

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

Tese de Doutorado

**Estudo de Hormônios Sexuais em Células Foliculares de Tireoide Humana em
Cultura Primária**

Ana Paula Santin

Orientadora: Tania Weber Furlanetto

Co-Orientadora: Ilma Simoni Brum

Porto Alegre, dezembro de 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

Tese de Doutorado

**Estudo de Hormônios Sexuais em Células Foliculares de Tireoide Humana em
Cultura Primária**

Tese de Doutorado apresentada ao PPG em
Medicina: Ciências Médicas como pré-requisito
obrigatório para obtenção do grau de Doutor

Ana Paula Santin

Orientadora: Tania Weber Furlanetto

Co-Orientadora: Ilma Simoni Brum

Porto Alegre, dezembro de 2012

CIP - Catalogação na Publicação

Santin, Ana Paula
Estudo de Hormônios Sexuais em Células Foliculares
de Tireoide Humana em Cultura Primária / Ana Paula
Santin. -- 2012.
138 f.

Orientadora: Tania Weber Furlanetto.
Coorientadora: Ilma Simoni Bruna.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2012.

1. Tireoide. 2. Cultura Primária. 3. Célula
Folicular. 4. Gene Normalizador. 5. GPR30. I.
Furlanetto, Tania Weber, orient. II. Bruna, Ilma
Simoni, coorient. III. Título.

"A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, e sim em ter novos olhos".

Marcel Proust

DEDICATÓRIA

Dedico esta Tese ao meu noivo, Fabiano Bertoni. Gostaria de dividir contigo esta minha conquista e te agradecer por ser um companheiro sempre presente, de todas as horas, de todos os momentos!!

AGRADECIMENTOS

Aos meus inspiradores Arcângelo e Rita Santin e aos meus amados irmãos Bruno, Caroline e Ricardo, obrigada por sempre me apoiarem e ficarem na torcida nas minhas conquistas!

À minha querida orientadora, Prof^a Tania Weber Furlanetto, que esteve sempre envolvida em um grau perfeito em todas as etapas da minha tese, tanto na parte teórica como experimental. Ao longo da minha carreira acadêmica, espero ser uma orientadora tão eficaz para os meus alunos como a Prof^a Tania foi para mim. Obrigada pelos ensinamentos acadêmicos, pela paciência e troca de experiência. Obrigada pelas conversas e pelos longos conselhos sobre a vida.

À minha co-orientadora Ilma Simoni Brum, agradeço por abrir as portas dos laboratórios LAGOM/LabiMET e, em especial, pela permanente disponibilidade de sempre me ouvir, ensinar e sugerir, tornando possível a realização desta tese.

À contagiante profissional Dr^a Beatriz Assis Brasil, pela paciência e disponibilidade durante as coletas das amostras durante toda a Tese.

À Prof^a Regina Pessoa-Pureur e a amiga Dr^a Samanta Loureiro, obrigada pelos ensinamentos e por embelezar e dar "cor" as minhas lindas células.

Às minhas mestres e amigas Ana Antunes, Sandrine Wagner, Simone Castro, Raquel Weber e Laura Alencastro pelo incentivo inicial em seguir a vida acadêmica.

As queridas colegas Aline Damo e Ana Caroline Hillebrand e ao estimado colega Gustavo Dias Ferreira, obrigada pela ajuda técnica nas PCRs e nos Western *blots*, e pela torcida durante as etapas desta Tese.

À brilhante e exemplar aluna de iniciação científica Laura Bessestil, obrigada pela ajuda diária e por fazer as tuas "tarefas" com amor e dedicação.

Aos colegas do LAGOM/LABiMET: Adriane Pozzobon, Aline Amaral, Ana Carolina Hillebrand, Ana Kussler, Amanda Machado, Anita Pimental, Bruna Amorim, Carlos Flores, Diego Alcoba, Fernanda Seibel, Gisele Branchini, Gustavo Ferreira, Gustavo Vasconcelos Alves, Joelson Tomedi, Lolita Schneider, Patrícia Martiny, Tiago Fontanive, Vanderlei Biolchi, Vanessa Lora e Viviane Treichel obrigada pela paciência inicial dos veteranos, pelo caloroso acolhimento de todos, pelos cafezinhos e seminários. A convivência diária foi maravilhosa e a amizade vai ficar para sempre...vocês foram muito importantes nessa etapa da minha vida!!

Aos colegas do CPE-HCPA pelas conversas de corredor, pelas trocas de ideias e reagentes.

Ao secretário Everaldo do CPE e ao técnico Jefersom do UAMP, obrigada pelos "Bons Dias", pelos cafezinhos maravilhosos, pela paciência para agilizar a parte burocrática dos projetos e pelo convívio diário!! Vocês são profissionais admiráveis!

À CAPES/PROF, HCPA/FIPE pelo auxílio financeiro, possibilitando o desenvolvimento desta Tese.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
Fisiologia normal da célula folicular	2
Regulação da função e crescimento das células foliculares da tireoide.....	4
Lesões da Tireoide.....	6
Nódulos Tireoidianos	6
Câncer de Tireoide	7
Referências	9
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
Progesterona.....	15
Receptores de Progesterona (PR).....	16
Regulação da expressão dos PRs.....	17
Efeitos genômicos da progesterona	17
Efeitos não genômicos mediados pela progesterona	18
Estradiol	19

GPR30/GPER.....	19
Normalização da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR).....	22
Referências.....	23
JUSTIFICATIVA.....	31
OBJETIVOS.....	32
Objetivo Geral	32
Objetivos Específicos	32
METODOLOGIAS.....	33
Delineamento do estudo	33
Obtenção do tecido	33
Cultura primária de células foliculares da tireoide.....	33
Desenho experimental e tratamentos utilizados	34
Extração de RNA total.....	35
Síntese de cDNA.....	35
Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR)	36
Seleção do gene de referência.....	38
Análise da expressão proteica	38
Extração de Proteínas	38
Western <i>blotting</i>	38

Imunocitoquímica	40
Referências	41
RESULTADOS e DISCUSSÃO	42
CAPÍTULO I.....	43
Papel do estrogênio na função e regulação do crescimento da tireoide	43
CAPÍTULO II.....	61
Receptores de Progesterona no Tecido Tireoidiano: uma Revisão Sistemática	61
CAPÍTULO III.....	76
Padronização de um Modelo de Cultura Primária de Células Foliculares de Tireoide Humana	76
Dissociação enzimática e condições de cultivo	77
Padrão de distribuição dos filamentos de F-actina e α -tubulina nas células foliculares da tireoide em cultura primária.....	80
Manutenção da diferenciação das células foliculares da tireoide	82
Referências	85
CAPÍTULO IV	87
Validação de um Gene de Referência para a Normalização da Expressão Gênica por PCR Quantitativa em Tempo Real em Células Foliculares de Tireoide Humana em Cultura Primária Tratadas com Progesterona e Estradiol	87
CAPÍTULO V	101

Efeito da progesterona nas expressão dos genes TG, TPO e NIS em células foliculares da tireoide humana.....	101
CAPÍTULO VI	114
Identificação do Receptor de Membrana GPR30/GPER em Células Foliculares de Tireoide Humana.....	114
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	132
PERSPECTIVAS E RESULTADOS PRELIMINARES	135
FONTES DE FINANCIAMENTO.....	137

RESUMO

Os mecanismos etiopatogênicos que levam ao desenvolvimento dos nódulos e tumores da tireoide ainda não são bem conhecidos. É fato estabelecido que a prevalência dessas lesões é maior nas mulheres. Dessa forma, o que nos motivou a realizar esta Tese foi avaliar se os hormônios sexuais femininos tem efeito direto sobre as células de tireoide humanas normais podendo contribuir para a sua etiopatogenia.

Este estudo teve como objetivos padronizar um modelo de cultura primária de células foliculares de tireoide humana normal e nesse modelo validar um gene normalizador após tratamento com estradiol e progesterona, avaliar os efeitos da progesterona na expressão dos genes NIS, TG e TPO bem como avaliar a expressão gênica e proteica e a possível localização intracelular do receptor de membrana GPR30 nestas células.

Em nosso modelo de cultura primária em monocamada, as células foliculares mantiveram sua morfologia cubóide característica e permaneceram diferenciadas o que foi evidenciado pela dosagem de tireoglobulina e T₄ livre, no sobrenadante do meio de cultura, e pela identificação das proteínas TG e TPO por imunocitoquímica. A estimulação com progesterona aumentou a expressão dos genes NIS, TG e TPO, respectivamente, 1.78 (p=0.003), 1.50 (p=0.034) e 1.64 (p=0.018) vezes, quando

comparadas ao grupo tratado somente com TSH. Essa estimulação da progesterona foi inibida por mifepristona sugerindo que a progesterona tem efeito direto nas células foliculares da tireoide e que esse efeito é mediado por seu receptor nuclear. A normalização da expressão gênica foi realizada pelo gene β -actina, o qual demonstrou uma maior estabilidade entre os grupos analisados. Demonstramos também que as células normais da tireoide expressam tanto o gene como a proteína do receptor de membrana GPR30 com possível localização na membrana celular e no espaço perinuclear.

Palavras chaves: Tireoide; Cultura Primária; Célula Folicular; Tireoperoxidase; Tireoglobulina; Simporter sódio/iodo; Gene de Referência; Progesterona; Estradiol; Receptor de Progesterona; Receptor de Estrogênio; GPR30.

ABSTRACT

The mechanisms leading to the development of thyroid nodules and tumors are not well established. As these lesions are more common in women, female sex hormones could be involved in the pathogenesis of these disorders.

The objectives of this study were to establish a model of primary culture of normal human thyroid follicular cells, to validate a normalizing gene for qRT-PCR after treatment with estradiol and progesterone, to evaluate the effects of progesterone on the expression of genes NIS, TG and TPO, and to evaluate the GPR30 gene and protein expression as well as its possible intracellular location, in these cells. In our model of primary monolayer culture, follicular cells maintained their characteristic cuboid differentiated morphology; and had evidence of differentiated thyroid function: the production of thyroglobulin and free T4, and identification of TG and TPO proteins by immunocytochemistry . Adding progesterone to TSH increased NIS, TG and TPO mRNA, respectively, 1.78 (p=0.003), 1.50 (p=0.034) and 1.64 (p=0.018) folds, compared to the group treated with only TSH. This stimulation was inhibited by mifepristone, suggesting that progesterone has a direct effect on the thyroid follicular cells. Normalization of gene expression was performed using β -actin as reference gene. We have also demonstrated that normal thyroid cells expressed

GPR30 gene and protein, which is possibly localized in the plasma membrane and the perinuclear region.

Keywords: Thyroid; Primary Culture; Follicular Thyroid Cell; Thyroperoxidase; Thyroglobulin; Sodium/Iodide Simporter; Reference Gene; Progesterone; Estradiol; Progesterone Receptor; Estrogen Receptor; GPR30.

LISTA DE ABREVIATURAS

Akt ou PKB	Proteína Quinase B
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclico
cDNA	DNA complementar
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
G α	Proteína α G estimulatória
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina-1
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
NIS	Simporter sódio/iodo
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
T4L	Tiroxina livre
TG	Tireoglobulina
TPO	Tireoperoxidase
TRH	Hormônio liberador de tireotrofina
TSH	Hormônio tireotrófico estimulante
TSH-R	Receptor de hormônio tireotrófico estimulante

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Regulação da função tireoidiana.	2
Figura 2 - Representação esquemática de uma célula folicular da tireoide, com a localização celular das principais proteínas e organelas envolvidas na regulação da função diferenciada destas células. envolvidas na regulação da função diferenciada destas células.	3
Figura 3 - Esquema das alterações genéticas encontradas em câncer de tireoide derivadas de células foliculares, com a incidência de cada tipo de câncer (caixa roxa); a frequência das principais mutações envolvidas (verde), bem como as rotas ativadas ou inibidas em cada alteração (laranja).	9
Figura 4 - Curva de dissociação ou curva de melting para os genes (A) tireoperoxidase, (B) simporter sódio-iodeto e (C) tireoglobulina, demonstrando a especificidade dos primers na amplificação de um único produto.....	37
Figura 5 - A e B, onde podem ser visualizados aglomerados de células foliculares da tireoide após digestão e, em C, uma única célula folicular isolada.	77
Figura 6 - Imagens de células foliculares da tireoide, obtidas por microscópio invertido de contraste de fase, demonstrando sua morfologia característica em monocamada em diferentes escalas e estágios de confluência.....	79

Figura 7 - Morfologia característica das células foliculares da tireoide em formato cuboide (A) e em formato de gota (B) e a perda da morfologia 3 dias após tripsinização (C).	80
Figura 8 - Análise das proteínas α -tubulina (A e B) e F-actina (C e D) das células foliculares da tireoide em aumento de 1000x.	81
Figura 9 - Localização intracelular das proteínas tireoglobulina (A) e tireoperoxidase (B) (indicadas por setas, em verde). Os microfilamentos de actina foram marcados com faloidina (em vermelho) e o núcleo com DAPI (em azul). Aumento de 1000x.	82
Figura 10 - Efeito da progesterona na expressão dos genes NIS, TG e TPO e a possível localização do receptor de membrana GPR30 em um modelo de células foliculares normais da tireoide humana em cultura primária.....	116
Figura 11 - Efeitos da progesterona na fosforilação das proteínas AKT e ERK 1/2.	135

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos primers para amplificação dos genes marcadores de diferenciação das células foliculares da tireoide.....	37
Tabela 2 - Características dos anticorpos primários utilizados para detectar proteínas*.....	40
Tabela 3 - Dosagem de T4 livre e tireoglobulina (TG) em sobrenadante coletado no último dia de tratamento para avaliar a viabilidade e a diferenciação das células foliculares da tireoide.	83

INTRODUÇÃO

A glândula tireoide foi descrita pela primeira vez por Aristóteles, sendo denominada assim em 1656 por Thomas Wharton. Seu nome, em grego, significa "em forma de escudo".

A tireoide é uma glândula endócrina com cerca de 15 gramas, formada por dois lobos unidos pelo istmo, localizada na parte anterior do pescoço (Hoyes, 1985; Policeni, 2012). Cada lobo é constituído por folículos esféricos que contêm coloide no seu interior e que são revestidos por células epiteliais cuboides, conhecidas como tireocitos ou células foliculares. As células foliculares são polarizadas e estão dispostas em monocamadas ao redor do coloide, o qual é composto principalmente pela glicoproteína tireoglobulina, precursora dos hormônios tireoidianos T3 (triiodotironina) e T4 (tiroxina ou tetra-iodotironina). As células foliculares são cerca de 80% das células formadoras da glândula, o restante é composto por células parafoliculares ou células C, responsáveis pela produção de calcitonina, células endoteliais, que formam as paredes dos vasos, e fibroblastos, que formam o tecido de sustentação da glândula.

Cada folículo possui autonomia na regulação do sistema de vascularização sendo este considerado morfológicamente um sistema heterogêneo tanto em estado normal como anormal (Gerard, 2000; Gerard, 2002).

O controle da função e do crescimento da glândula normal, bem como a secreção dos hormônios tireoidianos, é regulado principalmente pelo TSH, um hormônio produzido pela hipófise em resposta à secreção hipotalâmica de hormônio liberador de tirotrófina, em um circuito de retroalimentação, conforme Figura 1. O iodo, um halogênio que deve ser ingerido na alimentação, é um dos componentes indispensáveis na síntese dos hormônios da tireoide.

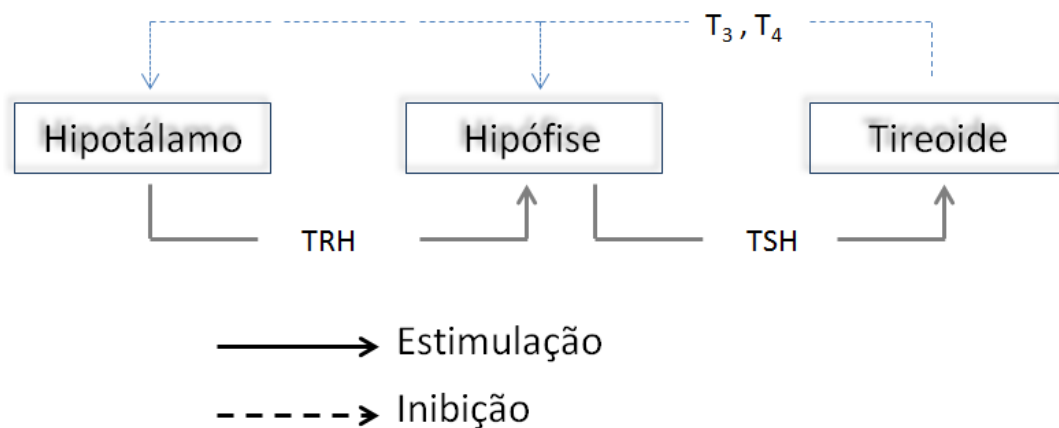


Figura 1 - Regulação da função tireoidiana.

Fisiologia normal da célula folicular

As células foliculares têm características que as tornam diferenciadas e especializadas, sendo estas a capacidade de formar o folículo, a produção de tireoglobulina, a iodação de resíduos de tirosina e a produção, o estoque e a secreção dos hormônios tireoidianos (De Felice, 2004). A organização e a polaridade das células foliculares também fazem parte das características destas células diferenciadas e são essenciais para a sincronia do metabolismo especializado da glândula e para a captação de iodeto. A estrutura folicular permite que a célula atue como uma célula

exócrina, já que secreta tireoglobulina para o lúmen folicular, e uma célula endócrina, que secreta os hormônios tireoidianos na corrente sanguínea (Suzuki, 2000; Mauchamp, 1998).

As células foliculares exibem uma superfície basal ou basolateral, de frente ao espaço intersticial e capilares, e uma superfície apical, a qual contém numerosas microvilosidades sendo a região de interface entre célula folicular e o coloide. Nestas células há junções comunicantes (*gap junctions*) na membrana plasmática que permitem a troca de pequenas moléculas e um metabolismo coordenado entre as células foliculares adjacentes.

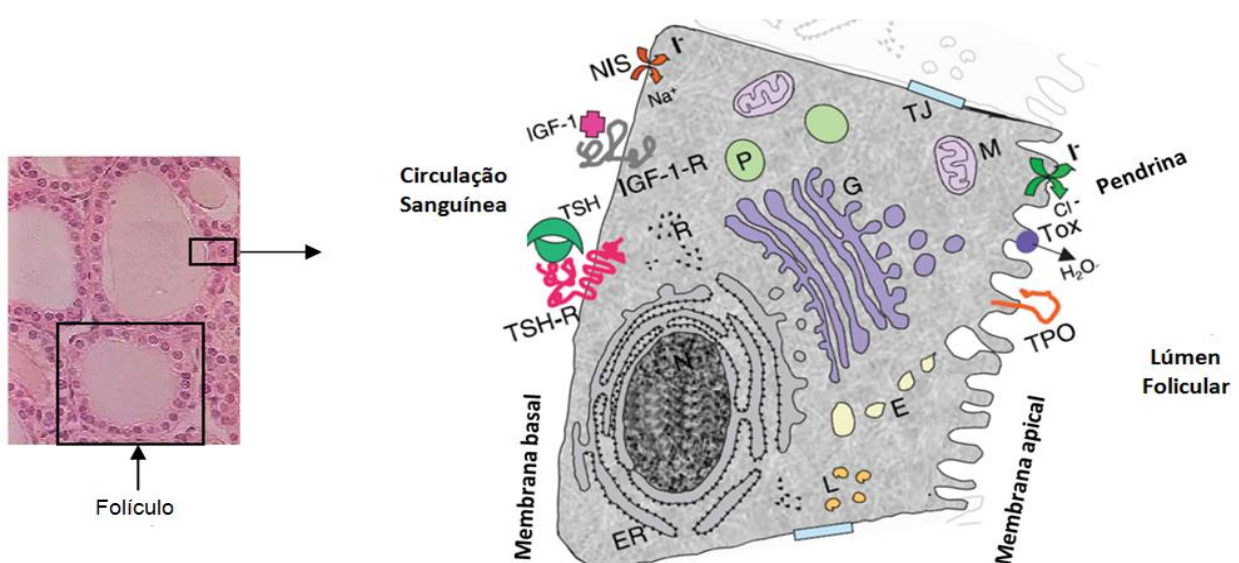


Figura 2 - Representação esquemática de uma célula folicular da tireoide, com a localização celular das principais proteínas e organelas envolvidas na regulação da função diferenciada destas células. IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina-1; IGF-IR: receptor de IGF-1; NIS: simporter sódio/iodo; TG, tireoglobulina; TJ: junções de oclusão intercelular (*tight junctions*); Tox: oxidases; TPO: tireoperoxidase; TSH: tirotrófina; TSH-R: receptores de TSH; E: endossomo; ER: retículo endoplasmático; G: aparelho de Golgi, L:

lisossomo; M: mitocôndria, N: núcleo; P: peroxissomo; R: ribossomo livre. Figura modificada de van de Graaf, 2001.

Células foliculares em cultura primária são um modelo bem estabelecido e representativo do funcionamento das células foliculares *in vivo*, pois são sensíveis e dependentes do hormônio TSH capazes de produzir e secretar TG (Nitsch, 1980; Chambard, 1983; Roger, 1984; Chambard, 1987; Rasmussen, 1996; Mruck, 2002). Quando cultivados *in vitro*, as células epiteliais da tireoide se arranjam em uma monocamada polarizada apresentando uma resistência aproximadamente de 6,000 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ e uma diferença de potencial transepitelial com cerca de 20 mV (Ericson, 1992).

A disposição em monocamada das células foliculares permitiu estudar o mecanismo estimulatório do TSH, modelo no qual foi possível observar a elevação nos níveis de cAMP, efluxo de iodeto e exocitose da tireoglobulina em poucos minutos após a estimulação com TSH (Ericson, 2000).

Regulação da função e crescimento das células foliculares da tireoide

Para a manutenção da homeostase celular, a célula deve ser capaz de codificar, integrar e decifrar sinais provenientes do meio externo por meio de ativação ou inibição de vias de sinalização intracelulares. Estimulação por sinais extracelulares, tais como hormônios e fatores de crescimento, iniciam uma série de respostas através de ligações a receptores específicos ou inespecíficos. A regulação da função da tireoide

envolve três principais vias de sinalização: a cascata da adenosina monofosfato cíclico (AMPc), a cascata da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e a cascata do fosfatidil-inositol 3 quinase (PI3K) (Brzezianska, 2011).

Diversas moléculas, fatores de crescimento ou hormônios, após ligarem-se aos seus receptores específicos ou não, aumentam os níveis intracelulares de AMPc. A ligação do TSH ao seu receptor de membrana, por aumentar os níveis de AMPc, estimula (a) a proliferação, sendo que a presença de insulina ou IGF-I provavelmente é necessária para um efeito mitogênico (Kimura, 2001; Dremier, 2002); (b) a diferenciação das células foliculares (Kupperman, 1993); (c) a manutenção da morfologia cuboidal da célula folicular (Passareiro, 1985; Roger, 1988) e (d) a indução da expressão de genes de diferenciação da tireoide, tais como TG, TPO, NIS e TSHR, uma vez que o AMPc liga-se à subunidade reguladora da *proteína quinase dependente de AMPc* (PKA) que por sua vez, entra no núcleo e fosforila proteínas nucleares específicas. Essa cascata é controlada por um sistema de retroalimentação negativa, sendo que as fosfodiesterases possuem um papel majoritário na parada da indução do sinal de AMPc.

As proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) constituem uma das principais vias de sinalização das células eucarióticas e estão envolvidas em diversas funções celulares. Nas células foliculares, a cascata de MAPK (ERK1/2) é ativada por fatores de crescimento tais como EGF que, combinados com insulina ou IGF-1, têm efeito mitogênico (Roger, 1988; Dumont, 1992).

Diversos receptores de superfície, especialmente os ligados à tirosina quinase, podem ativar a enzima PI3K, que, quando ativada, converte o bifosfato 4,5-fosfatidilinositol (PIP₂) na membrana plasmática em trifosfato 3,4,5-fosfatidilinositol

(PIP3). O PIP3 recruta proteínas quinase dependente de fosfoinosítídeos-1 e 2 (PDK1 e PDK2), os quais ativam a proteína quinase B (PKB ou também conhecida como AKT) por fosforilação (James, 1996; Alessi, 1997).

As cascatas de cAMP, MAPK e PI3K induzem a proliferação e manutenção da homeostase nas células foliculares. Qualquer forma de estimulação ou inibição de uma ou mais dessas cascatas, seja por moléculas sinalizatórias ou mutações genéticas, pode resultar na proliferação anormal dessas células.

Lesões da Tireoide

Lesões da glândula tireoide estão entre as doenças endócrinas mais comuns, tendo implicações biológicas e médicas extremamente importantes.

Nódulos Tireoidianos

O bócio multinodular é a anormalidade benigna mais comum da tireoide, sendo caracterizada pelo aumento da glândula, com deformação da estrutura normal. Embora não seja a única, a falta de iodo é uma condição totalmente aceita na etiologia do desenvolvimento de nódulos benignos (Krohn, 2005; Knudsen, 2002; Hansen, 2005). A falta de iodo leva a uma hiperplasia da célula folicular para que esta se adapte a uma utilização mais eficiente do iodo e, conseqüentemente, causa aumento do metabolismo desta célula. Ainda, a deficiência de iodo traz aumento na produção e liberação de TSH, com aumento do AMPc e, conseqüentemente, estimula a função e o crescimento da célula folicular (Meyer, 2009).

Embora em menor frequência, mutações no receptor de TSH como na proteína α G estimulatória (G α) (Figura 3) podem levar à produção constitutiva de AMPc, tornando a célula folicular hiperplásica e, assim, estimulando a proliferação e secreção dos hormônios da tireoide (Vassart, 1992).

Como o câncer de tireoide, os nódulos tireoidianos apresentam uma maior frequência nas mulheres, sendo a prevalência de 4 a 7% em mulheres e 1% em homens, tomando-se como referência dois estudos realizados na Inglaterra e nos Estados Unidos, países onde não há deficiência de iodo (Tunbridge, 1977; Canaris, 2000). Esse dado sugere que outros fatores, mais comuns nas mulheres, podem estar envolvidos na etiologia do bócio. Em áreas com deficiência de iodo, a prevalência de bócio pode chegar a 50% (Krohn, 2002). Ainda, sabe-se que as mulheres são mais suscetíveis à deficiência de iodo (Laurberg, 1998) e que o envelhecimento se acompanha de redução da prevalência de bócio difuso nas mulheres (Vanderpump, 1995). A maior prevalência das neoplasias e nódulos benignos da tireoide em mulheres é pobremente entendida, e pode estar associada a efeitos diretos e indiretos dos hormônios sexuais femininos na tireoide.

Câncer de Tireoide

O câncer de tireoide é o tumor maligno mais comum do sistema endócrino, representando a sétima malignidade mais comum entre as mulheres (Ortega, 2004). Para o Rio Grande do Sul, segundo INCA, estima-se uma taxa de 11,5 casos para cada 100 mil mulheres para o ano de 2012 (INCA, 2012).

Os tumores malignos da tireoide são provenientes de dois grupos celulares que possuem origens embriológicas distintas, sendo os subtipos carcinomas papilífero,

folicular e anaplásico originários de células foliculares; já o subtipo carcinoma medular é originário de células C. Dentre eles, o carcinoma papilífero é o mais frequente, correspondendo a cerca de 80% dos casos.

Em geral, as mulheres apresentam uma incidência de câncer de tireoide três vezes maior do que os homens (Zarate, 2009; Ortega, 2004), sendo que o pico de incidência de casos nas mulheres ocorre ao final do período reprodutivo, atingindo um pico de 40-49 anos, enquanto que nos homens o pico ocorre aos 60-69 anos de idade. Interessantemente, as taxas de incidência começam a se equivaler por volta dos 85 anos de idade (Rahbari, 2010).

Em relação ao prognóstico do carcinoma papilar, os homens apresentam uma evolução mais agressiva, com uma menor sobrevida livre de doença e uma maior mortalidade. Para os subtipos mais agressivos de câncer de tireoide, anaplásico e medular, os índices de incidência e agressividade são semelhantes entre homens e mulheres.

Mutações de ponto e rearranjos cromossômicos são fatores etiológicos bem estudados e caracterizados nas doenças benignas e malignas da tireoide. A maioria dessas mutações envolve os genes efetores das vias MAPK e PI3K-AKT e podem ocorrer ao acaso, por falha do sistema de reparo do DNA, ou por exposição a diferentes tipos de radiação. Na Figura 3, podemos observar as alterações genéticas mais comuns e sua frequência nos diferentes subtipos de câncer de tireoide derivados de células foliculares, bem como as vias de sinalização ativadas ou inibidas (Hebrant, 2011; Fagin, 2008; Grande, 2012). Ainda, cerca de 20 a 30% dos adenomas são causados por fatores etiológicos desconhecidos (Hebrant, 2011).

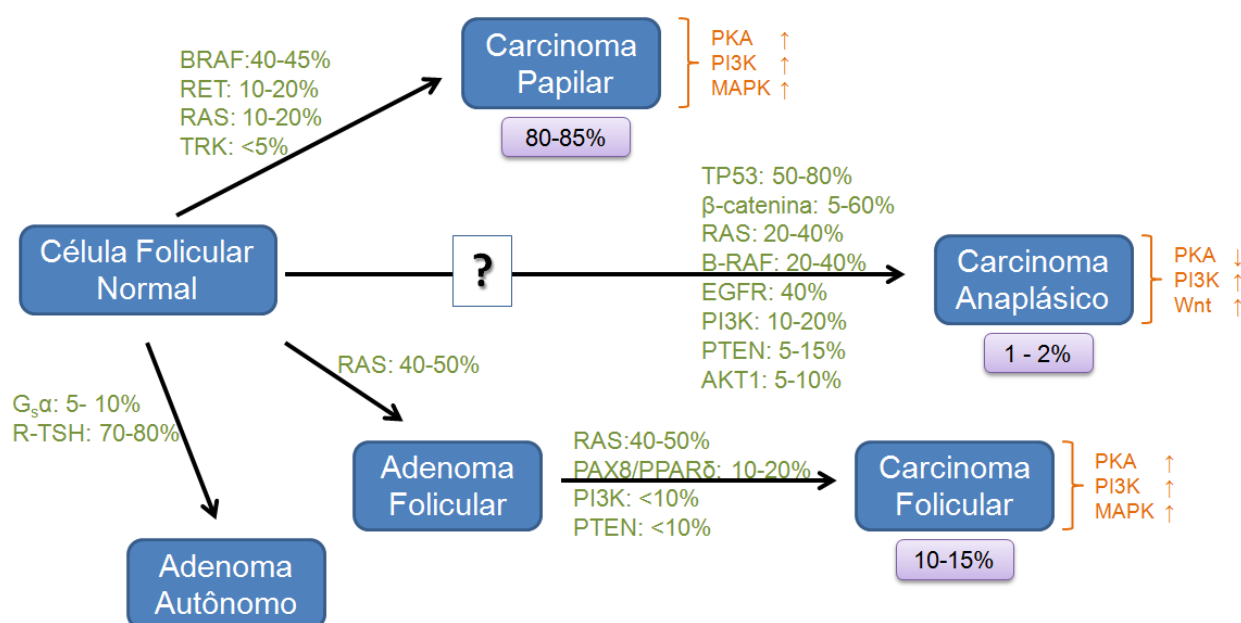


Figura 3 - Esquema das alterações genéticas encontradas em câncer de tireoide derivadas de células foliculares, com o percentual de cada tipo de câncer (caixa roxa); a frequência das principais mutações envolvidas (verde), bem como as rotas ativadas ou inibidas em cada alteração (laranja). Figura modificada de Hebrant, 2011; Fagin, 2008 e Grande, 2012.

