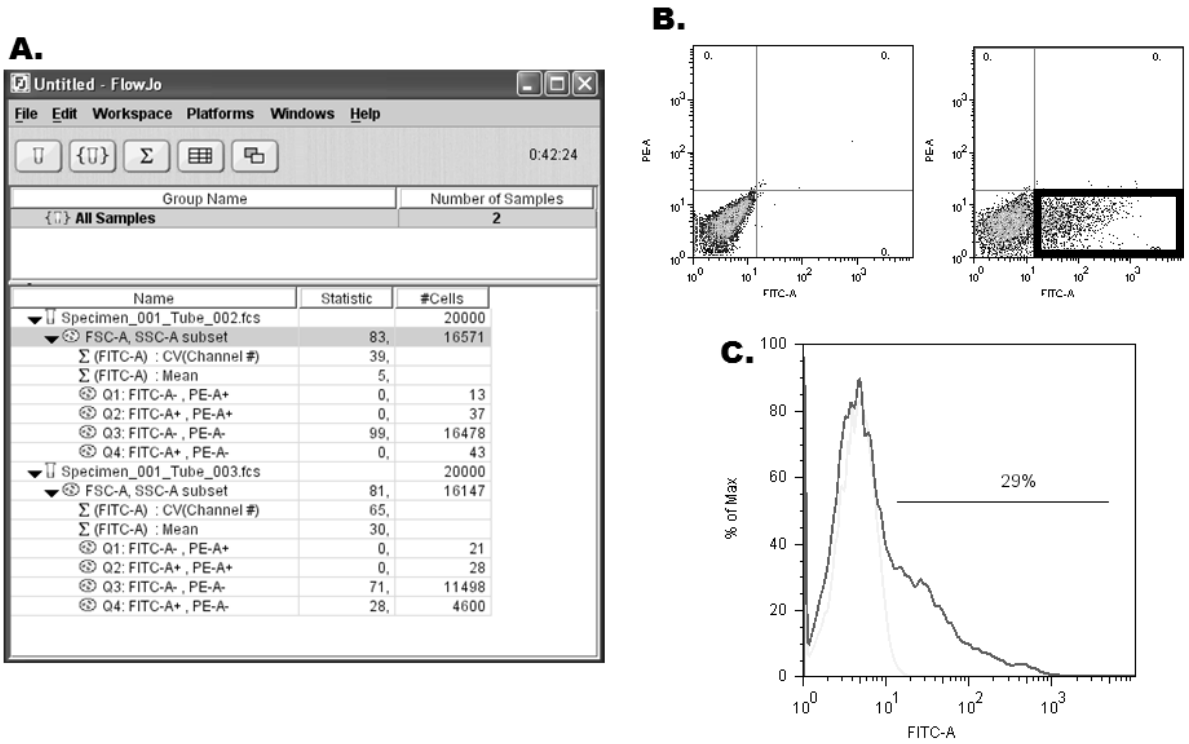
A meia-vida do transcrito de NIS foi estabelecida em células PCCl3 tratadas (linha cinza) e não tratadas (linha preta) com excesso de iodeto (10^{-3} M), após tratamento prévio por 1 h com actinomicina D. Os resultados estão expressos como média ± SEM de três experimentos independentes; n=8 para ambos os grupos, em cada período de tempo estudado.
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

3.2 Avaliação da responsividade da região 3'UTR do mRNA de NIS ao excesso de iodo

3.2.1 Células eGFP e eGFP-UTR

Após a transfecção permanente e o procedimento de seleção, as células eGFP e eGFP-3'UTR foram submetidas à análise por citometria de fluxo. Conforme esperado, foi possível observar células positivamente marcadas em ambas as linhagens celulares, confirmando a eficiência dos protocolos adotados. As células que não foram transfectadas não apresentaram marcação positiva. (**Figura 12**).

Figura 12 – Representação esquemática da análise, por citometria de fluxo, das células transfectadas com plasmídeos peGFP-C2 e selecionadas com antibiótico G418.

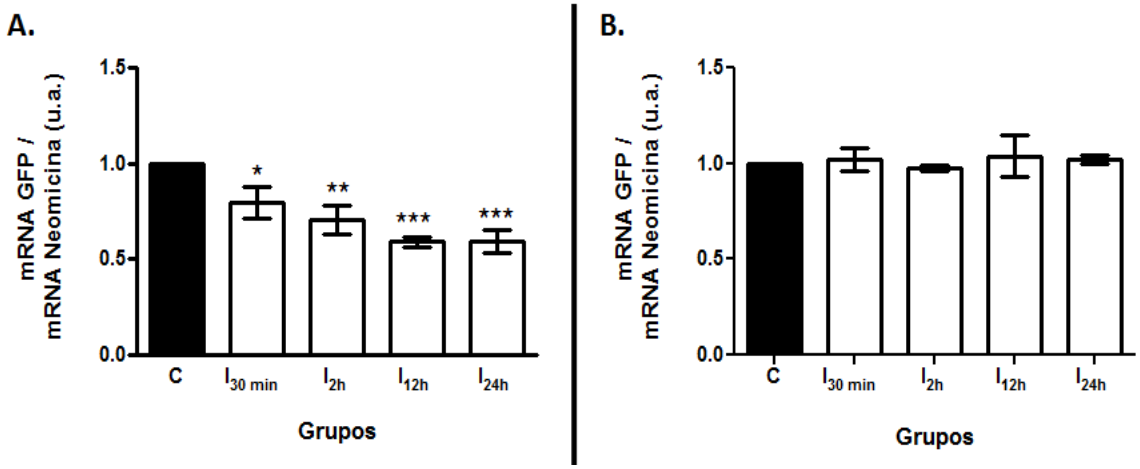


Células eGFP, eGFP-3'UTR e células não transfectadas foram fixadas com paraformaldeído 2%, e preparadas para análise por citometria de fluxo, através do equipamento *FACSCalibur Flow Cytometer*. *A)* Interface do *software* utilizado para a análise das linhagens de células transfectadas com plasmídeos peGFP-C2 (*Speciment_001_Tube_003*) e células não transfectadas (*Speciment_001_Tube_002*). *B)* Painéis de *Dot Plot* obtidos a partir da análise da fluorescência verde das células não transfectadas (*painel da esquerda*) e células transfectadas com plasmídeos peGFP-C2 (*painel da direita*). Células transfectadas com plasmídeos peGFP-C2 apresentam fluorescência detectável, por expressarem eGFP, e as células positivas encontram-se no quadrante em destaque; *C.* Histograma representativo para determinação da porcentagem de células positivas para eGFP na linhagem de células transfectadas com plasmídeos peGFP-C2 (linha preta) em relação às células não transfectadas (linha cinza).
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

3.2.2 Avaliação da expressão de eGFP frente ao tratamento com excesso de iodeto

A região 3'UTR do mRNA de NIS é responsiva ao iodo, uma vez que *células eGFP-3'UTR* tratadas com excesso de iodeto apresentaram reduzida expressão do mRNA de eGFP (**Figura 13A**), enquanto que *células eGFP* não apresentaram qualquer modificação no conteúdo deste transcrito após serem submetidas ao mesmo tratamento (**Figura 13B**).

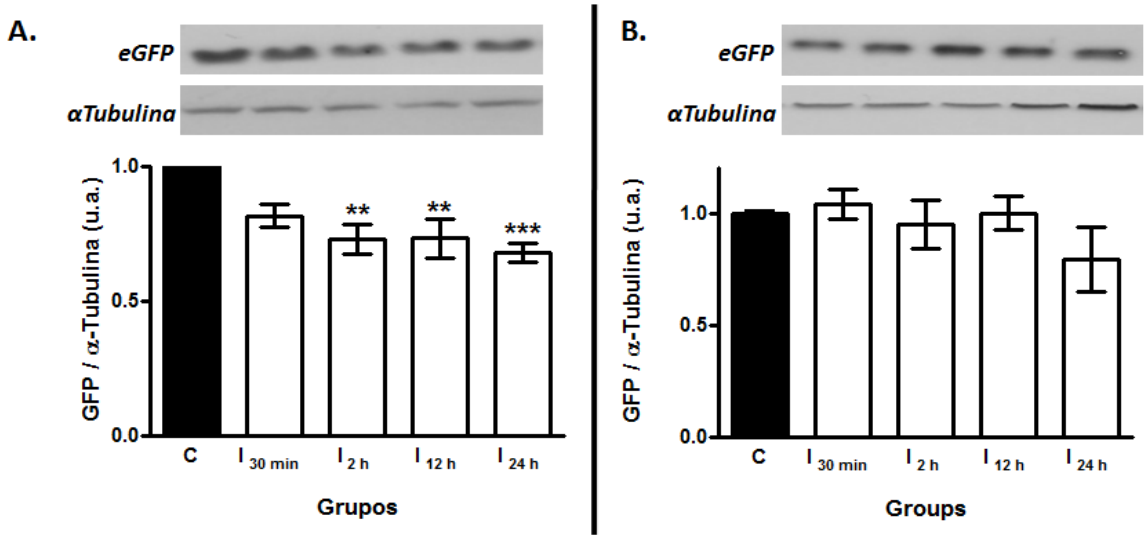
Figura 13 – Efeito do excesso de iodeto sobre a expressão do mRNA de eGFP em células eGFP-3'UTR e células eGFP.



Representação gráfica dos valores obtidos a partir da análise da expressão de eGFP e Neomicina em céluls eGFP-3'UTR (A) e células eGFP (B), por *Real-Time PCR*. Os resultados estão expressos como média ± SEM de dois experimentos independentes em unidades arbitrárias; n=6 em cada grupo. * p < 0,05; ** p < 0,01; p < 0,001 vs C. *One-way analysis of variance.*
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

Resultados similares foram observados na avaliação da expressão proteica de eGFP. *Células eGFP-3'UTR* apresentaram redução no conteúdo total da proteína eGFP após o tratamento com NaI (**Figura 14A**), enquanto que nenhuma modificação significativa foi observada em *células eGFP* submetidas ao mesmo tratamento (**Figura 14B**).

Figura 14 – Efeito do excesso de iodeto sobre a expressão proteica de eGFP em células eGFP-3'UTR e células eGFP.

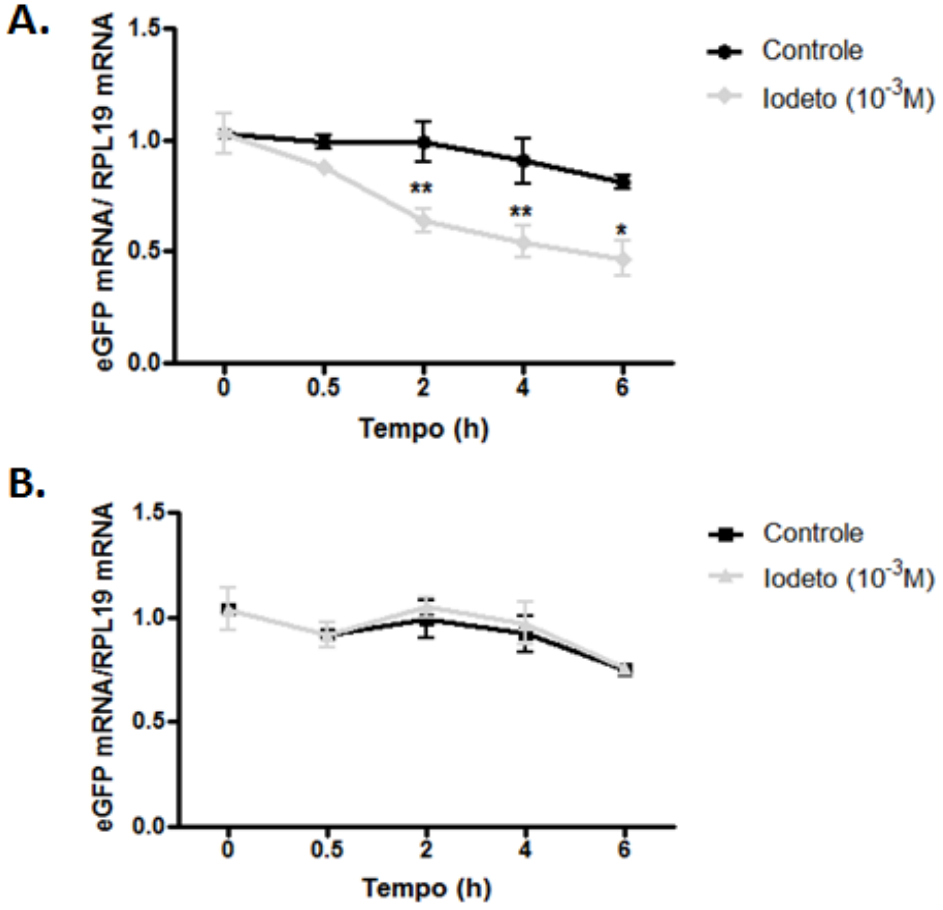


Representação gráfica dos valores obtidos na análise densitométrica das bandas referentes expressão de eGFP e α-tubulina, em células eGFP-3'UTR (A) e células eGFP (B), a partir de ensaios de *Western Blotting*. Os imunoblots referentes ao conteúdo de eGFP e α-tubulina (normalizador) de cada grupo estão representados acima do gráfico. Os resultados estão expressos como média ± SEM de três experimentos independentes em unidades arbitrárias; n=6 em cada grupo.** p<0,01; *** p<0,001 vs C. *One-way analysis of variance.*
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

3.2.3 Avaliação da meia-vida do mRNA de eGFP frente ao tratamento com excesso de iodeto

Quando as *células eGFP-3'UTR* foram tratadas com actinomicina D e posteriormente com iodeto de sódio houve redução significativa na meia-vida do mRNA de eGFP ($t_{1/2}$: 2 h) em relação ao grupo controle ($t_{1/2}$: 7,5 h) (**Figura 15A**). Por outro lado, quando as *células eGFP* foram submetidas ao mesmo tratamento, não apresentaram alteração significativa no decaimento do transcrito de eGFP ($t_{1/2}$: 8,5 h), em relação ao grupo controle ($t_{1/2}$: 9 h) (**Figura 15B**).

Figura 15 – Decaimento do mRNA de eGFP frente ao excesso de iodeto.

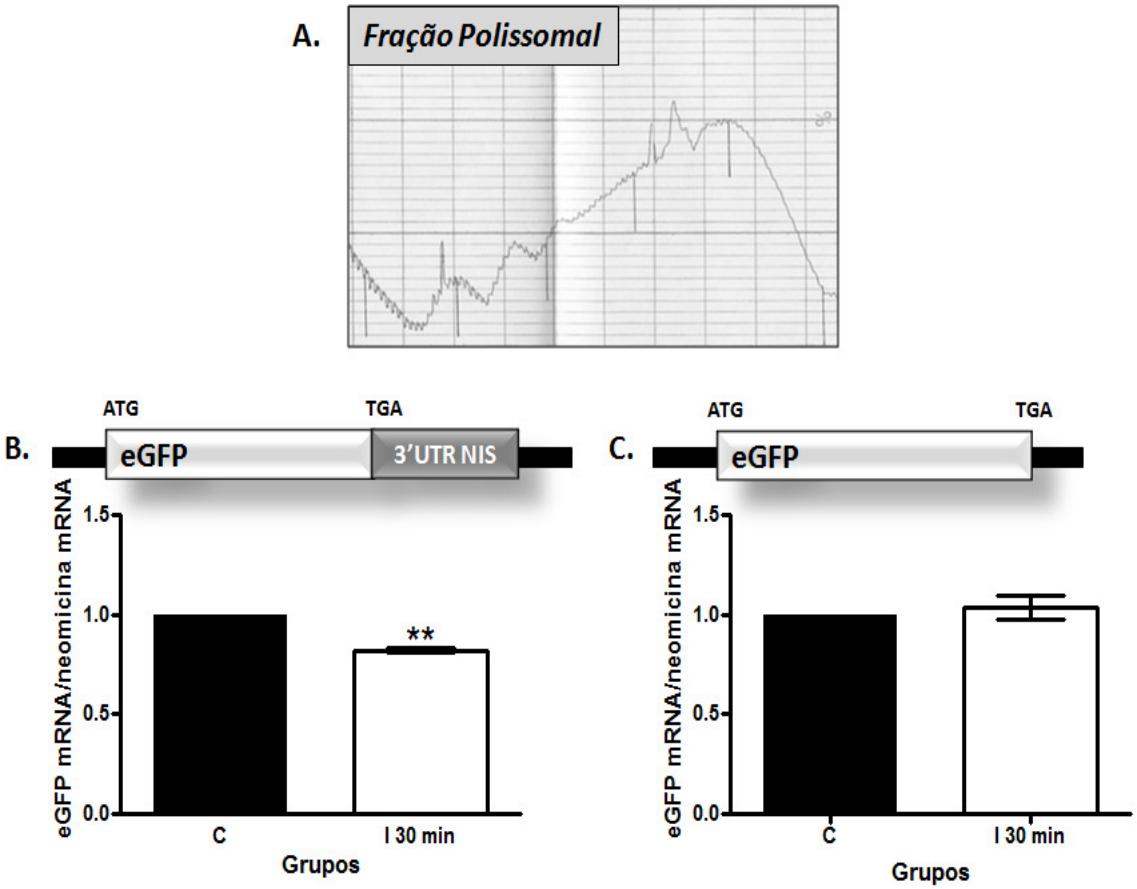


Curva de decaimento do mRNA de eGFP de células eGFP-3'UTR (A) ou eGFP (B), tratadas (linha cinza) ou não tratadas (linha preta) com excesso de iodeto (10^{-3} M), após tratamento prévio por 1 h com actinomicina D; n=6 para ambos os grupos, em cada um dos períodos de tempo estudados. Os resultados estão expressos como média ± SEM de dois experimentos independentes em unidades arbitrárias; n=6 em cada um dos grupos. * P< 0.05; ** P< 0.01 vs. C0 h. *Two-way analysis of variance.*
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

3.2.4 Avaliação da taxa de tradução do mRNA de eGFP frente ao tratamento com excesso de iodeto

A partir do ensaio de perfil polissomal foi possível analisar a quantidade de mRNA de eGFP associada a ribossomos **(Figura 16A)**, um indicativo da taxa tradução deste transcrito. De acordo com os resultados obtidos, observou-se menor conteúdo de mRNA de eGFP associado a ribossomos em *células eGFP-3'UTR* tratadas com excesso de iodeto por 30 min, em comparação ao grupo controle (**Figura 16B**). Este efeito não foi observado em *células eGFP* submetidas ao mesmo tratamento, que apresentaram semelhante conteúdo de mRNA de eGFP associado aos ribossomos nos grupos controle e iodo (**Figura 16C**).

Figura 16 – Perfil polissomal de células eGFP-3'UTR e células eGFP.

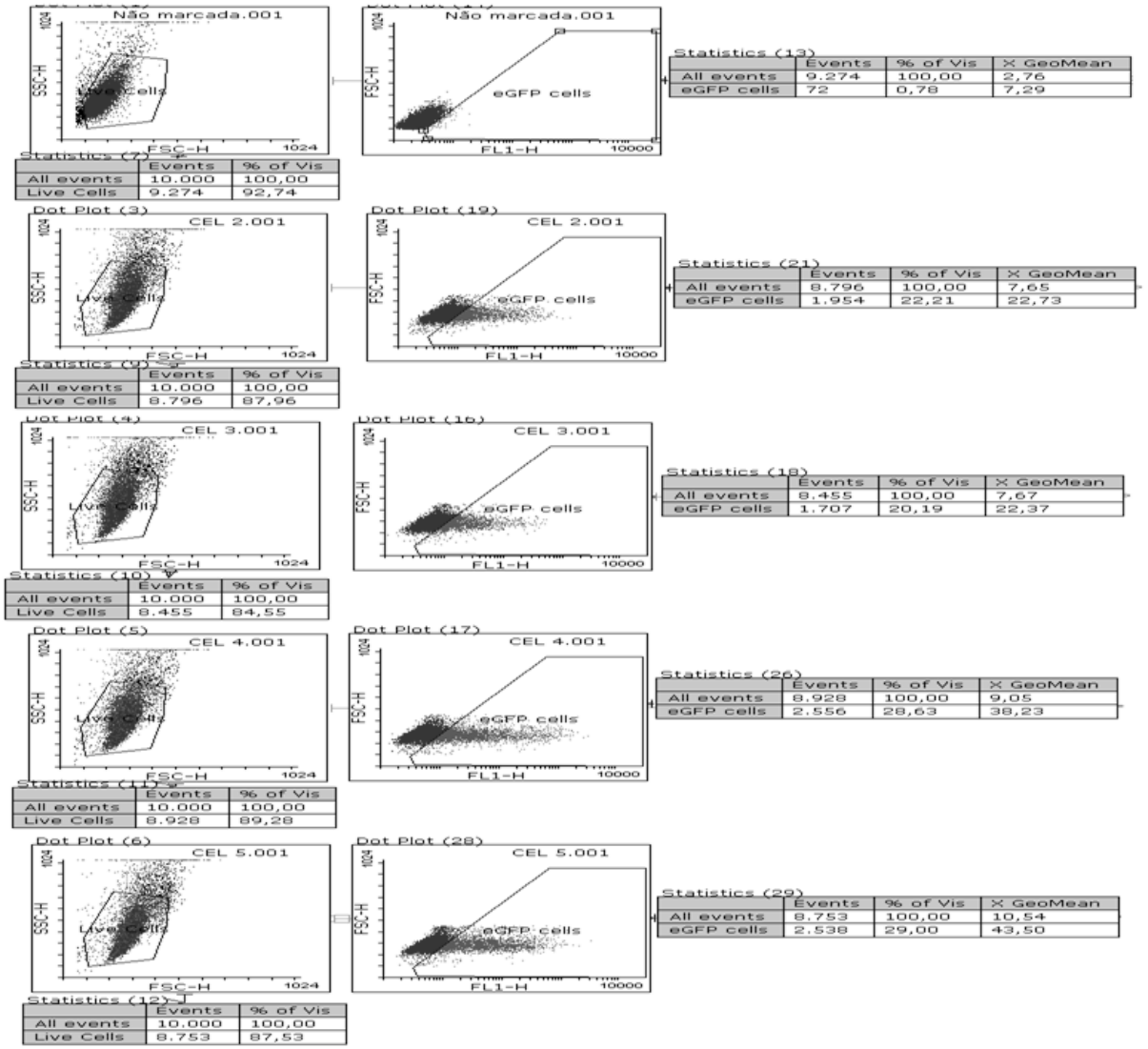


Representação gráfica dos resultados obtidos em ensaios de perfil polissomal de eGFP-3'UTR (B) e células eGFP (C) tratadas (colunas brancas) ou não tratadas (colunas pretas) com iodeto de sódio 10^{-3} M, por 30 min. O esquema gráfico da porção dos ribossomos associados aos mRNAs é representado pela figura A. Foram realizados três experimentos independentes, utilizando-se 10 garrafas por n, em cada grupo experimental. Os resultados estão expressos como média ± SEM. ** P< 0.01 *vs.* C. *Unpaired t test.*
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

3.2.5 Identificação da porção da região 3' não traduzível do mRNA de NIS responsiva ao excesso de iodeto

A eficiência de transfecção dos novos plasmídeos gerados com porções de diferentes tamanhos da região 3' UTR do mRNA de NIS foi confirmada por ensaios de citometria de fluxo (**Figura 17**).

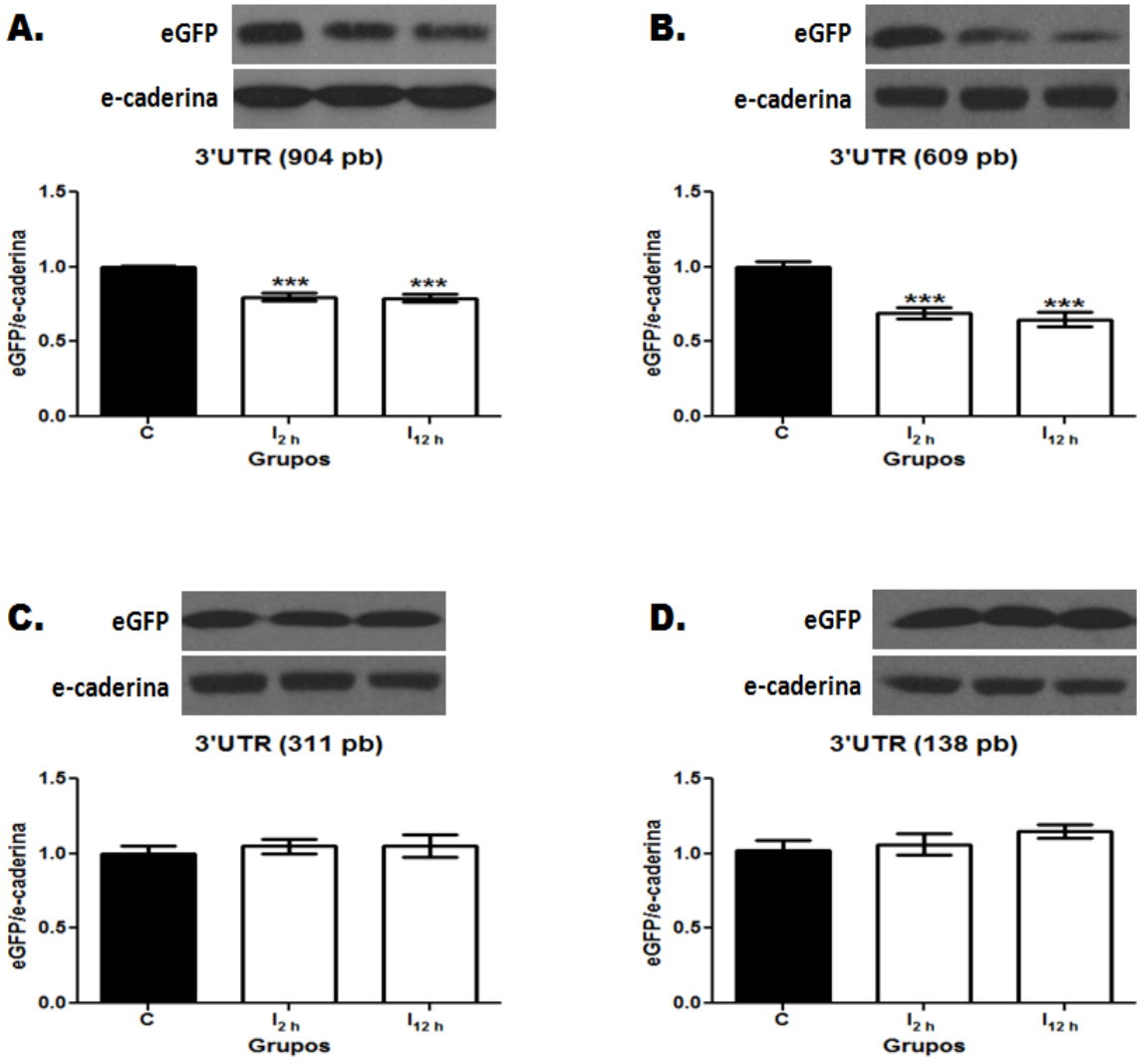
Figura 17 – Análise da expressão de eGFP em células transfectadas com vetores peGFP-C2 contendo diferentes porções da região 3'UTR do mRNA de NIS.



Nos painéis à *esquerda* encontram-se as análises por *Dot Plot* das células viáveis em cada uma das linhagens. Abaixo destes painéis estão descritas as porcentagens de células viáveis *(Live cells*). Nos painéis *à direita* encontram-se as análises para determinação do número de células positivas para eGFP (*eGFP cells*), ou seja, que foram efetivamente transfectadas com os plasmídeos utilizados. Não marcada: células não transfectadas; Cél 2.: células PCCl3 transfectadas com peGFP-C2 e a região 3'UTR completa (904 pb) do mRNA de NIS; Cél 3.: células transfectadas com peGFP-C2 contendo 609 pb da região 3'UTR do mRNA de NIS; Cél 4.: células transfectadas com peGFP-C2 contendo 311 pb da região 3'UTR do mRNA de NIS; Cél 5.: células transfectadas com peGFP-C2 contendo 138 pb da região 3'UTR do mRNA de NIS.
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

Após a geração das linhagens, as células foram tratadas com NaI (10^{-3} M) por 2 h e 12 h. Observou-se que, após o tratamento houve redução significativa da expressão proteica de eGFP, em ambos os períodos estudados, em células transfectadas com o plasmídeo peGFP-C2 contendo os fragmentos de 904 (**Figura 18A**) e 609 pb (**Figura 18B**) da região 3' não traduzível do mRNA de NIS. As células transfectadas com os plasmídeos contendo os fragmentos de 311 (**Figura 18C**) e 138 pb (**Figura 18D**) não apresentaram variação na expressão de eGFP após o tratamento com NaI.

Figura 18 – Efeito do excesso de iodeto sobre a expressão protéica de eGFP em células transfectadas com plasmídeos contendo porções da região 3' não traduzível do mRNA de NIS.

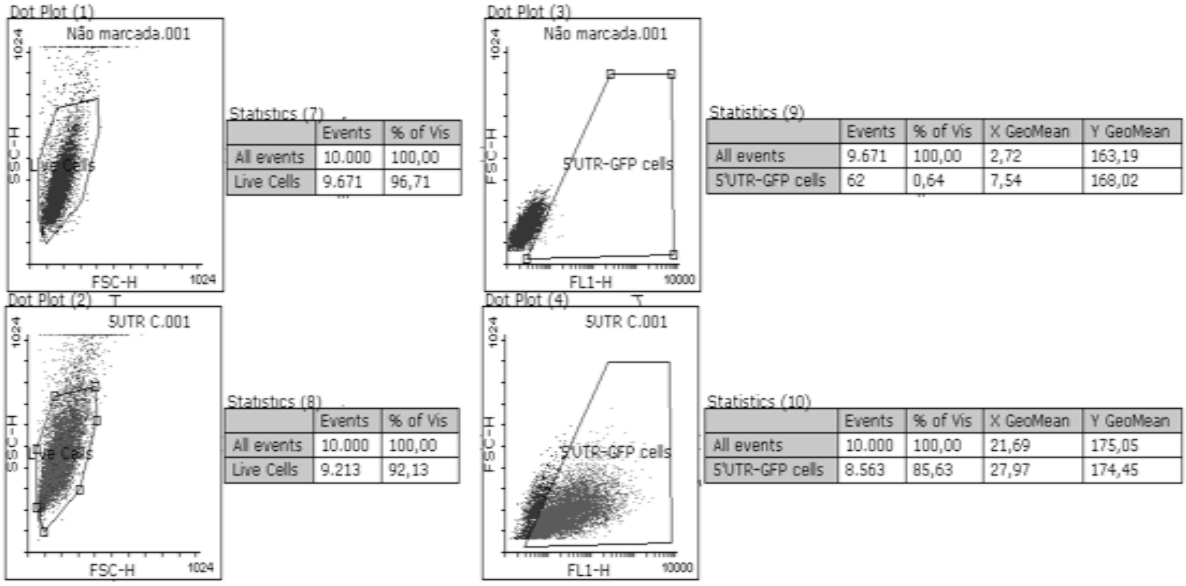


Avaliou-se a expressão de eGFP em células transfectadas com plasmídeos contendo a região 3' não traduzível do mRNA de NIS completa (A), ou fragmentos de 609 (B), 311 (C) e 138 pb (D) desta região. Cada figura apresenta a representação gráfica dos valores obtidos a partir da análise densitométrica das bandas referentes expressão de eGFP e e-caderina, na porção inferior; e os imunoblots referentes ao conteúdo de eGFP e e-caderina (normalizador), na porção superior. Os resultados estão expressos como média ± SEM de três experimentos independentes, em unidades arbitrárias. * $p<0,05$ *vs* C. *One-way analysis of variance.*
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

3.3 Avaliação da responsividade da região 5'UTR do mRNA de NIS ao excesso de iodo

A eficiência de transfecção e seleção das células PCCl3 contendo os plasmídeos peGFP-N2 contendo a região 5' não traduzível do mRNA de NIS inserido *upstream* a região codificadora de eGFP foi confirmada por ensaios de citometria de fluxo (**Figura 19**).

