

# **MODULAÇÃO DA CAPTAÇÃO DE IODETO E DA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES DE ÁCIDO RETINÓICO (RAR E RXR) PELA TIREOTROFINA E PELO ÁCIDO RETINÓICO EM CÉLULAS TIREÓIDEAS NORMAIS PCCL3**

**Elaine Cristina Lima de Souza**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências (Fisiologia).

Orientadora:

Prof<sup>ª</sup>. Denise Pires de Carvalho

Co-orientador:

Prof. Luiz Eurico Nasciutti

Rio de Janeiro  
Fevereiro/ 2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**FICHA CATALOGRÁFICA**

---

Souza, Elaine Cristina Lima

Modulação da captação de iodeto e da expressão dos receptores RAR e RXR pelo ácido retinóico em células tireóideas normais PCCL3 / Elaine Cristina Lima de Souza. Rio de Janeiro: UFRJ, IBCCF, 2008.  
X, 85f. il.

Orientadora: Denise Pires de Carvalho

Co-orientador: Luiz Eurico Nasciutti

Dissertação de Mestrado – UFRJ / IBCCF/ Ciências Biológicas – Fisiologia, 2008.

Referências: f.74-83

1. Captação de Iodeto. 2. Ácido Retinóico. 3. Receptores RAR e RXR. 4. Células tireóideas PCCL3. I. Carvalho, Denise P. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia. III. Título.

Este trabalho é dedicado aos meus queridos pais, que sempre me incentivaram a estudar e a seguir meus sonhos. Muito Obrigada!

## AGRADECIMENTOS

---

A Deus por me dar força e a sabedoria necessária para conquistar meu objetivo.

A minha orientadora Denise Pires de Carvalho, por ser minha mestra e minha maior incentivadora.

Ao meu co-orientador Luiz Eurico Nasciutti que me adotou em seu laboratório o qual foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos do LFE, cujos nomes não citarei para que não me esqueça de nenhum, já que todos tiveram sua participação neste trabalho, seja no desenvolvimento deste, seja nos momentos de descontração, importantíssimos para minhas inspirações científicas.

Aos amigos do meu laboratório adotivo, que me acolheram como seu membro e que sempre me trataram com respeito e amizade.

A Christina Takiya por estar sempre pronta a me ajudar,

As minhas companheiras de sempre: Celia Palmero, Natália Mação, Mônica Mühlbauer, Flávia Nóbrega, Sabrina Coelho e Renata Grozovski, obrigada por estarem sempre ao meu lado, na alegria e na tristeza.

A minha amiga de coração Camilla Antonieta, que aos poucos se tornou uma pessoa muito importante na minha vida.

Enfim, agradeço a toda minha família pai, mãe, avó, irmãos, por me ajudarem a perseguir meus sonhos sempre.

---

## **MODULAÇÃO DA CAPTAÇÃO DE IODETO E DA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES DE ÁCIDO RETINÓICO (RAR E RXR) PELA TIREOTROFINA E PELO ÁCIDO RETINÓICO EM CÉLULAS TIREÓIDEAS NORMAIS PCCL3**

Elaine Cristina Lima de Souza

Orientadora: Denise Pires de Carvalho

Co-orientador: Luiz Eurico Nasciutti

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Fisiologia).

O ácido retinóico (AR) tem sido usado para o tratamento rediferenciador do carcinoma diferenciado avançado da tireóide. Pouco se sabe sobre a regulação dos receptores de AR na tireóide. Na tentativa de determinar o mecanismo usado pelo AR, tivemos como objetivo avaliar os efeitos do ácido retinóico sobre a função do co-transportador sódio/iodeto (NIS) e a regulação da expressão dos receptores de ácido retinóico RAR ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) e RXR ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) na linhagem de células tireóideas PCCL3. As células PCCL3 foram tratadas por 72 horas com  $1\mu\text{M}$  de all-trans-AR,  $1\mu\text{M}$  de 13-cis-AR ou veículo (0,1% etanol), na presença ou ausência de TSH. O AR não alterou a viabilidade celular medida pelo MTT. Também não encontramos alterações provocadas pelo AR na morfologia celular, quando analisada por microscopia de contraste de fase. O AR diminuiu significativamente a captação de iodeto pelas células, assim como a expressão do mRNA do NIS avaliada por RT-PCR. Apesar desta diminuição, a proteína NIS continuou presente devido a sua meia-vida longa, porém o tratamento com AR diminuiu a sua translocação para a membrana plasmática. A avaliação da expressão e localização celular dos receptores foi feita por imunocitoquímica. Observamos que os receptores RAR $\alpha$ , RXR $\alpha$ , RXR $\beta$ , RXR $\gamma$  estão expressos e localizados no núcleo das células. O RAR $\beta$  localizou-se no citoplasma celular. O receptor RAR $\gamma$  não está expresso nestas células. O tratamento com AR regulou negativamente a expressão de dois

receptores de AR, o RAR $\alpha$  e o RAR $\beta$ . Na ausência de TSH por 48h observamos diminuição da captação de iodeto e diminuição significativa na expressão desses receptores. Ao repormos o TSH por 48h, observamos que há retorno da captação de iodeto sem o retorno da expressão dos receptores RAR $\alpha$  e RAR $\beta$ . Nesse momento, as células que não expressam os RARs foram tratadas com AR e TSH. Observamos a mesma redução da captação de iodeto observada quando o tratamento foi feito na presença dos receptores. Concluimos que o AR diminui a captação de iodeto das células PCCL3 devido à reduzida expressão de mRNA do NIS e por este não conseguir translocar-se eficientemente para a membrana. A célula PCCL3 expressa quase todas as isoformas dos receptores de AR, exceto o RAR $\gamma$ , pelo menos quando na presença de TSH. O TSH e o AR modulam positiva- ou negativamente os receptores RAR, respectivamente. A reposição do TSH restabelece a captação de iodeto sem que seja necessária a re-expressão dos receptores RAR. O tratamento com AR diminuiu a captação de iodeto mesmo quando feito na ausência dos RARs, sugerindo que o AR possa atuar diminuindo a captação de iodeto via os RXRs ou por efeitos não genômicos.

Palavras-chave: Captação de Iodeto, Ácido Retinóico, Receptores RAR e RXR, Células tireóideas PCCL3.

Rio de Janeiro  
Fevereiro, 2008.

**ABSTRACT**

---

**IODIDE UPTAKE AND RETINOIC ACID RECEPTORS (RAR AND RXR) EXPRESSION MODULATION BY THYROTROPIN AND RETINOIC ACID IN THYROID NORMAL CELL LINE PCCL3**

Elaine Cristina Lima de Souza

Orientadora: Denise Pires de Carvalho

Co-orientador: Luiz Eurico Nasciutti

Abstract da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Fisiologia).

Retinoic acid (RA) has been used for redifferentiation in thyroid carcinoma. It is unclear how retinoic receptors are regulated. In order to determine the mechanisms used by RA, to measure its effects retinoic acid effects on sodium-iodide symporter (NIS) function and retinoic acid receptors RAR ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) and RXR ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) expression in the normal thyroid cell line PCCL3. PCCL3 cells were treated during 72 hours with all-trans-RA (1 $\mu$ M), 13-cis-RA (1 $\mu$ M) or vehicle (ethanol 0.1%), in the presence or absence of TSH. Retinoic acid did not change cellular viability. We did not find any difference in cellular morphology in microscopy RA decreased iodide uptake by cells significantly as the mRNA expression evaluated using RT-PCR. Even though decreased, NIS protein still is present due its long half-life; however RA treatment decreased translocation to the plasmatic membrane. Expression and cellular localization of the receptors was evaluated by immunofluorescence. The RAR $\alpha$ , RXR $\alpha$ , RXR $\beta$  and RXR $\gamma$  receptors were expressed and localized in nucleus. RAR $\beta$  was localized in the cellular cytoplasm. RAR $\gamma$  receptor isn't expressed in these cells. RA treatment promoted downregulation of RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  and RXR $\gamma$ . In the absence of TSH during 48 hours the iodide uptake decreased and the receptors expression decreases significantly. When TSH was replaced there was restoration in iodide uptake without restoration of RA receptors. In this moment, cells aren't expressed RARs were treated with RA and TSH. We noted same iodide



uptake decrease observed when treatment was done in the presence of the receptors. In conclusion, RA decrease iodide uptake in PCCL3 cells because the decrease in mRNA expression and because it can't translocated efficiently to membrane. PCCL3 cells expressed almost all isoforms RA receptors, except RAR $\gamma$ , at least in the TSH presence. TSH and RA can modulate positively and negatively RAR receptors, respectively. TSH replaced restored iodide uptake without restored RAR receptors expression. RA treatment decrease iodide uptake even when done in the RARs absence, suggesting RA can act decreasing iodide uptake by RXRs receptors or by non-genomics effects.

Key words: Iodide Uptake, Retinoic Acid, RAR and RXR Receptors, Thyroid cell line PCCL3.

Rio de Janeiro  
Fevereiro, 2008

**ABREVIATURAS**

---

<b>AMPC</b>	monofosfato cíclico de adenosina
<b>AP-1</b>	fator de transcrição
<b>AR</b>	ácido retinóico
<b>ARO , FRO, ATC</b>	linhagem de células derivadas de carcinoma anaplásico humano
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>CDT</b>	carcinoma diferenciado da tireóide
<b>CRE</b>	elemento responsivo ao AMPcíclico
<b>CREB</b>	proteína ligadora de CRE
<b>D1</b>	iodotironina desidase tipo I
<b>DMSO</b>	dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	ácido desoxiribonucléico
<b>DNMT</b>	DNA metiltransferase
<b>DO</b>	densidade óptica
<b>EGF</b>	fator de crescimento epitelial
<b>ER</b>	receptor de estrogênio
<b>ERK1/2</b>	cinase regulado por sinal extracelular
<b>F9</b>	linhagem de células de carcinoma embrionário murino
<b>FA</b>	adenoma folicular
<b>FRTL-5</b>	linhagem de células de tireóide normal de rato
<b>FTC</b>	células derivadas de carcinoma folicular
<b>FTC-133</b>	linhagem de células derivadas de carcinoma folicular humana
<b>GAPDH</b>	gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
<b>HBSS</b>	Tampão Hank's Balanced Salt Solution
<b>HDAC</b>	Histona desacetilase
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	peróxido de hidrogênio
<b>Hth74 e C643</b>	células derivadas de carcinoma anaplásico humana
<b>KClO<sub>4</sub></b>	perclorato de potássio
<b>LPA</b>	leucemia promielocítica aguda

<b>MIT</b>	Massachusetts Institute of Technology
<b>MMI</b>	metimazole
<b>MTC</b>	carcinoma medular da tireóide
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy methoxyphenyl)-2-(4- ulfophenyl)-2H-tetrazolium)
<b>mRNA</b>	ácido ribonucléico mensageiro
<b>NADPH</b>	fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo
<b>NIS</b>	co-transportador sódio/iodeto
<b>NPA</b>	linhagem de células derivadas de carcinoma folicular pouco diferenciado
<b>NTF-1</b>	NIS-TSH-responsive factor
<b>Nthy-ori 3-1</b>	linhagem de células de tireóide normal humano
<b>NUE</b>	NIS upstream enhancer
<b>ORF</b>	fita aberta de leitura
<b>PAX-8</b>	fator de transcrição de domínio pareado
<b>PCCL3</b>	linhagem de células de tireóide normal de rato
<b>PCI</b>	pesquisa de corpo inteiro
<b>PKA</b>	proteína cinase A
<b>PKC</b>	proteína cinase C
<b>PTC</b>	carcinoma papilífero
<b>PTU</b>	6n-propil-tiouracil
<b>RAR</b>	receptor de ácido retinóico
<b>RARE</b>	elemento responsivo ao ácido retinóico
<b>RT-PCR</b>	transcriptase reversa – reação da polimerase em cadeia
<b>RXR</b>	receptor de retinóide X
<b>SFB</b>	soro fetal bovino
<b>siRNA</b>	pequeno RNA de interferência
<b>SLC5A5</b>	família de carreadores solúveis
<b>TT</b>	células derivadas de carcinoma medular da tireóide
<b>T<sub>3</sub></b>	3, 5, 3' – triiodotironina

<b>T<sub>4</sub></b>	3, 5, 3', 5'-tetraiodotironina ou tiroxina
<b>Tg</b>	tireoglobulina
<b>ThOX1</b>	oxidase da tireóide 1
<b>ThOX2</b>	oxidase da tireóide 2
<b>TITF-1</b>	fator de transcrição tireóideo 1
<b>TPO</b>	tireoperoxidase
<b>TPS</b>	tampão fosfato de sódio
<b>TRH</b>	hormônio liberador de tireotrofina
<b>TSH</b>	hormônio estimulador da tireóide ou tireotrofina
<b>TSHR</b>	receptor para TSH
<b>UCLA R0 82 W-1</b>	linhagem de células derivadas de carcinoma folicular humano
<b>WRO</b>	linhagem de células derivadas de carcinoma folicular

## ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Modelo da estrutura secundária do NIS.....	<b>19</b>
<b>Figura 2</b>	Esquema representativo da biossíntese dos hormônios tireóideos.....	<b>20</b>
<b>Figura 3</b>	Esquema do promotor de NIS de rato.....	<b>21</b>
<b>Figura 4</b>	Alterações no processo de tumorigênese responsável pela perda da captação de iodeto nos tireócitos.....	<b>24</b>
<b>Figura 5</b>	Distribuição da intensidade da imunomarcagem das isoformas de RXR no núcleo e citoplasma.....	<b>34</b>
<b>Figura 6</b>	Viabilidade das células PCCL3 tratadas com all-trans-AR ou 13-cis-AR.....	<b>46</b>
<b>Figura 7</b>	Microscopia de contraste de fase.....	<b>47</b>
<b>Figura 8</b>	Efeitos do all-trans AR, 13-cis AR ou veículo sobre o acúmulo de iodeto das células PCCL3.....	<b>48</b>
<b>Figura 9</b>	Efluxo de iodeto <i>in vitro</i> nas células.....	<b>49</b>
<b>Figura 10</b>	Análise de RT-PCR.....	<b>50</b>
<b>Figura 11</b>	Análise por microscopia confocal da expressão de NIS.....	<b>51</b>
<b>Figura 12</b>	Imunofluorescência para RARs e RXRs na presença de TSH.....	<b>53</b>
<b>Figura 13</b>	Imunofluorescência para RARs e RXRs na presença de TSH e AR.....	<b>54</b>
<b>Figura 14</b>	Influência do TSH para a resposta ao AR.....	<b>56</b>
<b>Figura 15</b>	Imunofluorescência para RARs e RXRs na ausência de TSH.....	<b>57</b>
<b>Figura 16</b>	Captação de iodeto após reposição de TSH.....	<b>58</b>
<b>Figura 17</b>	Imunofluorescência para RARs e RXRs após reposição de TSH.....	<b>59</b>
<b>Figura 18</b>	Efeitos do all-trans AR e 13-cis AR ou veículo sobre o acúmulo de iodo nas células PCCL3 quando tratadas por 48h na presença de TSH.....	<b>61</b>

<b>Esquema 1</b>	Desenhos experimentais usados neste trabalho.....	<b>40</b>
<b>Esquema 2</b>	Extração de RNA total.....	<b>43</b>
<b>Esquema 3</b>	Regulação da transcrição do gene de NIS por TSH e pelo ácido retinóico.....	<b>69</b>
<b>Tabela 1</b>	Efeitos do AR nas células tireóideas.....	<b>85</b>
<b>Tabela 2</b>	Seqüências senso (forward) e antisenso (reverse) dos oligonucleotídeos (iniciadores) específicos para os genes do gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e do NIS.....	<b>43</b>
<b>Tabela 3</b>	Especificações dos anticorpos para os receptores de AR Santa Cruz.....	<b>45</b>
<b>Tabela 4</b>	Relação entre a expressão dos receptores de AR e a captação de iodeto na ausência e presença de AR.....	<b>55</b>
<b>Tabela 5</b>	TSH modulando a captação de iodeto e a expressão dos receptores de AR.....	<b>59</b>
<b>Gráfico 1</b>	Comparação de estudos clínicos mostrando a resposta dos pacientes com carcinomas papilífero, folicular e misto ao tratamento com AR.....	<b>29</b>
<b>Gráfico 2</b>	Representa o resultado de diferentes trabalhos mostrando a proporção dos receptores de AR que estão expressos em espécimes cirúrgicos e linhagens tumorais	<b>33</b>

## SUMÁRIO

<b>I.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	17
	<b>1. Importância da Captação de Iodeto pela Glândula Tireóide</b>	17
	1.1) <i>A Molécula de NIS e sua Função</i>	18
	1.2) <i>Regulação de NIS por Tireotrofina</i>	20
	1.3) <i>Atividade Transcricional do gene do NIS</i>	21
	1.4) <i>Regulação Pós-Transcricional de NIS</i>	22
	<b>2. Carcinoma Tireóideo</b>	22
	<b>3. Retinóides</b>	25
	3.1) <i>Ácido Retinóico e a Tireóide Normal</i>	25
	3.2) <i>Ácido Retinóico e o Câncer de Tireóide</i>	27
	<b>4. Mecanismos de Ação do Ácido Retinóico</b>	30
	4.1) <i>Expressão dos Receptores de AR em Células Tireóideas Normais e Tumorais</i>	31
	4.2) <i>Relação entre a Expressão dos Receptores RAR e RXR e os Efeitos do AR</i>	35
<b>II.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	37
<b>II.I</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	37
	1) Efeitos do ácido retinóico na célula PCCL3:	37
	2) Relação entre a expressão dos receptores de AR e a captação de iodeto:	37

<b>II. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>38</b>
1. Cultura de Células	38
2. Tratamentos	38
3. Ensaio do MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy-methoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)	41
4. Ensaio de Captação de Iodeto e Efluxo de Iodeto	41
5. RT-PCR semi-quantitativo para NIS	42
6. Imunofluorescência para NIS – MICROSCOPIA CONFOCAL	44
7. Imunofluorescência para os receptores RAR e RXR	44
8. Análises Estatísticas	45
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>46</b>
1) Efeitos do Ácido Retinóico nas células PCCL3:	46
2) Alterações que o AR provoca nas células PCCL3 causando a diminuição da quantidade de iodeto intracelular:	48
3) Relação entre a expressão dos receptores de AR e a captação de iodeto:	52
4) Papel do TSH como modulador da expressão dos receptores de AR:	55
5) A reposição do TSH restaura a captação sem normalizar a expressão dos receptores de AR:	57
6) Importância de RXR $\alpha$ e RXR $\beta$ para o efeito do AR em diminuir a captação de iodeto das células PCCL3:	60
<b>V. DISCUSSÃO</b>	<b>62</b>
<b>VI. RESUMO DOS RESULTADOS</b>	<b>71</b>



<b>VII.</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>73</b>
<b>VIII.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>74</b>
<b>IX.</b>	<b>ANEXO</b>	<b>84</b>

## I. INTRODUÇÃO

### ***1. Importância da Captação de Iodeto pela Glândula Tireóide***

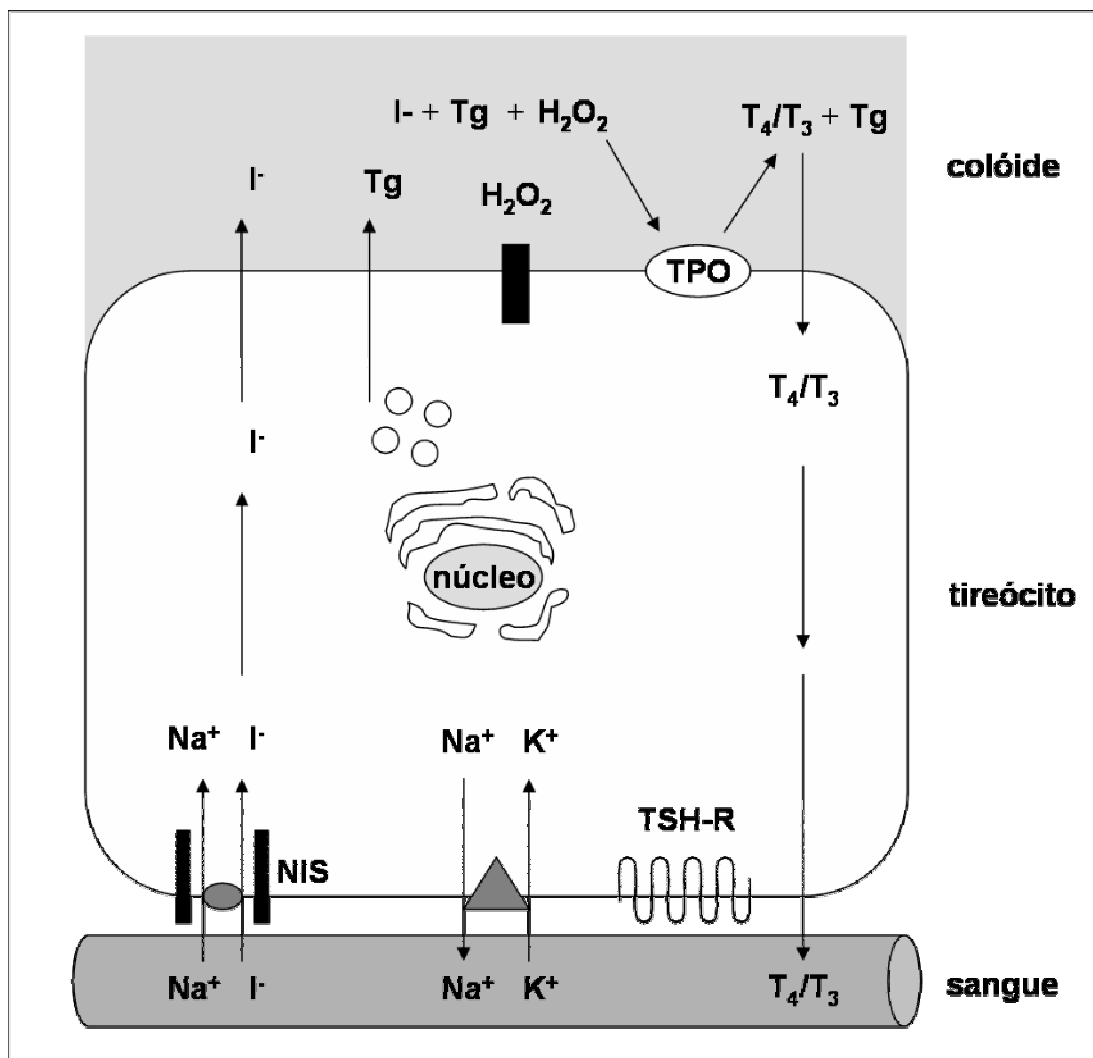
A capacidade da glândula tireóide concentrar iodeto é a base da sua síntese hormonal e possibilitou o diagnóstico e a terapia de doenças tireóideas benignas e do câncer da tireóide com iodo radioativo. No início de 1896, Baumann descreveu pela primeira vez que a glândula tireóide concentra iodo num fator de 20 a 40 vezes em relação ao plasma, em condições fisiológicas (Baumann *apud* Riesco-Eizaguirre e col., 2006). Dada a extraordinária importância do iodo na tireóide, muitos pesquisadores começaram a ampliar o conhecimento sobre a fisiologia e as doenças da tireóide. Em 1942, pesquisadores do MIT (Massachusetts Institute of Technology), mostraram que a sua capacidade de concentrar iodo possibilitava o diagnóstico e, eventualmente, a destruição das células tireóideas com iodo radioativo (Hertz, 1942 e Hertz & Roberts, 1942). Desde então, centenas de pacientes têm recebido radioiodo com objetivos médicos, melhorando significativamente o tratamento das doenças da tireóide. Em 1996 foi feita a clonagem do co-transportador sódio/iodeto, NIS, primeiro em ratos (Daí, 1996) e logo após em humanos (Smanik, 1996). Isto proporcionou o melhor entendimento da fisiopatologia da tireóide e abriu um promissor campo na pesquisa do câncer, além de abrir novas fronteiras como a busca de estratégias para reexpressar o NIS endógeno na tireóide e no câncer de mama, assim como tentar induzir expressão ectópica do NIS por transfecção do NIS em cânceres não-tireóideos (Dohan, 2003). Assim, no futuro, a terapia com radioiodo poderá ser estendida aos cânceres não-tireóideos. O conhecimento mais aprofundado do NIS e de seus reguladores é extremamente importante para futuras aplicações clínicas.