Referências

ALESSI, D. R., JAMES, S. R., DOWNES, C. P., HOLMES, A. B., GAFFNEY, P. R., REESE, C. B. & COHEN, P. 1997. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol*, 7, 261-9.

BRZEZIANSKA, E. & PASTUSZAK-LEWANDOSKA, D. 2011. A minireview: the role of MAPK/ERK and PI3K/Akt pathways in thyroid follicular cell-derived neoplasm. *Front Biosci*, 16, 422-39.

CANARIS, G. J., MANOWITZ, N. R., MAYOR, G. & RIDGWAY, E. C. 2000. The Colorado thyroid disease prevalence study. *Arch Intern Med*, 160, 526-34.

CHAMBARD, M., MAUCHAMP, J. & CHABAUD, O. 1987. Synthesis and apical and basolateral secretion of thyroglobulin by thyroid cell monolayers on permeable substrate: modulation by thyrotropin. *J Cell Physiol*, 133, 37-45.

CHAMBARD, M., VERRIER, B., GABRION, J. & MAUCHAMP, J. 1983. Polarization of thyroid cells in culture: evidence for the basolateral localization of the iodide "pump" and of the thyroid-stimulating hormone receptor-adenyl cyclase complex. *J Cell Biol*, 96, 1172-7.

DE FELICE, M. & DI LAURO, R. 2004. Thyroid development and its disorders: genetics and molecular mechanisms. *Endocr Rev*, 25, 722-46.

DREMIER, S., COULONVAL, K., PERPETE, S., VANDEPUT, F., FORTEMAISON, N., VAN KEYMEULEN, A., DELEU, S., LEDENT, C., CLEMENT, S., SCHURMANS, S., DUMONT, J. E., LAMY, F., ROGER, P. P. & MAENHAUT, C. 2002. The role of cyclic AMP and its effect on protein kinase A in the mitogenic action of thyrotropin on the thyroid cell. *Ann N Y Acad Sci*, 968, 106-21.

DUMONT, J. E., LAMY, F., ROGER, P. & MAENHAUT, C. 1992. Physiological and pathological regulation of thyroid cell proliferation and differentiation by thyrotropin and other factors. *Physiol Rev*, 72, 667-97.

ERICSON, L. E. & NILSSON, M. 1992. Structural and functional aspects of the thyroid follicular epithelium. *Toxicol Lett*, 64-65 Spec No, 365-73.

ERICSON, L. E. & NILSSON, M. 2000. Deactivation of TSH receptor signaling in filter-cultured pig thyroid epithelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 278, E611-9.

FAGIN, J. A. & MITSIADES, N. 2008. Molecular pathology of thyroid cancer: diagnostic and clinical implications. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 22, 955-69.

GERARD, A. C., MANY, M. C., DAUMERIE, C., COSTAGLIOLA, S., MIOT, F., DEVIJLDER, J. J., COLIN, I. M. & DENEFF, J. F. 2002. Structural changes in the angiofollicular units between active and hypofunctioning follicles align with differences in the epithelial expression of newly discovered proteins involved in iodine transport and organification. *J Clin Endocrinol Metab*, 87, 1291-9.

GERARD, A. C., XHENSEVAL, V., COLIN, I. M., MANY, M. C. & DENEFF, J. F. 2000. Evidence for co-ordinated changes between vascular endothelial growth factor and nitric oxide synthase III immunoreactivity, the functional status of the thyroid follicles, and the microvascular bed during chronic stimulation by low iodine and propylthiouracyl in old mice. *Eur J Endocrinol*, 142, 651-60.

GRANDE, E., DIEZ, J. J., ZAFON, C. & CAPDEVILA, J. 2012. Thyroid cancer: molecular aspects and new therapeutic strategies. *J Thyroid Res*, 2012, 847108.

HANSEN, P. S., BRIX, T. H., BENNEDBAEK, F. N., BONNEMA, S. J., IACHINE, I., KYVIK, K. O. & HEGEDUS, L. 2005. The relative importance of genetic and environmental factors in the aetiology of thyroid nodularity: a study of healthy Danish twins. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 62, 380-6.

HEBRANT, A., VAN STAVEREN, W. C., MAENHAUT, C., DUMONT, J. E. & LECLERE, J. 2011. Genetic hyperthyroidism: hyperthyroidism due to activating TSHR mutations. *Eur J Endocrinol*, 164, 1-9.

HOYES, A. D. & KERSHAW, D. R. 1985. Anatomy and development of the thyroid gland. *Ear Nose Throat J*, 64, 318-33.

INCA. 2012. Instituto Nacional do Câncer. Neoplasia Maligna da Glândula Tireoide [Online]. Available: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/mapa.asp?ID=30> [Accessed 31/08/2012].

JAMES, S. R., DOWNES, C. P., GIGG, R., GROVE, S. J., HOLMES, A. B. & ALESSI, D. R. 1996. Specific binding of the Akt-1 protein kinase to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate without subsequent activation. *Biochem J*, 315 (Pt 3), 709-13.

KIMURA, T., VAN KEYMEULEN, A., GOLSTEIN, J., FUSCO, A., DUMONT, J. E. & ROGER, P. P. 2001. Regulation of thyroid cell proliferation by TSH and other factors: a critical evaluation of in vitro models. *Endocr Rev*, 22, 631-56.

KNUDSEN, N., LAURBERG, P., PERRILD, H., BULOW, I., OVESEN, L. & JORGENSEN, T. 2002. Risk factors for goiter and thyroid nodules. *Thyroid*, 12, 879-88.

KROHN, K., FUHRER, D., BAYER, Y., ESZLINGER, M., BRAUER, V., NEUMANN, S. & PASCHKE, R. 2005. Molecular pathogenesis of euthyroid and toxic multinodular goiter. *Endocr Rev*, 26, 504-24.

KROHN, K. & PASCHKE, R. 2002. Somatic mutations in thyroid nodular disease. *Mol Genet Metab*, 75, 202-8.

KUPPERMAN, E., WEN, W. & MEINKOTH, J. L. 1993. Inhibition of thyrotropin-stimulated DNA synthesis by microinjection of inhibitors of cellular Ras and cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol*, 13, 4477-84.

LAURBERG, P., PEDERSEN, K. M., HREIDARSSON, A., SIGFUSSON, N., IVERSEN, E. & KNUDSEN, P. R. 1998. Iodine intake and the pattern of thyroid disorders: a comparative epidemiological study of thyroid abnormalities in the elderly in Iceland and in Jutland, Denmark. *J Clin Endocrinol Metab*, 83, 765-9.

MAUCHAMP, J., MIRRIONE, A., ALQUIER, C. & ANDRE, F. 1998. Follicle-like structure and polarized monolayer: role of the extracellular matrix on thyroid cell organization in primary culture. *Biol Cell*, 90, 369-80.

MEYER, E. S. & MAIA, A. L. S. 2009. Aspectos patogênicos e clínicos do bócio multinodular. *Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre*, 29, 246-254.

MRUCK, S., PFAHLBERG, A., PAPADOPOULOS, T., STREMMEL, C. & KUWERT, T. 2002. Uptake of (201)TI into primary cell cultures from human thyroid tissue is multiplied by TSH. *J Nucl Med*, 43, 145-52.

NITSCH, L. & WOLLMAN, S. H. 1980. Suspension culture of separated follicles consisting of differentiated thyroid epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77, 472-6.

ORTEGA, J., SALA, C., FLOR, B. & LLEDO, S. 2004. Efficacy and cost-effectiveness of the UltraCision harmonic scalpel in thyroid surgery: an analysis of 200 cases in a randomized trial. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A*, 14, 9-12.

PASSAREIRO, H., ROGER, P. P., LAMY, F., LECOCQ, R., DUMONT, J. E. & NUNEZ, J. 1985. Thyrotropin modifies the synthesis of actin and other proteins during thyroid cell culture. *Eur J Biochem*, 147, 263-72.

POLICENI, B. A., SMOKER, W. R. & REEDE, D. L. 2012. Anatomy and embryology of the thyroid and parathyroid glands. *Semin Ultrasound CT MR*, 33, 104-14.

RAHBARI, R., ZHANG, L. & KEBEBEW, E. 2010. Thyroid cancer gender disparity. *Future Oncol*, 6, 1771-9.

RASMUSSEN, A. K., KAYSER, L., PERRILD, H., BRANDT, M., BECH, K. & FELDT-RASMUSSEN, U. 1996. Human thyroid epithelial cells cultured in monolayers. I. Decreased thyroglobulin and cAMP response to TSH in 12-week-old secondary and tertiary cultures. *Mol Cell Endocrinol*, 116, 165-72.

ROGER, P., TATON, M., VAN SANDE, J. & DUMONT, J. E. 1988. Mitogenic effects of thyrotropin and adenosine 3',5'-monophosphate in differentiated normal human thyroid cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*, 66, 1158-65.

ROGER, P. P. & DUMONT, J. E. 1984. Factors controlling proliferation and differentiation of canine thyroid cells cultured in reduced serum conditions: effects of thyrotropin, cyclic AMP and growth factors. *Mol Cell Endocrinol*, 36, 79-93.

SUZUKI, K., NAKAZATO, M., ULIANICH, L., MORI-AOKI, A., MORIYAMA, E., CHUNG, H. K., PIETRARELLI, M., GRASSADONIA, A., MATOBA, H. & KOHN, L. D. 2000. Thyroglobulin autoregulation of thyroid-specific gene expression and follicular function. *Rev Endocr Metab Disord*, 1, 217-24.

TUNBRIDGE, W. M., EVERED, D. C., HALL, R., APPLETON, D., BREWIS, M., CLARK, F., EVANS, J. G., YOUNG, E., BIRD, T. & SMITH, P. A. 1977. The spectrum of thyroid disease in a community: the Whickham survey. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 7, 481-93.

VAN DE GRAAF, S. A., RIS-STALPERS, C., PAUWS, E., MENDIVE, F. M., TARGOVNIK, H. M. & DE VIJLDER, J. J. 2001. Up to date with human thyroglobulin. *J Endocrinol*, 170, 307-21.

VANDERPUMP, M. P., TUNBRIDGE, W. M., FRENCH, J. M., APPLETON, D., BATES, D., CLARK, F., GRIMLEY EVANS, J., HASAN, D. M., RODGERS, H., TUNBRIDGE, F. & ET AL. 1995. The incidence of thyroid disorders in the community: a twenty-year follow-up of the Whickham Survey. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 43, 55-68.

VASSART, G. & DUMONT, J. E. 1992. The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth. *Endocr Rev*, 13, 596-611.

ZARATE, A., BASURTO, L., SAUCEDO, R. & HERNANDEZ VALENCIA, M. 2009. Thyroid dysfunction: a topic of constant review for the gynaecologist, for its frequency in women. *Ginecol Obstet Mex*, 77, 96-102.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Progesterona

Os primeiros relatos de isolamento e purificação da progesterona foram em 1934 (Allen, 1934). Quimicamente, é conhecida como 4-pregнено-3,20-diona com um esqueleto de 21 carbonos ($C_{21}H_{30}O_2$) e uma massa molecular de 314,47 g/mol. A origem de seu nome data de 1935 (Allen, 1935) e, etimologicamente, a palavra progesterona, que é derivada do latim, indica seu papel vital na gestação (*pró* = favorável; *gester* = derivado de gestação; e *ona* = termo que indica hormônio).

Além de ser um hormônio classicamente conhecido como regulador fundamental no desenvolvimento e na manutenção funcional do sistema reprodutor feminino (Lessey, 2003; Graham, 1997), pode desempenhar funções em outros tecidos, como mediar sinais do comportamento sexual feminino no cérebro (Mani, 2012), atuar na modulação da massa óssea (Seifert-Klauss, 2010) e em outros tecidos (Graham, 1997). Em um estado não gestacional, a produção de progesterona ocorre principalmente no corpo lúteo (Niswender, 2002). A biossíntese da progesterona ocorre a partir do colesterol em duas etapas basicamente: primeiramente o colesterol é transportado para dentro da mitocôndria e, por clivagem enzimática, é convertido em

pregnenolona que, por sua vez, é convertida em progesterona por ação das enzimas presentes no retículo endoplasmático liso (Rekawiecki 2008; Niswender, 2002).

Na gestação há necessidade de uma concentração circulante maior de progesterona e para tal, além do corpo lúteo receber estímulo hormonal luteotrófico para manter uma constante produção de progesterona, ocorre produção de progesterona placentária pelo sinciotrofoblasto (Gomez-Concha, 2011; Uribe, 2003).

Receptores de Progesterona (PR)

Localizado no braço longo do cromossomo 11 (11q22.1), o gene PR foi identificado em 1969 (O'Malley, 1969), caracterizado e clonado em 1970 (Sherman, 1970). Desde então, a presença de PR têm sido descrita em vários tipos de tecidos, reprodutivos ou não.

Os PRs, assim como os demais receptores nucleares, são fatores de transcrição organizados basicamente em três domínios funcionais: um domínio amino terminal pouco conservado, o qual contém dois domínios de transativação, responsáveis pelo recrutamento de proteínas do receptor; um segundo domínio altamente conservado de *ligação ao DNA* que contém *dedos de zinco*, responsável pela sua especificidade, e um terceiro domínio igualmente conservado carboxi terminal o qual contém apenas um sítio de transativação (Ellmann, 2009).

As principais isoformas do PR são a isoforma A (PRA) com 94 kDa, e a isoforma B (PRB) com 114 kDa, sendo ambas codificadas pelo mesmo gene (Ellmann, 2009). A diferença entre as isoformas A e B se dá pela inserção de um resíduo adicional de 164 aminoácidos na porção amino terminal do PRB (Kastner, 1990b; Kastner, 1990a), região que representa o domínio amino terminal citado acima, provavelmente refletindo

diferenças de transcrição de ambas as isoformas. A isoforma C apresenta um tamanho de 60 kDa, não apresenta atividade transcricional por não apresentar o domínio de ligação ao DNA, e foi sugerido que influencia a atividade das isoformas PRA e PRB (Wei, 1997; Condon, 2006).

Regulação da expressão dos PRs

Nos tecidos alvos clássicos que respondem aos estímulos da progesterona e do estrogênio, é demonstrado que tanto os derivados de estrogênio como a própria progesterona são os moduladores fisiológicos da expressão dos PRs (Graham, 1997), pois os derivados de estrogênio aumentam a expressão dos PR enquanto a progesterona a diminui (Katzenellenbogen, 1980). Contudo, o estrogênio não controla a expressão dos receptores de progesterona em todos os tipos de tecido e seu efeito pode variar entre diferentes espécies, conforme revisado recentemente (Jacobsen, 2012).

Uma Revisão Sistemática sobre a presença de receptores de progesterona em tecido tireoidiano normal ou anormal encontra-se no Capítulo II desta Tese.

Efeitos genômicos da progesterona

Segundo a teoria clássica, a molécula de progesterona se difunde na membrana celular, tanto por difusão através da membrana ou assistida por transportador. No citosol, as moléculas de progesterona ligam-se aos receptores nucleares de progesterona, e sofrem uma mudança conformacional a qual gera uma dissociação de

proteínas acessórias, que anteriormente mantinham o receptor na sua forma inativa (Pratt, 2004). Por fim, complexo progesterona-receptor gera um aumento da afinidade no domínio de ligação ao DNA e migra para o núcleo, onde vai influenciar a transcrição de genes alvos (Rochette-Egly, 2003; Tata, 2002). A via descrita acima é chamada "genômica", pois envolve ação direta sobre a transcrição de genes alvos e tem latência de horas ou dias.

A mifepristona, um hormônio sintético derivado de noretindrona que também é conhecida como RU-486, apresenta atividade antagonista da progesterona por ligar-se com alta afinidade aos receptores nucleares da progesterona, sendo esta a base para a utilização desta droga como contraceptivo e abortivo (Meyer, 1990). Esta droga foi sintetizada pela primeira vez em 1980 por pesquisadores franceses e em 1988 já estava disponível comercialmente.

Efeitos não genômicos mediados pela progesterona

Além dos efeitos genômicos, a progesterona é capaz de gerar também efeitos não genômicos, nos quais sua ação ocorre com um tempo de latência muito curto, via ativação de proteínas de membrana ou citosólicas, onde segundos mensageiros são gerados e atuam em diferentes vias de sinalização intracelular (Lange, 1998). A priori não há razão ou dados suficientes para desconsiderar a possibilidade de que ambos os efeitos ocorram de forma complementar (Lange, 2008; Silva, 2010), na qual a indução de ações não genômicas influenciaria indiretamente as ações genômicas (Lange, 2008). Os efeitos não genômicos podem ser agrupados em três classes, com base em seus mecanismos de ação: (1) efeitos que ocorrem na membrana plasmática, mas não

mediados por receptores; (2) efeitos mediados por receptores presentes na membrana celular e (3) efeitos que ocorrem através de receptores clássicos localizados na membrana celular (Falkenstein, 2000). Efeitos rápidos podem também ocorrer em organelas como a mitocôndria e em outros sítios celulares. Vale ressaltar que os efeitos não genômicos da progesterona já foram relatados em várias células como espermatozóides (Blackmore, 1990), oócitos (Tian, 2000), neurônios (Cai, 2009), plaquetas e eritrócitos (Losel, 2003), no entanto, não foram avaliados nas células foliculares da tireoide.

Estradiol

Diferentemente da progesterona, os efeitos clássicos e não clássicos do estrogênio e seus derivados, bem como a distribuição de seus receptores nucleares, têm sido avaliados na literatura. Uma revisão detalhada encontra-se no Capítulo I desta Tese.

Recentemente foi descrito que os efeitos do 17β -estradiol também podem ser mediados por meio de um receptor de membrana não clássico, conhecido como GPR30 ou GPER.

GPR30/GPER

O conhecimento sobre o GPR30 iniciou-se no período de 1996 a 1998, no qual grupos independentes isolaram este receptor órfão em linfoblastos (Owman, 1996),

células B (Kvingedal, 1997), células endoteliais de cordão umbilical (Takada et al., 1997) e no DNA genômico humano (Feng, 1997; O'Dowd, 1998).

Mais tarde, foi relatado que este receptor órfão era capaz de mediar a ativação não-genômica das proteínas quinases reguladas por sinais extracelulares 1 e 2 (ERK-1/2) em resposta ao estímulo por 17- β -estradiol em células de câncer de mama (Filardo, 2000; Filardo, 2002). Em 2005, dois grupos independentes postularam o GPR30/GPER como um novo receptor de estradiol, devido a este hormônio ligar-se diretamente a este receptor (Thomas, 2005; Revankar, 2005). Desde então, inúmeros trabalhos foram publicados em diversos tipos celulares normais ou não, conforme revisado recentemente (Prossnitz, 2011).

Em 2001, antes do GPR30/GPER ser descrito como receptor de estrogênio, Manole demonstrou que o 17 β -estradiol ativava a via das ERK1/2 em células foliculares de bócio, sugerindo que este hormônio era capaz de desencadear efeitos não genômicos nestas células (Manole, 2001). Até o momento, dois trabalhos foram publicados avaliando a expressão e os efeitos mediados pelo GPR30/GPER em células foliculares na tireoide (Vivacqua, 2006; Kumar, 2010).

Vivacqua e cols avaliaram os efeitos do estradiol em células de linhagem de carcinoma de tireoide humana pouco diferenciada (WRO) transfectadas com oligonucleotídeos anti-sense específicos para GPR30/GPER (Vivacqua, 2006), as quais são negativas para a expressão dos receptores clássicos do estrogênio, ER α e ER β . Neste estudo, os autores demonstraram que nas células transfectadas ocorreu uma diminuição na expressão do gene *c-fos* quando comparado com as células não transfectadas. Este gene apresenta expressão aumentada e está envolvido na

progressão do ciclo celular em diferentes tipos de neoplasias de tireoide (Kataki, 2003) e em bócio (Thomas, 2010).

No estudo realizado por Kumar e colaboradores, foi vista expressão baixa do GPR30/GPER na linhagem WRO e ausência desse gene nas linhagens originárias de carcinoma papilífero NPA87 e KAT5 (Kumar, 2010), e, por tal razão, os autores não avaliaram nestas células a resposta do GPR30/GPER após estimulação por estradiol.

Recentemente foi sugerido que se estude o papel do GPR30/GPER em células humanas normais para minimizar resultados contraditórios, uma vez que as células de linhagens podem variar seu fenótipo, mesmo sob condições fisiológicas ideais (Barton, 2012).

Outro ponto de bastante discussão na literatura tem sido a localização intracelular deste receptor desde suas primeiras publicações em 2005. A localização intracelular é um ponto importante para prever tanto as características físico-químicas quanto o mecanismo de ação de um fármaco. Como a sinalização mediada pelo GPR30 tem-se mostrado alterada em diversos estados patológicos (Prossnitz, 2011), este receptor representa um alvo importante para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (Prossnitz, 2008).

Embora o GPR30/GPER tenha sido relatado em compartimentos isolados, como na membrana plasmática (Thomas, 2005; Funakoshi, 2006; Filardo, 2007; Sanden, 2011; Lucas, 2010; Revankar, 2005), no retículo endoplasmático (Revankar, 2005; Kleuser, 2008; Otto, 2008; Lin, 2009) e no aparelho de Golgi (Sakamoto, 2007), atualmente a teoria mais aceita é que, assim como outros tipos de receptores de

proteínas G, o receptor GPR30/GPER passa por um processo de endocitose após a sua estimulação, conhecido como translocação.

Normalização da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

Atualmente, a metodologia da qRT-PCR é a técnica de maior sensibilidade e especificidade para avaliar a expressão gênica entre diferentes grupos experimentais, pois pode-se determinar o número exato de cópias produzidas a cada ciclo. Contudo, devido à alta sensibilidade desta técnica, a etapa da normalização dos dados obtidos vem sendo bastante discutida em trabalhos recentes (Andersen, 2004; Meller, 2005; Rubie, 2005; Zhang, 2005; Dheda, 2004).

A normalização dos níveis de expressão de um gene alvo é realizada para compensar a variabilidade associada à técnica da qRT-PCR. As maiores fontes dessas variações são a qualidade da extração e pureza do RNA total, além da eficiência da síntese de DNA complementar (cDNA) (Silver, 2006). Assim, a escolha de um gene de referência apropriado para cada experimento é um ponto crucial na análise da expressão gênica para ajustes compensatórios dessas variações experimentais.

Genes de referência, comumente chamados de genes constitutivos ou genes normalizadores, são genes que regulam funções básicas e essenciais para a célula, e por tal razão, a expressão destes genes deveria ser estável em diferentes indivíduos, tipos de tecidos e células e em diferentes estados fisiológicos ou não (She, 2009). No entanto, na prática, os genes de referência comumente usados podem ter expressão

variável entre indivíduos ou em resposta a tratamentos (Khimani, 2005). Assim, os genes de referência selecionados devem ser validados para cada configuração experimental e a escolha deve ser baseada na maior estabilidade do gene entre as amostras analisadas.

Algoritmos computacionais como *BestKeeper* (Pfaffl, 2004), *GeNorm* (Vandesompele, 2002) e *Normfinder* (Andersen, 2004), entre outros, têm ajudado na escolha do gene de referência mais estável dentre um grupo de genes candidatos para a normalização individualizada de cada experimento, uma vez que relatos da literatura têm demonstrado a dificuldade de desenvolver um padrão experimental geral. O programa *NormFinder* calcula um valor de estabilidade para cada gene candidato, baseado na análise da expressão dos diferentes subgrupos experimentais, permitindo fazer uma estimativa da variação do gene em análise tanto intra como intergrupo. A estabilidade dos genes é mostrada como valor de estabilidade, sendo que os genes com menor valor de estabilidade possuem alta estabilidade de expressão (Andersen, 2004).

Referências

ALLEN, W. M., BUTENANDT, A., CORNER, G. W. & SLOTTA, K. H. 1935. Nomenclature of Corpus Luteum Hormone. *Science*, 82, 153.

ALLEN, W. M. & WINTERSTEINER, O. 1934. Crystalline Progesterin. *Science*, 80, 190-1.

ANDERSEN, C. L., JENSEN, J. L. & ORNTOFT, T. F. 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance

estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res*, 64, 5245-50.

BARTON, M. 2012. Position paper: The membrane estrogen receptor GPER - Clues and questions. *Steroids*, 77, 935-42.

BLACKMORE, P. F., BEEBE, S. J., DANFORTH, D. R. & ALEXANDER, N. 1990. Progesterone and 17 alpha-hydroxyprogesterone. Novel stimulators of calcium influx in human sperm. *J Biol Chem*, 265, 1376-80.

CAI, J., CHEN, J., HE, H., YIN, Z., ZHU, Z. & YIN, D. 2009. Carbonyl stress: malondialdehyde induces damage on rat hippocampal neurons by disturbance of Ca(2+) homeostasis. *Cell Biol Toxicol*, 25, 435-45.

CONDON, J. C., HARDY, D. B., KOVARIC, K. & MENDELSON, C. R. 2006. Up-regulation of the progesterone receptor (PR)-C isoform in laboring myometrium by activation of nuclear factor-kappaB may contribute to the onset of labor through inhibition of PR function. *Mol Endocrinol*, 20, 764-75.

DHEDA, K., HUGGETT, J. F., BUSTIN, S. A., JOHNSON, M. A., ROOK, G. & ZUMLA, A. 2004. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques*, 37, 112-4, 116, 118-9.

ELLMANN, S., STICHT, H., THIEL, F., BECKMANN, M. W., STRICK, R. & STRISSEL, P. L. 2009. Estrogen and progesterone receptors: from molecular structures to clinical targets. *Cell Mol Life Sci*, 66, 2405-26.

FALKENSTEIN, E., TILLMANN, H. C., CHRIST, M., FEURING, M. & WEHLING, M. 2000. Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev*, 52, 513-56.

FENG, Y. & GREGOR, P. 1997. Cloning of a novel member of the G protein-coupled receptor family related to peptide receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, 231, 651-4.

FILARDO, E., QUINN, J., PANG, Y., GRAEBER, C., SHAW, S., DONG, J. & THOMAS, P. 2007. Activation of the novel estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 (GPR30) at the plasma membrane. *Endocrinology*, 148, 3236-45.

FILARDO, E. J., QUINN, J. A., BLAND, K. I. & FRACKELTON, A. R., JR. 2000. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol*, 14, 1649-60.

FILARDO, E. J., QUINN, J. A., FRACKELTON, A. R., JR. & BLAND, K. I. 2002. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol Endocrinol*, 16, 70-84.

FUNAKOSHI, T., YANAI, A., SHINODA, K., KAWANO, M. M. & MIZUKAMI, Y. 2006. G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun*, 346, 904-10.

GOMEZ-CONCHA, C., FLORES-HERRERA, O., OLVERA-SANCHEZ, S., ESPINOSA-GARCIA, M. T. & MARTINEZ, F. 2011. Progesterone synthesis by human placental mitochondria is sensitive to PKA inhibition by H89. *Int J Biochem Cell Biol*, 43, 1402-11.

GRAHAM, J. D. & CLARKE, C. L. 1997. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev*, 18, 502-19.

JACOBSEN, B. M. & HORWITZ, K. B. 2012. Progesterone receptors, their isoforms and progesterone regulated transcription. *Mol Cell Endocrinol*, 357, 18-29.

KASTNER, P., BOCQUEL, M. T., TURCOTTE, B., GARNIER, J. M., HORWITZ, K. B., CHAMBON, P. & GRONEMEYER, H. 1990a. Transient expression of human and chicken progesterone receptors does not support alternative translational initiation from a single mRNA as the mechanism generating two receptor isoforms. *J Biol Chem*, 265, 12163-7.

KASTNER, P., KRUST, A., TURCOTTE, B., STROPP, U., TORA, L., GRONEMEYER, H. & CHAMBON, P. 1990b. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J*, 9, 1603-14.

KATAKI, A., SOTIRIANAKOS, S., MEMOS, N., KARAYIANNIS, M., MESSARIS, E., LEANDROS, E., MANOURAS, A. & ANDROULAKIS, G. 2003. P53 and C-FOS overexpression in patients with thyroid cancer: an immunohistochemical study. *Neoplasma*, 50, 26-30.

KATZENELLENBOGEN, B. S. 1980. Dynamics of steroid hormone receptor action. *Annu Rev Physiol*, 42, 17-35.

KHIMANI, A. H., MHASHILKAR, A. M., MIKULSKIS, A., O'MALLEY, M., LIAO, J., GOLENKO, E. E., MAYER, P., CHADA, S., KILLIAN, J. B. & LOTT, S. T. 2005. Housekeeping genes in cancer: normalization of array data. *Biotechniques*, 38, 739-45.

KLEUSER, B., MALEK, D., GUST, R., PERTZ, H. H. & POTTECK, H. 2008. 17-Beta-estradiol inhibits transforming growth factor-beta signaling and function in breast cancer cells via activation of extracellular signal-regulated kinase through the G protein-coupled receptor 30. *Mol Pharmacol*, 74, 1533-43.

KUMAR, A., KLINGE, C. M. & GOLDSTEIN, R. E. 2010. Estradiol-induced proliferation of papillary and follicular thyroid cancer cells is mediated by estrogen receptors alpha and beta. *Int J Oncol*, 36, 1067-80.

KVINGEDAL, A. M. & SMELAND, E. B. 1997. A novel putative G-protein-coupled receptor expressed in lung, heart and lymphoid tissue. *FEBS Lett*, 407, 59-62.

LANGE, C. A. 2008. Integration of progesterone receptor action with rapid signaling events in breast cancer models. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 108, 203-12.

LANGE, C. A., RICHER, J. K., SHEN, T. & HORWITZ, K. B. 1998. Convergence of progesterone and epidermal growth factor signaling in breast cancer. Potentiation of mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem*, 273, 31308-16.

LESSEY, B. A. 2003. Two pathways of progesterone action in the human endometrium: implications for implantation and contraception. *Steroids*, 68, 809-15.

LIN, B. C., SUZAWA, M., BLIND, R. D., TOBIAS, S. C., BULUN, S. E., SCANLAN, T. S. & INGRAHAM, H. A. 2009. Stimulating the GPR30 estrogen receptor with a novel tamoxifen analogue activates SF-1 and promotes endometrial cell proliferation. *Cancer Res*, 69, 5415-23.

LOSEL, R. M., FALKENSTEIN, E., FEURING, M., SCHULTZ, A., TILLMANN, H. C., ROSSOL-HASEROTH, K. & WEHLING, M. 2003. Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers. *Physiol Rev*, 83, 965-1016.

LUCAS, T. F., ROYER, C., SIU, E. R., LAZARI, M. F. & PORTO, C. S. 2010. Expression and signaling of G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) in rat sertoli cells. *Biol Reprod*, 83, 307-17.

LYDON, J. P. & EDWARDS, D. P. 2009. Finally! A model for progesterone receptor action in normal human breast. *Endocrinology*, 150, 2988-90.