Figura 19 – Expressão de eGFP em células PCCl3 transfectadas com plasmídeos peGFP-N2.



Statistics (7)	Events	% of Vis
All events	10.000	100,00
Live Cells	9.671	96,71

Statistics (9)	Events	% of Vis	X GeoMean	Y GeoMean
All events	9.671	100,00	2,72	163,19
5'UTR-GFP cells	62	0,64	7,54	168,02

Statistics (8)	Events	% of Vis
All events	10.000	100,00
Live Cells	9.213	92,13

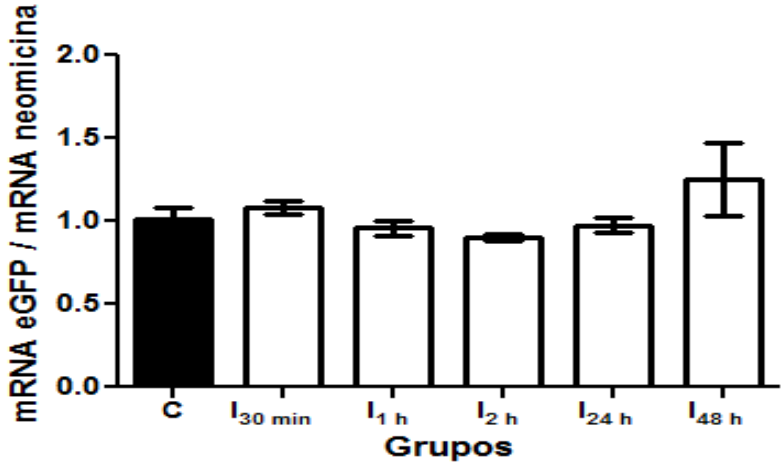
Statistics (10)	Events	% of Vis	X GeoMean	Y GeoMean
All events	10.000	100,00	21,69	175,05
5'UTR-GFP cells	8.563	85,63	27,97	174,45

Representação da análise realizada por citometria de fluxo da eficiência de transfecção e seleção de células PCCl3 com plasmídeos peGFP-N2 contendo a região 5' não traduzível completa (84 pb) de NIS *upstream* a região codificadora de eGFP. Nos painéis à *esquerda* encontram-se as análises por *Dot Plot* das células viáveis *(Live cells*) em cada uma das linhagens (não marcada e 5'UTR), e nos quadros ao lado as porcentagens destas células. Nos painéis *à direita* encontram-se as análises para determinação do número de células positivas para eGFP (*5'UTR-eGFP cells*), ou seja, que foram efetivamente transfectadas com o plasmídeo utilizado (peGFP-N2). Não marcada: células não transfectadas; 5'UTR C: células PCCl3 transfectadas com peGFP-N2 e a região 5'UTR completa (84 pb) do mRNA de NIS.
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

3.3.1 Avaliação da expressão de eGFP frente ao tratamento com excesso de iodeto

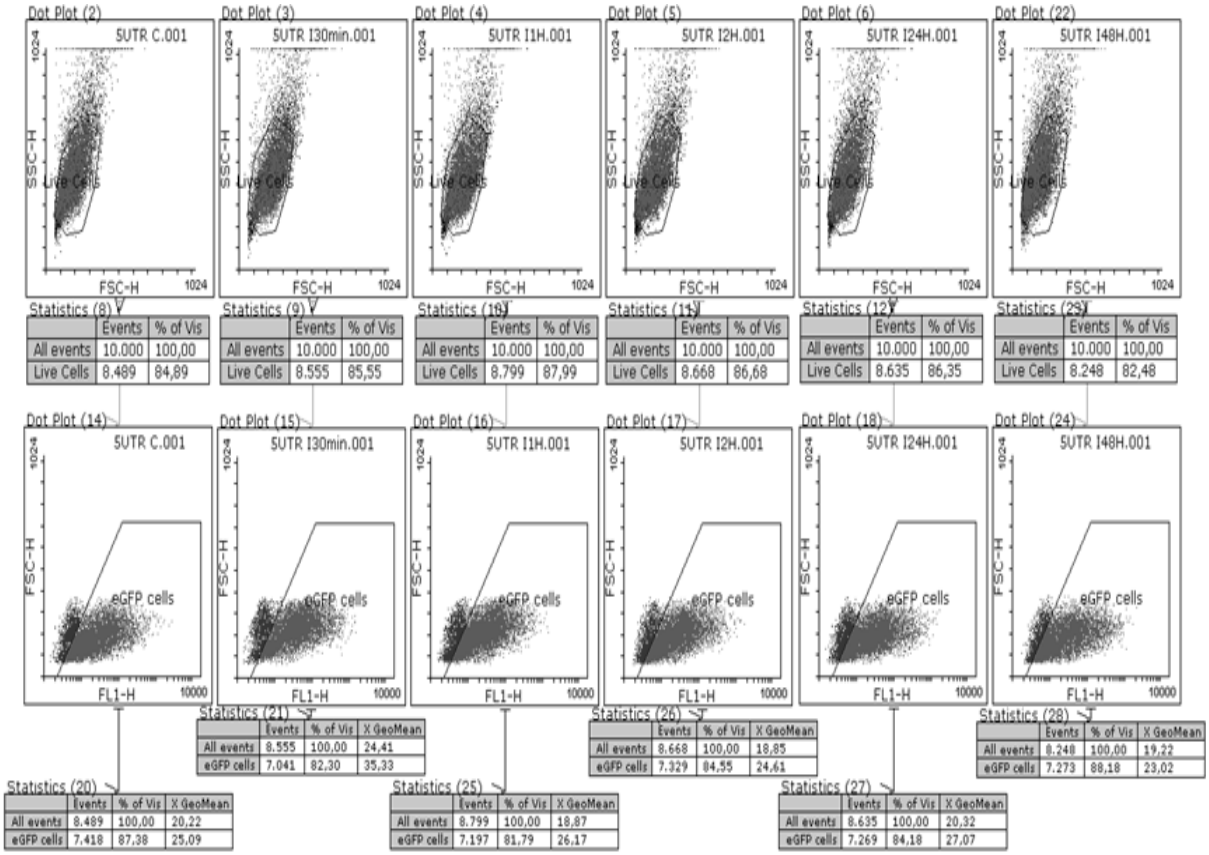
A região 5' não traduzível do mRNA de NIS não é responsiva ao iodo, uma vez que *células 5'UTR-eGFP* tratadas com NaI (10^{-3} M) não apresentaram alteração no conteúdo de mRNA de eGFP (**Figura 20**), ou do conteúdo total de proteína eGFP (**Figura 21**), em relação às células que não foram tratadas com este oligoelemento.

Figura 20 – Efeito do excesso de iodeto sobre a expressão do mRNA de eGFP em células 5'UTR-eGFP.



Representação gráfica dos valores obtidos a partir da análise da expressão dos mRNAs de eGFP e Neomicina por *Real-Time PCR*. Os resultados estão expressos como média ± SEM de dois experimentos independentes, em unidades arbitrárias; n=6 em cada grupo. *One-way analysis of variance.*
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

Figura 21 – Efeito do excesso de iodeto sobre a expressão proteica de eGFP em células 5'UTR-eGFP.



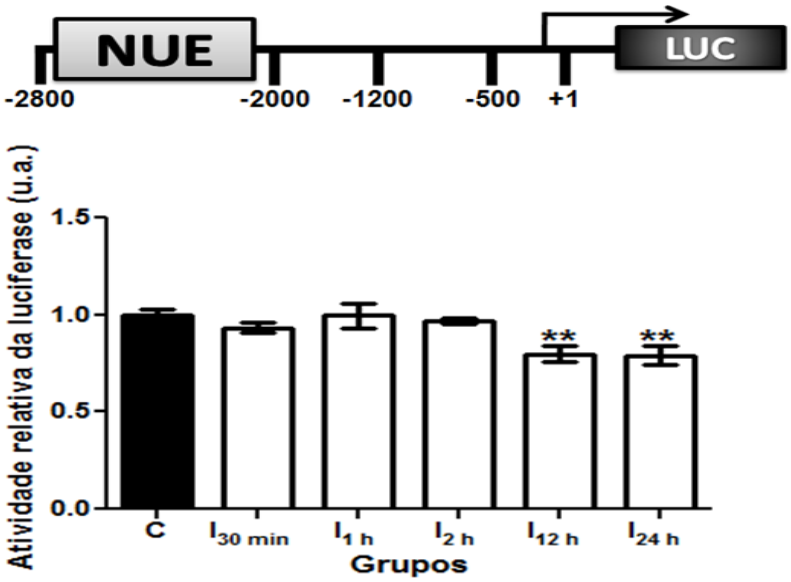
Representação gráfica das análises, por citometria de fluxo, do conteúdo total de eGFP em células PCCl3 5'UTR-eGFP tratadas com excesso de iodo por 30 min até 48 h. Nos *painéis Dot Plot superiores* encontra-se a análise do número de células viáveis após o tratamento com NaI. Nos *painéis Dot Plot inferiores* encontram-se as análises para determinação do número de células positivas para eGFP (*eGFP cells*). Não foi observada diferença significativa entre os grupos.Foram realizados dois experimentos independentes.
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

3.4 Avaliação do efeito do iodo sobre a atividade transcricional do promotor de NIS

3.4.1 Transfecção transitória do promotor completo de NIS (pNIS 2.8)

Observou-se redução da atividade do promotor completo de NIS a partir de 12 h de tratamento com excesso de iodeto. A atividade relativa da luciferase foi corrigida pela atividade relativa da β-galactosidase, que funcionou como um controle interno da eficiência da transfecção (**Figura 22**).

Figura 22 – Efeito do tratamento com excesso de iodeto sobre a atividade do promotor completo de NIS (pNIS-2.8kb).

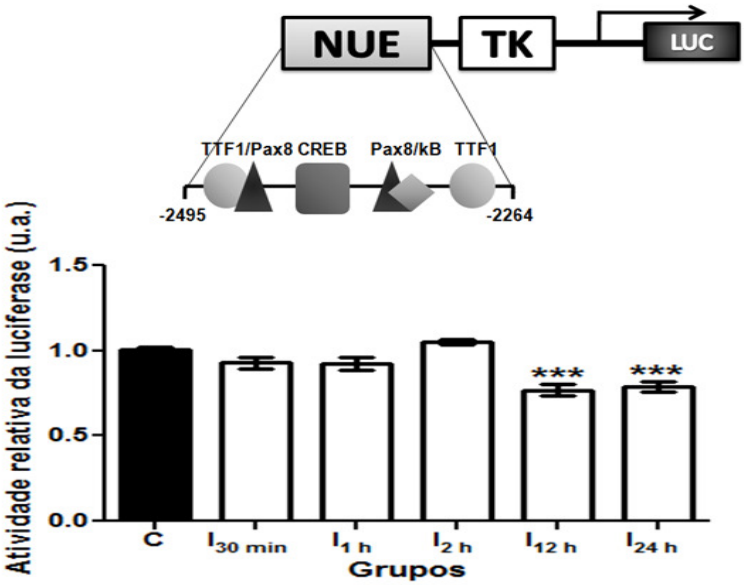


Células PCCl3 foram transfectadas, de forma transitória, com plasmídeos contendo a região promotora de NIS *upstream* ao gene repórter da luciferase. O painel superior representa, de maneira esquemática, a porção do plasmídeo na qual a região promotora de NIS se encontra. O painel inferior mostra a atividade transcricional em resposta ao tratamento com NaI, por 30 min, 1, 2, 12 e 24 h. Os resultados são expressos como atividade relativa da luciferase, normalizada pela atividade relativa da β-galactosidase. Os resultados estão expressos como média ± SEM de três experimentos independentes, em unidades arbitrárias; n=9 em cada grupo. ** p<0,01 *vs* C. *One-way analysis of variance.*
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

3.4.2 Transfecção transitória da região enhancer de NIS (pNUE) e de mutantes desta região

O tratamento com excesso de iodeto também comprometeu a atividade da região *enhancer* do promotor de NIS, dada a menor atividade relativa da luciferase em células PCCl3 tratadas com iodeto de sódio por 12 e 24 h, mas não por 30 min, 1 e 2 h (**Figura 23**).

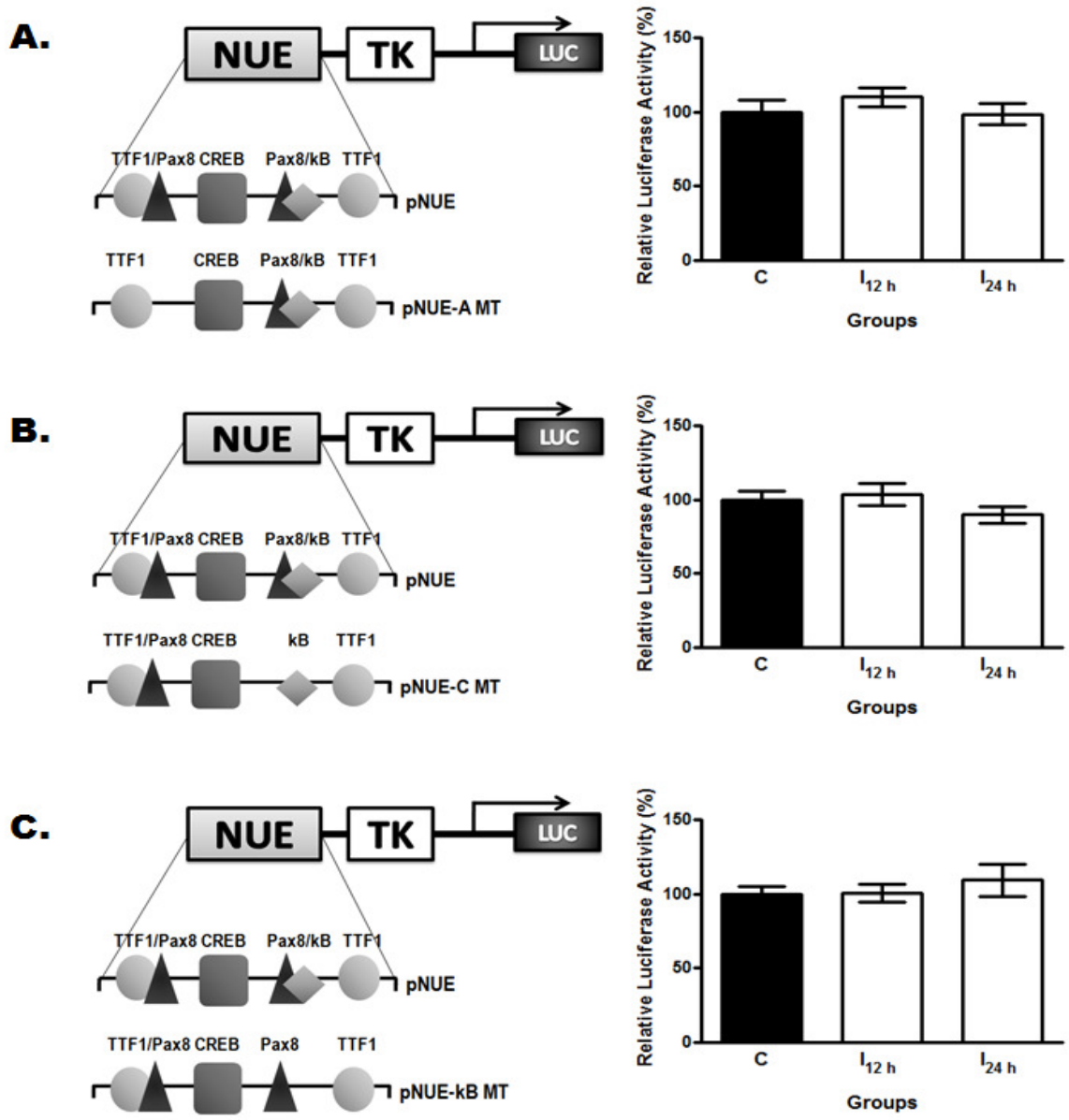
Figura 23 – Efeito do tratamento com excesso de iodeto sobre a atividade da porção *enhancer* do promotor de NIS (NUE).



Células PCCl3 foram transientemente transfectadas com plasmídeos contendo a região NUE *upstream* ao gene da luciferase. O painel superior representa, de maneira esquemática, a porção do plasmídeo na qual a NUE se encontra. O painel inferior mostra a atividade transcricional em resposta ao tratamento com NaI, por 30 min, 1, 2, 12 e 24 h. Os resultados são expressos como atividade relativa da luciferase, normalizada pela atividade relativa da β-galactosidase. Os resultados estão expressos como média ± SEM de três experimentos independentes, em unidades arbitrárias ***p<0,001 *vs* C. *One-way analysis of variance.*
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

A partir da transfecção de células PCCl3 com mutantes da região NUE, observou-se que tanto a remoção dos sítios de ligação de Pax8 (**Figura 24A** e **24B**), quanto do sítio de ligação de p65 (sítio kB) (**Figura 24C**), impediram que o efeito inibitório do iodeto sobre a atividade transcricional do *enhancer* de NIS ocorresse.

Figura 24 – O efeito inibitório do iodeto sobre a atividade do promotor de NIS depende da região NUE e envolve os sítios de ligação de Pax8 e p65.



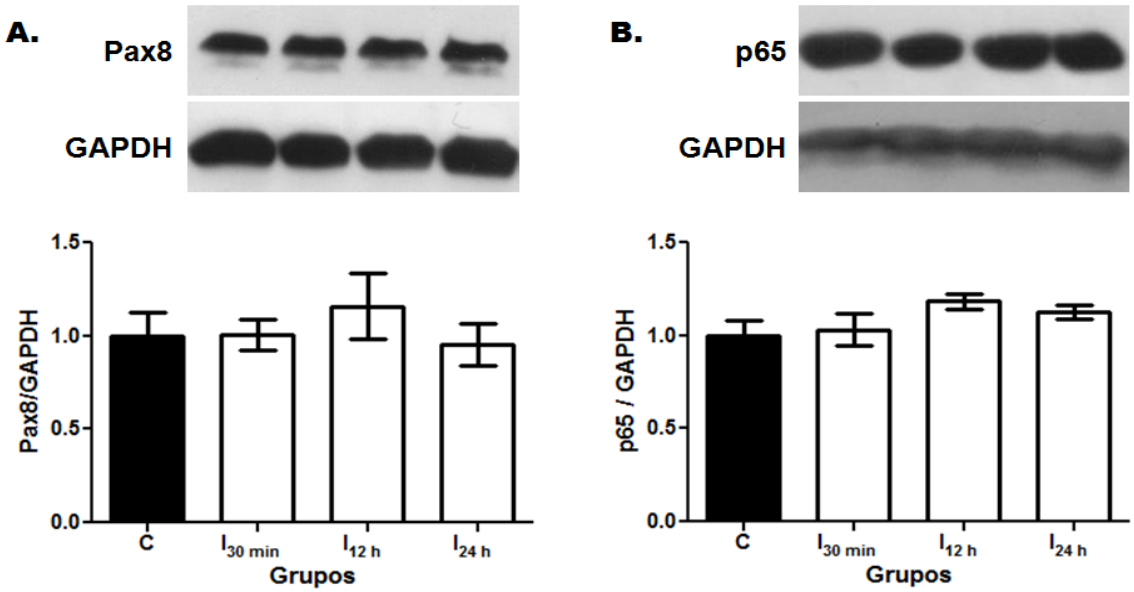
Células PCCl3 foram transientemente transfectadas com plasmídeos contendo deleções em sítios específicos de ligação do Pax8 (A e B) e p65 (sítio kB) (C). O painel à esquerda de cada figura representa, de maneira esquemática, os plasmídeos utilizados. Os gráficos à direita, por sua vez, representam a atividade transcricional das regiões NUE mutantes em resposta ao tratamento com NaI por 12 e 24 h. Os resultados são expressos como atividade relativa da luciferase, normalizada pela atividade relativa da β-galactosidase. Os resultados estão expressos como média ± SEM de três experimentos independentes, em porcentagem; n=9 em cada grupo. *One-way analysis of variance.*
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

3.4.3 Análise da expressão dos fatores transcricionais Pax8 e p65

A partir da análise densitométrica dos resultados obtidos pelos ensaios de *Western Blotting*, foi possível observar que o excesso de iodeto de sódio não alterou a expressão dos

fatores transcricionais Pax8 (**Figura 25A**) e p65 (**Figura 25B**) em nenhum dos tempos estudados.

Figura 25 – Efeito do excesso de iodeto sobre o conteúdo total de Pax8 e p65 em células PCCl3.

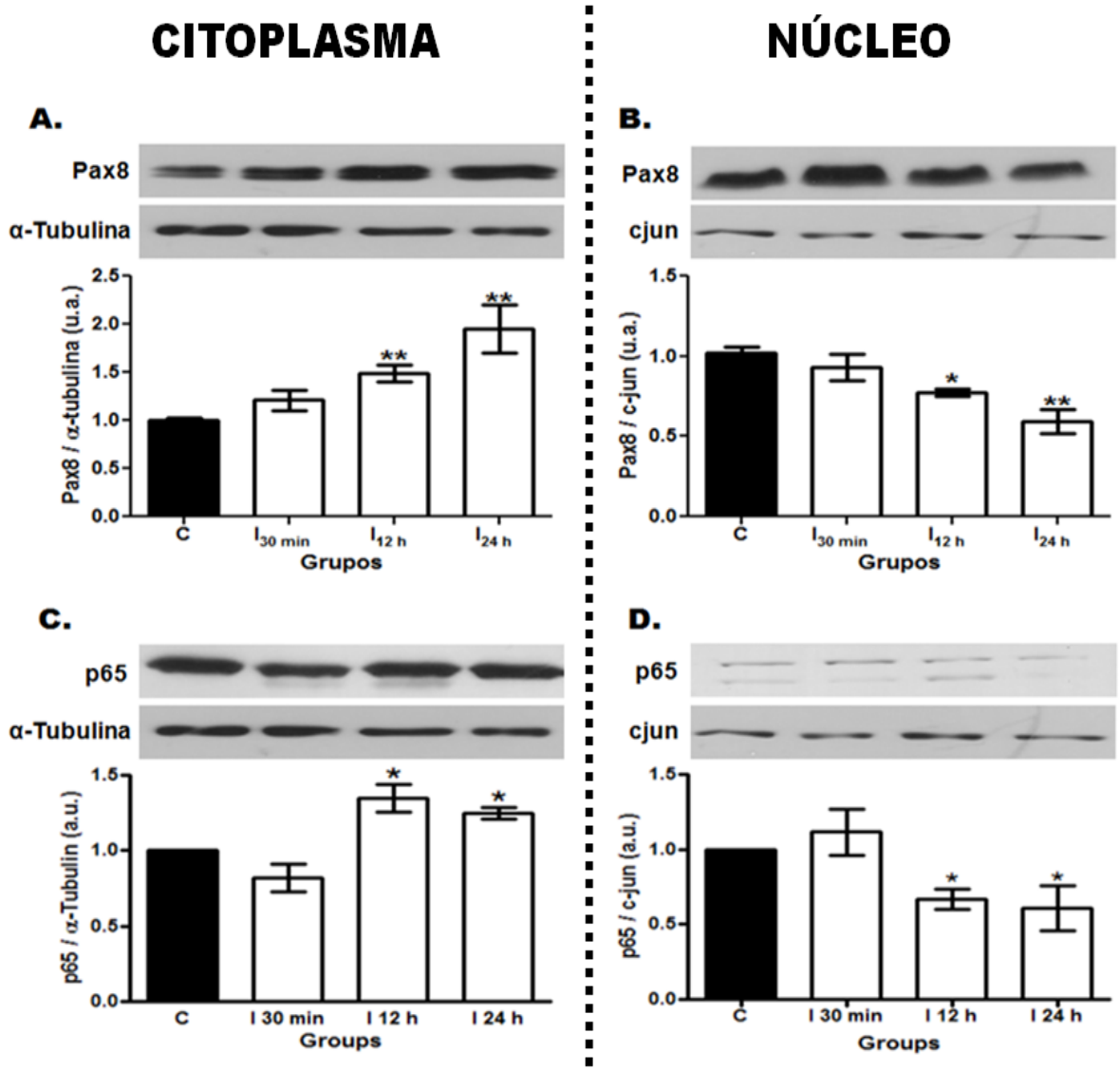


Nos painéis superiores aos gráficos, encontram-se imunoblots representativos do conteúdo total de Pax8 (A) e p65 (B), assim como de GAPDH (normalizador) de cada um dos grupos. Na porção inferior, encontra-se a representação gráfica dos valores obtidos a partir da análise densitométrica das bandas referentes expressão de Pax8, p65 e GAPDH, em ensaios de *Western Blotting*. Os resultados estão expressos como média ± SEM de dois experimentos independentes, em unidades arbitrárias; n=6 em cada grupo. *One-way analysis of variance.*
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

3.4.4 Fracionamento de proteínas citoplasmáticas e nucleares para determinação da localização subcelular dos fatores transcricionais Pax8 e p65

Após a exposição das células PCCl3 ao excesso de iodo e o procedimento de fracionamento de proteínas citoplasmáticas e nucleares, observou-se um aumento do conteúdo citoplasmático de Pax8 (**Figura 26A**) e p65 (**Figura 26C**) nos períodos de 12 e 24 h, mas não após 30 min do tratamento. O conteúdo nuclear de Pax8 (**Figura 26B**) e p65 (**Figura 26D**), por sua vez, apresentaram-se reduzidos após 12 e 24 h de tratamento com iodeto.

Figura 26 – Efeito do excesso de iodeto sobre a localização subcelular de Pax8 e p65.

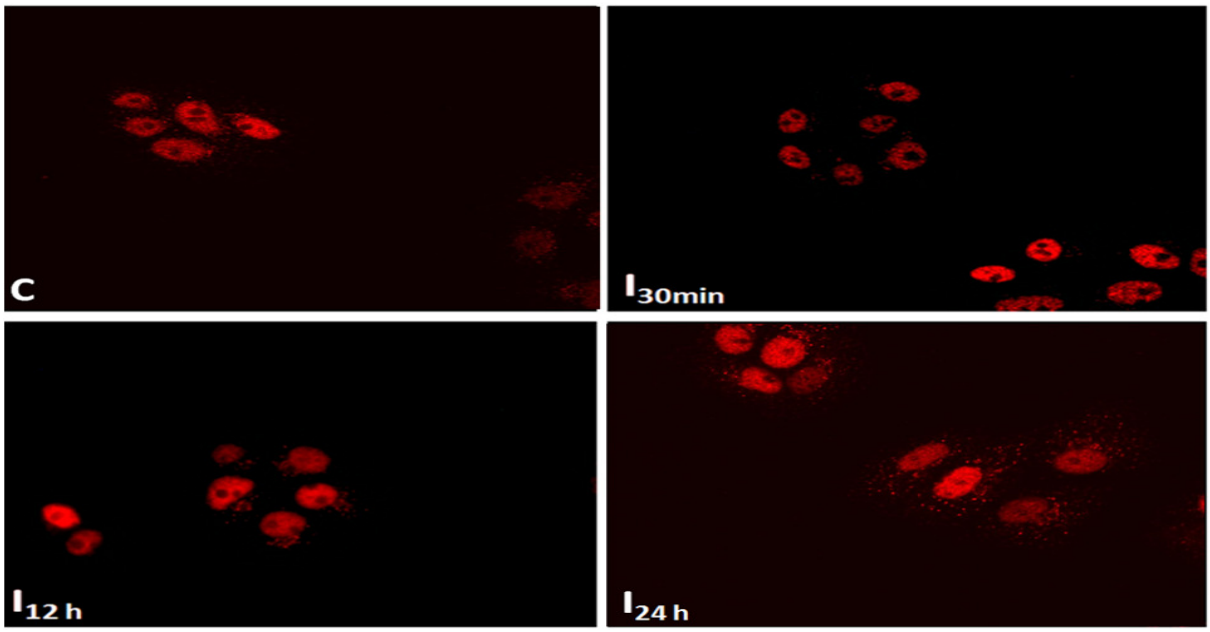


Células PCCl3 foram tratadas com excesso de iodeto por 30 min, 12 e 24 h e as proteínas totais foram fracionadas em proteínas nucleares e citoplasmáticas. Em cada figura, os painéis superiores apresentam os imunoblots representativos do conteúdo de Pax8, p65, α-tubulina e cjun. Na porção inferior de cada figura, encontra-se a representação gráfica dos resultados obtidos a partir da análise densitométrica das bandas referentes à Pax8 (A e B) e p65 (C e D), normalizada pela análise densitométrica de α-tubulina (normalizador citoplasmático) e cjun (normalizador nuclear). Os resultados estão expressos como média ± SEM de quatro experimentos independentes, em unidades arbitrárias; n=4 em cada grupo. * p< 0,05; ** p< 0,01 *vs* C. *One-way analysis of variance.*
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

3.4.5 Análise da localização subcelular dos fatores transcricionais Pax8 e p65 por imunofluorescência

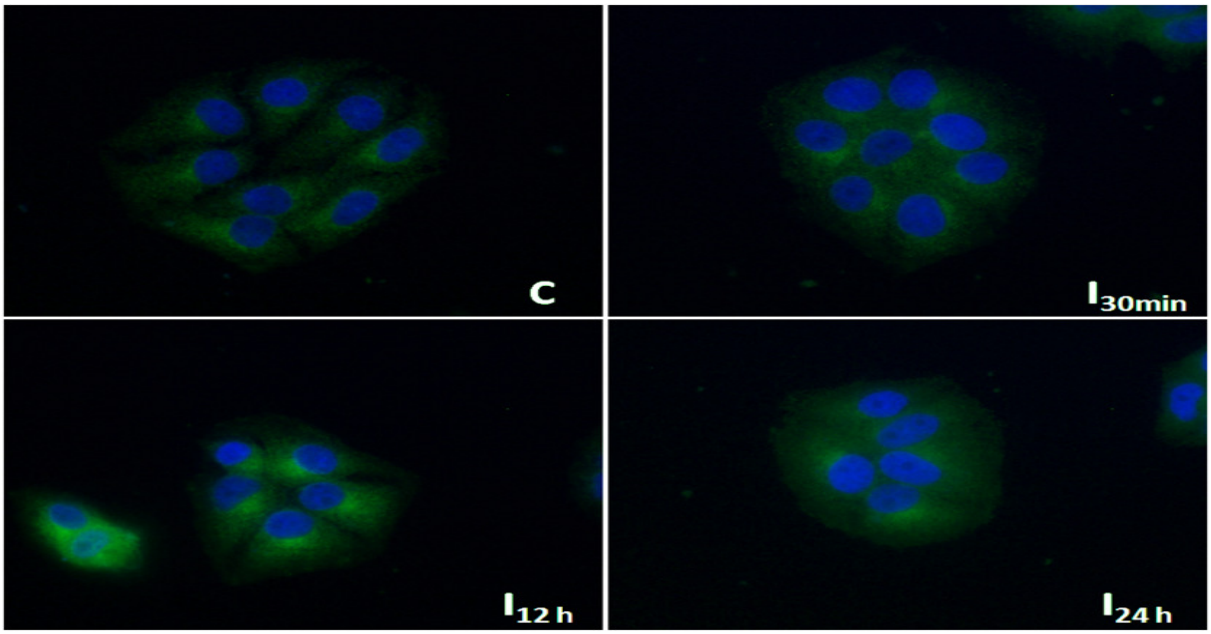
Corroborando os dados descritos na seção anterior, os ensaios de imunofluorescência demonstraram claramente um aumento do conteúdo citoplasmático de Pax8 (**Figura 27**) e p65 (**Figura 28**).

