

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: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. 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

## 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 PCC13 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, transpcionais e pós-transpcionais, envolvidas no efeito inibitório do iodeto sobre a expressão e função da proteína NIS. Para tanto, células PCC13 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-transpcionais estudados; avaliar os eventos transpcionais 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, transpcionais e pós-transpcionais, 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 transcripcional. 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 essential 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 function after acute exposure of thyrocytes to iodide excess. Therefore, the data presented herein add new evidences of the mechanisms 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.

## 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.

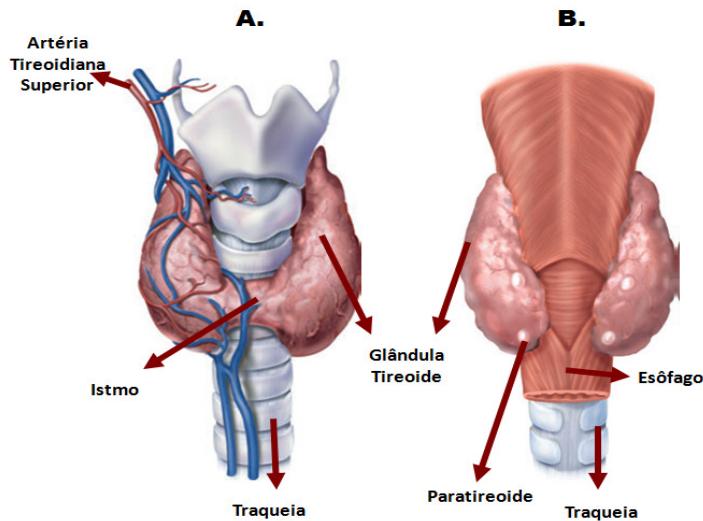
Apesar de a tireoide possuir um sistema altamente especializado de transporte de iodo, as doenças geradas a partir da deficiência de iodo na dieta ainda são um grave problema de saúde pública mundial, com múltiplas e severas consequências para o organismo, todas devidas à inadequada produção de hormônios 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, África do Sul, Zimbábue 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 bocio (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.

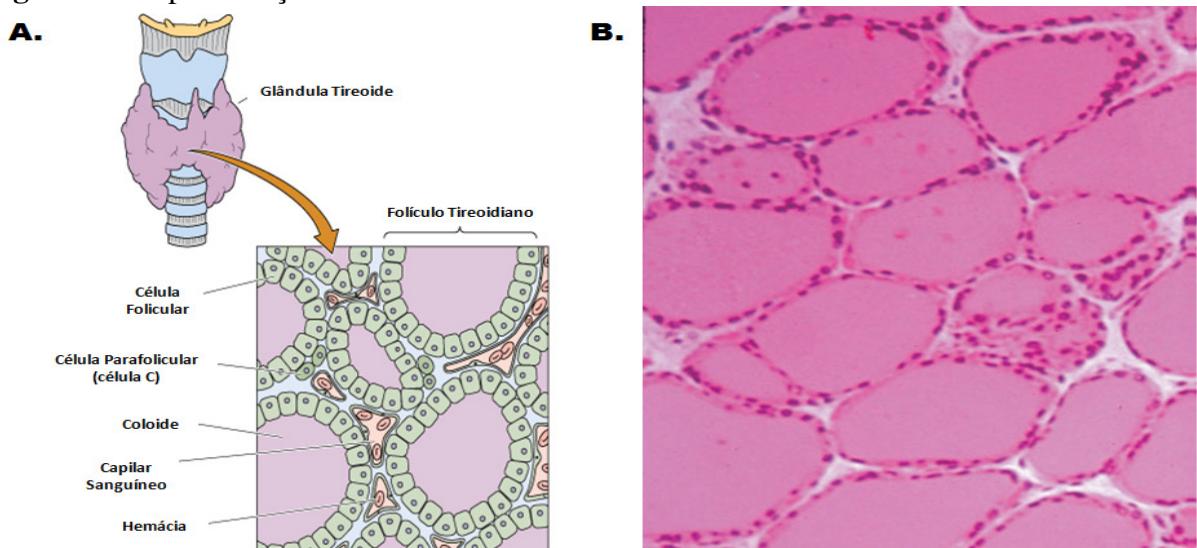


A. Visão Anterior da Tireoide. B. Visão Posterior da Tireoide  
Fonte: Modificado de (Saladin, 2003).

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).