MANI, S. K. & BLAUSTEIN, J. D. 2012. Neural Progestin Receptors and Female Sexual Behavior. *Neuroendocrinology*.

MANOLE, D., SCHILDKNECHT, B., GOSNELL, B., ADAMS, E. & DERWAHL, M. 2001. Estrogen promotes growth of human thyroid tumor cells by different molecular mechanisms. *J Clin Endocrinol Metab*, 86, 1072-7.

MELLER, M., VADACHKORIA, S., LUTHY, D. A. & WILLIAMS, M. A. 2005. Evaluation of housekeeping genes in placental comparative expression studies. *Placenta*, 26, 601-7.

MEYER, M. E., PORNON, A., JI, J. W., BOCQUEL, M. T., CHAMBON, P. & GRONEMEYER, H. 1990. Agonistic and antagonistic activities of RU486 on the functions of the human progesterone receptor. *EMBO J*, 9, 3923-32.

NISWENDER, G. D. 2002. Molecular control of luteal secretion of progesterone. *Reproduction*, 123, 333-9.

O'DOWD, B. F., NGUYEN, T., MARCHESE, A., CHENG, R., LYNCH, K. R., HENG, H. H., KOLAKOWSKI, L. F., JR. & GEORGE, S. R. 1998. Discovery of three novel G-protein-coupled receptor genes. *Genomics*, 47, 310-3.

O'MALLEY, B. W., MCGUIRE, W. L., KOHLER, P. O. & KORENMAN, S. G. 1969. Studies on the mechanism of steroid hormone regulation of synthesis of specific proteins. *Recent Prog Horm Res*, 25, 105-60.

OTTO, C., ROHDE-SCHULZ, B., SCHWARZ, G., FUCHS, I., KLEWER, M., BRITTAIN, D., LANGER, G., BADER, B., PRELLE, K., NUBBEMEYER, R. &

FRITZEMEIER, K. H. 2008. G protein-coupled receptor 30 localizes to the endoplasmic reticulum and is not activated by estradiol. *Endocrinology*, 149, 4846-56.

OWMAN, C., BLAY, P., NILSSON, C. & LOLAIT, S. J. 1996. Cloning of human cDNA encoding a novel heptahelix receptor expressed in Burkitt's lymphoma and widely distributed in brain and peripheral tissues. *Biochem Biophys Res Commun*, 228, 285-92.

PFAFFL, M. W., TICHOPAD, A., PRGOMET, C. & NEUVIANS, T. P. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett*, 26, 509-15.

PRATT, W. B., GALIGNIANA, M. D., MORISHIMA, Y. & MURPHY, P. J. 2004. Role of molecular chaperones in steroid receptor action. *Essays Biochem*, 40, 41-58.

PROSSNITZ, E. R. & BARTON, M. 2011. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nat Rev Endocrinol*, 7, 715-26.

PROSSNITZ, E. R., SKLAR, L. A., OPREA, T. I. & ARTERBURN, J. B. 2008. GPR30: a novel therapeutic target in estrogen-related disease. *Trends Pharmacol Sci*, 29, 116-23.

REKAWIECKI, R., KOWALIK, M. K., SLONINA, D. & KOTWICA, J. 2008. Regulation of progesterone synthesis and action in bovine corpus luteum. *J Physiol Pharmacol*, 59 Suppl 9, 75-89.

REVANKAR, C. M., CIMINO, D. F., SKLAR, L. A., ARTERBURN, J. B. & PROSSNITZ, E. R. 2005. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*, 307, 1625-30.

ROCHETTE-EGLY, C. 2003. Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation. *Cell Signal*, 15, 355-66.

RUBIE, C., KEMPF, K., HANS, J., SU, T., TILTON, B., GEORG, T., BRITTNER, B., LUDWIG, B. & SCHILLING, M. 2005. Housekeeping gene variability in normal and cancerous colorectal, pancreatic, esophageal, gastric and hepatic tissues. *Mol Cell Probes*, 19, 101-9.

SAKAMOTO, H., MATSUDA, K., HOSOKAWA, K., NISHI, M., MORRIS, J. F., PROSSNITZ, E. R. & KAWATA, M. 2007. Expression of G protein-coupled receptor-30, a G protein-coupled membrane estrogen receptor, in oxytocin neurons of the rat paraventricular and supraoptic nuclei. *Endocrinology*, 148, 5842-50.

SANDEN, C., BROSELID, S., CORNMARK, L., ANDERSSON, K., DASZKIEWICZ-NILSSON, J., MARTENSSON, U. E., OLDE, B. & LEEB-LUNDBERG, L. M. 2011. G protein-coupled estrogen receptor 1/G protein-coupled receptor 30 localizes in the plasma membrane and traffics intracellularly on cytokeratin intermediate filaments. *Mol Pharmacol*, 79, 400-10.

SEIFERT-KLAUSS, V. & PRIOR, J. C. 2010. Progesterone and bone: actions promoting bone health in women. *J Osteoporos*, 2010, 845180.

SHE, X., ROHL, C. A., CASTLE, J. C., KULKARNI, A. V., JOHNSON, J. M. & CHEN, R. 2009. Definition, conservation and epigenetics of housekeeping and tissue-enriched genes. *BMC Genomics*, 10, 269.

SHERMAN, M. R., CORVOL, P. L. & O'MALLEY, B. W. 1970. Progesterone-binding components of chick oviduct. I. Preliminary characterization of cytoplasmic components. *J Biol Chem*, 245, 6085-96.

SILVA, E., KABIL, A. & KORTENKAMP, A. 2010. Cross-talk between non-genomic and genomic signalling pathways--distinct effect profiles of environmental estrogens. *Toxicol Appl Pharmacol*, 245, 160-70.

SILVER, N., BEST, S., JIANG, J. & THEIN, S. L. 2006. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol Biol*, 7, 33.

TAKADA, Y., KATO, C., KONDO, S., KORENAGA, R. & ANDO, J. 1997. Cloning of cDNAs encoding G protein-coupled receptor expressed in human endothelial cells exposed to fluid shear stress. *Biochem Biophys Res Commun*, 240, 737-41.

TATA, J. R. 2002. Signalling through nuclear receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 702-10.

THOMAS, P., PANG, Y., FILARDO, E. J. & DONG, J. 2005. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology*, 146, 624-32.

THOMASZ, L., OGLIO, R., RANDI, A. S., FERNANDEZ, M., DAGROSA, M. A., CABRINI, R. L., JUVENAL, G. J. & PISAREV, M. A. 2010. Biochemical changes during goiter induction by methylmercaptoimidazol and inhibition by delta-iodolactone in rat. *Thyroid*, 20, 1003-13.

TIAN, J., KIM, S., HEILIG, E. & RUDERMAN, J. V. 2000. Identification of XPR-1, a progesterone receptor required for *Xenopus* oocyte activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 14358-63.

URIBE, A., STRAUSS, J. F., 3RD & MARTINEZ, F. 2003. Contact sites from human placental mitochondria: characterization and role in progesterone synthesis. *Arch Biochem Biophys*, 413, 172-81.

VANDESOMPELE, J., DE PRETER, K., PATTYN, F., POPPE, B., VAN ROY, N., DE PAEPE, A. & SPELEMAN, F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, 3, RESEARCH0034.

VIVACQUA, A., BONOFILIO, D., ALBANITO, L., MADEO, A., RAGO, V., CARPINO, A., MUSTI, A. M., PICARD, D., ANDO, S. & MAGGIOLINI, M. 2006. 17beta-estradiol, genistein, and 4-hydroxytamoxifen induce the proliferation of thyroid cancer cells through the g protein-coupled receptor GPR30. *Mol Pharmacol*, 70, 1414-23.

WEI, L. L., NORRIS, B. M. & BAKER, C. J. 1997. An N-terminally truncated third progesterone receptor protein, PR(C), forms heterodimers with PR(B) but interferes in PR(B)-DNA binding. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 62, 287-97.

ZHANG, X., DING, L. & SANDFORD, A. J. 2005. Selection of reference genes for gene expression studies in human neutrophils by real-time PCR. *BMC Mol Biol*, 6, 4.

JUSTIFICATIVA

A prevalência de doenças da tireoide é maior em mulheres, assim, os hormônios sexuais progesterona e estradiol podem ter efeitos diretos nas células foliculares da tireoide. Como não há estudos *in vitro* ou *in vivo* que tenham avaliado efeitos da progesterona na glândula tireoide, o estudo do efeito desse hormônio em células tireoidianas pode contribuir para esse conhecimento. Além disso, recentemente foi descrito um receptor de membrana para estradiol, chamado GPR30 ou GPER, portanto, justifica-se avaliar sua presença em células normais da tireoide.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar os efeitos *in vitro* na expressão dos genes e proteínas NIS, TG e TPO em células foliculares da tireoide tratadas com progesterona e caracterizar a expressão e possível localização do receptor de membrana GPR30 nas células foliculares da tireoide.

Objetivos Específicos

1. Estabelecer um modelo de cultura primária de células foliculares da tireoide humana;
2. Avaliar a expressão gênica e proteica do receptor não clássico GPR30 em células foliculares de tireoide humanas;
3. Avaliar o gene de referência adequado em cultura primária de células foliculares humanas expostas ou não a tratamentos com estradiol e progesterona e seus respectivos inibidores nucleares e
4. Avaliar o efeito da progesterona na expressão gênica da tireoglobulina, da tireoperoxidase e do transportador sódio/iodo, em células foliculares de tireoide tratadas com TSH.

METODOLOGIAS

Delineamento do estudo

Este estudo tratou-se de um ensaio experimental *in vitro*.

Obtenção do tecido

As células foliculares de tireoide humana normais foram obtidas de tecido normal circunjacente a tumores diferenciados de tireoide retirado em tireoidectomia total ou quase total e digerido para a separação das células. A normalidade do tecido foi avaliada por patologista durante exame de congelação e o tecido obtido foi acondicionado em tubos tipo Falcon contendo meio de transporte Hank's (GIBCO, Grand Island NY, USA) refrigerado, contendo 100 µg/ml de kanamicina (Sigma Aldrich, St. Louis MO, USA).

Cultura primária de células foliculares da tireoide

O tecido de tireoidiano foi digerido com Colagenase Tipo I (GIBCO) para a separação das células do tecido conjuntivo. Os meios testados foram meio 199, meio Ham's F-12 modificado por Coon e meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium),

todos suplementados com soro bovino fetal (SBF) 10% (GIBCO), kanamicina 100 µg/ml (Sigma Aldrich), insulina 10 µg/ml (ASPEN PHARMA), transferrina 5 µg/ml (Sigma Aldrich) (meio 2H), e TSH 1 mUI/ml (Sigma Aldrich) (meio 3H). As células em uma densidade de $1,0 \times 10^6$ células/ml foram semeadas em placas de 6 poços, e cultivadas em estufa umidificada com temperatura de 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂ (Thermo Scientific's Revco Elite II®).

As células em cultura foram acompanhadas por microscópio de contraste de fase durante todas as etapas do estudo. Somente as culturas que apresentaram morfologia compatível, com população estimada de menos de 10% de fibroblastos, e sem contaminação, foram incluídas no estudo.

Desenho experimental e tratamentos utilizados

No 5^o ou 7^o dia após semeadura, as células geralmente apresentavam cerca de 80% de confluência, e então, eram lavadas com PBS a 37°C e tratadas com meio 2H (meio 3H sem TSH), por 48 horas e divididas em quatro ou oito subgrupos, conforme descrito nos Capítulos IV e V, respectivamente.

Etanol foi adicionado se necessário para que todos os grupos contivessem 0,1% de álcool absoluto no meio, considerando que os hormônios esteroides e seus antagonistas foram solubilizados em etanol. Não há estudos na literatura avaliando os efeitos da progesterona e seu inibidor nas células foliculares da tireoide e, por isso, testamos três diferentes concentrações de progesterona. Os tempos de exposição aos tratamentos foram de 3, 6, 12, 24 e 48 horas.

Extração de RNA total

Ao finalizar os tempos de tratamentos, o meio foi aspirado e as células foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) e RNA total foi extraído com 1 mL/10 cm² do reagente Trizol[®] (GIBCO, BRL, NY, EUA), que mantém a integridade do RNA enquanto rompe as células e dissolve os componentes celulares (Chomczynski, 1987). Em seguida, adicionaram-se 200µl de clorofórmio, e após breve homogeneização, as amostras foram centrifugadas para separar a solução em fase orgânica e fase aquosa, na qual se encontra o RNA. A precipitação do RNA foi feita pela adição de álcool isopropílico e o precipitado foi lavado com etanol 75% em água isenta de RNases. O RNA foi ressuspenso em 15 a 30 µl de água livre de RNase. A concentração e a pureza do RNA extraído foram avaliadas através do espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Rockland DE EUA). Os critérios verificados considerando a amostra de RNA pura foram uma relação A_{260}/A_{280} entre 1,8-2,0 e uma razão de $A_{260}/A_{230} > 2,0$.

Síntese de cDNA

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi feita a partir de 1 µg de RNA total. A solução de RNA foi inicialmente desnaturada a 65°C por 5 minutos, juntamente com 1 µL de oligonucleotídeo complementar (Oligo(dT)) à cauda poli-A e com 1 µL de desoxirribonucleotídeos (dNTPs). Em seguida foi adicionada uma mistura contendo tampão Tris-HCl 200 mM pH 8,4 com KCl 50 mM, MgCl₂ 25 mM, DTT 0,1M e 40 unidades da enzima RNase OUT, e incubado por 2 min a 42°C. Após, foram

adicionadas 50U da enzima transcriptase reversa *SuperScript III*, incubando-se a 42°C por 50 min. Após foi feita nova desnaturação a 70°C por 15 min para inibir a atividade enzimática e a mistura foi incubada com 2U da enzima Rnase H por 20 min a 37°C. O produto desta reação foi armazenado a -20°C até seu uso.

Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR)

A análise da expressão gênica foi feita através do qRT-PCR. Essa é uma metodologia sensível que utiliza um sistema de detecção contínua da cinética da reação de qRT-PCR por fluorescência (Bustin, 2000). O corante fluorescente utilizado nas amplificações foi o *SYBR Green I* (Invitrogen) e a referência passiva utilizada foi o fluoróforo ROX (Invitrogen) (Morrison, 1998). A descrição dos *primers* utilizados bem como suas características encontram-se descritas na Tabela 1. A *especificidade* da reação para cada *primer* foi confirmada através de uma *curva* de dissociação ou curva de *melting* conforme pode ser visto na Figura 4. A amplificação foi realizada em duplicata em placas de 96 poços, com protocolo único para os diferentes genes, constituído de um ciclo inicial por 10 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos por 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C para anelamento e 30 segundos em 72°C. Análise da curva de dissociação para confirmar a presença de um único produto durante a reação foi realizada por execução de um gradiente de 60-95°C, com um aumento gradual de temperatura de 2°C por min. A eficiência da amplificação de cada gene foi determinada com base na inclinação (*slope*) da curva relativa, utilizando cinco concentrações seriadas de cDNAs (não diluído, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) de um *pool* de cDNA obtidos a partir de 2 µL dos cDNAs das amostras analisadas.

Tabela 1 - Características dos *primers* para amplificação dos genes marcadores de diferenciação das células foliculares da tireoide.

Gene	Primer Sense (5'- 3')	Posição cDNA	Produto (pb)
TG	GGCTAATGCTACATGTCCTG	5354–5374	231
	GCTTCTGTTGGAGATGCTGG	5565–5584	
TPO	GTCTGTCACGCTGGTTATGG	61–80	242
	CAATCACTCCGCTTGTGGC	283–302	
NIS	TCCATGTATGGCGTGAACC	1117–1135	234
	CTTCGAAGATGTCCAGCACC	1331–1350	

TPO: tireoperoxidase; TG: tireoglobulina; NIS: simporter do sódio-iodeto;

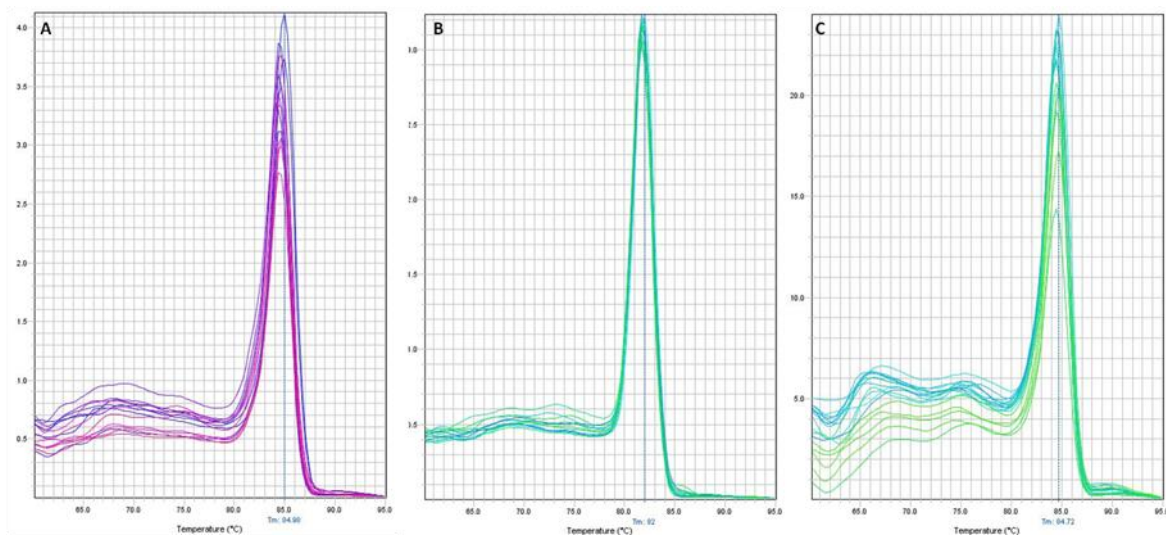


Figura 4 - Curva de dissociação ou curva de *melting* para os genes (A) tireoperoxidase, (B) simporter sódio-iodeto e (C) tireoglobulina, demonstrando a especificidade dos *primers* na amplificação de um único produto.

Seleção do gene de referência

A descrição dos critérios para a escolha do gene de referência e a metodologia utilizada encontram-se no Capítulo IV desta Tese.

Análise da expressão proteica

Extração de Proteínas

Para extração das proteínas, as células em cultura foram lavadas com PBS gelado e lisadas com 1 mL do tampão RIPA (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, EDTA 1mM pH 7,4, desoxicolato de sódio 0,25%, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, PMSF 1 mM, NaF 1 mM, Na₃CO₄ 1mM e leupeptina 1 µg/mL). O material foi solubilizado por 2 horas a 4°C, e após foi centrifugado a 10.000 x g por 10 min a 4°C. O sobrenadante contendo as proteínas foi transferido para outro tubo e estocado a -20°C, enquanto o precipitado contendo as organelas celulares e restos da membrana celular foram descartados. A concentração de proteínas foi medida pelo método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976), utilizando-se uma curva padrão com concentrações conhecidas de albumina de soro bovino (BSA).

Western blotting

Para separação das proteínas foi utilizado o SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio) com uma concentração de poliacrilamida de 7% a 10%. Aproximadamente 20 µg da proteína extraída das amostras foram incubadas com solução de Laemmli (glicerol 50%, SDS 10%, Tris 62,5 mM, azul de

bromofenol 0,1% e 2- β -mercaptoetanol 0,05%) a 95°C por 10 min (Laemmli, 1970) para desnaturação e após submetidas à eletroforese na presença de tampão de *blotting* (glicina 192 mM, Tris 25 mM e SDS 0,1%, pH 8,3).

As proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de PVDF (Immobilon™-P, Millipore USA), previamente lavada por 15 segundos em metanol P.A. e durante 2 minutos em água destilada. A transferência foi efetuada no sistema Semi Dry Trans-Blot SD (Bio-Rad), por 1 hora, com uma diferença de potencial elétrico de aproximadamente 25 V.

As membranas com as proteínas transferidas foram incubadas durante 2 horas em solução bloqueadora (TBS - NaCl 15 mM, EDTA 5 mM, TRIS 50 mM, Tween 20 0.5%, pH 7.4 e leite desnatado 5%) para saturar os sítios inespecíficos, auxiliando a diminuir ligações inespecíficas entre anticorpo e membrana e também nos níveis de interferência do *background*.

Após o bloqueio, as membranas foram incubadas *overnight* a 4°C, sob suave agitação, com os anticorpos primários descritos na Tabela 2 e após, incubados por 2 horas em temperatura ambiente com anticorpos secundários característicos. Por fim, as membranas foram expostas em sala escura, com solução para quimiluminescência (ECL) por cerca de 1 min, e colocadas em contato com o filme fotográfico (HyperFilm ECL, GE HealthCare, Uppsala, Sweden). Após a revelação, a densidade óptica das bandas foi medida pelo *software* ImageJ®. A densitometria obtida para as bandas das proteínas em estudo (Tabela 2) foi normalizada pela proteína β -tubulina.

Tabela 2 - Características dos anticorpos primários utilizados para detectar proteínas*.

Nome do Anticorpo	Marca	Isotipo	Diluição
Ac anti-GPR30 (K-19)-R	Santa Cruz	rabbit IgG	1:200
Ac anti-GPR30 (N-15)-R	Santa Cruz	rabbit IgG	1:200
β -Tubulina	Invitrogen	mouse IgG1	1:1000
AKT	Santa Cruz	rabbit IgG	1:250
pAKT	Santa Cruz	rabbit IgG	1:250
ERK 1/2	Santa Cruz	rabbit IgG	1:250
pERK 1/2	Santa Cruz	rabbit IgG	1:250

* AKT: proteína quinase B; pAKT proteína quinase B fosforilada; ERK 1/2: proteína cinase regulada por sinais extracelulares tipo 1 e 2; pERK 1/2: proteína cinase regulada por sinais extracelulares tipo 1 e 2 fosforiladas; GPR30: receptor de estrógeno acoplado à proteína G.

Imunocitoquímica

A técnica de imunocitoquímica foi utilizada para analisar a estrutura do citoesqueleto e também avaliar a possível localização e distribuição intracelular das proteínas específicas, tireoperoxidase e tireoglobulina, e das proteínas do citoesqueleto F-actina e α -tubulina, nas células foliculares em cultura. As condições para a avaliação da presença e da possível localização intracelular do receptor de membrana GPR30 nas células foliculares da tireoide encontram-se no Capítulo VI desta Tese.

As células foram cultivadas sobre lamínulas em placas de 35 mm nas mesmas condições descritas acima. Após as células foliculares atingirem a morfologia característica e confluência de 80-90%, as células foram lavadas com PBS gelado e fixadas com solução de paraformaldeído a 4% por 30 minutos, o qual fixa as células sem alterar a morfologia destas.

Para permeabilização das células, um passo importante para avaliação de proteínas intracelulares já que os anticorpos são moléculas grandes e não têm acesso direto ao citoplasma, foi utilizado uma solução a 0,1% de Triton X-100, diluída em tampão fosfato. Após, os sítios inespecíficos foram bloqueados com solução a 5% de albumina bovina por duas horas à temperatura ambiente.

Após o bloqueio, as lamínulas contendo as células foliculares foram incubadas em câmara úmida *overnight* com os anticorpos primários específicos contra TG ou TPO ou tubulina e depois, incubadas por duas horas em câmara úmida e escura com seus respectivos anticorpos secundários acoplados ao fluoróforo Cy5 ou Cy3 (Sigma Aldrich). Para revelação dos filamentos de actina utilizou-se faloidina marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC Labeled-Sigma). As células foram visualizadas em microscópio óptico de fluorescência e armazenadas em um computador IBM-PC compatível.

Referências

BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.

BUSTIN, S. A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 25, 169-93.

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

LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.

MORRISON, T. B., WEIS, J. J. & WITTEWER, C. T. 1998. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques*, 24, 954-8, 960, 962.

RESULTADOS e DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão dos experimentos desta Tese estão apresentados no formato de Capítulos separados. Os resultados que já foram publicados ou que serão submetidos encontram-se na Língua Inglesa.

CAPÍTULO I

Papel do estrogênio na função e regulação do crescimento da tireoide

Artigo publicado 4 de Maio de 2011 na Revista *Journal of Thyroid Research*

DOI: 10.4061/2011/875125

Role of Estrogen on Thyroid Function and Growth Regulation

Ana Paula Santin¹ and Tania Weber Furlanetto^{1,2}

¹ Postgraduation Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil;

² Divisão de Medicina Interna, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcellos 2350/700, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brasil.

Abstract

Thyroid diseases are more prevalent in women, particularly between puberty and menopause. It is wellknown that estrogen (E) has indirect effects on the thyroid economy. Direct effects of this steroid hormone on thyroid cells have been described more recently; so, the aim of the present paper was to review the evidences of these effects on thyroid function and growth regulation, and its mechanisms. The expression and ratios of the two E receptors, α and β , that mediate the genomic effects of E on normal and abnormal thyroid tissue were also reviewed, as well as nongenomic, distinct molecular pathways. Several evidences support the hypothesis that E has a direct role in thyroid follicular cells; understanding its influence on the growth and function of the thyroid in normal and abnormal conditions can potentially provide new targets for the treatment of thyroid diseases.

Correspondence should be addressed to Tania Weber Furlanetto, taniafurlanetto@gmail.com

1. Introduction

Thyroid diseases are more prevalent in women particularly between puberty and menopause [1], and women are more susceptible to the goitrogenic effect of iodine deficiency [2]. Carcinomas of the thyroid are three times more frequent in women than in men, and the peak rates occur earlier in women [3]. These epidemiological data suggest a role of estrogen in the pathogenesis of thyroid diseases.

Estrogen has a well-known indirect effect on thyroid economy, increasing the thyroxine binding globulin [4], and the need for thyroid hormone in hypothyroid women [5]. Direct effects of estrogen on thyroid cells have been described more recently [6], so the aim of the present paper was to review the evidences of these effects on thyroid function and growth regulation, and its mechanisms.

2. Estrogen and Its Receptors

17- β -estradiol (E2) is a lipophilic hormone with low-molecular weight that occurs naturally. Cellular signaling of estrogen is mediated classically upon the binding on two soluble intracellular nuclear receptors, estrogen receptor (ER) alpha, and ER beta [7]. The isoform β is smaller than the isoform α , and the DNA-binding domains of both subtypes are highly conserved. After binding of E2, ER forms a stable dimer that interacts with specific sequences called estrogen response elements (ERE) to initiate the transcription of target genes. Ligand-bound ERs can also interact with other transcription factors complexes and influence transcription of genes that do not harbor EREs. Third and fourth mechanisms of ERs regulatory actions are, respectively, non-

genomic and the ligand independent pathway. A variety of rapid signaling events such as activation of kinases and phosphatases and increases in ion fluxes across membranes has been described. These and other aspects of signaling and targets of ERs have been reviewed recently [7].

Recently, a transmembrane intracellular non-classical ER mediating rapid cell signaling was described, a G protein–coupled receptor (GPCR), named GPR30 [8].

2.1. Expression of ERs in Human Thyroid Tissue.

Classically, the presence of ER is fundamental for a direct action of estrogen in a given cell. ER has been described in both neoplastic and non-neoplastic human thyroid tissues, but the results are discordant. Immunohistochemical assays, with monoclonal antibodies, are the most commonly used methods for establishing receptor status. As may be seen in Table 1, some studies have found ER-positivity in normal and abnormal thyroid tissue, while others have not detected ER protein in any tissue studied. This discrepancy could be due to methodological issues; the development of monoclonal antibodies against ER with high sensitivity and specificity, and others factors such as tissue fixation, tissue processing, interpretation of immunohistochemistry and *cut-offs* for positive results, could have contributed to the sensitivity of the techniques employed [7].

Table 1: Estrogen receptor (ER) in human normal thyroid, and benign and malignant thyroid disease.

Study	Method	Normal	All benign lesions	All neoplastic lesions	All carcinoma	Benign lesions			Carcinoma		
						Adenoma	Goiter	Papillary	Follicular	Medullary	Anaplastic
Tavangar et al. [10]; 2007	IHC					8/37	31/130	37/119	2/18	0/35	0/12
Arain et al. [11]; 2003	IHC	0/25				0/9	0/8	0/19	0/10	0/4	
Lewy-Trenda et al. [12]; 1998	IHC					2/19	0/20	4/8	3/5		0/4
Valle et al. [13]; 1998	RT-PCR	28/33				12/12	6/7	26/26	1/1	1/1	1/1
Bonacci et al. [14]; 1996	DCC	26/38	11/28		7/20						
Jaklic et al. [15]; 1995	IHC					0/1	0/5	0/4		0/1	
Colomer et al. [16]; 1996	IHC							24/74		1/7	
Inoue et al. [17]; 1993	IHC							18/70			
Inoue et al. [18]; 1993	IHC										
Yane et al. [19]; 1994	RT-PCR			5/27							
Yane et al. [20]; 1993	IHC	0/10			2/19	2/12	0/7				
Hiasa et al. [21]; 1993	IHC					44/130	23/39	19/115	7/23		0/6
Diaz et al. [22]; 1991	IHC					20/30		23/30	11/20		
Mizukami et al. [23]; 1991	IHC		8/18			4/8		47/62			1/6
Takeichi et al. [24]; 1991	IHC							11/12			
Hong et al. [25]; 1991	IHC							1/27	1/20		
Miki et al. [26]; 1990	DCC	0/14	12/46		7/23	5/11	2/12	6/20	0/1		1/1
Haruta et al. [27]; 1990	IHC							30/52			0/12
Chaudhuri et al. [28]; 1989	SDG	3/8	20/22			7/9	5/23		8/8		0/6
Money et al. [29]; 1989	IHC			14/15							
Clark et al. [30]; 1985	SDG										
Hampf [15]; 1985	RBA	0/8			0/5						
Molteni et al. [37]; 1981	SDG	0/2									

Data are shown as number of ER-positive samples/total number of samples. IHC: immunohistochemical assay; DCC: dextran-coated charcoal assay; RT-PCR: reverse transcriptase-polymerase chain reaction technique; SDG: sucrose density gradient assay; RBA: radioligand binding assay.

2.2. Expression of ER α and ER β in Human Thyroid Tissue.

ER expression in human thyroid was first reported in 1981 [37]. ER α was first described in 1973 [38], and ER β was identified in 1996 [39], so only from this moment on it was possible to evaluate the relationship between isoforms of ERs in thyroid tissue. An important role of different patterns of distribution and expression of subtypes ERs in thyroid carcinoma has been proposed: estrogen binding to ER α would promote cell proliferation and growth, and, in contrast, ER β would promote apoptotic actions and other suppressive functions in thyroid tumors, as reviewed by Chen et al. [40]. Then, ER α : ER β ratio could have a role in the pathophysiology of thyroid cancer [40], similar to that postulated for breast cancer [41].

In differentiated thyroid follicular tumors, the expression of ER α has been associated with well-differentiated tumors and reduced incidence of disease recurrence [54]. ER α protein [55] and ER α mRNA [19, 56] are expressed in normal and neoplastic follicular cells of the thyroid. Also, the expression of ER α and ER β was detected in human medullary thyroid cancer [34] with an increased ratio of ER α /ER β , suggesting a possible role in tumor growth and progression. A few studies evaluated ER α and ER β expression in normal and abnormal thyroid tissue, as shown in Table 2.