Figura 27 – Avaliação da localização subcelular de Pax8 frente ao excesso de iodeto, por ensaio de imunofluorescência.



A partir dos ensaios observou-se aumento do conteúdo de Pax8 no citoplasma das células PCCl3 após tratamento com excesso de iodeto por 12 e 24 h, em relação ao grupo controle (C). Imagens obtidas a partir da análise das lamínulas contendo células PCCl3 fixadas, em microscópio de fluorescência (X400). A proteína Pax8 encontra-se marcada em vermelho, a partir da incubação de células com anticorpo primário anti-Pax8 e anticorpo secundário conjugado com TRITC. Foram realizados três experimentos independentes.
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

Figura 28 – Avaliação da localização subcelular de p65 frente ao excesso de iodeto, por ensaio de imunofluorescência.

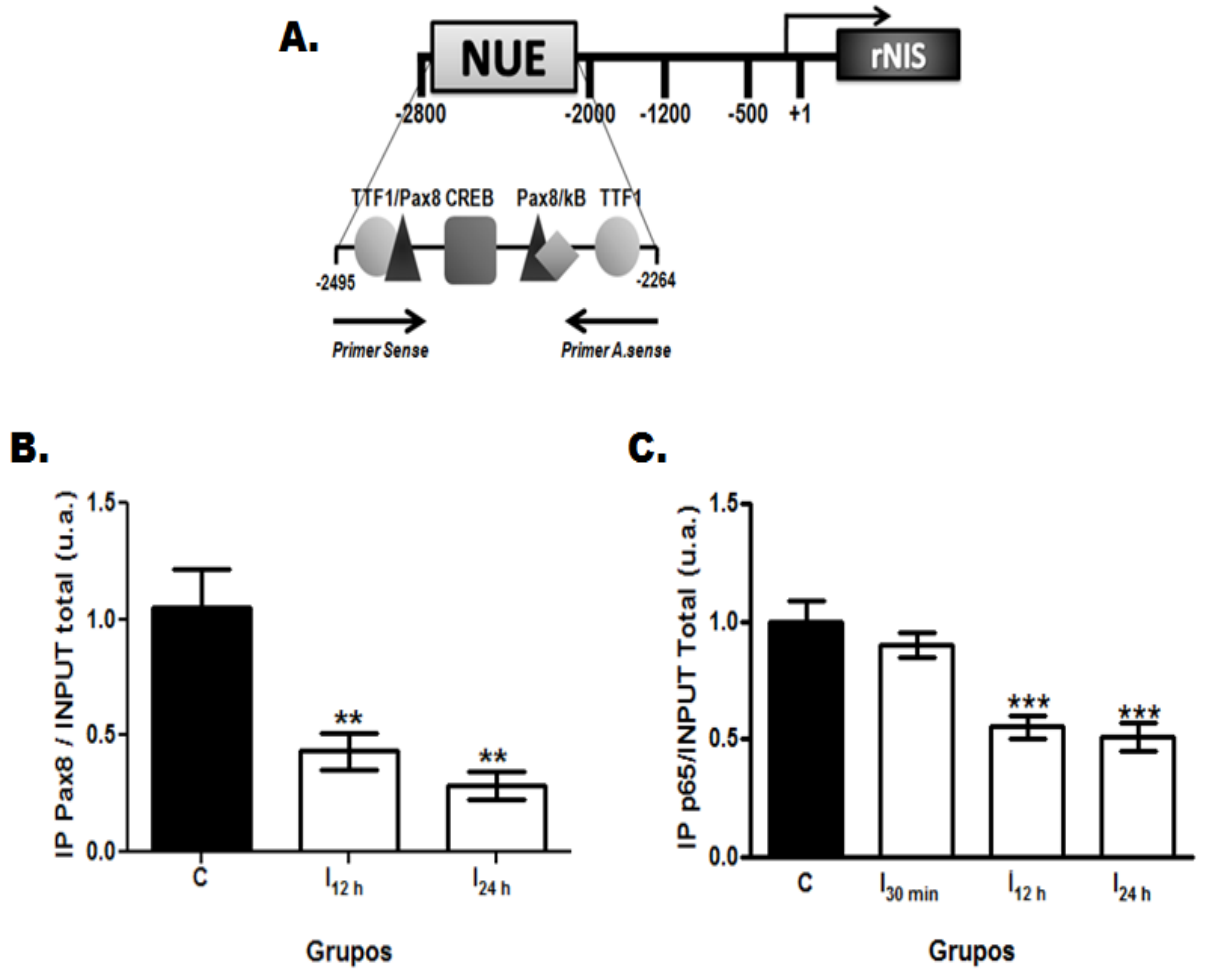


A partir dos ensaios observou-se aumento do conteúdo de p65 no citoplasma das células PCCl3 após tratamento com excesso de iodeto por 12 e 24 h, em relação ao grupo controle (C). Imagens obtidas a partir da análise das lamínulas contendo células PCCl3 fixadas, em microscópio de fluorescência (X400). A proteína p65 encontra-se marcada em verde, a partir da incubação de células com anticorpo primário anti-p65 e anticorpo secundário conjugado com FITC. Os núcleos celulares encontram-se marcados com DAPI. Foram realizados três experimentos independentes.
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

3.4.6 Ensaio de imunoprecipitação da cromatina (ChIP Assay)

A partir dos ensaios de ChIP, utilizando-se anticorpos específicos para Pax8 e p65, observou-se que o tratamento de células PCCl3 com excesso de iodeto reduziu a associação dos fatores transcricionais Pax8 (**Figura 29B**) e p65 (**Figura 29C**) aos seus sítios específicos na região *enhancer* do promotor de NIS após 12 e 24 h de tratamento.

Figura 29 – Efeito do excesso de iodeto sobre a associação entre os fatores transcricionais Pax8 e p65 e seus sítios de ligação específicos na região *enhancer* do promotor de NIS (NUE).



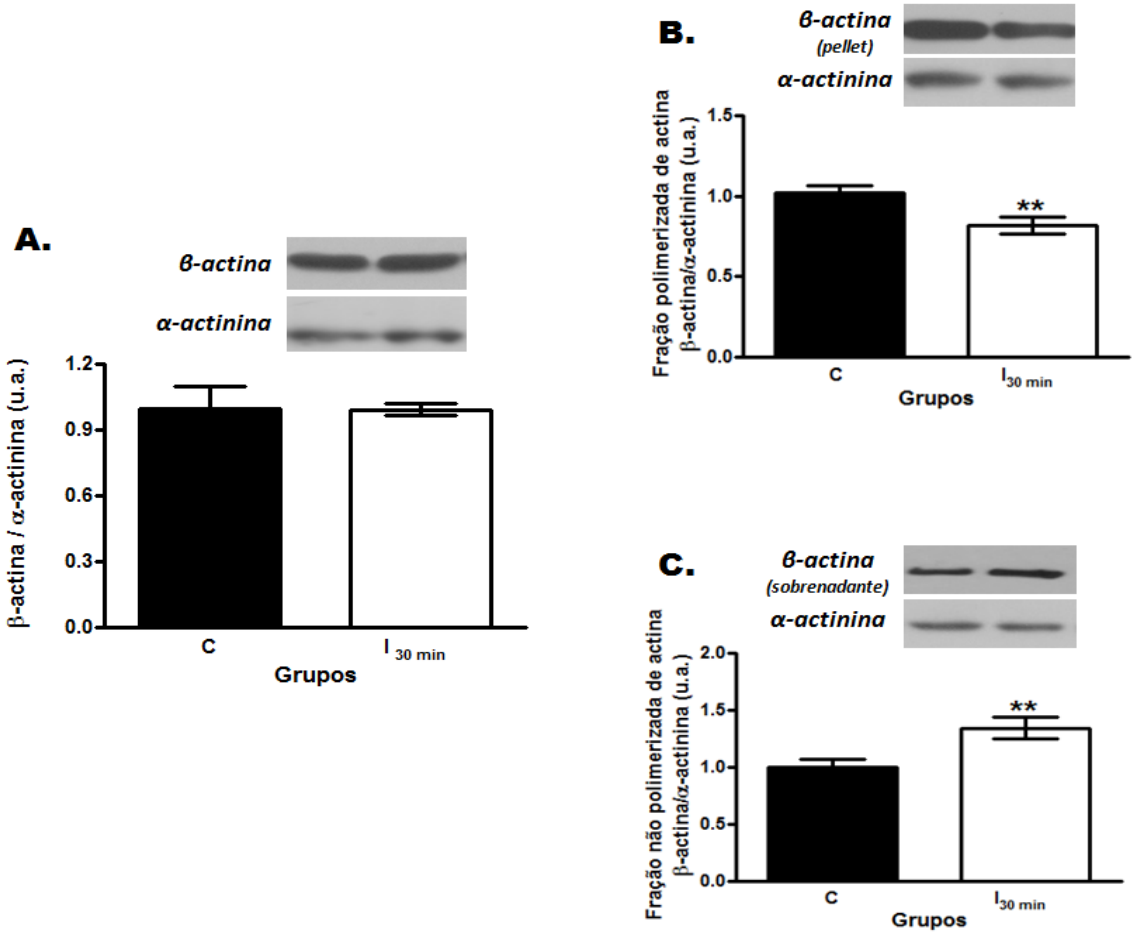
Após a imunoprecipitação da cromatina com anticorpos específicos para Pax8 (B) ou p65 (C), o DNA foi extraído e amplificado através de ensaios de *Real-Time PCR,* utilizando-se primers específicos para a região *enhancer* do promotor de NIS (A). Os resultados estão expressos como média ± SEM de dois experimentos independentes, em unidades arbitrárias; n=5 em cada grupo.**p<0,01; *** p<0,001 *vs* C. *One-way analysis of variance.*
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

3.5 Avaliação do efeito do iodo na organização do citoesqueleto dos tireócitos

3.5.1 Avaliação da expressão da actina polimerizada e não polimerizada

O tratamento de células PCCl3, por 30 min, com excesso de iodeto não alterou o conteúdo total de actina (**Figura 30A**). Todavia, o conteúdo de actina polimerizada (fração que engloba os filamentos de actina) apresentou-se reduzido e o de não polimerizada (fração monomérica de actina) aumentado, frente ao excesso de iodeto por 30 min (**Figura 30B** e **30C**).

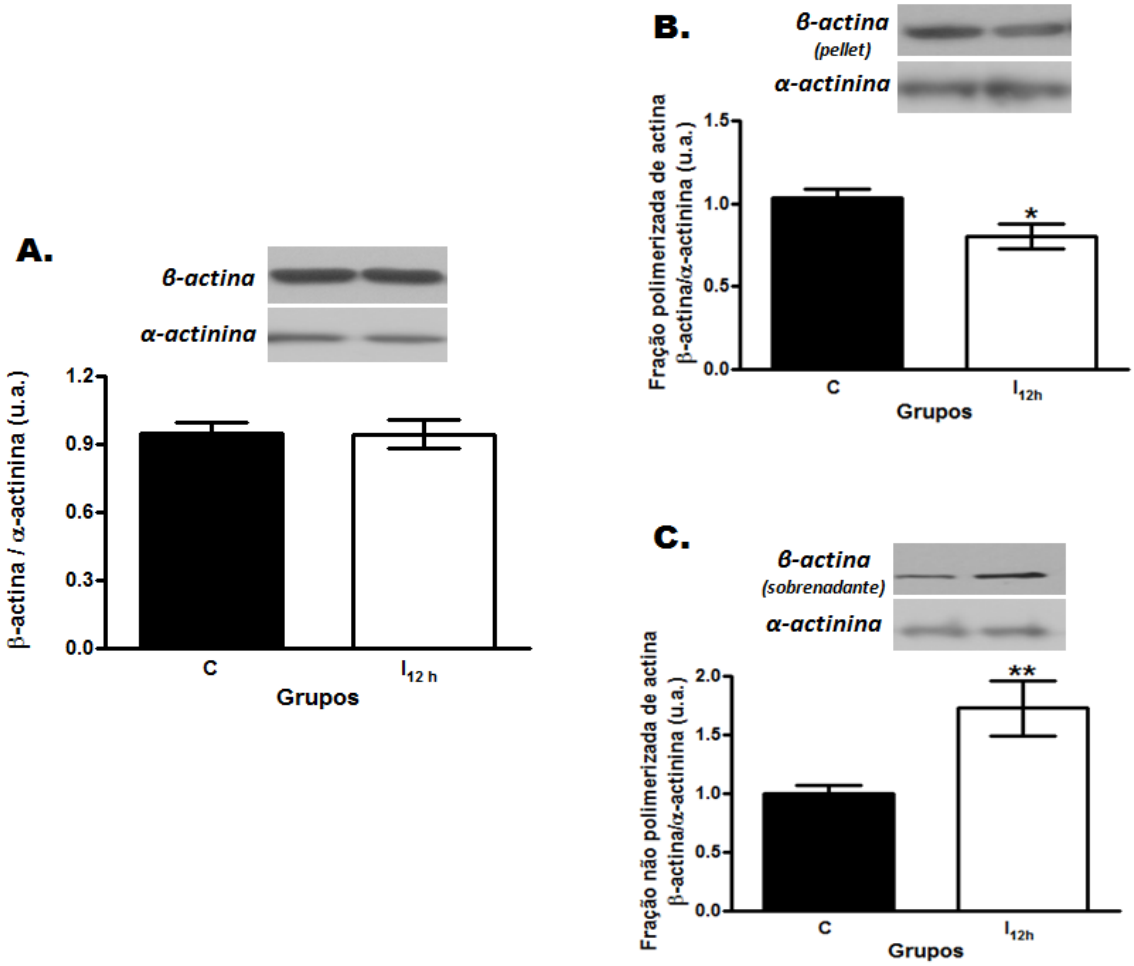
Figura 30 – Avaliação do conteúdo total, e das frações polimerizada e não polimerizada de β-actina de células PCCl3 tratadas com excesso de iodeto por 30 min.



Os imunoblots referentes ao conteúdo de β-actina e α-actinina (normalizador) de cada grupo estão representados acima de cada um dos gráficos. Abaixo dos imunoblots, encontra-se a representação gráfica do conteúdo total (A), fração polimerizada (B) e fração não polimerizada (C) de actina. Os resultados foram obtidos a partir da análise densitométrica das bandas de β-actina e α-actinina de cada amostra de cada um dos grupos. Os resultados estão expressos como média ± SEM de três experimentos independentes, em unidades arbitrárias; n=9 em cada grupo. ** p<0,01 *vs* C. *Unpaired t test.*
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

Resultados semelhantes foram observados após 12 h de exposição ao excesso de iodeto. Não foi observada alteração no conteúdo total de actina após 12 h do tratamento de células PCCl3 com excesso de NaI (**Figura 31A**). Além disso, este tratamento reduziu significativamente o conteúdo de actina polimerizada (**Figura 31B**) e aumentou o conteúdo de actina não polimerizada (**Figura 31C**), nestas células.

Figura 31 – Avaliação do conteúdo total, e das frações polimerizada e não polimerizada de β-actina de células PCCl3 tratadas com excesso de iodeto por 12 h.



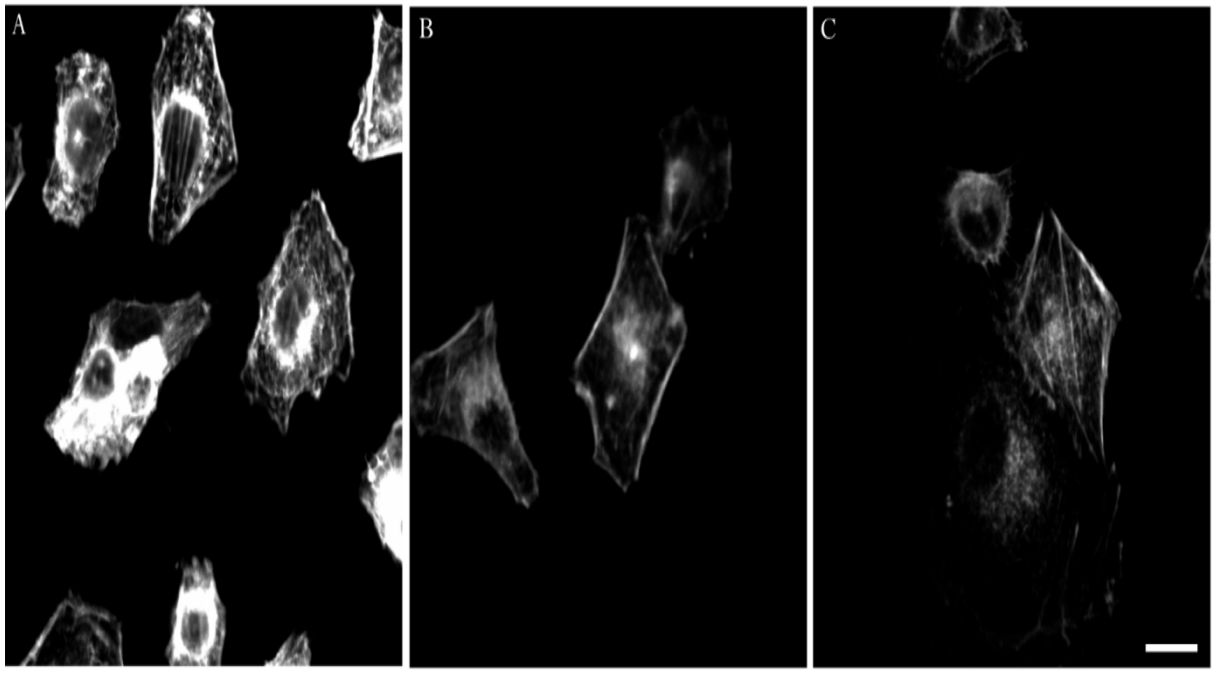
Os imunoblots referentes ao conteúdo de β-actina e α-actinina (normalizador) de cada grupo estão representados acima de cada um dos gráficos. Abaixo dos imunoblots, encontra-se a representação gráfica do conteúdo total (A), fração polimerizada (B) e fração não polimerizada (C) de actina. Os resultados foram obtidos a partir da análise densitométrica das bandas de β-actina e α-actinina de cada amostra de cada um dos grupos. Os resultados estão expressos como média ± SEM de três experimentos independentes, em unidades arbitrárias; n=9 em cada grupo. * $p<0,05$; ** $p<0,01$ *vs* C. *Unpaired t test.*
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

3.5.2 Avaliação da organização do citoesqueleto de actina por ensaios de imunocitoquímica

Para confirmar os dados obtidos a partir dos ensaios de fracionamento de actina, foram realizados ensaios de imunocitoquímica com marcador específico de actina polimerizada, a faloidina, conjugada ao fluoróforo rodamina.

A partir da análise das lamínulas em microscópio confocal observou-se redução no conteúdo de filamentos de actina nas células PCCl3 tratadas com excesso de iodeto de sódio por 30 min e 12 h, em relação às células controle (**Figura 32**).

Figura 32 – Efeito do excesso de iodo sobre a distribuição e conteúdo de filamentos de actina em células PCCl3.

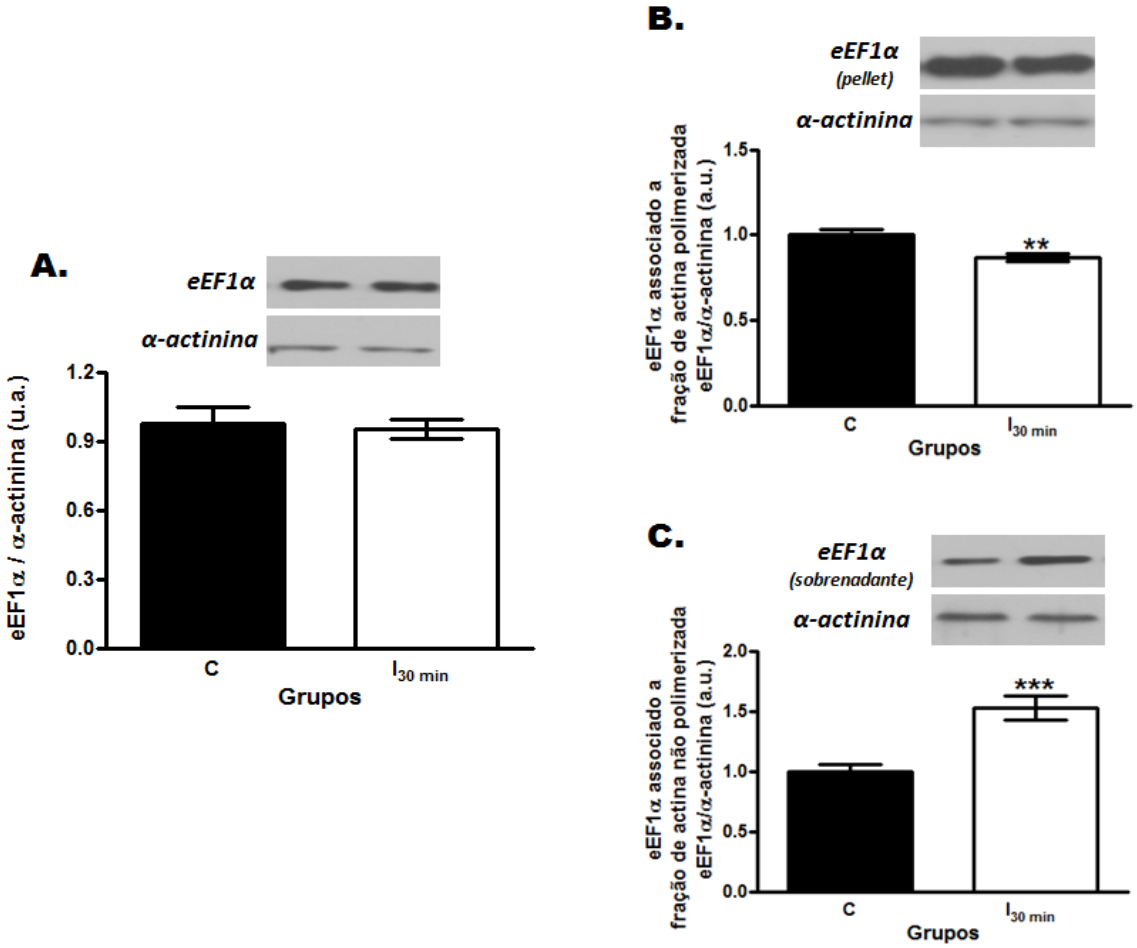


Os painéis representam fotomicrografias dos grupos Controle (A), $I_{30\ min}$ (B) e $I_{12\ h}$ (C). A marcação de actina polimerizada foi determinada por ensaios de imunocitoquímica utilizando-se faloidina conjugada com rodamina. As imagens foram obtidas por microscópio confocal LSM 510. Foram realizados 3 experimentos independentes. Barras de magnitude, 14 µM.
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

3.5.3 Avaliação do conteúdo total de eEF1α e da taxa de ligação deste fator com o citoesqueleto

O tratamento de células PCCl3 com iodeto de sódio, por 30 min, não alterou o conteúdo total de eEF1α (**Figura 33A**). Entretanto, houve redução significativa do conteúdo de eEF1α associado à fração polimerizada de actina, dado corroborado pela maior presença deste fator na fração de actina não polimerizada (**Figura 33B** e **33C**).

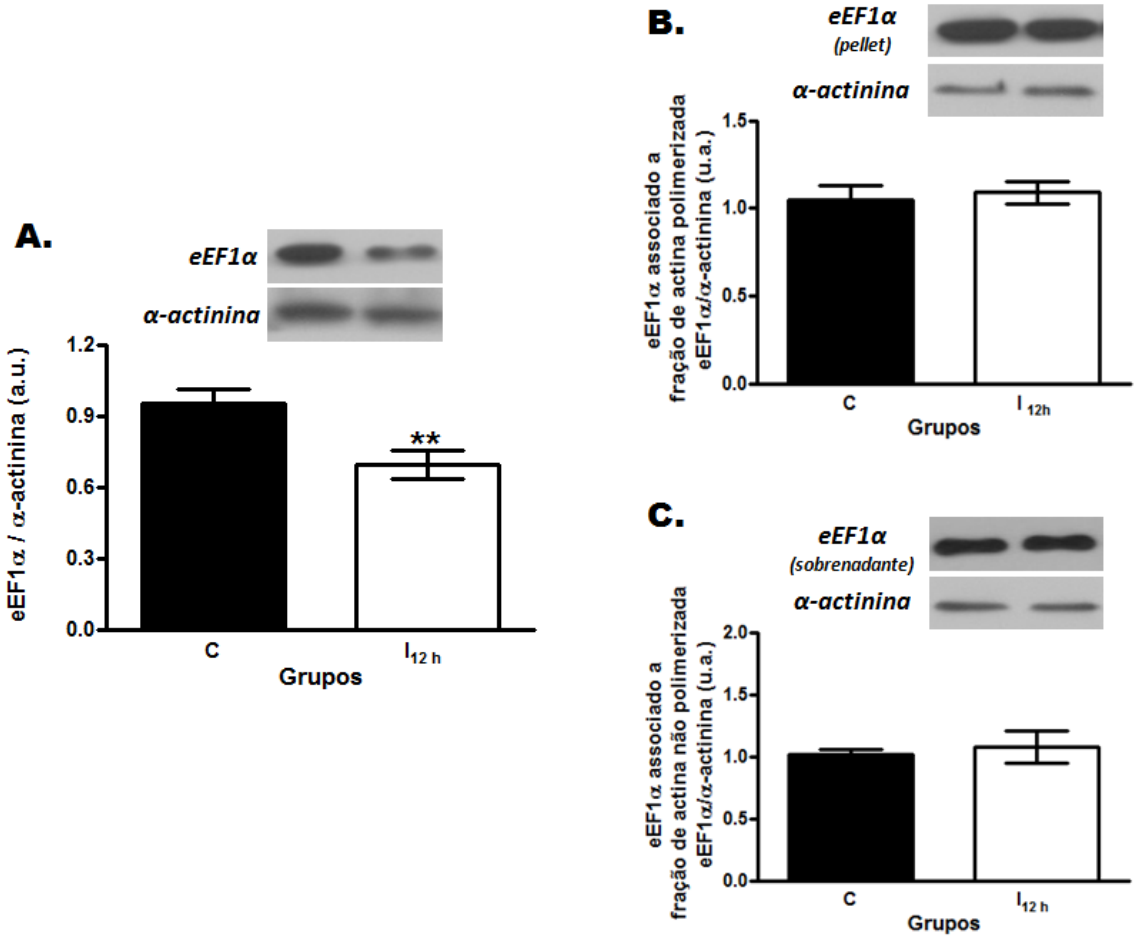
Figura 33 – Avaliação do conteúdo total de eEF1α e do conteúdo deste fator associado às frações polimerizada e não polimerizada de β-actina, em células PCCl3 tratadas com excesso de iodeto por 30 min.



Os imunoblots referentes ao conteúdo de eEF1α e α-actinina (normalizador) de cada grupo estão representados acima de cada um dos gráficos. Abaixo dos imunoblots, encontra-se a representação gráfica do conteúdo total de eEF1α (A), do seu conteúdo associado à fração polimerizada (B) e à fração não polimerizada (C) de actina. Os resultados foram obtidos a partir da análise densitométrica das bandas de eEF1α e α-actinina de cada amostra de cada um dos grupos. Os resultados estão expressos como média ± SEM de três experimentos independentes, em unidades arbitrárias; n=9 em cada grupo. ** p<0,01; *** p<0,001 *vs* C. *Unpaired t test.*
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

Após 12 h de tratamento com iodeto, observou-se redução no conteúdo total de eEF1α de células PCCl3 (**Figura 34A**). No entanto, não foi observada qualquer alteração no conteúdo deste fator nas frações de actina polimerizada ou não polimerizada (**Figura 34A** e **34B**).

Figura 34 – Avaliação do conteúdo total de eEF1α e do conteúdo deste fator associado às frações polimerizada e não polimerizada de β-actina, em células PCCl3 tratadas com excesso de iodeto por 12 h.

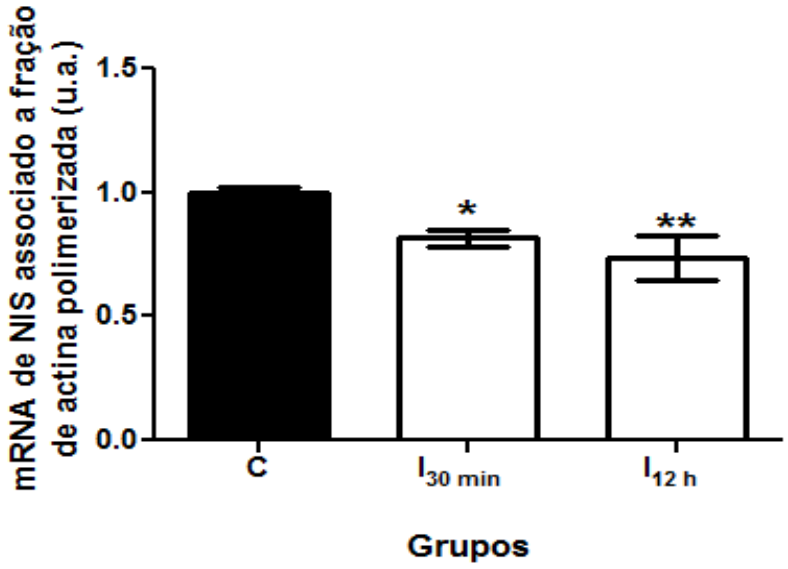


Os imunoblots referentes ao conteúdo de eEF1α e α-actinina (normalizador) de cada grupo estão representados acima de cada um dos gráficos. Abaixo dos imunoblots, encontra-se a representação gráfica do conteúdo total de eEF1α (A), do seu conteúdo associado à fração polimerizada (B) e à fração não polimerizada (C) de actina. Os resultados foram obtidos a partir da análise densitométrica das bandas de eEF1α e α-actinina de cada amostra de cada um dos grupos. Os resultados estão expressos como média ± SEM de três experimentos independentes, em unidades arbitrárias; n=9 em cada grupo. ** p< 0,01; *** p< 0,001 *vs* C. *Unpaired t test.*
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

3.5.4 Avaliação do conteúdo de mRNA de NIS ligado ao citoesqueleto

O tratamento de células PCCl3 com iodeto de sódio (10^{-3} M), tanto por 30 min quanto por 12 h, reduziu o conteúdo de mRNA de NIS associado à fração polimerizada (filamentos) de β-actina (**Figura 35**).

Figura 35 – Avaliação da associação do mRNA de NIS aos filamentos de actina de células PCCl3 tratadas com excesso de iodeto.