### **1.1) A Molécula de NIS e sua Função**

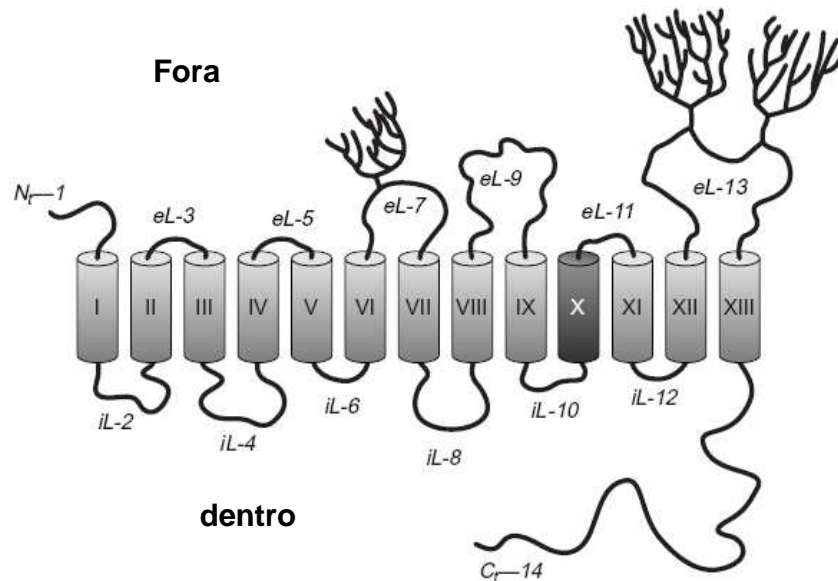
O co-transportador sódio/iodeto (NIS) é uma glicoproteína integral de membrana que medeia o transporte ativo de iodeto para dentro da célula folicular, o primeiro passo para síntese dos hormônios tireóideos. Ele faz o co-transporte de dois íons sódio ( $\text{Na}^+$ ) juntamente com um íon iodeto ( $\text{I}^-$ ), dependendo, portanto do gradiente eletroquímico de sódio mantido pela  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase sensível à oubaína (**Figura 1**). O NIS é inibido por inibidores competitivos, como o tiocianato e o perclorato. Dentro da célula, o iodeto se dirige até a membrana apical a qual atravessa pela pendrina (produto do gene da síndrome de Pendred) (Scott, 1999) e outros transportadores ainda não identificados. Assim, a polarização celular tem um papel fundamental para o correto transporte de iodeto. Na face extracelular da membrana apical a tireoperoxidase (TPO) catalisa a oxidação do iodeto o qual se liga a resíduos tirosina da tireoglobulina (Tg), assim como o acoplamento oxidativo de duas iodotirosinas que origina triiodotironina ( $\text{T}_3$ ) e tiroxina ( $\text{T}_4$ ). Este processo, chamado de organificação do iodo, ocorre na grande molécula de Tg acumulada no colóide da luz folicular e pode ser inibido pelo propiltiouracil (PTU) e metimazole (MMI), inibidores da atividade da enzima TPO. A TPO não possui atividade biológica na ausência de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que é o fator limitante para iodação da tireoglobulina quando o suprimento de iodeto é normal. O sistema de geração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  é cálcio dependente e transmembrana, sendo as principais enzimas envolvidas as oxidases da tireóide 1 (ThOX1) e 2 (ThOX 2), também chamadas “Duox” por serem oxidases duais que pertencem a família da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato hidrogênio (NADPH) oxidase (NOX) que foram recentemente clonadas (De Deken, 2000). Depois da endocitose e degradação fagolisossomal da tireoglobulina,  $\text{T}_3$  e  $\text{T}_4$  são liberados na circulação. O processo inteiro, incluindo transporte de iodeto e expressão de NIS, é regulado pelo hormônio estimulador da tireóide (TSH), que interage com o receptor de TSH (TSHR; receptor transmembrana acoplado a proteína G estimulatória) localizado na membrana basolateral e estimula as vias relacionadas ao AMP cíclico.

O gene do NIS humano está localizado no cromossoma 19p12 -13.2, e codifica uma glicoproteína de 643 aminoácidos com uma massa molecular de aproximadamente 70-90 kDa. O gene é constituído de 15 exons interrompidos por 14 íntrons e tem uma

fita aberta de leitura (ORF) de 1929 nucleotídeos. Como um membro da família de carreadores solúveis (SLC5A5), que usam o gradiente eletroquímico de sódio como força motriz, o NIS é formado por 13 segmentos transmembrana com a face N-terminal para o meio extracelular e o COOH-terminal para a face citosólica (**Figura 2**) (Levy, 1997). Existem três tipos de glicosilação na forma madura do NIS, mas ela não parece ter um papel importante na estabilidade, atividade e endereçamento para a membrana plasmática (Levy, 1998). O NIS é também uma fosfoproteína, e a maioria da fosforilação ocorre na região COOH terminal (Riedel, 2001).



**Figura 1.** Esquema representativo da biossíntese dos hormônios tireóideos. Adaptado de Filetti e col; 1999.



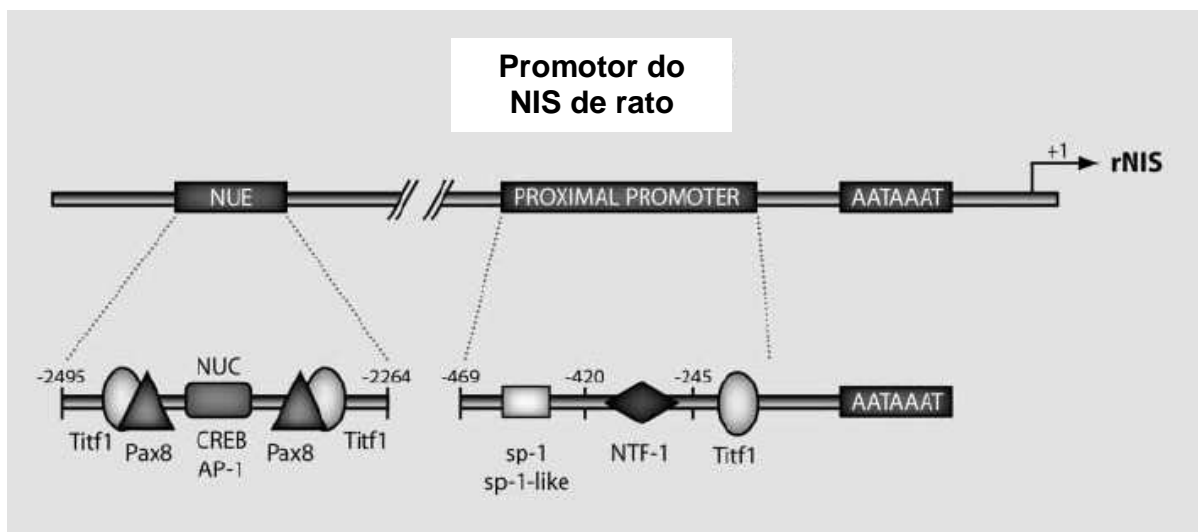
**Figura 2.** Modelo da estrutura secundária do NIS. Adaptado de Dohan e col; 2000.

### 1.2) Regulação de NIS por Tireotrofina

A tireotrofina (TSH) é o principal regulador hormonal da função tireóidea e a maioria das suas ações é mediada pela ativação da adenilato ciclase através da ligação a proteína G $\alpha$ s. Tem sido mostrado que o TSH estimula o transporte de iodeto para dentro das células tireóideas via AMPcíclico de maneira dependente de síntese protéica (Weiss, 1984 e Nissim, 1987). Depois da clonagem do NIS, muitos estudos revelaram que pelo menos dois mecanismos são usados pelo TSH para regular o transporte de iodeto. O primeiro e mais óbvio é a transcrição do gene do NIS, positivamente regulada, em estudos *in vitro* (Kogai, 1997 e Ohno, 1999) e *in vivo*. O segundo refere-se à indução da atividade da proteína NIS (Riedel, 2001 e Paire, 1997), por modificações pós-transcricionais, que são essenciais para o tráfego de NIS para membrana.

### 1.3) Atividade Transcricional do gene do NIS

A estrutura do promotor do gene do NIS de rato tem sido estudada em detalhe nos últimos anos. Existem duas principais regiões regulatórias: parte do promotor proximal de NIS localizado entre os nucleotídeos -124 e -420, relativo ao sítio de início da transcrição, e o NIS upstream enhancer (NUE) localizado entre os nucleotídeos -2260 e -2495 (**Figura 3**) (Ohno, 1999 e Taki, 2002). O promotor proximal de NIS contém sítios de ligação para TITF-1 (Endo, 1997), NTF-1 (NIS-TSH-responsible factor) (Ohmonri, 1998), e Sp-1 (Xu, 2002), enquanto o NUE contém os sítios de ligação para PAX-8 e TITF-1 e uma seqüência símil ao elemento responsivo ao AMPcíclico (CRE). Embora a importância destas regiões e fatores precisem ser mais estudadas, está claro que NUE é essencial para a atividade transcricional do NIS e que a interação funcional entre PAX-8 e o fator de ligação à seqüência símil ao CRE é necessária para ativar a transcrição, específica da tireóide, de maneira dependente de AMPcíclico. Ao contrário, o TITF-1 parece não ser necessário para induzir a transcrição dependente de NUE (Ohno, 1999 e Taki, 2002).



**Figura 3.** Esquema do promotor de NIS de rato. Adaptado de Riesco-Eizaguirre e col; 2006.

#### **1.4) Regulação Pós-Transcricional de NIS**

O NIS precisa se localizar na membrana para ser totalmente funcional. Isto é importante para o transporte de iodo na tireóide e é o princípio da radioiodoterapia para o câncer de tireóide. A diminuição na captação de iodeto observada em muitos cânceres de tireóide é devido ao não endereçamento do NIS para a membrana plasmática. Portanto, é interessante elucidar os mecanismos que regulam a distribuição subcelular de NIS.

Depois da deprivação do TSH, células de tireóide de rato em cultura ainda expressam NIS por muitos dias devido à sua longa meia-vida (3 a 5 dias), mas a proteína não permanece na membrana por muito tempo e o transporte de iodeto diminui nas primeiras 24 horas. Isto sugere que existe um mecanismo dependente de TSH para manter o NIS na membrana plasmática (Riedel, 2001). Como o NIS é uma fosfoproteína e a fosforilação foi relatada como tendo um papel no endereçamento de outros transportadores para a membrana, foi postulado que este seria o mecanismo responsável pela regulação pós-transcricional do NIS pelo TSH. De fato, o padrão de fosforilação do NIS parece ser parcialmente modulado pelo TSH, de modo dependente de PKA (Riedel, 2001). No entanto, ainda não se sabe se a fosforilação do NIS está envolvida no endereçamento e retenção do NIS na membrana plasmática basolateral.

## **2. Carcinoma Tireóideo**

A maioria dos nódulos tireóideos é benigno, com uma incidência de carcinoma em cerca de 3% a 4%. Foi notada uma preponderância do sexo feminino entre os pacientes que desenvolvem carcinoma da tireóide na faixa etária de adultos jovens e na meia-idade, talvez havendo alguma relação com a expressão de receptores de estrogênio no epitélio tireóideo neoplásico. Por outro lado, os casos que ocorrem na infância e nas fases mais avançadas da vida apresentam distribuição equilibrada entre os sexos masculino e feminino. Os principais tipos de carcinoma da tireóide e suas freqüências relativas são os seguintes:

- Carcinoma Papilífero (75% a 85% dos casos)
- Carcinoma Folicular (10% a 20% dos casos)
- Carcinoma Anaplásico (< 5% dos casos)
- Carcinoma Medular (5% dos casos)

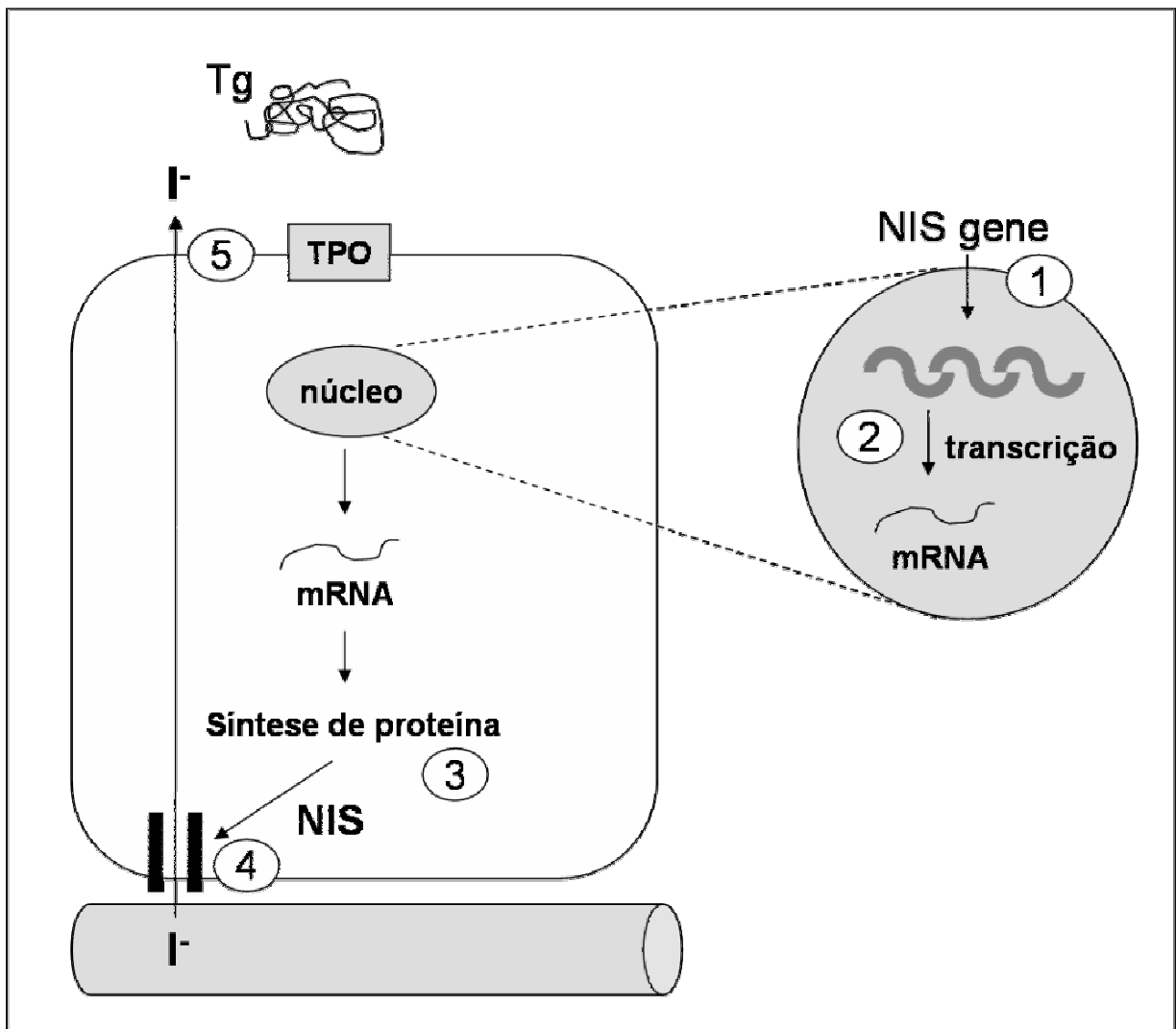
Os carcinomas da tireóide são derivados do epitélio folicular, exceto os carcinomas medulares; estes são derivados das células parafoliculares ou células C (Kumar, 2005). Os carcinomas papilífero e folicular são os chamados carcinomas diferenciados da tireóide (CDT), enquanto que o carcinoma anaplásico é um carcinoma indiferenciado.

A maioria dos carcinomas papilífero e folicular mantêm a grande parte das propriedades do tireócito normal. Com a progressão tumoral, as características morfológicas e funcionais dos CDT desaparecem. Isto corresponde a um crescimento mais agressivo, espalhamento metastático e perda da captação de iodeto. Esta perda de diferenciação é observada em cerca de 1/3 dos pacientes com CDT (Simon, 1998). A dediferenciação corresponde à perda de funções específicas da tireóide como redução da expressão do receptor de TSH e, principalmente, diminuição da capacidade de captação de iodeto, o que torna os tratamentos convencionais ineficazes.

Notamos, portanto, que o câncer de tireóide apesar de acometer um pequeno número de pessoas, e ser responsável por um baixo índice de mortalidade, pode tornar-se mais agressivo com a perda da diferenciação e, assim, aumento da mortalidade nos pacientes que apresentam este tumor. A partir destas considerações podemos observar a necessidade de se buscar terapias coadjuvantes no tratamento do câncer de tireóide, principalmente para aqueles que não respondem à terapia com radioiodo, como os tumores pouco diferenciados ou indiferenciados.

Assim, uma das idéias chave para o tratamento seria o uso de substâncias capazes de reverter à perda de diferenciação, aumentando principalmente a capacidade de captação de iodeto para que possa ser usada a radioiodoterapia. Sabendo-se que a perda da captação de iodeto que ocorre no CDT, tornando-o irresponsivo a radioiodoterapia, pode ser devida a alterações em diferentes estágios da síntese do NIS (Filetti, 1999) (**Figura 4**), faz-se necessária à descoberta de novas moléculas capazes de modular estas etapas.





**Figura 4.** Possíveis alvos de alterações que ocorrem no processo de tumorigênese responsável pela perda da captação de iodo nos tireócitos. 1) Alterações estruturais no gene de NIS; 2) Alterações na regulação da transcrição de NIS; 3) Alterações na síntese da proteína NIS; 4) Alterações no transporte de NIS para membrana plasmática; 5) Alterações na organização do iodo. Adaptado de Filetti e col; 1999.

### **3) Retinóides**

Retinóides são análogos naturais e sintéticos do ácido retinóico, um metabólito da vitamina A, e são moduladores específicos da proliferação celular, da diferenciação e da morfogênese em vertebrados (Kagechika, 2005). O termo “retinóide” foi primeiramente definido pela estrutura química da vitamina A, mas é agora reconhecido como o termo biológico para duas classes de ligantes de receptores nucleares que medeiam as atividades biológicas do AR, que são o receptor de ácido retinóico (RAR) e o receptor de retinóide X (RXR), como proposto por Sporn e colaboradores em 1994 (Sporn, 1994). Estudos clínicos e experimentais têm revelado que os retinóides regulam grande variedade de processos biológicos essenciais, como a morfogênese e a organogênese embrionária de vertebrados, a parada do crescimento celular, a diferenciação e a apoptose (Sporn 1994; Sporn, 1976; Blomhof, 1994; Kastner, 1995; Chambon, 2005). O All-trans ácido retinóico, o mais potente metabólito biologicamente ativo da vitamina A, pode corrigir os principais defeitos causados pela deficiência da vitamina A em animais adultos (Kastner, 1995). Alguns estudos têm mostrado evidências das possibilidades do uso de AR no tratamento e prevenção do câncer (Hong, 1997). O mais expressivo exemplo de atividade anticâncer de retinóides é o tratamento de pacientes com leucemia promielocítica aguda (LPA), um subtipo de leucemia promielogênica aguda, pois a adição de AR na terapia curou aproximadamente 72% dos pacientes com LPA (De The, 1990A; Degos, 2001; Lin, 1999).

#### **3.1) Ácido Retinóico e a Tireóide Normal**

O ácido retinóico possui um papel fundamental no crescimento e na diferenciação de uma variedade de células. Foi mostrado que os retinóides afetam a função tireóidea *in vivo*. Os primeiros estudos evidenciando efeito da vitamina A na função tireóidea foram descritos já na década de 40. Simkins e colaboradores (Simkins, 1947) mostraram a diminuição dos sintomas de hipertireoidismo em dois pacientes com bócio difuso tóxico tratados com altas doses de vitamina A. Além disso, observou-se

que ratos com deficiência de vitamina A apresentam aumento das concentrações séricas de  $T_3$  e  $T_4$  e do índice de tiroxina livre (Morley, 1978). Em 1983, Garcin e colaboradores, também mostraram que a deficiência de vitamina A em ratos foi associada com aumento nas concentrações séricas dos hormônios tireóideos.

Na década de 90 foram realizados diversos estudos sobre os efeitos do AR em cultura de células tireóideas normais. Em 1992, Hishinuma e colaboradores, mostraram o efeito do AR na síntese de  $T_4$  e  $T_3$  em cultura de folículos de tireóide de porcos, cultivados sobre gel de colágeno tipo I. Observaram que o AR reduziu em 55% e 44% a produção de  $T_4$  e  $T_3$  respectivamente. Um ano depois, Namba e colaboradores, usando cultura primária de tireócitos humanos derivados de tecido tireóideo de doença de Graves humano, verificaram que 72 horas de tratamento com AR (0; 0,01; 0,1; 1 $\mu$ M) foi capaz de reduzir a expressão de mRNA de TPO e de Tg, diminuir a secreção de Tg, porém não afetou a incorporação de timidina tritiada. Del Senno e colaboradores (1993) mostraram, em cultura primária de folículos de tireóides humanas derivadas de áreas normais da glândula de pacientes que sofreram cirurgia por nódulo solitário não funcionante, que o tratamento por 72 horas com All-trans AR (1 $\mu$ M) reduziu a incorporação de timidina tritiada e o conteúdo de DNA. Com relação à expressão de mRNA de Tg, o AR não teve efeito, porém reduziu a expressão do mRNA da TPO, tanto basal quanto a expressão estimulada por TSH.

Uma importante função tireóidea que parece também ser modulada pelo ácido retinóico é a captação de iodeto. Já foi mostrado o efeito do ácido retinóico sobre a expressão de NIS e a captação de iodeto na linhagem FRTL-5 de células tireóideas normais de rato. O ácido retinóico promoveu a redução na expressão de NIS, avaliada por Northern blot, e também reduziu significativamente a captação de  $^{125}$ iodo (Schmutzler, 1997).

Alguns trabalhos têm mostrado o efeito do AR sobre o eixo hipotálamo-hipófise-tireóide. Estudos experimentais e clínicos mostram diminuição do nível sérico de TSH, redução da resposta do TSH ao hormônio liberador de tireotrofina (TRH) e conseqüentemente hipotireoidismo central (Liu, 2002). Mais recentemente, em 2007, Tuncel e colaboradores mostraram por PCR em tempo real que, em outra linhagem de células tireóideas normais humanas chamada Nthy-ori 3-1, o tratamento com all-trans

AR aumentou a expressão de Tg e TPO, e diminuiu a expressão de NIS e do receptor de TSH; e estas modulações parecem ser tempo dependentes.