The effects of the agonists of ER α and ER β , respectively, propyl-pyrazole-triol (PPT) and diarylpropionitrile (DPN), in the proliferation of thyroid cancer cell lines has been studied: PPT had a stimulatory effect, while inhibition of proliferation and DNA fragmentation were observed after DPN [45]. In the same study, small interference ribonucleic acid (siRNA) blocking ER α or ER β demonstrated that knockdown of the ER α attenuated E2-mediated B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) expression, an important antiapoptotic protein, while knockdown of the ER β enhanced E2-induced Bcl-2 expression [45].

Table 2: ER α and ER β in human normal thyroid, and benign and malignant thyroid diseases.

Study	Isoform	All benign	All carcinoma	Benign lesions			Carcinoma		
				Adenoma	Goiter	Papillary	Follicular	Medullary	Anaplastic
Vaiman et al. [31]; 2010	ER α			0/34	0/150	0/90	0/6	0/4	0/5
	ER β			30/34	126/150	60/90	4/6	3/4	3/5
Winters et al. [32]; 2010	ER α					1/1			
Vannucchi et al. [33]; 2010	ER α		12/38						
Cho et al. [34]; 2007	ER α							10/11	
	ER β							8/11	
Bléchet et al. [35]; 2007	ER α							0/28	
	ER β							26/28	
Ceresini et al. [36]; 2006	ER α				0/17	0/17			
	ER β				17/17	14/17			

Data are shown as number of ER-positive samples/total number of samples.

2.3. Expression of GPR30 in Thyroid Lines Cells

Growing evidence suggests that estrogens are also able to exert nongenomic events mediated by GPR30 [8]. Vivacqua and colleagues analyzed the effects of E2 and the phytoestrogen genistein in human follicular thyroid carcinoma cell lines, WRO and FRO, and ARO, a human anaplastic thyroid carcinoma cell line [46]. Both hormones stimulated in vitro proliferation of these cell lines through the GPR30 and mitogen-activated protein kinase signaling cascade [46]. In other human benign and malignant thyroid tissue, the expression of GPR30 has not been studied.

3. Response to E₂ Stimulation *In Vitro*

3.1. Proliferation

Several studies described proliferation of thyroid cells induced by E2, as shown in Table 3.

Table 3: E2 effects on thyroid protein expression, function, and proliferation *in vitro*.

Study	Thyroid cells	Presence of ER α /ER β	ER α expression	ER β expression	Proliferation	Nis expression	Iodide uptake	TG mRNA
Kumar et al. [42]; 2010	NPA87	ER α +/ER β +			↑			
	KAT5	ER α +/ER β +			↑			
	WRO	ER α +/ER β +			↑			
Rajoria et al. [43]; 2010	BCPAP	ER α +/ER β +			↑			
	Nthy-3-1	ER α +/ER β +			↑			
Zeng et al. [44]; 2008	KAT5	ER α +/ER β +	↑	0	↑			
	FRO	ER α +/ER β +	0	↑	↓			
Zeng et al. [45]; 2007	KAT5	ER α +/ER β +	↑	0	↑			
	FRO	ER α +/ER β +	↑	↑	↑			
	ARO	ER α +/ER β +	↑	0	↑			
Vivacqua et al. [46]; 2006	WRO	ER α +/ER β -			↑			
	FRO	ER α +/ER β -			↑			
	ARO	ER α -/ER β -			↑			
Lee et al. [47]; 2005	KAT5				↑			
Bamu et al. [48]; 2001	NPA87	ER+		↑	↑			
	WRO	ER+			↓			
Manole et al. [6]; 2001	HTC - TSHr	ER α +/ER β +	↑	↑	↑			
	Goiter	ER α +/ER β +	↑	↑	↑			
	XTC 133				↑			
Furlanetto et al. [49]; 2001	FRTL-5				↑		↓	
Furlanetto et al. [50]; 1999	FRTL-5	ER α +			↑	↓		
Nagy et al. [51]; 1999*	Mng				↑			
	Ca				↑			
	Ade				↓			
Del Senno et al. [52]; 1989**	N				↑			↑
	Ade				↑			↑
	Ca				0			0
Yang et al. [53]; 1988	TT				↑			

Estrogen receptor (ER) +: presence of expression, -: absence of expression; NPA87, KAT5, and BCPAP: human papillary thyroid carcinoma cell lines; WRO and FRO: human follicular thyroid carcinoma cell lines; Nthy-3-1: human normal transformed thyroid cell line; ARO: human anaplastic thyroid carcinoma cell line; HTC-TSHr: human thyroid carcinoma cell line lacking endogenous TSH receptor; XTC-133: thyroid cancer cell line of Hurthle cell origin; FRTL-5: Fischer rat thyroid cell line. Mng: multinodular goiter; Ca: carcinoma; Ade: adenoma; N: normal thyroid; TT: human medullary thyroid carcinoma cell line; ↑: increase, ↓: decrease, and 0: no effect, after E2 exposure.: *thyroid tissue obtained in surgical resection, under organotypic culture conditions for 48 hours;**suspension cultures of thyroid follicles.

Some of the most commonly used assays are incorporation of bromodeoxyuridine (BrdU) [6], 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) [45, 47, 50, 57], [(3)H]-thymidine incorporation [48, 52, 53], and trypan blue solution [43]. Cotreatment with ICI182780, fulvestrant, an antagonist of E2 by

inhibition and degradation of ER [58], significantly attenuated these proliferative effects. Based in these studies, E2 increases proliferation of thyroid cells.

3.2. ER-Dependent Effects on Thyroid Differentiation Proteins

Several Few studies evaluated E2 effect on gene transcription of differentiation proteins in thyroid cells. In Fischer rat derived thyroid cell line, FRTL-5, E2 treatment decreased the sodium-iodide symporter (NIS) gene expression [50], and the iodide uptake [49]. E2 increased the thyroglobulin gene expression in suspension cultures of human thyroid follicles of adenoma and carcinoma [52]. These data are shown in Table 3. The opposite effects of E2 on the NIS gene expression and iodide uptake, in FRTL-5 cells, and the thyroglobulin gene expression, in suspension culture of thyroid cells, could be due to the different systems studied; it cannot be excluded that estradiol affects these genes by different intracellular pathways. These results, together with the increase in cell growth caused by estrogen, could implicate this hormone in the pathogenesis of goiter and thyroid carcinoma; nevertheless, as just one study evaluated the effect of estrogen on thyroid differentiated proteins in human thyroid tissue, more studies should be done to better understand the role of estrogen in thyroid differentiated protein expression.

3.3. Non-Genomic Effects of E2

Some of the actions of E2 in the proliferation of thyroid cells are mediated by the activation of signal transducing pathways, as shown in Table 4. E2 can induce activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) [42] and phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) in follicular thyroid carcinoma cells, mainly due to interaction via membrane associated ER [42, 45, 46]. PI3K and Erk1/2

signaling may play a critical role in preventing apoptosis and inducing cell cycle progression by induction of key genes expression [59].

Table 4: Non-genomic estrogens effects on thyroid cells.

Study	Cells	GPR30	MAPK	PI3k	Cyclin D1	<i>c-fos</i>	Bcl-2	Bax
Kumar et al.[42]; 2010	NPA87	–	↑	↑				
	KAT5	–	↑	↑	↑			
	WRO	+	↑	↑	↑			
Zeng et al. [45]; 2007	KAT5						↑	↓
	FRO						↑	↓
	WRO						↑	↓
Vivacqua et al. [46]; 2006	WRO	+	↑		↑	↑		
	FRO	+	↑		↑	↑		
	ARO	+	↑		↑	↑		
Manole et al. [6]; 2001	HTC-TSHr		↑		↑			
	Goiter		↑		↑			
	XTC 133		↑		↑			

NPA87 and KAT5: human papillary thyroid carcinoma cell lines; WRO and FRO: human follicular thyroid carcinoma cell lines; HTC-TSHr: human thyroid carcinoma cell line lacking endogenous TSH receptor; XTC-133: thyroid cancer cell line of Hurthle cell origin; Goiter: primary culture of human thyroid cells isolated from goiter nodules. (+): presence of expression; (–) absence of expression; (↑): increase, (↓): decrease, and (0): no effects, after E2 exposure.

Expression of early response genes and regulatory genes of the cell cycle are necessary for proliferation of cells. As E2 has been demonstrated to stimulate the growth of thyroid cells, it is important to study the expression of key cell-cycle genes such as cyclin D1 after stimulation with E2. Cyclin D1 regulates the cell progression cycle facilitating G1 to S phase transition and also has an estrogen-responsive regulatory region [60], that is likely different from the canonical EREs. Overexpression of cyclin D1 in thyroid malignancies has been reported [61–65], moreover, its expression has been associated with an aggressive behavior in papillary thyroid microcarcinomas, because over 90% of the metastasizing microcarcinomas expressed cyclin D1 [66].

E2 significantly increased the expression of cyclin D1 in a human thyroid carcinoma cell line lacking endogenous TSH receptor (HTC-TSHr cells), and in a thyroid cancer cell line of Hurthle cell origin (XTC-133), which was abolished by PD.098059 that

blocked G0/G1 to S phases [6]. E2 upregulated cyclins A and D1, as well as the proto-oncogene c-fos, in WRO, FRO, and ARO cells [46]. Cyclin D1 was also shown to be upregulated by E2 in KAT5, a papillary thyroid cancer cell line, and WRO cells [42].

Together, these results are very compelling, pointing to an ability of E2 to regulate genes mediating cell cycle progression in thyroid cells, and potentially contributing to the pathogenesis of thyroid cancer or thyroid hyperplasia.

4. Conclusions

There are evidences that estrogen may have direct actions in human thyroid cells by ER-dependent mechanisms or not, modulating proliferation, and function. Different patterns of distribution, expression, and ratios of ER α and ER β may have a role in thyroid cancer cells proliferation, as well as in the outcome of thyroid cancer. Studying estrogen effects on thyroid cells is a potential tool to better understand the pathogenesis of thyroid diseases, and to develop targets to its treatment. Further studies on the influence of E2 on the growth and function of the thyroid are needed, preferably in primary culture of normal and abnormal human thyroid cells.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests.

References

[1] M. P. J. Vanderpump, W. M. G. Tunbridge, J. M. French et al., "The incidence of thyroid disorders in the community: a twenty-year follow-up of the Wickham Survey," *Clinical Endocrinology*, vol. 43, no. 1, pp. 55–68, 1995.

[2] P. Laurberg, K. M. Pedersen, A. Hreidarsson, N. Sigfusson, E. Iversen, and P. R. Knudsen, "Iodine intake and the pattern of thyroid disorders: a comparative epidemiological study of thyroid abnormalities in the elderly in Iceland and in Jutland, Denmark," *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 83, no. 3, pp. 765–769, 1998.

[3] L. Enewold, K. Zhu, E. Ron et al., "Rising thyroid cancer incidence in the United States by demographic and tumor characteristics, 1980–2005," *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, vol. 18, no. 3, pp. 784–791, 2009.

[4] Z. Ben-Rafael, J. F. Struass, B. Arendash-Durand, L. Mastroianni, and G. L. Flickinger, "Changes in thyroid function tests and sex hormone binding globulin associated with treatment by gonadotropin," *Fertility and Sterility*, vol. 48, no. 2, pp. 318–320, 1987.

[5] B. M. Arafah, "Increased need for thyroxine in women with hypothyroidism during estrogen therapy," *New England Journal of Medicine*, vol. 344, no. 23, pp. 1743–1749, 2001.

[6] D. Manole, B. Schildknecht, B. Gosnell, E. Adams, and M. Derwahl, "Estrogen promotes growth of human thyroid tumor cells by different molecular mechanisms," *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 86, no. 3, pp. 1072–1077, 2001.

[7] N. Heldring, A. Pike, S. Andersson et al., "Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets," *Physiological Reviews*, vol. 87, no. 3, pp. 905–931, 2007.

[8] C. M. Revankar, D. F. Cimino, L. A. Sklar, J. B. Arterburn, and E. R. Prossnitz, "A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling," *Science*, vol. 307, no. 5715, pp. 1625–1630, 2005.

[9] A. M. Gown, "Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer," *Modern Pathology*, vol. 21, no. 2, pp. S8–S15, 2008.

[10] S. M. Tavangar, M. Monajemzadeh, B. Larijani, and V. Haghpanah, "Immunohistochemical study of oestrogen receptors in 351 human thyroid glands," *Singapore Medical Journal*, vol. 48, no. 8, pp. 744–747, 2007.

[11] S. A. Arain, M. H. Shah, S. A. Meo, and Q. Jamal, "Estrogen receptors in human thyroid gland. An immunohistochemical study," *Saudi Medical Journal*, vol. 24, no. 2, pp. 174–178, 2003.

[12] I. Lewy-Trenda, "Estrogen receptors in the malignant and benign neoplasms of the thyroid," *Polski Merkurusz Lekarski*, vol. 5, no. 26, pp. 80–83, 1998.

[13] L. D. Valle, A. Ramina, S. Vianello, A. Fassina, P. Belvedere, and L. Colombo, "Potential for estrogen synthesis and action in human normal and neoplastic thyroid tissues," *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 83, no. 10, pp. 3702–3709, 1998.

[14] R. Bonacci, A. Pinchera, P. Fierabracci, A. Gigliotti, L. Grasso, and C. Giani, "Relevance of estrogen and progesterone receptors enzyme immunoassay in malignant, benign and surrounding normal thyroid tissue," *Journal of Endocrinological Investigation*, vol. 19, no. 3, pp. 159–164, 1996.

[15] B. R. Jaklic, J. Rushin, and B. C. Ghosh, "Estrogen and progesterone receptors in thyroid lesions," *Annals of Surgical Oncology*, vol. 2, no. 5, pp. 429–434, 1995.

[16] A. Colomer, J. V. Martínez-Mas, X. Matias-Guiu et al., "Sex-steroid hormone receptors in human medullary thyroid carcinoma," *Modern Pathology*, vol. 9, no. 1, pp. 68–72, 1996.

[17] H. Inoue, K. Oshimo, H. Miki et al., "Immunohistochemical study of estrogen receptor and estradiol on papillary thyroid carcinoma in young patients," *Journal of Surgical Oncology*, vol. 53, no. 4, pp. 226–230, 1993.

[18] H. Inoue, K. Oshimo, H. Miki, M. Kawano, and Y. Monden, "Immunohistochemical study of estrogen receptors and the responsiveness to estrogen in papillary thyroid carcinoma," *Cancer*, vol. 72, no. 4, pp. 1364–1368, 1993.

[19] K. Yane, Y. Kitahori, N. Konishi et al., "Expression of the estrogen receptor in human thyroid neoplasms," *Cancer Letters*, vol. 84, no. 1, pp. 59–66, 1994.

[20] K. Yane, O. Tanaka, H. Miyahara, T. Matsunaga, Y. Kitahori, and Y. Hiasa, "Immunohistochemical study of epidermal growth factor receptor and estrogen receptor in human thyroid tumors," *Journal of Otolaryngology of Japan*, vol. 96, no. 5, pp. 787–790, 1993.

[21] Y. Hiasa, H. Nishioka, Y. Kitahori et al., "Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in 313 paraffin section cases of human thyroid tissue," *Oncology*, vol. 50, no. 2, pp. 132–136, 1993.

[22] N. M. Diaz, G. Mazoujian, and M. R. Wick, "Estrogen receptor protein in thyroid neoplasms. An immunohistochemical analysis of papillary carcinoma, follicular carcinoma, and follicular adenoma," *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, vol. 115, no. 12, pp. 1203–1207, 1991.

[23] Y. Mizukami, T. Michigishi, A. Nonomura, T. Hashimoto, M. Noguchi, and F. Matsubara, "Estrogen and estrogen receptors in thyroid carcinomas," *Journal of Surgical Oncology*, vol. 47, no. 3, pp. 165–169, 1991.

[24] N. Takeichi, H. Ito, R. Haruta, T. Matsuyama, K. Dohi, and E. Tahara, "Relation between estrogen receptor and malignancy of thyroid cancer," *Japanese Journal of Cancer Research*, vol. 82, no. 1, pp. 19–22, 1991.

[25] G. S. Hong, I. T. Y. Sng, and K. C. Soo, "Oestrogen receptors in well differentiated thyroid cancers," *Annals of the Academy of Medicine Singapore*, vol. 20, no. 6, pp. 767–769, 1991.

[26] H. Miki, K. Oshimo, H. Inoue, T. Morimoto, and Y. Monden, "Sex hormone receptors in human thyroid tissues," *Cancer*, vol. 66, no. 8, pp. 1759–1762, 1990.

[27] R. Haruta, H. Ito, N. Takeichi, T. Matsuyama, K. Dohi, and E. Tahara, "An immunohistochemical study of estrogen receptors in thyroid carcinoma," *Gan No Rinsho*, vol. 36, no. 4, pp. 465–468, 1990.

[28] P. K. Chaudhuri and R. Prinz, "Estrogen receptor in normal and neoplastic human thyroid tissue," *American Journal of Otolaryngology*, vol. 10, no. 5, pp. 322–326, 1989.

[29] S. R. Money, W. Muss, W. L. Thelmo et al., "Immunocytochemical localization of estrogen and progesterone receptors in human thyroid," *Surgery*, vol. 106, no. 6, pp. 975–979, 1989.

[30] O. H. Clark, P. L. Gerend, and M. Davis, "Estrogen and thyroid-stimulating hormone (TSH) receptors in neoplastic and nonneoplastic human thyroid disease," *Journal of Surgical Research*, vol. 38, no. 2, pp. 89–96, 1985.

[31] M. Vaiman, Y. Olevson, L. Habler, A. Kessler, S. Zehavi, and J. Sandbank, "Diagnostic value of estrogen receptors in thyroid lesions," *Medical Science Monitor*, vol. 16, no. 7, pp. 203–207, 2010.

[32] A. Winters, P. Friedlander, B. M. Jaffe, M. A. Khalek, K. Moroz, and E. Kandil, "A postmenopausal woman with gross cystic disease fluid protein-15 and estrogen receptor-positive recurrence of papillary thyroid cancer," *Thyroid*, vol. 20, no. 12, pp. 1413–1417, 2010.

[33] G. Vannucchi, M. Perrino, S. Rossi et al., "Clinical and molecular features of differentiated thyroid cancer diagnosed during pregnancy," *European Journal of Endocrinology*, vol. 162, no. 1, pp. 145–151, 2010.

[34] M. A. Cho, M. K. Lee, K. H. Nam et al., "Expression and role of estrogen receptor α and β in medullary thyroid carcinoma: different roles in cancer growth and apoptosis," *Journal of Endocrinology*, vol. 195, no. 2, pp. 255–263, 2007.

[35] C. Bléchet, P. Lecomte, L. De Calan, P. Beutter, and S. Guyétant, "Expression of sex steroid hormone receptors in C cell hyperplasia and medullary thyroid carcinoma," *Virchows Archiv*, vol. 450, no. 4, pp. 433–439, 2007.

[36] G. Ceresini, S. Morganti, V. Graiani et al., "Estrogen receptor (ER)- β , but not ER- α , is present in thyroid vessels: immunohistochemical evaluations in multinodular goiter and papillary thyroid carcinoma," *Thyroid*, vol. 16, no. 12, pp. 1215–1220, 2006.

[37] A. Molteni, R. L. Warpeha, L. Brizio-Molteni, and E. M. Fors, "Estradiol receptor-binding protein in head and neck neoplastic and normal tissue," *Archives of Surgery*, vol. 116, no. 2, pp. 207–210, 1981.

[38] E. V. Jensen and E. R. DeSombre, "Estrogen receptor interaction," *Science*, vol. 182, no. 4108, pp. 126–134, 1973.

[39] S. Mosselman, J. Polman, and R. Dijkema, "ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor," *FEBS Letters*, vol. 392, no. 1, pp. 49–53, 1996.

[40] G. G. Chen, A. C. Vlantis, Q. Zeng, and C. A. Van Hasselt, "Regulation of cell growth by estrogen signaling and potential targets in thyroid cancer," *Current Cancer Drug Targets*, vol. 8, no. 5, pp. 367–377, 2008.

[41] A. M. Sotoca, H. Van den Berg, J. Vervoort et al., “Influence of cellular ER α /ER β ratio on the ER α -agonist induced proliferation of human T47D breast cancer cells,” *Toxicological Sciences*, vol. 105, no. 2, pp. 303–311, 2008.

[42] A. Kumar, C. M. Klinge, and R. E. Goldstein, “Estradiol induced proliferation of papillary and follicular thyroid cancer cells is mediated by estrogen receptors α and β ,” *International Journal of Oncology*, vol. 36, no. 5, pp. 1067–1080, 2010.

[43] S. Rajoria, R. Suriano, A. Shanmugam et al., “Metastatic phenotype is regulated by estrogen in thyroid cells,” *Thyroid*, vol. 20, no. 1, pp. 33–41, 2010.

[44] Q. Zeng, G. G. Chen, A. C. Vlantis, G. M. Tse, and C. A. Van Hasselt, “The contributions of oestrogen receptor isoforms to the development of papillary and anaplastic thyroid carcinomas,” *Journal of Pathology*, vol. 214, no. 4, pp. 425–433, 2008.

[45] Q. Zeng, G. G. Chen, A. C. Vlantis, and C. A. Van Hasselt, “Oestrogen mediates the growth of human thyroid carcinoma cells via an oestrogen receptor-ERK pathway,” *Cell Proliferation*, vol. 40, no. 6, pp. 921–935, 2007.

[46] A. Vivacqua, D. Bonofiglio, L. Albanito et al., “17 β -Estradiol, genistein, and 4-hydroxytamoxifen induce the proliferation of thyroid cancer cells through the G protein-coupled receptor GPR30,” *Molecular Pharmacology*, vol. 70, no. 4, pp. 1414–1423, 2006.

[47] M. L. Lee, G. G. Chen, A. C. Vlantis, G. M. K. Tse, B. C. H. Leung, and C. A. Van Hasselt, “Induction of thyroid papillary carcinoma cell proliferation by estrogen is associated with an altered expression of Bcl-xL,” *Cancer Journal*, vol. 11, no. 2, pp. 113–121, 2005.

[48] K. S. Banu, P. Govindarajulu, and M. M. Aruldas, “Testosterone and estradiol have specific differential modulatory effect on the proliferation of human thyroid papillary and follicular carcinoma cell lines independent of TSH action,” *Endocrine Pathology*, vol. 12, no. 3, pp. 315–327, 2001.

[49] T. W. Furlanetto, R. B. Nunes, A. M. I. Sopelsa, and R. M. B. Maciel, “Estradiol decreases iodide uptake by rat thyroid follicular FRTL-5 cells,” *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 34, no. 2, pp. 259–263, 2001.

[50] T. W. Furlanetto, L. Q. Nguyen, and J. L. Jameson, "Estradiol increases proliferation and down-regulates the sodium/iodide symporter gene in FRTL-5 cells," *Endocrinology*, vol. 140, no. 12, pp. 5705–5711, 1999.

[51] N. Nagy, I. Camby, C. Decaestecker et al., "The influence of L-triiodothyronine, L-thyroxine, estradiol-17 β , the luteinizing hormone-releasing hormone, the epidermal growth factor and gastrin on cell proliferation in organ cultures of 35 benign and 13 malignant human thyroid tumors," *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, vol. 125, no. 6, pp. 361–368, 1999.

[52] L. Del Senno, E. Degli Uberti, S. Hanau, R. Piva, R. Rossi, and G. Trasforini, "In vitro effects of estrogen on *tgb* and *c-myc* gene expression in normal and neoplastic human thyroids," *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 63, no. 1-2, pp. 67–74, 1989.

[53] K. Yang, C. E. Pearson, and N. A. Samaan, "Estrogen receptor and hormone responsiveness of medullary thyroid carcinoma cells in continuous culture," *Cancer Research*, vol. 48, no. 10, pp. 2760–2763, 1988.

[54] D. O. Kavanagh, M. McIlroy, E. Myers et al., "The role of oestrogen receptor α in human thyroid cancer: contributions from coregulatory proteins and the tyrosine kinase receptor HER2," *Endocrine-Related Cancer*, vol. 17, no. 1, pp. 255–264, 2010.

[55] C. Lee et al., "Estrogen receptors and glucocorticoid receptors in human well-differentiated thyroid cancer," *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 2, no. 2, pp. 229–233, 1998.

[56] C. Egawa, Y. Miyoshi, K. Iwao, E. Shiba, and S. Noguchi, "Quantitative analysis of estrogen receptor- α and - β messenger RNA expression in normal and malignant thyroid tissues by real-time polymerase chain reaction," *Oncology*, vol. 61, no. 4, pp. 293–298, 2001.

[57] T. Hoelting, S. Tezeman, A. E. Siperstein, Q. Y. Duh, and O.H. Clark, "Biphasic effects of thyrotropin on invasion and growth of papillary and follicular thyroid cancer in vitro," *Thyroid*, vol. 5, no. 1, pp. 35–40, 1995.

[58] V. Marsaud, A. Gougelet, S. Maillard, and J.-M. Renoir, "Various phosphorylation pathways, depending on agonist and antagonist binding to endogenous estrogen receptor α (ER α), differentially affect ER α extractability, proteasome mediated

stability, and transcriptional activity in human breast cancer cells,” *Molecular Endocrinology*, vol. 17, no. 10, pp. 2013–2027, 2003.

[59] M. Saji and M. D. Ringel, “The PI3K-Akt-mTOR pathway in initiation and progression of thyroid tumors,” *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 321, no. 1, pp. 20–28, 2010.

[60] L. Altucci, R. Addeo, L. Cicatiello et al., “17 β -estradiol induces cyclin D gene transcription, p36(D)-p34(cdk4) complex activation and p105(Rb) phosphorylation during mitogenic stimulation of G-arrested human breast cancer cells,” *Oncogene*, vol. 12, no. 11, pp. 2315–2324, 1996.

[61] S. Sporny, D. Slowinska-Klencka, and M. Ratynska, “Cyclin D1 expression in primary thyroid carcinomas,” *Neuroendocrinology Letters*, vol. 26, no. 6, pp. 815–818, 2005.

[62] Y. Shi, M. Zou, E. Varkondi, A. Nagy, L. Kozma, and N. R. Farid, “Cyclin D1 in thyroid carcinomas,” *Thyroid*, vol. 11, no. 7, pp. 709–710, 2001.

[63] F. Basolo, M. A. Caligo, A. Pinchera et al., “Cyclin D1 overexpression in thyroid carcinomas: relation with clinicopathological parameters, retinoblastoma gene product, and ki67 labeling index,” *Thyroid*, vol. 10, no. 9, pp. 741–746, 2000.

[64] D. Lazzereschi, L. Sambuco, C. Carnuvale Scalzo et al., “Cyclin D1 and cyclin E expression in malignant thyroid cells and in human thyroid carcinomas,” *International Journal of Cancer*, vol. 76, no. 6, pp. 806–811, 1998.

[65] S. Wang, R. V. Lloyd, M. J. Hutzler, M. S. Safran, N. A. Patwardhan, and A. Khan, “The role of cell cycle regulatory protein, cyclin D1, in the progression of thyroid cancer,” *Modern Pathology*, vol. 13, no. 8, pp. 882–887, 2000.

[66] M. L. C. Khoo, S. Ezzat, J. L. Freeman, and S. L. Asa, “Cyclin D1 protein expression predicts metastatic behavior in thyroid papillary microcarcinomas but is not associated with gene amplification,” *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 87, no. 4, pp. 1810–1813, 2002.

CAPÍTULO II

Receptores de Progesterona no Tecido Tireoidiano: uma Revisão Sistemática

Artigo submetido 9 de Dezembro de 2012 na Revista *European Thyroid Journal*

Progesterone Receptor in the Thyroid: a Systematic Review

Ana Paula Santin¹ and Tania Weber Furlanetto^{1,2}

1. Postgraduation Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

2. Internal Medicine Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Short title: Progesterone receptor and the thyroid gland

Corresponding author

Tania Weber Furlanetto

Rua Ramiro Barcelos 2350/700

Porto Alegre, RS, Brazil

90035-003

Telephone/Fax: 00 55 51 3359.8152

e-mail: taniafurlanetto@gmail.com; tfurlanetto@hcpa.ufrgs.br

Conflicts of interest: Both authors have no conflicts of interest.

Abstract

Thyroid cancer and thyroid nodules are more prevalent in women than men, and the incidence of thyroid cancer is increasing. As this increase appears to be larger in women, sex hormones may have an etiological role contributing to it. Progesterone effects on thyroid cells have not been described. The identification of progesterone receptor (PR) in the thyroid would be an important step to postulate an effect of progesterone in these cells, so the objective of this systematic review was to evaluate studies of PR in thyroid tissue. Progesterone receptor (PR) has been found in normal and diseased thyroid. The studies reviewed suggest that its positivity is higher in benign and well-differentiated carcinomas when compared to less differentiated tumors, nevertheless, technical reasons could have influenced the results.

Keywords: Thyroid; Receptors, Progesterone; Thyroid Cancer; Thyroid Nodules

Introduction

Thyroid nodules and thyroid cancer are more common in women (Mitchell et al., 2007; Vanderpump, 2011). The incidence rate of thyroid cancer is increasing, which could be due to better surveillance techniques. Nevertheless, other factors are probably involved because not only the incidence of small tumors increased, but also of larger ones. As the increase in incidence appears to be more rapid in women, sex hormones may have an etiological role contributing to thyroid cancer (Enewold et al., 2009).

A prospective cohort study demonstrated increased risk of thyroid cancer in young women with longer adolescent menstrual cycles, later menarche, and pregnancy ending within five years of the cohort enrollment (Horn-Ross et al., 2011). Others studies have shown an increased risk of thyroid cancer and thyroid nodules with higher body mass index (Engeland et al., 2006; Kim et al., 2012; Kitahara et al., 2011; Oh et al., 2005; Peterson et al., 2012).

A higher prevalence of nodular goiters was noted in women during and after pregnancy (Struve et al., 1993). During pregnancy, thyroid nodules increased in number and size (Kung et al., 2002); and thyroid cancer affected one in a thousand pregnant women, being the second most common type of cancer in pregnancy (Imran and Rajaraman, 2011). For each additional pregnancy the risk of developing cancer increased by 8 percent (Truong et al., 2005). These studies reinforced the hypotheses that sex hormones could have a role on the pathogenesis of these thyroid disorders. Several studies suggested a direct effect of estrogen on thyroid cells growth (Filardo et

al., 2000; Furlanetto et al., 1999; Kumar et al., 2010; Manole et al., 2001), but there are no studies of progesterone effects on thyroid cells.

In a randomized, double-blind, placebo-controlled study in healthy postmenopausal women, progesterone decreased slightly circulating levels of TSH (Caufriez et al., 2009). In addition, another study demonstrated decreased TSH levels in the early luteal phase, which could be due to higher levels of progesterone (Caufriez et al., 2011). These effects could be indirect or not. As progesterone effects are mainly mediated by its nuclear receptor (Kastner et al., 1990b), the aim of this review was to evaluate and compare the publications about progesterone receptors (PR) in the thyroid.

Search strategy

We searched for published articles indexed in PUBMED and EMBASE/MEDLINE through keywords in the title or abstract: "thyroid gland" [All Fields] OR "thyroid tissue"[All Fields] OR "thyroid cells" [All Fields] AND "progesterone receptor" [All Fields] AND ("humans"[MeSH Terms] OR "humans" [All Fields] OR "human" [All Fields]), in PubMed; ('progesterone receptor'/exp OR 'progesterone receptor') AND 'thyroid tissue', in EMBASE/MEDLINE. Full texts were read for possible inclusion. Three additional citations in other publications were also included.