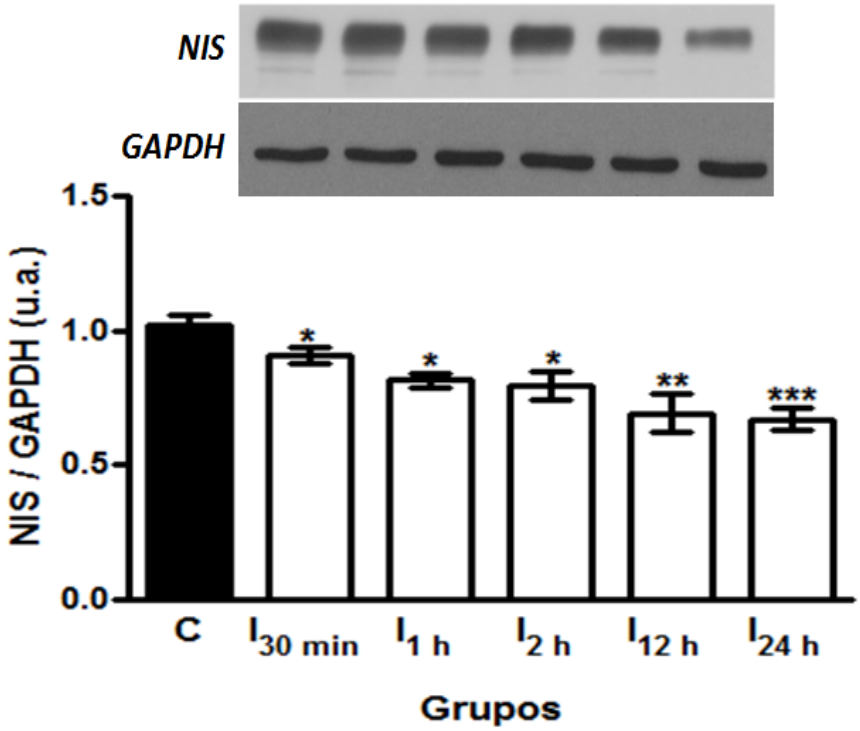
Os valores obtidos referentes à expressão do mRNA de NIS foram normalizados pela expressão do mRNA de RPL19 (gene constitutivo), por *Real-Time PCR*. Os dados encontram-se representados como média ± SEM de três experimentos independentes realizados em triplicata. * p< 0,05; ** p<0,01 *vs* C. *One-way analysis of variance*.
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

3.6 Avaliação do efeito do iodo no conteúdo total, localização subcelular e função de NIS

3.6.1 Conteúdo total de NIS

O tratamento de células PCCl3 com iodeto de sódio promoveu uma redução do conteúdo total de NIS, em todos os períodos de tempo estudados (**Figura 36**).

Figura 36 – Avaliação do conteúdo total de NIS frente ao tratamento de células PCCl3 com excesso de iodeto.

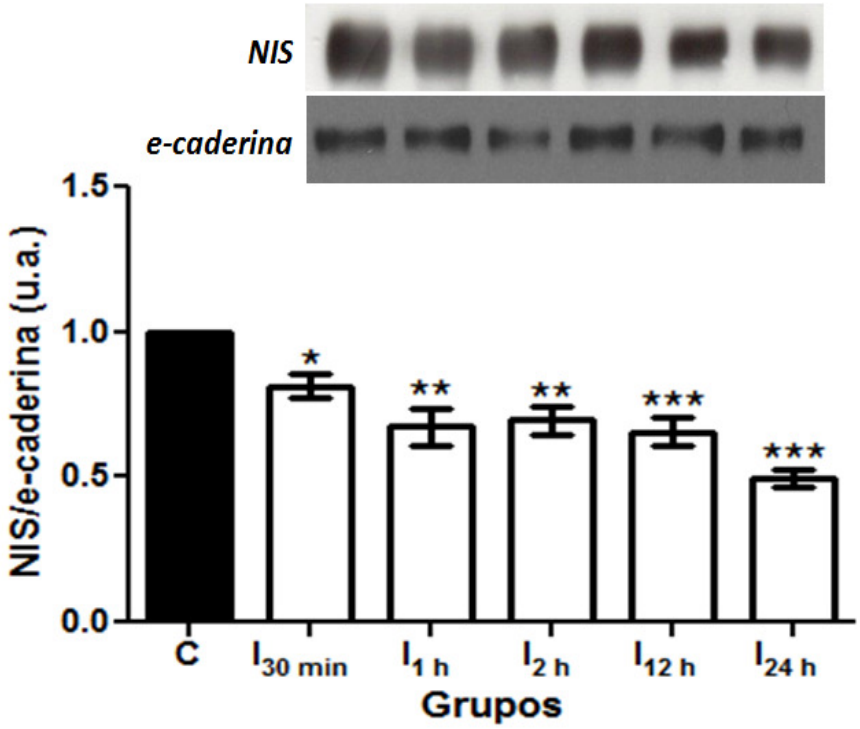


As células foram tratadas com NaI (10^{-3} M) por 30 min, 1, 2, 12 e 24 h. Os imunoblots representativos de um experimento, referentes ao conteúdo de NIS e GAPDH (normalizador) de cada grupo estão representados acima do gráfico. Abaixo das bandas, encontram-se os gráficos dos resultados obtidos a partir de análise densitométrica das bandas de NIS e GAPDH. Os resultados estão expressos como média ± SEM de dois experimentos independentes, em unidades arbitrárias; n=8 em cada grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ *vs* C. *One-way analysis of variance.*
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

3.6.2 Análise do conteúdo de NIS na membrana plasmática

A partir da técnica de biotinilação de superfície, observou-se que o tratamento com NaI diminuiu o conteúdo de NIS presente na membrana plasmática dos tireócitos, em todos os períodos estudados (**Figura 37**).

Figura 37 – Avaliação do conteúdo de NIS na membrana plasmática de células PCCl3 tratadas com iodeto de sódio.

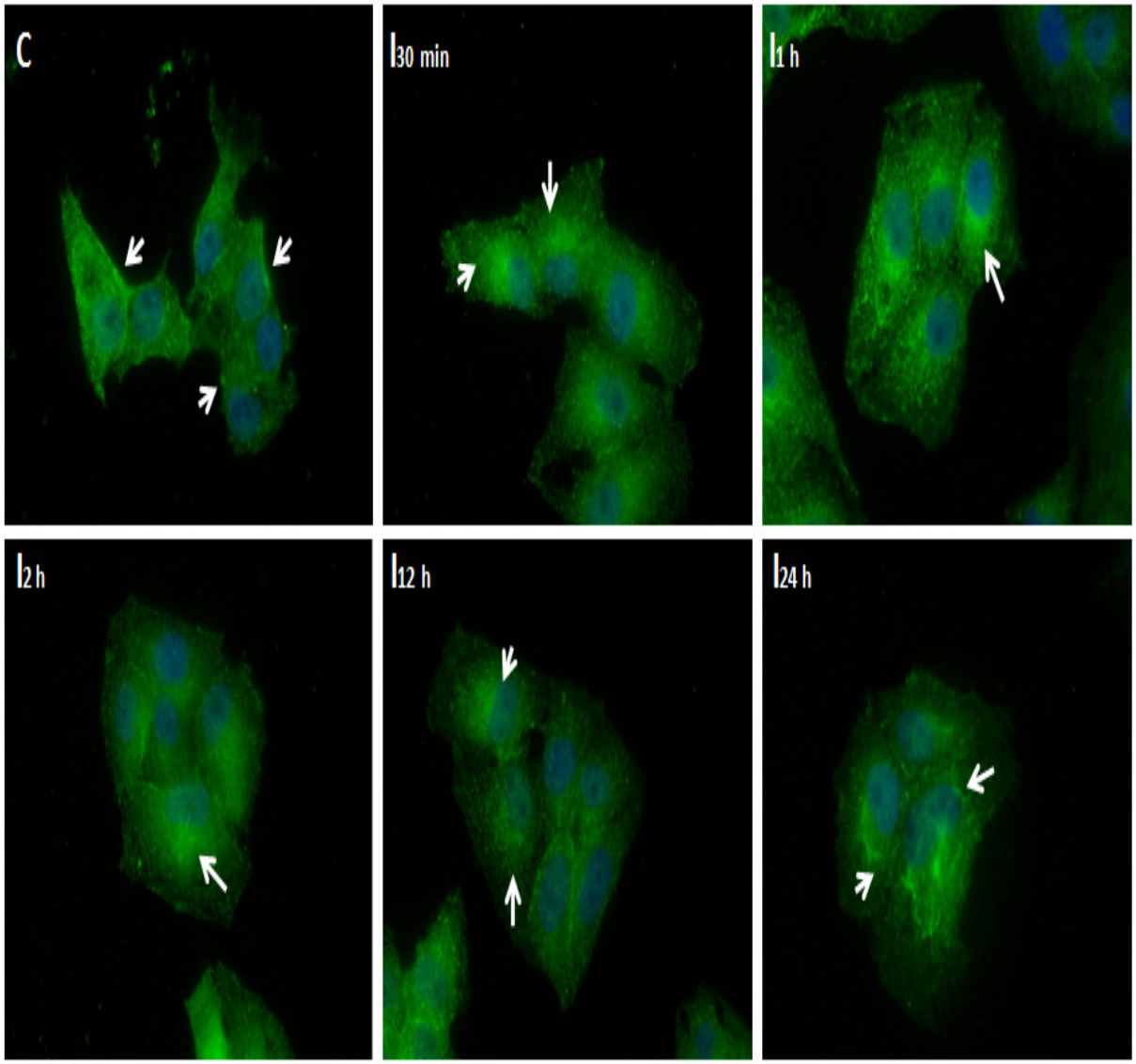


Células PCCl3 foram incubadas com o reagente amino-específico e membrana-impermeável sulfo-NHS-SS-biotina, que forma uma ligação covalente com os resíduos de lisina que estão expostos na face extracelular da membrana plasmática. Após a incubação, o extrato de proteínas biotiniladas foi precipitado com *beads* de agarose-estreptavidina e posteriormente fez-se o imunoblot. A proteína e-caderina foi utilizada como normalizador da fração de proteínas de membrana. Os resultados estão expressos como média ± SEM de cinco experimentos independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs C. *One-way analysis of variance.*
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

3.6.3 Imunocitoquímica

Os dados obtidos por biotinilação, descritos no tópico anterior, foram corroborados por ensaios de imunocitoquímica. As células controle apresentaram uma marcação homogênea de NIS por toda a célula, com pontos mais intensos de marcação na periferia da célula. O tratamento com excesso de iodeto, por sua vez, aumentou a marcação de NIS na região mais central das células, com menor marcação na região periférica, em todos os tempos estudados. Observou-se ainda que, quanto maior o período de tratamento, menor foi a intensidade da marcação da proteína NIS nas células PCCl3 (**Figura 38**).

Figura 38 – Avaliação localização subcelular de NIS frente ao excesso de iodeto, por ensaios de imunocitoquímica.

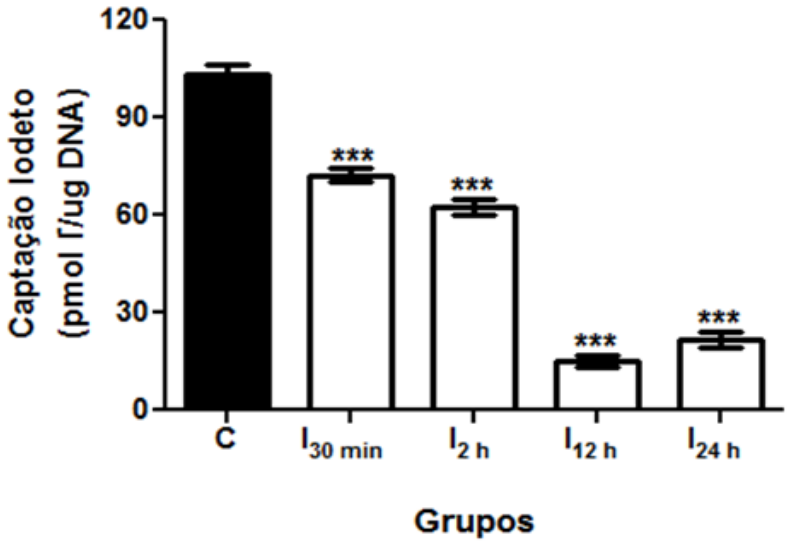


Células PCCl3 foram tratadas com iodeto de sódio por 30 min, 1, 2, 12 e 24h. As células foram fixadas e incubadas com anticorpo primário (anti-NIS) e anticorpo secundário (anti-coelho conjugado com FITC). Os resultados demonstram que o tratamento com iodo promoveu redução da marcação de NIS na membrana plasmática dos tireócitos e aumento de sua marcação na região intracelular. As imagens foram obtidas a partir da análise das lamínulas em microscópio de fluorescência (X600). Os núcleos das células PCCl3 encontram-se corados em azul (DAPI). As setas brancas indicam a prevalência da marcação de NIS em cada um dos grupos estudados. Foram realizados três experimentos independentes.
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

3.6.4 Avaliação da captação de iodeto

Após serem tratadas com excesso de iodeto por 30 min, 2, 12 e 24 h, as células PCCl3 apresentaram redução significativa e progressiva na captação de iodeto radioativo (**Figura 39**).

Figura 39 – Captação de ^{125}I por células PCCl3 tratadas com iodeto de sódio.



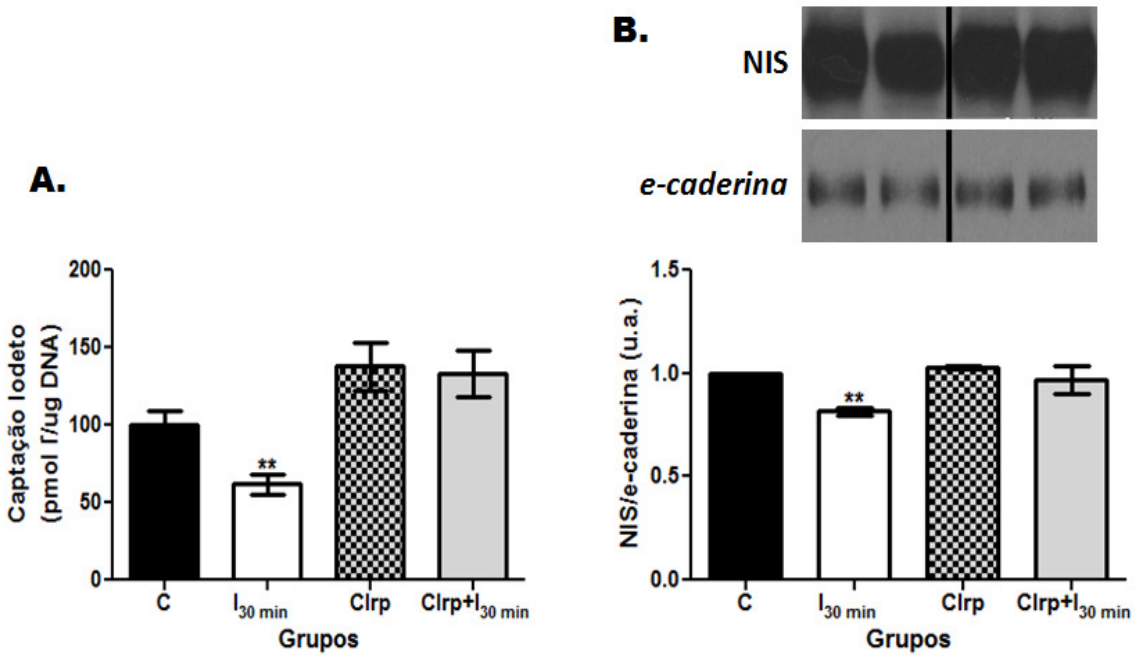
Após o tratamento com NaI (10^{-3}M) por 30 min, 2, 12 e 24 h, as células PCCl3 foram lavadas e incubadas com 20 µM NaI suplementado com 50 µCi/µmol $Na^{125}I$ por 45 min. A captação de iodo radioativo esta expressa como pmol I^-/µg DNA. Cada coluna representa a média ± SEM de tres experimentos independentes realizados em triplicata. *** $p < 0,001$ *vs* C. *One-way analysis of variance*.
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

3.6.5 Avaliação da via de internalização da proteína NIS

Frente aos resultados obtidos nos experimentos descritos anteriormente, o próximo passo do protocolo experimental foi avaliar se a redução da proteína NIS na membrana plasmática, bem como a conseqüente diminuição na atividade de captação de iodeto pelas células tireoidianas, se devia à rápida ativação de alguma via de internalização de proteínas.

Observou-se que o inibidor da via de internalização por clatrina foi capaz de impedir os efeitos inibitórios exercidos pelo excesso de iodeto nos tireócitos. Desta maneira, as células que foram tratadas com clorpromazina (20 µM), por uma hora, e então submetidas ao tratamento com excesso de iodo por 30 min, não apresentaram redução na captação de iodeto radioativo (**Figura 40A**) e no conteúdo de NIS na membrana plasmática (**Figura 40B**).

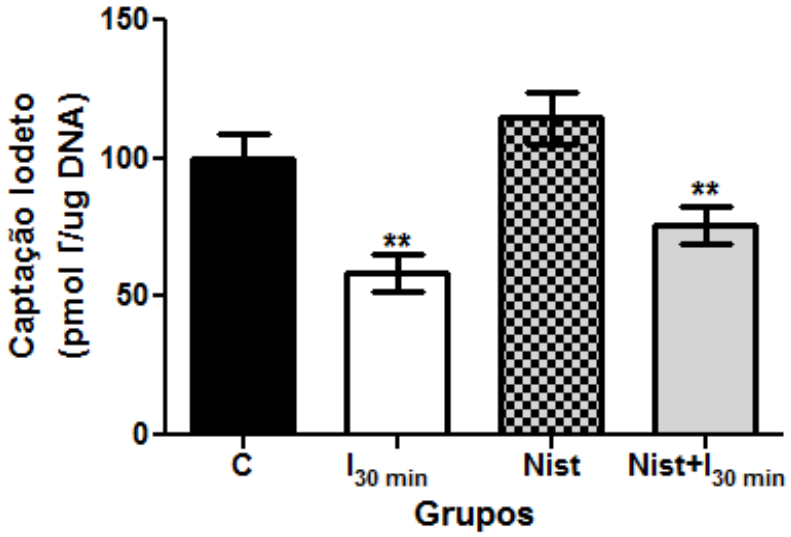
Figura 40 – Efeito da inibição da via de internalização por clatrina sobre a ação inibitória do iodo na captação de ^{125}I e expressão de NIS na membrana plasmática dos tireócitos.



Painel A – ensaios de captação de iodeto *steady-state* foram realizados em células PCCl3 incubadas por 1 h com clorpromazina (20 µM) e posteriormente, com iodeto de sódio (10^{-3} M). As células foram lavadas e incubadas com 20 µM NaI suplementado com 50 µCi/µmol $Na^{125}I$ por 45 min. A captação de iodo radioativo encontra-se expressa como pmol I⁻/µg DNA. Cada coluna representa a média ± SEM de três experimentos independentes realizados em triplicata. ** $p < 0,01$ *vs* C e Clrp. *One-way analysis of variance*. *Painel B* – Ensaios de biotinilação de membrana foram realizados em células tratadas por 1 h com clorpromazina (20 µM) e posteriormente, com iodeto de sódio por 30 min. As células foram incubadas com o reagente amino-específico e membrana-impermeável sulfo-NHS-SS-biotina. Após a incubação, o extrato de proteínas biotiniladas foi precipitado com *beads* de agarose-estreptavidina e posteriormente fez-se o imunoblot. A proteína e-caderina foi utilizada como normalizador da fração de proteínas de membrana. Imunoblots representativos das proteínas NIS e e-caderina encontram-se acima do gráfico. Os resultados estão expressos como média ± SEM de quatro experimentos independentes. ** $p < 0,01$ *vs* C e Clrp. *One-way analysis of variance*.
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

No entanto, a nistatina, droga que inibe a via de internalização por cavéolas, foi incapaz de bloquear os efeitos inibitórios desencadeados pelo excesso de iodeto nos tireócitos. Sendo assim, o tratamento das células tireoidianas com nistatina (5 µM) por 1 h e posteriormente, com iodeto de sódio (10^{-3} M) não impediu a redução da captação de iodeto radioativo induzida pelo tratamento apenas com excesso de iodeto (**Figura 41**).

Figura 41 – Efeito da inibição da via de internalização por cavéolas sobre a ação inibitória do iodo na captação de ^{125}I pelos tireócitos.

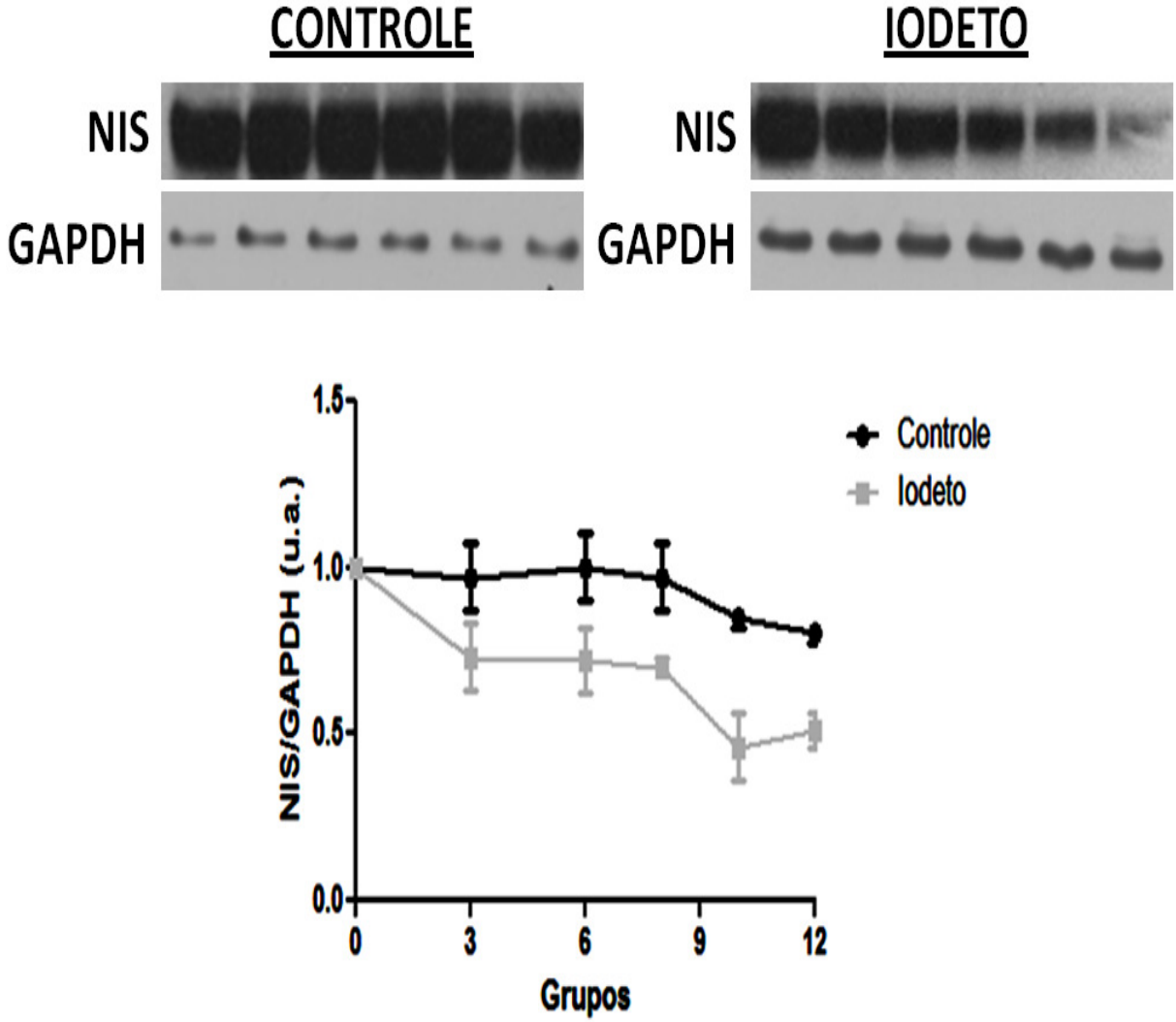


Ensaios de captação de iodeto *steady-state* foram realizados em células PCCl3 incubadas por 1 h com nistatina (5 µM) e posteriormente, com iodeto de sódio (10^{-3} M). Após os tratamentos, as células foram lavadas e incubadas com 20 µM NaI suplementado com 50 µCi/µmol $Na^{125}I$ por 45 min. A captação de iodo radioativo encontra-se expressa como pmol Γ/µg DNA. Cada coluna representa a média ± SEM de três experimentos independentes realizados em triplicata. ** $p < 0,01$ *vs* C. *One-way analysis of variance*.
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

3.6.6 Análise da meia-vida da proteína NIS

Dada a rápida redução da expressão de NIS frente ao tratamento com excesso de iodeto, foram realizados ensaios com um inibidor do processo de tradução, a ciclohexamida (CHX; 10 µg/ml), para análise da meia-vida da proteína NIS. De acordo com nossos resultados, a taxa de degradação da proteína NIS é acelerada quando as células tireoidianas são tratadas com iodo ($t_{1/2}$: 13 h), em relação àquelas do grupo controle ($t_{1/2}$: 24 h) (**Figura 42**).

Figura 42 – Análise da meia-vida da proteína NIS frente ao excesso de iodeto.



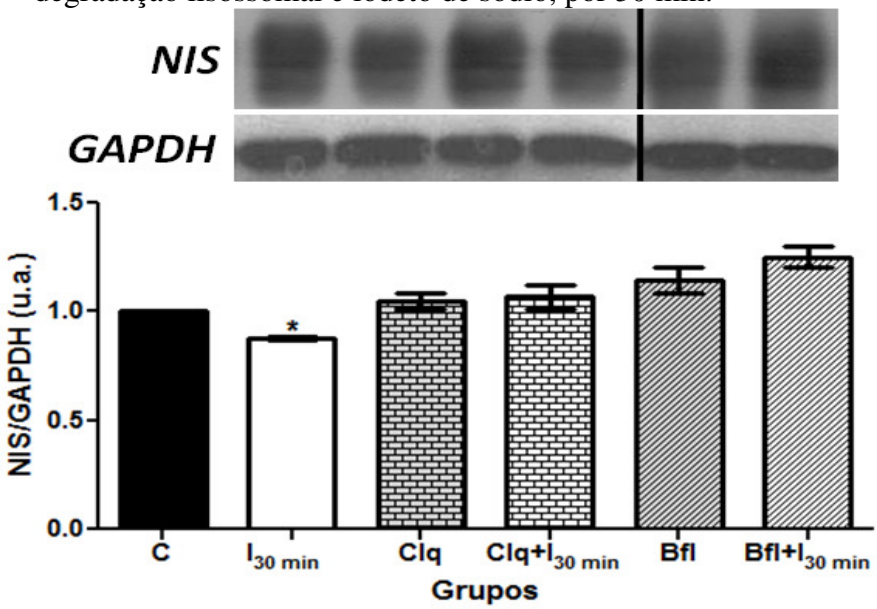
Células PCCl3 foram tratadas por 24 h com NaI e então submetidas ao tratamento com bloqueador da tradução, ciclohexamida (10 ug/ml), por 3-12 h. Representação gráfica dos resultados obtidos quanto ao conteúdo total de NIS nos grupos C e I, em diferentes períodos de tempo. Os imunoblots referentes ao conteúdo de NIS e GAPDH (normalizador) de cada grupo estão representados acima do gráfico. *Two-way analysis of variance.*
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

3.6.7 Avaliação da via de degradação de NIS

Dada a rápida diminuição da expressão de NIS e de sua meia-vida quando as células tireoidianas foram tratadas com NaI, fez-se a avaliação de qual via de degradação protéica estaria envolvida nos eventos observados.

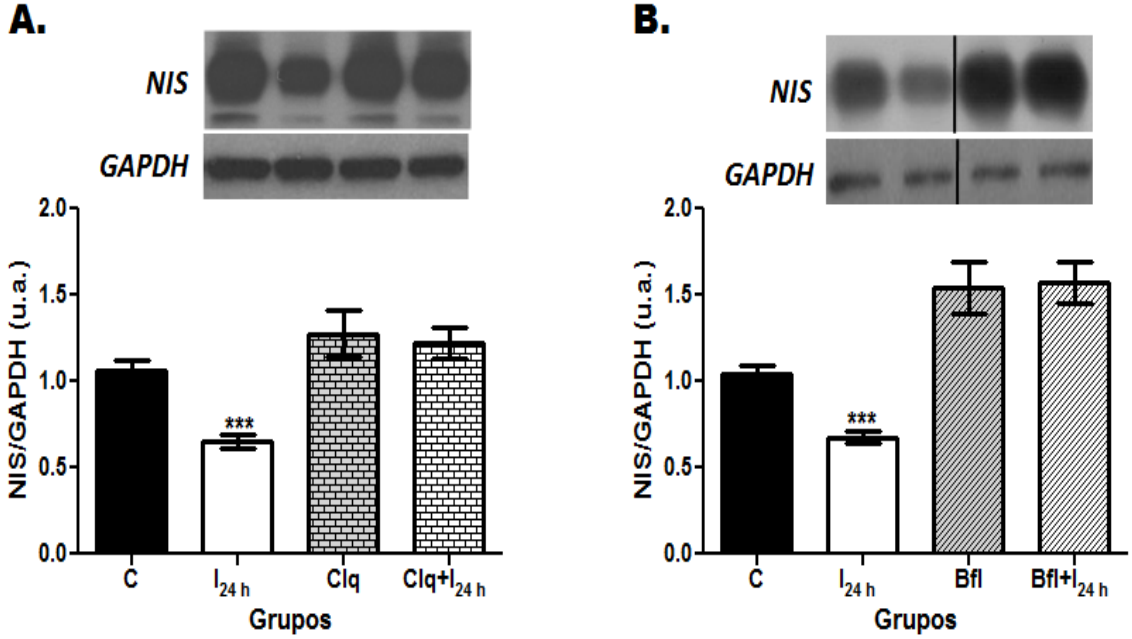
Quando as células foram tratadas por 1 h com cloroquina (50 μM) ou bafilomicina (100 nM), inibidores da proteólise por via lisossomal, e posteriormente tratadas com iodeto de sódio por 30 min (**Figura 43**) e 24 h (**Figura 44**), observou-se a prevenção da diminuição no conteúdo total de NIS induzida pelo tratamento apenas com excesso de iodeto.

Figura 43 – Análise do conteúdo total de NIS em células tratadas com inibidores da via de degradação lisossomal e iodeto de sódio, por 30 min.



