

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

Dissertação de Mestrado

**Expressão gênica do GPER1 e sua proteína no tecido tireoidiano
normal e no bócio**

Raquel Weber

Orientadora: Tania Weber Furlanetto

Porto Alegre, novembro de 2013

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

**Expressão gênica do GPER1 e sua proteína no tecido tireoidiano
normal e no bócio**

Raquel Weber

Orientadora: Tania Weber Furlanetto

Dissertação de Mestrado apresentada ao PPG
em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS, como
requisito para obtenção do grau de Mestre.

Porto Alegre, novembro de 2013

CIP - Catalogação na Publicação

Weber, Raquel

Expressão gênica do GPER1 e sua proteína no tecido tireoidiano normal e no bócio / Raquel Weber. -- 2013. 75 f.

Orientadora: Tania Weber Furlanetto.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. tireoide. 2. bócio. 3. GPER1. 4. estradiol. 5. gene de referência. I. Furlanetto, Tania Weber, orient. II. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação aos meus queridos pais, Ovídia e Roque,
e a minha amada irmã Cristiane Weber.

Fico feliz em compartilhar com vocês essa conquista!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a Dra. Tania Weber Furlanetto, por me aceitar como sua aluna, por compartilhar comigo seus conhecimentos e por toda a sua disponibilidade durante a elaboração e a realização deste trabalho;

À Dra. Ana Paula Santin Bertoni, pela amizade, pela disponibilidade em me ensinar as técnicas, pela revisão textual e auxílio na interpretação dos resultados;

À Dra. Ilma Simoni Brum por permitir eu utilizar os laboratórios LABiMET e LAGOM para a realização dos experimentos;

À FIPE/HCPA, CAPES/PROF e CNPq pelo financiamento dessa pesquisa;

Aos queridos colegas do Laboratório Weinmann pela paciência e apoio;

Agradeço a Simone Martins de Castro, Ana Lúcia Antunes, Sandrine Comparsi Wagner, Vivian Dadalt Reichter e Rejane Oravec pelo exemplo e incentivo pela busca do meu desenvolvimento profissional;

Ao Pe. Celestino Fritzen pela amizade, conselhos e caronas;

Agradeço à Deus pelos meus pais e irmã. Vocês são meus exemplos de vida! Obrigada por todo carinho, compreensão e apoio!

E a todas as outras pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização desta pesquisa.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.

Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

Define-se como bócio um aumento benigno de volume da tireoide não relacionado a doenças autoimunes, infiltrativas ou neoplasias. A causa mais comum é carência de iodo, no entanto, mesmo em áreas com suficiência de iodo, os bócios ocorrem, por mecanismos desconhecidos, e são mais comuns nas mulheres. A presença dos receptores clássicos do estrogênio (ER α e ER β) no tecido tireoidiano já foi descrita, bem como o efeito direto do estradiol na glândula. Porém, a presença do receptor de estrogênio acoplado a proteína G (GPER1) em bócio ainda não foi descrita. Esse estudo teve como objetivos avaliar a expressão gênica e protéica de GPER1 em tecido de tireoide humano normal e bócio, e estimar a prevalência de expressão gênica ou protéica do GPER1 nesses tecidos. As metodologias utilizadas para avaliar a expressão gênica e protéica do GPER1 foram a Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real a partir de Transcrição Reversa (RT-qPCR) e o Western Blot, respectivamente. A fim de realizar uma acurada comparação dos níveis de mRNA em amostras de tecido de tireoide normal e bócio, realizou-se a escolha de um gene de referência para normalizar os dados obtidos pela RT-qPCR. Dentre os seis genes avaliados, a beta-actina foi o mais estável, calculado pelo programa NormFinder, sendo adequada sua utilização como gene de referência, a fim de minimizar o efeito das variações experimentais inerentes ao método. Na análise da expressão gênica, o mRNA do GPER1 estava presente em todas as amostras avaliadas (normal=16 e bócio=19), com um nível de expressão maior em tecido normal de tireoide, quando comparado ao bócio ($p=0,01$). Na análise da expressão protéica, em todas as amostras de tecido normal avaliadas ($n=15$), verificou-se a presença da proteína do GPER1 (banda com peso molecular ~38 KDa). Porém, em 28% das amostras de bócio ($n=13$), não foi identificada a expressão protéica desse receptor. Além disso, os níveis de proteína do GPER1 foram significativamente menores no bócio, quando comparados aos do tecido normal de tireoide ($p=0,002$). Esses dados sugerem que o GPER1 está presente em células normais na tireoide, e que, o desenvolvimento do bócio pode desencadear, ou ser consequência, da perda de expressão desse receptor.