Results and Discussion

After reviewing the 29 papers obtained in the search and three citations retrieved from manual search, 12 papers that examined PR status in the thyroid were included in this review (Figure 1).

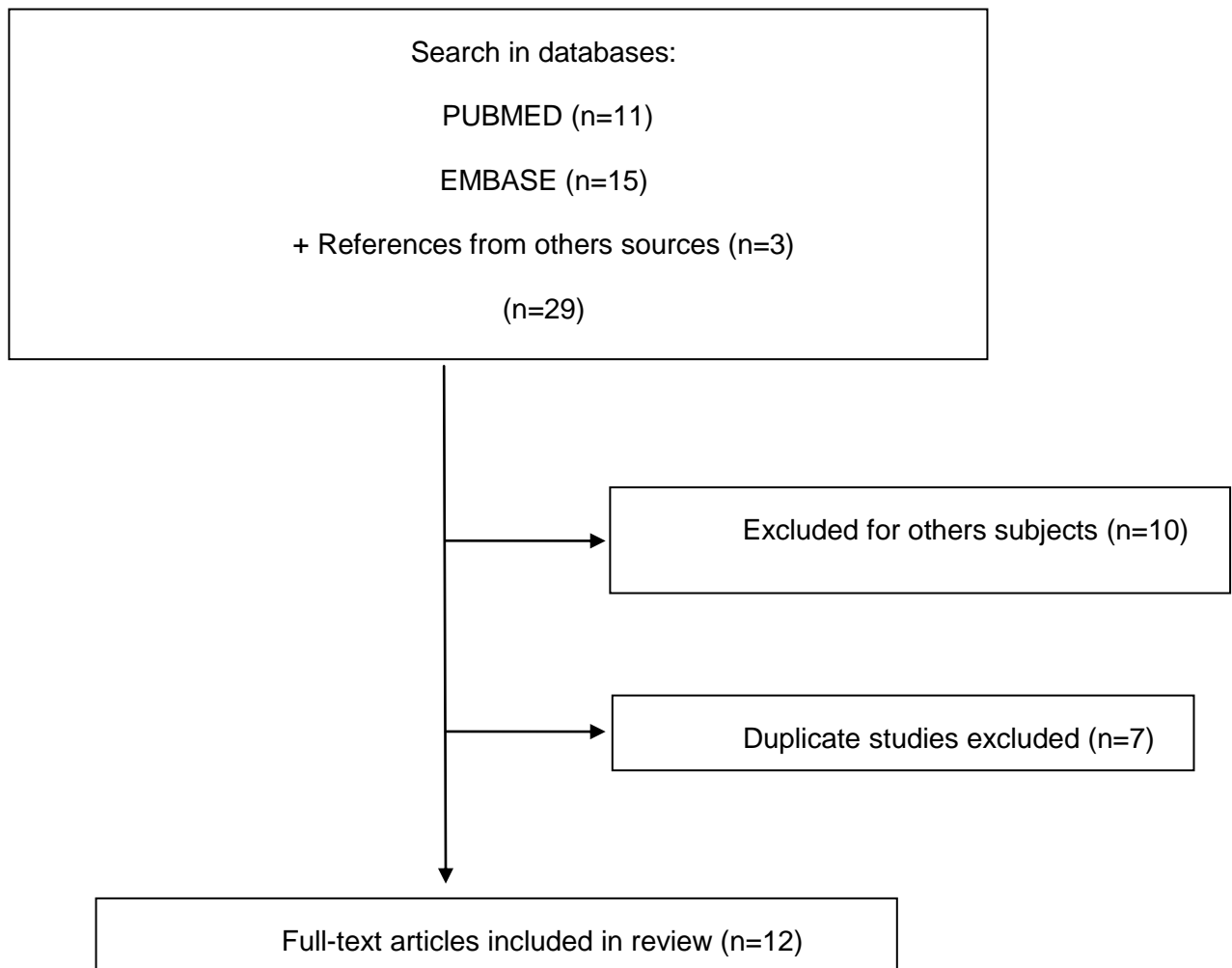


Figure 1: Identification of relevant articles. We searched the PUBMED and EMBASE database. 12 relevant studies describing PR status on thyroid tissue were retrieved and examined.

In Table 1 the main features and conclusions of the studies are summarized. Studies demonstrated no correlation between the PR status and age (Bur et al., 1993; Fei et al., 2011; Memon et al., 2005; Miki et al., 1990; Money et al., 1989), sex (Bur et al., 1993; Fei et al., 2011; Memon et al., 2005; Money et al., 1989), histopathologic

diagnosis (Bur et al., 1993; Fei et al., 2011; Money et al., 1989), or tumor size (Bur et al., 1993; Fei et al., 2011). The status of PR expression in normal thyroid or thyroid diseases were summarized in Table 1.

Table 1: Progesterone Receptors (PR) in human normal thyroid, nonneoplastic and neoplastic thyroid diseases.

Study, year	Country	Method	Normal	Benign lesions		Carcinoma				
				Adenoma	Goiter	Papillary	Follicular	Medullary	Anaplastic	
Bhargava, 2012	India	IHC				1/5 ^c ; 2/5 ^d	0/3	0/3		
Fei, 2011	China	IHC				66/83	7/9	5/6		2/3
Bléchet, 2007	France	IHC							2/28	
Memon, 2005	Pakistan	IHC	0/25	0/9	0/8	0/19	0/10	0/4		
Karlsson, 1997	Sweden	IHC				5/28				
Bonacci, 1996	Italy	EIA	11/20 ^a ; 8/18 ^b		15/18		7/20			
Colomer, 1996	Spain	EIA, IHC and DCC							5/7 ^e ; 7/7 ^f	
Jaklic, 1995	U.S.A.	IHC		0/5		0/5		0/1		
Bur, 1993	U.S.A.	IHC			0/2	13/39	1/5	0/3		0/3
Miki, 1990	Japan	DCC	0/5	0/6	3/9	0/3				0/1
Marugo, 1989	Italy	DCC	12/23 ^c ; 21/23 ^d	5/12 ^c ; 12/12 ^d	9/18 ^c ; 17/18 ^d					
Money, 1989	Austria	ICA			3/15					
Chaudhuri, 1986	U.S.A.	SDG	0/2	0/3	4/14	3/6				

Data are shown as number of PR positive samples/total number of samples. a: normal thyroid tissue surrounding cancer; b: normal thyroid tissue surrounding benign thyroid disease; c: PR in the cytosol fraction; d: PR in the nuclear fraction; e: by enzyme immune assay and dextran-coated charcoal assay; f: by immunohistochemistry assay; IHC: immunohistochemical assay; EIA: enzyme immune

assay; DCC: dextran-coated charcoal assay; ICA: immunocytochemical assay; SDG: sucrose density gradient assay.

In three studies PR were not found in normal thyroid tissue surrounding tumors (Chaudhuri et al., 1986; Memon et al., 2005; Miki et al., 1990), which could be due to the techniques employed or to the small sample numbers; as this protein probably has a low concentration in normal thyroid. This hypothesis is reinforced by studies that demonstrated very low PR protein levels in normal tissue: Bonacci showed concentrations ranging from 1.5 to 6 fmol/mg protein extracted from cytosolic fraction (Bonacci et al., 1996); and Marugo, evaluating PR presence in the cytoplasm and nucleus, found concentrations ranging, respectively, from 0.3 to 15.7 fmol/mg protein, and 31 to 186.3 fmol/mg DNA, (Marugo et al., 1989).

In thyroid adenomas, one study found PR expression (Marugo et al., 1989) while four studies were not able to detect PR (Chaudhuri et al., 1986; Jaklic et al., 1995; Memon et al., 2005; Miki et al., 1990). Again, the small number of cases analyzed and/or the sensitivity of the techniques employed could have underestimated the real prevalence of PR expression in these tissues.

Although two studies were unable to demonstrate PR in goiter (Bur et al., 1993; Memon et al., 2005), five others studies demonstrated a prevalence of PR positivity ranging from 20 to 94% (Bonacci et al., 1996; Chaudhuri et al., 1986; Marugo et al., 1989; Miki et al., 1990; Money et al., 1989).

Papillary thyroid carcinoma (PTC) is the most common type of thyroid cancer, occurring in around 80% of cases, and several studies evaluating PRs in this type of

tumor have been published. Three studies did not demonstrate PR, (Jaklic et al., 1995; Memon et al., 2005; Miki et al., 1990) while six others identified this receptor positivity ranging from 9 to 79% (Bhargava et al., 2012; Bonacci et al., 1996; Bur et al., 1993; Fei et al., 2011; Karlsson et al., 1997; Money et al., 1989). The findings obtained in the recent study by Fei and cols, evaluating the presence of PR in PTC, are instigating due to the number of cases analyzed as well as to the percentage of positive cases, as shown in Table 1(Fei et al., 2011). In the same study, 78% of PTC cases were positive for GPR30, a G-protein coupled receptor 30, that has been described to be up-regulated by progesterone (Ahola et al., 2002; Thomas et al., 2005).

Five studies evaluated the presence of PR in follicular thyroid carcinoma (Bhargava et al., 2012; Bonacci et al., 1996; Bur et al., 1993; Fei et al., 2011; Memon et al., 2005), and in three it was positive (Bonacci et al., 1996; Bur et al., 1993; Fei et al., 2011).

Medullary thyroid carcinoma (MTC) is uncommon (Ceolin et al., 2012; Kebebew et al., 2005). In three studies, which included the highest numbers of cases, PR were detected (Blechet et al., 2007; Colomer et al., 1996; Fei et al., 2011), while in four other studies the authors were not able to demonstrate the presence of this protein (Fei et al., 2011).

Anaplastic thyroid carcinomas (ATC) are the most aggressive thyroid tumors and in 7 cases studied, PR was identified in only two cases (Table 1).

Endometrial and breast tissues were the PR positive control most frequently used in the studies included in this review, and strong staining for PR was evident in both. Ideally, the positive control should have had a weak to moderate positivity for PR

expression, as thyroid tissue probably has low PR expression, since there is no gold standard assay available (Hammond et al., 2010). Karlsson et al. used vimentin as a control for evaluating antigen preservation after fixation or embedding (Karlsson et al., 1997).

In some studies PR nuclear staining was considered specific (Blechet et al., 2007; Bur et al., 1993; Colomer et al., 1996; Jaklic et al., 1995; Karlsson et al., 1997; Memon et al., 2005; Money et al., 1989). In three studies PR was considered positive with staining of nucleus and/or cytoplasm: Marugo observed more positive cases for PR in the nucleus (Marugo et al., 1989), while Fei and Bhargava found PR preferably expressed in the cytoplasm (Bhargava et al., 2012; Fei et al., 2011). Others studies evaluated PR only in the cytosol (Bonacci et al., 1996; Chaudhuri et al., 1986; Miki et al., 1990). It has been shown previously that PR are translocated from the cytoplasm to the nucleus in response to progesterone stimulation (Perrot-Appianat et al., 1992) and in this context, it seems reasonable to evaluate the receptor in both fractions.

The considerable variability in PR status in the thyroid could be explained, at least partially, by the assessment methods (Table 1). Colomer showed that immunohistochemistry (IHC) assays are more sensitive than steroid binding analysis and enzyme immune assay in the same samples (Colomer et al., 1996). IHC was the methodology more frequently used in the studies reviewed here, so the conflicting results could be due to variations in the sensitivity and protocols of this technique.

In conclusion, this systematic review demonstrated that PR is probably present in normal thyroid, as well as in benign and malignant thyroid diseases, so its presence

cannot be used to separate these conditions. Studies using more sensitive techniques could be useful to elucidate the prevalence of this protein in different thyroid diseases.

References

Ahola, T.M., Purmonen, S., Pennanen, P., Zhuang, Y.H., Tuohimaa, P., Ylikomi, T., 2002, Progesterin upregulates G-protein-coupled receptor 30 in breast cancer cells. *Eur J Biochem* 269, 2485-2490.

Bhargava, S., Bansal, R., Elhence, P., Pandey, S., Makkar, N., 2012, Cyto-Histological Correlation of Thyroid Lesions with Estrogen and Progesterone Receptor Status on Neoplastic Lesions. *JOURNAL of Clinical and Diagnostic Research* 6, 811-815.

Blechet, C., Lecomte, P., De Calan, L., Beutter, P., Guyetant, S., 2007, Expression of sex steroid hormone receptors in C cell hyperplasia and medullary thyroid carcinoma. *Virchows Arch* 450, 433-439.

Bonacci, R., Pinchera, A., Fierabracci, P., Gigliotti, A., Grasso, L., Giani, C., 1996, Relevance of estrogen and progesterone receptors enzyme immunoassay in malignant, benign and surrounding normal thyroid tissue. *J Endocrinol Invest* 19, 159-164.

Bur, M., Shiraki, W., Masood, S., 1993, Estrogen and progesterone receptor detection in neoplastic and non-neoplastic thyroid tissues. *Mod Pathol* 6, 469-472.

Caufriez, A., Leproult, R., L'Hermite-Baleriaux, M., Kerkhofs, M., Copinschi, G., 2011, Progesterone prevents sleep disturbances and modulates GH, TSH, and melatonin secretion in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 96, E614-623.

Caufriez, A., Leproult, R., L'Hermite-Baleriaux, M., Moreno-Reyes, R., Copinschi, G., 2009, A potential role of endogenous progesterone in modulation of GH, prolactin and thyrotrophin secretion during normal menstrual cycle. *Clin Endocrinol (Oxf)* 71, 535-542.

Ceolin, L., Siqueira, D.R., Romitti, M., Ferreira, C.V., Maia, A.L., 2012, Molecular Basis of Medullary Thyroid Carcinoma: The Role of RET Polymorphisms. *Int J Mol Sci* 13, 221-239.

Chaudhuri, P.K., Patel, N., Sandberg, L., Prinz, R.A., 1986, Distribution and characterization of steroid hormone receptors in human thyroid tissue. *World J Surg* 10, 737-744.

Colomer, A., Martinez-Mas, J.V., Matias-Guiu, X., Llorens, A., Cabezas, R., Prat, J., Garcia-Ameijeiras, A., 1996, Sex-steroid hormone receptors in human medullary thyroid carcinoma. *Mod Pathol* 9, 68-72.

Enewold, L., Zhu, K., Ron, E., Marrogi, A.J., Stojadinovic, A., Peoples, G.E., Devesa, S.S., 2009, Rising thyroid cancer incidence in the United States by demographic and tumor characteristics, 1980-2005. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18, 784-791.

Engeland, A., Tretli, S., Akslen, L.A., Bjorge, T., 2006, Body size and thyroid cancer in two million Norwegian men and women. *Br J Cancer* 95, 366-370.

Fei, L., Haojun, L., Ping, L., Guanglun, Y., Gang, T., 2011, Expression of GPR30, ER α and PR in thyroid carcinoma tissues and their association with thyroid carcinoma. *Journal of Third Military Medical University* 33, 1691-1694.

Filardo, E.J., Quinn, J.A., Bland, K.I., Frackelton, A.R., Jr., 2000, Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol* 14, 1649-1660.

Furlanetto, T.W., Nguyen, L.Q., Jameson, J.L., 1999, Estradiol increases proliferation and down-regulates the sodium/iodide symporter gene in FRTL-5 cells. *Endocrinology* 140, 5705-5711.

Hammond, M.E., Hayes, D.F., Dowsett, M., Allred, D.C., Hagerty, K.L., Badve, S., Fitzgibbons, P.L., Francis, G., Goldstein, N.S., Hayes, M., Hicks, D.G., Lester, S., Love, R., Mangu, P.B., McShane, L., Miller, K., Osborne, C.K., Paik, S., Perlmutter, J., Rhodes, A., Sasano, H., Schwartz, J.N., Sweep, F.C., Taube, S., Torlakovic, E.E.,

Valenstein, P., Viale, G., Visscher, D., Wheeler, T., Williams, R.B., Wittliff, J.L., Wolff, A.C., 2010, American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol* 28, 2784-2795.

Horn-Ross, P.L., Canchola, A.J., Ma, H., Reynolds, P., Bernstein, L., 2011, Hormonal factors and the risk of papillary thyroid cancer in the California Teachers Study cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 20, 1751-1759.

Imran, S.A., Rajaraman, M., 2011, Management of differentiated thyroid cancer in pregnancy. *J Thyroid Res* 2011, 549609.

Jaklic, B.R., Rushin, J., Ghosh, B.C., 1995, Estrogen and progesterone receptors in thyroid lesions. *Ann Surg Oncol* 2, 429-434.

Karlsson, M.G., Hardell, L., Hallquist, A., 1997, No association between immunohistochemical expression of p53, c-erbB-2, Ki-67, estrogen and progesterone receptors in female papillary thyroid cancer and ionizing radiation. *Cancer Lett* 120, 173-177.

Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H., Chambon, P., 1990, Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J* 9, 1603-1614.

Kebebew, E., Greenspan, F.S., Clark, O.H., Woeber, K.A., McMillan, A., 2005, Anaplastic thyroid carcinoma. Treatment outcome and prognostic factors. *Cancer* 103, 1330-1335.

Kim, J.Y., Jung, E.J., Park, S.T., Jeong, S.H., Jeong, C.Y., Ju, Y.T., Lee, Y.J., Hong, S.C., Choi, S.K., Ha, W.S., 2012, Body size and thyroid nodules in healthy Korean population. *J Korean Surg Soc* 82, 13-17.

Kitahara, C.M., Platz, E.A., Freeman, L.E., Hsing, A.W., Linet, M.S., Park, Y., Schairer, C., Schatzkin, A., Shikany, J.M., Berrington de Gonzalez, A., 2011, Obesity and thyroid cancer risk among U.S. men and women: a pooled analysis of five prospective studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 20, 464-472.

Kumar, A., Klinge, C.M., Goldstein, R.E., 2010, Estradiol-induced proliferation of papillary and follicular thyroid cancer cells is mediated by estrogen receptors alpha and beta. *Int J Oncol* 36, 1067-1080.

Kung, A.W., Chau, M.T., Lao, T.T., Tam, S.C., Low, L.C., 2002, The effect of pregnancy on thyroid nodule formation. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 1010-1014.

Manole, D., Schildknecht, B., Gosnell, B., Adams, E., Derwahl, M., 2001, Estrogen promotes growth of human thyroid tumor cells by different molecular mechanisms. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 1072-1077.

Marugo, M., Torre, G., Bernasconi, D., Fazzuoli, L., Berta, S., Giordano, G., 1989, Thyroid and steroid receptors. *J Endocrinol Invest* 12, 565-570.

Memon, G.R., Arain, S.A., Jamal, Q., Ansari, T., 2005, Immunohistochemical study of progesterone receptors in thyroid gland. *J Pak Med Assoc* 55, 321-324.

Miki, H., Oshimo, K., Inoue, H., Morimoto, T., Monden, Y., 1990, Sex hormone receptors in human thyroid tissues. *Cancer* 66, 1759-1762.

Mitchell, I., Livingston, E.H., Chang, A.Y., Holt, S., Snyder, W.H., 3rd, Lingvay, I., Nwariaku, F.E., 2007, Trends in thyroid cancer demographics and surgical therapy in the United States. *Surgery* 142, 823-828; discussion 828 e821.

Money, S.R., Muss, W., Thelmo, W.L., Boeckl, O., Pimpl, W., Kaindl, H., Sungler, P., Kirwin, J., Waclawicek, H., Jaffe, B.M., et al., 1989, Immunocytochemical localization of estrogen and progesterone receptors in human thyroid. *Surgery* 106, 975-978; discussion 979.

Oh, S.W., Yoon, Y.S., Shin, S.A., 2005, Effects of excess weight on cancer incidences depending on cancer sites and histologic findings among men: Korea National Health Insurance Corporation Study. *J Clin Oncol* 23, 4742-4754.

Pacini, F., Castagna, M.G., Brilli, L., Pentheroudakis, G., 2010, Thyroid cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 21 Suppl 5, v214-219.

Perrot-Appanat, M., Lescop, P., Milgrom, E., 1992, The cytoskeleton and the cellular traffic of the progesterone receptor. *J Cell Biol* 119, 337-348.

Peterson, E., De, P., Nuttall, R., 2012, BMI, diet and female reproductive factors as risks for thyroid cancer: a systematic review. *PLoS One* 7, e29177.

Struve, C.W., Haupt, S., Ohlen, S., 1993, Influence of frequency of previous pregnancies on the prevalence of thyroid nodules in women without clinical evidence of thyroid disease. *Thyroid* 3, 7-9.

Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E.J., Dong, J., 2005, Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* 146, 624-632.

Truong, T., Orsi, L., Dubourdieu, D., Rougier, Y., Hemon, D., Guenel, P., 2005, Role of goiter and of menstrual and reproductive factors in thyroid cancer: a population-based case-control study in New Caledonia (South Pacific), a very high incidence area. *Am J Epidemiol* 161, 1056-1065.

Vanderpump, M.P., 2011, The epidemiology of thyroid disease. *Br Med Bull* 99, 39-51.

CAPÍTULO III

Padronização de um Modelo de Cultura Primária de Células Foliculares de Tireoide Humana

Dissociação enzimática e condições de cultivo

O isolamento das células foliculares a partir do tecido que constitui a glândula tireoide já foi descrito em estudos anteriores (Chambard et al., 1983; Nitsch and Wollman, 1980; Roger and Dumont, 1984) e representa um modelo de alta correspondência tanto bioquímica como funcional com o tecido original.

Em nosso modelo, a digestão enzimática do tecido tireoidiano, realizada com 2,5 mg/mL da enzima colagenase Tipo I, foi adequada para isolar as células foliculares do tecido conjuntivo, conforme observado na Figura 5.

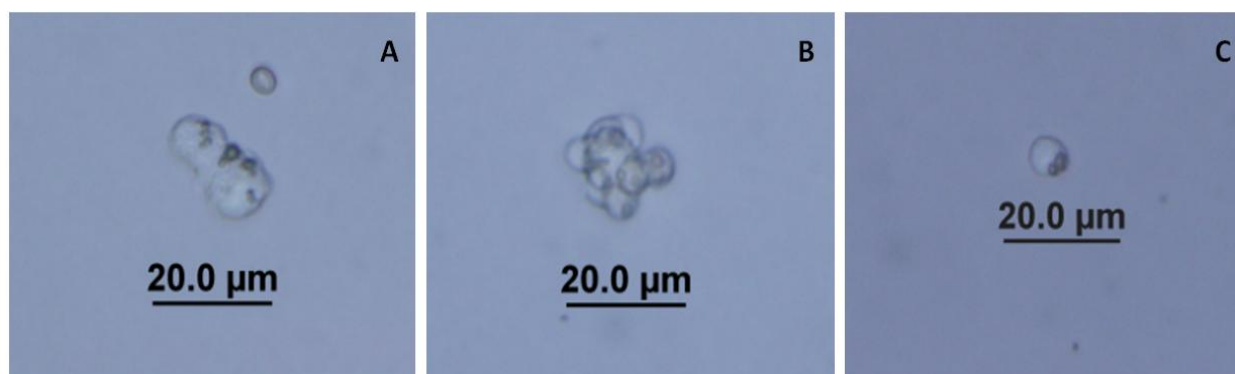


Figura 5 - A e B, onde podem ser visualizados aglomerados de células foliculares da tireoide após digestão e, em C, uma única célula folicular isolada.

As células foliculares da tireoide aderiram facilmente nas placas de seis e 24 poços, mesmo utilizando-se diferentes marcas como TPP®, Corning® e Started®. Sabe-se que diferentes marcas apresentam diferentes composições e combinações de substratos carregados negativamente que auxiliam a adesão celular sendo que fibronectina, colágeno e laminina estão entre os substratos mais utilizados (Kleinman et al., 1987).

Os meios DMEM, 199 e Ham's F12 Coon's modificado (F12) foram testados sendo que o meio F12 apresentou melhores resultados em relação à adesão e à manutenção morfológica das células foliculares da tireoide.

Os suplementos utilizados no nosso modelo *in vitro*, foram obtidos do estudo prévio de Furlanetto e cols em 1999, o qual visou manter as células foliculares em condições fisiológicas semelhantes às encontradas na glândula da tireoide humana. Além do soro bovino fetal, os suplementos glutamina, transferrina e TSH foram utilizados em nosso modelo.

A importância da L-glutamina para sobrevivência celular e a proliferação *in vitro* foi primeiramente descrita em 1949 (Ehrensvarð et al., 1949) e melhor elucidada em 1956 (Eagle et al., 1956), onde foi demonstrada atuar como precursor na síntese de peptídeos e de proteínas, purina e pirimidina, ácidos nucleicos e nucleotídeos, e também fornecendo carbonos de sua estrutura para reações de oxidação intracelular. A presença da transferrina é importante para manter o aporte de ferro para a célula, auxiliando a célula a manter a homeostase e a regular a quantidade de ferro absorvida do meio extracelular (Bomford and Munro, 1985). A insulina possui ação mitogênica e permite a ação proliferativa do TSH nas células da tireoide, (Burikhanov et al., 1996; Van Keymeulen et al., 2000). O papel essencial do TSH na manutenção da função e morfologia das células foliculares da tireoide foi previamente revisado na introdução desta tese.

As culturas utilizadas apresentavam morfologia característica, com presença de poucos fibroblastos e sem contaminação microbiológica ou química evidentes.

Após 2 horas em cultura, as células foliculares da tireoide se encontravam parcialmente aderidas e em 24 horas já se podia observar a morfologia característica destas células. O fenótipo e a confluência das células em cultura foram acompanhados por microscopia. As células epiteliais crescem em monocamadas, formando ilhas de alta densidade celular a partir de um aglomerado ou mesmo de uma única célula (Figura 6).

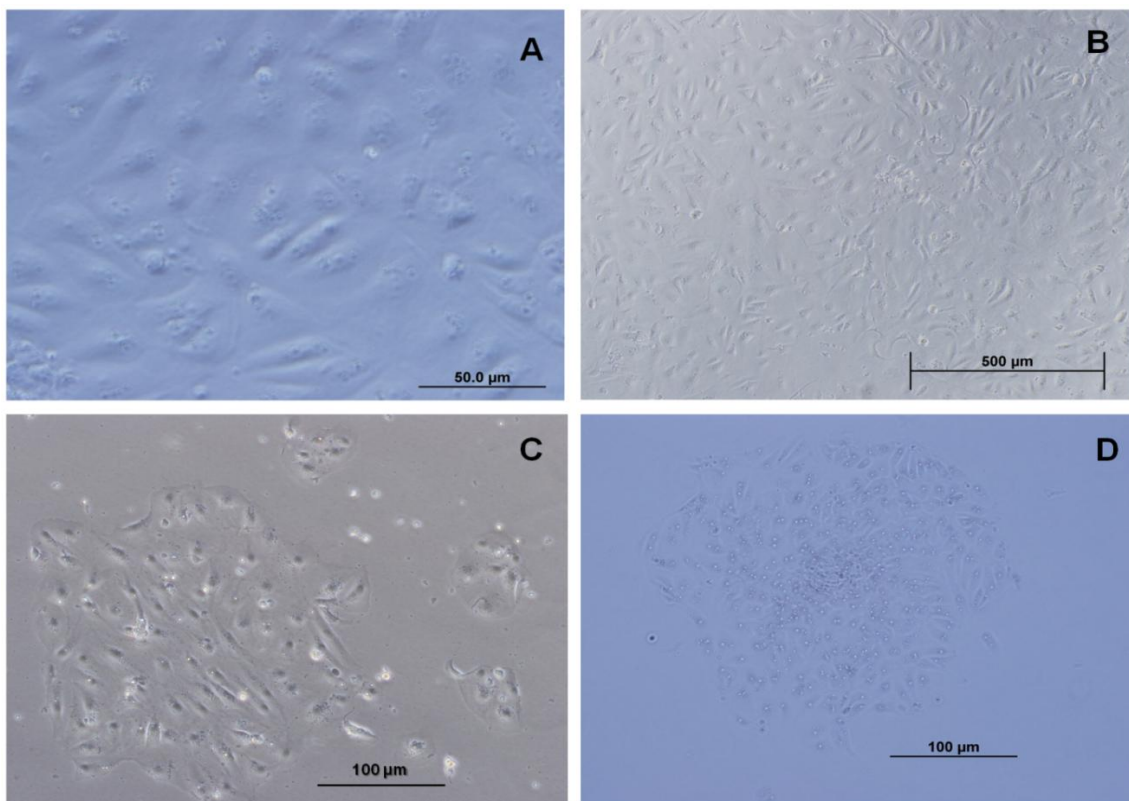


Figura 6 - Imagens obtidas por microscópio invertido de contraste de fase de células foliculares da tireoide, demonstrando sua morfologia característica em monocamada em diferentes escalas e estágios de confluência.

A célula folicular isolada apresenta um formato cuboide (Figura 7.A) ou semelhante ao formato de gota (Figura 7.B), com presença de vacúolos ao redor do

núcleo, sendo características igualmente observadas em estudos prévios de cultura primária de células foliculares de tireoide (Roger and Dumont, 1984).

Não obtivemos sucesso na tentativa de tripsinizar as células foliculares para passagens consecutivas, pois embora apresentassem boa adesão, a formação das ilhas em monocamadas e a morfologia regular da célula epitelial raramente foram observadas (Figura 7.C).

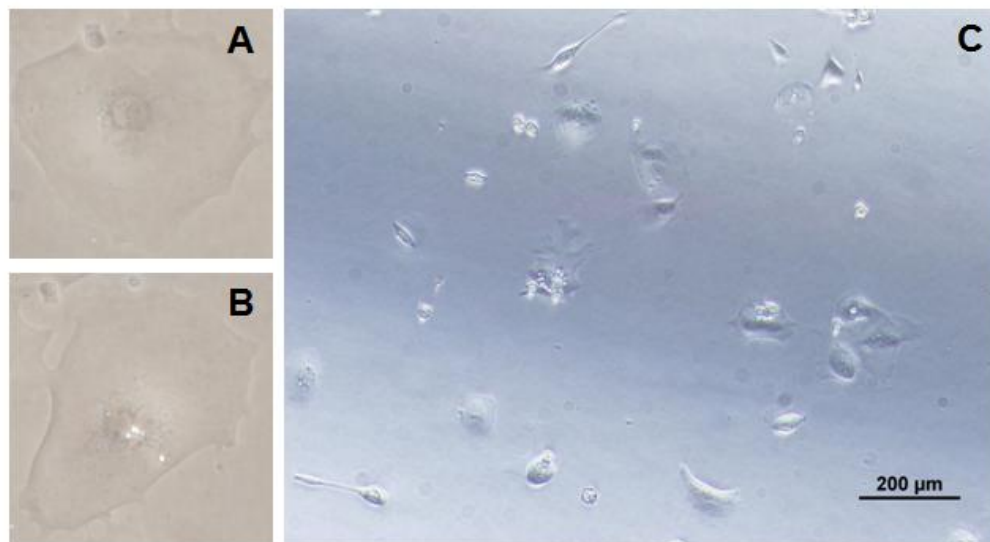


Figura 7 - Morfologia característica em ampliação maior das células foliculares da tireoide em formato cuboide (A) e em formato de gota (B) e a perda da morfologia 3 dias após tripsinização (C).