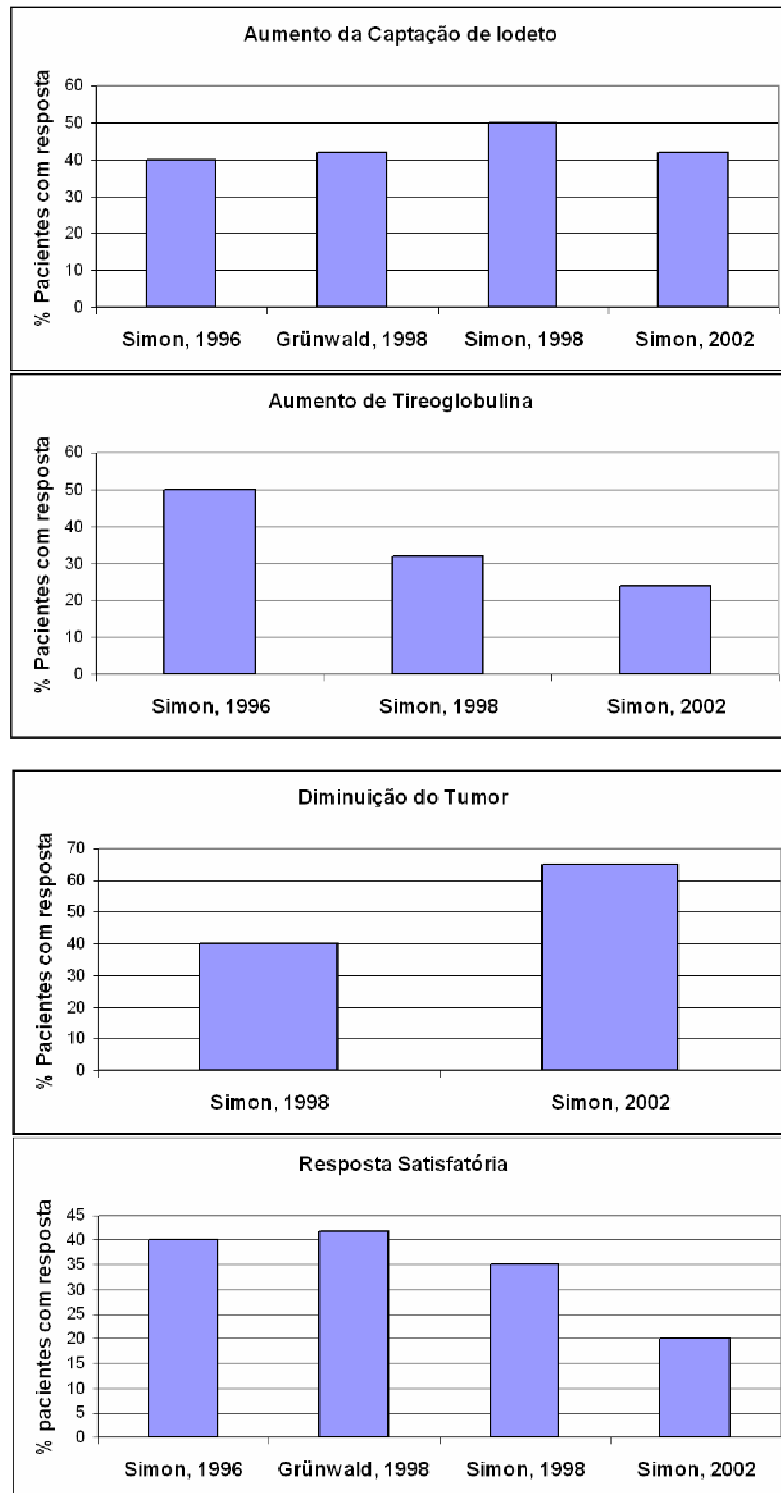
### **3.2) *Ácido Retinóico e o Câncer de Tireóide***

Sabe-se que os tumores da tireóide podem sofrer dediferenciação e isto pode causar dificuldade no tratamento e piorar o prognóstico do paciente. Como o AR possui importante função na diferenciação das células tireóideas, ele poderia ser usado para tentar rediferenciar a célula tumoral e favorecer o uso do radioiodo no tratamento da doença. No primeiro estudo clínico com AR (Simon, 1996), foram avaliados 11 pacientes com carcinoma diferenciado da tireóide (CDT) sem capacidade de concentrar radioiodo e inoperáveis, por extensa invasão local e/ou metástase à distância. Nesses pacientes, a isotretinoína, ou 13-cis-AR (1,5mg/Kg por dia), foi administrada por 5 semanas. Em 4 pacientes houve resposta satisfatória, com aumento da captação de iodeto. Posteriormente, Grünwald e colaboradores estudaram 12 pacientes com os mesmos critérios acima e administraram isotretinoína por 2 a 10 meses, na dose de 1,0 a 1,5 mg/Kg por dia. Cinco pacientes apresentaram aumento na captação de iodeto, porém em 3 o aumento foi apenas discreto. Em 1998, foi publicado um trabalho mostrando um estudo piloto realizado com 20 pacientes com carcinoma tireóideo avançado, incluindo apenas pacientes com carcinoma folicular e papilífero. Destes, 65% responderam ao tratamento de cinco semanas com 13-cis AR, com redução da tireoglobulina sérica, aumento na captação de iodeto e diminuição da massa tumoral (Simon, 1998). Um estudo piloto com aplicação de AR em 20 pacientes com carcinoma indiferenciado, que não respondiam ao tratamento convencional, mostrou que 8 pacientes tiveram diminuição ou estabilização do tamanho do tumor e/ou dos níveis de tireoglobulina sérica em adição à ativação do transporte de iodeto (Schmutzler, 2000). Em 2001, Schmutzler e colaboradores publicaram outro estudo piloto mostrando que, de 50 pacientes tratados com ácido retinóico 21 mostraram aumento na captação de iodeto depois de 5 semanas. Isto indica que o aumento da atividade de NIS e da captação de iodeto pela rediferenciação causada por AR pode ser uma alternativa terapêutica para o câncer indiferenciado da tireóide. Em 2002, foi publicado o resultado

final do estudo piloto de Simon e colaboradores. Eles obtiveram os seguintes resultados: dos 50 pacientes avaliados 30 mostraram aumento na captação de iodeto e oito um médio aumento. Os níveis de tireoglobulina se mantiveram inalterados ou diminuíram em 20 pacientes. O tamanho do tumor foi avaliado em 37 pacientes; destes houve regressão do tumor apenas em 6 e não houve mudanças em 22 pacientes. No total houve uma resposta parecida em 19 pacientes (38%). A resposta à terapia nem sempre corresponde ao aumento da captação de iodeto; também pode estar relacionado a efeitos antiproliferativos. Nesse estudo, observou-se também baixa taxa de efeitos colaterais com boa tolerância ao tratamento com retinóide. O **Gráfico 1** mostra o resumo dos resultados de estudos clínicos com ácido retinóico no câncer de tireóide.

Estudos com linhagem de células derivadas de carcinoma folicular humano (UCLA R0 82 W-1) mostraram redução da proliferação celular e aumento da captação de iodeto após tratamento com 13-cis AR, porém houve redução da atividade de iodotironina desiodase tipo I (D1) (Van Herle, 1990). Em 1994, um grupo de pesquisadores da Alemanha mostrou, em outra linhagem de carcinoma folicular, FTC-133, que o tratamento com 9-cis AR, 13-cis AR e all-trans AR induziram aumento da atividade da enzima desiodase do tipo 1, sugerindo que isto mostraria aumento de diferenciação das células de carcinoma folicular da tireóide (Schreck, 1994). Frohlich e colaboradores (2005) mostram que o AR diminuiu a proliferação, aumentou a quantidade de NIS na membrana, porém não alterou a quantidade de tireoglobulina em células derivadas de carcinoma folicular humano da tireóide (FTC-133). Nesta mesma linhagem de células, Schmutzler e colaboradores (1997), mostraram aumento da expressão de NIS, porém não mostraram aumento na captação do iodeto.

Observamos que existe muita variação na resposta ao tratamento com AR, *in vivo* e *in vitro*, e entre células normais e tumorais (**Tabela 1, em anexo**); isto pode estar relacionado a características específicas de cada célula. Devem existir diferenças entre os mecanismos de ação do AR em cada situação, causando, portanto, diferentes efeitos do AR.



**Gráfico 1** Comparação de estudos clínicos mostrando a resposta dos pacientes com carcinomas papilífero, folicular e misto ao tratamento com AR.

#### **4) Mecanismos de Ação do Ácido Retinóico**

O ácido retinóico exerce seus efeitos através de duas classes de receptores nucleares de retinóides, RARs e RXRs, ambos têm três subtipos ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ). Ligantes endógenos de RARs e RXRs são identificados como All-trans-AR e 9-cis-AR. O All-trans AR liga-se aos RARs e o 9-cis AR liga-se aos RARs e aos RXRs porém com maior afinidade ao RAR (Kagechika, 2005). Assim o 9-cis-AR é um pan-agonista para todos os seis receptores. A isotretinoína ou 13-cis-AR também pode se ligar aos RARs e aos RXRs.

Os três subtipos de RAR, RAR $\alpha$ , primeiramente identificado em 1987 pelos grupos de Pierre Chambon e Ron Evans; RAR $\beta$  e RAR $\gamma$  originam-se de três genes distintos (Giguere, 1987; Petkovich, 1987; Chambon, 1996). Para cada subtipo de RAR, várias isoformas existem e diferem entre si pela sua região N-terminal. Os RARs funcionam formando heterodímeros com os três receptores de retinóide X: RXR $\alpha$ , RXR $\beta$  e RXR $\gamma$  (Mangelsdorf, 1995; Kastner, 1997; Mark, 1999). Estudos *in vitro* demonstraram que os heterodímeros RXR-RAR atuam como reguladores dependentes de ligante através da sua ligação a uma seqüência específica do DNA, RARE, encontrada na região promotora dos genes alvo do AR.

O primeiro receptor de retinóide X identificado, o RXR $\alpha$ , foi inicialmente descrito como um receptor órfão (Mangelsdorf, 1990). No entanto, este respondia especificamente aos retinóides, já que altas concentrações de All-trans AR podiam ativar RXR $\alpha$ . Além disso, foi demonstrado que 9-cis AR, isômero do All-trans AR, é um ligante de alta afinidade para o RXR $\alpha$ , tanto quanto para o outros subtipos, RXR $\beta$  e RXR $\gamma$ , que foram descobertos mais tarde (Rowe, 1991; Yu, 1991). Ainda não é claro qual a importância da capacidade do 9-cis AR se ligar nos RARs e nos RXRs. Os RXRs são também identificados como fatores necessários para a eficiente ligação ao DNA de vários membros da superfamília de receptores nucleares e formam heterodímeros com outros receptores (Laudet, 1992; Leid, 1992). Além do mais, estudos *in vitro* têm mostrado que o RXR pode formar homodímero RXR-RXR, o que sugere a existência de uma via de sinalização de RXR independente de outros receptores nucleares (Mangelsdorf, 1991).

Enquanto os agonistas de RAR podem ativar a transcrição através de cada heterodímero, os RXRs não são capazes de responder a agonistas seletivos de RXR na ausência de ligante de RAR. A base molecular deste fenômeno, referido como subordinação de RXR ou silenciamento, tem sido desvendada. O agonista ligando ao RXR é incapaz de induzir a dissociação do co-repressor do heterodímero RXR-RAR, impedindo o recrutamento de co-ativadores (Westin, 1998). Uma ativação transcricional sinérgica é observada quando os agonistas tanto de RAR quanto de RXR são ligados simultaneamente, indicando que os RXRs não são transcricionalmente silenciados no heterodímero RXR-RAR (Lotan, 1995a).

#### **4.1) Expressão dos Receptores de AR em Células Tireóideas Normais e Tumorais**

O primeiro relato sobre a expressão de receptores de ácido retinóico em células tireóideas foi feito por Del Senno e colaboradores em 1993. Usando a análise de Northern blot eles mostraram que o gene de RAR $\alpha$  é transcrito em cultura primária de células de tireóides normais humanas, de bócio e de adenomas da tireóide, enquanto a expressão do RAR $\beta$  não pôde ser detectado. Eles observaram que nem o TSH nem o AR alteraram a expressão de mRNA de RAR $\alpha$ . Em 1994 o grupo de Del Senno realizou análise de Northern blot e RT-PCR para avaliar a expressão dos genes dos receptores RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  e RAR $\gamma$  em tecidos e cultura primária de tireócitos humanos. Em tecido normal e adenomatoso houve expressão de RAR $\alpha$  enquanto que o RAR $\beta$  e RAR $\gamma$  eram indetectáveis. Em amostras de carcinoma a expressão de RAR $\alpha$  diminuiu, enquanto que o RAR $\beta$  foi detectável.

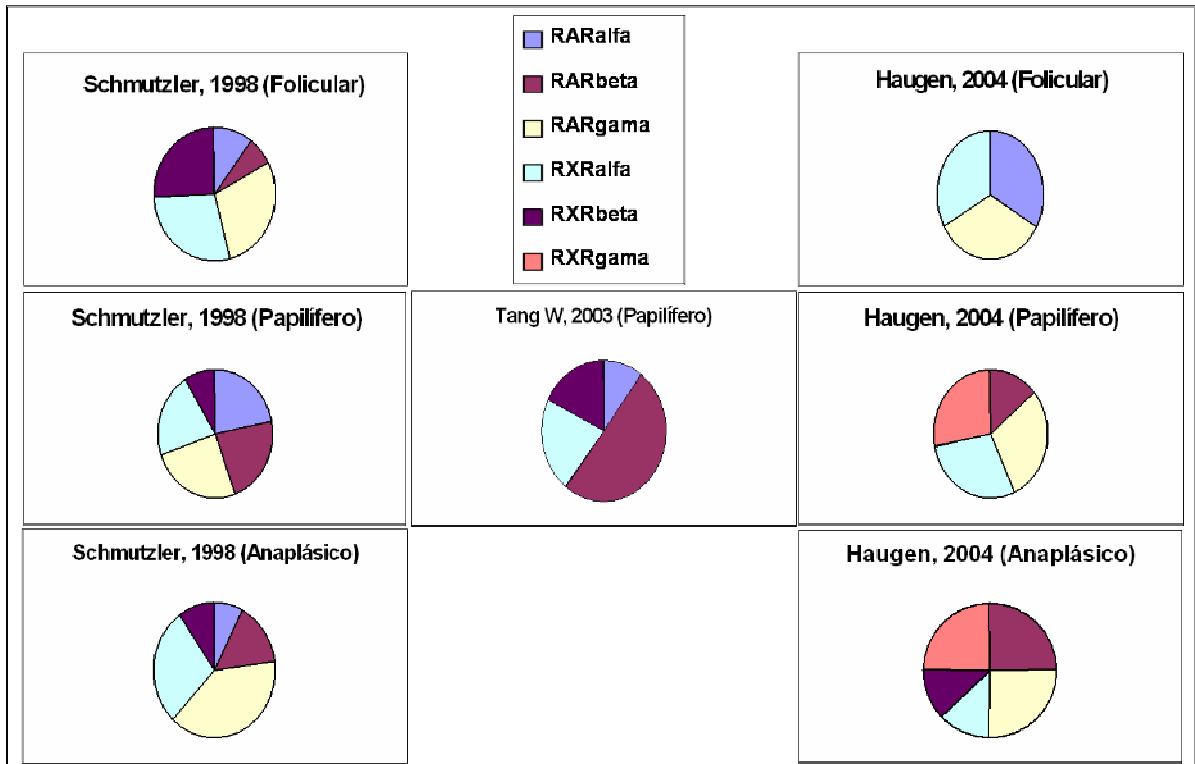
Usando RT-PCR para investigar a expressão dos genes das famílias RAR e RXR e o efeito do AR sobre a expressão de mRNA dos receptores em linhagem de células de carcinoma da tireóide humana, Schmutzler e colaboradores (1998) mostraram que o mRNA do RAR $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  está presente no bócio e nas linhagens de carcinoma. Também o RXR $\alpha$  foi observado em todas as amostras. O mRNA do RXR $\beta$  é detectável nas linhagens de carcinoma, mas parece ser perdido no bócio, enquanto que em duas outras amostras saudáveis e de bócio estava presente. O RXR $\gamma$  não apareceu nem no



bócio nem na linhagem de células. Naquele trabalho também foi feita a avaliação da expressão dos receptores RAR e RXR em amostras aleatórias de carcinoma da tireóide também usando RT-PCR. A maioria dos receptores estava presente em todas as amostras de tumores, e nenhuma mudança dramática na intensidade das bandas do PCR foi detectada. No entanto, em 9 de 12 amostras de tumores foi observado uma redução ou ausência de RXR $\beta$ , indicando desregulação do mRNA de RXR $\beta$ .

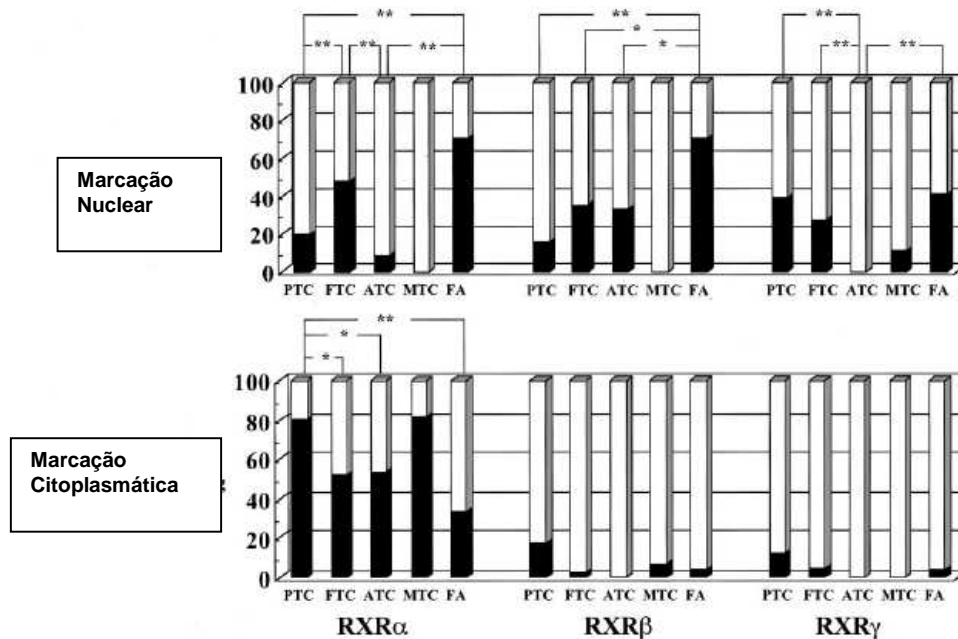
Tang e colaboradores (2003) mostraram o status dos receptores de retinóides em 42 amostras de carcinoma papilífero da tireóide usando RT-PCR. Houve perda de expressão de mRNA em 18 casos; destes três perderam RAR $\alpha$ , 14 perderam o RAR $\beta$ , seis perderam o RXR $\alpha$  e cinco o RXR $\beta$ . A expressão de RAR $\gamma$  e RXR $\gamma$  foi encontrada em todas as 42 amostras. Foi mostrada também uma correlação entre a perda de expressão dos receptores e a perda de diferenciação e a progressão do tumor.

Em 2004, Bryan Haugen e colaboradores mostraram a expressão de mRNA e a expressão de proteínas dos receptores de retinóides em linhagens de câncer de tireóide. Foi observada variação na expressão dos receptores RAR $\beta$  e RXR $\gamma$ , sendo que não foi detectada expressão de RXR $\gamma$  no tecido tireoideano normal. Além disso, este grupo mostrou que a presença dos receptores RAR $\beta$  e RXR $\gamma$  está relacionada com a supressão do crescimento tumoral, o que sugere que estas isoformas possam estar relacionadas com melhor resposta ao tratamento com ácido retinóico. No **Gráfico 2** está representado um resumo de três autores, mostrando a diferente expressão dos receptores de AR em espécimes e células tumorais tireóideas.



**Gráfico 2** Representa o resultado de diferentes trabalhos mostrando a proporção dos receptores de AR que estão expressos em espécimes cirúrgicos e linhagens tumorais.

Takiyama e colaboradores, em 2004, mostraram, não apenas a expressão dos receptores RXR em carcinoma tireóideo humano, como também a sua localização intracelular (núcleo ou citoplasma) por imunohistoquímica. A **Figura 5** mostra os resultados obtidos. Observamos que as células tireóideas não-tumorais mostraram diminuição da marcação nuclear das três isoformas de RXR. Em particular, alguns carcinomas apresentaram intensa marcação citoplasmática de RXR $\alpha$ .



**Figura 5.** Distribuição da intensidade da imunomarcação das isoformas de RXR no núcleo e citoplasma das amostras (57 PTC, 40 FTC, 24 ATC, 28 MTC, e 27 FA). A intensidade de marcação foi comparada com a das células foliculares tireóideas normais na margem de cada espécime. O eixo Y representa a porcentagem de casos em cada categoria histológica das amostras tumorais. Barras abertas mostram ausência ou fraca imunomarcação, e barras fechadas mostram moderada ou forte marcação de cada isoforma de RXR. (FA=adenoma folicular) exibiram marcação nuclear dos receptores de RXR e os carcinomas (PTC= carcinoma papilífero, FTC=carcinoma folicular, ATC= carcinoma anaplásico, MTC= carcinoma medular). Retirado de Takiyama e col., 2004.

Como podemos notar, existe diferente expressão dos receptores de retinóides nos diferentes tipos celulares, seja no tecido normal ou tumoral. Existe diferença entre os resultados obtidos em cada trabalho, lembrando, também, que cada um usou uma metodologia distinta para avaliar a expressão das isoformas dos receptores.

Portanto, esses achados poderiam explicar porque o tratamento de células tireóideas com AR pode promover diferentes respostas entre as células estudadas. O que determina essas variações ainda é desconhecido; uma das hipóteses é de que haja um diferente mecanismo de ação do AR nestas células, devido, por exemplo, ao diferente repertório de receptores de AR. Julgamos de especial interesse o melhor entendimento dos fatores que podem regular a expressão desses receptores nos tireócitos.

#### **4.2) Relação entre a Expressão dos Receptores RAR e RXR e os Efeitos do AR**

Usando a técnica de hibridização *in situ*, revelou-se a expressão de todos os três RARs durante o desenvolvimento embrionário de camundongo. Enquanto o RAR $\alpha$  está presente em todos os tecidos, a expressão tanto de RAR $\beta$  quanto de RAR $\gamma$  são mais seletivos (Dolle, 1990). Esta diferente distribuição tecidual sugere que os RARs possuem distintas funções fisiológicas.