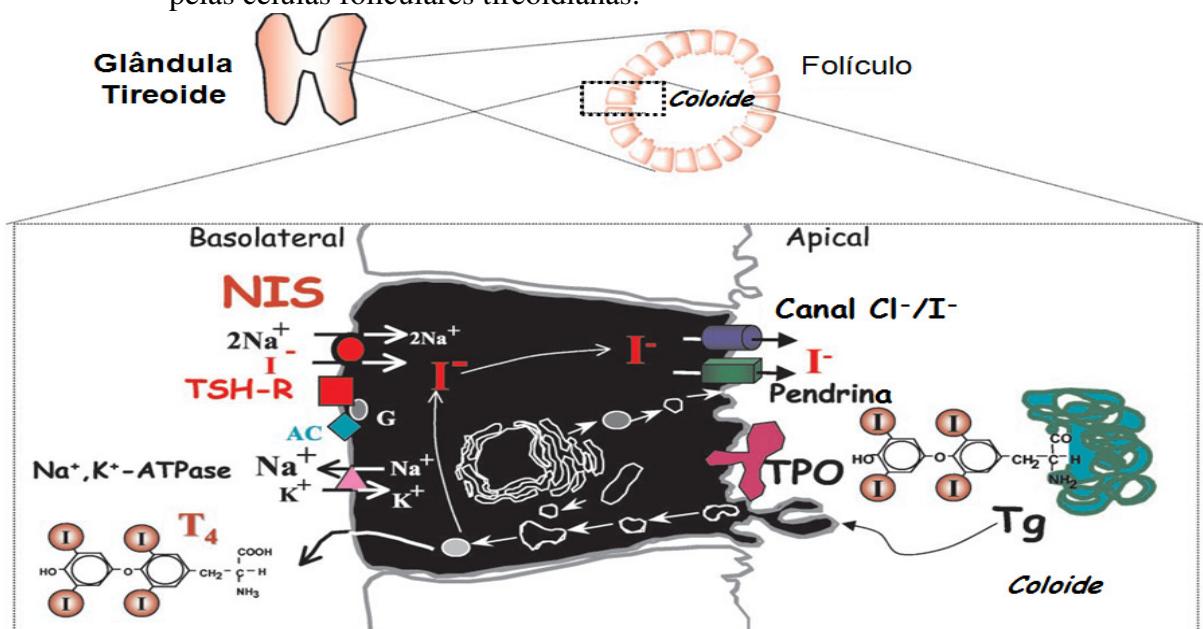
Como já explicitado anteriormente, o iodo é fundamental para a biossíntese dos HTs, e após ter sido obtido pela dieta, é reduzido a iodeto, absorvido pelo trato gastrointestinal e transportado pela corrente sanguínea, a partir da qual a tireoide tem acesso a este oligoelemento e é capaz de captá-lo, 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-diiodotirosina (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, consequentemente, 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)