Palavras-chave: tireoide, bócio, GPER1, estradiol, gene de referência

ABSTRACT

Goiter is an enlarged thyroid not related to autoimmune, infiltrative or neoplastic diseases. Iodine deficiency is its most common cause. But, even in areas with sufficient iodine, the goiter occurs by unknown mechanisms, and it is more frequent in women. The presence of classical estrogen receptors (ER α and ER β) in thyroid tissue has been described, indicating a direct effect on the gland. However, in goiter, the presence of the G-protein coupled estrogen receptor (GPER1) has not been described. The aims of this study were to evaluate GPER1 gene and protein expressions in normal human thyroid tissue and goiter, and to estimate the prevalence of gene expression or protein GPER1 in these tissues. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) and Western blot were used to evaluate GPER1 gene and protein expressions, respectively. In order to perform an accurate comparison of mRNA levels in tissue samples from normal thyroid and goiter a reference gene was validated to normalize RT-qPCR. Among the six genes analyzed, beta-actin was the most stable, as calculated by the NormFinder program. In gene expression analysis, GPER1 mRNA was present in all samples (normal=16 and goiter=19), with a higher expression level in normal thyroid than in goiter ($p=0.01$). In all normal samples tested ($n=15$) the presence of GPER1 protein (band with molecular weight ~ 38 kDa) was identified by Western blot. However, it was not found in 28% of goiter samples ($n=13$). Furthermore, GPER1 protein levels were significantly lower in goiter than in normal thyroid ($p=0.002$). These data suggest that GPER1 is present in normal thyroid cells, and goiter development could trigger or be a consequence of the loss of this receptor expression.

Key-words: thyroid, goiter, GPER1, estradiol, reference gene

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localização da glândula tireoide.....	14
Figura 2. Estrutura do folículo	15
Figura 3. Representação esquemática de um receptor com sete domínios transmembrana	21
Figura 4. Representação esquemática da sinalização mediada pelo GPER1	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Presença dos receptores de estrogênio (ER α , ER β) na tireoide por técnica de imuno-histoquímica	19
Tabela 2. Expressão gênica e/ou protéica de GPER1 em diferentes tecidos	26
Tabela 3. Estudos de efeitos não genômicos do E2 em células de tireoide	29

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc	Adenosina monofostato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
DAG	Diacilglicerol
E2	17- β -estradiol
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidermal
ER	Receptor de estrogênio
ERK1/2	Proteína quinase regulada por sinais extracelulares 1 e 2
G1	Agonista do GPER1
G15	Antagonista do GPER1
GDP	Guanosina difosfato
GPCR	Receptor acoplado à proteína G
GPER1	Receptor de estrogênio acoplado à proteína G
GPR30	Receptor acoplado à proteína G 30
GTP	Guanosina trifosfato

H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HB-EGF	Fator de crescimento epidermal ligado a heparina
HIS	Hibridização <i>in situ</i>
HIQ	Imuno-histoquímica
IP3	Inositol trifosfato
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MMP	Metaloproteinase
NIS	Co-transportador sódio/iodeto
OHT	Tamoxifeno
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDS	Pendrina
PIP2	Fosfatidilinositol bifosfato
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
PKC	Proteína quinase C
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa
7TM	Receptor com sete domínios transmembrana
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
TG	Tireoglobulina
TGB	Globulina ligadora de tiroxina

ThOx	Oxidase tireoidiana
TPO	Tireoperoxidase
TRH	Hormônio liberador de tireotrofina
TSH	Hormônio estimulante da tireoide
TTR	Transtirretina
WB	Western bot

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 O estradiol.....	18
2.2 Receptores acoplados à proteína G	20
2.3 Proteína G	21
2.4 Receptor de estrogênio acoplado à proteína G.....	22
2.5 Presença de GPER1 em diversos tecidos.....	25
2.6 Transdução de sinal pelo GPER1	27
2.7 Efeitos não genômicos do E2 na tireoide	29
3 JUSTIFICATIVA.....	31
4 OBJETIVO GERAL.....	32
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO	33
6 ARTIGOS EM INGLÊS	46
6.1 Escolha do gene de referência.....	46
6.2 Expressão gênica e protéica do GPER1 em tecido normal e bócio	59
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	73

1 INTRODUÇÃO

A glândula tireoide tem papel primordial na manutenção da homeostase corporal através da ação dos hormônios tiroxina (T4) e triiodotironina (T3), por ela produzidos. No embrião humano, a glândula desenvolve-se a partir do endoderma e migra da boca primitiva para a porção anterior do pescoço. Em adultos, a tireoide se localiza na região ântero-inferior do pescoço e pesa em torno de 20 a 30g. É composta por dois lobos laterais, apoiados nos primeiros anéis traqueais e unidos por um istmo mediano de tamanho variável, conforme representado na Figura 1 (Hansen, 1997; Houssay, 2004; Vanderpump, 2008).