O papel específico de cada receptor tem sido estudado em detalhes em uma linhagem de células derivadas de carcinoma embrionário murino, F9, que são responsivas ao AR. Estas células representam um modelo simples para análise da sinalização de RARs e RXRs sob condições *in vitro* que mimetizam, pelo menos em parte, os processos fisiológicos que ocorrem durante o início da embriogênese (Rochette-Egly, 2001). Com este modelo, e usando a técnica de knockout, foi mostrado, por exemplo, que os heterodímeros RXR $\alpha$ -RAR $\gamma$  são necessários para que o AR cause parada do crescimento celular, enquanto que o heterodímero RXR $\alpha$ -RAR $\alpha$  é requerido para a diferenciação parietal endodermal na presença de AMPcíclico. Além disso, o RXR $\alpha$  é especialmente necessário para a correta diferenciação destas células (Clifford, 1996). Seguindo esta mesma linha, estudos *in vitro* têm mostrado que, embora outros subtipos de RAR também sejam expressos, os agonistas de RAR $\alpha$  inibem a proliferação em algumas linhagens de células de câncer de mama e a diferenciação de células leucêmicas (Dawson, 1995; Chen, 1996).

A Leucemia promielocítica aguda (LPA) é uma doença rara que é caracterizada pela translocação cromossomal recíproca entre os genes RAR $\alpha$  (cromossomo 17) e PML (cromossomo 15) (Larson *apud* Thacher, 2000). A expressão de uma proteína mutante da fusão de PML-RAR $\alpha$  atua como um inibidor dominante negativo da sinalização do retinóide pelo recrutamento de co-ativadores negativos N-CoR e SMRT junto com histona desacetilase (Lin *apud* Thacher, 2000), evitando a diferenciação da célula LPA que deveria ocorrer normalmente na presença de AR endógeno. O uso de concentrações supra-fisiológicas de AR induziu remissão dos pacientes com LPA junto com a quimioterapia (Warrel *apud* Thacher, 2000), presumivelmente por reverter os efeitos negativos do PML-RAR $\alpha$ .

Foi realizado um estudo com camundongos transgênicos, os quais tinham um gene dominante negativo para RAR $\alpha$ , que não permitia a ligação do ligante, expressa no tecido linfóide e mamário e resultou em uma transformação maligna (Kupumbati, 2006).

A deficiência de vitamina A pode causar mudanças neoplásicas no epitélio bronquial e pode estar associada ao aumento do risco de câncer de pulmão (Sporn, 1976 e Sporn *apud* Petty, 2005). Embora resultados de triagens clínicas suportem o papel dos retinóides (naturais e sintéticos) na quimioprevenção do câncer do trato aéreo-digestivo (Hong *apud* Petty, 2005), dados de triagens randomizadas sugerem que carotenóides ou retinóides não são efetivos para a quimioprevenção do câncer de pulmão na população em geral, embora um benefício deva existir para não-fumantes (Frohlich, 1999). A resistência clínica aos retinóides no câncer de pulmão parece ser devido, pelo menos em parte, à perda da expressão do receptor RAR $\beta$  durante a carcinogênese do pulmão (Freemantle *apud* Petty, 2005). A identificação de metodologias farmacológicas, que restaurem a expressão do receptor, deve promover a base para estratégias futuras de terapia e quimioprevenção baseada em retinóides (Petty, 2005).

Neste trabalho pretendemos avaliar a correlação entre os efeitos do AR na captação de iodeto e o repertório de receptores que a célula expressa, tentando determinar qual o mecanismo de ação usado pelo ácido retinóico para regular a captação de iodeto nas células normais quando tratadas com os isômeros de ácido retinóico. Além disso, pretendemos determinar se a tireotrofina (TSH), importante regulador de NIS, e da captação de iodeto, pode modular a expressão dos receptores de AR.

## **II. OBJETIVOS**

Avaliar a relação entre os efeitos do ácido retinóico sobre a modulação da função do co-transportador sódio-iodeto e o repertório de receptores de ácido retinóico RAR ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) e RXR ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) na linhagem de células tireóideas de rato PCCL3.

### **II.I OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

#### 3) Efeitos do ácido retinóico na célula PCCL3:

- Avaliar a viabilidade celular por MTT;
- Avaliar a morfologia celular por microscopia de contraste de fase;
- Avaliar a captação de iodeto.
- Avaliar o efluxo de iodeto;
- Avaliar a expressão de mRNA de NIS por RT-PCR semi-quantitativo;
- Avaliar a expressão e localização celular do NIS por microscopia confocal.

#### 4) Relação entre a expressão dos receptores de AR e a captação de iodeto:

- Avaliar a expressão e a localização intracelular das diferentes isoformas de receptores RAR ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) e RXR ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) em linhagem de células normais PCCL3, por microscopia de epifluorescência.
- Avaliar se há modulação da expressão dos receptores RAR ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) e RXR ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) por ácido retinóico e pela tireotrofina (TSH).

## MATERIAIS E MÉTODOS

---

### III. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 1. Cultura de Células

Usamos a linhagem celular PCCL3, estabelecida a partir de células epiteliais da tireóide derivadas de ratos Fisher adultos de 18 meses, e que mantém *in vitro* a maioria das características das células tireóideas diferenciadas, como secreção de tireoglobulina e captação de iodeto. A proliferação destas células é principalmente regulada por TSH e insulina (Fusco, 1987). As células cresceram em monocamada, com meio de cultura Coon's Modified Ham's F12 suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), insulina (10 $\mu$ g/mL), transferrina (5 $\mu$ g/mL) e TSH (1mU/mL).

#### 2. Tratamentos

As células foram tratadas com dois isômeros do ácido retinóico: o all-trans-AR e o 13-cis-AR (isotretinoína), ambos na concentração de 1 $\mu$ M, concentração utilizada na maioria dos trabalhos. O ácido retinóico foi dissolvido em etanol 100% numa concentração 1000 vezes maior que a concentração de uso. Para o controle usamos o veículo (etanol 0,1%).

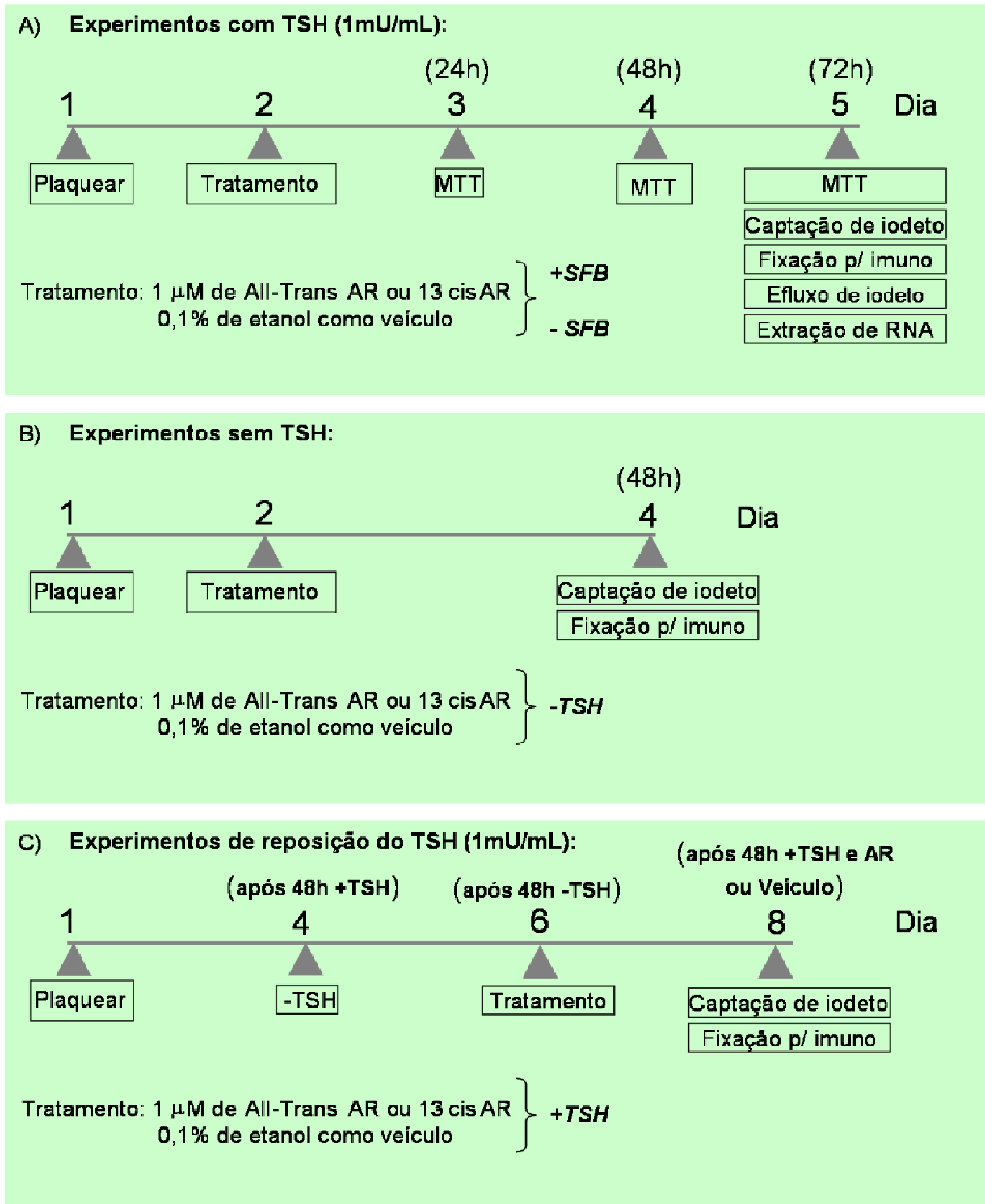
A cultura de células PCCL3 é mantida em meio de cultura suplementado com TSH, usamos, portanto as células nesta condição para avaliarmos os efeitos do AR sobre elas. As células foram plaqueadas em diferentes superfícies e com diferente número de células dependendo do ensaio a ser realizado, cada condição será detalhada na explicação da metodologia de cada ensaio. Em geral as células foram plaqueadas no momento que consideramos como o primeiro dia de experimento. Após 24h de plaqueamento, momento onde as células já foram aderidas à superfície, o meio de cultura foi trocado pelo meio com os tratamento com veículo ou com os isômeros de AR. Com o ensaio do MTT avaliamos a cada 24 horas durante 72 horas a viabilidade

celular na presença e ausência de SFB. O tempo de 72 horas de tratamento também foi usado para os ensaios de captação e efluxo de iodeto, extração de RNA para RT-PCR e fixação das células para realização da imunofluorescência, sempre na presença de TSH e SFB (**Esquema 1A**).

Realizamos ensaios na ausência de TSH para avaliarmos a modulação na captação de iodeto e na expressão dos receptores de AR. Como as células dependem do TSH para sua manutenção escolhemos o tempo de 48 horas para os ensaios. As células foram plaqueadas no momento que consideramos como o primeiro dia de experimento. Após 24h de plaqueamento, momento onde as células já foram aderidas à superfície, o meio de cultura foi trocado pelo meio sem TSH na presença de veículo ou dos isômeros de AR. Após 48 horas foi realizada a captação de iodeto e fixação das células para posterior imunofluorescência (**Esquema 1B**).

Para determinarmos os efeitos da reposição do TSH na captação de iodeto e na expressão dos receptores de AR as células foram plaqueadas em meio na presença de TSH por 48 horas. Em seguida o meio foi trocado por meio sem TSH e assim permaneceu por 48 horas. Neste momento foi colocado os tratamentos com veículo ou com os isômeros de AR na presença de TSH e assim permaneceu por 48 horas, onde então, foi realizado o ensaio de captação de iodeto e a fixação das células para posterior imunofluorescência (**Esquema 1C**).





**Esquema 1.** Os esquemas acima representam resumidamente os desenhos experimentais usados neste trabalho.

### **3. ENSAIO DO MTT (3-(4,5-DIMETHYLTHIAZOL-2-YL)-5-(3-CARBOXY-METHOXYPHENYL)-2-(4-SULFOPHENYL)-2H-TETRAZOLIUM)**

Para o ensaio de viabilidade celular as células foram cultivadas por 24, 48 e 72 horas em placa de 96 poços ( $4 \times 10^3$  células/poço) em meio com ou sem SFB conforme descrito no esquema 1A, na presença de veículo ou dos isômeros de AR. O ensaio de MTT é baseado na conversão do sal tetrazolium (MTT) em sal formazam que é solúvel em meio de cultura e cuja absorbância é medida diretamente a 570nm. O meio de cultura das células foi descartado e foram adicionados 100µL de MTT (0,5mg/ml) em cada poço. A placa foi coberta com papel alumínio e permaneceu 3 horas na estufa a 37°C. Em seguida, o MTT foi retirado e foram acrescentados 100µL de DMSO. A absorbância foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm. Os resultados foram expressos em % de viabilidade celular em relação ao veículo.

### **4. ENSAIO DE CAPTAÇÃO DE IODETO E EFLUXO DE IODETO**

Células PCCL3 ( $10^5$  células/poço) foram cultivadas em placas de 24 poços e o tratamento foi realizado conforme descrito no esquema 1A, 1B e 1C.

Para o ensaio, o meio foi removido e as células foram lavadas com HBSS. Então, as células foram mantidas parte com HBSS e a outra metade com HBSS suplementado com um inibidor competitivo de NIS, o  $\text{KClO}_4$  (10µM), para controle da captação específica, e todos os poços continham iodeto ( $^{125}\text{I}$ ). Depois de 45 minutos a 37°C em atmosfera úmida, o meio radioativo foi aspirado, as células foram lavadas com HBSS gelado e o iodo acumulado foi extraído com 500µL de etanol 90%. O extrato em etanol 90% foi contado em um Automatic Gamma Counter – 1470 - WIZARD. Resultados foram normalizados pela viabilidade celular medida pelo ensaio do MTT e expresso como contagens por minuto por A570 nm (Unterholner, 2006) ou pela quantidade de proteína avaliada pelo método de Bradford, sendo estes dados expressos como contagens por minuto por micrograma de proteína.

Para o efluxo, após as células foram expostas ao iodeto ( $^{125}\text{I}$ ) por 45 minutos. A seguir, retirou-se o sobrenadante e acrescentou-se 500 µL de HBSS. A cada 3 minutos

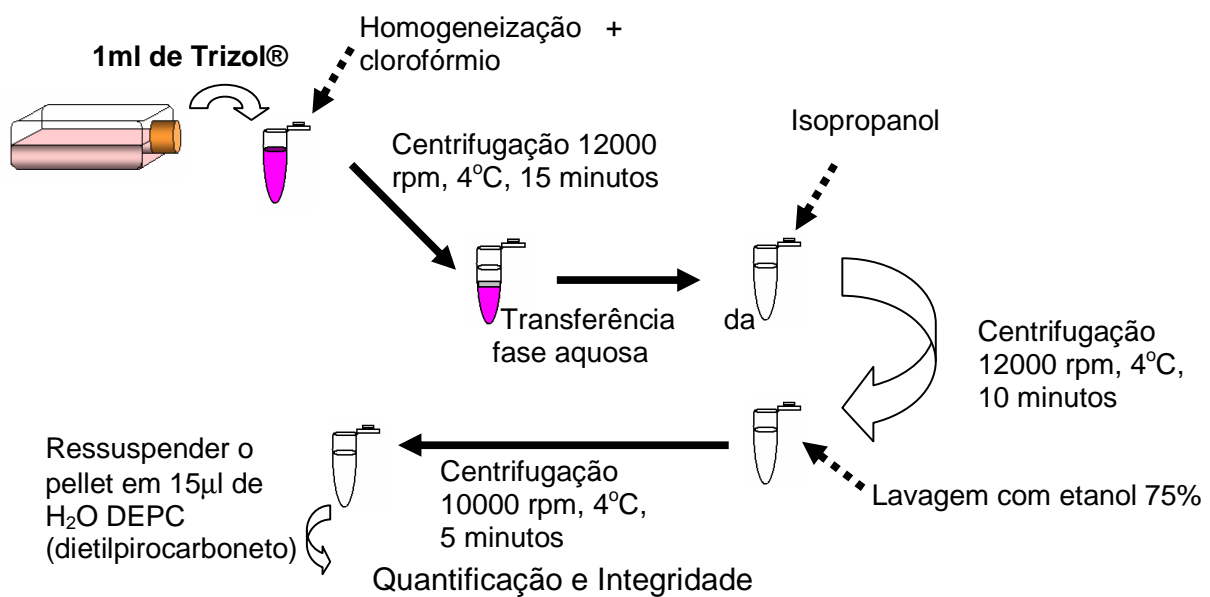
todo o sobrenadante foi retirado e armazenado para posterior contagem. Este processo se repetiu até 18 minutos e em seguida, o iodo acumulado no interior das células foi extraído com 500 $\mu$ L de etanol 90%.

## 5. RT-PCR SEMI-QUANTITATIVO PARA NIS

As células foram cultivadas em garrafas de cultura ( $10^5$  células/garrafa de 25  $\text{cm}^3$ ) em meio com TSH 1mU/ml. Próximo da confluência, as células foram tratadas conforme descrito no esquema 1A, e após os tratamentos as células foram recolhidas em 1ml de trizol® para posterior extração do RNA, conforme esquema 2. Do RNA extraído, uma alíquota foi retirada para avaliar sua integridade e fazer quantificação do RNA total.

Para a síntese do cDNA foi utilizado 1  $\mu$ g de RNA, quantidade que foi determinada após padronização do número de ciclos da PCR e das quantidades de RNA usadas na transcrição reversa para o RT-PCR semi-quantitativo. Foram utilizados oligo (dT)<sub>12-18</sub> (0,4 mM), M-MuLV transcriptase reversa (200U), tampão 1x first strand (50mM de Tris-HCl pH8.3, 75mM KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de DTT), 10 unidades RNAsin (inibidor de RNase) 0,5mM dNTP. O RNA foi incubado a 70°C por 5 minutos, na presença de H<sub>2</sub>O DEPC, oligo dT e dNTP. Em seguida, foi adicionado ao tubo o restante dos reagentes, que foram incubados a 42°C por 1 hora. Terminado o tempo de incubação, a mistura foi submetida a 90°C por 10 minutos para inativação da transcriptase reversa. Foram adicionados então 0,3 volumes de acetato de amônia 7,5M, pH 8,0 e 2,5 volumes de etanol 100 %, e esta solução ficou no freezer a -70°C, durante 18 horas, para precipitação do cDNA. Depois, as amostras foram centrifugadas (12000 rpm) por 30 minutos, a 4°C, para precipitação do cDNA. O sobrenadante foi descartado e acrescentamos 50  $\mu$ l de etanol a 75% e centrifugamos novamente. O precipitado (cDNA) foi ressuspensão em 11  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O MilliQ e armazenado a -20°C. Para a PCR, foram utilizados 1 $\mu$ l de cDNA e foi feito um controle negativo sem cDNA (controle negativo). Na PCR o cDNA foi incubado com 12 pmol do oligonucleotídeo iniciador senso e 12 pmol do oligonucleotídeo iniciador antisenso do gene do GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) como controle interno e 12 pmol dos

oligonucleotídeos iniciadores do NIS, tampão de reação (75mM Tris-HCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 20mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), dNTP (0,1mM) e DNA polimerase (5U). A reação foi realizada nas seguintes condições: 94°C por 4 minutos; **Nº ciclos** (**Tabela 2**) com a seguinte seqüência: 95°C por 30 segundos, temperatura de anelamento (**T°C**) (**Tabela 2**) por 45 segundos e 72°C por 45 segundos; 72°C por 7 minutos; e 4°C por 4 minutos.



**Esquema 2.** Extração de RNA total.

mRNA alvo	Tamanho	T °C	Nº ciclos	Seqüência (senso)	Seqüência (antisenso)
GAPDH	300 pb	60	35	5' ccc caa tgt gtc cgt cgt gga t 3'	5' tgg agg cca tgt agg cca tga gg3'
NIS	424 pb	55	37	5' atc ctc tcc tca ccg agt ca 3'	5' cgc agc tct agg tac tgg ta 3'

**Tabela 2.** Seqüências senso (forward) e antisenso (reverse) dos oligonucleotídeos (iniciadores) específicos para os genes do gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e do NIS.

## 6. IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA O NIS – MICROSCOPIA CONFOCAL

As células ( $3 \times 10^4$ ) foram cultivadas em placas de 24 poços sobre lamínulas de vidro, e foram tratadas como descrito no esquema 1A, 1B e 1C. As células foram lavadas por duas vezes com tampão fosfato de sódio (PBS) e fixadas em paraformaldeído (PFA) 2% em PBS por 20 minutos à temperatura ambiente. Foi colocado  $\text{NH}_4\text{Cl}$  50mM por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida lavou-se por 3 vezes com PBS. Para permeabilização das células usou-se 0,2% (vol/vol) Triton X-100 (em PBS), contendo 0,5% (peso/vol) BSA, 0,1mM  $\text{CaCl}_2$  e 0,1mM  $\text{MgCl}_2$ . As células foram incubadas com anticorpo primário por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida as células foram lavadas duas vezes com PBS. Então foram incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho (TRITC) por 1 hora à temperatura ambiente. Lavou-se por 2 vezes com PBS. Para marcação dos núcleos usou-se o DAPI. As imagens foram analisadas em microscópio Zeiss LSM 510 META (Laser Scanning Microscope).

## 7. IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA OS RECEPTORES RAR E RXR

As células ( $3 \times 10^4$ ) foram cultivadas por 72 horas em placas de 24 poços sobre lamínulas de vidro, e foram tratadas com veículo (etanol 0,1%), all-trans AR (1 $\mu\text{M}$ ) ou 13-cis AR (1 $\mu\text{M}$ ). Após este tempo as células foram fixadas com paraformaldeído (4% em TPS) acrescido de sacarose (4%) durante 30 minutos. Em seguida, foi feita permeabilização com Triton X-100 (0,5%) durante 30 minutos. As células foram lavadas com TPS-Tween 20 (0,1%) várias vezes. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito com uma pré-incubação, durante 30 minutos, com mistura 1:1 de soro de ovelha (10% em TPS-Tween 20 (0,1%)) e PBS-BSA (10% em TPS-Tween 20 (0,1%)). As células foram lavadas com TPS-Tween 20 (0,1%) várias vezes. Incubou-se com o anticorpo primário (diluído 1:200) overnight a 4°C ( **Tabela 3**). As células foram lavadas com TPS-Tween 20 (0,1%) várias vezes. Depois foi colocado o anticorpo secundário (anti-rabbit IgG – *Sigma*) e este ficou incubando por 2 horas a temperatura ambiente. As células foram lavadas com TPS-Tween 20 (0,1%) várias vezes. Para localizar as células foi

feita marcação nuclear com DAPI. Posteriormente, foi feita a montagem das lâminas e estas foram analisadas em microscópio de epifluorescência.