Padrão de distribuição dos filamentos de F-actina e α -tubulina nas células foliculares da tireoide em cultura primária

Para melhor conhecermos a morfologia das células foliculares da tireoide, avaliamos o padrão de distribuição dos microtúbulos e os microfilamentos do citoesqueleto dessas células pela técnica de imunocitoquímica de fluorescência.

Os microtúbulos, que são polímeros de tubulina, organizados a partir da região perinuclear em direção à periferia, são responsáveis por condicionar a forma celular (Infanger et al., 2006) e, como podemos observar na Figura 8.A e 8.B, a distribuição destes filamentos concentram-se na região perinuclear.

Os microfilamentos de actina determinam a forma da membrana plasmática e participam da geração de forças contráteis (Alberts et al., 2002; Etienne-Manneville, 2004). A presença do TSH no meio é necessária para manter o formato cubóide da célula (Figura 8.C e 8.D) e sua ausência leva ao aumento das fibras de stress de actina (Passareiro et al., 1985; Roger and Dumont, 1984).

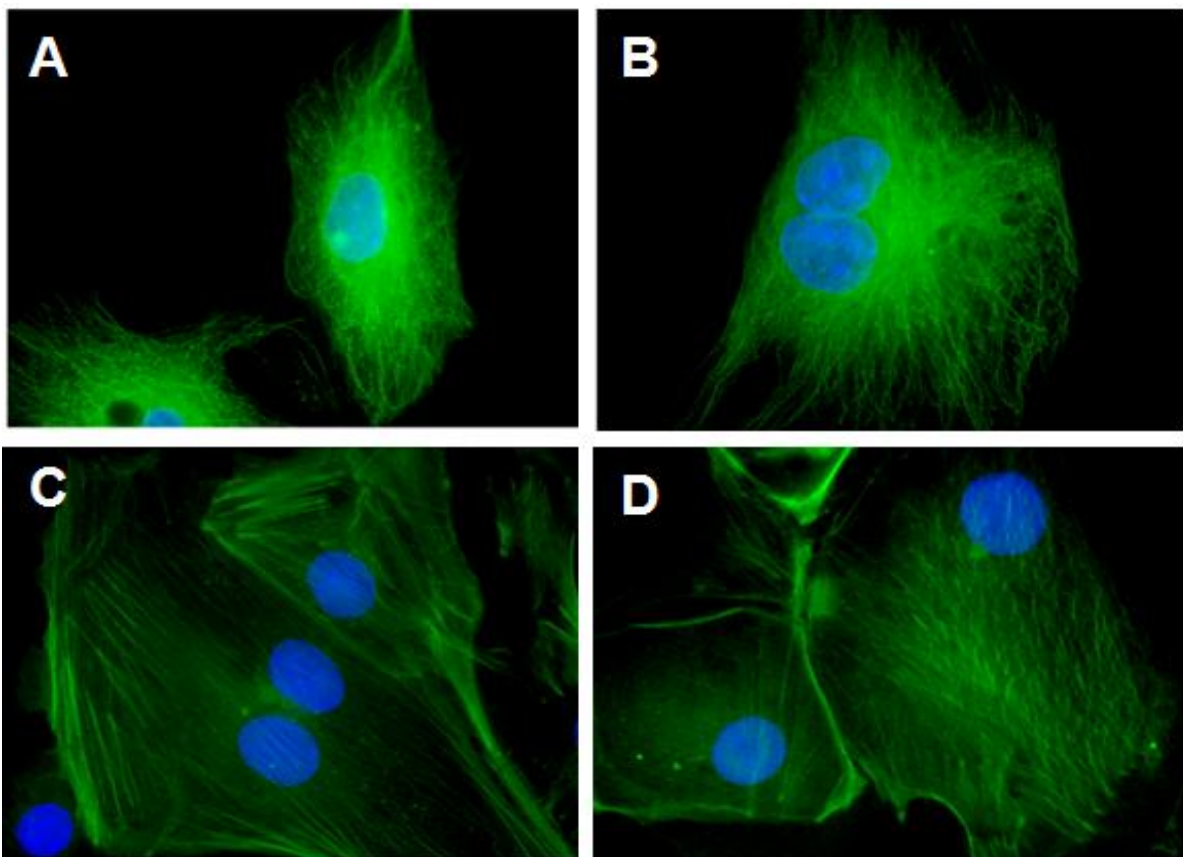


Figura 8 - Análise das proteínas α -tubulina (A e B) e F-actina (C e D) das células foliculares da tireoide em aumento de 1000x.

Os filamentos de actina foram marcados por meio da reação com faloidina conjugada com isotiocianato de fluoresceína, a qual nos permitiu observar que os filamentos de actina se distribuem de forma organizada e homogênea por toda a célula folicular, revelando seu formato característico cuboide ou em forma de gota.

Manutenção da diferenciação das células foliculares da tireoide

O meio utilizado permitiu, além da manutenção da morfologia, que a célula tireoidiana permanecesse com sua função diferenciada, a qual foi avaliada pela presença das proteínas específicas TG e TPO (Figura 9), bem como pela dosagem de tireoglobulina e T_4 livre no sobrenadante das culturas (Tabela 3).

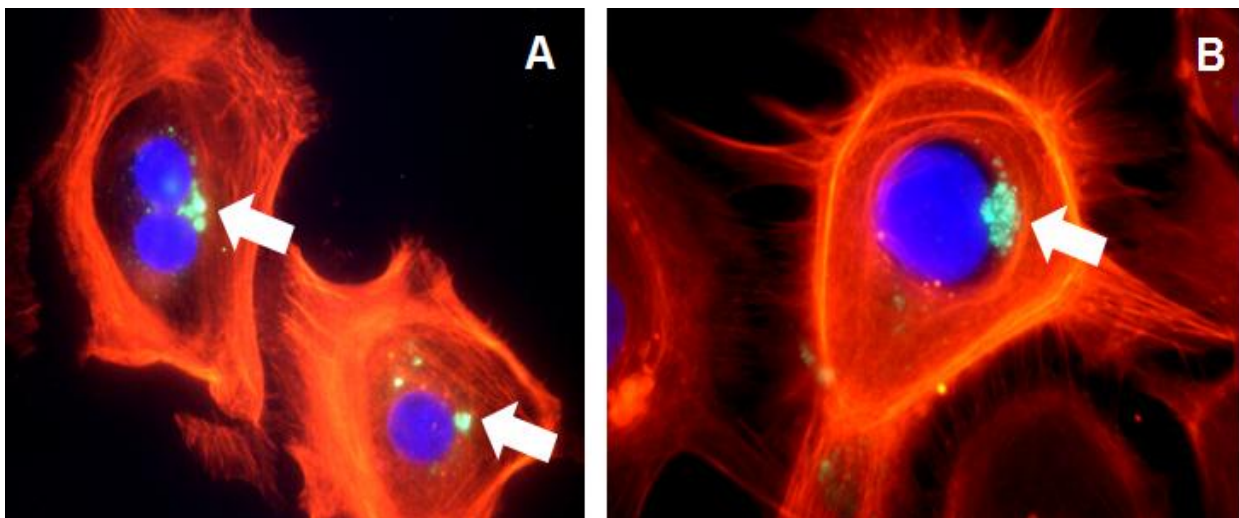


Figura 9 - Localização intracelular das proteínas por tireoglobulina (A) e tireoperoxidase (B) (indicadas por setas, em verde). Os microfilamentos de actina foram marcados com faloidina (em vermelho) e o núcleo com DAPI (em azul). Aumento de 1000x.

Para marcação das proteínas TG e TPO, as células semeadas em lamínulas de vidro foram fixadas, permeabilizadas e incubadas com anticorpos primários

específicos contra TG e TPO com posterior dupla marcação com as fibras de actina e com DAPI (Figura 9).

Na Figura 9, observa-se que tanto TPO como TG parecem estar próximas ao núcleo. Na glândula íntegra, as células foliculares apresentam a TPO na região apical, face que fica voltada para o lúmen folicular. Sabe-se que, em cultura, as células foliculares da tireoide perdem a polaridade, porém não perdem a diferenciação. Alguns autores sugerem que no cultivo em monocamadas, a parte apical da célula fique voltada para o meio enquanto a parte basal permaneceria aderida na placa de cultura (Toda et al., 2011). Ainda, vale ressaltar que as imagens obtidas pela técnica de imunocitoquímica, obtidas pelo microscópio óptico, representam uma superposição de planos, e, sendo assim, a TPO pode estar de fato na região apical da célula folicular.

Tabela 3 - Dosagem de T₄ livre e tireoglobulina (TG) em sobrenadante coletado no último dia de tratamento para avaliar a viabilidade e a diferenciação das células foliculares da tireoide.

	T₄ livre (ng/dL)	TG (ng/mL)
Cultura 1	1,54	2,66
Cultura 2	2,17	9,78
Cultura 4	1,68	196,00
Cultura 5	1,39	14,70
Cultura 6	1,58	71,10

Avaliando a dosagem de TG, observaram-se níveis variando de 2,66 a 196,00 ng/mL (n=5), enquanto os níveis de variação do T₄ livre apresentaram uma variação de 1,54 a 2,17 ng/dL (n=5). A coleta foi realizada sempre no último dia de tratamento. Cada "n" representa uma cultura independente e foi proveniente de diferentes pacientes (Tabela 1). Embora a variação das dosagens de T₄ livre e TG tenha sido alta, é importante ressaltar que somente as células epiteliais da tireoide são capazes de sintetizar esses hormônios.

Trabalhos na literatura descrevem que a insulina em baixas concentrações, mesmo na ausência de TSH, é capaz de aumentar a síntese de TG (Deleu et al., 1999; Kimura et al., 2001). Neste contexto, notamos que, após 48 horas mesmo na ausência de TSH as células foliculares ainda apresentaram produção de TG, fato que poderia estar associado à estimulação pelo soro bovino fetal e pela insulina. Embora o modelo em monocamadas e a falta de suplementação com iodo não represente um modelo adequado para avaliação da síntese dos hormônios tireoidianos, vale ressaltar que a dosagem desses hormônios foi utilizada somente para avaliarmos a viabilidade funcional das células em cultura e garantir que estas células estivessem diferenciadas até o fim dos experimentos.

Futuros estudos com células foliculares normais cultivadas em matrizes tridimensionais e com a suplementação de iodo são necessários para acompanhar a cinética da TG e do T₄ livre desde o estímulo até síntese final, bem como para validar e caracterizar as condições ideais de todo processamento analítico para avaliação desses hormônios, desde a coleta até a dosagem final.

Referências

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002, *Molecular Biology of The Cell 4 Edition* Nova York, 982 p.

Bomford, A.B., Munro, H.N., 1985, Transferrin and its receptor: their roles in cell function. *Hepatology* 5, 870-875.

Burikhanov, R., Coulonval, K., Pirson, I., Lamy, F., Dumont, J.E., Roger, P.P., 1996, Thyrotropin via cyclic AMP induces insulin receptor expression and insulin Co-stimulation of growth and amplifies insulin and insulin-like growth factor signaling pathways in dog thyroid epithelial cells. *J Biol Chem* 271, 29400-29406.

Chambard, M., Verrier, B., Gabrion, J., Mauchamp, J., 1983, Polarization of thyroid cells in culture: evidence for the basolateral localization of the iodide "pump" and of the thyroid-stimulating hormone receptor-adenyl cyclase complex. *J Cell Biol* 96, 1172-1177.

Deleu, S., Pirson, I., Coulonval, K., Drouin, A., Taton, M., Clermont, F., Roger, P.P., Nakamura, T., Dumont, J.E., Maenhaut, C., 1999, IGF-1 or insulin, and the TSH cyclic AMP cascade separately control dog and human thyroid cell growth and DNA synthesis, and complement each other in inducing mitogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 149, 41-51.

Eagle, H., Oyama, V.I., Levy, M., Horton, C.L., Fleischman, R., 1956, The growth response of mammalian cells in tissue culture to L-glutamine and L-glutamic acid. *J Biol Chem* 218, 607-616.

Ehrensvar, G., Fischer, A., Stjernholm, R., 1949, Protein metabolism of tissue cells in vitro; the chemical nature of some obligate factors of tissue cell nutrition. *Acta Physiol Scand* 18, 218-230.

Etienne-Manneville, S., 2004, Actin and microtubules in cell motility: which one is in control? *Traffic* 5, 470-477.

Infanger, M., Kossmehl, P., Shakibaei, M., Bauer, J., Kossmehl-Zorn, S., Cogoli, A., Curcio, F., Oksche, A., Wehland, M., Kreutz, R., Paul, M., Grimm, D., 2006,

Simulated weightlessness changes the cytoskeleton and extracellular matrix proteins in papillary thyroid carcinoma cells. *Cell Tissue Res* 324, 267-277.

Kimura, T., Van Keymeulen, A., Golstein, J., Fusco, A., Dumont, J.E., Roger, P.P., 2001, Regulation of thyroid cell proliferation by TSH and other factors: a critical evaluation of in vitro models. *Endocr Rev* 22, 631-656.

Kleinman, H.K., Luckenbill-Edds, L., Cannon, F.W., Sephel, G.C., 1987, Use of extracellular matrix components for cell culture. *Anal Biochem* 166, 1-13.

Nitsch, L., Wollman, S.H., 1980, Suspension culture of separated follicles consisting of differentiated thyroid epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 472-476.

Passareiro, H., Roger, P.P., Lamy, F., Lecocq, R., Dumont, J.E., Nunez, J., 1985, Thyrotropin modifies the synthesis of actin and other proteins during thyroid cell culture. *Eur J Biochem* 147, 263-272.

Roger, P.P., Dumont, J.E., 1984, Factors controlling proliferation and differentiation of canine thyroid cells cultured in reduced serum conditions: effects of thyrotropin, cyclic AMP and growth factors. *Mol Cell Endocrinol* 36, 79-93.

Toda, S., Aoki, S., Uchihashi, K., Matsunobu, A., Yamamoto, M., Ootani, A., Yamasaki, F., Koike, E., Sugihara, H., 2011, Culture models for studying thyroid biology and disorders. *ISRN Endocrinol* 2011, 275782.

Van Keymeulen, A., Dumont, J.E., Roger, P.P., 2000, TSH induces insulin receptors that mediate insulin costimulation of growth in normal human thyroid cells. *Biochem Biophys Res Commun* 279, 202-207.

CAPÍTULO IV

***Validação de um Gene de Referência para a Normalização da
Expressão Gênica por PCR Quantitativa em Tempo Real em Células
Foliculares de Tireoide Humana em Cultura Primária Tratadas com
Progesterona e Estradiol***

Artigo publicado 6 de Junho de 2012 na Revista *Molecular Biotechnology*

DOI:10.1007/s12033-012-9565-0

Validation of Reference Genes for Normalizing Gene Expression in Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR in Human Thyroid Cells in Primary Culture Treated with Progesterone and Estradiol

Ana Paula Santin¹, Aline Francielle Damo Souza², Ilma Simoni Brum³, Tania Weber Furlanetto¹

¹ Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CEP: 90035-903, Rua Ramiro Barcelos, 2350/700, Porto Alegre, RS, Brasil.

² Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

³ Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Short title: reference gene and human thyroid cells

Corresponding author

Tania Weber Furlanetto

Rua Ramiro Barcellos 2350/700

Porto Alegre, RS, Brazil

90035-903

Telephone: 00 55 51 3359.8152

Fax: 00 55 51 3359.8152

e-mail: taniafurlanetto@gmail.com

Abstract

The use of appropriately chosen reference genes for normalizing gene expression in real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction is an important step in the analysis of gene expression, compensating for several technical factors. As female sex hormones have been shown to influence growth and differentiation of thyroid follicular cells, the establishment of normalizer genes in human thyroid cells in primary culture, treated with progesterone, and estradiol, is important to evaluate their effect on gene expression in these cells, so candidate reference genes were studied. β -Actin, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), b2-microglobulin (B2M), and TATA box binding protein (TBP) were evaluated in thyroid cells treated with estradiol, progesterone, and their inhibitors. Normfinder software was used to assess the stability of the genes and identified b-actin as the gene with adequate stability and lower inter-group variations, when compared to TBP, B2M, and GAPDH.

Keywords: Real time qRT-PCR, Primary cell culture, Thyroid, Gene expression, Estradiol, Progesterone.

Introduction

Estradiol has been shown to affect both growth and function in rat thyroid cells or abnormal human thyroid cells by modulating the expression of genes such as the sodium/iodide symporter (NIS) [1, 2], thyroglobulin (TG) [3], and thyroperoxidase (TPO) genes [4, 5]. The signaling mechanisms involved in these actions are still unknown [6, 7]. Estradiol-induced thyroid cell proliferation is probably mediated by genes responsible for regulating one or more stages of this process, as cyclin D1 [8], and proto-oncogene c-fos [6]. So far, there are no data regarding the effects of estradiol, and progesterone in vitro in human normal thyroid cells, although their receptors have been identified in these cells [9, 10].

Real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) is the most sensitive and specific method for assessing gene expression [11], although normalizing this method has been widely discussed recently [12–16]. Normalization of a target gene expression is performed to compensate for several technical factors, such as quality of RNA extraction, RNA purity, poor efficiency of the synthesis of complementary DNA (cDNA), inaccurate quantification of RNA sample, and variability of pipetting [17]. Thus, the choice of an appropriate reference gene for each experiment is a crucial point in the analysis of gene expression.

Software programs, Normfinder [12], GeNorm [18], and Bestkeeper [19], have been used for choosing reference genes. In this context, this study aimed to evaluate the most stable reference gene in human thyroid cells in primary culture treated with progesterone and estradiol, and its inhibitors.

Materials and Methods

Tissue Acquisition

Normal human thyroid tissue was obtained from patients who underwent total thyroidectomy as part of treatment for differentiated thyroid cancer in the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). After macroscopic and frozen sections evaluation of surgical specimens by two pathologists, some of the tissue was treated to obtain

thyroid cells. This study was approved by the Ethics Committee of HCPA (GPPG: 08-454).

Isolation of Primary Epithelial Human Thyroid Cells

Thyroid tissue was cut in fragments of about 1 mm³ and digested by 3 mg/ml collagenase type I in Hank's solution (GIBCO, Grand Island, NY, USA), for 2 h at 37°C with gentle shaking. The suspension of cells was sequentially filtered through nylon meshes with 250, 150, and 60 µm pore size. The filtered fraction, containing epithelial thyroid cells, was resuspended in Ham's F-12 Coon's modification medium and seeded in 35-mm Petri dishes at a density of 1.9 × 10⁶ cells/cm². Cells were maintained in the same medium supplemented with 10 % fetal bovine serum, 10 µg/ml insulin, 5 µg/ml transferrin, 1 mU/ml TSH, and 100 U/ml kanamycin (3H medium). Cells were kept at 37°C in 5 % CO₂, with a medium change every 48 h. All reagents were obtained from Sigma Aldrich Co, St. Louis, MO, USA, unless stated otherwise.

When cells were approximately 80 % confluent, they were deprived of TSH for 48 h (3H medium without TSH: 2H medium), and treated with progesterone or estrogen in the presence or absence, respectively, of mifepristone (progesterone antagonist, Sigma Aldrich) or ICI 182780 (antagonist of estradiol, I.C.I. Pharmaceuticals, Macclesfield Cheshire, UK). As there is no published study evaluating the effect of progesterone in human thyroid cells in vitro, three different concentrations of this hormone were tested: 1, 10, and 100 nM. 17β-Estradiol was studied at 10 nM, as described previously [1]. Thus, eight groups were treated, as follows: G1, 2H medium; G2, 2H medium + 20 µU/ml TSH; G3, G4, and G5, 2H medium + 20 µU/ml TSH and, respectively, 100, 10, and 1 nM progesterone; G6, 2H medium + 20 IU/ml TSH + 10 nM progesterone + 100 nM mifepristone; G7, 2H medium + 20 IU/ml TSH and 10nM 17β-estradiol; and G8, 2H medium + 20 IU/ml TSH + 10 nM 17β-estradiol + 100 nM ICI 182780. Experiments were repeated five times in different culture cells to test reproducibility.

RNA Extraction

RNA extraction was performed with Trizol (Invitrogen, Life Technologies, Karlsruhe, Germany) following the manufacturer instructions and stored at -80°C. RNA concentration and purity were assessed by Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Rockland, DE, USA). RNA purity was considered appropriate when the ratio of measurements at A260:A280 was from 1.8 to 2.1.

Synthesis of Complementary DNA (cDNA)

1 µg total RNA was transcribed into cDNA using oligo-dT primers and Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer instructions. cDNA was diluted to 1:10 in diethyl pyrocarbonate (DEPC) water and stored at -20°C.

Selection of Reference Genes and Primers Design

Based on commonly used reference genes in cultured cells, and considering different pathways and functions for each gene, four genes were selected as candidate for reference gene, as shown in Table 1.

Table 1: Name and function of candidate reference genes for normalizing gene expression in normal thyroid cells treated with estradiol and progesterone

Symbol	Gene name	Function
β -Actin	β -Actin	Cytoskeletal structural protein
B2M	β -2-microglobulin	Component of MHC-I
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Glycolysis and gluconeogenesis
TBP	TATA box binding protein	Transcription factor

MHC-I major histocompatibility complex class I

The primer sequences, product length, and mean melting temperature (T_m) for each gene are shown in Table 2. PCR primers were kindly supplied by Molecular, Endocrine and Tumor Biology Laboratory, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Annealing temperature of 60°C was used for amplification.

Table 2 Name, product length, mean melting temperature (T_m), and sequence primers for candidate reference genes for normalizing gene expression in normal thyroid cells treated with estradiol and progesterone.

Gene	Primer sequence	Product length (bp)	Mean T_m (°C)
β -Actin	Forward: 5'-TGCCGACAGGATGCAGAAG-3' Reverse: 5'-GCCGATCCACACGGAGTACT-3'	106	82.0
B2M	Forward: 5'-CTATCCAGCGTACTCCAAAG-3' Reverse: 5'-ACAAGTCTGAATGCTCCACT-3'	165	78.5
GAPDH	Forward: 5'-CTTTGTCAAGCTCATTTCTGG-3' Reverse: 5'-TCTTCTCTTGTGCTCTTGC-3'	133	84.2
TBP	Forward: 5'-GGGTTTTCCAGCTAAGTTCTTG-3' Reverse: 5'-CTGTAGATTAACAGGAAATAAC-3'	150	79.1

bp base pairs, °C Celsius degree, *B2M* β -2-microglobulin, *GAPDH* Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, *TBP* TATA box binding protein.

cDNA amplification

qPCR reactions for DNA amplification were performed on the Step One Plus (Applied Biosystems, USA) using Kit Platinum SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen). Duplicate measurements were performed to determine reproducibility of the assays with a single protocol: reaction mixtures were initially incubated at 95°C for 2 min, followed by 40 cycles of 15 sec denaturation step at 95°C, 30 sec at 60°C annealing step and a 30 sec elongation step at 72°C. For each primer pair, dissociation curve analyses were performed by running a gradient of 60-95°C to confirm the specificity of the PCR amplification, and the absence of primer dimer.

cDNA standard curves were constructed using the threshold cycles with five measuring 10-fold dilution points from a pooled cDNA of the samples.

Statistical Analysis

The variability of gene expression of candidate genes was evaluated by the Normfinder algorithm, which automatically calculates the average expression stability for each candidate gene.

Results

The efficacy of isolation of the epithelial thyroid cells, and the growth conditions were assessed by phase-contrast microscopy. The confluence in monolayers and typical phenotype of normal human thyroid epithelial cells are shown in Fig. 1.

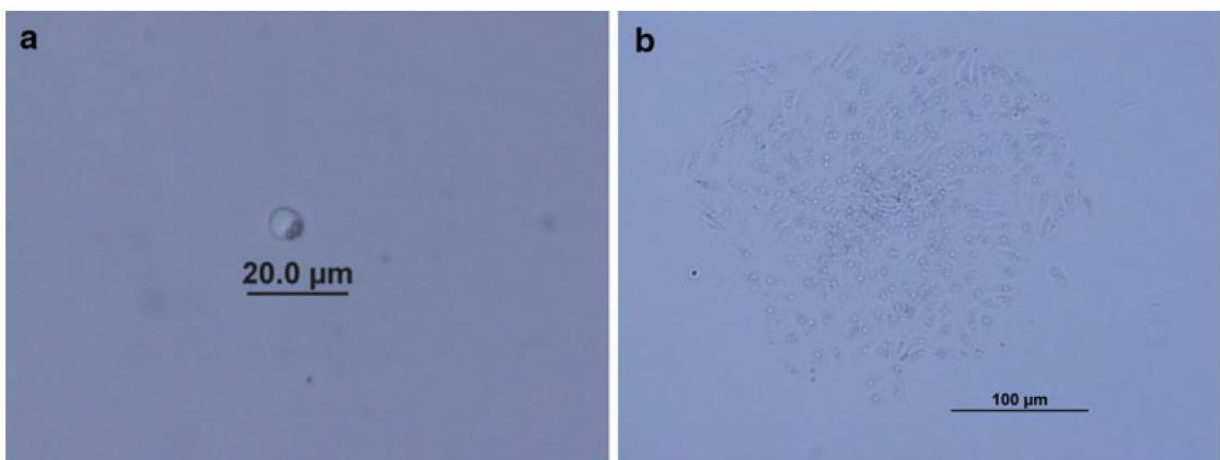
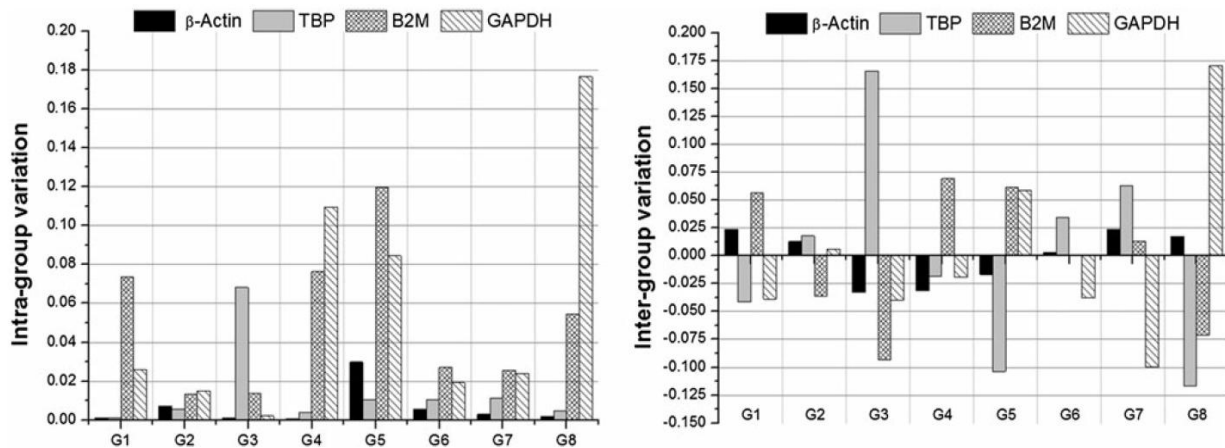


Fig. 1 Phase-contrast microscopy of primary human thyroid cells isolated by collagenase. **a** Thyroid cell in suspension after enzymatic dissociation, and **b** thyroid cells clumps 48 h after seeding. Scale **a** 20 μm and **b** 100 μm.

The values of stability of the candidate genes, and ranking obtained from NormFinder analysis are shown, respectively, in Fig. 2 and Table 3. The most stable combination was β -actin plus TBP (0.034).

Fig. 2 Intra- and inter-group variation for candidate reference genes in five cultures of normal thyroid cells, according to treatment, as evaluated by NormFinder. The most stable gene is the one that has values closer to zero. GAPDH, B2M, and TBP had higher instability than β -actin.



B2M β -2-microglobulin, *GAPDH* Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, *TBP* TATA box binding protein, G1 no TSH, G2 TSH 20 IU/ml, G3 TSH 20 IU/ml + progesterone 100 nM, G4 TSH 20 IU/ml + progesterone 10 nM, G5 TSH 20 IU/ml + progesterone 1 nM, G6 TSH 20 IU/ml + progesterone 10 nM + mifepristone 100 nM, G7 TSH 20 IU/ml + estradiol 10 nM, G8 TSH 20 IU/ml + estradiol 10 nM + 100 nM ICI 182780.

Table 3 Candidate reference genes for normalization of RT-qPCR in human thyroid cells, according to their stability, as calculated by NormFinder.

Ranking order	Gene	Stability value
1	β -Actin	0.033
2	TBP	0.054
3	GAPDH	0.108
4	B2M	0.108

Genes are listed from the most stable gene (β -actin) to the least stable one (B2M)

B2M β -2-microglobulin, *GAPDH* glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, *TBP* TATA box binding protein

Discussion and Conclusion

In the present study b-actin gene was shown to be suited for RT-qPCR gene expression data normalization in primary culture cells obtained from normal human thyroid, when treated with progesterone or estradiol. TBP, B₂M, and GAPDH genes had a greater variation in gene expression indicating a low stability of these genes in the different groups studied.

Currently, it is accepted that there is no universal reference gene for RT-qPCR data normalization. Each experiment is unique because of its individual characteristics and, therefore, it is important to validate the candidate reference gene for every experimental situation. The importance of choosing the appropriate reference gene cannot be overstated, because the choice of an unsuitable one could lead to misinterpretation of biological effects in studies of gene expression [16]. The ideal reference gene should provide a transcript constant under all experimental conditions at any time of the cell cycle or cellular differentiation [16].

In the present study, the culture of primary cells obtained from normal human thyroid tissue was characterized by cell growth in adherent monolayer. The differentiation of thyrocytes was confirmed by measuring TG in the supernatant of each study group (data not shown).

NormFinder was chosen to compare candidate genes due to its ability to estimate inter-and intra-group variability separately (Fig. 2) and then combine them into a stability value (Table 3), representing the estimated systematic error [12]. The gene expression is more stable when this value is closer to zero. The stability value less than 0.15 is the cut-off for an acceptable reference gene [18].

In Table 3, stability values obtained are shown, already considering both variations; the most stable to the least stable genes were β -actin > TBP > GAPDH = B₂M.

Unfortunately, there are no studies in normal thyroid cells to compare with our results. B₂M and GAPDH genes are the most often used as reference genes in several human tissues but today there is emerging evidence that both these genes could vary its expression in different conditions [20].

Stability values were calculated separately for intra-and inter-groups. Although TBP has shown a good stability value (Table 3), due its low intra-group variation (0.068), its high inter-group variation (0.166), as observed in Fig. 2, does not allow us to suggest this gene as a reference gene for the experimental conditions used.

Also through the graphical representations in Fig. 2, it can be seen that the expression of b-actin had a low variation both intra-and inter-group. Nevertheless, it is important to point out that some variation is expected intergroup, when working with primary cells culture, mainly due to tissue conditions in vivo, surgical details, and the various steps for obtaining cells from dissociated tissue.

Because of the importance of evaluating these inter-and intra-group expression variations, allowing to evaluate the heterogeneity between different cultures, other softwares, such as GeNorm and Bestkeeper, were not used to assess candidate reference genes.

Although some studies in immortalized cell lines from rat thyroid or human abnormal thyroid have shown that steroid hormones could influence the function and growth of the thyroid [1–3, 6–8, 21] there are no reports on the effects of estradiol or progesterone in normal human thyroid cells. So these results could be potentially helpful for future studies to assess changes in the pattern of gene expression in normal human thyroid cells when exposed to these steroid hormones.