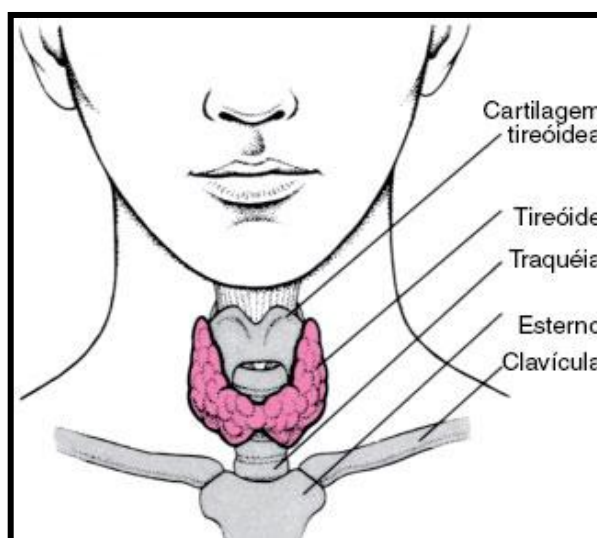


Figura1: Localização da glândula tireoide.

Fonte: <http://mmspf.msdonline.com.br/pacientes/manualmerck/secao13/cap145.html>

A atividade da glândula tireoide é controlada pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-tireoidiano. O hipotálamo é responsável pela síntese do hormônio liberador de tireotrofina (TRH) que atua na hipófise anterior, regulando a produção do hormônio estimulante da tireoide (TSH). O TSH liga-se a receptores específicos nas células da tireoide e estimula todas as etapas de síntese do T3 e T4, além de controlar sua secreção. Por sua vez, os níveis de T3 e T4 inibem, por retroalimentação negativa, a síntese e liberação do TSH e do TRH (Azevedo, 2005).

A unidade anatomofuncional da glândula é o folículo tireoidiano, que tem forma esférica e é revestido por um epitélio de células cúbicas. Estas células secretam para a luz do folículo o colóide tireoidiano, cujo principal constituinte é a tireoglobulina (TG), uma glicoproteína iodada. Entre os folículos encontra-se o tecido intersticial, muito rico em capilares. Dessa forma, a membrana basal das células foliculares está em contato com capilares sanguíneos e sua membrana apical com o colóide intrafolicular (Figura 2). Junto aos folículos encontram-se um grupo de células parafoliculares (células C), que secretam calcitonina (Houssay,2004).

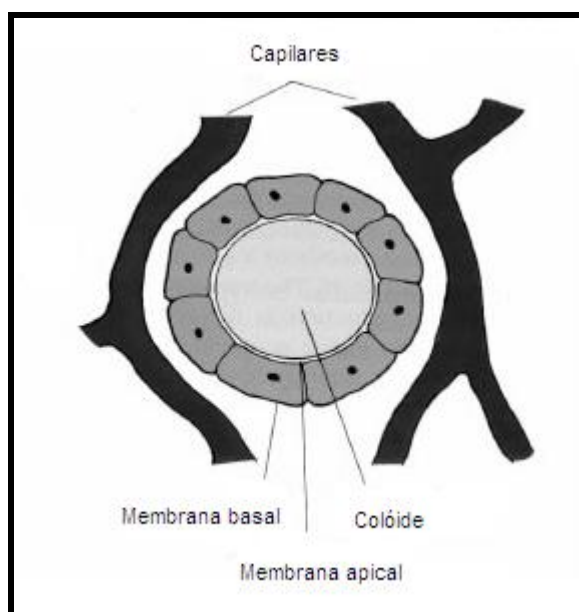


Figura 2: Estrutura do folículo

(Modificado de <http://www.misodor.com/HIPOTIREOIDISMO.php>).