RAR $\alpha$	(C-20)	sc-551	lot G052	coelho policlonal IgG
RAR $\beta$	(C-19)	sc-552	lot F272	coelho policlonal IgG
RAR $\gamma$	(G-1)	sc-7387	lot F062	camundongo monoclonal IgG
RXR $\alpha$	(D-20)	sc-553	lot F0403	coelho policlonal IgG
RXR $\beta$	(C-20)	sc-831	lot F0603	coelho policlonal IgG
RXR $\gamma$	(Y-20)	sc-555	lot J2803	coelho policlonal IgG

**Tabela 3.** Especificações dos anticorpos para os receptores de AR. Santa Cruz.

## 8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

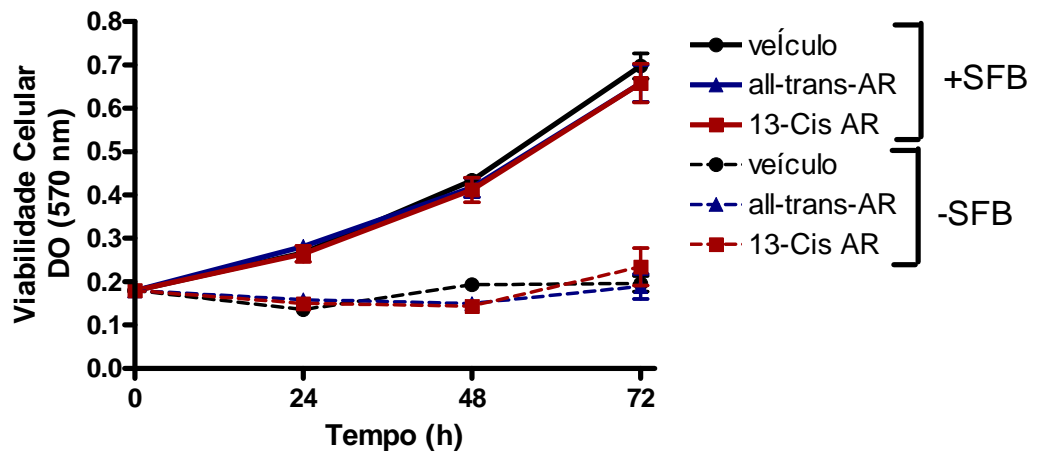
Para análise da viabilidade e do efluxo de iodeto temporal das células tratadas com AR na presença de TSH usou-se Two-way ANOVA Bonferroni post test.

Para análise da captação de iodeto e viabilidade celular das células tratadas com AR na ausência de TSH e da captação de iodeto das células tratadas com AR na presença de TSH usou-se One-way ANOVA seguido do teste de múltiplas comparações de Dunnet.

#### IV. RESULTADOS

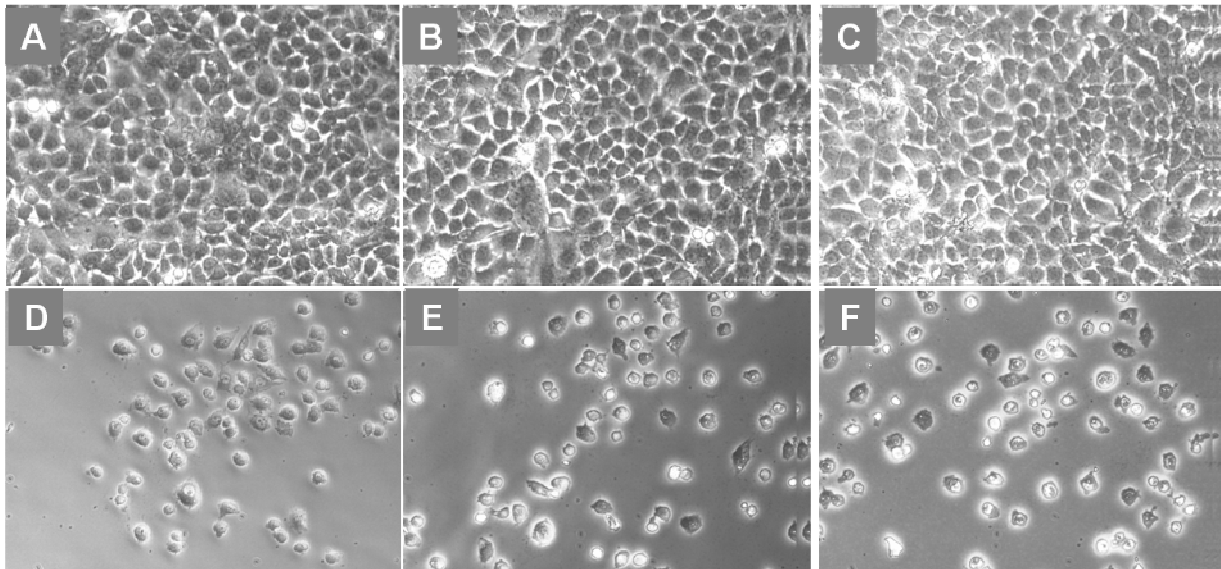
##### 1) Efeitos do Ácido Retinóico nas células PCCL3:

As Células PCCL3 foram cultivadas em placas de 96 poços por 24h na presença de SFB para permitir a aderência celular. Após este tempo as células foram cultivadas com ou sem SFB, recebendo o tratamento com all-trans-AR ( $1\mu\text{M}$ ), 13-cis-AR ( $1\mu\text{M}$ ) ou veículo. Como já foi relatada a capacidade do ácido retinóico em causar morte celular nas células tumorais, avaliamos a viabilidade celular das células PCCL3 após o tratamento. A viabilidade celular foi avaliada usando o método do MTT, nos tempos de 24, 48 e 72h após o tratamento. Não observamos nenhuma diferença na viabilidade celular entre os tratamentos com ácido retinóico e o veículo, tanto na presença quanto na ausência de SFB (**Figura 6**). Mostramos, portanto, que nas células PCCL3, o AR não modula a viabilidade celular na dose usada.



**Figura 6** Viabilidade das células PCCL3 tratadas com all-trans-AR ou 13-cis-AR. Células foram tratadas por 72h com all-trans-AR ( $\blacktriangle$ ), 13-cis-AR ( $\blacksquare$ ) e veículo ( $\bullet$ ) tanto na ausência (----) ou na presença (—) de soro (SFB). O número de células vivas é proporcional à concentração de sal formazan formado no ensaio do MTT e medido no comprimento de onda de 570 nm. Nenhuma diferença entre os tratamentos e o veículo (etanol 0,1%). DO= densidade óptica.

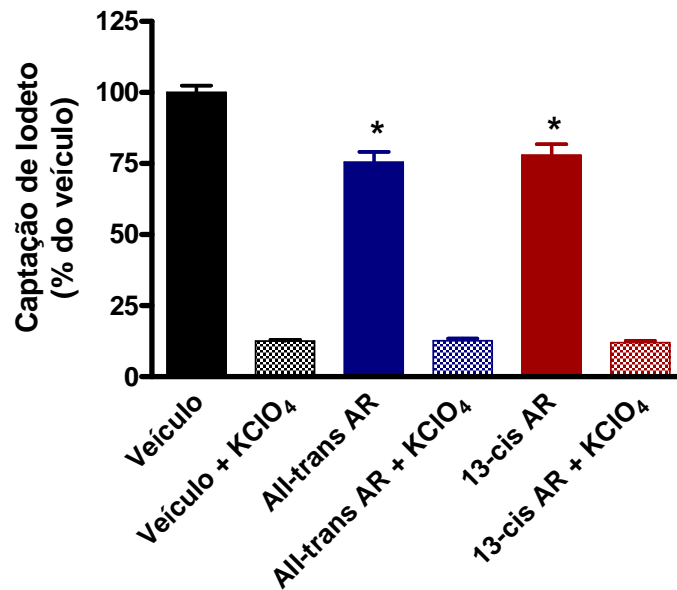
Determinamos as possíveis mudanças morfológicas induzidas pelo tratamento com AR. A morfologia foi avaliada por microscopia de contraste de fase e notamos que nenhuma diferença visível ocorreu entre os tratamentos (**Figura 7**).



**Figura 7.** Microscopia de contraste de fase após 72 horas de tratamento com veículo (A), all-trans AR (B) e 13-cis AR (C) com SFB (A,B,C) e veículo (D), all-trans AR (E) e 13-cis AR (F) sem SFB (D,E,F). Aumento de 250X.

O AR é capaz de aumentar a captação de iodeto nas células tumorais. Para avaliarmos o efeito do ácido retinóico sobre a captação de iodeto das células PCCL3 fizemos o ensaio de captação de iodeto usando  $^{125}\text{I}$ . Células foram cultivadas em placas de 24 poços e foram tratadas conforme feito para o ensaio de viabilidade celular. A análise da captação foi realizada após 72h de tratamento. No ensaio de captação de iodeto determinamos a quantidade de radioiodeto no interior das células após a incubação com  $^{125}\text{I}$ . O perclorato de potássio ( $\text{KClO}_4$ ) foi usado pelo seu efeito inibidor de NIS para determinar a captação específica através do NIS. Observamos que o tratamento com AR diminuiu em cerca de 25% a captação de iodeto em relação ao veículo (**Figura 8**).

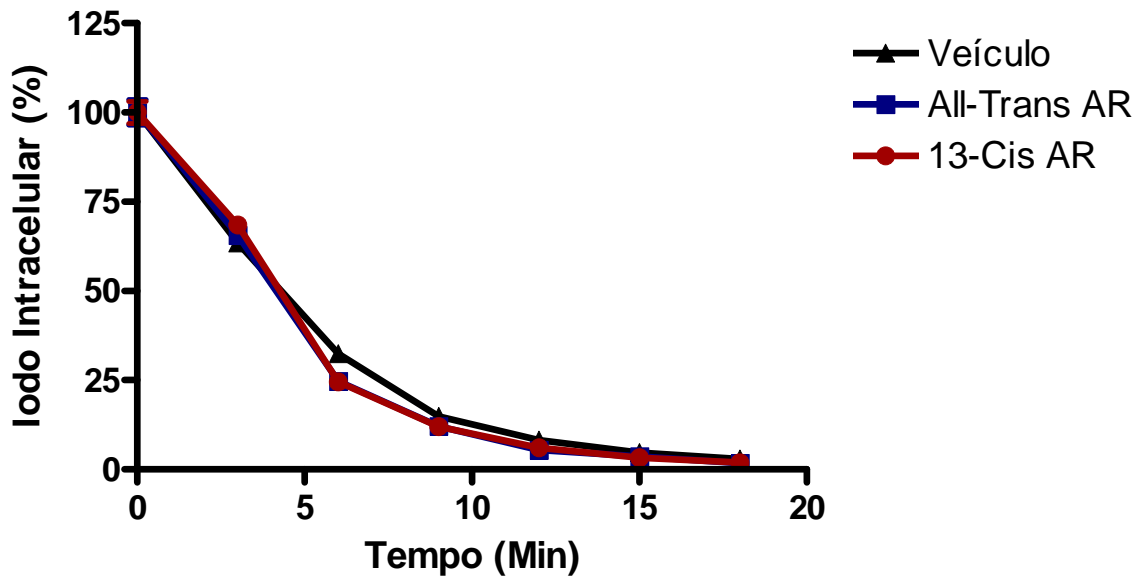




**Figura 8** Efeitos do all-trans AR, 13-cis AR ou veículo sobre o acúmulo de iodeto das células PCCL3. Tratamento com all-trans AR ou 13-cis AR diminuiu a captação de iodeto sensível ao perclorato de potássio em aproximadamente 25% em relação ao veículo. Os resultados foram normalizados pela medida das células vivas pelo ensaio de viabilidade de MTT, que se correlaciona diretamente com o número de células viáveis. Resultados são expressos como % do veículo. \* $p < 0,05$  versus veículo.

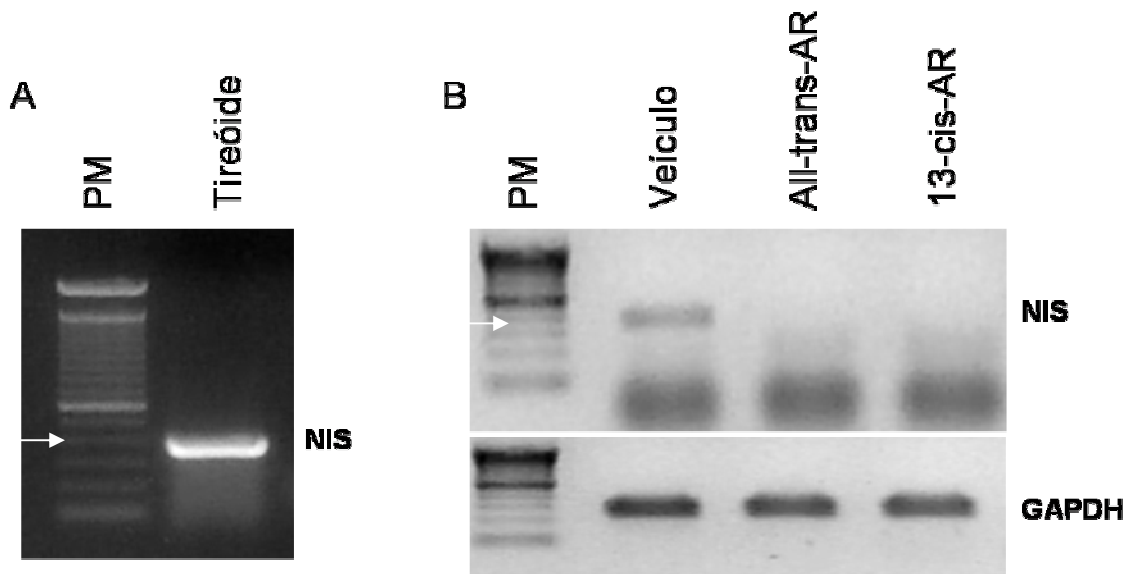
## 2) Alterações que o AR provoca nas células PCCL3 causando a diminuição da quantidade de iodeto intracelular:

Pelos resultados da captação determinamos a quantidade de iodeto no interior das células, portanto a diminuição pode ter ocorrido devido à diminuição no influxo de iodeto por NIS ou pelo aumento no efluxo de iodeto. Para esclarecer por que o AR estaria diminuindo o iodeto intracelular, fizemos um ensaio de efluxo de iodeto. As células foram cultivadas e tratadas como feito anteriormente e a análise foi realizada 72h após o tratamento. O efluxo foi feito conforme descrito na metodologia. Nenhuma diferença foi observada entre os tratamentos e o veículo (**Figura 9**). A partir deste resultado concluímos que o AR influencia a capacidade de entrada de iodo na célula, assim deve modular o co-transportador NIS nas células PCCL3.

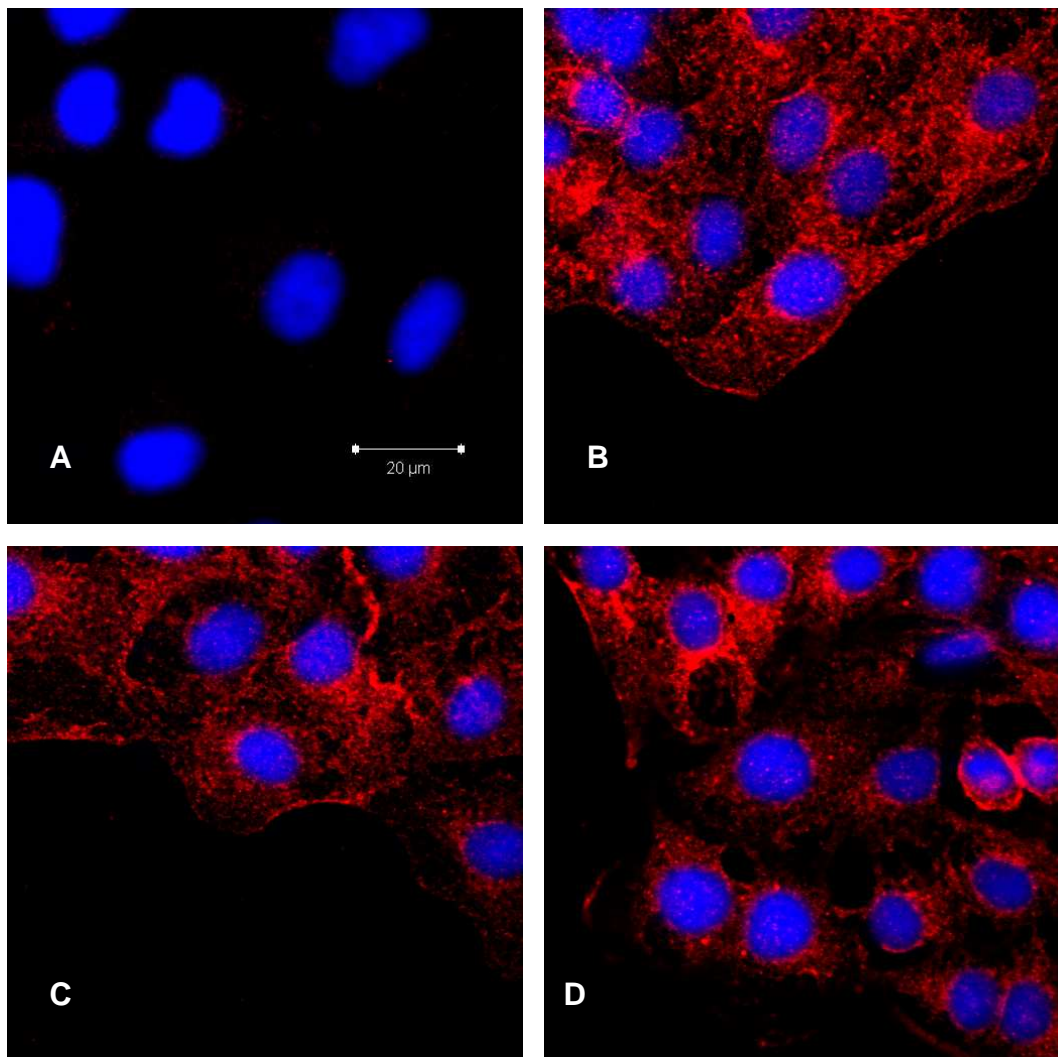


**Figura 9** Efluxo de iodeto foi estudado *in vitro* nas células PCCL3 após tratamento com all-trans-AR (1 $\mu$ M) ou 13-cis-AR (1 $\mu$ M) em comparação com as células tratadas com veículo. Nenhuma diferença entre os tratamentos e o veículo foi observada.

Com o objetivo de determinar como o AR modula a função do NIS analisamos os efeitos do AR sobre a transcrição do mRNA de NIS, expressão da proteína NIS e sua translocação para membrana plasmática. Para análise da transcrição do mRNA de NIS fizemos RT-PCR semi-quantitativo. Após padronização do número de ciclos e da quantidade de RNA total usada, fizemos o RT-PCR das células tratadas por 72h com AR e veículo. Os tratamentos com AR, tanto all-trans-AR quanto o 13-cis-AR, causaram regulação negativa da expressão do NIS (**Figura 10**), o GAPDH foi usado como controle interno. Usando microscopia confocal notamos que neste mesmo tempo ainda há expressão da proteína NIS nas células, o que comprova a longa meia-vida do NIS (**Figura 11**). Notamos também que o tratamento com 13-cis-AR diminuiu a quantidade de NIS na membrana plasmática, já com all-trans-AR esta diminuição foi menos perceptível (**Figura 11**). Concluímos que o tratamento com AR diminuiu a função de NIS tanto pela diminuição da transcrição quanto pela redução de NIS localizado na membrana celular, onde o mesmo exerce sua função de transportador.



**Figura 10** Análise de RT-PCR do efeito do tratamento com all-trans-AR, 13-cis-AR e veículo sobre a expressão do mRNA de NIS das células PCCL3. Células PCCL3 foram tratadas por 72h, depois o RNA total foi extraído e submetido a RT-PCR para determinar os níveis de mRNA de NIS. A, expressão do mRNA de NIS na tireóide de rato. B, gel de agarose corado com brometo de etídeo representando os níveis de expressão de mRNA de NIS nos tratamentos com veículo, all-trans-AR e 13-cis-AR. PM, peso molecular. A seta representa a banda de 400 pares de base.

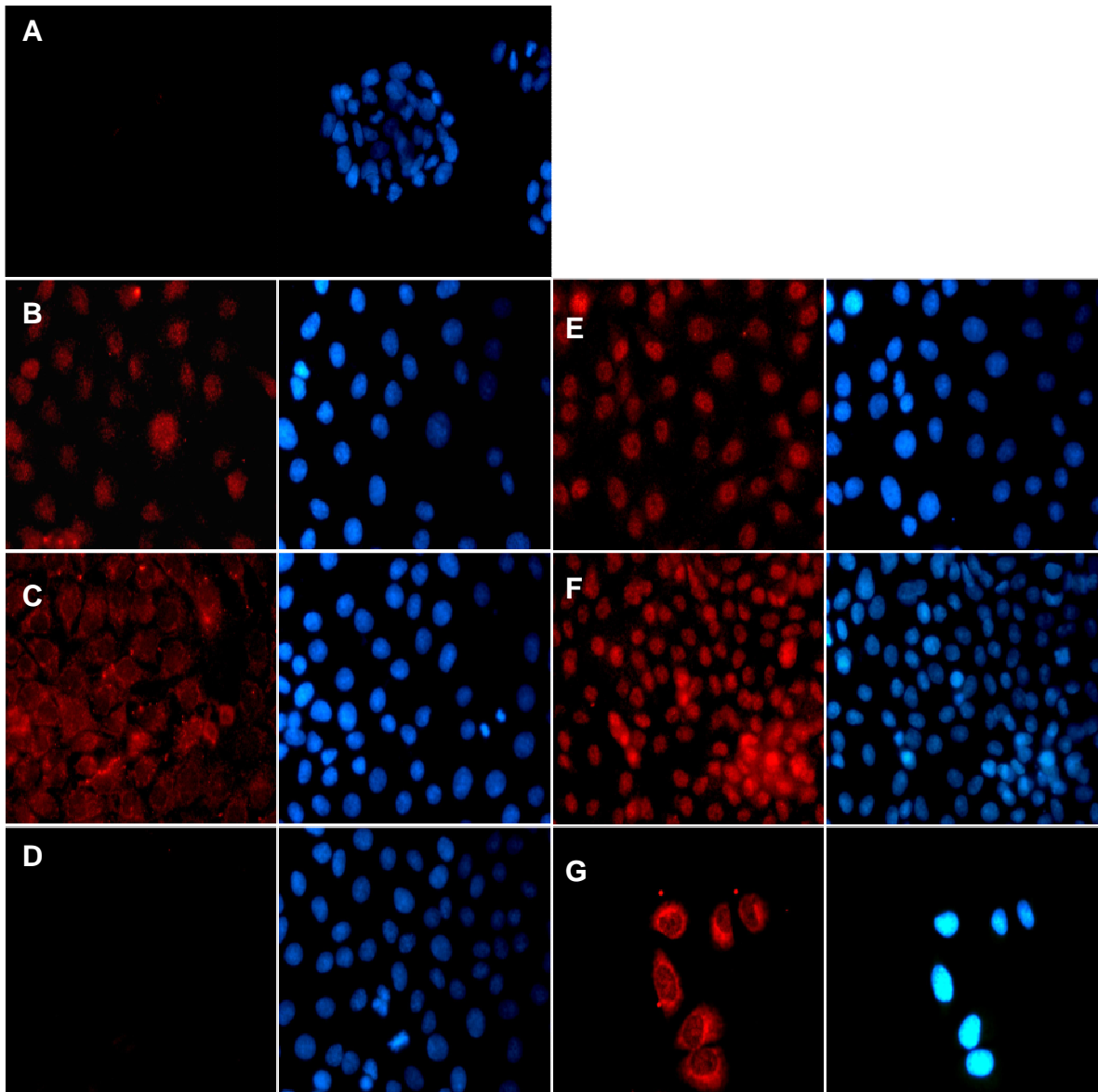


**Figura 11** Marcação de NIS foi feita nas células PCCL3 com anticorpo anti-NIS (vermelho) e Dapi foi usado para marcar o núcleo (azul). Células foram mantidas na presença de TSH com veículo (B), all-trans-AR (C) ou 13-cis-AR (D). A imunofluorescência de NIS nestas células foi analisada por microscopia confocal. Controle negativo (A).