In conclusion, the results of the present study suggest that b-actin gene is more stable than TBP, GAPDH, and B2M genes to evaluate the response of primary cells culture from normal human thyroid to treatment with progesterone or estradiol.

Conflict of interest The authors have no conflicts of interest.

References

1. Furlanetto T.W., Nguyen L.Q., Jameson J.L. (1999). Estradiol increases proliferation and down-regulates the sodium/iodide symporter gene in FRTL-5 cells. *Endocrinology*, 140, 5705-5711.
2. Furlanetto T.W., Nunes R.B., Sopelsa A.M., Maciel R.M. (2001). Estradiol decreases iodide uptake by rat thyroid follicular FRTL-5 cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34, 259-263.
3. del Senno L., degli Uberti E., Hanau S., Piva R., Rossi R., Trasforini G. (1989). In vitro effects of estrogen on tgb and c-myc gene expression in normal and neoplastic human thyroids. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 63, 67-74.
4. Pantaleao T.U., Mousovich F., Rosenthal D., Padron A.S., Carvalho D.P., da Costa V.M. (2010). Effect of serum estradiol and leptin levels on thyroid function, food intake and body weight gain in female Wistar rats. *Steroids*, 75, 638-642.
5. Lima L.P., Barros I.A., Lisboa P.C., Araujo R.L., Silva A.C., Rosenthal D., et al. (2006). Estrogen effects on thyroid iodide uptake and thyroperoxidase activity in normal and ovariectomized rats. *Steroids*, 71, 653-659.
6. Vivacqua A., Bonofiglio D., Albanito L., Madeo A., Rago V., Carpino A., et al. (2006). 17 β -Estradiol, genistein, and 4-hydroxytamoxifen induce the proliferation of thyroid cancer cells through the G protein-coupled receptor GPR30. *Molecular Pharmacology*, 70, 1414-1423.
7. Kumar A., Klinge C.M., Goldstein R.E. (2010). Estradiol induced proliferation of papillary and follicular thyroid cancer cells is mediated by estrogen receptors alpha and beta. *International Journal of Oncology*, 36, 1067-1080.
8. Manole D., Schildknecht B., Gosnell B., Adams E., Derwahl M. (2001). Estrogen promotes growth of human thyroid tumor cells by different molecular mechanisms. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86, 1072-1077.
9. Kansakar E., Chang Y.J., Mehrabi M., Mittal V. (2009). Expression of estrogen receptor, progesterone receptor and vascular endothelial growth factor-A in thyroid cancer. *The American Surgeon*, 75, 785-789.

10. Memon G.R., Arain S.A., Jamal Q., Ansari T. (2005). An immunohistochemical study on the progesterone in the thyroid gland. *Journal Pakistan Medical Association*, 55, 321-324.
11. Kubista M., Andrade J.M., Bengtsson M., Forootan A., Jonak J., Lind K., et al. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 95-125.
12. Andersen C.L., Jensen J.L., Orntoft T.F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets *Cancer Research*, 64, 5245-5250.
13. Meller M., Vadachkoria S., Luthy D.A., Williams M.A. (2005). Evaluation of housekeeping genes in placental comparative expression studies. *Placenta*, 26, 601-607.
14. Rubie C., Kempf K., Hans J., Su T., Tilton B., George T., et al. (2005). Housekeeping gene variability in normal and cancerous colorectal, pancreatic, esophageal, gastric and hepatic tissues. *Molecular and Cellular Probes*, 19, 101-109.
15. Zhang X., Ding L., Sandford A.J. (2005). Selection of reference genes for gene expression studies in human neutrophils by real-time PCR. *BMC Molecular Biology*, 6, 1-7.
16. Dheda K., Huggett J.F., Bustin S.A., Johnson M.A., Rook G., Zumla A. (2004). Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques*, 37, 112-114.
17. Silver N., Best S., Jiang J., Thein S.L. (2006). Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Molecular Biology*, 7, 1-9.
18. Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., et al. (2002). Accurate normalization of real time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3, 1-12.

19. Pfaffl M.W., Tichopad A., Prgomet C., Neuvians T.P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, 26, 509-515.

20. Brkljačić J., Tanić N., Milutinović D.V., Elaković I., Jovanović S.M., Perišić T., et al. (2010). *BMC Molecular Biology*, 11, 1-9.

21. Filardo E.J., Quinn J.A., Bland K.I., Frackelton A.R., (2000). Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EG. *Molecular Endocrinology*, 14, 1649-1660.

CAPÍTULO V

Efeito da progesterona nas expressão dos genes TG, TPO e NIS em células foliculares da tireoide humana

Progesterone Increased Gene Expression in Human Thyroid Follicular Cells

Ana Paula Santin¹, Ilma Simoni Brum², Ana Carolina Hillebrand², Tania Weber Furlanetto¹

¹ Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CEP: 90035-903, Rua Ramiro Barcelos, 2350/700, Porto Alegre, RS, Brasil.

² Programa de Pós Graduação em Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

Short title: Progesterone effects in thyroid cells

Corresponding author

Tania Weber Furlanetto

Rua Ramiro Barcelos 2350/700

Porto Alegre, RS, Brazil

90035-003

Telephone: 00 55 51 3359.8152

Fax: 00 55 51 3359.8152

e-mail: taniafurlanetto@gmail.com

tfurlanetto@hcpa.ufrgs.br

Conflicts of interest: All authors have no conflicts of interest.

Abstract

Thyroid cancer and thyroid nodules are more prevalent in women, and sex hormones may have an etiological role contributing to it. Progesterone receptors have been described in thyroid cells, but there are no data about direct effects of progesterone on these cells, so the aim of the present study was to evaluate progesterone effects in the sodium iodide symporter (NIS), thyroglobulin (TG), and thyroperoxidase (TPO) gene expression in a model of human normal thyroid cells in primary culture. When thyroid cells were treated with TSH 20 μ UI/mL plus progesterone 10 nM, the expression of NIS, TG, TPO mRNA increased significantly by 1.78, 1.50, and 1.64 folds, respectively, when compared to TSH 20 μ UI/mL alone. These effects were abolished by mifepristone, an antagonist of progesterone receptor, suggesting that genes involved on thyroid cell function are up regulated by progesterone through the genomic pathway.

Keywords: Thyroid; Progesterone; Mifepristone; Thyroid Cells; Primary Culture.

Introduction

Thyroid nodules and thyroid cancer are more common in women (Mitchell et al., 2007; Vanderpump, 2011), suggesting that female sex hormones could be involved in the pathogenesis of these disorders.

Although estrogens have been shown to regulate proliferation, differentiation, and function of thyroid cells in vitro, by genomics and non-genomics pathways, as reviewed recently (Santin and Furlanetto, 2011), there are no data about direct effects of progesterone on thyroid cells. Progesterone receptor is a member of a family of nuclear receptors and is capable to regulate directly the transcription of target genes or interact with a series of co-activator complexes that modify chromatin and influence their transcription (Weigel and Moore, 2007).

As progesterone receptors have been variably described in thyroid follicular cells (Bonacci et al., 1996; Marugo et al., 1989), these cells could be susceptible to the influence of progesterone, so the aim of the present study was to evaluate progesterone effects on the sodium iodide symporter (NIS), thyroglobulin (TG), and thyroperoxidase gene expression in a model of human normal thyroid cells in primary culture.

Methods

Human Thyroid Primary Cell Cultures

Thyroid tissue acquisition, isolation and culture of follicular cells were made as described previously (Santin et al., 2012). In brief, normal thyroid tissue surrounding tumors was obtained from patients who underwent total thyroidectomy, and digested with collagenase.

Experimental design

Thyroid cells were maintained in Ham's F-12 Coon's modification medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 10 µg/mL insulin, 5 µg/mL transferrin, 1 mU/mL TSH, and 100 U/mL kanamycin. Five or 7 days later, cells were deprived of TSH for 48 hours in the medium described above with 5% fetal bovine serum with no TSH (2H medium), subsequently, thyroid cells were treated with 2H medium and TSH, progesterone, and mifepristone, as follows: Group 1: ethanol; Group 2: 20 µIU/mL TSH; Group 3: 20 µIU/mL TSH + 10 nM progesterone, and Group 4: 20 µIU/mL TSH + 10 nM progesterone + 100 nM mifepristone. The final concentration of ethanol was adjusted to 0.1%. The cells were treated for 3, 6, 12, 24 or 48 h before total RNA isolation.

Gene expression analysis

Total RNA was isolated using the Trizol® reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad CA, USA) according to the manufacturer instructions, and concentration and purity were assessed using Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Rockland DE, USA), and stored at -80°C. 1 µg total RNA was transcribed into cDNA by Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen Life Technologies), according to the manufacturer instructions, and then stored at -20°C.

Expression of TG, TPO and NIS by quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) were performed on Applied Biosystems® StepOne™ Real-Time PCR System using Kit Platinum SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen Life Technologies). β-actin was used as reference gene (Santin et al., 2012). The primers for the specific amplification for TG, TPO and NIS were described previously (Tanaka et al., 2000). Annealing temperature of 60°C was

used for amplification; dissociation curves were performed by running a gradient of 60-95°C to confirm the specificity of the PCR amplification product. All samples were amplified in triplicate and cDNA standard curves were constructed using the threshold cycles with five successive 10-fold dilution points of a pool of cDNA samples.

Statistical analysis

qRT-PCR experiments were performed in duplicates, and repeated, in independent cultures isolated from different patients, three times for NIS gene and four times for TG and TPO genes. NIS, TG and TPO mRNA values were normalized by β -actin before statistical analysis. Differences in means were evaluated with the Student's t-test or ANOVA. After ANOVA, post hoc LSD test was used to detect which means were different. All statistical analysis were performed with SPSS software, version 18.0 (SPSS, Chicago, IL), and considered significant when p was less than 0.05.

Results

Thyroid cells in primary cultures were responsive to stimulation by TSH

Thyroid follicular cell viability and differentiation were assessed by the characteristic morphology and by staining TG and TPO proteins by immunocytochemistry (data not shown).

The response to TSH of NIS, and TG and TPO mRNA expression, were better seen, respectively, after 3h and 48h (data not shown). TG and TPO mRNA expression increased, respectively, 1.40 and 2.71 folds, after 48 hours of treatment with 20 μ IU/mL TSH, NIS mRNA expression increased non-significantly 2.67 fold after 3 hours of TSH treatment. These results are shown in Figure 1.

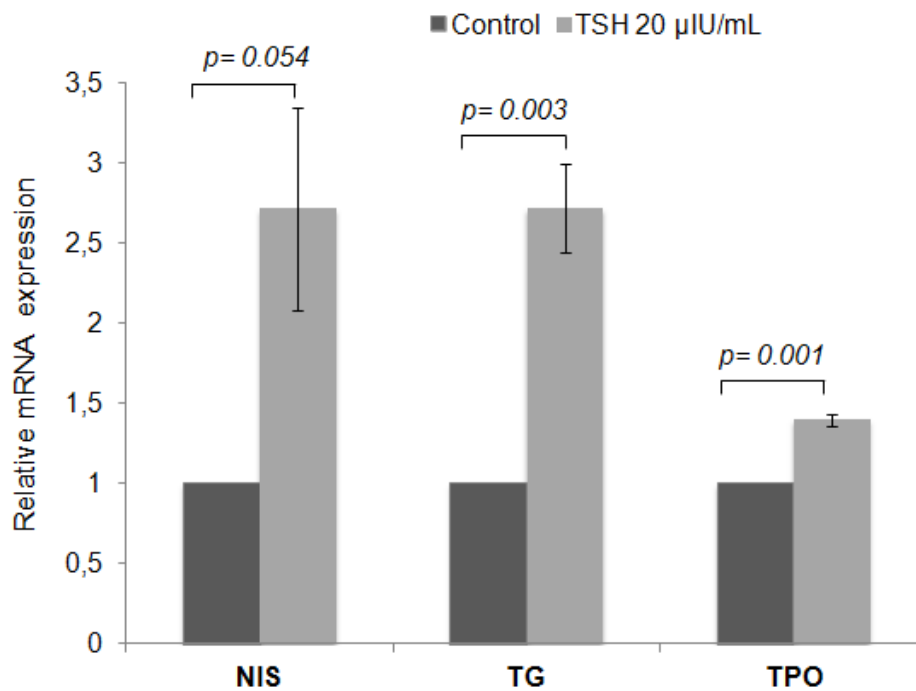


Figure 1: Mean mRNA expression of thyroid proteins in response to TSH in human thyroid follicular cells in primary culture. The response of sodium-iodide symporter (NIS), and thyroglobulin (TG) and thyroperoxidase (TPO) genes, were measured, respectively, after 3h and 48h, by qRT-PCR, and normalized with β -actin gene expression. Data are shown as the ratio of target cDNA/control, which was arbitrarily set to $1 \pm$ standard deviation. The experiments were performed in duplicates, and repeated in three independent cultures for NIS, and in four independent cultures for TG and TPO.

Progesterone up-regulated TG, TPO and NIS mRNA expression in follicular thyroid cells

To evaluate the effect of progesterone on the expression of TG, TPO e NIS genes, qRT-PCR was applied. When thyroid cells were treated with TSH 20 μ IU/mL plus progesterone 10 nM, the expression of NIS, TG, and TPO increased,

respectively, by 1.78, 1.50, and 1.64 times when compared to TSH, arbitrarily set as 1 (Figure 2).

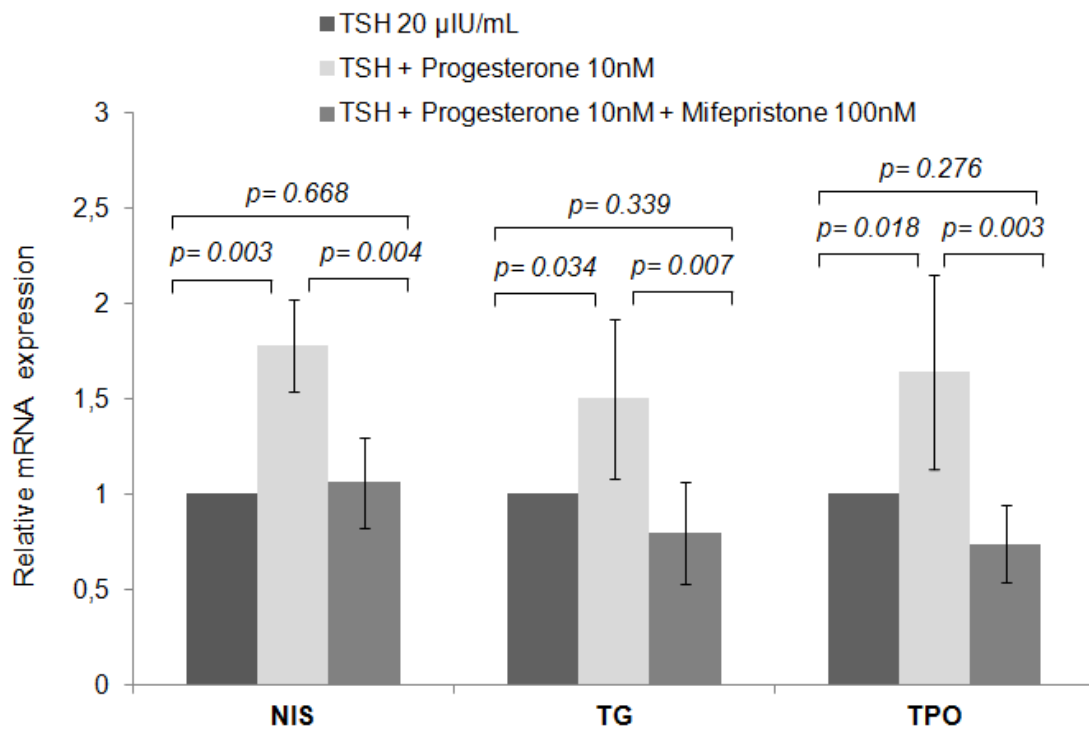


Figure 2: Progesterone increased mean mRNA expression of thyroid genes in response to TSH in human normal thyroid follicular cells in primary culture. The response of the sodium-iodide symporter (NIS), and the thyroglobulin (TG) and the thyroperoxidase (TPO) genes were measured, respectively, after 3h and 48h, by qRT-PCR, and normalized with β -actin gene expression. The experiments were performed in duplicates, and repeated in three independent cultures for NIS, and four independent cultures for TG and TPO. Data are shown as the mean ratio of treatment/TSH arbitrarily set as $1 \pm$ standard deviation, and were evaluated with Anova (NIS: $p=0.002$; TG: $p=0.018$; TPO: $p=0.008$), and LSD as post hoc test.

Mifepristone reversed the effects of progesterone in thyroid follicular cells

In order to determine whether the effects of progesterone in NIS, TG, and TPO mRNA expression were mediated by the classical pathway, cells were treated with TSH 20 μ UI/ml plus progesterone 10 nM plus mifepristone 100 nM. There was no difference on the expression of the three genes studied (NIS: $p=0.668$, TG: $p=0.339$, and TPO: $p=0.276$), when the group treated with TSH 20 μ IU/mL was compared with the group treated with TSH 20 μ IU/mL+ progesterone 10 nM plus mifepristone 100 nM by the LSD post hoc test, as shown in Figure 2.

Discussion and Conclusions

To investigate the effects of progesterone on thyroid cells, normal follicular thyroid cells derived from human tissue were cultured in monolayer. Progesterone up-regulated TG, TPO, and NIS mRNA expression in cells stimulated by TSH and these effects were abolished by mifepristone.

Isolated human follicular cells derived from normal thyroid tissue have been described in other studies (Chambard et al., 1983; Nitsch and Wollman, 1980), with high functional correspondence with the original follicular cells. In our model, thyroid cells exhibited the expected morphology. Although the control group has been treated with no TSH, the presence of TG, TPO and NIS mRNA was detected in these experimental conditions, which could be due to other components of the medium such as insulin, as observed for proliferation (Kimura et al., 2001), or to constitutive activation.

In agreement with our findings, other studies have reported significant increase in TG mRNA levels at 48 h of stimulation with TSH. Nosedá et al evaluated TG mRNA levels in FRTL-5 cells and showed a 2-fold and 4-fold increase in the expression at 24

hours and 48 hours, respectively, when compared to no TSH (Nosedá et al., 2005). Likewise, also in FRTL-5 cells, Velez et al tested different times of TSH stimulation in thyroid cells and observed an increase in TG mRNA expression approximately 2-fold in 3 and 6 hours, 2.5-fold at 12, 24 and 72 hours, and a significant increase of about 4.5 times at 48 hours (Velez et al., 2006).

Pratt et al using primary cultures of sheep thyroid cells demonstrated increase of TPO mRNA in response to TSH, beginning in 8 hours and peaking at 24-72 hours (Pratt et al., 1989). Eszlinger et al observed that TPO mRNA expression increased markedly up to 20-fold after 8, 12, 24 and 48 hours after stimulation with TSH 1mU/ml in primary cultures of human normal thyroid cells (Eszlinger et al., 2004).

TSH has been shown to up-regulate NIS mRNA in primary cultures of thyroid cells in monolayer. In cultured human thyroid cells from a patient with Graves' disease, NIS mRNA increased about 2.7-fold after 24 h of incubation with TSH (Saito et al., 1997). NIS mRNA levels in FRTL-5 cells, increased about 2.5-fold, after 48 hours of stimulation with 20µU/ml TSH (Furlanetto et al., 1999). Ajjan demonstrated that NIS gene expression was constitutively expressed in TSH-deprived FRTL-5 cells, and was upregulated about 4.5 times after 6, 12 and 24 h of stimulation by 0.1 mU/ml TSH but not during the first 2 hours (Ajjan et al., 1998).

Unfortunately, there are no studies of progesterone effect on thyroid cells, human or not, so data obtained here cannot be compared with other studies.

As the effect of progesterone on the NIS, TG and TPO genes expression was abolished by mifepristone, an antagonist of PR, a direct action of progesterone on thyroid cells probably occurred through its nuclear receptor (Leonhardt and Edwards, 2002). Further studies are needed to investigate progesterone effects on thyroid cells.

In conclusion, our results suggest that genes involved on thyroid cell function are up regulated by progesterone through its nuclear receptor.

References

Ajjan, R.A., Watson, P.F., Findlay, C., Metcalfe, R.A., Crisp, M., Ludgate, M., Weetman, A.P., 1998, The sodium iodide symporter gene and its regulation by cytokines found in autoimmunity. *J Endocrinol* 158, 351-358.

Bonacci, R., Pinchera, A., Fierabracci, P., Gigliotti, A., Grasso, L., Giani, C., 1996, Relevance of estrogen and progesterone receptors enzyme immunoassay in malignant, benign and surrounding normal thyroid tissue. *J Endocrinol Invest* 19, 159-164.

Chambard, M., Verrier, B., Gabrion, J., Mauchamp, J., 1983, Polarization of thyroid cells in culture: evidence for the basolateral localization of the iodide "pump" and of the thyroid-stimulating hormone receptor-adenyl cyclase complex. *J Cell Biol* 96, 1172-1177.

Deleu, S., Pirson, I., Coulonval, K., Drouin, A., Taton, M., Clermont, F., Roger, P.P., Nakamura, T., Dumont, J.E., Maenhaut, C., 1999, IGF-1 or insulin, and the TSH cyclic AMP cascade separately control dog and human thyroid cell growth and DNA synthesis, and complement each other in inducing mitogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 149, 41-51.

Eszlinger, M., Holzapfel, H.P., Voigt, C., Arkenau, C., Paschke, R., 2004, RGS 2 expression is regulated by TSH and inhibits TSH receptor signaling. *Eur J Endocrinol* 151, 383-390.

Furlanetto, T.W., Nguyen, L.Q., Jameson, J.L., 1999, Estradiol increases proliferation and down-regulates the sodium/iodide symporter gene in FRTL-5 cells. *Endocrinology* 140, 5705-5711.

Kimura, T., Van Keymeulen, A., Golstein, J., Fusco, A., Dumont, J.E., Roger, P.P., 2001, Regulation of thyroid cell proliferation by TSH and other factors: a critical evaluation of in vitro models. *Endocr Rev* 22, 631-656.

Leonhardt, S.A., Edwards, D.P., 2002, Mechanism of action of progesterone antagonists. *Exp Biol Med (Maywood)* 227, 969-980.

Marugo, M., Torre, G., Bernasconi, D., Fazzuoli, L., Berta, S., Giordano, G., 1989, Thyroid and steroid receptors. *J Endocrinol Invest* 12, 565-570.

Mitchell, I., Livingston, E.H., Chang, A.Y., Holt, S., Snyder, W.H., 3rd, Lingvay, I., Nwariaku, F.E., 2007, Trends in thyroid cancer demographics and surgical therapy in the United States. *Surgery* 142, 823-828; discussion 828 e821.

Nitsch, L., Wollman, S.H., 1980, Suspension culture of separated follicles consisting of differentiated thyroid epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 472-476.

Nosedá, P.A., Thomasz, L., Pregliasco, L., Krawiec, L., Pisarev, M.A., Juvenal, G.J., 2005, Long-term effect of norepinephrine on thyroglobulin gene expression in FRTL-5 cells. *Thyroid* 15, 417-421.

Pratt, M.A., Eggo, M.C., Bachrach, L.K., Carayon, P., Burrow, G.N., 1989, Regulation of thyroperoxidase, thyroglobulin and iodide levels in sheep thyroid cells by TSH, tumor promoters and epidermal growth factor. *Biochimie* 71, 227-235.

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

Santin, A.P., Furlanetto, T.W., 2011, Role of estrogen in thyroid function and growth regulation. *J Thyroid Res* 2011, 875125.

Santin, A.P., Souza, A.F., Brum, L.S., Furlanetto, T.W., 2012, Validation of Reference Genes for Normalizing Gene Expression in Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR in Human Thyroid Cells in Primary Culture Treated with Progesterone and Estradiol. *Mol Biotechnol*.

Tanaka, K., Otsuki, T., Sonoo, H., Yamamoto, Y., Udagawa, K., Kunisue, H., Arime, I., Yamamoto, S., Kurebayashi, J., Shimosuma, K., 2000, Semi-quantitative comparison of the differentiation markers and sodium iodide symporter messenger

ribonucleic acids in papillary thyroid carcinomas using RT-PCR. *Eur J Endocrinol* 142, 340-346.

Vanderpump, M.P., 2011, The epidemiology of thyroid disease. *Br Med Bull* 99, 39-51.

Velez, M.L., Costamagna, E., Kimura, E.T., Fozzatti, L., Pellizas, C.G., Montesinos, M.M., Lucero, A.M., Coleoni, A.H., Santisteban, P., Masini-Repiso, A.M., 2006, 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* 147, 3260-3275.

Weigel, N.L., Moore, N.L., 2007, Steroid receptor phosphorylation: a key modulator of multiple receptor functions. *Mol Endocrinol* 21, 2311-2319.

CAPÍTULO VI

Identificação do Receptor de Membrana GPR30/GPER em Células Foliculares de Tireoide Humana

Artigo Submetido 31 de Setembro de 2012 na Revista *Tissue & Cell*

Identification of G-protein coupled receptor 30 (GPR30/GPER) in human normal thyroid cells

Santin, AP¹; Loureiro, SO²; Pessoa-Pureur, R³; Brum, IS⁴; Furlanetto, TW⁵

¹ Ana Paula Santin, Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CEP: 90035-003, Rua Ramiro Barcelos, 2350/700 - Porto Alegre, RS - Brazil. E-mail: anapsantin@gmail.com

² Samanta Loureiro Oliveira, Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CEP: 90035-003, Rua Ramiro Barcelos, 2600/31 - Porto Alegre, RS - Brazil. E-mail: emaildasamanta@gmail.com

³ Regina Pessoa-Pureur, Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CEP: 90035-003, Rua Ramiro Barcelos, 2600/31 - Porto Alegre, RS - Brazil. E-mail: rpureur@ufrgs.br

⁴ Ilma Simoni Brum, Programa de Pós Graduação em Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CEP: 90050-150, Rua, Sarmiento Leite, 500, Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: ilma@ufrgs.br

⁵ Tania Weber Furlanetto, Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CEP: 90035-003, Rua Ramiro Barcelos, 2350/700 - Porto Alegre, RS - Brazil. E-mail: taniafurlanetto@gmail.com and tfurlanetto@hcpa.ufrgs.br

Abstract

Thyroid nodules and differentiated thyroid cancer are more common in women, and the incidence of the last has been increasing, which could be due to estrogen effects in thyroid cells. Estrogen responses are typically mediated through classical estrogen receptors, the α and β isoforms, which have been described in normal and abnormal human thyroid tissue, although effects mediated through G protein estrogen receptor 1 (GPR30/GPER), described in some thyroid cancer cell lines, could be responsible for regulation of growth in normal cells. In this study, GPR30 gene and protein expression are described in normal human thyroid cells in primary culture, and is possibly localized in plasma membrane and perinuclear region by immunocytochemistry. Further studies are needed to determine the functionality of these receptors in the thyroid as well as its role in normal and abnormal conditions.

Keywords: GPR30; Thyroid; Primary Cell Culture; Thyrocytes, 17β -estradiol, immunocytochemistry;

Introduction

Thyroid nodules and differentiated thyroid cancer are more common in women, and the incidence of the last has been increasing (Wartofsky 2010). 17β -estradiol actions have been described in thyroid cells, but mechanisms of action are not well known (Mendonça and Jorge 2002). Estrogen effects are typically mediated through two classical estrogen receptors (ER), the α and β isoforms (ER α and ER β) (Banu et al. 2002, Zeng et al. 2007, Zeng et al. 2008), which have been described in normal and abnormal human thyroid tissue (Santin and Furlanetto 2011).

In 2002, Filardo et al. reported estrogen-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade in breast cancer cells ER α / β -negative, mediated by a G-protein-coupled receptor (Filardo E. J. et al. 2002), named GPR30 or GPER (Alexander et al. 2011). Subsequently, GPR30 has been described in several tissues and cell types (Mizukami 2010, Olde and Leeb-Lundberg 2009) with sub-cellular localization in plasma membrane (Filardo E. et al. 2007, Funakoshi et al. 2006, Lucas et al. 2010, Revankar et al. 2005, Sanden et al. 2011, Thomas et al. 2005), endoplasmic reticulum (Kleuser et al. 2008, Lin et al. 2009, Otto et al. 2008, Revankar et al. 2005), and Golgi apparatus (Sakamoto et al. 2007).

So far, only two studies, both using carcinoma thyroid cell lines, were performed to evaluate 17β -estradiol effects mediated through GPR30 in thyroid cells. While Vivacqua et al. described estradiol-induced proliferation in WRO, FRO, and ARO cell lines which was prevented by silencing GPR30 (Vivacqua et al. 2006), Kumar et al. were not able to identify GPR30 expression in NPA87 and KAT5 cells and found low

expression of this receptor in WRO, suggesting that estradiol-induced proliferation involves majorly ER α and ER β (Kumar et al. 2010).

GPR30 studies in normal human cells could help to explain current contradictory results in estrogen responsive tissues, since non transformed cells can vary their phenotype, even under physiological conditions (Barton 2012). So, the primary purpose of this study was to evaluate the expression of GPR30 in normal human thyroid cells. The possible localization of this receptor was also evaluated.

Materials and Methods

Thyroid tissue acquisition

Tissue samples were obtained from patients submitted to thyroidectomy as part of treatment for differentiated thyroid cancer. Normal human thyroid tissue was obtained in the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). After macroscopic from patients who underwent total thyroidectomy as part of treatment for differentiated thyroid cancer and frozen sections evaluation of surgical specimens by two pathologists, some of the normal tissue was kept in Hank's solution at about 4°C until processing. The project was submitted to, and approved by, the Research Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil. In accordance with the Resolution HCPA 02/97, based on the Resolution CNS 196/96 of the National Health Council, Brazil, and the Guideline 9 of the International Ethical Guidelines for Biomedical Research Involving Human Subjects (CIOMS, WHO, Geneva, 1993), there was no need to obtain informed consent of the patients, because only after the surgical procedure the researchers would know if a tissue sample would

be available, they would not know the identity nor have access to the files of the patients; and the tissue samples would be discharged by the pathologists, so there was no interference with these exams. All tissue samples were considered medical waste, and patient data were anonymized.

Primary culture of normal thyroid cells

Thyroid tissue was cut in fragments of about 1 mm³ and digested by 3 mg/ml of collagenase Type I (GIBCO, Grand Island NY., USA) for 2h at 37°C with gentle shaking. The resulting suspension was filtered through nylon meshes with 250, 150 and 60 µm pore size; the filtered fraction containing epithelial thyroid cells was resuspended and seeded in a 35mm Petri dish at a density of 1x10⁶ cells/cm² in Ham's F-12 Coon's modified medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 10 µg/mL insulin, 5 µg/mL transferrin, 1 mU/mL TSH and 100 U/mL kanamycin at 37 °C with 5% CO₂.