A biossíntese dos hormônios tireoidianos depende da ação de várias proteínas presentes nas células foliculares. O co-transportador sódio/iodeto (NIS), existente na membrana basal, é responsável pela captação do iodeto da corrente sanguínea. No interior celular, o iodeto se difunde em direção ao espaço luminal, devido a um gradiente eletroquímico existente. Na membrana apical, o iodeto é transportado pela pendrina (PDS) para o lúmen onde será incorporado a TG. Essa organificação depende da oxidação prévia do iodeto, catalisada pela tireoperoxidase (TPO), na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 é gerado pela oxidase tireoidiana (ThOx), sendo que esse passo é o limitante da biossíntese de T3 e T4 em condições de suficiência de iodo. A expressão gênica do NIS, PDS, TPO, ThOx e Tg também é regulada pelo TSH (Vaisman, 2004).

O colóide, contendo o T3 e T4, é fagocitado a partir da membrana apical da célula folicular. Essa fagocitose é ativada pelo TSH pelo aumento de adenosina monofosfato cíclico (AMPc). Por ação de lisossomas, que hidrolisam a TG, os hormônios são liberados e migram por difusão passiva para a membrana basal, onde atingem a corrente circulatória (Houssay, 2004).

T4 e T3, por serem moléculas hidrofóbicas, se ligam a três proteínas plasmáticas de forma reversível: globulina ligadora de tiroxina (TBG), transtirretina (TTR) e albumina, a fim de serem transportados pelo sangue até os órgãos alvo. Lá, na forma livre, atuam em receptores nucleares envolvidos na regulação da transcrição de genes. Como o T3 possui maior afinidade pelo receptor, boa parte do T4 é convertida em T3 nesses órgãos, pela ação de desiodinases. Os hormônios tireoidianos desencadeiam efeitos neuromusculares, hematopoiéticos, cardiovasculares, gastrointestinais, pulmonares, no metabolismo de lipídeos e carboidratos, no desenvolvimento fetal e no controle da temperatura corpórea (Cooper, 2013).

Define-se bócio como o aumento de volume da tireoide através de hipertrofia e hiperplasia glandulares. Os bócios podem ser classificados segundo suas características morfológicas e funcionais. Distinguem-se em difusos ou nodulares, tóxicos ou atóxicos e hipocaptantes (frios), normocaptantes (mornos) ou hipercaptantes (quentes). Os bócios difusos resultam de um crescimento uniforme e generalizado da glândula (bócio simples), ao passo que os nodulares se formam a

partir de crescimento neoplásico ou não (Burrow,1991; LiVolsi, 1997; Nobrega, 2006).

Os termos atóxico e tóxico referem-se à ocorrência ou não de hiperfunção. Classifica-se como atóxico o bócio que tem expressão clínica de produção hormonal normal ou diminuída. Já o tóxico refere-se ao bócio que apresenta produção excessiva de hormônios. Cintilograficamente, os nódulos podem ser chamados de hipocaptantes, de normocaptantes e de hipercaptantes. Essa nomenclatura descreve a quantidade de radiotraçador que o bócio concentra comparada à quantidade presente no resto do parênquima (Dumont, 1992; Nobrega, 2006).

A deficiência de iodo era a causa mais comum de bócio atóxico (Knudsen, 2002). Com a disseminação do uso de sal iodado a deficiência de iodo tornou-se menos frequente. Dados epidemiológicos brasileiros confirmam esse dado, pois demonstram que houve uma queda de 86% na prevalência de bócio em crianças na faixa de 6 a 14 anos, após a implementação de políticas oficiais de suplementação (Corrêa, 2002).

Nas regiões do mundo sem deficiência de iodo o bócio atóxico possui uma prevalência em torno de 7%, afetando mais mulheres do que homens, em uma proporção entre 4:1 (Tunbridge, 1997). A causa do bócio na ausência de deficiência de iodo, auto-imunidade, ou defeitos biossintéticos óbvios é desconhecida (Cooper, 2013). Devido a essa maior prevalência em mulheres, os hormônios sexuais poderiam estar envolvidos na fisiopatologia dessa doença.

2 REVISAO DA LITERATURA

2.1 O Estradiol

O 17- β -estradiol (E2) é um hormônio esteroide, com baixo peso molecular (272,38g/mol). Derivado do colesterol tem como precursor imediato a androstenediona ou a testosterona. É sintetizado em grandes quantidades no ovário pelas células granulosas, a partir de precursores androgênicos proporcionados pelas células tecais. Sua produção é regulada por hormônios hipofisários e hipotalâmicos. Outros tecidos como a placenta, glândula suprarrenal, tecido adiposo, cérebro, músculo, mama e testículo também são responsáveis pela biossíntese desse hormônio, devido à presença da enzima aromatase (Houssay, 2004).