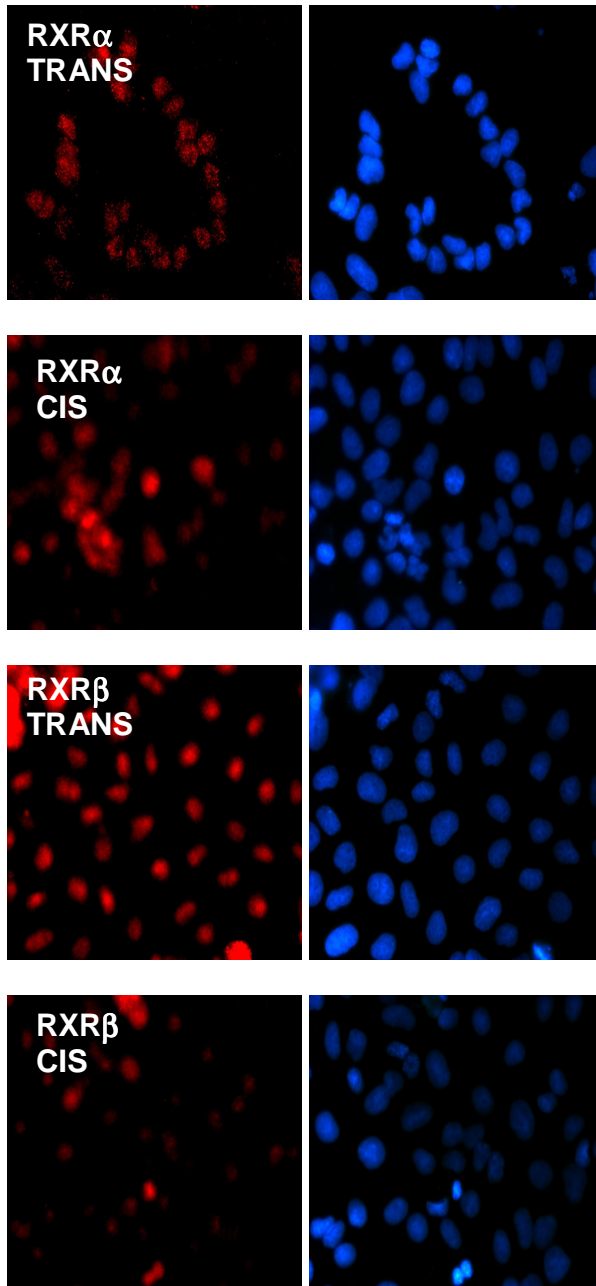
### 3) Relação entre a expressão dos receptores de AR e a captação de iodeto:

O repertório de receptores de ácido retinóico que a célula expressa pode ter um importante papel na resposta ao AR. Por isso, determinamos quais receptores de ácido retinóico a célula PCCL3 expressa na ausência e na presença de ácido retinóico. Observamos que na ausência de AR, as células expressam a maioria dos receptores, exceto o RAR $\gamma$ . Além disso notamos que o RAR $\beta$  e o RXR $\gamma$  estavam localizados no citoplasma, diferente dos outros receptores que têm localização no núcleo (**Figura 12**).

Na presença tanto de all-trans-AR quanto de 13-cis-AR notamos que a maioria dos receptores de AR são modulados negativamente, exceto o RXR $\alpha$  e o RXR $\beta$  (**Figura 13**). Na **Tabela 4** está resumida a relação encontrada entre a captação de iodeto e o repertório de receptores.



**Figura 12** Expressão dos receptores RAR e RXR nas células PCCL3 tratadas na presença de TSH (vermelho). RAR $\alpha$  (B), RAR $\beta$  (C), RAR $\gamma$  (D), RXR $\alpha$  (E), RXR $\beta$  (F), RXR $\gamma$  (G). Ao lado de cada figura está a respectiva marcação para o núcleo da célula com DAPI (azul). A, controle negativo.



**Figura 13** Após 72h de tratamento com All-trans-AR e 13-cis-AR as células PCCL3 apenas continuam expressando os receptores RXR $\alpha$  e RXR $\beta$  (em vermelho). Ao lado de cada figura está a respectiva marcação para o núcleo da célula com DAPI (azul).

	<i>RAR<math>\alpha</math></i>	<i>RAR<math>\beta</math></i>	<i>RAR<math>\gamma</math></i>	<i>RXR<math>\alpha</math></i>	<i>RXR<math>\beta</math></i>	<i>RXR<math>\gamma</math></i>	<i>Captação de Iodeto</i>
-AR	X	X		X	X	X	Normal
+AR				X	X		Diminui

**Tabela 4.** Relação entre a expressão dos receptores de AR e a captação de iodeto na ausência e presença de AR.

A partir destes resultados notamos que deve existir uma relação entre o efeito do AR em diminuir a captação de iodeto e o repertório de receptores de AR expresso na célula no momento do tratamento. Neste momento surgem duas hipóteses:

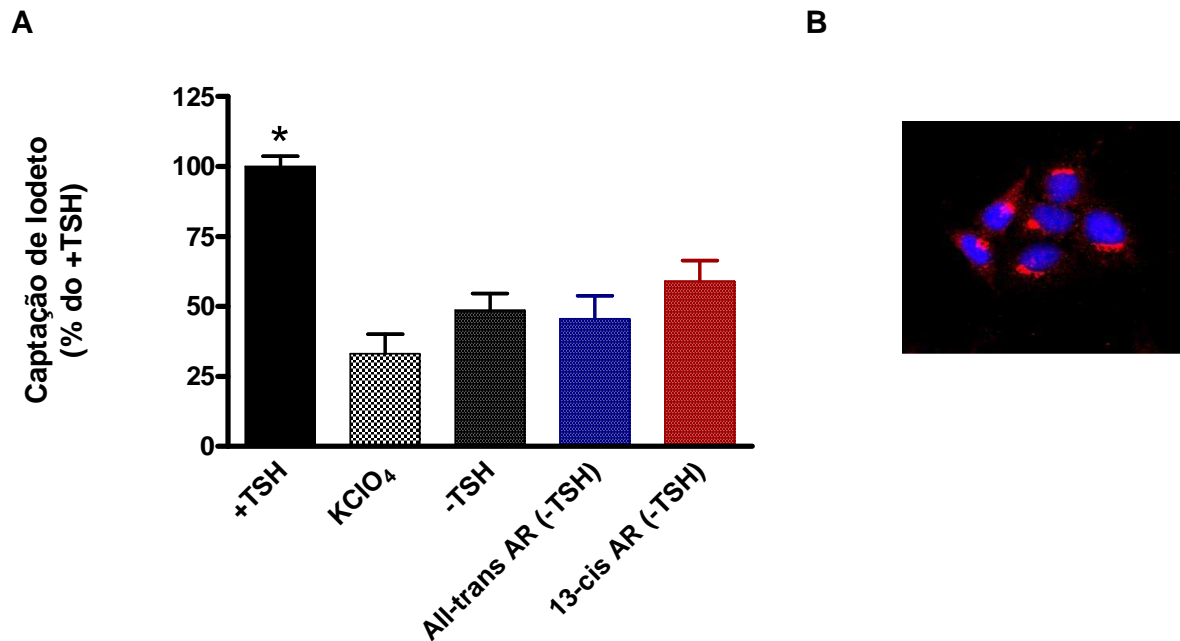
1) *Será que a diminuição da captação de iodeto ocorre devido a perda da expressão dos receptores  $RAR\alpha$ ,  $RAR\beta$  e  $RXR\gamma$ ?*

2) *Será que a diminuição da captação de iodeto ocorre devido a ligação do AR nos homodímeros ou heterodímeros formados pelos receptores  $RXR\alpha$  e  $RXR\beta$ ?*

#### **4) Papel do TSH como modulador da expressão dos receptores de AR:**

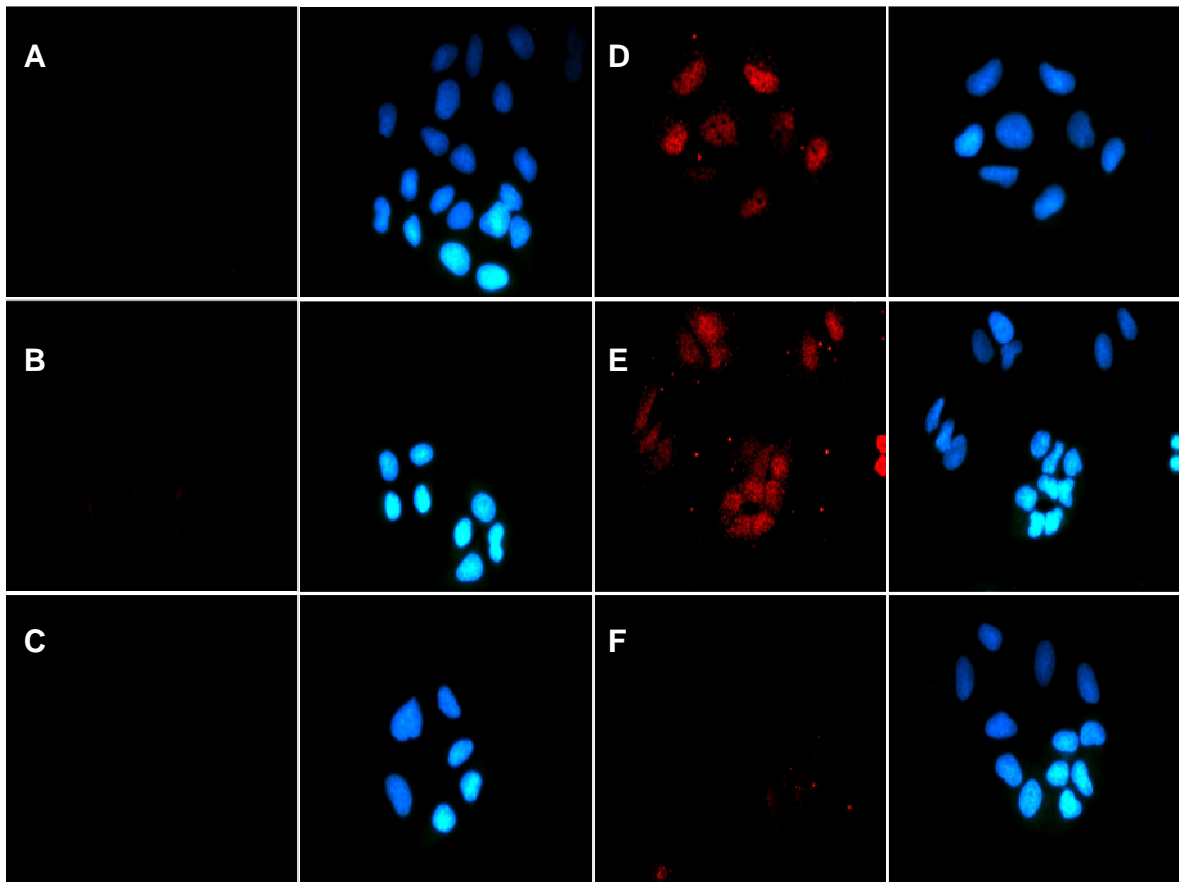
Sabe-se que na ausência de TSH ocorre redução da função do tireócito, inclusive na captação de iodeto. Determinamos se o mesmo ocorre nas células PCCL3 e se o AR tem algum efeito na ausência de TSH. Os resultados nos mostram que após 48h sem TSH as células PCCL3 param de captar o iodeto e o tratamento com AR não diferiu do veículo quando na ausência TSH (**Figura 14A**). Após 48h sem TSH observamos que o NIS é expresso em menor quantidade e, além disso, fica acumulado na região perinuclear, o que explica a redução da captação de iodeto nesta situação (**Figura 14B**).





**Figura 14** Influência do TSH para a resposta ao AR. A, Efeitos do all-trans AR, 13-cis AR ou veículo no acúmulo de iodo na células PCCL3 sem TSH por 48h. B, representa a microscopia confocal para marcação de NIS das células PCCL3 após 48h sem TSH. Os resultados foram normalizados pela quantidade de proteína quantificada pelo método de Bradford. \* $p < 0.05$  versus outros grupos.

Observamos que na ausência de TSH os receptores de AR são modulados negativamente, com exceção dos  $RXR\alpha$  e  $RXR\beta$ , assim como ocorreu após tratamento por AR (**Figura 15**).



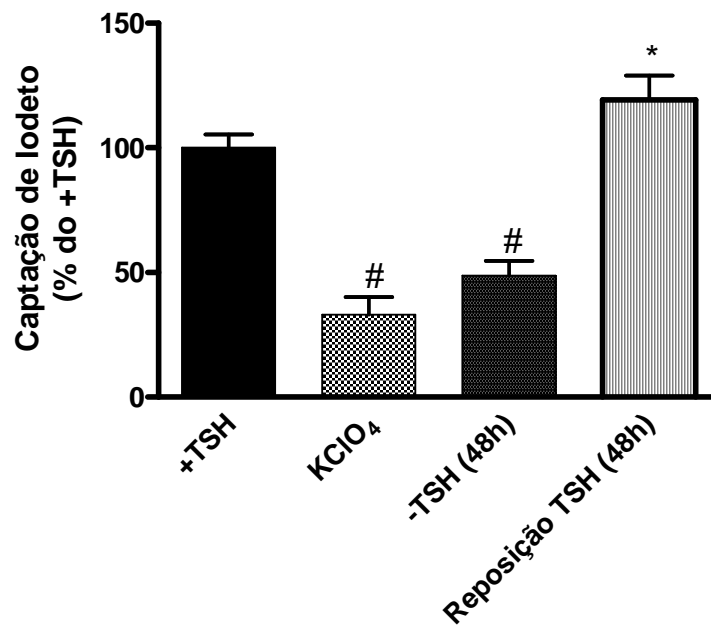
**Figura 15** Expressão dos receptores RAR e RXR nas células PCCL3 tratadas na ausência de TSH (vermelho). RAR $\alpha$  (A), RAR $\beta$  (B), RAR $\gamma$  (C), RXR $\alpha$  (D), RXR $\beta$  (E), RXR $\gamma$  (F). Ao lado de cada figura está a respectiva marcação para o núcleo da célula com DAPI (azul).

Esses resultados, assim como os do tratamento com AR, sugerem que a diminuição da captação de iodeto poderia ter relação com o repertório de receptores expressos, pois tanto o AR quanto a ausência de TSH reduzem a captação e diminuem a expressão dos mesmos receptores de AR.

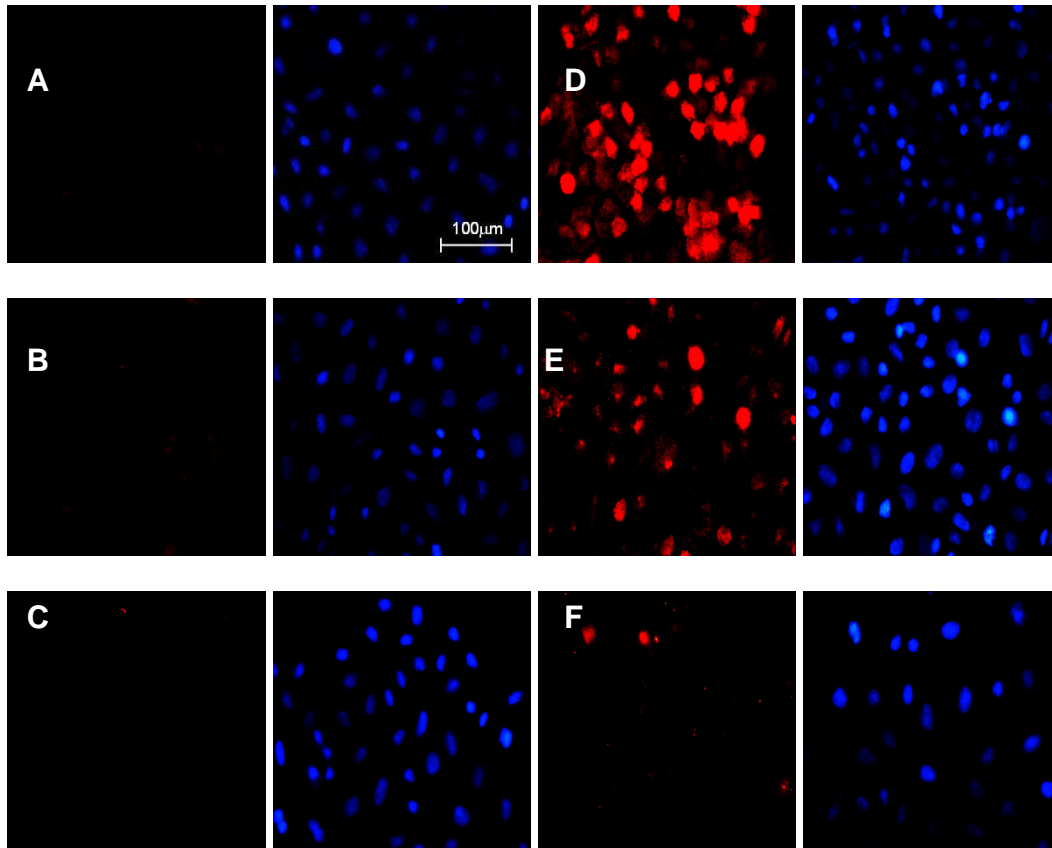
##### **5) A reposição do TSH restaura a captação sem normalizar a expressão dos receptores de AR:**

Fizemos a reposição do TSH por 48h após a retirada do TSH também por 48h e avaliamos a captação de iodeto e a expressão dos receptores de AR. Observamos que após reposição do TSH a captação é restabelecida, sendo inclusive significativamente

maior que a captação das células que não foram privadas de TSH por 48h (**Figura 16**). Quanto à expressão dos receptores, observamos que no momento em que foi feita a captação de iodeto a expressão dos receptores de AR não retornou (**Figura 17**).



**Figura 16** Reposição do TSH por 48h após 48h em meio sem TSH. Resultados são expressos como % do veículo. Os resultados foram normalizados pela quantidade de proteína quantificada pelo método de Bradford. #P<0,05 versus +TSH. \*P<0,05 versus +TSH.



**Figura 17** Expressão dos receptores RAR e RXR nas células PCCL3 após 48h de reposição com TSH (vermelho). RAR $\alpha$  (A), RAR $\beta$  (B), RAR $\gamma$  (C), RXR $\alpha$  (D), RXR $\beta$  (E), RXR $\gamma$  (F). Ao lado de cada figura está a respectiva marcação para o núcleo da célula com DAPI (azul).

	<i>RAR<math>\alpha</math></i>	<i>RAR<math>\beta</math></i>	<i>RAR<math>\gamma</math></i>	<i>RXR<math>\alpha</math></i>	<i>RXR<math>\beta</math></i>	<i>RXR<math>\gamma</math></i>	<i>Captação de Iodeto</i>
<b>+TSH(72h)</b>	X	X		X	X	X	<b>Normal</b>
<b>-TSH (48h)</b>				X	X		<b>Diminui</b>
<b>Reposição TSH (48h)</b>				X	X		<b>Normal</b>

**Tabela 5** TSH modulando a captação de iodeto e a expressão dos receptores de AR.

Como observamos na **Tabela 5**, o TSH exerce seus efeitos sobre a captação de iodeto independentemente do repertório de receptores de AR, apesar de regular a expressão de alguns desses receptores.

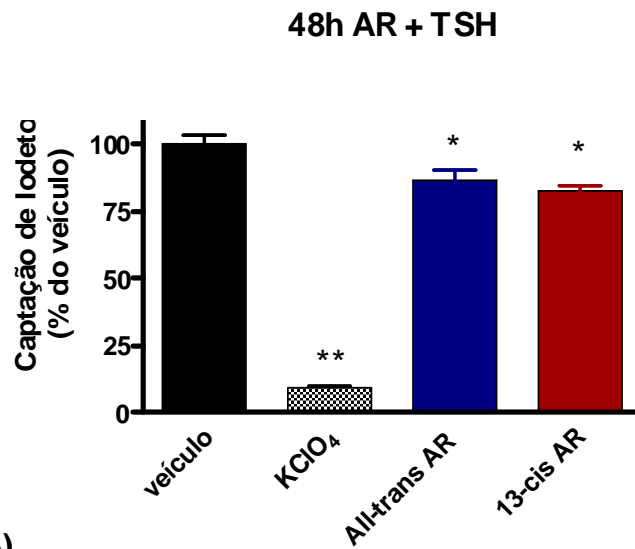
#### **6) Importância de RXR $\alpha$ e RXR $\beta$ para o efeito de diminuir a captação de iodeto das células PCCL3 do AR:**

Para tentar responder as perguntas feitas anteriormente, se seria a ausência de alguns receptores de AR ou a presença de outros, que fariam com que o AR exercesse o efeito de diminuir a captação de iodeto, fizemos o tratamento com AR nas células no momento em que apenas expressavam RXR $\alpha$  e RXR $\beta$ . Para isso cultivamos as células por 48h na ausência de TSH, em seguida adicionamos o AR na presença de TSH por 48h. Notamos que após 48h de tratamento com AR já existe a diminuição da captação de iodeto das células PCCL3, e que quando o AR é adicionado na cultura após 48h sem TSH, as células diminuem a captação de iodeto igualmente (**Figura 18**).

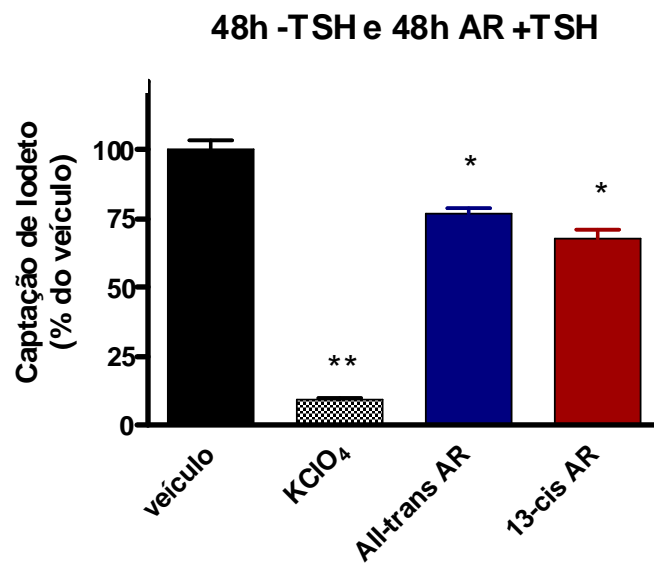
Após 48h de reposição com TSH há normalização da captação de iodeto sem que haja restauração de expressão dos receptores RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  e RXR $\gamma$ , assim notamos que sua presença não é importante para a captação de iodeto promovida pelo TSH. Além disso, o AR reduziu a captação mesmo quando adicionado no momento de ausência desses receptores, assim sendo, parece que os efeitos do AR não dependem da ligação a essas isoformas de receptores.

Parece que os homodímeros ou heterodímeros formados pelos receptores RXR $\alpha$  e RXR $\beta$  são importantes para que o AR diminua a captação de iodeto nas células PCCL3.

A)



B)



**Figura 18** Efeitos do all-trans AR e 13-cis AR ou veículo sobre o acúmulo de iodo nas células PCCL3 quando tratadas por 48h na presença de TSH. A) 48h AR + TSH; B) 48h - TSH e 48h AR + TSH. Resultados são expressos % do veículo. Os resultados foram normalizados pela quantidade de proteína quantificada pelo método de Bradford. \* $p < 0.05$  versus veículo; \*\* $p < 0.05$  versus outros grupos.