Representação gráfica dos resultados obtidos quanto ao conteúdo total de NIS após tratamento de células PCCl3 com inibidores da degradação lisossomal cloroquina (50 µM) e bafilomicina (100 nM), e posteriormente tratadas com iodeto de sódio (10^{-3} M). Os imunoblots referentes ao conteúdo de NIS e GAPDH (normalizador) de cada grupo estão representados acima do gráfico. Cada coluna representa a média ± SEM de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ *vs* C. *One-way analysis of variance*.
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

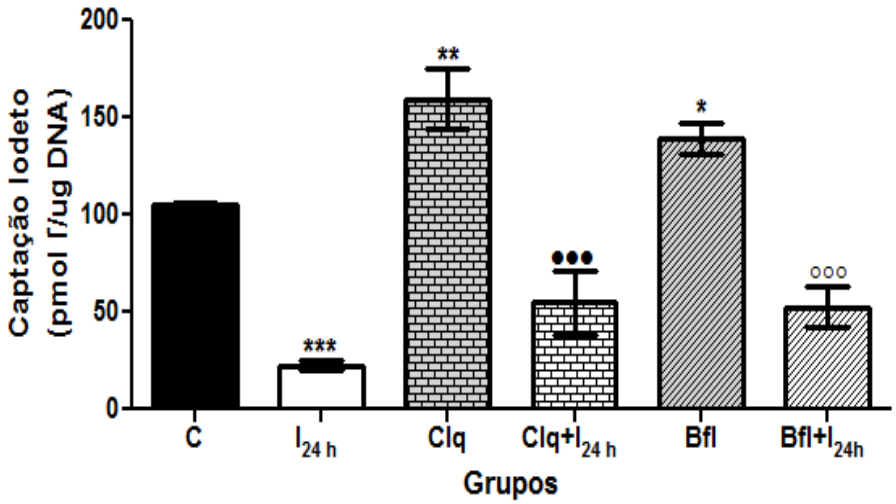
Figura 44 – Análise do conteúdo de NIS em células tratadas com inibidores da via de degradação lisossomal e iodeto de sódio, por 24 h.



Representação gráfica dos resultados obtidos quanto ao conteúdo total de NIS após tratamento de células PCCl3 com inibidores da degradação lisossomal cloroquina (50 µM) (A) e bafilomicina (100 nM) (B), e posteriormente tratadas com iodeto de sódio (10^{-3} M), por 24 h. Os imunoblots referentes ao conteúdo de NIS e GAPDH (normalizador) de cada grupo estão representados acima do gráfico. Cada coluna representa a média ± SEM de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$ *vs* C, Clq e Bfl. *One-way analysis of variance*.
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

É interessante ressaltar que quando as células foram tratadas com os inibidores de degradação lisossomal (cloroquina e bafilomicina) por 24 h, houve um aumento significativo da captação de iodo radioativo pelos tireócitos, em relação às células controle. Além disso, embora a presença dos inibidores lisossomais não tenha sido capaz de reverter completamente os efeitos inibitórios do excesso de iodeto sobre a captação de iodo após 24 h de tratamento, tanto as células tratadas com cloroquina, como as tratadas com bafilomicina, apresentaram um aumento na captação de iodo em relação àquelas tratadas apenas com NaI. Em relação aos seus respectivos controles, a captação nestes grupos foi: $I_{24\ h}$: 20% (*vs.* C), Clq+$I_{24\ h}$: 35% (*vs.* Clq) e Bfl+$I_{24\ h}$: 40% (*vs.* Bfl) (**Figura 45**).

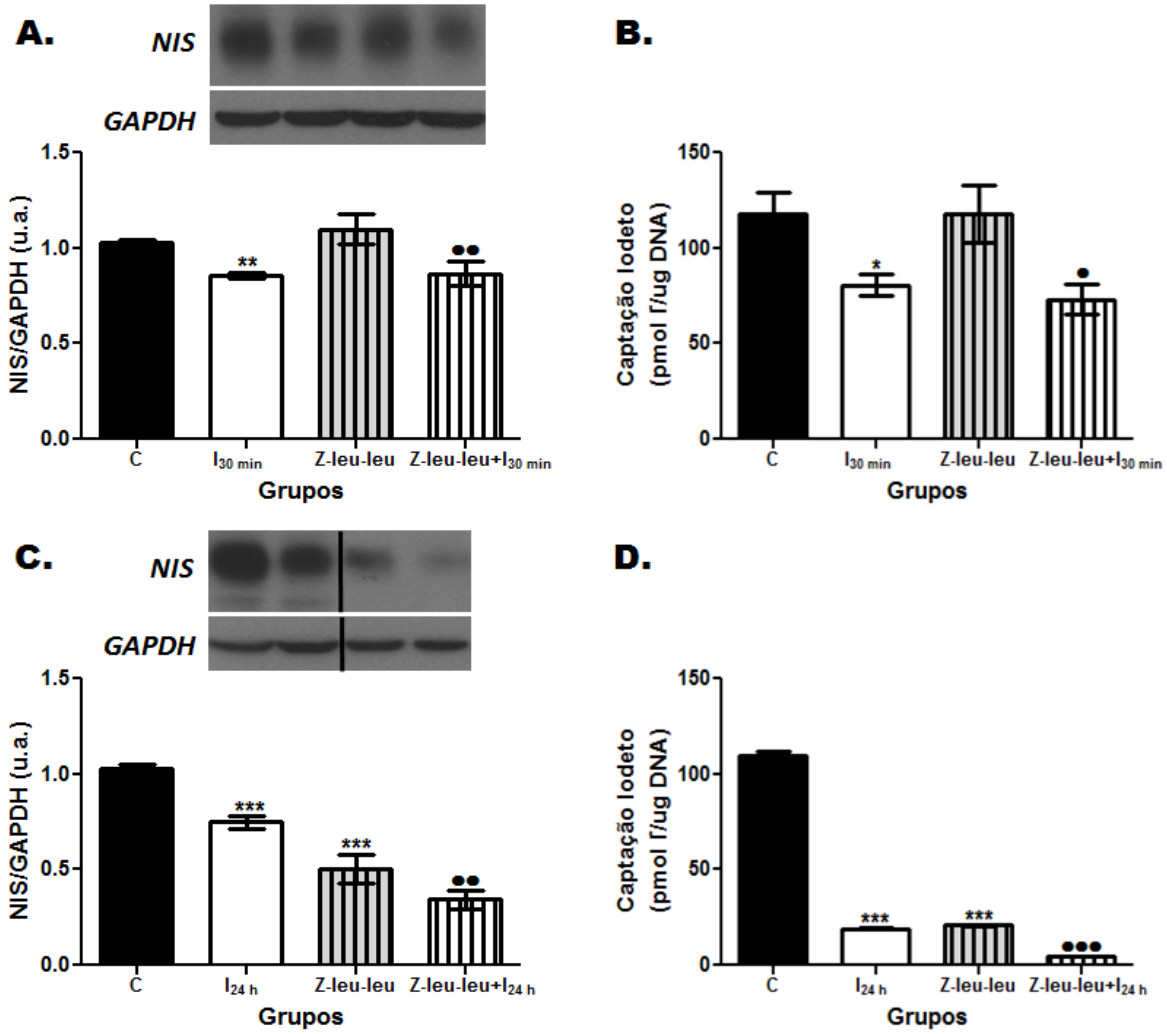
Figura 45 – Efeito da inibição da via de degradação lisossomal sobre a ação inibitória do iodo na captação de ^{125}I pelos tireócitos.



Ensaios de captação de iodeto *steady-state* foram realizados em células PCCl3 incubadas por 1 h com cloroquina (50 µM) e bafilomicina (100 nM) e posteriormente, com iodeto de sódio (10^{-3} M), por 24 h. Após os tratamentos, as células foram lavadas e incubadas com 20 µM NaI suplementado com 50 µCi/µmol $Na^{125}I$ por 45 min. A captação de iodo radioativo encontra-se expressa como pmol I^-/µg DNA. Cada coluna representa a média ± SEM de dois experimentos independentes realizados em triplicata. * p< 0,05; ** p< 0,01; *** p < 0,001 *vs* C; ••• p< 0,001 *vs* Clq; ooo p< 0,001 *vs* Bfl. *One-way analysis of variance*.
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

Todavia, o tratamento prévio de células PCCl3 com o inibidor da via de degradação proteassomal, Z-leu-leu-leu-al, não foi capaz de reverter os efeitos inibitórios sobre o conteúdo total de NIS e captação de iodeto induzidos pelo excesso de NaI por 30 min (**Figura 46A e 46B**) e 24 h (**Figura 46C e 46D**). Ainda, é importante ressaltar que o tratamento das células com este inibidor por 24 h reduziu significativamente o conteúdo total de proteína NIS e a captação de iodo radioativo por estes tireócitos, em relação ao grupo controle (**Figura 46C e 46D**).

Figura 46 – Efeito da inibição da via de degradação proteassomal sobre a ação inibitória do iodo na expressão de NIS e captação de ^{125}I pelos tireócitos.



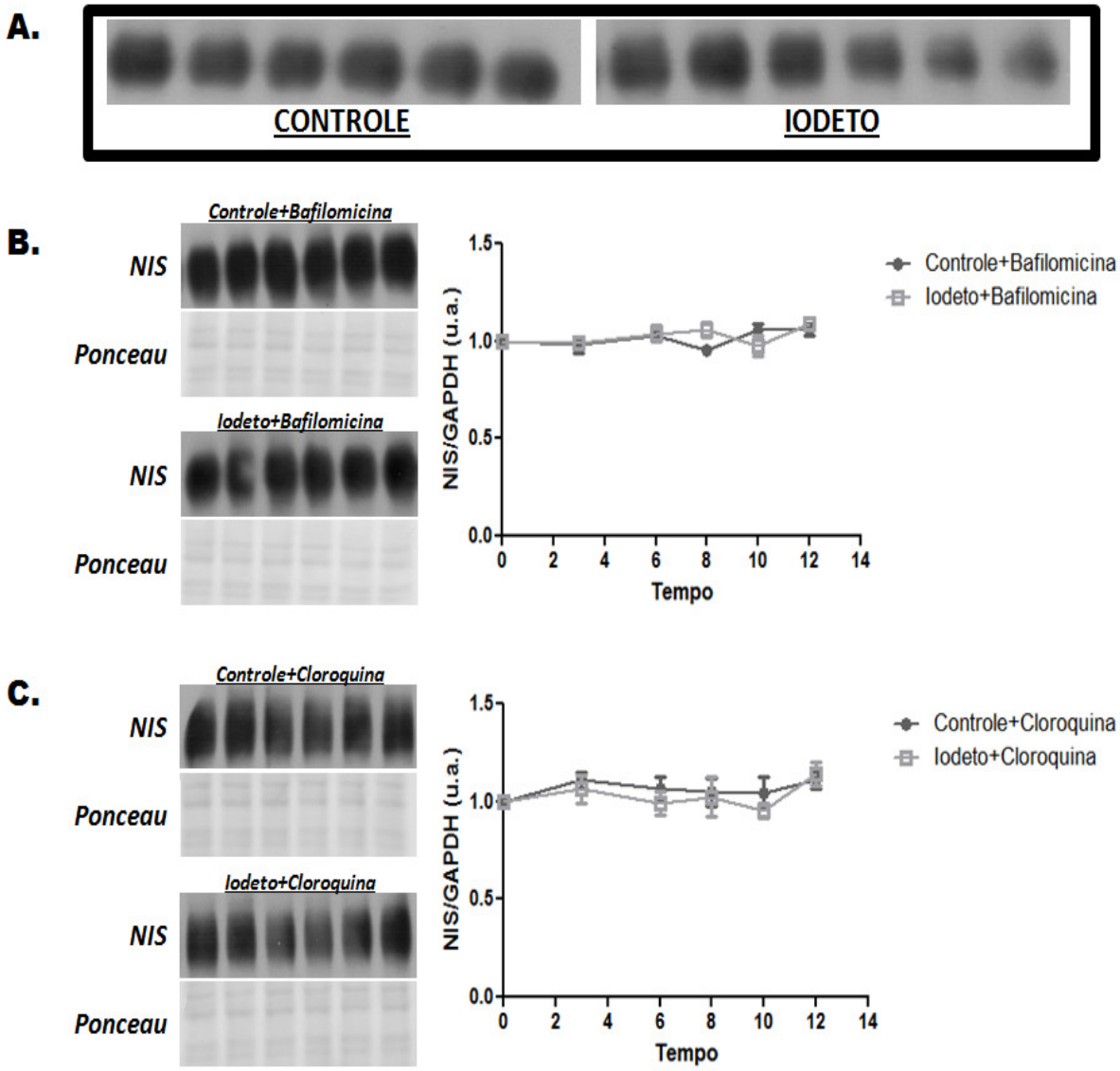
Painéis A e C – análise do conteúdo de NIS em células PCCl3 tratadas por 1 h com inibidor da via de degradação proteassomal, Z-leu-leu-leu-al (5 µM) e então submetidas ao tratamento com iodeto de sódio (10^{-3} M), por 30 min (A) e 24 h (C). Os imunoblots referentes ao conteúdo de NIS e GAPDH (normalizador) de cada grupo estão representados acima do gráfico. Cada coluna representa a média ± SEM de três experimentos independentes. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ *vs* C; •• $p< 0,01$ *vs* Z-leu-leu. *One-way analysis of variance*. *Painéis B e D* – ensaios de captação de iodo radioativo *steady-state* foram realizados em células PCCl3 incubadas por 1 h com Z-leu-leu-leu-al (5 µM) e posteriormente, com iodeto de sódio (10^{-3} M) por 30 min (B) e 24 h (D). As células foram lavadas e incubadas com 20 µM NaI suplementado com 50 µCi/µmol $Na^{125}I$ por 45 min. A captação de iodo radioativo encontra-se expressa como pmol I^-/µg DNA. Cada coluna representa a média ± SEM de dois experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ *vs* C; • $p< 0,05$; ••• $p<0,001$ *vs* Z-leu-leu. *One-way analysis of variance*.
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

3.6.8 Análise da meia-vida da proteína NIS frente ao excesso de iodeto e inibidores da degradação protéica

O aumento na taxa de degradação de NIS provocado pelo tratamento dos tireócitos com excesso de iodeto (**Figura 47A**) foi prevenido a partir do tratamento prévio das células com bafilomicina (**Figura 47B**) ou cloroquina (**Figura 47C**). Sendo assim, as células tratadas

com iodeto e inibidores da via de degradação lisossomal apresentaram taxa de decaimento semelhante àquela apresentada pelos respectivos grupos controle. Nos tempos mais curtos de tratamento, inclusive, foi possível observar um aumento no conteúdo total da proteína.

Figura 47 – Análise da meia-vida de NIS em células previamente tratadas com inibidores da via de degradação lisossomal, submetidas ao tratamento com excesso de iodeto.



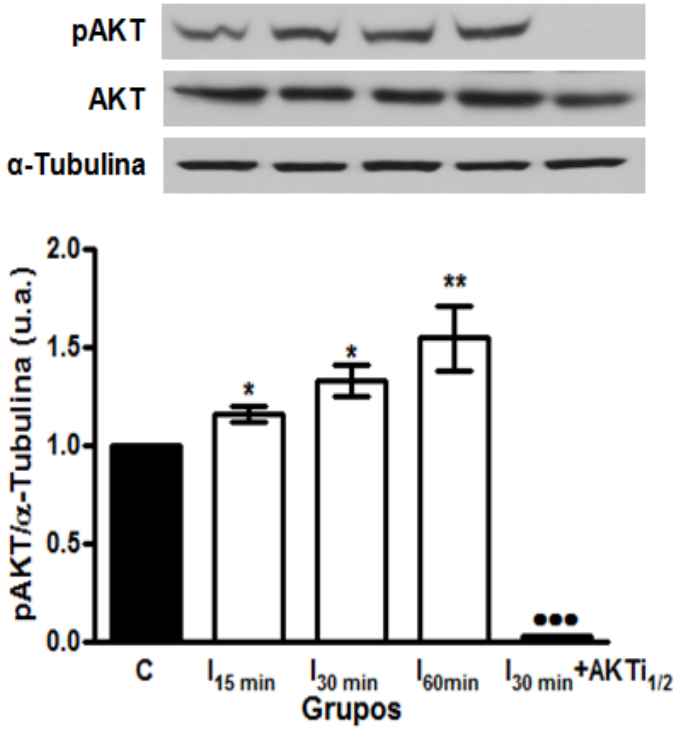
Células PCCl3 foram tratadas por 24 h com bafilomicina (100 nM), cloroquina (50 µM), iodeto de sódio (10^{-3} M), bafilomicina com iodeto de sódio, cloroquina com iodeto de sódio. Após este período, as células foram tratadas com o bloqueador da tradução ciclohexamida (10 ug/ml), por 0-12 h. *Painel A* – Imunoblots representativos do decaimento de NIS em células PCCl3 controle ou tratadas com iodeto de sódio. *Painel B* – Representação gráfica dos resultados obtidos quanto ao conteúdo total de NIS nos grupos tratados com bafilomicina ou bafilomicina + iodeto de sódio, e então submetidos ao tratamento com CHX. Os imunoblots referentes ao conteúdo de NIS e Ponceau (normalizador) de cada grupo estão representados ao lado do gráfico. Foram realizados quatro experimentos independentes. *Painel C* – Representação gráfica dos resultados obtidos quanto ao conteúdo total de NIS nos grupos tratados com cloroquina ou cloroquina + iodeto de sódio, e então submetidos ao tratamento com CHX. Os imunoblots referentes ao conteúdo de NIS e Ponceau (normalizador) de cada grupo estão representados ao lado do gráfico. Foram realizados quatro experimentos independentes. *Two-way analysis of variance.*
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

3.7 Avaliação do efeito do iodo na via de sinalização PI3K-Akt

3.7.1 Avaliação da fosforilação de Akt pelo excesso de iodeto

O tratamento de células PCCl3 com NaI aumentou a fosforilação de Akt em todos os tempos estudados, de 15 min até 1 h. O inibidor de AKTi1/2, utilizado como um controle da especificidade da reação de fosforilação, foi eficaz em bloquear a fosforilação de Akt frente ao tratamento com iodeto de sódio (**Figura 48**).

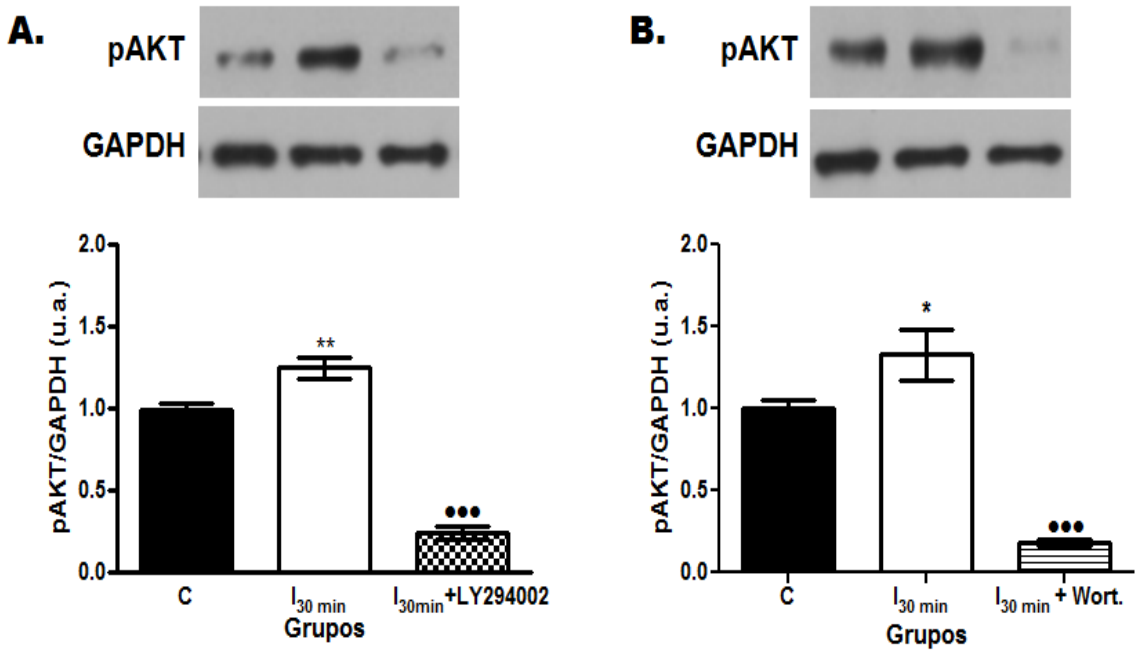
Figura 48 – Análise da fosforilação de Akt em células PCCl3 tratadas com iodeto de sódio.



As células foram tratadas com 10^{-3} M de NaI, e então homogeneizadas em tampão específico para proteínas fosforiladas. Em cada experimento, um dos poços foi tratado concomitantemente com NaI e $AKTi_{1/2}$, para que houvesse um controle interno da especificidade da fosforilação observada. Os imunoblots referentes à quantidade de Akt fosforilada, Akt total e α-tubulina (normalizador) de cada grupo estão representados acima do gráfico. Cada coluna representa a média ± SEM de três experimentos independentes. *p< 0,05; ** p < 0,01 *vs* C. *One-way analysis of variance*.
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

Além disso, o tratamento dos tireócitos com inibidores da ativação de PI3K, wortmanina (1 µM) e LY294002 (10 µM), preveniu que a ativação de Akt fosse desencadeada pela exposição ao excesso de iodeto por 30 min (**Figura 49**).

Figura 49 – A ativação de PI3K é necessária para que o tratamento de tireócitos com iodeto de sódio desencadeie a fosforilação de Akt.

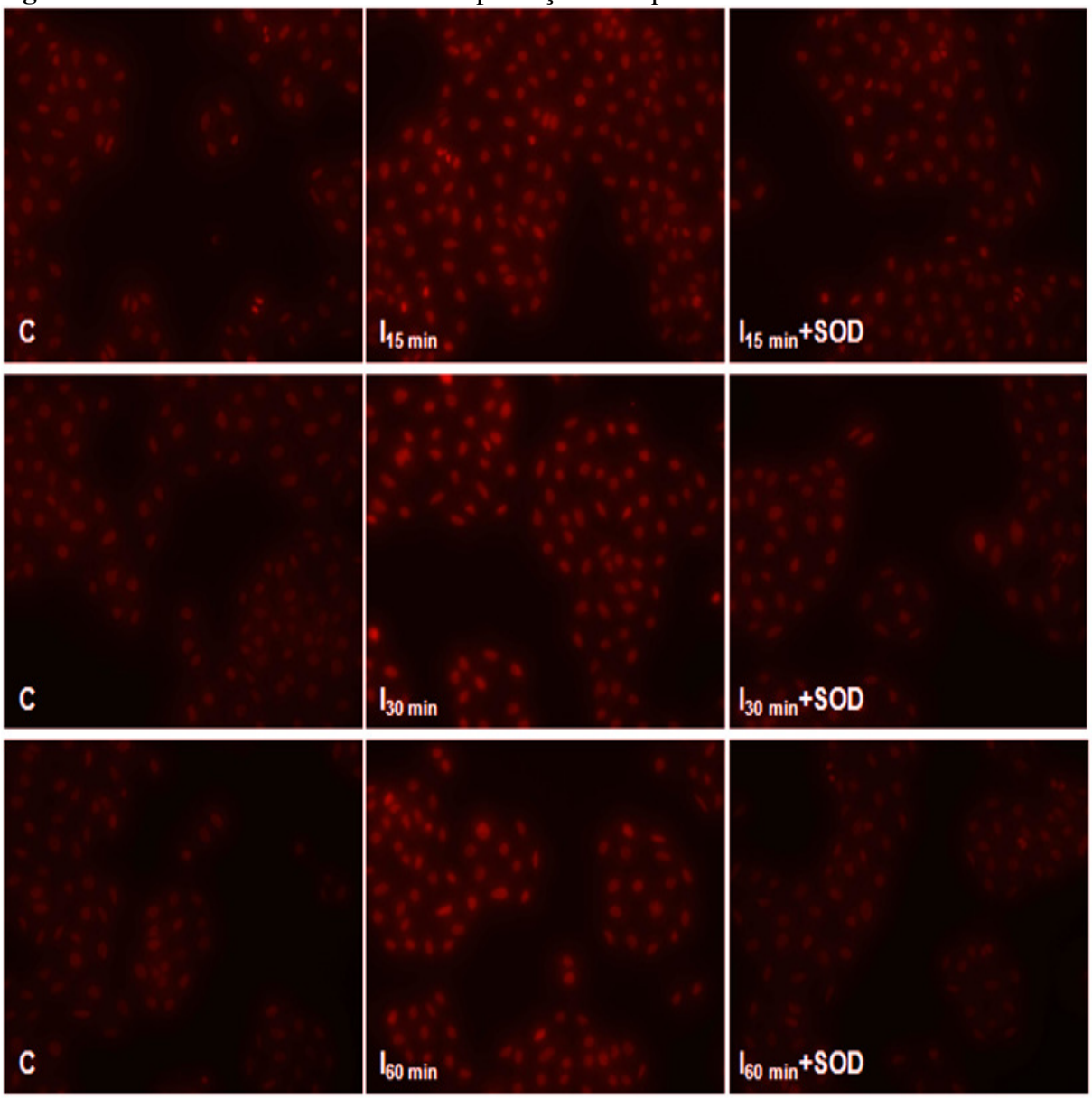


Células PCCl3 foram tratadas com 10^{-3} M de NaI, e/ou NaI+inibidores da PI3k, LY294002 (A) ou Wortmanina (Wort.) (B). As células foram então homogeneizadas em tampão específico para proteínas fosforiladas. Os imunoblots referentes à Akt fosforilada e GAPDH (normalizador) de cada grupo estão representados acima do gráfico. Cada coluna representa a média ± SEM de três experimentos independentes. *p< 0,05; ** p< 0,01 *vs* C. *One-way analysis of variance*.
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

3.7.2 Dosagem de ROS e seu papel na ativação da via de sinalização PI3K-Akt pelo excesso de iodeto

A partir dos ensaios de células PCCl3 tratadas com DHE, para dosagem de ROS, observou-se que o excesso de iodeto induz a produção de superóxido, um precursor da H_2O_2, nos tireócitos, em todos os períodos de tratamento estudados, de 15 min a 1 h. Além disso, o tratamento prévio das células com a enzima SOD-peg diminuiu o sinal de fluorescência gerado a partir do tratamento das células apenas com iodeto de sódio, demonstrando que a espécie reativa de oxigênio gerada a partir do tratamento com este oligoelemento realmente é $O_2^{\bullet -}$ (**Figura 50**).

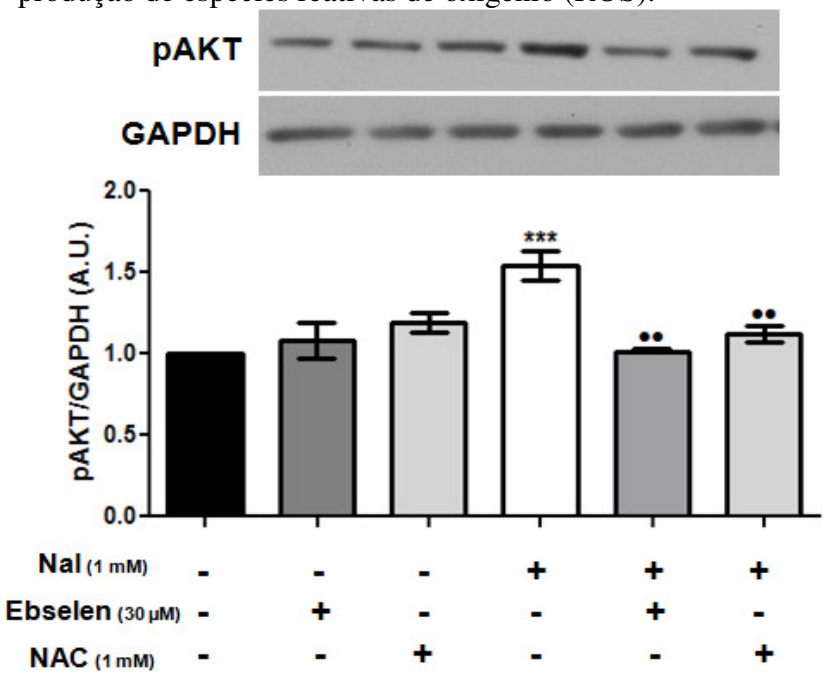
Figura 50 – O excesso de iodeto induz a produção de superóxido em células PCCl3.



As células tireoidianas foram pré-incubadas com SOD-peg (100 U/ml) por 30 min, e então por 10 min com DHE (5 μM). Posteriormente, as células foram tratadas por 15, 30 e 60 min com iodeto de sódio. A produção de superóxido foi avaliada utilizando-se o microscópio ZEISS Axiovert 100 M. Quanto maior a intensidade de vermelho, maior a produção de superóxido observada. Três experimentos independentes foram realizados. (X100).
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

Adicionalmente, a fosforilação de Akt induzida pelo tratamento das células PCCl3 com NaI por 30 min foi bloqueada quando os tireócitos foram previamente tratados com os agentes antioxidantes ebselen (30 μM) e *N*-acetil-cisteína (1 mM) (**Figura 51**).

Figura 51 – O excesso de iodeto induz a fosforilação de Akt, em tireócitos, através da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).



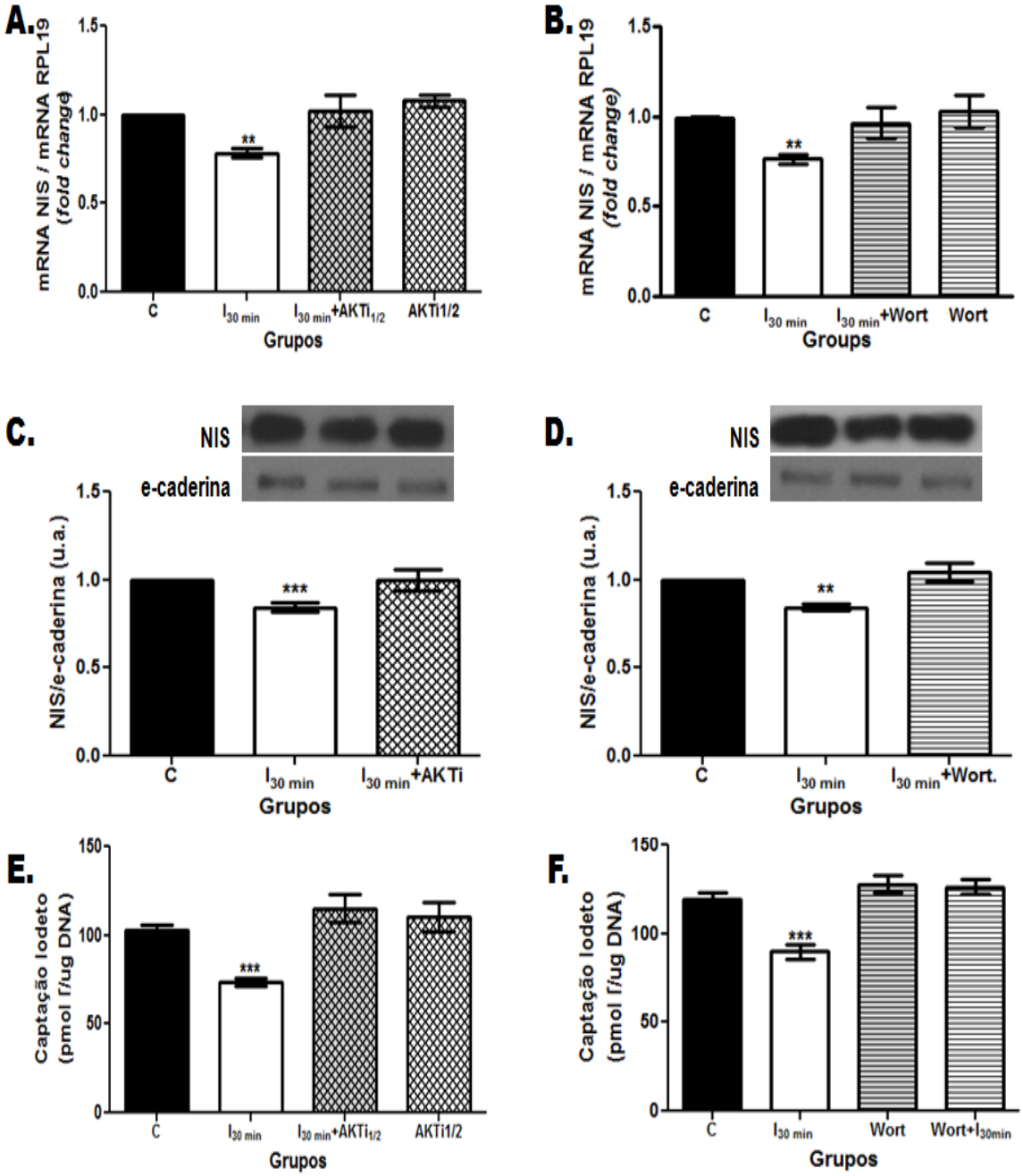
As células PCCl3 foram pré-incubadas, por 1 h, com sequestradores de ROS, Ebselen (30 µM) ou *N*-acetil-cisteína (NAC; 1 mM), e posteriormente expostas ao iodeto de sódio (10^{-3} M) por 30 min. Ensaios de *Western Blotting* foram realizados para analisar o conteúdo de Akt fosforilada, o conteúdo de GAPDH foi utilizado como normalizador. Os imunoblots representativos de pAkt e GAPDH encontram-se acima do gráfico. Os resultados são expressos como média ± SEM, em unidades arbitrárias. Foram realizados três experimentos independentes. *** p< 0,001 *vs* C; •• p<0,01 *vs* $I_{30\ min.}$ *One-way analysis of variance*.
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

3.7.3 Avaliação da inibição da atividade da via PI3K-Akt e suas conseqüências sobre a expressão e atividade de NIS frente ao excesso de iodeto

O tratamento subseqüente das células PCCl3 com inibidores da via de sinalização PI3K-Akt e iodeto de sódio, impediu a manifestação dos efeitos inibitórios desencadeados por este oligoelemento sobre a expressão e função de NIS.