Além de ser responsável pelas características sexuais femininas, o E2 exerce diversas ações fisiológicas. Nos hormônios tireoidianos, o E2 age de forma indireta, pois interfere na concentração de TBG e TTR. Em situações de hiperestrogenismo, ocorre um aumento de TBG e uma diminuição de TTR. Como consequência, ocorre um aumento dos níveis séricos de T3 e T4 (Man, 1969; Glinoe, 1978; Azevedo, 2005).

Devido ao caráter lipofílico do E2, ações diretas são mediadas por receptores intracelulares: o receptor de estrogênio (ER) alfa e ER beta. Os efeitos modulados por esses receptores são considerados lentos, pois envolvem a regulação da transcrição de genes. Conforme revisado por Santin (Santin, 2011) a presença de receptores de E2 já foi descrita na tireoide, tanto em tecidos com lesões benignas, quanto em malignas (Tabela 1).

Tabela 1: Presença dos receptores de estrogênio (ER α , ER β) na tireoide por técnica de imuno-histoquímica (Modificado de Santin, 2011).

Estudo	Isoforma	Benigno			Carcinoma		
		Adenoma	Bócio	Papilar	Folicular	Medular	Anaplásico
Vaiman, 2010	ER α	0/34*	0/150	0/90	0/6	0/4	0/5
	ER β	30/34	126/150	60/90	4/6	3/4	3/5
Winter, 2010	ER α			1/1			
Vannucchi, 2010	ER α						
Cho, 2007	ER α					10/11	
	ER β					8/11	
Bléchet, 2007	ER α					0/28	
	ER β					26/28	
Ceresini, 2006	ER α		0/17	0/17			
	ER β		17/17	14/17			

* Relação entre número de amostras positivas para os receptores de estrogênio pelo número total de amostras analisadas.

Através desses estudos, verifica-se uma menor expressão dos receptores ER α em comparação ao ER β . Conforme revisado por Chen (Chen, 2008), uma hipótese proposta para explicar essa diferença na distribuição da expressão dos subtipos dos ER em carcinoma de tireoide é que a ligação do E2 ao ER α promove proliferação e crescimento celular, enquanto que, ao ligar-se ao ER β , desencadeia efeitos supressores e apoptóticos. Desse modo, a razão entre os receptores alfa e beta poderia indicar um papel na fisiopatologia desses carcinomas. Em câncer de mama, essa relação já foi estudada (Sotoca, 2008).

A discrepância na presença dos receptores encontrada nos estudos apresentados na Tabela 1 também pode ser atribuída à especificidade e sensibilidade dos anticorpos utilizados na técnica de imuno-histoquímica. Outros fatores metodológicos, como as etapas de fixação e processamento do tecido, podem interferir na interpretação dos resultados (Gown, 2008).

Até o momento, três estudos avaliaram o efeito do E2, *in vitro*, na função de células de tireoide (revisado por Santin, 2011). Além do aumento da proliferação celular, em células foliculares normais e de adenoma, o E2 estimulou a expressão de TG (Del Senno, 1989). Já, em células de linhagem de rato Fischer (FRTL-5), houve a diminuição da expressão do NIS e da captação de iodeto, e o aumento da

proliferação celular na presença e ausência de TSH (Furlanetto, 1999, 2001). Esse fato poderia explicar, em parte, a maior prevalência de bócio em mulheres.

Evidências recentes sugerem que o E2 também está envolvido na regulação de respostas celulares rápidas mediadas pela ativação de cascatas de sinalização celular (Revankar, 2005). O receptor ao qual se atribui essa sinalização é o receptor de estrogênio acoplado a proteína G (GPER1) que pertence à família dos receptores acoplados à proteína G.

2.2 Receptores acoplados à proteína G

Os receptores acoplados à proteína G (GPCR) são considerados uma das maiores famílias de proteínas em mamíferos. Eles estão presentes na superfície celular de diversos tecidos, sendo responsáveis pela transdução de sinais intracelulares que regulam uma variedade de funções vitais como a resposta à luz, ao odor, ao sabor, aos neurotransmissores e aos hormônios. Os ligantes de GPCR podem ser estruturas diversas, incluindo pequenas moléculas orgânicas, lipídeos, íons, glicoproteínas e polipeptídios (Karnik, 2003).