---

## V. DISCUSSÃO

O co-transportador  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  (NIS) é uma glicoproteína de membrana que medeia o transporte ativo de iodeto na glândula tireóide (Daí, 1996). A capacidade de concentrar iodeto pelo tecido tireóideo é crucial à aplicação de radioiodo no diagnóstico e tratamento de doenças benignas e malignas da tireóide. No caso do carcinoma diferenciado, a captação do radiotraçador é utilizada para avaliar recorrência tumoral, através da pesquisa de corpo inteiro (PCI), e para terapia ablativa com a administração de dose elevada de  $^{131}\text{I}$  (Coelho, 2006).

Apesar dos carcinomas papilífero e folicular manterem a maioria das propriedades do tireócito normal, uma variedade de defeitos bioquímicos já foram demonstrados. Nessas neoplasias malignas, a expressão de NIS encontra-se geralmente diminuída (Lazar, Arturi, Tanaka *apud* Coelho, 2006). Como consequência é encontrada menor capacidade de concentrar e organificar o iodo e de síntese hormonal nos tecidos carcinomatosos. Opções terapêuticas para o carcinoma dediferenciado, como a radioterapia externa e a quimioterapia, são geralmente pouco eficazes e utilizadas como tratamento paliativo. Em estudos recentes, o ácido retinóico (AR) tem-se mostrado útil como terapia rediferenciadora (Coelho, Simon, Grünald *apud* Coelho, 2006).

O AR é um metabólito ativo da vitamina A, que regula a taxa de crescimento e diferenciação de vários tipos celulares. Devido à possibilidade das configurações cis-trans da cadeia lateral, existem vários isômeros do AR: all-trans-AR (tretinoína), 13-cis-AR (isotretinoína) e 9-cis-AR (Marcus, 2000).

A ação do AR é obtida através da ligação com receptores específicos, que fazem parte da superfamília de receptores nucleares. Existem 2 tipos: o receptor de ácido retinóico (RAR) e o receptor de retinóide X (RXR). Cada família apresenta os subtipos  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . RAR e RXR atuam como fatores de transcrição ligante-dependentes, modulando a expressão dos genes responsivos ao AR. All-trans-AR liga-se ao RAR e 9-

cis-AR ao RAR e RXR. A isotretinoína não interage com nenhum dos receptores, entretanto, *in vivo* isomeriza-se espontaneamente a all-trans e 9-cis e, portanto, ativa indiretamente tanto RAR, quanto RXR.

O presente trabalho teve como objetivo demonstrar a relação entre o efeito do AR e da tireotrofina na captação de iodeto e o repertório de receptores que a célula expressa nessas situações.

Utilizamos neste trabalho cultura de linhagem de células normais de tireóide de rato chamada PCCL3, que mantém *in vitro* a maioria das características diferenciadas das células tireóideas, como secreção de tireoglobulina e captação de iodeto (Fusco, 1987).

Analizamos os efeitos do AR na viabilidade celular, morfologia celular e na captação de iodeto. Os isômeros de AR não afetaram a viabilidade nem a morfologia celular (Figuras 6 e 7). Estes dados concordam com o encontrado por Namba e colaboradores (1993) em cujo estudo o crescimento de células de tireóide normal humana não foi alterado pelo tratamento com AR, porém discordam de outros estudos mostrando diminuição do crescimento celular em células tireóideas normais humanas e de porco (Del Senno, 1993; Del Senno, 1994; Frohlich, 2001; Frohlich, 2004). Em células de carcinoma folicular da tireóide, o tratamento das células com 13-cis-AR diminuiu o crescimento celular (Van Herle, 1990). Porém, Haugen e colaboradores mostraram em outras linhagens de carcinoma folicular, que o tratamento com 9-cis-AR não alterou o crescimento celular, mas o diminuiu em células de carcinoma anaplásico (Haugen, 2004). Alguns trabalhos mostraram que o AR aumenta a morte celular de tireócitos normais de porco (Frohlich, 1999; Frohlich, 2001; Frohlich, 2004) e de células anaplásicas (Haugen, 2004). Com relação às características morfológicas, nenhum estudo foi realizado anteriormente.

Os tratamentos com os isômeros de AR diminuíram a quantidade de iodeto intracelular (Figura 8). Essa diminuição ocorreu por prejuízo na captação de iodeto e não no efluxo (Figura 9), além disso, a redução da captação parece estar relacionada com a diminuição na expressão de mRNA de NIS (Figura 10) e com sua localização intracelular (Figura 11). Este dado corresponde ao encontrado por Schmutzler e colaboradores em 1997, que verificaram em células FRTL-5, haver redução do acúmulo



de iodeto intracelular com o tratamento por AR, correlacionada à diminuição da expressão de NIS. Nesse mesmo trabalho, células de carcinoma folicular tiveram aumento de expressão de NIS, sem alteração na captação de iodeto, e em células anaplásicas não houve alteração nem na expressão nem na função de NIS. Por outro lado, em culturas primárias de células de tireóide normal de porco, houve aumento da captação sem alterações na expressão de NIS (Frohlich, 2004).

Como já foi dito, é importante conhecer o repertório de receptores que a célula expressa em cultura, para então podermos determinar o mecanismo de ação usado pelo AR naquele sistema. Verificamos que as células, quando cultivadas na presença de TSH (1mU/mL), expressam quase todos os receptores exceto o RAR $\gamma$  (Figura 12). Além disso, observamos diferente localização de alguns destes receptores, que também pode influenciar na resposta ao AR. Poucos trabalhos foram feitos mostrando a expressão dos receptores de AR nas células tireóideas normais. Del Senno e colaboradores, em 1994, mostraram neste tipo de células a expressão de RAR $\alpha$ , mas não houve expressão de RAR $\beta$  e RXR $\gamma$ . Enquanto Haugen e colaboradores em 2004, encontraram expressão de RAR $\beta$ , mas não de RXR $\gamma$ . Em tecidos tumorais a divergência é ainda maior como já foi descrito na introdução.

Já foi relatado que o status nutricional de retinóides afeta o nível de proteína ligadora de retinóides em animais adultos (Schmutzler, 1998). Além disso, a regulação da expressão de RAR $\beta$  por retinóides já foi demonstrada *in vivo* e *in vitro* (Grunt, 2005). Mostramos em nosso trabalho que os isômeros de AR foram capazes de diminuir a expressão dos receptores de AR, permanecendo apenas a expressão dos RXR $\alpha$  e RXR $\beta$  (Figura 13). Um estudo publicado em 1992 realizado por Kato e colaboradores mostrou que a deficiência de vitamina A e a sua reposição em ratos pode modular a expressão principalmente de RAR $\beta$ . Nesse estudo foi observado que a deficiência de vitamina A causou redução na expressão de RAR $\beta$ , sem influenciar a expressão do RAR $\alpha$  e RAR $\gamma$ . Ao contrário, a reposição da vitamina A fez com que a expressão de RAR $\beta$  voltasse aos níveis normais, a análise de mRNA foi feita por Northern blot e foi realizada em diversos tecidos periféricos, exceto na tireóide. Este trabalho ainda mostrou que nem a vitamina D nem o hormônio tireoideano, que são ligantes de

receptores que heterodimerizam com o receptor de retinóide, foram capazes de modular a expressão dos genes dos RARs.

Outro trabalho, publicado em 2006 por Mernitz e colaboradores, mostra o tratamento de 9-cis-AR em camundongos usados como modelo de câncer de pulmão (camundongo A/J). Este tratamento resultou em redução de 48% do crescimento tumoral e redução de 40% na incidência de tumor, além disso, aumentou a expressão do mRNA do gene de RAR $\beta$ .

Em 1994, Del Senno e colaboradores estudaram em cultura primária de tireócitos normais e adenomatosos o efeito do AR. Eles avaliaram se o TSH e o AR poderiam modular o receptor RAR $\alpha$ . Eles não encontraram nenhuma modulação, pelo menos em relação ao mRNA de RAR $\alpha$ . Já em 1998 foi mostrado o efeito do AR na expressão de seus receptores em diferentes linhagens de células, FTC-133 e FTC-238, derivadas de carcinoma folicular, e Hth74 e C643, derivadas de carcinoma anaplásico. O RAR $\alpha$  foi reduzido nas células anaplásicas após o tratamento com AR, já o RAR $\beta$  foi estimulado pelo AR nestas células, sendo que todos estes resultados foram adquiridos usando RT-PCR semi-quantitativo (Schmutzler, 1998).

Células de câncer de ovário e mama, quando tratadas com inibidor do receptor de EGF, têm a expressão de RAR $\beta$  aumentada (Grunt, 2005). Os receptores de EGF possuem uma importância crucial para a transformação maligna, progressão, diagnóstico, prognóstico e tratamento de vários tipos de câncer. Cerca de 30% dos cânceres de mama e ovário superexpressam este receptor, que é indicativo de um prognóstico desfavorável. O RAR $\beta$  se distingue dos outros receptores por dois fatores: primeiro, a interação do RAR $\beta$  com co-repressores é mais ineficiente, então os heterodímeros contendo RAR $\beta$  são mais responsivos a retinóides do que aqueles que não o contêm. Segundo, em contraste com os outros receptores de retinóides, que requerem ativação pelo ligante para transreprimir AP-1, RAR $\beta$  reprime AP-1 já na ausência de ligante. Assim o RAR $\beta$  é um importante mediador dos efeitos biológicos dos retinóides e atua como um inibidor constitutivo da atividade de AP-1. Estes achados sugerem que uma ligação entre receptor de EGF/retinóide pode gerar um

grande potencial para o design de drogas anticâncer usando inibidores do receptor de EGF e retinóides (Grunt, 2005).

Foi demonstrada por Féart e colaboradores que células mononucleares de sangue periférico de pacientes com hipotireoidismo apresentavam diminuição da expressão de alguns receptores nucleares de retinóides, como  $RAR\alpha$  e  $RAR\gamma$ . Isto sugere que os hormônios tireóideos podem regular a expressão dos receptores de retinóides.

Em 2004, Rousseau e colaboradores mostraram que células de câncer de mama positivas para o receptor de estrogênio quando tratadas com AR aumentam a expressão dos receptores  $RAR\alpha$  e  $\beta$ , o que não ocorre com as células negativas para o receptor de estrogênio (Ctrl), sendo que aumentou muito mais o receptor  $RAR\beta$ . Isto sugere uma relação entre a presença do receptor de estrogênio e a sensibilidade ao AR. Estas células de câncer de mama positivas para o receptor  $\beta$  de estrogênio,  $ER\beta$ , têm seu crescimento inibido após tratamento com AR, o que sugere também que o  $RAR\beta$  esteja relacionado com a inibição do crescimento celular (Rousseau, 2004).

Outro trabalho publicado por Elisei e colaboradores (2006) mostrou que apenas as linhagens celulares que expressaram o  $RAR\beta$  tiveram inibição da proliferação celular quando tratadas com all-trans AR, porém não tiveram variação da captação de iodeto. Estes células são derivadas de carcinoma folicular (WRO) e carcinoma folicular pouco diferenciado (NPA), enquanto que as células derivadas de carcinoma anaplásico (ARO e FRO) e medular (TT) não sofreram efeito do tratamento com AR, e não expressaram o  $RAR\beta$ .

Este resultado difere do mostrado em 2004 por Haugen e colaboradores, onde, usando RT-PCR, foi mostrado que as células WRO não expressavam nem estimulavam via 9-cis-AR, o gene de  $RAR\beta$ , assim como não houve inibição do crescimento após o tratamento com AR o que concorda com a hipótese de que a presença do  $RAR\beta$  é requerida para a inibição do crescimento. A razão pela qual a expressão do  $RAR\beta$  estava presente nas células WRO desses autores (Haugen, 2004), mas não nas células WRO de outros laboratórios é difícil de explicar; uma possibilidade sugerida pelo grupo é que elas sofram algumas mudanças durante as passagens.

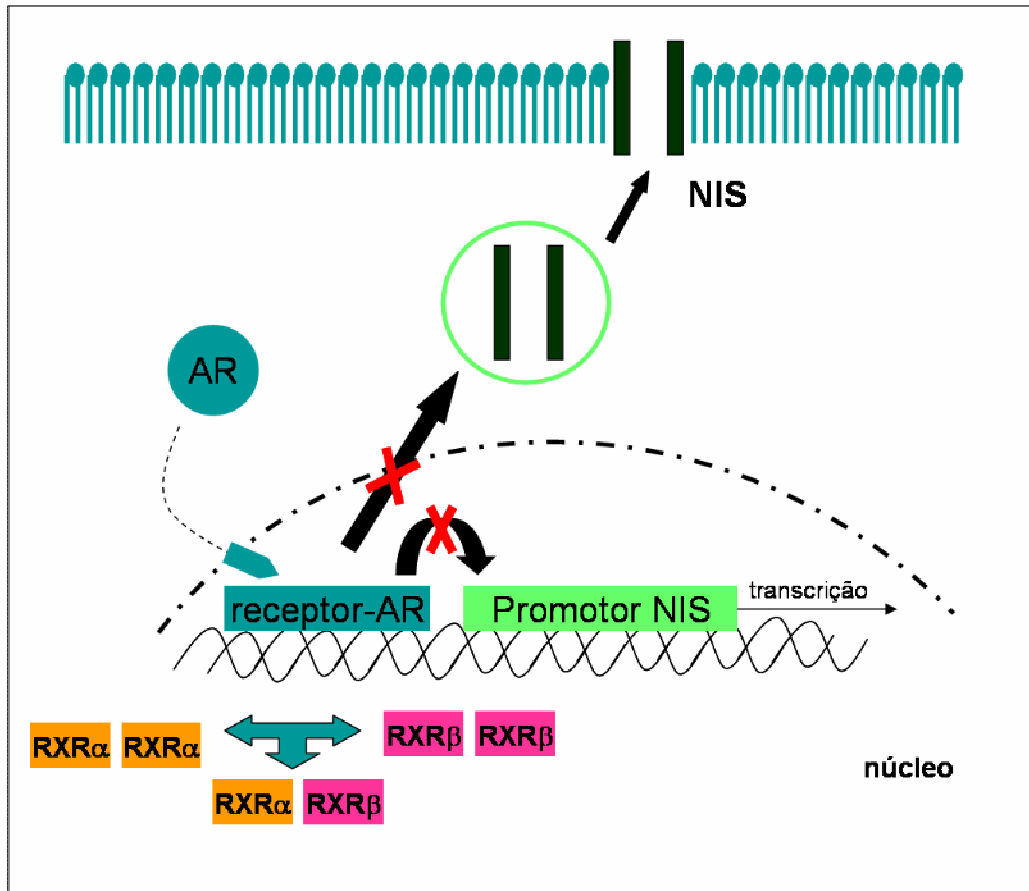
A modulação da expressão dos receptores de AR pode ocorrer por mecanismos epigenéticos. Mecanismos de silenciamento epigenético de genes supressores de tumor têm sido relacionados a carcinogênese e o RAR $\beta$  é codificado por um gene supressor de tumor frequentemente silenciado durante a carcinogênese (Mongan, 2005). Histonas desacetilases (HDAC) e DNA metiltransferases (DNMT) têm um papel fundamental e temporal de regulação da expressão gênica. Foi mostrado que inibidores de HDAC, incluindo a trichostatina A, pode induzir diferenciação e inibição de crescimento de muitos tipos de células de câncer *in vitro* (Kelly, 2002). Estudos futuros serão feitos para determinar se a diminuição da expressão dos receptores de AR ocorreu por mecanismos de silenciamento epigenético, para isso usaremos o ácido valpróico, um inibidor de HDAC, e avaliaremos se existe restauração da expressão dos receptores de AR, o que já foi demonstrado em células de câncer de mama (Mongan, 2005).

O hormônio estimulador da tireóide (TSH) é o regulador hormonal primário da função tireóidea e é conhecido por estimular a captação de iodeto na tireóide (Vassart *apud* Riedel, 2001). Nenhuma captação de iodeto é detectada em humanos cujos níveis séricos de TSH foram suprimidos e já foi demonstrado tanto *in vivo* quanto *in vitro* que o TSH é capaz de aumentar a captação de iodeto e a transcrição de NIS na tireóide de ratos (Martino *apud* Riedel, 2001). Além disso, foi observado por Riedel e colaboradores que na ausência de TSH o NIS é redistribuído da membrana plasmática para o compartimento intracelular. Isto sugere que sob deprivação de TSH, a perda da captação de iodeto pode ser devido à redistribuição intracelular de NIS. Nas células PCCL3 também observamos a redução da captação de iodeto após 48h de cultivo na ausência de TSH (**Figura 14a**) e, por microscopia confocal, observamos que o NIS se encontra no espaço intracelular (**Figura 14b**).

Na tentativa de mostrar relação entre os efeitos do TSH e do AR na função de NIS, avaliamos a expressão dos receptores de AR após 48h de cultivo sem TSH. Observamos que houve modulação negativa da expressão dos receptores de AR, restando apenas a expressão do RXR $\alpha$  e RXR $\beta$  (**Figura 15**), assim como havia ocorrido com o tratamento com AR. Porém notamos que após a reposição por 48h com TSH, apesar do retorno da captação de iodeto a níveis normais (**Figura 16**), a expressão dos

receptores continua baixa. (**Figura 17**). Isto nos sugere que não deve existir uma relação direta entre a falta dos receptores de AR e a redução da captação de iodeto, pelo menos na ausência do AR, ou seja, a simples ausência de receptores não determina uma redução da captação de iodeto, desde que se tenha TSH. Outra hipótese seria de que o RXR $\alpha$  e RXR $\beta$ , que permanecem expressos, teriam maior importância sobre a modulação negativa da expressão de NIS que os outros receptores.

Por fim, mostramos neste trabalho que o efeito que o AR exerce na diminuição da captação de iodeto continua ocorrendo mesmo com a maioria dos receptores não sendo expressos (**Figura 18**). No **Esquema 3** está sendo mostrado o modelo proposto para a regulação da captação de iodeto via receptores de ácido retinóico RXR $\alpha$  e RXR $\beta$ . Como o efeito do AR, na diminuição da captação de iodeto, ocorre quando na presença apenas dos receptores RXR $\alpha$  e RXR $\beta$ , podemos sugerir que o AR deve se ligar aos homo ou heterodímeros formados por estes receptores e assim, modular negativamente a expressão do NIS e, portanto, diminuir a captação de iodeto. Além disso, o ácido retinóico pode usar este mesmo mecanismo de ação para impedir a translocação do NIS para membrana plasmática.



**Esquema 3** Possível mecanismo usado pelo ácido retinóico para regulação da expressão e da translocação de NIS para membrana plasmática. A regulação pode ocorrer devido à interação dos AR com as isoformas RXR $\alpha$  e RXR $\beta$  dos receptores de AR.

Portanto sabemos que as ações do AR são mediados pela ligação aos receptores nucleares (RARs), que atuam como fatores de transcrição induzida por ligante formando heterodímeros com os receptores de retinóide X (RXRs) e ligando ao elemento responsivo ao AR (RARE) localizado na região regulatória dos genes alvo (Chambon, 1996). No entanto, existem evidências de que os receptores nucleares podem mediar efeitos rápidos extragenômicos que estimulam as vias de sinalização por mecanismos ainda não compreendidos, que são independentes da ligação dos receptores ao elemento responsivo ao DNA (Parker, 2002). Em 2006, Aggarwal e colaboradores, mostraram ação não clássica do AR ativando a proteína de ligação ao elemento responsivo ao AMP cíclico (CREB) em células epiteliais normais de brônquio humanas. Foi mostrado que o AR ativa CREB independentemente dos receptores de AR, já que, mesmo estando estes silenciados por pequenos RNAs de interferência

(siRNA), houve ativação. Além disso, a inibição de PKC ou ERK1/2 bloqueiam a ativação de CREB mediada pelo AR. Logo, existe ainda uma segunda possibilidade de mecanismo de ação do AR que será por mecanismos independente dos seus receptores, ativando diretamente vias de sinalização citoplasmática como as vias de PKC e MAPK.

## RESUMO DOS RESULTADOS

---

### VI. RESUMO DOS RESULTADOS

- O ácido retinóico não influencia a viabilidade celular nem a morfologia das células PCCL3;
- Ocorre diminuição da quantidade de iodeto intracelular com o tratamento de AR na dose de 1 $\mu$ M por 48 e 72 horas;
- Esta diminuição não acontece devido ao aumento do efluxo de iodeto, mas por alterações no NIS;
- Os isômeros do AR diminuem a expressão do mRNA de NIS;
- Apesar da redução do mRNA de NIS, a proteína NIS continua sendo expressa (meia-vida longa), porém existe diminuição da sua localização na membrana plasmática;
- As células PCCL3 quando cultivadas na presença de TSH expressam quase todos os receptores de AR, exceto o RAR $\gamma$ . Além disso, observamos que alguns receptores foram expressos também no citoplasma, como o RAR $\beta$  e o RXR $\gamma$ .
- O tratamento com os isômeros de AR fizeram com que as células PCCL3 diminuíssem a expressão dos RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  e RXR $\gamma$  e continuassem expressando apenas os receptores RXR $\alpha$  e RXR $\beta$ ;



- Na ausência do TSH as células diminuem sua capacidade de captação de iodeto e também diminuem a expressão dos receptores de AR, continuando a expressar apenas o RXR $\alpha$  e o RXR $\beta$ ;
- Com a reposição do TSH a célula PCCL3 volta a captar iodeto, inclusive significativamente mais do que as células que não tiveram a retirada do TSH. Porém não houve retorno da expressão dos receptores. Portanto o TSH atua independentemente do repertório de receptores de AR presente;
- Quando os isômeros de AR foram administrados no momento que a célula expressava apenas os receptores RXR $\alpha$  e o RXR $\beta$ , a célula continuou tendo sua captação reduzida.

**VII. CONCLUSÕES**

- 1) Os isômeros do AR diminuem a captação de iodeto por células PCCL3, mesmo na presença de TSH. Essa ação ocorre mesmo na ausência dos receptores RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  e RXR $\gamma$ .
- 2) A diminuição do NIS pelo AR ocorre devido à diminuição da expressão do mRNA do NIS. Há ainda diminuição da presença do NIS na membrana plasmática.
- 3) O TSH modula positivamente a expressão dos RAR e RXR, entretanto sua ação estimulatória sobre o NIS não depende da presença desses receptores.
- 4) Os isômeros de AR modulam negativamente a expressão dos receptores RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  e RXR $\gamma$  e podemos inferir que a diminuição de NIS ocorra pela ligação do AR aos receptores RXR $\alpha$  e RXR $\beta$  ou por mecanismos não clássicos independentes dos receptores de AR.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- AGGARWAL S.; Kim S-W.; Cheon K.; Tabassam F.H.; Yoon J-H.; Koo J.S. (2006). Nonclassical Action of retinoic acid on the activation of the cAMP response element-binding protein in normal human bronchial epithelial cells. *Molecular Biology of the Cell*, 17:566-575.
- BLOMHOF R. (1994). Transport and metabolism of vitamin A. *Nutr Rev*, 52:S13-23.
- CHAMBON P. (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J*, 10:940-954.
- CHAMBON P. (2005). The nuclear receptor superfamily: a person restrospect on the first two decades. *Molecular Endocrinology*, 19:1418-1428.
- CHEN J.Y.; Clifford J.; Susi C.; Starret J.; Tortolani D.; Ostrowski J.; Reczek P.R.; Chambon P.; Gronemeyer H. (1996). Two distinct actions of retinoid-receptor ligands. *Nature*, 382:819-822.
- CLIFFORD J.; Chiba H.; Sobieszczuk D.; Metzger D.; Chambon P. (1996). RXRalpha-null F9 embryonal carcinoma cells are resistant to the differentiation, anti-proliferative and apoptotic effects of retinoids. *EMBO J*, 15:4142-4155.
- COELHO, S.M.; Corbo R.; Buescu A.; Carvalho D.P.; Vaisman M. (2003). Ácido Retinóico: Uma terapia promissora para carcinoma tireoideano desdiferenciado? Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo, 47(2):190-196.
- DAI G.; Ley O.; Carrasco N. (1996). Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature*, 379:458-460.
- DAWSON M.I.; Chao W.R.; Pine P.; Jong L.; Hobbs P.D.; Rudd C.K.; Quick T.C., Niles R.M., Zhang X.K.; Lombardo A. (1995). Correlation of retinoid binding affinity to retinoic acid receptor alpha with retinoid inhibition of growth of estrogen receptor positive MCF-7 mammary carcinoma cells. *Cancer Research*, 55:4446-4451.
- DE DEKEN X.; Wang D.; Many M.C.; Costagliola S.; Libert F.; Vassart G.; Dumont J.E.; Miot F. (2000). Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 23227-23233.
- DE THE H.; Chomienne C.; Lanotte M.; Degos L. ; Dejean A. (1990A). The t(15 ;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha

gene to a novel transcribed locus. *Nature*, 347:558-561.