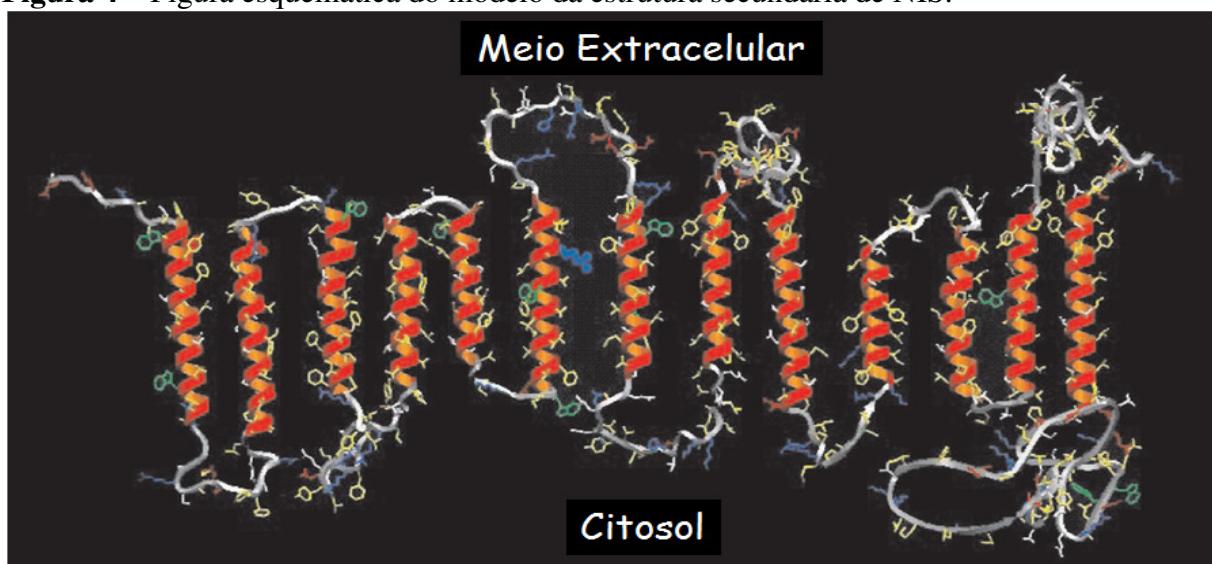
### 1.3.1 Caracterização molecular de NIS

Em 1996, o gene SLC5A5, que codifica NIS em humanos e o gene Slc5a5, que codifica NIS em ratos, foram clonados (Dai 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 exons 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***

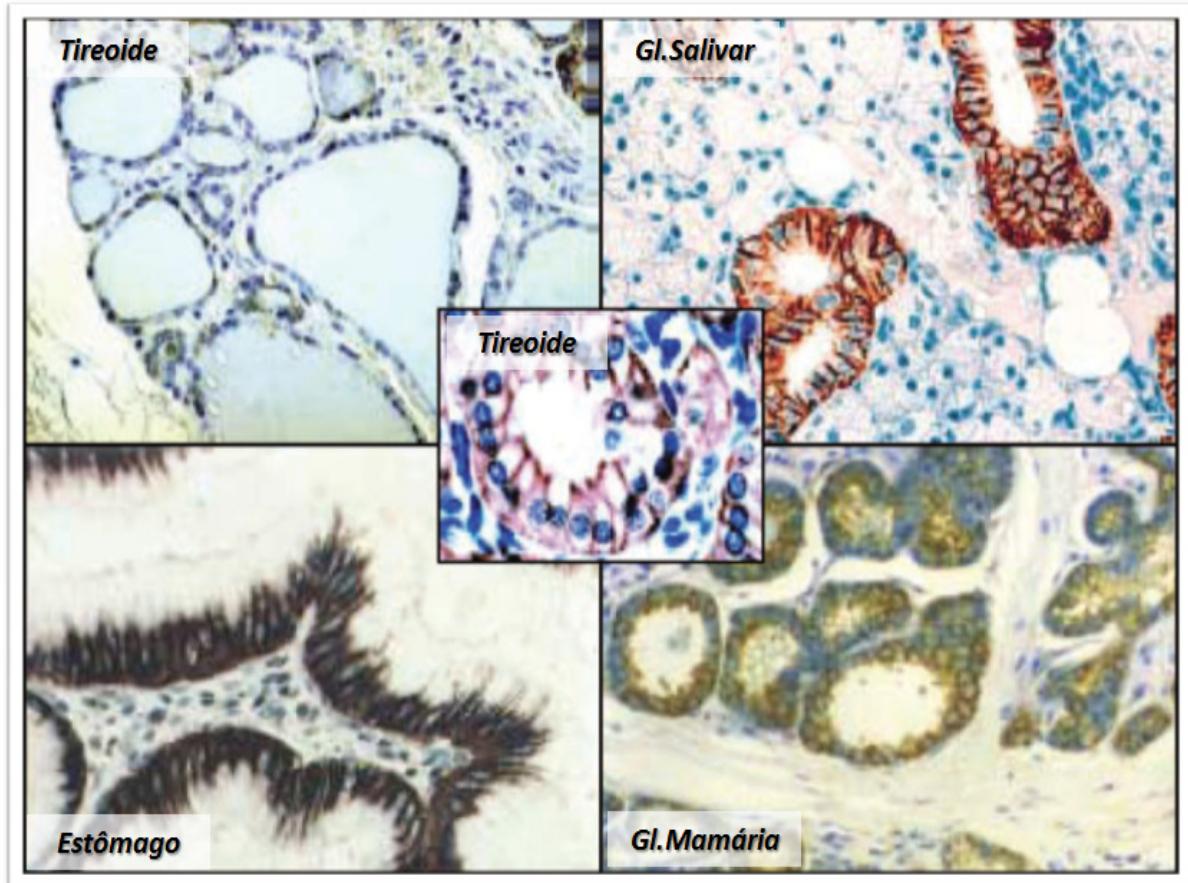
Considerando que o interior das células foliculares tireoidianas mantém um potencial elétrico negativo e uma concentração de iodeto maior do que aquela apresentada pelo plasma, a captação de iodeto pela tireoide mediada pela NIS, somente é possível, graças a um transporte ativo secundário, o qual ocorre a favor do gradiente eletroquímico de Na<sup>+</sup> gerado pela Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> 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 transcripcionais (Kogai et al., 1997; Marcocci et al., 1984), quanto pós-transcripcionais. 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  $\alpha$  da proteína G, as subunidades  $G\beta\gamma$  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- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) e interleucina 1- $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) 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 INF $\gamma$  desenvolveram um quadro de hipotireoidismo, derivado de uma intensa redução da expressão do gene de NIS (Caturegli et al., 2000).