Neste sentido, observou-se que o tratamento prévio das células PCCl3 com os inibidores $Akti_{1/2}$ e Wortmanina preveniu a redução da expressão do mRNA de NIS (**Figura 52A e 52B**), do conteúdo de NIS na membrana plasmática (**Figura 52C e 52D**) e da captação de iodo radioativo (**Figura 52E e 52F**) induzidos pelo excesso de iodeto, após 30 min de tratamento.

Figura 52 – Avaliação da inibição da via de sinalização PI3K/Akt sobre os efeitos inibitórios do iodeto na expressão e função de NIS em células PCCl3.



As células foram tratadas por 1 h com $AKTi_{1/2}$ ou Wortmanina (Wort.), e posteriormente, com NaI, por 30 min. *Painéis A e B* – Os valores obtidos referentes à expressão do mRNA de NIS foram normalizados pela expressão do mRNA de RPL19, por *Real-Time PCR*. Os dados encontram-se representados como média ± SEM de três experimentos independentes realizados em triplicata. ** p<0,01 *vs* C. *One-way analysis of variance*. *Painéis C e D* – Ensaios de biotinilação de membrana foram realizados, a partir da incubação das células com o reagente amino-específico e membrana-impermeável sulfo-NHS-SS-biotina. Após a incubação, o extrato de proteínas biotiniladas foi precipitado com *beads* de agarose-estreptavidina e posteriormente fez-se o imunoblot. A e-caderina foi utilizada como normalizador da fração de proteínas de membrana. Imunoblots representativos das proteínas NIS e e-caderina encontram-se acima dos gráficos. Os resultados estão expressos como média ± SEM de três experimentos independentes. ** p < 0,01; *** p < 0,001 *vs* C. *One-way analysis of variance*. *Painéis E e F* – Foram realizados ensaios de captação de iodeto *steady-state*. Após os respectivos tratamentos as células foram lavadas e incubadas com 20 µM NaI suplementado com 50 µCi/µmol $Na^{125}I$ por 45 min. A captação de iodo radioativo encontra-se expressa como pmol I⁻/µg DNA. Cada coluna representa a média ± SEM de dois experimentos independentes realizados em triplicata. *** p< 0,001 *vs* C. *One-way analysis of variance*.
Fonte: (Serrano-Nascimento, 2013).

4 DISCUSSÃO

A importância do iodo para a biossíntese HTs é incontestável (Farwell, Braverman, 2001; Larsen et al., 1998; Vaisman et al., 2003). Além disso, o iodeto também é um agente essencial para a regulação da expressão e função de NIS, além de outros genes tireoidianos, o que evidencia seu papel como regulador da função da tireoide (Eng et al., 1999; Eng et al., 2001; Leoni et al., 2008; Leoni et al., 2011; Spitzweg et al., 1999b; Uyttersprot et al., 1997; Wolff, Chaikoff, 1948).

Embora a regulação negativa de NIS pelo excesso iodeto esteja bem caracterizada, tanto *in vivo* quanto *in vitro,* os mecanismos moleculares desencadeados por este oligoelemento na promoção destes eventos não estão completamente esclarecidos.

Neste sentido, estudos recentes demonstraram que o excesso de iodeto é capaz de rapidamente regular a expressão e o comprimento da cauda poli(A) do mRNA de NIS, tanto em ratos quanto em células PCCl3 (Serrano-Nascimento et al., 2010; Serrano-Nascimento et al., 2012). A partir dos novos experimentos, aqui apresentados, utilizando-se a mesma linhagem celular demonstrou-se que o tratamento com NaI também interfere com a taxa de degradação do transcrito de NIS, uma vez que as células tratadas apresentaram uma abrupta redução da meia-vida do mRNA de NIS ($t_{1/2}$: 2 h) em relação às células controle ($t_{1/2}$: 6,5 h). É importante ressaltar que a meia-vida do transcrito de NIS das células controle é condizente com a apresentada pela literatura, o que reforça a fidedignidade dos dados apresentados (Kogai et al., 1997). Além disso, a redução abrupta da meia-vida também é condizente com dados recentes da literatura, sobre a regulação de NIS pelo iodeto em enterócitos (Nicola et al., 2012).

Existem evidências na literatura, de que assim como o iodeto, outros oligoelementos (ferro, selênio e cálcio) regulam a expressão de proteínas relacionadas com seu transporte/metabolismo. Estes micronutrientes agem através de mecanismos pós-transcricionais que envolvem sua interação com elementos responsivos nos mRNAs, alterando o comprimento da cauda poli(A) e, consequentemente, a estabilidade destas moléculas (Bermano et al., 1996a; Bermano et al., 1996b; Eisenstein, 2000; Kilav et al., 2001; Lodish et al., 1999; Moallem et al., 1998; Naveh-Many et al., 2002; Rouault, 2002; Sela-Brown et al., 2000; Wallander et al., 2006).

Além da relação entre tamanho da cauda poli(A) e estabilidade dos transcritos, sabe-se que esta última também é regulada por alterações na taxa de degradação destas moléculas,

normalmente ocasionada pela ativação/inativação de proteínas (elementos *trans*) que interagem com regiões regulatórias específicas nos mRNAs (elementos *cis*) (Gingerich et al., 2004). Além disso, existe uma relação direta entre estabilidade e meia-vida de transcritos. Desta maneira, fica evidente que o conteúdo de um determinado mRNA na célula não depende apenas da taxa de transcrição do gene que o codifica, mas também de sua estabilidade. Sendo assim, quanto maior a cauda poli(A) do mRNA, maior é a sua estabilidade, meia-vida e eficiência de tradução, ocorrendo o oposto quando há redução do grau de poliadenilação do mesmo. Estes eventos ocorrem porque à cauda poli(A) se associam proteínas que a protegem da clivagem por exoribonucleases e que participam do seu ancoramento à maquinaria de tradução (Gingerich et al., 2004; Robinson, 1988; Ross, 1995).

Desta maneira, a redução da meia-vida do transcrito de NIS frente ao tratamento com iodeto indica que este oligoelemento atua pós-transcricionalmente no processamento deste mRNA. Sugere-se assim, que o iodeto aumenta a taxa de degradação do transcrito de NIS através da redução do comprimento da cauda poli(A) deste transcrito (Serrano-Nascimento et al., 2010; Serrano-Nascimento et al., 2012).

As regiões regulatórias presentes nos mRNAs (elementos *cis*) geralmente possuem sequências específicas de bases susceptíveis a ação de nucleases, e são freqüentemente encontradas em regiões 3'UTR (Wilson et al., 1999), bem como na 5'UTR (Brennan, Steitz, 2001), embora também sejam encontradas em regiões codificadoras (Jacobson, Peltz, 1996). Sendo assim, a importância das regiões não traduzíveis dos mRNAs explicita-se principalmente pelo seu papel na regulação pós-transcricional da expressão dos transcritos.

Embora estas regiões regulatórias sejam encontradas por todo mRNA, é geralmente na porção 3'UTR que são encontrados *motifs* de desestabilização, alvos da ação de endonucleases, que são protegidos por proteínas regulatórias (Wilson et al., 1999). Desta maneira, qualquer fator que interfira nesta relação proteína-mRNA poderia promover uma alteração na estabilidade, e consequentemente, na expressão dos transcritos (Gingerich et al., 2004; Lodish et al., 1999).

Os resultados obtidos indicaram que este tipo de mecanismo regulatório é acionado pela presença do iodeto, uma vez que quando as *células eGFP-3'UTR* foram tratadas com excesso de iodeto, observou-se menor expressão e meia-vida do mRNA de eGFP, reduzida associação deste transcrito com ribossomos, além de menor conteúdo total de eGFP. Enquanto isso, a ausência da porção 3'UTR do mRNA de NIS nos plasmídeos eGFP-C2 garantiu que o tratamento de *células eGFP* com NaI não induzisse qualquer alteração na

expressão, meia-vida e taxa de tradução de eGFP. Estes resultados, em conjunto, indicam que algum fator/*motif* presente na porção 3'UTR do mRNA de NIS seja fundamental para o desencadeamento dos efeitos observados.

É importante ressaltar que, efeitos tão rápidos (30 min) quanto àqueles observado para NIS foram também observados para o transcrito de eGFP, indicando pela primeira vez, que a região 3'UTR do mRNA de NIS é responsiva ao iodeto.

Adicionalmente, a partir de deleções da região 3'UTR, delimitou-se um fragmento de 298 pb que parece conter o *motif* responsivo ao iodeto em células tireoidianas. Esta delimitação é de extrema importância, uma vez que indica novos caminhos de investigação sobre quais proteínas e/ou miRNAs poderiam estar envolvidos na regulação inibitória pós-transcricional do iodeto sobre o mRNA de NIS.

A região 5' não traduzível do mRNA de NIS, por sua vez, não apresentou responsividade à presença de iodeto. Esta região foi avaliada uma vez que alguns oligoelementos interagem com ambas as regiões não traduzíveis (5'UTR e 3'UTR) de diferentes transcritos, refletindo em diferentes mecanismos de regulação (Lodish et al., 1999). A interação do ferro com a região 5' não traduzível do mRNA da ferritina, por exemplo, interfere com a taxa de tradução deste transcrito (Butt et al., 1999; Caltagirone et al., 2001; Erlitzki et al., 2002). Entretanto, na presença da porção 5'UTR do mRNA de NIS não ocorreu qualquer alteração da expressão de eGFP em células submetidas ao tratamento com excesso de iodeto, indicando que esta região não está envolvida nos eventos pós-transcricionais observados.

Contudo, além da regulação pós-transcricional, já foi sugerido que em tempos mais longos de exposição o iodeto desencadeia mecanismos transcricionais de regulação. De fato, demonstrou-se que a partir de 12 h de tratamento, o iodeto diminui abruptamente o conteúdo de mRNA de NIS, sem alterar o comprimento da cauda poli(A) deste transcrito (Serrano-Nascimento et al., 2012).

Com o intuito de avaliar a participação destes eventos transcricionais na regulação da expressão de NIS pelo iodeto, células PCCl3 foram transfectadas com vetores contendo o gene da luciferase sob o comando do promotor completo de NIS ou de sua região *enhancer*. Os resultados confirmaram que após 12 h de tratamento há uma redução na taxa de transcrição do gene da NIS, que justifica a diminuída expressão deste transcrito.

A atividade do promotor de NIS depende da ligação de uma série de fatores transcricionais. Dentre eles destaca-se o Pax8, um dos principais fatores responsáveis pela

ativação de expressão de NIS, e que apresenta dois sítios específicos de ligação no promotor deste gene em ratos (Costamagna et al., 2004; Endo et al., 1997; Ohno et al., 1999; Tong et al., 1997). O TTF-1 parece não exercer um efeito estimulatório muito relevante sobre a atividade do promotor de NIS, ainda que sua região *enhancer* possua um sítio de ligação para este fator. Recentemente, um sítio de ligação para o fator transcricional p65 foi descrito no *enhancer* de NIS, próximo a um dos sítios de ligação de Pax8. Além disso, estudos demonstraram que há uma interação física entre estes dois fatores transcricionais, o que aumenta sinergicamente a transcrição do gene da NIS (Nicola et al., 2010).

As deleções de cada um dos sítios de ligação de Pax8 ou p65 no *enhancer* do promotor de NIS bloquearam a redução da atividade deste promotor induzida pelo tratamento com excesso de iodeto, por 12 e 24 h. Sendo assim, sugere-se que os eventos transcricionais desencadeados pelo iodeto dependam destes fatores transcricionais.

De acordo com a literatura e com os dados obtidos no presente estudo, o excesso de iodeto não altera a expressão de Pax8 (Leoni et al., 2011), ou de p65. Todavia, os ensaios de fracionamento protéico e imunofluorescência, demonstraram que células tratadas com iodeto apresentam menor conteúdo destes fatores transcricionais no núcleo e maior conteúdo dos mesmos no citoplasma, sugerindo um comprometimento da translocação destes fatores para o núcleo. É muito provável que essa reduzida translocação para o núcleo tenha relação com a reduzida taxa de ligação de Pax8 e p65 em suas regiões específicas no promotor de NIS. É possível que o desarranjo do citoesqueleto de actina induzido pelo iodeto e observado neste estudo também esteja envolvido neste evento, já que poderia comprometer a translocação destes fatores transcricionais do citoplasma para o núcleo. Eventos adicionais relacionados ao processo de desorganização do citoesqueleto de actina serão discutidos adiante.

Resumindo, o tratamento de tireócitos com NaI por 12 e 24 h desencadeia uma série de eventos transcricionais de regulação da expressão de NIS, embora não se exclua a contribuição de outros eventos pós-transcricionais nestes períodos de tratamento.

É importante ressaltar que não foi observada qualquer alteração na atividade do promotor de NIS, após 30 min, 1h e 2 h de tratamento com iodeto. Este resultado confirma que os efeitos desencadeados pelo iodeto em curtos períodos de tempo (30 min – 2 h) dependem exclusivamente de eventos pós-transcricionais e os mais tardios, predominantemente de eventos transcricionais.

Deve-se levar em consideração que, além do comprimento da cauda poli(A) e da contribuição da região 3'UTR, temas já discutidos anteriormente, outros mecanismos estão envolvidos na regulação pós-transcricional da expressão de genes.

Descreve-se, por exemplo, que a organização do citoesqueleto de actina desempenha um importante papel na manutenção da estabilidade de mRNAs. Sabe-se que a esta estrutura associam-se proteínas de fundamental importância para a poliadenilação de transcritos, como a PAP (*poly-A polimerase*) e PABP (*poly-A binding protein*) (Mohr, 2001; Schroder, 1982). Desta maneira, eventos que promovam a desorganização do citoesqueleto, podem comprometer a poliadenilação e o ancoramento dos transcritos, afetando sua estabilidade e eficiência de tradução.

A literatura apresenta dados concretos de que o excesso de iodeto altera a morfologia dos tireócitos, sugerindo alterações no arcabouço celular (Takasu et al., 1985; Yamazaki et al, 2007). Os resultados apresentados neste estudo corroboraram estes dados, já que os ensaios de fracionamento de actina e de imunofluorescência demonstraram que o iodeto compromete a organização do citoesqueleto de actina de células tireoidianas, em ambos os períodos estudados (30 min e 12h).

Uma vez que o citoesqueleto desempenha importantes funções na manutenção da estabilidade e poliadenilação de transcritos, é possível que a desorganização desta estrutura contribua para a redução do comprimento de cauda poli(A) do transcrito de NIS, observada anteriormente (Serrano-Nascimento et al., 2010; Serrano-Nascimento et al., 2012).

Ao citoesqueleto associam-se fatores, que além de atuarem no processo de tradução, auxiliam no ancoramento de transcritos, como é o caso do eEF1α (Liu et al., 2002). Há evidências de que a interação entre eEF1α e o citoesqueleto de actina seja extremamente importante para a manutenção da estabilidade de alguns transcritos, já que estes, ancorados ao citoesqueleto, estariam protegidos da ação de RNAses, bem como para o direciomanto de transcritos à regiões específicas das células, para a geração local de proteína (Levadoux et al.,1999; Liu et al., 2002; Mahon et al., 1997).

Os resultados apresentados corroboram em parte estes efeitos.

As células tireoidianas tratadas por 30 min com excesso de NaI apresentaram diminuição da associação de eEF1α com a actina polimerizada, sem que alterações em seu conteúdo total fossem observadas. Simultaneamente, foi possível observar um menor ancoramento do transcrito de NIS ao citoesqueleto. Este evento sugere o importante papel deste fator, na ancoragem deste transcrito ao arcabouço celular. De acordo com o que se

apresentou anteriormente, o menor ancoramento do transcrito de NIS ao citoesqueleto aumentaria sua susceptibilidade à ação de exonucleases, contribuindo para a diminuição do comprimento da sua cauda poli(A), do seu conteúdo total, e da sua taxa de tradução, efeitos descritos em estudos anteriores (Eng et al., 1999; Eng et al., 2001; Leoni et al., 2008; Leoni et al., 2011; Serrano-Nascimento et al., 2010, Serrano-Nascimento et al., 2012).

No entanto, após 12 h de tratamento com NaI, outros mecanismos passam a atuar, uma vez que houve redução do conteúdo total de eEF1α e da associação do mRNA de NIS ao citoesqueleto, sem que alterações na associação deste fator ao citoesqueleto fossem observadas. Neste caso, apesar da diminuição de eEF1α ser condizente com a menor ancoragem do transcrito de NIS ao citoesqueleto, não se pode descartar a participação de outros fatores de ancoramento (Jasen, 2001; Shannon et al., 1998; Singer, 1992).

A redução no conteúdo total de eEF1α observada poderia refletir em menor atividade global do processo de tradução nos tireócitos, visto que além de ancorar transcritos este fator tem um papel fundamental no alongamento da cadeia polipeptídica (Liu et al., 2002; Mickleburgh et al., 2004).

O citoesqueleto desempenha outras funções, como translocação de proteínas entre os diferentes compartimentos celulares, mobilidade celular, secreção de hormônios (Dominguez, Holmes, 2011; Egelman, Orlova, 1995; Insall, Machesky, 2009; Schoenenberger et al., 2011). Assim, a desorganização do citoesqueleto de actina induzida pelo iodeto, poderia estar associada a outros eventos inibitórios desencadeados por este oligoelemento, como no comprometimento da translocação de NIS para a membrana plasmática de tireócitos, ou dos fatores transcricionais Pax8 e p65 para o núcleo, conforme descrito anteriormente.

De fato, em todos os períodos estudados, o excesso de iodeto promoveu diminuição no conteúdo de NIS presente na membrana plasmática das células PCCl3 – resultado confirmado por ensaios de biotinilação de superfície e imunocitoquímica. Estes resultados justificam a menor captação de iodeto radioativo observada, uma vez que esta atividade depende da quantidade de NIS inserida na membrana plasmática. Os dados de captação apresentados, inclusive, corroboraram dados apresentados por outros grupos de pesquisa, que demonstraram o comprometimento da captação de iodo radioativo em tireócitos tratados com excesso de iodeto, e que este efeito aumenta progressivamente quanto maior o tempo de tratamento (Grollman et al., 1986; Leoni et al., 2011; Takasu et al., 1985).

Em conjunto, estes resultados de menor conteúdo de NIS na membrana plasmática e de menor captação de iodeto radioativo fundamentam o mecanismo de escape do efeito

Wolff-Chaikoff (Wolff, Chaikoff, 1949), uma vez que levam à redução do conteúdo intracelular de iodeto nos tireócitos e, consequentemente, à recuperação das funções de síntese e secreção de hormônios, em períodos mais longos de tratamento com excesso de iodo.

Outros fatores poderiam contribuir para a menor quantidade de proteína NIS presente na membrana plasmática, além da desorganização do citoesqueleto de actina. Por este motivo, avaliou-se a participação de vias de internalização de proteínas de membrana nos eventos inibitórios desencadeados pelo iodeto. Existem duas vias muito importantes que participam deste processo de internalização, a via da clatrina e a via da caveolina (Kumari et al., 2010; Nichols et al., 2003).

Os resultados apresentados neste estudo fornecem fortes evidências de que a via da clatrina seja ativada pelo excesso de iodeto, uma vez que o tratamento concomitante de células PCCl3 com NaI e clorpromazina impediu que a rápida (30 min) redução da atividade de NIS e de seu conteúdo na membrana plasmática fossem observadas. A literatura demonstra que a porção carboxi-terminal da NIS possui um *motif* com duas leucinas ($L_{557}L_{558}$), que parece ter um papel importante no *sorting* de algumas proteínas de membrana, por interagir com a maquinaria de internalização por clatrinas (Dietrich et al., 1997; Tan et al., 1998). Desta maneira, a redução de NIS na membrana plasmática poderia envolver a interação entre o *motif* dileucina e as clatrinas. Adicionalmente, o inibidor da via de internalização por caveolina, nistatina, não foi capaz de reverter os efeitos inibitórios do iodeto sobre a atividade de NIS, e por esse motivo, é pouco provável que esta via esteja relacionada com o processo de internalização de NIS induzido pelo iodeto.

Estudos anteriores indicaram a necessidade de um citoesqueleto de actina organizado para que o processo de internalização por clatrina aconteça normalmente (Galleta et al., 2010; Yarar et al., 2005). Contudo, outros estudos demonstraram que a desorganização do citoesqueleto de actina potencializa a internalização de proteínas mediada por clatrinas, efeito dependente da célula estudada (Boucrot et al., 2006; Fujimoto et al., 2000; Uriarte et al., 2009). Um estudo, em especial, sugeriu que o citoesqueleto de microtúbulos fornece a força mecânica necessária para o processo de endocitose, enquanto que o citoesqueleto de actina inibe este processo (Uriarte et al., 2009). Sendo assim, a desorganização do citoesqueleto de actina em tireócitos tratados com iodeto pode ter relação direta com a endocitose mediada por clatrina, induzida pelo mesmo tratamento nestas células.

Além da menor quantidade de NIS na membrana plasmática, também foi observado menor conteúdo total de NIS em células PCCl3 tratadas com iodeto. Neste quesito, conforme já explicitado, sabe-se que a diminuição da cauda poli(A) pode refletir em menor recrutamento de transcritos para os ribossomos, comprometendo o processo de tradução. De fato, já foi demonstrado que células PCCl3 tratadas com excesso de iodeto apresentam reduzido conteúdo de mRNA de NIS associado aos ribossomos (Serrano-Nascimento et al., 2012).

A redução de NIS após períodos mais longos de tratamento com iodeto (12 e 24 h) não é surpreendente, uma vez que outros estudos reportaram dados semelhantes (Eng et al., 1999; Eng et al., 2001; Leoni et al., 2011). Contudo, embora existam dados que corroborem e até justifiquem a redução da proteína NIS já em 30 min, este é um dado intrigante. Alguns estudos apontam que a meia-vida de NIS é de aproximadamente quatro dias (Kogai et al., 1997; Paire et al., 1997; Riedel et al., 2001). Outros estudos sugerem que a meia-vida desta proteína em sistemas *in vitro* seja muito mais curta – menor do que 24 horas (Eng et al., 2001; Nicola et al., 2012).

Para determinação da meia-vida de NIS frente ao tratamento com NaI, células PCCl3 foram tratadas com o inibidor de tradução, ciclohexamida (10 ug/ml), em diferentes períodos de tempo. A partir dos resultados, pode-se concluir que a meia-vida de NIS foi reduzida pelo tratamento com iodeto. Estes resultados sugerem que em paralelo à menor associação do transcrito de NIS aos ribossomos, outros eventos estejam envolvidos, como modificações pós-traducionais ou ativação de um rápido processo de degradação desta proteína (Eng et al., 2001; Riedel et al., 2001). Neste sentido, buscou-se avaliar se esse último processo estava envolvido na redução da expressão de NIS induzida pelo excesso de iodeto nos tireócitos. Para tanto, no presente estudo, foram utilizados inibidores específicos da via proteassomal (Z-leu-leu-leu-al) e lisossomal (cloroquina e bafilomicina) de degradação (Knecht et al., 2009; Ciechanover, 2010).

Embora alguns estudos tenham mostrado a associação de NIS à calnexinas, ubiquitinas e subunidades do proteassoma (Vadysirisack et al., 2008), e que em enterócitos a redução de NIS induzida pelo iodeto parece envolver esta via de degradação proteica (Nicola et al., 2012), o Z-leu-leu-leu-al foi incapaz de impedir o efeito inibitório induzido pelo iodeto (por 30 min e 24 h) sobre a expressão e função de NIS, em tireócitos. Sendo assim, é pouco provável que a via proteassomal de degradação proteica esteja envolvida na rápida redução da expressão de NIS em tireoide.

A utilização de inibidores da via lisossomal de degradação, por sua vez, preveniu a redução do conteúdo de NIS observada após o tratamento dos tireócitos por 30 min ou 24 h com NaI. A redução da meia-vida de NIS também não foi evidenciada quando as células foram previamente tratadas com estes inibidores. Entretanto, a presença dos inibidores lisossomais não reverteu completamente os efeitos inibitórios do iodeto sobre a captação de iodo, após 24 h de tratamento.

Estes dados sugerem que o excesso de iodo desencadeie primeiramente eventos de internalização de NIS, seguidos por outros relacionados à degradação proteica por lisossomos. Sendo assim, como a captação de iodeto depende da NIS presente na membrana plasmática, e uma vez que os inibidores lisossomais não impedem que ela seja internalizada, eles seriam apenas capazes de bloquear a redução do conteúdo total desta proteína, mas não a redução de sua atividade.

Além dos eventos anteriormente descritos, sabe-se que a ativação ou inativação de diferentes vias de sinalização regulam a expressão e atividade de NIS em tireócitos. Desta maneira, enquanto a ativação da via adenilil-ciclase pelo TSH estimula a expressão e atividade desta proteína (Vassart, Dumont, 1992), a ativação da via da PI3K/Akt inibe NIS (de Souza et al., 2010; García, Santisteban, 2002; Kogai et al., 2008; Zabalos et al., 2008). Inclusive, alguns estudos indicam que a ativação da via de sinalização da PI3K/Akt leva, em algumas células, à produção de óxido nítrico, que é responsável por inibir a atividade e a expressão de NIS em células FRTL5 (Carrillo-Sepulveda et al., 2010; Cheng et al., 2012; Chung et al., 2008; Fozzatti et al., 2007; Kobayashi et al., 2003). Tem-se demonstrado também, que a ativação desta via de sinalização compromete a translocação de fatores transcricionais (como o Pax8) para o núcleo, reduz a atividade do promotor de NIS, e diminui a atividade desta proteína na captação de iodeto pelas células tireoidianas (de Souza et al., 2010; García, Santisteban, 2002; Kogai et al., 2008; Zabalos et al., 2008). Outros estudos ainda, indicaram que a ativação de PI3K/Akt está relacionada com o aumento da endocitose de proteínas de membrana mediada por clatrina (Botelho et al., 2002; Uriarte et al., 2009), e conforme discutido anteriormente, esta provavelmente é a via de internalização proteica acionada pelo excesso de iodeto no modelo experimental estudado.

Os resultados apresentados neste estudo indicaram que o iodeto induz rapidamente a fosforilação de Akt, via ativação *upstream* de PI3K. Adicionalmente, à medida que células PCCl3 foram concomitantemente tratadas com NaI e inibidores da ativação destas proteínas, os rápidos efeitos inibitórios promovidos por este oligoelemento, tanto sobre a expressão,

quanto sobre a atividade de NIS, foram revertidos. Isto indica que, provavelmente, a ativação desta via de sinalização tem um papel chave nos rápidos eventos inibitórios desencadeados pelo iodeto sobre a expressão e atividade de NIS em células tireoidianas.

Há evidências de que a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) esteja envolvida na ativação da via de sinalização PI3K/Akt em outros modelos celulares (Chen et al., 2010; Kim et al., 2007; Kim et al., 2008; Ushio-Fukai et al., 1999). Os dados obtidos no presente trabalho confirmaram que o iodeto induz a produção de ROS em tireócitos, em períodos de tempo mais curtos do que aqueles observados anteriormente (Leoni et al., 2011); e graças ao uso dos sequestradores de ROS, pode-se confirmar que o iodeto só é capaz de ativar a via de sinalização da PI3K/Akt, através da produção destas moléculas.

Sendo assim, o presente estudo demonstrou que, tal como outros oligoelementos, o iodeto desencadeia uma série de mecanismos, transcricionais e pós-transcricionais, que podem ou não estar relacionados uns aos outros, mas que em conjunto, são responsáveis pela inibição da expressão e função de NIS em tireócitos expostos agudamente ao excesso de iodeto. Desta maneira, o conjunto de dados apresentados adiciona à literatura, uma série de novas evidências dos mecanismos envolvidos na regulação de NIS durante o efeito Wolff-Chaikoff e seu escape.

5 CONCLUSÕES

Dentre as principais conclusões deste estudo, destaca-se que:

1. A região 3'UTR do mRNA de NIS é responsiva ao iodeto, sugerindo que por esta razão, o tratamento com este oligoelemento reduz a meia-vida e a taxa de tradução do transcrito.
2. A região 5'UTR não é responsiva ao iodeto, e não está, portanto, envolvida nos rápidos mecanismos pós-transcricionais acionados por este oligoelemento.
3. Os mecanismos transcricionais são desencadeados pelo iodetoo em períodos de tratamento mais longos (12 e 24 h) e envolvem o comprometimento da translocação dos fatores transcricionais Pax8 e p65 para o núcleo dos tireócitos, assim como a diminuição da ligação destes fatores em suas regiões específicas do promotor do gene da NIS.
4. O citoesqueleto de actina de células PCCl3 é desorganizado pelo excesso de iodeto. Sugere-se que este efeito esteja envolvido em eventos da regulação da expressão de NIS pelo iodeto, como: diminuição da estabilidade do transcrito de NIS, comprometimento da translocação de NIS para a membrana plasmática e de fatores transcricionais para o núcleo das células tireoidianas, internalização de NIS por clatrinas.
5. O tratamento com excesso deste oligoelemento rapidamente diminui o conteúdo total de NIS, sua meia-vida, sua localização na membrana plasmática e sua atividade de captação de iodeto, através do acionamento de mecanismos rápidos de internalização (por clatrinas) e de degradação protéica (por lisossomos).
6. A via de sinalização da PI3K/Akt é rapidamente ativada pelo excesso de iodeto, mecanismo que depende da produção de ROS pelos tireócitos. Adicionalmente, a ativação desta via de sinalização é responsável pela rápida (30 min) inibição da expressão/função de NIS induzida por este oligoelemento.