DEGOS L.; Wang Z.Y. (2001). All trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene*, 20:7140-7145.

DEL SENNO L.; Rossi R.; Franceschetti P.; degli Uberti E.C. (1994). Expression of all-trans-retinoic acid receptor RNA in human thyroid cells. *Biochem Mol Biol Int*, 33(6):1107-1115.

DEL SENNO L.; Rossi R.; Gandini D.; Piva R.; Franceschetti P.; Degli Uberti E.C. (1993). Retinoic acid-induced decrease of DNA synthesis and peroxidase mRNA levels in human thyroid cells expressing retinoic acid receptor alpha mRNA. *Life Sciences*, 53:1039-1048.

DOHAN O.; De la Vieja A.; Carrasco N. (2000). Molecular study of the sodium-iodide symporter (NIS): A new field in thyroidology. *TEM*, 11: 99-105.

DOHAN O.; De la Vieja A.; Paroder V.; Riedel C.; Hartan M.; Reed M.; Ginter C.S.; Carrasco N. (2003). The sodium/iodide symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. *Endocrine Reviews*, 24:48-77.

DOLLE P.; Ruberte E.; Leroy P.; Morriss-Kay G.; Chambon P. (1990). Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. I. A systematic study of their differential pattern of transcription during mouse organogenesis. *Development*, 110:1133-1151.

ELISEI R.; Vivaldi A.; Ciampi R.; Faviana P.; Basolo F.; Santini F.; Traino C.; Pacini F.; Pinchera A. (2006). Treatment with drugs able to reduce iodine efflux significantly increases the intracellular retention time in thyroid cancer cells stably transfected with sodium iodide symporter complementary deoxyribonucleic acid. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(6):2389-2395.

ENDO T.; Kaneshige M.; Nakazato M.; Ohmori M.; Harii N.; Onaya T. (1997). Thyroid transcription factor-1 activates the promoter activity of rat thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter gene. *Molecular Endocrinology*, 11:1747-1755.

FÉART, C. et al. (2005). Decreased expression of retinoid nuclear receptor (RAR- $\alpha$  and RAR- $\gamma$ ) mRNA determined by real-time quantitative RT-PCR in peripheral blood mononuclear cells of hypothyroid patients. *Journal of molecular Endocrinology*. 34:849-858.

- FILETTI S.; Bidart S-M.; Arturi F.; Caillou B.; Russo D.; Schlumberger M. (1999). Sodium/Iodide symporter: a key transporter system in thyroid cancer cell metabolism. *European Journal of Endocrinology*, 144: 443-457.
- FROHLICH E.; Brossart P.; Wahl R. (2001). Effects of retinoids on porcine thyrocytes under different culture conditions. *Histochem J*, 33(5):295-304.
- FROHLICH E.; Machicao F.; Wahl R. (2005). Action of thiazolidinediones on differentiation, proliferation and apoptosis of normal and transformed thyrocytes in culture. *Endocrine Related Cancer*, 12(2):291-303.
- FROHLICH E.; Wahl R. (1999). Effects of retinol on follicular porcine thyrocytes in culture. *Journal of Molecular Medicine*, 77:189-192.
- FROHLICH E.; Witke A.; Czarnocka B.; Wahl R. (2004). Retinol has specific effects on binding of thyrotrophin to cultured porcine thyrocytes. *Journal of Endocrinology*, 183:617-626.
- FUSCO A.; Berlingiero M.T.; Di Fiore P.P; Portella G.; Grieco M.;Vecchio G. (1987). One- and two-step transformations of rat thyroid epithelial cells by retroviral oncogenes. *Molecular and Cellular Biology*, 7(9):3365-3370.
- GARCIN H.; Higuieret P. (1983). Thyroid hormones in vitamin A-deficient rats: Effects of retinoic acid supplementation. *Ann. Nutri. Metab*, 27:495-500.
- GIGUERE V.; Ong E.S.; Segui P.; Evans R.M. (1987). Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature*, 330:624-629.
- GRUNT, T. M. et al. (2005) An EGF receptor inhibitor induces RAR- $\beta$  expression in breast cancer and ovarian cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 329:1253-1259.
- GRUNWALD F.; Pakos H.; Menzel C.; Otte R.; Palmedo H.; Pfeifer U. (1998). Redifferentiation therapy with retinoic acid in follicular thyroid cancer. *J Nucl Med*, 39:1555-1558.
- HAUGEN B.R.; Larson L.L.; Pugazhenti U.; Haus W.R.; Klopper J.P.; Kramer C.A.; Sharma V. (2004). Retinoic acid and retinoid X receptors are differentially expressed in thyroid cancer and thyroid carcinoma cell lines and predict response to treatment with retinoids. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(1):272-280.
- HERTZ S.; Roberts A. (1942). Radioactive iodine as an indicator in thyroid

physiology. V. The use of radioactive iodine in the differential diagnosis of two types of Graves' Disease. *Journal of Clinical Investigation*, 21(1): 31-32.

HERTZ S.; Roberts A.; Salter W.T. (1942). Radioactive iodine as an indicator in thyroid physiology. IV. The metabolism of iodine in Graves' disease. *Journal of Clinical investigation*, 21: 25.

HISHINUMA A.; Kasai K.; Ichimura K.; Emoto T.; Shimoda S. (1992). Effects of epidermal growth factor, phorbol ester, and retinoic acid on hormone synthesis and morphology in porcine thyroid follicles cultured in collagen gel. *Thyroid*, 2 (4):351-359.

HONG W.K.; Sporn M.B. (1997). Recent advances in chemoprevention of cancer. *Science*, 278:1073-1077.

KAGECHIKA H.; Shuo K. (2005). Synthetic retinoids: Recent developments concerning structure and clinical utility. *Journal of Medical Chemistry*, 48: 5875-5883.

KASTNER P.; Mark M.; Chambon P. (1995). Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell*, 83:859-869.

KASTNER P.; Mark M.; Ghyselinck N.; Krezel W.; Dupe V.; Grondona J.M.; Chambon P. (1997). Genetic evidence that the retinoids signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development. *Development*, 124:313-326.

KATO S.; Mano H.; Kumazawa T.; Yoshizawa Y.; Kojima R.; Masushige S. (1992). Effect of retinoid status on  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  retinoic acid receptor mRNA levels in various rat tissues. *Biochem J*, 286:755-760.

KELLY W.K.; O'Connor O.A.; Marks P.A. (2002). Histone deacetylase inhibitors: from target to clinical trials. *Expert Opin Investigation Drugs*, 11:1695-1713.

KOGAI T.; Endo T.; Saito T.; Miyazaki A.; Kawaguchi A.; Onaya T. (1997) Regulation by thyroid-stimulating hormone of sodium-iodide symporter gene expression and protein levels in FRTL-5 cells. *Endocrinology*, 138:2227-2232.

KUMAR, V.; Abbas, A.; Fausto, N. O Sistema Endócrino. *Patologia: Robbins e Cotran Bases Patológicas das Doenças*. 7. ed. São Paulo. Elsevier Editora Ltda, 2005. cap. 24, p. 1230.

KUPUMBATI T.; Cattoretti G.; Marzan C.; Farias E.F.; Taneja R.; Lopez R. (2006).

Dominant negative retinoic acid receptor initiates tumor formation in mice. *Molecular Cancer*, 5:12.

LAUDET V.; Hanni C.; Coll J.; Catzeflis F.; Stehelin D. (1992). Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO J*, 11:1003-1013.

LEID M.; Kastner P.; Lyons R.; Nakshatri H.; Saunders M.; Zacharewski T.; Chen J.Y.; Staub A.; Garnier J.M.; Mader S. (1992). Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently. *Cell*, 68:377-395.

LEVY O.; Dai G.; Riedel C.; Ginter C.S.; Paul E.M.; Lebowitz A.N.; Carrasco N. (1997) Characterization of the thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter with an anti-COOH terminus antibody. *PNAS*, 94:5568-5573.

LEVY O.; De la Vieja A.; Ginter C.S.; Riedel C.; Dai G.; Carrasco N. (1998). N-linked glycosylation of the thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter (NIS). Implications for its secondary structure model. *Journal of Biological Chemistry*, 273:22657-22663.

LIN R.J.; Egan D.A.; Evans R.M. (1999). Molecular genetics of acute promyelocytic leukemia. *Trends Genetic*, 15:179-184.

LIU S.; Ogilvie K.M.; Klausing K.; Lawson M.A.; Jolley D.; Li D. (2002). Mechanism of selective retinoid X receptor agonist-induced hypothyroidism in the rat. *Endocrinology*, 143:2880-2885.

LOTAN R.; Dawson M.I.; Zou C.C.; Jong L.; Lotan D.; Zou C.P. (1995a). Enhanced efficacy of combinations of retinoic acid- and retinoid X receptors-selective retinoids and alpha-interferon in inhibition of cervical carcinoma cell proliferation. *Cancer Research*, 55:232-236.

MANGELSDORF D.J.; Evans R.M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*, 83:841-850.

MANGELSDORF D.J.; Ong E.S.; Dyck J.A.; Evans R.M. (1990). Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature*, 345:224-229.

MANGELSDORF D.J.; Umesono K.; Kliewer S.A.; Borgmeyer U.; Ong E.S.; Evans R.M. (1991). A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR. *Cell*, 555-561.

MARCUS R.; Coulston A.M. (2000). Fat-soluble vitamins: vitamins A, K and E. In:

- Hardman J.G.; Limbird L.E.; Gilman A.G., editors. *Goodman and Gilman's the pharmacologic basis of therapeutics*. 10<sup>th</sup> edition. New York: Mc Graw Hill, p.1773-1792.
- MARK M.; Ghyselinck N.B.; Wendling O.; Dupe V.; Mascrez B.; Kastner P.; Chambon P. (1999). A genetic dissection of the retinoid signaling pathway in the mouse. *Proc Nutr Soc*, 58:609-613.
- MERNITZ, H. et al. (2006). 9-cis-Retinoic acid inhibition of lung carcinogenesis in the A/J mouse model is accompanied by increased expression of RAR- $\beta$  but no change in cyclooxygenase -2. *Cancer Letters*, 244(1):101-108.
- MONGAN N.P.; Gudas L.J. (2005). Valproic acid, in combination with all-trans retinoic acid and 5-aza-2'-deoxycytidine, restores expresi3n of silenced RAR $\beta$ 2 in breast cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4(3):477-486.
- MORLEY J.E.; Damassa D.A.; Gordon J.; Pekary E; Hershman J.M. (1978). Thyroid function and vitamin A deficiency. *Life Science*, 2:1901-1906.
- NAMBA H.; Yamashita S.; Morita S.; Villadolid M.C.; Kimura H.; Yokohama N.; Izumi M.; Ishikawa N.; Ito K.; Nagataki S. (1993). Retinoic acid inhibits human thyroid peroxidase and thyroglobulin gene expression in cultured human thyrocytes. *Journal Endocrinology Investigation*, 16(2):87-93.
- NISSIM M.; Lee K.O.; Petrick P.A.; Weintraub B.D. (1987). A sensitive thyrotropin (TSH) bioassay based on iodide uptake in rat FRTL-5 thyroid cells: comparison with adenosine 3', 5'-monophosphate response to human serum TSH and enzymatically deglycosylated bovine and human TSH. *Endocrinology*. 121:1278-1287.
- OHMORI M.; Endo T.; Harii N.; Onaya T. (1998). A novel thyroid transcription factor is essential for thyrotropin-induced up-regulation of Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter gene expression. *Molecular Endocrinology*, 12:727-736.
- OHNO M.; Zannini M.; Levy O.; Carraco N.; Di Lauro R. (1999). The paired-domain transcription factor Pax-8 binds to the upstream enhancer of the rat sodium-iodide symporter gene and participates in both thyroid-specific and cyclic-AMP-dependent transcription. *Molecular and Cellular Biology*, 19:2051-2060.
- PAIRE A.; Bernier-Valentin F.; Selmi-Ruby S. ; Rousset B. (1997). Characterization of the rat thyroid iodide transporter using anti-peptide antibodies. Relationship



between its expression and activity. *Journal of Biological Chemistry*, 272:18245-18249.

PETKOVICH M.; Brand N.J.; Krust A.; Chambon P. (1987). A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 330:444-450.

PETTY W.; Li N.; Biddle A.; Bounds R.; Nitkin C.; Ma Y.; Dragnev K.; Freemantle S.; Dmitrovsky E. (2005). A novel retinoic acid receptor beta isoform and retinoid resistance in lung carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(22):1645-1651.

RIEDEL C.; Levy O.; Carrasco N. (2001). Post-transcriptional regulation of the sodium/iodide symporter by thyrotropin. *The Journal of Biological Chemistry*, 276:21458-21463.

RIESCO-EIZAGUIRRE G.; Santisteban P. (2006). A perspective view of sodium iodide symporter research and its clinical implications. *European Journal of Endocrinology*, 155:495-512.

ROCHETTE-EGLY C.; Chambon P. (2001). F9 embryocarcinoma cells: a cell autonomous model to study the functional selectivity of RARs and RXRs in retinoid signaling. *Histol Histopathol*, 16:909-922.

ROUSSEAU C.; Nichol J. N.; Pettersson F. ; Couture M.C ; Miller W.H. (2004). ER $\beta$  sensitizes breast cancer cells to retinoic acid: evidence of transcriptional crosstalk. *Molecular Cancer Research*, 2(9):523-531.

ROWE A.; Eager N.S.; Brickell P.M. (1991). A member of the RXR nuclear receptor family is expressed in neural-crest-derived cells of the developing chick peripheral nervous system. *Development*, 111:771-778.

SCHMUTZLER C. (2001). Regulation of the sodium/iodide symporter by retinoids – a review. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 109:41-44.

SCHMUTZLER C.; Kohrle J. (1998). Implications of the molecular characterization of the sodium-iodide symporter (NIS). *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 106(3):S1-10.

SCHMUTZLER C.; Kohrle J. (2000). Retinoic acid redifferentiation therapy for thyroid cancer. *Thyroid*, 10(5):393-406.

SCHMUTZLER C.; Winze R.; Meissner-Weigl J.; Köhrle J. (1997). Retinoic acid

- increases sodium/iodide symporter mRNA levels in human thyroid cancer cell lines and suppresses expression of functional symporter in nontransformed FRTL-5 rat thyroid cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 240:832-838.
- SCHMUTZLER, C. et al. (1998) Functional retinoid and thyroid hormone receptors in human thyroid-carcinoma cell lines and tissues. *Int. J. Cancer*, 76:368-376.
- SCHRECK R.; Schnieders F.; Schmutzler C.; Köhrle J. (1994). Retinoids stimulate type I iodothyronine 5'-deiodinase activity in human follicular thyroid cell lines. *Journal Clinical Endocrinology Metabolism*, 79:791-798.
- SCOTT D.A.; Wang R.; Kreman T.M.; Sheffield V.C.; Karniski L.P. (1999). The pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein. *Nature Genetics*, 21:440-443.
- SIMKINS S. (1947). Use massive doses of vitamin A in the treatment of hyperthyroidism – a preliminary reports. *Journal Clinical Endocrinology Metabolism*, 7:574-585.
- SIMON D.; Koehrle J.; Reiners C.; Boerner A.R., Schmutzler C.; Mainz K.; Goretzki P.E.; Roeher H.D. (1998). Redifferentiation therapy with retinoids: Therapeutic option for advanced follicular and papillary thyroid carcinoma. *World Journal of Surgery*, 22:569-574.
- SIMON D.; Kohrle J.; Schmutzler C.; Mainz K.; Reiners C.; Röher H.D. (1996). Reddifferentiation therapy of differentiate thyroid carcinoma with retinoic acid: basics and first clinical results. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 104(4):13-15.
- SIMON, D.; Körber c.; Krausch m.; Segering J.; Groth P.; Görges R.; Günwald F.; Müller-Gärtner H.M.; Schmutzler C.; Köhrler J.; Röher H.D.; Reiners C. (2002). Clinical impact of retinoids in redifferentiation therapy of advanced thyroid cancer: final results of a pilot study. *European Journal of Nuclear Medicine*. 29(6):775-782.
- SMANIK P.A.; Liu Q.; Furminger T.L.; Ryu K.; Xing S.; Mazzaferri E.L. Jhiang S.M. (1996). Cloning of the human sodium iodide symporter. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 226:339-345.
- SPORN M.B.; Dunlop N.M.; Newton D.L.; Smith J.M. (1976). Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). *Fed Proc*, 35:1332-1338.

SPORN M.B.; Roberts A.B.; Goodman D.S. (1994). The retinoids: Biology, chemistry and medicine. *Raven Press*.

TAKI K.; Kogai T.; Kanamoto Y.; Hershman J.M.; Brent G.A. (2002). A thyroid-specific far-upstream enhancer in the human sodium/iodide symporter gene requires Pax-8 binding and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-like sequence binding proteins for full activity and is differentially regulates in normal and thyroid cancer cells. *Molecular Endocrinology*, 16:2266-2282.

TAKIYAMA Y.; Miyokawa N.; Sugawara A.; Kato S.; Ito K.; Sato K.; Oikawa K.; Kobayashi H.; Kimura S.; Tateno M. (2004). Decreased expression of retinoid X receptors isoforms in human thyroid carcinomas. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(11):5851-5861.

TANG W.; Nakamura Y.; Zuo H.; Yasuoka H.; Yang O.; Wang X.; Nakamura M.; Mori I.; Miyauchi A.; Kakudo K. (2003). Differentiation, proliferation and retinoid receptor status of papillary carcinoma of the thyroid. *Pathology International*, 53(4):204-213.

THACHER S.M.; Vasudevan J.; Chandraratna R.A. (2000). Therapeutic applications for ligands of retinoid receptors. *Current Pharmaceutical Design*, 6:25-58.

TUNCEL M.; Aydin D.; Yaman E.; Tazebay U.; Güç D.; Dogan A.; Tasbasan B.; Ugur O. (2007). The comparative effects of gene modulators on thyroid-specific genes and radioiodine uptake. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 22(2):281-288.

UNTERHOLNER S.; Willhauck M.J.; Cengic N.; Schütz M.; Göke B.; Morris J.C.; Spitzweg C. (2006). Dexamethasone stimulation of retinoic acid-induced sodium iodide symporter expression and cytotoxicity of <sup>131</sup>I breast cancer cells. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 9(1):69-78.

VAN HERLE A.J.; Agatep M.L.; Padua D.M.; Totanes I.L.; Canlapan D.V.; Herle H.M.L. (1990). Effects of 13-cis-retinoic acid on growth and differentiation of human follicular carcinoma cells (UCLA RO 82 W-1) in vitro. *Journal Clinical Endocrinology Metabolism*, 71:755-763.

WEISS S.J.; Philp N.J.; Ambesi-Impiombato F.S.; Grollman E.F. (1984). Thyrotropin-stimulated iodide transport mediated by adenosine 3',5'-monophosphate and dependent on protein synthesis. *Endocrinology*, 114:1099-1107.

WESTIN S.; Kurokawa R.; Nolte R.T.; Wisely G.B.; McInerney E.M.; Rose D.W.;

MILBURN M.V.; Rosenfeld M.G.; Glass C.K. (1998). Interactions controlling the assembly of nuclear-receptor heterodimers and co-activators. *Nature*, 395:199-202.

XU J.; Kogai T.; Brent G.A.; Hershman J.M. (2002). A GC box in the human sodium iodide symporter gene promoter is essential for full activity. *Thyroid*, 12:107-114.

YU V.C.; Delsert C.; Andersen B.; Hollway J.M.; Devary O.V.; Naar A.M.; Kim S.Y.; Boutin J.M.; Glass C.K.; Rosenfeld M.G. (1991). RXRbeta: a coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response elements. *Cell*, 67:1251-1266.

# ANEXO

Tipos de Células	Origem	Tratamento	Crescimento Celular	Morte Celular	Secreção de tireoglobulina	Síntese de T3 e T4	Ativação de D1	Captação de iodeto	Expressão de NIS	Referências
UCLA RO 82W-1 (folicular)	Humana	13-cis AR	Diminui				Diminui	Aumenta		Van Herle AJ., 1990
Tireóide normal	Porco	AR (Qual ?)				Diminui				Hishinuma A., 1992
Tireóide normal	Humana	AR (Qual ?)	não altera		Diminui					Namba H., 1993
Tireóide normal	Humana	All-trans AR	Diminui		não altera					del Senno L., 1993
Tireóide normal	Humana	AR (Qual ?)	Diminui							del Senno L., 1994
FTC-133 e FTC-238	Humana	All-trans, 9-cis e 13-cis AR					Aumenta			Schreck R., 1994
Linhagem anaplásica	Humana	All-trans, 9-cis e 13-cis AR					não altera			Schreck R., 1994
FTC-133 e FTC-238	Humana	All-trans AR						não alterou	Aumenta	Schmutzler C., 1997
HTh74 e C643 (anaplásicos)	Humana	All-trans AR						não alterou	não alterou	Schmutzler C., 1997
FRTL-5	Rato	All-trans AR						Diminui	Diminui	Schmutzler C., 1997
Tireóide normal	Porco	Retinol		Aumenta						Fröhlich E., 1999
MCF-7 (tumor mama)	Humana	All-trans AR						Aumenta	Aumenta	Kogai T., 2000
Tireóide normal	Porco	Retinol	Diminui	Aumenta	Diminui					Fröhlich E., 2001
MCF-7 (tumor mama)	Humana	9-cis AR						Aumenta	Aumenta	Tanosaki S., 2003
Tireóide normal	Porco	Retinol	Diminui	Aumenta				Aumenta	não alterou	Fröhlich E., 2004
MRO e WRO (folicular)	Humana	9-cis AR	não altera							Haugen BR., 2004
DRO (anaplásico)	Humana	9-cis AR	Diminui	Aumenta						Haugen BR., 2004

**Tabela 1.** Resumo dos resultados dos tratamentos com ácido retinóico em células normais e tumorais.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)