Immunocytochemistry

Immunocytochemical analysis was carried out as described previously by (Loureiro et al. 2010). Briefly, thyroid cells, plated on glass coverslips and maintained in culture for 4-6 days, changing medium every two days, were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in phosphate-buffered saline (PBS) for 5 min at temperature. Non-specific sites were then blocked with 5% bovine serum albumin in PBS for 2 h at room temperature. Cells were incubated overnight at room temperature with antibodies to N-terminal domain or internal region of GPR30 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz CA, USA), both diluted 1:50 in TTBS (0.5M Tris Base, 9% NaCl, 0.5% Tween 20, pH 8.4). Anti-

thyroglobulin and anti-thyroperoxidase antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), both diluted 1:100 in TTBS, were used to confirm the presence of these specific thyroid proteins. Incubation with specific secondary antibody conjugated with Cy3 (sheep anti-rabbit; 1:5000) or with FITC (sheep anti-mouse; 1:400) were performed for 2 h room. To visualize microtubules, antibody mouse against α -tubulin (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad CA, USA), diluted 1:500 in TTBS, was used in immunofluorescence co-labeling.

In negative controls, reactions were performed omitting the primary antibody, with no reaction. The actin cytoskeleton was observed using fluorophore-labeled phalloidin, a fungal toxin that specifically binds actin, and the nucleus was stained with 0.25 μ g/mL 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Cells were visualized with a Nikon microscope and images were transferred to a computer with a digital camera (Sound Vision Inc., Newton, MA, USA).

Western blot analysis

Protein was extracted from 6 primary cultures of normal thyroid cells. Thyroid cells were homogenized in RIPA buffer containing 20 mM (pH 8.0) Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10% glycerol, plus 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, and 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). Lysates were centrifuged at 12.000 x g for 30 min at 4°C, and supernatants were used for the assay. Protein content was measured by the Bradford assay (Bradford 1976) and 50 micrograms of protein were separated in a 12% SDS-polyacrylamide gel with a standard molecular weight marker (Spectra™ Multicolor Broad, Thermo Fisher Scientific Inc, Rockford, IL, USA). Proteins were transferred to Immobilon-P polyvinylidene difluoride (0.45 μ m PVDF) blotting

membrane with a semi-dry transfer cell (Bio-Rad Trans-Blot® SD, Hercules, CA, USA). Afterwards, membranes were blocked by incubation with Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20 and 3% nonfat dry milk for 2 h at room temperature. Thereafter, membranes were incubated with rabbit anti-GPR30 antibodies (Santa Cruz Biotechnology), or with mouse anti- α -tubulin antibody (Invitrogen) overnight at 4°C. Membranes were then incubated in horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse immunoglobulin (Santa Cruz Biotechnology). Antigen-antibody complexes were detected by chemiluminescence and exposed to Kodak medical X-ray processor 102 (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA). Films were scanned and the optical density of each specific band analyzed using the Image Station 4000MM PRO® (Rochester, NY, USA).

Semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA from thyroid cells was extracted using Trizol® Reagent (Invitrogen Life Technologies) according to the manufacturer's instructions, and the concentration of isolated total RNA was measured by using a NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc., Rockland DE, USA).

cDNA was synthesized from 2 μ g of total RNA in a 20 μ L reaction using oligo-dT primers and the SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions, and stored at -20°C until use.

RT-PCR was performed to analyze GPR30 and β -actin mRNA amplification. β -actin gene was amplified as reference gene with primers: sense 5'-TGCCGACAGGATGCAGAAG-3' and antisense: 5'-GCCGATCCACACGGAGTACT-3' and for GPR30, primer pairs used were described previously (Maggiolini et al. 2004).

Thermocycling conditions for both primers pairs were 10 min at 95°C, followed by 45 cycles of 15 s at 94°C for template denaturation, 1 min at 60°C for annealing and 15 s at 72°C for extension. The specificity of the products was verified by melting curve analysis and 2.0% agarose gel electrophoresis containing 0.025 µg/ml ethidium bromide, and they were photographed under UV light using the ImageMaster program[®]. All reagents were obtained from Sigma Aldrich Co. (St. Louis MO, USA), unless stated otherwise.

Results and Discussion

In this study, for the first time, GPR30 mRNA and protein expression were demonstrated in normal human thyroid cells. This protein was probably located in plasma membrane and perinuclear space.

Thyroid epithelial cells instead of thyroid tissue were chosen to evaluate GPR30 expression in human thyroid to avoid nonspecific cells, as vascular endothelial cells. Although thyroid follicular cells in culture could have had loss of polarity, structural and functional aspects of differentiated thyroid cells were preserved. Medium supplemented with TSH allowed the maintenance of the characteristic phenotype of thyrocytes (Figure 1.A and Figure 1.B), which was confirmed by the presence of thyroglobulin and thyroperoxidase proteins (data not shown). Thyroglobulin was present in the supernatant of each culture medium exchange which further confirmed the differentiation of these cells (data not shown).

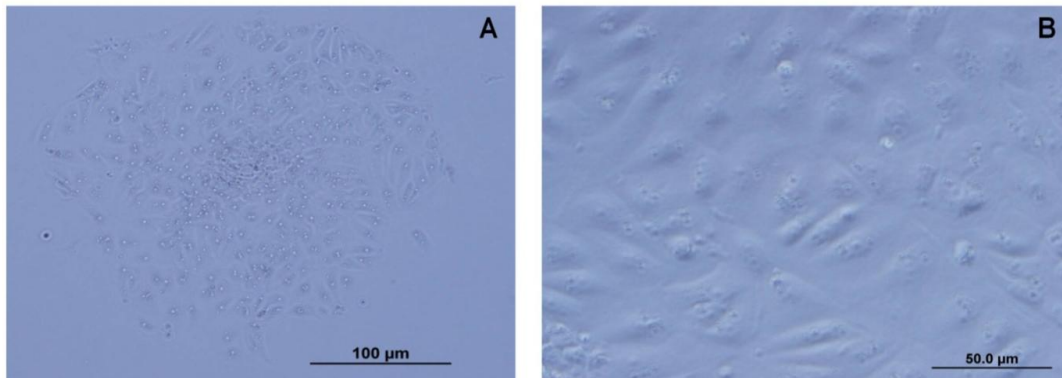


Figure 1: **A** and **B**: Primary cell culture of normal human thyrocytes in monolayers, by phase contrast microscopy.

GPR30 mRNA expression in normal thyroid cells

To examine GPR30 mRNA expression in thyroid cells, RT-PCR analysis was performed in isolated thyroid cells obtained from six different patients. One single band in 155 bp (Figure 2.A) was identified in all samples. β -actin gene was amplified to assess the quality of the mRNA amplification. These data are shown in Figure 2.B.



Figure 2: GPR30 mRNA expression in normal thyroid cells. Agarose gel electrophoresis showing **A**: GPR30 (155 bp) and **B** β -actin (105 bp).

GPR30 mRNA was detected in all samples of normal thyroid cells, differently from the results presented by Kumar and cols (Kumar et al. 2010), which

were not able to identify GPR30 expression in two papillary thyroid carcinoma cell lines, although it was identified in less differentiated or undifferentiated thyroid carcinoma cell lines (Vivacqua et al. 2006). This could be due to abnormalities of cancer cells.

Detection of GPR30 protein in human thyroid cells

To make a confident assessment of GPR30 immunoreactivity by immunocytochemistry, both untagged antibodies against GPR30 protein were tested by Western blot. The antibody against the N-terminal domain of GPR30 protein revealed a doublet at molecular masses ~ 42 and 55 kDa (Figure 3.A) while the antibody specific for the internal region showed one band ~ 38 kDa (Figure 3.B), as expected according to the datasheet of the manufacturer. As already described in other GPCRs, the ~ 55 kDa band protein can be the result of post-translational modifications, such as N-glycosylation or unprocessed α -factor at the N-terminal domain (Zhang et al. 2007).

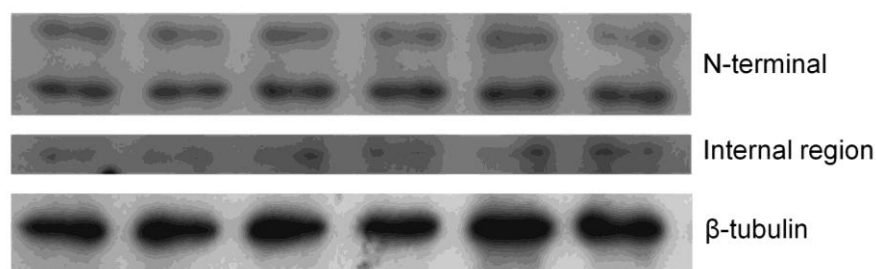


Figure 3: Western blot analysis of GPR30 expression in human normal thyroid cells in primary culture (n=6). Upper panel: antibody against the N-terminal region of GPR30, with two protein bands as expected, ~55 and 42 kDa; middle panel: antibody against the internal region of GPR30, 38 kDa; lower panel: β -tubulin, 50 kDa.

GPR30 protein is possibly localized in plasma membrane and perinuclear space in human normal thyroid cells.

Two different epitopes against the N-terminal and the internal region of GPR30 protein were evaluated because antibodies N-terminal, C-terminal or tagged could influence protein localization on cell surface expression (Langer et al. 2010). To better characterize the possible intracellular localization of GPR30 within human thyroid cells, we used double labeling immunocytochemistry for two cytoskeletal components: actin, using fluorophore-labeled phalloidin, and α -tubulin. No labeling for GPR30 was found in the negative control tested. Immunohistochemical methods were not performed, because although allowing the study of cells in their original tissue, they would not identify the location of cytoskeleton structures in cells, so they would not be useful to localize these proteins.

α -tubulin was used to visualize the microtubule cytoskeleton structure and its double labeling with GPR30 antibody against its N-terminal domain demonstrated GPR30 protein in the plasma membrane in thyroid cells (Figure 4.A) as described in other cell types (Filardo et al. 2007, Funakoshi et al. 2006, Lucas et al. 2010, Revankar et al. 2005, Sanden et al. 2011, Thomas et al. 2005) and also, a smaller amount of this protein around the nucleus. On the other hand double labeling with α -tubulin and the antibody to the internal region of GPR30 showed its distribution in the perinuclear space, probably localized in the membranes of the endoplasmic reticulum (Figure 4.B). In two other studies, calnexin and KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) staining, both targeting specifically the endoplasmic reticulum, were used to visualize GPR30 protein

into endoplasmic reticulum and the resulting images were similar to the ones obtained by us (Cheng et al. 2011a, Kleuser et al. 2008).

Phalloidin-fluorescein isothiocyanate staining of actin was used to identify cell membrane; double labeling of actin and anti-GPR30 N-terminal antibody suggested the presence of GPR30 in cell membrane (Figure 4.C and Figure 4.D). As GPR30 protein in plasma membrane was described in several cell types, this explains why GPR30 has usually been considered a mediator of non-genomic actions of 17 β -estradiol (Filardo et al. 2007).

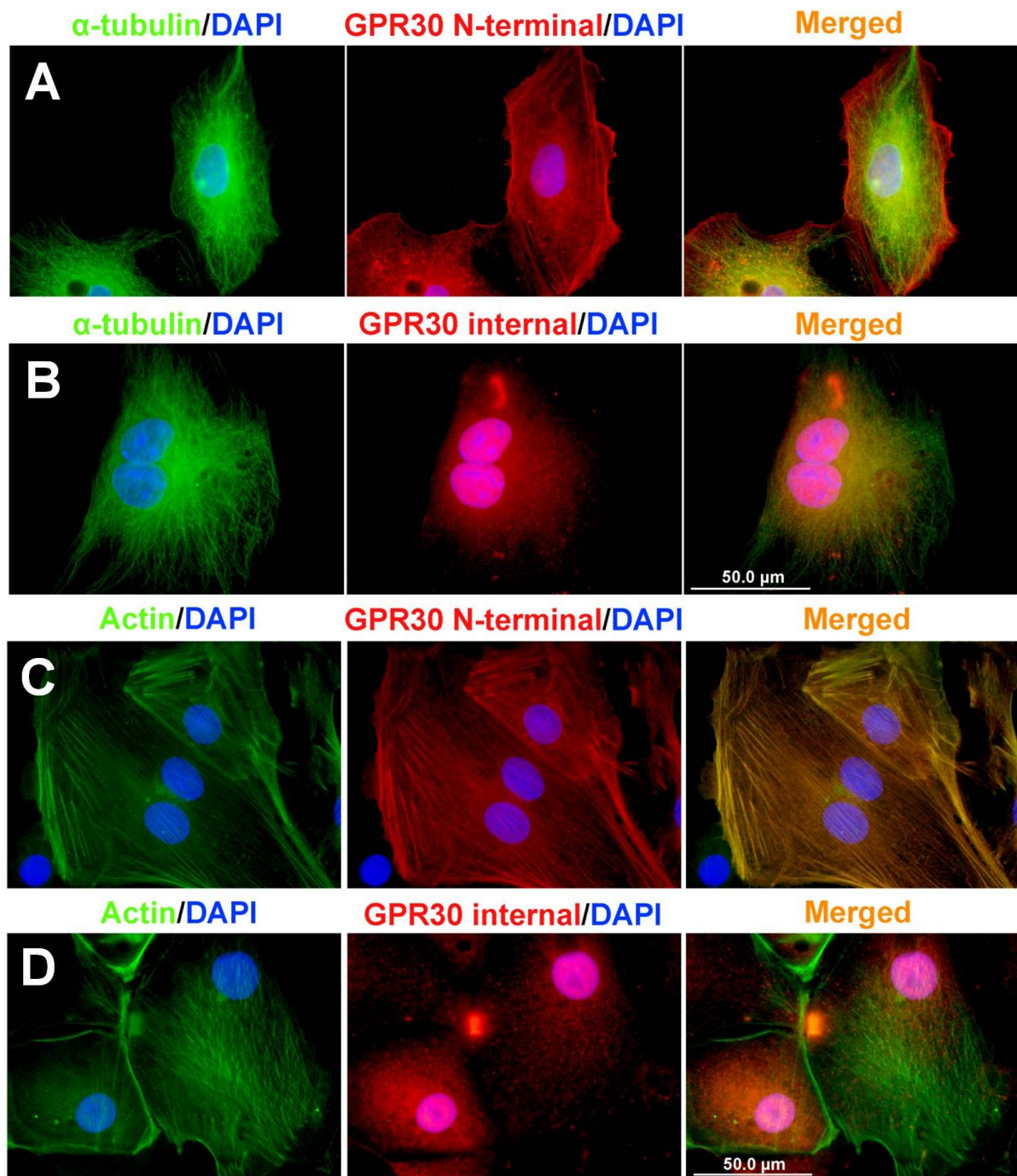


Figure 4. Sub-cellular distribution of GPR30 in human normal thyroid cells by immunocytochemistry fluorescent staining on coverslips. Nuclei were stained in blue with DAPI (blue). Co-localization of GPR30 and α -tubulin (panel **A** and **B**) or actin (panel **C** and **D**) showing that GPR30 was possibly located in plasma membrane (merged **A** and **C**) and perinuclear region (merged **B** and **D**) in human thyroid cells.

Taken together these findings suggest that GPR30 is not located in a single compartment of the thyroid cell, with possible occurrence of endocytic trafficking with internalization and recycling of GPR30, as suggested previously in other cell types (Cheng et al. 2011a) (Cheng et al. 2011b, Filardo et al. 2007). More importantly, this work has confirmed the presence of GPR30 in normal thyroid follicular cells.

Conclusions

In this study, we have documented, for the first time, mRNA and protein expression of GPR30 in normal human thyroid cells and its possible localization in plasma membrane and perinuclear space. These results justify further studies to determine the functionality of these receptors in thyroid cells as well as its role in normal and abnormal conditions.

References

- Alexander, S.P., Mathie, A., Peters, J.A., 2011. Guide to Receptors and Channels (GRAC), 5th edition. Br. J. Pharmacol. 164 Suppl 1, S1-324.
- Banu, S.K., Govindarajulu, P., Aruldas, M.M., 2002. Testosterone and estradiol up-regulate androgen and estrogen receptors in immature and adult rat thyroid glands in vivo. Steroids 67, 1007-1014.
- Barton, M., 2012. Position paper: The membrane estrogen receptor GPER/GPR30: Clues and questions. Steroids 77, 935-942.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.
- Cheng, S.B., Graeber, C.T., Quinn, J.A., Filardo, E.J., 2011. Retrograde transport of the transmembrane estrogen receptor, G-protein-coupled-receptor-30

(GPR30/GPER) from the plasma membrane towards the nucleus. *Steroids* 76, 892-896.

Cheng, S.B., Quinn, J.A., Graeber, C.T., Filardo, E.J., 2011b. Down-modulation of the G-protein-coupled estrogen receptor, GPER, from the cell surface occurs via a trans-Golgi-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 286, 22441-22455.

Filardo, E., Quinn, J., Pang, Y., Graeber, C., Shaw, S., Dong, J., Thomas, P., 2007. Activation of the novel estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 (GPR30) at the plasma membrane. *Endocrinology* 148, 3236-3245.

Filardo, E.J., Quinn, J.A., Frackelton, A.R., Jr., Bland, K.I., 2002. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol. Endocrinol.* 16, 70-84.

Funakoshi, T., Yanai, A., Shinoda, K., Kawano, M.M., Mizukami, Y., 2006. G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346, 904-910.

Kleuser, B., Malek, D., Gust, R., Pertz, H.H., Potteck, H., 2008. 17-Beta-estradiol inhibits transforming growth factor-beta signaling and function in breast cancer cells via activation of extracellular signal-regulated kinase through the G protein-coupled receptor 30. *Mol. Pharmacol.* 74, 1533-1543.

Kumar, A., Klinge, C.M., Goldstein, R.E., 2010. Estradiol-induced proliferation of papillary and follicular thyroid cancer cells is mediated by estrogen receptors alpha and beta. *Int. J. Oncol.* 36, 1067-1080.

Langer, G., Bader, B., Meoli, L., Isensee, J., Delbeck, M., Noppinger, P.R., Otto, C., 2010. A critical review of fundamental controversies in the field of GPR30 research. *Steroids* 75, 603-610.

Lin, B.C., Suzawa, M., Blind, R.D., Tobias, S.C., Bulun, S.E., Scanlan, T.S., Ingraham, H.A., 2009. Stimulating the GPR30 estrogen receptor with a novel tamoxifen analogue activates SF-1 and promotes endometrial cell proliferation. *Cancer Res.* 69, 5415-5423.

Loureiro, S.O., Romao, L., Alves, T., Fonseca, A., Heimfarth, L., Moura Neto, V., Wyse, A.T., Pessoa-Pureur, R., 2010. Homocysteine induces cytoskeletal

remodeling and production of reactive oxygen species in cultured cortical astrocytes. *Brain Res.* 1355, 151-164.

Lucas, T.F., Royer, C., Siu, E.R., Lazari, M.F., Porto, C.S., 2010. Expression and signaling of G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) in rat sertoli cells. *Biol. Reprod.* 83, 307-317.

Maggiolini, M., Vivacqua, A., Fasanella, G., Recchia, A.G., Sisci, D., Pezzi, V., Montanaro, D., Musti, A.M., Picard, D., Ando, S., 2004. The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17beta-estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 279, 27008-27016.

Mendonça, S.C.L., Jorge, P.T., 2002. Thyroid Function Studies in a Population Sample Over 50 Years of Age. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 46, 557-565.

Mizukami, Y., 2010. In vivo functions of GPR30/GPER-1, a membrane receptor for estrogen: from discovery to functions in vivo. *Endocr. J.* 57, 101-107.

Olde, B., Leeb-Lundberg, L.M., 2009. GPR30/GPER1: searching for a role in estrogen physiology. *Trends Endocrinol. Metab.* 20, 409-416.

Otto, C., Rohde-Schulz, B., Schwarz, G., Fuchs, I., Klewer, M., Brittain, D., Langer, G., Bader, B., Prella, K., Nubbemeyer, R., Fritzemeier, K.H., 2008. G protein-coupled receptor 30 localizes to the endoplasmic reticulum and is not activated by estradiol. *Endocrinology* 149, 4846-4856.

Revankar, C.M., Cimino, D.F., Sklar, L.A., Arterburn, J.B., Prossnitz, E.R., 2005. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 307, 1625-1630.

Sakamoto, H., Matsuda, K., Hosokawa, K., Nishi, M., Morris, J.F., Prossnitz, E.R., Kawata, M., 2007. Expression of G protein-coupled receptor-30, a G protein-coupled membrane estrogen receptor, in oxytocin neurons of the rat paraventricular and supraoptic nuclei. *Endocrinology* 148, 5842-5850.

Sanden, C., Broselid, S., Cornmark, L., Andersson, K., Daszkiewicz-Nilsson, J., Martensson, U.E., Olde, B., Leeb-Lundberg, L.M., 2011. G protein-coupled estrogen receptor 1/G protein-coupled receptor 30 localizes in the plasma membrane and traffics intracellularly on cytokeatin intermediate filaments. *Mol. Pharmacol.* 79, 400-410.

Santin, A.P., Furlanetto, T.W., 2011. Role of estrogen in thyroid function and growth regulation. *J. Thyroid Res.*, 875125.

Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E.J., Dong, J., 2005. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* 146, 624-632.

Vivacqua, A., Bonofiglio, D., Albanito, L., Madeo, A., Rago, V., Carpino, A., Musti, A.M., Picard, D., Ando, S., Maggiolini, M., 2006. 17beta-estradiol, genistein, and 4-hydroxytamoxifen induce the proliferation of thyroid cancer cells through the g protein-coupled receptor GPR30. *Mol. Pharmacol.* 70, 1414-1423.

Wartofsky, L., 2010. Increasing world incidence of thyroid cancer: increased detection or higher radiation exposure? *Hormones (Athens)* 9, 103-108.

Zeng, Q., Chen, G., Vlantis, A., Tse, G., van Hasselt, C., 2008. The contributions of oestrogen receptor isoforms to the development of papillary and anaplastic thyroid carcinomas. *J. Pathol.* 214, 425-433.

Zeng, Q., Chen, G.G., Vlantis, A.C., van Hasselt, C.A., 2007. Oestrogen mediates the growth of human thyroid carcinoma cells via an oestrogen receptor-ERK pathway. *Cell Prolif.* 40, 921-935.

Zhang, R., Kim, T.K., Qiao, Z.H., Cai, J., Pierce, W.M., Jr., Song, Z.H., 2007. Biochemical and mass spectrometric characterization of the human CB2 cannabinoid receptor expressed in *Pichia pastoris*--importance of correct processing of the N-terminus. *Protein Expr. Purif.* 55, 225-235.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme revisado no Capítulo I, há um número considerável de estudos avaliando o efeito do 17- β -estradiol em modelos *in vitro* em diversos tipos de linhagens e cultura primária de células foliculares da tireoide. Independente do tipo de modelo, há uma consistência e uma reprodutibilidade nos resultados diretos e indiretos obtidos após estimulação com estradiol. Observou-se que os efeitos do estradiol podem ser mediados por vias não genômicas, como pelo aumento da fosforilação da proteína ERK 1-2, a qual é mediada via ativação das proteínas PKC e c-RAS e também via aumento da expressão da PI3K que por sua vez levam a ativação da Akt e mTOR. Vale ressaltar que todos esses efeitos citados levam à proliferação das células foliculares da tireoide.

A presença do receptor da progesterona no tecido tireoidiano normal é a primeira evidência de que a progesterona pode ter ação direta na célula folicular da tireoide, embora, conforme demonstrado na revisão sistemática do Capítulo II, os estudos avaliados na literatura apresentem inconsistência de resultados.

Em nosso modelo avaliado, descrito no Capítulo III, a manutenção da diferenciação das células foliculares foi avaliada pela resposta ao TSH, que sabidamente, estimula a expressão dos genes TPO, TG e NIS. Este modelo mostrou-se adequado para avaliar a expressão desses genes. A utilização de linhagens de

células foliculares de tireoide, além de não apresentar um fenótipo comum e serem dotadas de mutações, em geral, apresentam também a perda da expressão de genes que as diferenciam em células foliculares normais e que são essenciais para manter a função dessas células.

Para análise de expressão gênica é aceito que não existe um gene normalizador ideal para todos os experimentos e, por isso, há a necessidade de validar isoladamente cada condição experimental, pois a escolha de um gene normalizador não adequado pode levar a uma interpretação equivocada dos efeitos biológicos estudados em seu experimento. Em nosso modelo, após estimular as células foliculares com estradiol e progesterona, bem como com seus respectivos antagonistas, identificamos que a β -actina é um gene normalizador aplicável e apresenta uma maior estabilidade quando comparadas com os genes TBP, B2M e GADPH (Capítulo IV).

Nos experimentos do Capítulo V, demonstramos que a progesterona é capaz de mediar aumento significativo da expressão dos genes NIS, TG e TPO e, pelo fato da mifepristona inibir esse efeito, podemos sugerir a hipótese de que esse efeito direto da progesterona nas células foliculares da tireoide é mediado por receptores clássicos. Até o momento não havia conhecimento sobre os possíveis efeitos da progesterona nestas células.

Por fim, no Capítulo VI, representando o primeiro relato na literatura em células foliculares da tireoide humana normal, demonstramos que estas expressam tanto o gene como a proteína do receptor de membrana GPR30 e sua possível co-localização

na membrana celular e espaço perinuclear, corroborando a hipótese de translocação do GPR30, estudada em outros tipos celulares.

Como conclusões finais, baseados nos resultados obtidos nos estudos que compõem essa tese, a progesterona aumentou a expressão dos genes NIS, TG e TPO em células foliculares da tireoide humana *in vitro* e, além disso, essas células expressam tanto o gene como a proteína para o receptor de membrana GPR30 que possivelmente está co-localizado tanto na membrana plasmática como na membrana do retículo endoplasmático (Figura 10).

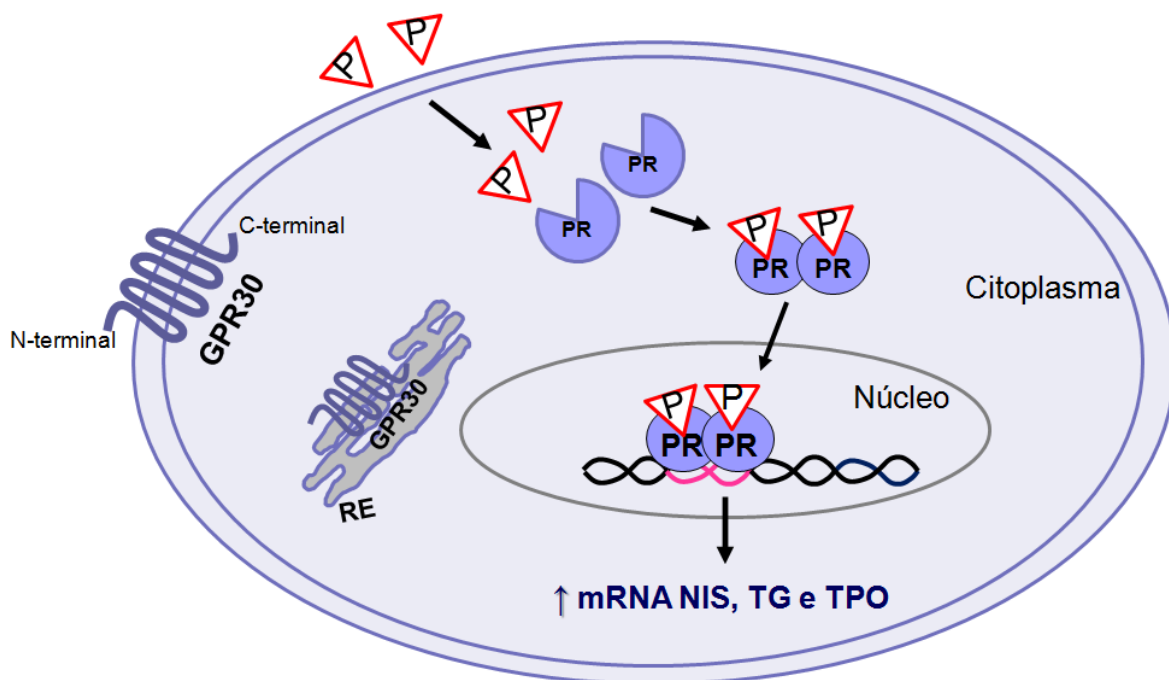


Figura 10: Efeito da progesterona na expressão dos genes NIS, TG e TPO e a possível localização do receptor de membrana GPR30 em um modelo de células foliculares normais da tireoide humana em cultura primária.

PERSPECTIVAS E RESULTADOS PRELIMINARES

A avaliação da expressão das proteínas NIS, TG e TPO está sendo realizada e ainda não temos conclusões devido ao pequeno número de culturas analisadas.

Temos, como perspectivas futuras, avaliar o efeito da progesterona em modelos 3D, o qual representa o modelo mais adequado para tal análise, tanto na expressão das proteínas NIS, TG e TPO como na atividade da enzima TPO.

Por outro lado, este modelo é ideal para avaliar os efeitos não clássicos da progesterona. Como resultados preliminares têm-se os resultados da ativação das proteínas AKT e ERK 1/2 onde estimulamos as células foliculares da tireoide por 5, 10, 15 e 30 minutos; até o momento, temos o resultado de apenas uma cultura (Figura 11).

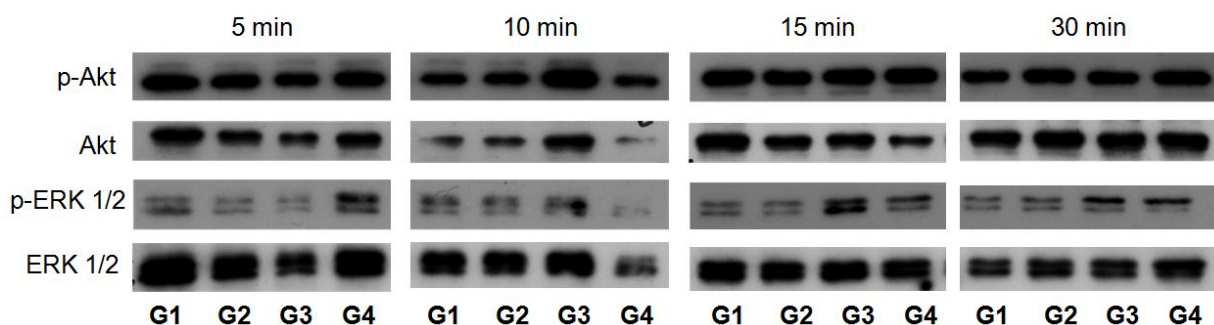


Figura 11 - Efeitos da progesterona na fosforilação das proteínas AKT e ERK 1/2.

Resultados preliminares (n=1). G1: meio 2H; G2: meio 2H + TSH 20 μ IU/mL; G3: meio 2H + TSH 20 μ IU/mL + progesterona 10 nM; G4: meio 2H + TSH 20 μ IU/mL + progesterona 10 nM + mifepristona 100 nM.

Em relação ao GPR30 temos como perspectiva mais importante avaliar a funcionalidade desse receptor nas células foliculares, expondo-as a antagonista, agonistas e RNA de interferência específicos para o receptor GPR30. Em andamento em nosso grupo, está sendo avaliada a expressão deste receptor em tecido tireoidiano normal e em bócio bem como em câncer papilar de tireoide. Além disso, estamos estudando o efeito da progesterona sobre a atividade da tireoperoxidase.

FONTES DE FINANCIAMENTO

Esta Tese foi financiada através de editais disponíveis nas agências federais de fomento para obtenção de recursos (CAPES/CNPq, PROPESQ/UFRGS e FIPE/HCPA).