O TGF $\beta$  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 TGF $\beta$  envolve a diminuição da expressão do fator transcracional 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 transcrpcionais 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 queracetina diminui a taxa de proliferação celular e reduz a expressão de NIS em células FRTL5 (Giuliani et al., 2008), enquanto que a miracetina 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-mercaptopimidazol (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 (Nagasaki, 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 ( $10 \mu\text{M}$ ), 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 ( $1\text{Na}^+ : 1\text{ClO}_4^-$ ) daquela observada durante o transporte de iodeto ( $2\text{Na}^+ : 1\text{I}^-$ ). Desta maneira, esse estudo sugeriu que NIS transporta diferentes íons a partir do gradiente de  $\text{Na}^+$ , 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 transitória 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 iodolípidos 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-transcpcionais 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 transpcionais 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  $^{131}\text{I}$  e  $^{123}\text{I}$  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 transcrecional 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  $^{125}\text{I}$ ;
- f) Investigar se a via de sinalização da PI3K (inibitória para a expressão/atividade de NIS) é ativada quando há excesso de iodeto.

## 2 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-transcpcionais acionados por este oligoelemento.
3. Os mecanismos transcpcionais são desencadeados pelo iodeto em períodos de tratamento mais longos (12 e 24 h) e envolvem o comprometimento da translocação dos fatores transcpcionais 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 transcpcionais 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, transcpcionais e pós-transcpcionais, 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 Ca<sup>2+</sup>-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-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](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, Mojdam 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 São 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<sub>1</sub> 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<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> 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<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter play a role in its Na<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> 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 suppression 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<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> 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'-untranslated 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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. 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 its 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<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> 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: independent 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  $^{131}\text{I}$  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 [ $^3\text{H}$ ]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 ( $^{131}\text{I}$ ) 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-methyl-2-mercaptopimidazole 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<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> 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<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> 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<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> 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<sup>+</sup>/K<sup>(+)</sup>-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, Forsslund-Aronsson E, Nilsson M. Stunting 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<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter mutant that causes congenital I<sup>-</sup> 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<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> 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<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> 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 iodide 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 from 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<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> 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<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> 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 inhibitory 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, ClO<sub>4</sub>, 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 ClO<sub>4</sub>, 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. Lipooxygenase-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.