Portanto, o presente estudo identificou vários mecanismos, transcricionais e pós-transcricionais, que são acionados pelo excesso de iodeto em sua regulação negativa da expressão/função de NIS em tireócitos, e que até então não tinham sido abordados ou descritos na literatura. Finalmente, esta tese envolve a abordagem e caracterização molecular de alguns eventos desencadeados no efeito Wolff-Chaikoff, no seu escape e no o efeito *stunning*, observado na prática clínica, que podem contribuir de maneira significativa para a melhor compreensão da fisiologia da glândula tireoide e seu mecanismo auto-regulatório, assim como, para a utilização de NIS no tratamento do câncer e em técnicas de terapia gênica.

REFERÊNCIAS*

Ajjan RA, Kamaruddin NA, Crisp M, Watson PF, Ludgate M, Weetman AP. Regulation and tissue distribution of the human sodium iodide symporter gene. Clin Endocrinol (Oxf). 1998a;49(4):517-23.

Ajjan RA, Watson PF, Findlay C, Metcalfe RA, Crisp M, Ludgate M, Weetman AP. The sodium iodide symporter gene and its regulation by cytokines found in autoimmunity. J Endocrinol. 1998b;158(3):351-8.

Alexander NM. Purification of bovine thyroid peroxidase. Endocrinology. 1977;100(6):1610-20.

Ameziane-El-Hassani R, Morand S, Boucher JL, Frapart YM, Apostolou D, Agnandji D, Gnidehou S, Ohayon R, Noël-Hudson MS, Francon J, Lalaoui K, Virion A, Dupuy C.Dual oxidase-2 has an intrinsic Ca2+-dependent H2O2-generating activity. J Biol Chem. 2005;280(34):30046-54.

Bartalena L, Grasso L, Brogioni S, Aghini-Lombardi F, Braverman LE, Martino E. Serum interleukin-6 in amiodarone-induced thyrotoxicosis. J Clin Endocrinol Metab. 1994;78(2):423-7.

Bermano G, Arthur JR, Hesketh JE. Role of the 3' untranslated region in the regulation of cytosolic glutathioneperoxidase and phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase gene expression by selenium supply. Biochem J. 1996a;320 (Pt 3):891-5.

Bermano G, Arthur JR, Hesketh JE. Selective control of cytosolic glutathione peroxidase and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase mRNA stability by selenium supply. FEBS Lett. 1996b 3;387(2-3):157-60.

Bidart JM, Lacroix L, Evain-Brion D, Caillou B, Lazar V, Frydman R, Bellet D, Filetti S, Schlumberger M. Expression of Na/I symporter and pendred syndrome genes in trophoblast cells. J Clin Endocrinol Metab. 2000a;85:4367–4372.

Bidart JM, Mian C, Lazar V, Russo D, Filetti S, Caillou B, Schlumberger M. Expression of pendrin and the Pendred syndrome (PDS) gene in human thyroid tissues. J Clin Endocrinol Metab. 2000b;85(5):2028-33.

Bizhanova A, Kopp P. Controversies concerning the role of pendrin as an apical iodide transporter in thyroid follicular cells. Cell Physiol Biochem. 2011;28(3):485-90.

Björkman U, Ekholm R. Hydrogen peroxide generation and its regulation in FRTL-5 and porcine thyroid cells. Endocrinology. 1992 Jan;130(1):393-9.

* De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. [Internet].Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journals. [2011 Jul 15].
Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

Boron W, Boulpaep EL. Textbook of medical physiology. 1st ed. Philadelphia: Elsevier Inc.; 2005. p. 1035-1048.

Botelho RJ, Tapper H, Furuya W, Mojdami D, Grinstein S. Fc gamma R-mediated phagocytosis stimulates localized pinocytosis in human neutrophils. J Immunol. 2002;169(8):4423-9.

Boucrot E, Saffarian S, Massol R, Kirchhausen T, Ehrlich M. Role of lipids and actin in the formation of clathrin-coated pits. Exp Cell Res. 2006;312(20):4036-48.

Braverman LE, Ingbar SH. Changes in Thyroidal Function During Adaptation to Large Doses of Iodide. J Clin Invest. 1963;42:1216-31.

Brennan CM, Steitz JA. HuR and mRNA stability. Cell Mol Life Sci. 2001;58(2):266-77.

Butt J, Kim HY, Basilion JP, Cohen S, Iwai K, Philpott CC, Altschul S, Klausner RD, Rouault TA. Differences in the RNA binding sites of iron regulatory proteins and potential target diversity.Proc Natl Acad Sci U S A. 1996;93(9):4345-9.

Caillou B, Dupuy C, Lacroix L, Nocera M, Talbot M, Ohayon R, Dème D, Bidart JM, Schlumberger M, Virion A. Expression of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (ThoX, LNOX, Duox) genes and proteins in human thyroid tissues. J Clin Endocrinol Metab. 2001;86(7):3351-8.

Caltagirone A, Weiss G, Pantopoulos K. Modulation of cellular iron metabolism by hydrogen peroxide. Effects of H2O2 on the expression and function of iron-responsive element-containing mRNAs in B6 fibroblasts. J Biol Chem. 2001;276(23):19738-45.

Camargo RY, Tomimori EK, Neves SC, G S Rubio I, Galrão AL, Knobel M, Medeiros-Neto G. Thyroid and the environment: exposure to excessive nutritional iodine increases the prevalence of thyroid disorders in Sao Paulo, Brazil. Eur J Endocrinol. 2008;159(3):293-9.

Carrasco N. Iodide transport in the thyroid gland. Biochim Biophys Acta. 1993;1154(1):65-82.

Carrillo-Sepúlveda MA, Ceravolo GS, Fortes ZB, Carvalho MH, Tostes RC, Laurindo FR, Webb RC, Barreto-Chaves ML. Thyroid hormone stimulates NO production via activation of the PI3K/Akt pathway in vascular myocytes. Cardiovasc Res. 2010;85(3):560-70.

Caturegli P, Hejazi M, Suzuki K, Dohan O, Carrasco N, Kohn LD, Rose NR. Hypothyroidism in transgenic mice expressing IFN-gamma in the thyroid. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(4):1719-24.

Chebath J, Chabaud O, Becarevic A, Cartouzou G, Lissitzky S. Thyroglobulin messenger ribonucleic acid translation in vitro. Eur J Biochem. 1977;77(2):243-52.

Chen L, Xu B, Liu L, Luo Y, Zhou H, Chen W, Shen T, Han X, Kontos CD, Huang S. Cadmium induction of reactive oxygen species activates the mTOR pathway, leading to neuronal cell death. Free Radic Biol Med. 2011;50(5):624-32.

Cheng WH, Lu PJ, Hsiao M, Hsiao CH, Ho WY, Cheng PW, Lin CT, Hong LZ, Tseng CJ. Renin activates PI3K-Akt-eNOS signalling through the angiotensin AT_1 and Mas receptors to modulate central blood pressure control in the nucleus tractus solitarii. Br J Pharmacol. 2012;166(7):2024-35.

Cho JY, Leveille R, Kao R, Rousset B, Parlow AF, Burak Jr WE, Mazzaferri EL, Jhiang SM. Hormonal regulation of radioiodide uptake activity and Na/I symporter expression in mammary glands. J Clin Endocrinol Metab. 2000; 85:2936–2943.

Chung BH, Kim JD, Kim CK, Kim JH, Won MH, Lee HS, Dong MS, Ha KS, Kwon YG, Kim YM. Icariin stimulates angiogenesis by activating the MEK/ERK- and PI3K/Akt/eNOS-dependent signal pathways in human endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 2008;376(2):404-8.

Ciechanover A. Intracellular protein degradation: from a vague idea through the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. Medicina (B Aires). 2010;70(2):105-19.

Costamagna E, García B, Santisteban P. The functional interaction between the paired domain transcription factor Pax8 and Smad3 is involved in transforming growth factor-beta repression of the sodium/iodide symporter gene. J Biol Chem. 2004;279(5):3439-46.

Cotgreave IA. 1997. N-acetylcysteine: pharmacological considerations and experimental and clinical applications. Adv Pharmacol. 1997;38:205-27.

Dai G, Levy O, Carrasco N. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. Nature. 1996;379(6564):458-60.

De la Vieja A, Ginter CS, Carrasco N. Molecular analysis of a congenital iodide transport defect: G543E impairs maturation and trafficking of the Na+/I- symporter. Mol Endocrinol. 2005;19(11):2847-58.

De La Vieja A, Ginter CS, Carrasco N. The Q267E mutation in the sodium/iodide symporter (NIS) causes congenital iodide transport defect (ITD) by decreasing the NIS turnover number. J Cell Sci. 2004;117(Pt 5):677-87.

De la Vieja A, Reed MD, Ginter CS, Carrasco N. Amino acid residues in transmembrane segment IX of the Na+/I- symporter play a role in its Na+ dependence and are critical for transport activity. J Biol Chem. 2007;282(35):25290-8.

de Souza dos Santos MC, Gonçalves CF, Vaisman M, Ferreira AC, de Carvalho DP. Impact of flavonoids on thyroid function. Food Chem Toxicol. 2011;49(10):2495-502.

de Souza EC, Padrón AS, Braga WM, de Andrade BM, Vaisman M, Nasciutti LE, Ferreira AC, de Carvalho DP. mTOR downregulates iodide uptake in thyrocytes. J Endocrinol. 2010;206(1):113-20.

del Prete MJ, Vernal R, Dolznig H, Müllner EW, Garcia-Sanz JA. Isolation of polysome-bound mRNA from solid tissues amenable for RT-PCR and profiling experiments. RNA. 2007;13(3):414-21.

Denef JF, Many MC, van den Hove MF. Iodine-induced thyroid inhibition and cell necrosis: two consequences of the same free-radical mediated mechanism? Mol Cell Endocrinol. 1996;121(1):101-3.

Dietrich J, Kastrup J, Nielsen BL, Odum N, Geisler C. Regulation and function of the CD3 _DxxxLL motif: a binding site for adaptor protein-1 and adaptor protein-2 in vitro. J Cell Biol. 1997;138:271–281.

Dohán O, De la Vieja A, Paroder V, Riedel C, Artani M, Reed M, Ginter CS, Carrasco N. The sodium/iodide symporter (NIS): Characterization, Regulation, and Medical Significance. Endocr Rev. 2003;24(1):48-77.

Dohán O, Gavrielides MV, Ginter C, Amzel LM, Carrasco N. Na(+)/I(-) symporter activity requires a small and uncharged amino acid residue at position 395. Mol Endocrinol. 2002;16(8):1893-902.

Dohán O, Portulano C, Basquin C, Reyna-Neyra A, Amzel LM, Carrasco N. The Na+/I symporter (NIS) mediates electroneutral active transport of the environmental pollutant perchlorate. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(51):20250-5.

Dominguez R, Holmes KC. Actin structure and function. Annu Rev Biophys. 2011;40:169-86.

Duarte GC, Tomimori EK, Boriolli RA, Ferreira JE, Catarino RM, Camargo RY, Medeiros-Neto G. Echographic evaluation of the thyroid gland and urinary iodine concentration in school children from various regions of the State of São Paulo, Brazil. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2004;48(6):842-8.

Duarte GC, Tomimori EK, Camargo RY, Rubio IG, Wajngarten M, Rodrigues AG, Knobel M, Medeiros-Neto G. The prevalence of thyroid dysfunction in elderly cardiology patients with mild excessive iodine intake in the urban area of São Paulo. Clinics (Sao Paulo). 2009;64(2):135-42.

Dupuy C, Pomerance M, Ohayon R, Noël-Hudson MS, Dème D, Chaaraoui M, Francon J, Virion A. Thyroid oxidase (THOX2) gene expression in the rat thyroid cell line FRTL5. Biochem Biophys Res Commun. 2000;277(2):287-92.

Egelman EH, Orlova A. New insights into actin filament dynamics. Curr Opin Struct Biol. 1995;5(2):172-80.

Eisenstein RS. Iron Regulatory Proteins and the Molecular Control of Mammalian Iron Metabolism. Annu Rev Nutr. 2000;20:627-62.

Endo T, Kaneshige M, Nakazato M, Ohmori M, Harii N, Onaya T. Thyroid transcription factor-1 activates the promoter activity of rat thyroid Na+/I- symporter gene. Mol Endocrinol. 1997;11(11):1747-55.

Eng PH, Cardona GR, Fang SL, Previti M, Alex S, Carrasco N, Chin WW, Braverman LE. Escape from the acute Wolff-Chaikoff effect is associated with a decrease in thyroid

sodium/iodide symporter messenger ribonucleic acid and protein. Endocrinology. 1999;140(8):3404-10.

Eng PH, Cardona GR, Previti MC, Chin WW, Braverman LE. Regulation of the sodium iodide symporter by iodide in FRTL-5 cells. Eur J Endocrinol. 2001;144(2):139-44.

Erlitzki R, Long JC, Theil EC. Multiple, conserved iron-responsive elements in the 3'-untranslated region of transferrin receptor mRNA enhance binding of iron regulatory protein 2. J Biol Chem. 2002;277(45):42579-87.

Eskandari S, Loo DD, Dai G, Levy O, Wright EM, Carrasco N. Thyroid Na+/I- symporter. Mechanism, stoichiometry, and specificity. J Biol Chem. 1997;272(43):27230-8.

Farwell AP, Braverman LE. Thyroid and antithyroid drugs. In: Hardman JG, Limbir LE (Ed.) Goodman & Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics. 10th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p.1563-96.

Fenteany G, Standaert RF, Lane WS, Choi S, Corey EJ, Schreiber SL. Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. Science. 1995;268(5211):726-31.

Ferreira AC, Lima LP, Araújo RL, Müller G, Rocha RP, Rosenthal D, Carvalho DP. Rapid regulation of thyroid sodium-iodide symporter activity by thyrotrophin and iodine. J Endocrinol. 2005;184(1):69-76.

Fozzatti L, Vélez ML, Lucero AM, Nicola JP, Mascanfroni ID, Macció DR, Pellizas CG, Roth GA, Masini-Repiso AM. Endogenous thyrocyte-produced nitric oxide inhibits iodide uptake and thyroid-specific gene expression in FRTL-5 thyroid cells. J Endocrinol. 2007;192(3):627-37.

Fujimoto LM, Roth R, Heuser JE, Schmid SL. Actin assembly plays a variable, but not obligatory role in receptor-mediated endocytosis in mammalian cells. Traffic. 2000;1(2):161-71.

Furlanetto TW, Nguyen LQ, Jameson JL. Estradiol increases proliferation and down-regulates the sodium/iodide symporter gene in FRTL-5 cells. Endocrinology. 1999;140:5705–5711.

Furlanetto TW, Nunes Jr RB, Sopelsa AM, Maciel RM. Estradiol decreases iodide uptake by rat thyroid follicular FRTL-5 cells. Braz J Med Biol Res. 2001;34:259–263.

Galletta BJ, Mooren OL, Cooper JA. Actin dynamics and endocytosis in yeast and mammals. Curr Opin Biotechnol. 2010;21(5):604-10.

García B, Santisteban P. PI3K is involved in the IGF-I inhibition of TSH-induced sodium/iodide symporter gene expression. Mol Endocrinol. 2002;16(2):342-52.

Gingerich TJ, Feige JJ, LaMarre J. AU-rich elements and the control of gene expression through regulated mRNA stability. Anim Health Res Rev. 2004;5(1):49-63.

Giuliani C, Noguchi Y, Harii N, Napolitano G, Tatone D, Bucci I, Piantelli M, Monaco F, Kohn LD. The flavonoid quercetin regulates growth and gene expression in rat FRTL-5 thyroid cells. Endocrinology. 2008;149(1):84-92.

Gnidehou S, Caillou B, Talbot M, Ohayon R, Kaniewski J, Noël-Hudson MS, Morand S, Agnangji D, Sezan A, Courtin F, Virion A, Dupuy C. Iodotyrosine dehalogenase 1 (DEHAL1) is a transmembrane protein involved in the recycling of iodide close to the thyroglobulin iodination site. FASEB J. 2004;18(13):1574-6.

Goldberg AL. Functions of the proteasome: the lysis at the end of the tunnel. Science. 1995;268(5210):522-3.

Green WL. Effects of 3-nitro-L-tyrosine on thyroid function in the rat: an experimental model for the dehalogenase defect. J Clin Invest. 1971;50(12):2474-84.

Greenspan FS, Gardner DG. Endocrinologia básica e clínica. 7. ed. Rio de Janeiro: MacGraw-Hill; 2006.

Grollman EF, Smolar A, Ommaya A, Tombaccini D, Santisteban P. Iodine supression of iodide uptake in FRTL-5 thyroid cells. Endocrinology. 1986;118(6):2477-82.

Haller K, Rambaldi I, Daniels E, Featherstone M. Subcellular localization of multiple PREP2 isoforms is regulated by actin, tubulin, and nuclear export. J Biol Chem. 2004;279(47):49384-94.

Halmi NS, Suelke RG. Problems of thyroidal self-regulation. Metabolism. 1956;5:646–651.

Huang H, Shi Y, Lin L, Li L, Lin X, Li X, Xu D. Inhibition of thyroid-restricted genes by follicular thyroglobulin involves iodinated degree. J Cell Biochem. 2011;112(3):971-7.

Insall RH, Machesky LM. Actin dynamics at the leading edge: from simple machinery to complex networks. Dev Cell. 2009;17(3):310-22.

Ivanov AI. Pharmacological inhibition of endocytic pathways: is it specific enough to be useful? Methods Mol Biol. 2008;440:15-33.

Jacobson A, Peltz SW. Interrelationships of the pathways of mRNA decay and translation in eukaryotic cells. Annu Rev Biochem. 1996;65:693-739.

Jasen RP. mRNA localization: message on the move. Nat Rev Mol Cell Biol. 2001;2(4):247-56.

Jhiang SM, Cho JY, Ryu KY, DeYoung BR, Smanik PA, Mcgauchy VR, Fischer AH, Mazzaferri EL. An immunohistochemical study of Na/I symporter in human thyroid tissues and salivary gland tissues. Endocrinology. 1998;139:4416–4419.

Kaminsky SM, Levy O, Salvador C, Dai G, Carrasco N. Na(+)-I- symport activity is present in membrane vesicles from thyrotropin-deprived non-I(-)-transporting cultured thyroid cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91(9):3789-93.

Kawaguchi A, Ikeda M, Endo T, Kogai T, Miyazaki A, Onaya T. Transforming growth factor-beta1 suppresses thyrotropin-induced Na+/I- symporter messenger RNA and protein levels in FRTL-5 rat thyroid cells. Thyroid. 1997;7(5):789-94.

Kilav R, Silver J, Naveh-Many T. A conserved cis-acting element in the parathyroid homone 3'-unstranslated region is sufficient for regulation of RNA stability by calcium and phosphate. J Biol Chem. 2001;276(12):8727-33.

Kim HJ, Park KG, Yoo EK, Kim YH, Kim YN, Kim HS, Kim HT, Park JY, Lee KU, Jang WG, Kim JG, Kim BW, Lee IK. Effects of PGC-1alpha on TNF-alpha-induced MCP-1 and VCAM-1 expression and NF-kappaB activation in human aortic smooth muscle and endothelial cells. Antioxid Redox Signal. 2007;9(3):301-7.

Kim HS, Loughran PA, Rao J, Billiar TR, Zuckerbraun BS. Carbon monoxide activates NF-kappaB via ROS generation and Akt pathways to protect against cell death of hepatocytes. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2008;295(1):G146-G152.

Kim JH, Na HJ, Kim CK, Kim JY, Ha KS, Lee H, Chung HT, Kwon HJ, Kwon YG, Kim YM. The non-provitamin A carotenoid, lutein, inhibits NF-kappaB-dependent gene expression through redox-based regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/Akt and NF-kappaB-inducing kinase pathways: role of H(2)O(2) in NF-kappaB activation. Free Radic Biol Med. 2008;45(6):885-96.

Kimura ET. Glândula Tiroide. In: Margarida de Mello Aires (Org.) Fisiologia. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012. p.1056-77.

Knecht E, Aguado C, Cárcel J, Esteban I, Esteve JM, Ghislat G, Moruno JF, Vidal JM, Sáez R. Intracellular protein degradation in mammalian cells: recent developments. Cell Mol Life Sci. 2009;66(15):2427-43.

Knobel M, Medeiros-Neto G. Disorders associated to chronic iodine deficiency. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2004;48(1):53-61.

Kobayashi N, Mita S, Yoshida K, Honda T, Kobayashi T, Hara K, Nakano S, Tsubokou Y, Matsuoka H. Celiprolol activates eNOS through the PI3K-Akt pathway and inhibits VCAM-1 Via NF-kappaB induced by oxidative stress. Hypertension. 2003;42(5):1004-13.

Kogai T, Endo T, Saito T, Miyazaki A, Kawaguchi A, Onaya T. Regulation by thyroid-stimulating hormone of sodium/iodide symporter gene expression and protein levels in FRTL-5 cells. Endocrinology. 1997;138(6):2227-32.

Kopp P. Prendred's syndrome: identification of the genetic defect a century after its recognition. Thyroid. 1999;9(1):65-9.

Kotani T, Ohtaki S. 6 Characterization of thyroid follicular cell apical plasma membrane peroxidase using monoclonal antibody. Endocrinol Jpn. 1987 Jun;34(3):407-13.

Kumari S, Mg S, Mayor S. Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. Cell Res. 2010;20(3):256-75.

Lacroix L, Mian C, Caillou B, Talbot M, Filetti S, Schlumberger M, Bidart JM. Na/I symporter and pendred syndrome gene and protein expressions in human extra-thyroidal tissues. Eur J Endocrinol. 2001;144:297–302.

Larsen PR, Davies TF, Hay ID Thyroid. In: Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR (Ed.) Williams textbook of endocrinology. 9th ed. Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo: W.B. Saunders Company; 1998. p.389-515.

Leoni SG, Galante PA, Ricarte-Filho JC, Kimura ET. Differential gene expression analysis of iodide-treated rat thyroid follicular cell line PCCl3. Genomics. 2008;91(4):356-66.

Leoni SG, Kimura ET, Santisteban P, De la Vieja A. Regulation of thyroid oxidative state by thioredoxin reductase has a crucial role in thyroid responses to iodide excess. Mol Endocrinol. 2011;25(11):1924-35.

Leung AM, Braverman LE, Pearce EN. History of u.s. iodine fortification and supplementation. Nutrients. 2012;4(11):1740-6.

Leung AM, Braverman LE. Iodine-induced thyroid dysfunction. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 2012;19(5):414-9.

Levadoux M, Mahon C, Beattie JH, Wallace HM, Hesketh JE. Nuclear import of metallothionein I requires it mRNA to be associated with the perinuclear cytoskeleton. J Biol Chem. 1999;274(49):34961-6.

Levy O, Dai G, Riedel C, Ginter CS, Paul EM, Lebowitz AN, Carrasco N. Characterization of the thyroid Na/I symporter with an anti-COOH terminus antibody. Proc Natl Acad Sci USA. 1997;94:5568–5573.

Levy O, De la Vieja A, Ginter CS, Riedel C, Dai G, Carrasco N. N-linked glycosylation of the thyroid Na+/I- symporter (NIS). Implications for its secondary structure model. J Biol Chem. 1998; 273:22657–22663.

Li M, Eastman CJ. The changing epidemiology of iodine deficiency. Nat Rev Endocrinol. 2012;8(7):434-40.

Liu D, Waxman DJ. Post-transcriptional regulation of hepatic NADPH-cytochrome P450 reductase by thyroid hormone: indendependet effect on poly(A) tail length and mRNA stability. Mol Pharmacol. 2002;61(5):1089-96.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. Methods. 2001;25(4):402-8.

Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Darnell J. Molecular cell biology. 4th ed. New York: W. H. Freeman; 1999.

Lundh C, Lindencrona U, Postgård P, Carlsson T, Nilsson M, Forssell-Aronsson E. Radiation-induced thyroid stunning: differential effects of (123)I, (131)I, (99m)Tc, and (211)At on iodide transport and NIS mRNA expression in cultured thyroid cells. J Nucl Med. 2009;50(7):1161-7.

Lundh C, Nordén MM, Nilsson M, Forssell-Aronsson E. Reduced iodide transport (stunning) and DNA synthesis in thyrocytes exposed to low absorbed doses from ^{131}I in vitro. J Nucl Med. 2007;48(3):481-6.

Mahon P, Partridge K, Beattie JH, Glover LA, Hesketh JE. The 3'untranslated region plays a role in the targeting of metallothionein-I mRNA to the perinuclear cytoplasm and cytoskeletal-bound polysomes. Biochim Biophys Acta. 1997;1358(2):153-62.

Marcocci C, Cohen JL, Grollman EF. Effect of actinomycin D on iodide transport in FRTL-5 thyroid cells. Endocrinology. 1984;115: 2123–2132.

Matsuzawa Y, Hostetler KY. Effects of chloroquine and 4,4'-bis(diethylaminoethoxy)alpha, beta-diethyldiphenylethane on the incorporation of [3H]glycerol into the phospholipids of rat liver lysosomes and other subcellular fractions, in vivo. Biochim Biophys Acta. 1980;620(3):592-602.

Medeiros-Neto G. Iodine nutrition in Brazil: where do we stand? Arq Bras Endocrinol Metabol. 2009;53(4):470-4.

Meller B, Gaspar E, Deisting W, Czarnocka B, Baehre M, Wenzel BE. Decreased radioiodine uptake of FRTL-5 cells after (131)I incubation in vitro: molecular biological investigations indicate a cell cycle-dependent pathway. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2008;35(6):1204-12.

Michihara A, Toda K, Kubo T, Fujiwara Y, Akasaki K, Tsuji H. Disruptive effect of chloroquine on lysosomes in cultured rat hepatocytes. Biol Pharm Bull. 2005;28(6):947-51.

Mickleburgh I, Burtle B, Nury D, Chabanon H, Chrzanowska-Lightowlers Z, Hesketh JE. Isolation and identification of a protein binding to the localization element of metallothionein I mRNA. Biochem Soc Trans. 2004;32(Pt 5):705-6.

Mitchell AM, Mandley SW, Morris JC, Powell KA, Bergert ER, Mortimer RH. Sodium iodide symporter (NIS) gene expression in human placenta. Placenta. 2001;22:256–258.

Moallem E, Kilav R, Silver J, Naveh-Many T. RNA-Protein binding and post-transcriptional regulation of parathyroid hormone gene expression by calcium and phosphate. J Biol Chem. 1998;273(9):5253-9.

Mohr E, Prakash N, Vieluf K, Fuhrmann C, Buck F, Richter D. Vasopressin mRNA localization in nerve cells: characterization of cis-acting elements and trans-acting factors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98(13):7072-9.

Morand S, Chaaraoui M, Kaniewski J, Dème D, Ohayon R, Noel-Hudson MS, Virion A, Dupuy C. Effect of iodide on nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity and Duox2 protein expression in isolated porcine thyroid follicles. Endocrinology. 2003;144(4):1241-8.

Morton ME, Chaikoff IL, Rosenfeld S. Inhibiting effect of inorganic iodide on the formation in vitro of thyroxine and diiodotyrosine by surviving thyroid tissue. J Biol Chem. 1944;154:381-7.

Nagasaka A, Hidaka H. Effect of antithyroid agents 6-propyl-2-thiouracil and 1-mehtyl-2-mercaptoimidazole on human thyroid iodine peroxidase. J Clin Endocrinol Metab. 1976;43(1):152-8.

Nakashima T, Taurog A, Riesco G. Mechanism of action of thioureylene antithyroid drugs: factors affecting intrathyroidal metabolism of propylthiouracil and methimazole in rats. Endocrinology. 1978;103(6):2187-97.

Nakazato M, Chung HK, Ulianich L, Grassadonia A, Suzuki K, Kohn LD. Thyroglobulin repression of thyroid transcription factor 1 (TTF-1) gene expression is mediated by decreased DNA binding of nuclear factor I proteins which control constitutive TTF-1 expression. Mol Cell Biol. 2000;20(22):8499-512.

Naveh-Many T, Bell O, Silver J, Kilav R. Cis and trans acting factors in the regulation of parathyroid hormone (PTH) mRNA stability by calcium and phosphate. FEBS Lett. 2002;529(1):60-4.

Nichols B. Caveosomes and endocytosis of lipid rafts. J Cell Sci. 2003;116(Pt 23):4707-14.
Nicola JP, Basquin C, Portulano C, Reyna-Neyra A, Paroder M, Carrasco N. The Na+/I- symporter mediates active iodide uptake in the intestine. Am J Physiol Cell Physiol. 2009;296(4):C654-62.

Nicola JP, Nazar M, Mascanfroni ID, Pellizas CG, Masini-Repiso AM. NF-kappaB p65 subunit mediates lipopolysaccharide-induced Na(+)/I(-) symporter gene expression by involving functional interaction with the paired domain transcription factor Pax8. Mol Endocrinol. 2010;24(9):1846-62.

Nicola JP, Reyna-Neyra A, Carrasco N, Masini-Repiso AM. Dietary iodide controls its own absorption through post-transcriptional regulation of the intestinal Na+/I- symporter. J Physiol. 2012; 590(Pt 23):6013-26.

Nicolussi A, D'Inzeo S, Santulli M, Colletta G, Coppa A. TGF-beta control of rat thyroid follicular cells differentiation. Mol Cell Endocrinol. 2003;207(1-2):1-11.

Nordén MM, Larsson F, Tedelind S, Carlsson T, Lundh C, Forssell-Aronsson E, Nilsson M. Down-regulation of the sodium/iodide symporter explains 131I-induced thyroid stunning. Cancer Res. 2007;67(15):7512-7.

Nunes MT. A glândula hipófise. In: Margarida de Mello Aires (Org.) Fisiologia. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012. p.1020-53.

Nunes MT. Hormônios tireoideanos: Mecanismo de Ação e Importância Biológica. Arq Bras Endocrinol Metab. 2003;47:639-643.

Ohkuma S, Poole B.Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. Proc Natl Acad Sci U S A. 1978;75(7):3327-31.

Ohno M, Zannini M, Levy O, Carrasco N, di Lauro R. The paired-domain transcription factor Pax8 binds to the upstream enhancer of the rat sodium/iodide symporter gene and participates

in both thyroid-specific and cyclic-AMP-dependent transcription**.** Mol Cell Biol. 1999;19(3):2051-60.

Paire A, Bernier-Valentin F, Selmi-Ruby S, Rousset B. Characterization of the rat thyroid iodide transporter using anti-peptide antibodies. J Biol Chem. 1997;272(29):18245-9.

Paroder-Belenitsky M, Maestas MJ, Dohán O, Nicola JP, Reyna-Neyra A, Follenzi A, Dadachova E, Eskandari S, Amzel LM, Carrasco N. Mechanism of anion selectivity and stoichiometry of the Na+/I- symporter (NIS). Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(44):17933-8.

Pekary AE, Hershman JM.Tumor necrosis factor, ceramide, transforming growth factor-beta1, and aging reduce sodium/iodide symporter messenger ribonucleic acid levels in FRTL-5 cell. Endocrinology. 1998;139(2):703-12.

Pekary AE, Levin SR, Johnson DG, Berg L, Hershman JM. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) inhibit the expression and activity of Na+/K(+)-ATPase in FRTL-5 rat thyroid cells. J Interferon Cytokine Res. 1997;17(4):185-95.