Para um receptor ser considerado pertencente a essa família, ele deve obedecer a dois critérios. O primeiro critério é estrutural: possuir uma região transmembrana com sete domínios hidrofóbicos, um segmento N-terminal que se localiza na face extracelular e um segmento C-terminal na face intracelular (Figura 3). Devido a essa estrutura, também são chamados de receptores 7TM. Já, o segundo critério é funcional: o receptor deve estar acoplado a uma proteína G. Em resposta a um estímulo extracelular, o receptor ativa essa proteína, desencadeando uma cascata de sinalização celular (Karnik, 2003; Kristiansen, 2004).

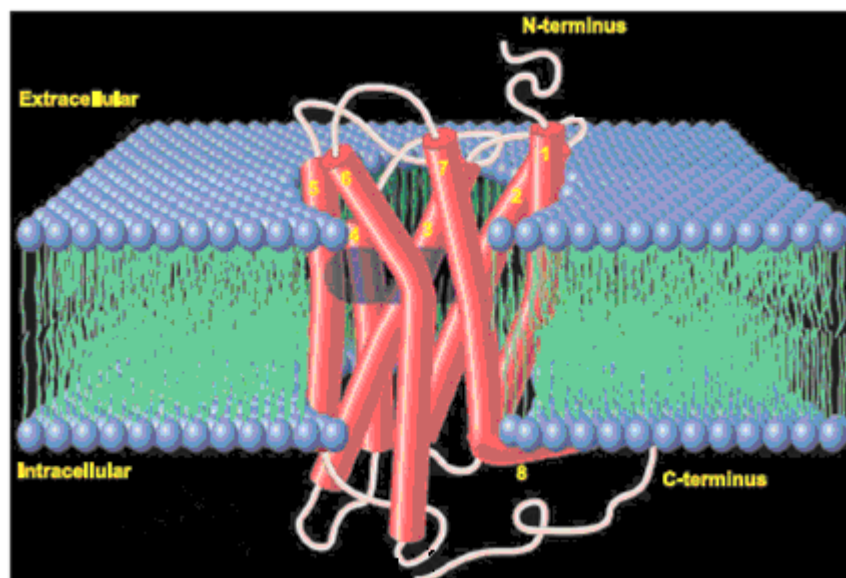


Figura 3: Representação esquemática de um receptor com sete domínios transmembrana (7TM). (Modificado de Kristiansen, 2004)

Atualmente, mais de 1000 genes codificando GPCR já foram identificados. Diferenças na estrutura e na sequência desses receptores possivelmente contribuem para diferenças no reconhecimento de um ligante e no acoplamento específico a uma determinada proteína G (Hauache, 2011).

Tendo como base a homologia na estrutura, afinidade por ligantes e análise filogenética, diversas classificações para os GPCR já foram propostas, conforme revisado por Kristiansen (Kristiansen, 2004).

2.3 Proteína G

Basicamente, a proteína G é formada por três cadeias polipeptídicas chamadas α , β e γ . As três cadeias estão localizadas na parte citoplasmática da membrana celular. A subunidade $G\alpha$ é uma proteína comutadora GTPase que oscila entre um estado ativo e inativo, enquanto as cadeias β e γ se associam em um dímero, formando a subunidade $G\beta\gamma$. Quando está ligada a GDP, a $G\alpha$ tem grande

afinidade por $G\beta\gamma$ e, desse modo, a proteína G permanece inativa. Com a ligação de um sinal químico que ativa a parte citoplasmática do receptor, ocorre a fosforilação da GDP, tornando a $G\alpha$ ativa, liberando-a das demais. Desse modo, a $G\alpha$.GTP consegue modular a atividade de uma proteína efetora associada. Com o término do sinal químico, a própria subunidade $G\alpha$ hidrolisa o GTP, transformando-o em GDP, inativando a proteína G. (Junqueira, 1997; Lodish, 2005). Em alguns casos, dependendo da célula e do ligante, é a subunidade $G\beta\gamma$ que media o sinal na proteína efetora.

A proteína G é classificada segundo a estrutura da subunidade $G\alpha$. As principais isoformas são G_s , G_i e G_q . De modo geral, essas isoformas ativam as proteínas efetoras que são os segundos mensageiros na resposta celular (Kristiansen, 2004; Moura, 2011).