Pinke LA, Dean DS, Bergert ER, Spitzweg C, Dutton CM, Morris JC. Cloning of the mouse sodium iodide symporter. Thyroid. 2001;11(10):935-9.

Postgård P, Himmelman J, Lindencrona U, Bhogal N, Wiberg D, Berg G, Jansson S, Nyström E, Forssell-Aronsson E, Nilsson M. Stunning of iodide transport by (131)I irradiation in cultured thyroid epithelial cells. J Nucl Med. 2002;43(6):828-34.

Preddy VR, Burrow GN, Watson RR. Comprehensive handbook of iodine: nutritional, biochemical, pathological and therapeutic aspects. 1st ed. Massachusetts: Academic Press; 2009.

Raben MS. The paradoxical effect of thiocyanate and of thyrotropin on the organic binding of iodine by the thyroid in the presence of large amounts of iodide. Endocrinology. 1949;45(3):296-304.

Reed-Tsur MD, De la Vieja A, Ginter CS, Carrasco N. Molecular characterization of V59E NIS, a Na+/I- symporter mutant that causes congenital I- transport defect. Endocrinology. 2008;149(6):3077-84.

Riedel C, Levy O, Carrasco N. Post-transcriptional regulation of the sodium/iodide symporter by thyrotropin. J Biol Chem. 2001;276:21458–21463.

Robinson BG, Frim DM, Schwartz WJ, Majzoub JA. Vasopressin mRNA in the suprachiasmatic nuclei: Daily regulation of polyadenylate tail length. Science. 1988 Jul 15;241(4863):342-4.

Ross J. mRNA stability in mammalian cell. Microbiol Rev. 1995;59(3):423-50.

Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. Cell. 1992;68(4):673-82.

Rouault TA. Post-Transcriptional Regulation of Human Iron Metabolism by Iron Regulatory Proteins. Blood Cells Mol Dis. 2002;29(3):309-14.

Royaux IE, Suzuki K, Mori A, Katoh R, Everett LA, Kohn LD, Green ED. Pendrin, the protein encoded by the Pendred syndrome gene (PDS) is an apical porter of iodide in the thyroid and is regulated by thyroglobulin in FRTL-5 cells. Endocrinology. 2000;141(2):839-45.

Saito T, Endo T, Kawaguchi A, Ikeda M, Nakazato M, Kogai T, Onaya T. Increased expression of the Na+/I- symporter in cultured human thyroid cells exposed to thyrotropin and in Graves' thyroid tissue. J Clin Endocrinol Metab. 1997;82:3331–3336.

Saladin K. Anatomy & Physiology: The Unity of Form and Function. 3th ed. New York: McGraw-Hill; 2003. p.647-648.

Schoenenberger CA, Mannherz HG, Jockusch BM. Actin: from structural plasticity to functional diversity. Eur J Cell Biol. 2011;90(10):797-804.

Schröder HC, Zahn RK, Müller WE. Role of actin and tubulin in the regulation of poly(A) polymerase-endoribonuclease IV complex from calf thymus. J Biol Chem. 1982;257(5):2305-9.

Schröder-van der Elst JP, Smit JW, Romijn HA, van der Heide D. Dietary flavonoids and iodine metabolism. Biofactors. 2003;19(3-4):171-6.

Schröder-van der Elst JP, van der Heide D, Romijn JA, Smit JW. Differential effects of natural flavonoids on growth and iodide content in a human Na+/I- symporter-transfected follicular thyroid carcinoma cell line. Eur J Endocrinol. 2004;150(4):557-64.

Sela-Brown A, Silver J, Brewer G, Naveh-Many T. Identification of AUF1 as a parathyroid hormone mRNA 3'-untranslated region-binding protein that determines parathyroid hormone mRNA stability. J Biol Chem. 2000;275(10):7424-9.

Serrano-Nascimento C, Calil-Silveira J, Goulart-Silva F, Nunes MT. New insights about the posttranscriptional mechanisms triggered by iodide excess on sodium/iodide symporter (NIS) expression in PCCl3 cells. Mol Cell Endocrinol. 2012;349(2):154-61.

Serrano-Nascimento C, Calil-Silveira J, Nunes MT. Posttranscriptional regulation of sodium-iodide symporter mRNA expression in the rat thyroid gland by acute iodide administration. Am J Physiol Cell Physiol. 2010;298(4):C893-9.

Shannon JM, Pan T, Edeen KE, Nielsen LD. Influence of the cytoskeleton on surfactant protein gene expression in cultured rat alveolar type II cells. Am J Physiol. 1998;274(1 Pt 1):L87-96.

Shiroozu A, Taurog A, Engler H, Dorris ML. Mechanism of action of thioureylene antithyroid drugs in the rat: possible inactivation of thyroid peroxidase by propylthiouracil. Endocrinology. 1983;113(1):362-70.

Sies H. Ebselen, a selenoorganic compound as glutathione peroxidase mimic. Free Radic Biol Med. 1993;14:313-323.

Singer RH. The cytoskeleton and mRNA localization. Curr Opin Cell Biol. 1992;4(1):15-9.

Smanik PA, Liu Q, Furminger TL, Ryu K, Xing S, Mazzaferri EL, Jhiang SM. Cloning of the human sodium lodide symporter. Biochem Biophys Res Commun. 1996;226(2):339-45.

Smanik PA, Ryu KY, Theil KS, Mazzaferri EL, Jhiang SM. Expression, exon-intron organization, and chromosome mapping of the human sodium iodide symporter. Endocrinology. 1997;138(8):3555-8.

Spitzweg C, Dutton CM, Castro MR, Bergert ER, Goellner JR, Heufelder AE, Morris JC. Expression of the sodium iodide symporter in human kidney. Kidney Int. 2001;59:1013-1023.

Spitzweg C, Heufelder AE, Morris JC. Thyroid Iodine Transport. Thyroid. 2000;10(4):321-30.

Spitzweg C, Joba W, Morris JC, Heufelder AE. Regulation of sodium iodide symporter gene expression in FRTL-5 rat thyroid cells. Thyroid. 1999b;9(8):821-30.

Spitzweg C, Joba W, Schriever K, Goellner JR, Morris JC, Heufelder AE. Analysis of human sodium iodide symporter immunoreactivity in human exocrine glands. J Clin Endocrinol Metab. 1999a;84(11):4178-84.

Spitzweg, C, Joba W, Eisenmenger W, Heufelder AE. Analysis of human sodium iodide symporter gene expression in extrathyroidal tissues and cloning of its complementary DNA form salivary gland, mammary gland, and gastric mucosa. J Clin Endocrinol Metab. 1998;83:1746-1751.

Sue M, Akama T, Kawashima A, Nakamura H, Hara T, Tanigawa K, Wu H, Yoshihara A, Ishido Y, Hiroi N, Yoshino G, Kohn LD, Ishii N, Suzuki K. Propylthiouracil increases sodium/iodide symporter gene expression and iodide uptake in rat thyroid cells in the absence of TSH. Thyroid. 2012;22(8):844-52.

Suzuki K, Lavaroni S, Mori A, Ohta M, Saito J, Pietrarelli M, Singer DS, Kimura S, Katoh R, Kawaoi A, Kohn LD. Autoregulation of thyroid-specific gene transcription by thyroglobulin. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(14):8251-6.

Takasu N, Handa Y, Kawaoi A, Shimizu Y, Yamada T. Effects of iodide on thyroid follicle structure and electrophysiological potentials of cultured thyroid cells. Endocrinology. 1985 Jul;117(1):71-6.

Tan PK, Waites C, Liu Y, Krantz DE, Edwards RH. A leucine based motif mediates the endocytosis of vesicular monoamine and acetylcholine transporters. J Biol Chem. 1998;273:17351-17360.

Taurog A. The mechanism of action of the thioureylene antithyroid drugs. Endocrinology. 1976;98(4):1031-46.

Taurog, A. Thyroid hormone synthesis. In: Braverman LE, Utiger RD (Ed.) The thyroid: A fundamental and clinical text. 8th ed. New York: Lippincott-Raven; 2000. p.85-91.

Tazebay UH, Wapnir IL, Levy O, Dohan O, Zuckier LS, Zhao QH, Deng HF, Amenta PS, Fineberg S, Pestell RG, Carrasco N. The mammary gland iodide transporter is expressed during lactation and in breast cancer. Nat Med. 2000;6(8):871-8.

Tong Q, Ryu KY, Jhiang SM. Promoter characterization of the rat Na+/I- symporter gene. Biochem Biophys Res Commun. 1997;239(1):34-41.

Ulianich L, Suzuki K, Mori A, Nakazato M, Pietrarelli M, Goldsmith P, Pacifico F, Consiglio E, Formisano S, Kohn LD. Follicular thyroglobulin (TG) suppression of thyroid-restricted genes involves the apical membrane asialoglycoprotein receptor and TG phosphorylation. J Biol Chem. 1999;274(35):25099-107.

Uriarte SM, Jog NR, Luerman GC, Bhimani S, Ward RA, McLeish KR. Counterregulation of clathrin-mediated endocytosis by the actin and microtubular cytoskeleton in human neutrophils. Am J Physiol Cell Physiol. 2009;296(4):C857-67.

Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Yin Q, Fujio Y, Walsh K, Griendling KK. Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. J Biol Chem. 1999;274(32):22699-704.

Uyttersprot N, Pelgrims N, Carrasco N, Gervy C, Maenhaut C, Dumont JE, Miot F. Moderate doses of iodide in vivo inhibit cell proliferation and the expression of thyroperoxidase and Na+/I- symporter mRNAs in dog thyroid. Mol Cell Endocrinol. 1997;131(2):195-203.

Vadysirisack DD, Chen ES, Zhang Z, Tsai MD, Chang GD, Jhiang SM. Identification of in vivo phosphorylation sites and their functional significance in the sodium iodide symporter.J Biol Chem. 2007;282(51):36820-8.

Vaisman M, Rosenthal D, Carvalho DP. Enzimas envolvidas na organificação tireoidiana do iodo. Arq Bras Endocrinol Metab. 2004;48:9-15.

Vassart G, Dumont JE. The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth. Endocr Rev. 1992;13:596–611.

Vayre L, Sabourin JC, Caillou B, Ducreux M, Schlumberger M, Bidart JM. Immunohistochemical analysis of Na/I symporter distribution in human extra-thyroid tissues. Eur J Endocrinol. 1999;141:382–386.

Vélez ML, Costamagna E, Kimura ET, Fozzatti L, Pellizas CG, Montesinos MM, Lucero AM, Coleoni AH, Santisteban P, Masini-Repiso AM. Bacterial lipopolysaccharide stimulates the thyrotropin-dependent thyroglobulin gene expression at the transcriptional level by involving the transcription factors thyroid transcription factor-1 and paired box domain transcription factor 8. Endocrinology. 2006;147(7):3260-75.

Wallander ML, Leibold EA, Eisenstein RS. Molecular control of vertebrate iron homeostasis by iron regulatory proteins. Biochim Biophys Acta. 2006;1763(7):668-89.

Wang LH, Rothberg KG, Anderson RG. Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. J Cell Biol. 1993;123(5):1107-17.

Weiss SJ, Philp NJ, Ambesi-Impiombato FS, Grollman EF. Thyrotropin-stimulated iodide transport mediated by adenosine 3'5'- monophosphate and dependent on protein synthesis. Endocrinology. 1984;114(4):1099-107.

Wilson GM, Sun Y, Sellers J, Lu H, Penkar N, Dillard G, Brewer G. Regulation of AUF1 expression via conserved alternatively spliced elements in the 3'untranslated region. Mol Cell Biol. 1999;19(6):4056-64.

Wolff J, Chaikoff IL, Goldberg RC, Meier JR. The temporary nature of the innibitory action of excess iodide on organic iodine synthesis in the normal thyroid. Endocrinology. 1949;45(5):504-13.

Wolff J, Chaikoff IL. Plasma inorganic iodide as a homeostatic regulator of thyroid function. J Biol Chem. 1948;174(2):555-64.

Wolff J. Transport of iodide and other anions in the thyroid gland. Physiol Rev. 1964; 44:45–90.

Yamamoto A, Tagawa Y, Yoshimori T, Moriyama Y, Masaki R, Tashiro Y. Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. Cell Struct Funct. 1998;23(1):33-42.

Yamazaki K, Mitsuhashi T, Yamada E, Yamada T, Kosaka S, Takano K, Obara T, Sato K. Amiodarone reversibly decreases sodium-iodide symporter mRNA expression at therapeutic concentrations and induces antioxidant responses at supraphysiological concentrations in cultured human thyroid follicles. Thyroid. 2007;17(12):1189-200.

Yarar D, Waterman-Storer CM, Schmid SL. A dynamic actin cytoskeleton functions at multiple stages of clathrin-mediated endocytosis. Mol Biol Cell. 2005;16(2):964-75.

Yoshida A, Sasaki N, Mori A, Taniguchi S, Mitani Y, Ueta Y, Hattori K, Sato R, Hisatome I, Mori T, Shigemasa C, Kosugi S. Different electrophysiological character of I, ClO4, and SCN in the transport by Na/I symporter. Biochem Biophys Res Commun. 1997;231:731-734.

Yoshida A, Sasaki N, Mori A, Taniguchi S, Ueta Y, Hattori K, Tanaka Y, Igawa O, Tsuboi M, Sugawa H, Sato R, Hisatome I, Shigemasa C, Grollman EF, Kosugi S. Differences in the electrophysiological response to I and the inhibitory anions SCN and ClO4, studied in FRTL-5 cells. Biochim Biophys Acta. 1998;414: 231-237.

Yoshida A, Taniguchi S, Hisatome I, Royaux IE, Green ED, Kohn LD, Suzuki K. Pendrin is an iodide-specific apical porter responsible for iodide efflux from thyroid cells. J Clin Endocrinol Metab. 2002;87(7):3356-61.

Zaballos MA, Garcia B, Santisteban P. Gbetagamma dimers released in response to thyrotropin activate phosphoinositide 3-kinase and regulate gene expression in thyroid cells. Mol Endocrinol. 2008;22(5):1183-99.

Zimmermann MB, Andersson M. Assessment of iodine nutrition in populations: past, present, and future. Nutr Rev. 2012a; 70(10):553-70.

Zimmermann MB, Andersson M. Update on iodine status worldwide. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 2012b;19(5):382-7.

Zimmermann MB, Ito Y, Hess SY, Fujieda K, Molinari L. High thyroid volume in children with excess dietary iodine intakes. Am J Clin Nutr. 2005;81(4):840-4.

Zuo L, Christofi FL, Wright VP, Bao S, Clanton TL. Lipoxygenase-dependent superoxide release in skeletal muscle. J Appl Physiol. 2004;97:661-668.

Zuo L, Christofi FL, Wright VP, Liu CY, Merola AJ, Berliner LJ, Clanton TL. Intra- and extracellular measurement of reactive oxygen species produced during heat stress in diaphragm muscle. Am J Physiol Cell Physiol. 2000;279:C1058-C1066.

APÊNDICE – *LISTA DE TRABALHOS PUBLICADOS*

Am J Physiol Cell Physiol. 2010 Apr;298(4):C893-9.

Posttranscriptional regulation of sodium-iodide symporter mRNA expression in the rat thyroid gland by acute iodide administration.

Serrano-Nascimento C, Calil-Silveira J, Nunes MT.

Dept. of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil.

Abstract

Iodide is an important regulator of thyroid activity. Its excess elicits the Wolff-Chaikoff effect, characterized by an acute suppression of thyroid hormone synthesis, which has been ascribed to serum TSH reduction or TGF-beta increase and production of iodolipids in the thyroid. These alterations take hours/days to occur, contrasting with the promptness of Wolff-Chaikoff effect. We investigated whether acute iodide administration could trigger events that precede those changes, such as reduction of sodium-iodide symporter (NIS) mRNA abundance and adenylation, and if perchlorate treatment could counteract them. Rats subjected or not to methylmercaptoimidazole treatment (0.03%) received NaI (2,000 microg/0.5 ml saline) or saline intraperitoneally and were killed 30 min up to 24 h later. Another set of animals was treated with iodide and perchlorate, in equimolar doses. NIS mRNA content was evaluated by Northern blotting and real-time PCR, and NIS mRNA poly(A) tail length by rapid amplification of cDNA ends-poly(A) test (RACE-PAT). We observed that NIS mRNA abundance and poly(A) tail length were significantly reduced in all periods of iodide treatment. Perchlorate reversed these effects, indicating that iodide was the agent that triggered the modifications observed. Since the poly(A) tail length of mRNAs is directly associated with their stability and translation efficiency, we can assume that the rapid decay of NIS mRNA abundance observed was due to a reduction of its stability, a condition in which its translation could be impaired. Our data show for the first time that iodide regulates NIS mRNA expression at posttranscriptional level, providing a new mechanism by which iodide exerts its autoregulatory effect on thyroid.

J Clin Endocrinol Metab. 2011 Jul;96(7):E1100-7.

Iodide transport defect: functional characterization of a novel mutation in the Na+/I- symporter 5'-untranslated region in a patient with congenital hypothyroidism.

Nicola JP, Nazar M, Serrano-Nascimento C, Goulart-Silva F, Sobrero G, Testa G, Nunes MT, Muñoz L, Miras M, Masini-Repiso AM.

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Haya de la Torre y Medina Allende, 5000 Córdoba, Argentina.

Abstract

CONTEXT: Iodide transport defect (ITD) is an autosomal recessive disorder caused by impaired Na(+)/I(-) symporter (NIS)-mediated active iodide accumulation into thyroid follicular cells. Clinical manifestations comprise a variable degree of congenital hypothyroidism and goiter, and low to absent radioiodide uptake, as determined by thyroid scintigraphy. Hereditary molecular defects in NIS have been shown to cause ITD.

OBJECTIVE: Our objective was to perform molecular studies on NIS in a patient with congenital hypothyroidism presenting a clinical ITD phenotype.

DESIGN: The genomic DNA encoding NIS was sequenced, and an in vitro functional study of a newly identified NIS mutation was performed.

RESULTS: The analysis revealed the presence of an undescribed homozygous C to T transition at nucleotide -54 (-54C>T) located in the 5'-untranslated region in the NIS sequence. Functional studies in vitro demonstrated that the mutation was associated with a substantial decrease in iodide uptake when transfected into Cos-7 cells. The mutation severely impaired NIS protein expression, although NIS mRNA levels remained similar to those in cells transfected with wild-type NIS, suggesting a translational deficiency elicited by the mutation. Polysome profile analysis demonstrated reduced levels of polyribosomes-associated mutant NIS mRNA, consistent with reduced translation efficiency.

CONCLUSIONS: We described a novel mutation in the 5'-untranslated region of the NIS gene in a newborn with congenital hypothyroidism bearing a clinical ITD phenotype. Functional evaluation of the molecular mechanism responsible for impaired NIS-mediated iodide concentration in thyroid cells indicated that the identified mutation reduces NIS translation efficiency with a subsequent decrease in protein expression and function.

Braz J Med Biol Res. 2011 Oct;44(10):1060-7.

Hypothyroidism decreases proinsulin gene expression and the attachment of its mRNA and eEF1A protein to the actin cytoskeleton of INS-1E cells.

Goulart-Silva F, Serrano-Nascimento C, Nunes MT.

Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

Abstract

The actions of thyroid hormone (TH) on pancreatic beta cells have not been thoroughly explored, with current knowledge being limited to the modulation of insulin secretion in response to glucose, and beta cell viability by regulation of pro-mitotic and pro-apoptotic factors. Therefore, the effects of TH on proinsulin gene expression are not known. This led us to measure: a) proinsulin mRNA expression, b) proinsulin transcripts and eEF1A protein binding to the actin cytoskeleton, c) actin cytoskeleton arrangement, and d) proinsulin mRNA poly(A) tail length modulation in INS-1E cells cultured in different media containing: i) normal fetal bovine serum - FBS (control); ii) normal FBS plus 1 µM or 10 nM T3, for 12 h, and iii) FBS depleted of TH for 24 h (Tx). A decrease in proinsulin mRNA content and attachment to the cytoskeleton were observed in hypothyroid (Tx) beta cells. The amount of eEF1A protein anchored to the cytoskeleton was also reduced in hypothyroidism, and it is worth mentioning that eEF1A is essential to attach transcripts to the cytoskeleton, which might modulate their stability and rate of translation. Proinsulin poly(A) tail length and cytoskeleton arrangement remained unchanged in hypothyroidism. T3 treatment of control cells for 12 h did not induce any changes in the parameters studied. The data indicate that TH is important for proinsulin mRNA expression and translation, since its total amount and attachment to the cytoskeleton are decreased in hypothyroid beta cells, providing evidence that effects of TH on carbohydrate metabolism also include the control of proinsulin gene expression.

Mol Cell Endocrinol. 2012 Feb 26;349(2):154-61.

New insights about the posttranscriptional mechanisms triggered by iodide excess on sodium/iodide symporter (NIS) expression in PCCl3 cells.

Serrano-Nascimento C, Calil-Silveira J, Goulart-Silva F, Nunes MT.

Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, 05508-000 São Paulo, SP, Brazil.

Abstract

Iodide excess acutely downregulates NIS mRNA expression, as already demonstrated. PCCl3 cells treated or not with NaI, NaI+NaClO(4) or NaI+Methimazole, for 30 min to 24 h, were used to further explore how iodide reduces NIS gene expression. NIS mRNA expression was evaluated by Real-Time PCR; its poly(A) tail length, by RACE-PAT; its translation rate, by polysome profile; total NIS content, by Western blotting. NIS mRNA decay rate was evaluated in actinomycin-D-treated cells, incubated with or without NaI for 0-6 h. Iodide treatment caused a reduction in NIS mRNA expression, half-life, poly(A) tail length, recruitment to ribosomes, as well as NIS protein expression. Perchlorate, but not methimazole, prevented these effects. Therefore, reduced poly(A) tail length of NIS mRNA seems to be related to its decreased half-life, in addition to its translation impairment. These data provide new insights about the molecular mechanisms involved in the rapid and posttranscriptional inhibitory effect of iodide on NIS expression.

Mol Cell Endocrinol. 2012 Mar 5;350(1):118-24.

Iodide treatment acutely increases pendrin (SLC26A4) mRNA expression in the rat thyroid and the PCCl3 thyroid cell line by transcriptional mechanisms.

Calil-Silveira J, Serrano-Nascimento C, Nunes MT.

Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, 05508-000 São Paulo, SP, Brazil.

Abstract

Iodine is a critical element involved in thyroid hormone synthesis. Its efflux into the follicular lumen is thought to occur, in part, through pendrin at the apical membrane of thyrocytes. This study attempted to investigate whether iodide administration affects SLC26A4 mRNA expression in rat thyroid and in PCCl3 cells. Rats and cells were treated or not with NaI from 30 min up to 48 h. One group was concomitantly treated with sodium perchlorate. SLC26A4 mRNA expression was also investigated in PCCl3 cells treated with actinomycin D prior to NaI treatment. Iodide administration significantly increased SLC26A4 mRNA content in both models. The simultaneous administration of NaI and perchlorate, as well as the treatment of PCCl3 cells with actinomycin D prevented this effect, indicating that intracellular iodide is essential for this event, which appears to be triggered by transcriptional mechanisms. These data show that intracellular iodide rapidly upregulates SLC26A4 mRNA expression.

Thyroid. 2012 Jul;22(7):747-54.

Triiodothyronine (T3) acutely stimulates glucose transport into L6 muscle cells without increasing surface GLUT4, GLUT1 or GLUT3.

Teixeira SS, Tamrakar AK, Goulart-Silva F, Serrano-Nascimento C, Klip A, Nunes MT.

University of São Paulo, Physiology and Biophysics, São Paulo, Brazil; teixeira@icb.usp.br.

Abstract

Background: Thyroid hormones (TH) act genomically to stimulate glucose transport by elevating glucose transporters (GLUTs) expression and glucose utilization by cells. However, non-genomic effects of TH are now emerging. Here we assess how T3 acutely affects glucose transport and the content of glucose transporters GLUT4, GLUT1 and GLUT3 at the surface of muscle cells, and possible interactions between T3 and insulin action. Methods: Differentiated L6 myotubes transfected with myc-tagged GLUT4 (L6-GLUT4myc) or GLUT1 (L6-GLUT1myc) and wild type L6 myotubes were studied in the following conditions: control, hypothyroid (Tx), Tx plus T3, Tx plus insulin, and Tx plus insulin and T3. Results: Glucose uptake and GLUT4 content at the cell surface decreased in the Tx group relative to controls. T3 treatment for 30 min increased glucose transport into L6-GLUT4myc cells without altering surface GLUT4 content, which increased only thereafter. The total amount of GLUT4 protein remained unchanged among the groups studied. The surface GLUT1 content of L6-GLUT1myc cells also remained unaltered after T3 treatment; however, in these cells glucose transport was not stimulated by T3. In wild type L6 cells although T3 treatment increased the total amount of GLUT3, it did not change the surface GLUT3 content. Moreover, within 30 min, T3 stimulation of glucose uptake was additive to that of insulin in L6-GLUT4myc cells. As expected, insulin elevated surface GLUT4 content and glucose uptake. However, interestingly, surface GLUT4 content remained unchanged or even dropped with T3 plus insulin. Conclusions: These data reveal that T3 rapidly increases glucose uptake in L6-GLUT4myc cells, which, at least for 30 min, did not depend on an increment in GLUT4 at the cell surface yet potentiates insulin action. We propose that this rapid T3 effect involves activation of GLUT4 transporters at the cell surface, but cannot discount the involvement of an unknown GLUT.

Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2013 Jan;121(1):14-9.

Triiodothyronine (T3) Induces Proinsulin Gene Expression by Activating PI3K: Possible Roles for GSK-3β and the Transcriptional Factor PDX-1.

Goulart-Silva F, Serrano-Nascimento C, Texeira SS, Nunes MT.

Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, 05508-000 São Paulo, SP, Brazil.

Abstract

Thyroid hormone (TH) activates PI3K and Akt, leading to glucose uptake in rat skeletal muscle cells and proliferation of insulinoma cells, respectively. However, TH actions on pancreatic beta cells have been little explored, which lead us to evaluate the TH effects on proinsulin gene expression, and the involvement of PI3K/Akt/GSK-3β signaling pathway, and a transcriptional factor for insulin (PDX-1). INS-1E cells were sorted into 3 groups: control and TH-depleted treated or not with T3 for 30 min. Cells were also previously treated with actinomycin D (ActD), cycloheximide (CHX), wortmannin or Akt inhibitor. Proinsulin mRNA expression was evaluated by real time PCR, and pGSK-3β and PDX-1 protein content was analyzed by Western blotting. TH depletion decreased proinsulin mRNA content, which was restored after acute T3 treatment. ActD, CHX and wortmannin, but not Akt inhibitor, prevented the rapid stimulatory effect of T3 on proinsulin mRNA expression. TH depletion did not affect the phosphorylated GSK-3β and PDX-1 protein content; but T3 treatment led to an increase in the content of these proteins. These data indicate that T3 acutely increases proinsulin mRNA expression, by mechanisms which depends on the activation of PI3K, but not of Akt, and may involve the inactivation of GSK-3β by phosphorylation. Since GSK-3β enhances PDX-1 degradation rate, the GSK-3β inactivation could explain the increase of PDX-1 content in T3-treated cells. Considering that PDX-1 is one of the most important transcriptional factors for proinsulin gene expression, its enhancement may underlie the increased proinsulin mRNA content acutely induced by T3.

J Mol Histol. 2013 Apr;44(2):221-9.

Estradiol induces transcriptional and posttranscriptional modifications in versican expression in the mouse uterus.

Salgado RM, Covarrubias AC, Favaro RR, Serrano-Nascimento C, Nunes MT, Zorn TM.

Department of Cell and Developmental Biology, University of São Paulo, Avenida Professor Lineu Prestes, 1524-Room 429, Butantã, São Paulo, SP, 05508-000, Brazil, rsalgado@icb.usp.br.

Abstract

We have previously shown the differential expression of versican in the mouse uterus under ovarian hormone influence. We also demonstrated there is not a direct correlation between mRNA levels and protein expression, suggesting posttranscriptional events, such as alteration in mRNA stability. This posttranscriptional effect may result in the elongation and stabilization of transcripts poly(A) tail. Thus, the aim of this study was to analyze whether estradiol (E2) regulates versican mRNA stability and expression in a dose-related and time-dependent manner. For this purpose female mice were ovariectomized and treated with a single injection of 0.1 or 10 μg E2. To block transcription a group of females received a single injection of alpha-amanitin before hormone administration. Uterine tissues were collected 30 min, 1, 3, 6, 12 and 24 h after treatments and processed for quantitative real time PCR (qPCR), RACE-PAT Assay and immunohistochemistry. qPCR showed that versican mRNA levels are higher than control from 3 to 24 h after E2 administration, whereas after transcription inhibition versican mRNA unexpectedly increases within 3 h, which can be explained when transcriptional blockers alter the degradation rate of the transcript, resulting in the superinduction of this mRNA. Accordingly, analysis of versican transcript poly(A) tail evidenced a longer product 3 h after treatment, but not after 12 h. Versican immunoreaction becomes conspicuous in the superficial stroma only 3 h after E2 injection, whereas the whole stroma is immunoreactive from 6 h onward. These results demonstrate that E2 modulates versican at the transcriptional and posttranscriptional levels in a time-dependent manner.

Manuscrito submetido na Thyroid. 2013.

The acute inhibitory effects of iodide excess on sodium/iodide symporter expression and activity involve the PI3K/Akt signaling pathway activation.

Serrano-Nascimento C, Texeira SS, Nicola JP, Nachbar RT, Masini-Repiso, Nunes MT.

Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, 05508-000 São Paulo, SP, Brazil. Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI-CONICET), Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

Abstract

Background: Iodide is an important regulator of thyroid function and gene expression. Its excess reduces sodium/iodide symporter (NIS) expression and activity, as well as increases ROS production, which is known to activate PI3K/Akt cascade. Previous studies have demonstrated that this signaling pathway also exerts inhibitory effects on NIS expression and activity. Therefore, the aim of this study was to analyze whether the inhibitory effects of acute iodide excess on NIS were mediated by PI3K/Akt signaling pathway through ROS production.

Methods: PCCl3 cells, cultured in normal or starving conditions, were treated with NaI (10-3 M) for 15-60 min, and Akt phosphorylation was evaluated by Western Blotting. To investigate the activation of PI3K, cells were previously treated with Wortmannin or LY294002 and treated for 30 min with iodide. ROS production and its involvement with Akt activity were evaluated through DHE assay and by using ROS scavengers (NAC/Ebselen), respectively. PCCl3 cells concomitantly treated with NaI and specific inhibitors of PI3K and Akt (Akti1/2) were used to investigate the role of PI3K/Akt signaling pathway on the inhibitory effects of iodide on NIS expression. NIS mRNA content, plasma membrane expression and activity were evaluated by Real-Time PCR, cell surface biotinylation and iodide uptake assay, respectively.

Results: Iodide excess increased Akt phosphorylation, both at normal and starving conditions. This effect was abolished when the cells were previously treated with PI3K inhibitors or ROS scavengers. Iodide-induced reduction of NIS mRNA expression, plasma membrane expression and iodide uptake activity were prevented when the cells were previously treated with PI3K/Akt inhibitors.

Conclusions: The acute and posttranscriptional effects of iodide on NIS expression and activity depend on the production of reactive oxygen species that leads to the activation of PI3K/Akt signaling pathway in thyrocytes. These results include PI3K/Akt as a novel mediator of iodide effect on thyroid autoregulation.