A proteína G_s exerce resposta estimulatória. Ativa a adenilato ciclase, uma enzima intracelular aderida à membrana plasmática que catalisa a formação de AMPc a partir da adenosina trifosfato (ATP). O aumento na concentração de AMPc intracelular culmina na ativação da proteína quinase dependente de AMPc (PKA). Essa enzima pode fosforilar diversas estruturas intracelulares, obtendo uma resposta específica ao estímulo agonista (Moura, 2011).

A proteína G_i está relacionada com a diminuição da resposta celular, pois ao contrário da G_s , essa isoforma inibe a atividade da enzima adenilato ciclase (Moura, 2011).

A proteína G_q está envolvida na ativação da enzima fosfolipase C. Depois de ativada ela degrada o fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂) presente na membrana em inositol trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG). O IP₃, por ser hidrofílico, migra pelo citosol e se liga a receptores na mitocôndria e no retículo endoplasmático, promovendo a liberação do íon cálcio no citosol. O Ca^{+2} funciona como um terceiro mensageiro que desencadeia respostas intracelulares, como a exocitose. Já, o DAG tem a função de ativar a proteína quinase C (PKC), uma enzima ligada à membrana plasmática que promove a fosforilação de radicais em diversas proteínas intracelulares (Moura, 2011).

A rápida interrupção da sinalização, quando um ligante particular é retirado, e a dessensibilização do receptor sob altas concentrações de ligante ou após exposição prolongada ao ligante auxiliam as células a responderem adequadamente, quando submetidas a diferentes circunstâncias (Lodish, 2005).

2.4 Receptor de estrogênio acoplado à proteína G

O receptor de estrogênio acoplado à proteína G (GPER1), mais conhecido como receptor acoplado à proteína G 30 (GPR30), é um membro da família dos GPCR. O gene do GPER1 localiza-se no braço curto do cromossomo 7, locus 22, dividido em três éxons, com um peso molecular de aproximadamente 41kDa, que origina uma proteína composta por 375 aminoácidos. Conforme Feng e Gregor (Feng, 1997) esse gene é expresso em diferentes espécies de animais, demonstrando sua conservação durante a evolução.

O GPER1 contém uma região C-terminal intracelular com 47 aminoácidos, uma sequência envolvida na transdução de sinal intracelular, uma segunda alça extracelular com 10 aminoácidos, duas cisteínas nas duas primeiras alças extracelulares que podem formar ligações dissulfeto e ajudar a estabilizar a estrutura e uma porção N-terminal extracelular com 57 aminoácidos contendo resíduos de ácido aspártico. Pensa-se que o ligante se associa com o domínio N-terminal para ativar o receptor. A proteína G liga-se à terceira alça do domínio intracelular (Mizukami, 2010; Thomas, 2005).

Há divergências na literatura com relação à localização celular desse receptor. Por ser um GPCR, ele deveria estar situado na membrana plasmática e esta localização já foi demonstrada (Thomas, 2005; Revankar, 2005; Funakoshi, 2006; Filardo, 2007). Porém, alguns autores sugerem que o GPER1 está presente na membrana do retículo endoplasmático e no aparelho de Golgi (Revankar, 2005; Sakamoto, 2007; Otto, 2008; Lin, 2009; Mizukami, 2010). A hipótese mais aceita para explicar esse fato é que, assim como outros GPCR, o receptor GPER1 passaria por um processo de endocitose após a sua estimulação, conhecido como translocação.

Por muitos anos o GPER1 foi considerado um receptor órfão. Devido a sua grande homologia estrutural com os receptores angiotensina II 1A, interleucina 8A e quimicina tipo 1, sugeriu-se que peptídeos e glicoproteínas poderiam ser possíveis ligantes (Kristiansen, 2004).

Conforme revisado por Rae e Johnson (2005), a primeira suspeita da existência de um novo receptor de membrana responsivo ao estradiol surgiu em 1977 por Pietras e Szego em um estudo realizado com um preparado da membrana plasmática de células endometriais e de fígado. Demonstrou a presença de um receptor com alta afinidade de ligação ao estradiol. Porém essa ação foi atribuída, pela comunidade científica, aos receptores clássicos do E2, principalmente ao ER alfa, que teria a possibilidade de migrar para a membrana plasmática.

Anos mais tarde, pesquisadores independentes, através da técnica de clonagem pela reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando primers degenerados para amplificar domínios transmembrana de possíveis GPCR, identificaram o gene do GPER1 em linfoma de Burkitt (Owman, 1996), linfócitos B (Kvingedal, 1997), endotélio (Takada, 1997), DNA do genoma humano (Feng, 1997; O'Dowd, 1998). O cDNA dessa proteína também foi identificado em células de linhagem de câncer de mama através de um rastreamento diferencial entre bibliotecas de cDNA de duas linhagens celulares ER positiva (MCF7) e ER negativa (MDA-MB-231) (Carmeci et al, 1997). Estes pesquisadores também demonstraram a presença desse receptor em diversos tecidos.

Posteriormente, foi relatado que este receptor órfão era capaz de mediar a ativação não-genômica das proteínas quinases reguladas por sinais extracelulares 1 e 2 (ERK-1/2) em resposta ao estímulo por E2 em células de câncer de mama (Filardo, 2000; Filardo, 2002). Em 2005, dois grupos independentes postularam o GPER1 como um novo receptor de estradiol, devido a alta afinidade de ligação do hormônio ao receptor (Thomas, 2005; Revankar, 2005). Desde então, inúmeros trabalhos foram publicados em diversos tipos celulares, normais ou não, conforme revisado recentemente (Prossnitz, 2011).

2.5 Presença de GPER1 em diversos tecidos

A fim de averiguar o que já se conhece sobre expressão gênica e/ou protéica do GPER1 em diferentes tecidos, foi realizado um levantamento bibliográfico por meio de uma revisão sistemática na base de dados PubMed/MEDLINE. O descritor utilizado para a localização das referências foi “GPR30”, sendo selecionados artigos em inglês, português ou espanhol. Foram excluídos os artigos cujo resumo não abordava o assunto em questão ou que avaliaram a expressão somente em células de linhagem.

Na base de dados pesquisada, foram encontrados 397 artigos indexados com o descritor utilizado. Após a leitura dos resumos e a avaliação dos critérios de inclusão e exclusão, restaram 40 artigos, que são apresentados na Tabela 2.

Através dessa revisão sistemática ficou evidenciado a presença do GPER1 em diversos tecidos em que a ação do E2 já foi descrita. No sistema nervoso, alterações comportamentais, como a ansiedade, poderiam ser desencadeadas por esse hormônio (Kastenberger, 2012). Além disso, outros estudos sugerem um papel neuroprotetor do E2 em situações de isquemia e de esclerose múltipla (Lebesque, 2009; Yates, 2010). No sistema cardiovascular, o E2 desempenha uma ação vasodilatadora, que contribui na regulação da pressão arterial (do Nascimento, 2009), mas que poderia ocasionar o desenvolvimento de varizes (Raffeto, 2010). No pâncreas, sugere-se uma possível ação na secreção da insulina e prevenção de apoptose das células beta (Louet, 2004). Na suprarrenal, o E2 poderia aumentar a produção dos hormônios esteroidais por uma possível regulação de enzimas existentes nas rotas biossintéticas dessa glândula (Carmina, 1999). No tecido ósseo, desempenha importante função na regulação do seu metabolismo e maturação (Nilsson, 2003).

Além disso, esses estudos confirmam achados iniciais, de que é um gene conservado na evolução (Feng, 1997), por estar presente em diferentes espécies animais. É um receptor expresso em ambos os sexos, sendo que dois estudos descreveram uma maior expressão do GPER1 em mulheres (Balhuizen, 2010; Kumar, 2011).

Tabela 2. Expressão gênica e/ou protéica de GPER1 em diferentes tecidos.

Sistema	Órgão/Célula	Espécie	Sexo	Expressão Gênica	Expressão Protéica	Estudo
Nervoso	Cérebro	camundongo	F		WB, HIQ	Tian, 2013
		rato	M, F	RT-PCR		Spary, 2013
		rato	M, F	RT-PCR	WB	Matsuda, 2008
		rato	M, F	HIS	WB, HIQ	Sakamoto, 2007
		rato	M, F		HIQ	Brailoiu, 2007
		rato	M		WB, HIQ	Funakoshi, 2006
	Gânglio nervoso	rato	M, F	HIS	HIQ	Takanami, 2010
	Coluna	rato	M, F	HIS	HIQ	Takanami, 2010
Cardiovascular	Vasos	rato	M,F		HIQ	Brailoiu, 2013
		rato	F		HIQ	Lindsey, 2011
		rato		RT-PCR	WB	Ding, 2009
		humano		RT-PCR		Haas, 2007
		rato		RT-PCR		Gros, 2011
Reprodutor	Mama	humano	F		HIQ	Ignatov, 2011
		humano	F		HIQ	Arias-Pulido, 2010
		humano	F	RT-PCR	HIQ	Poola, 2008
		humano	F	RT-PCR		Kuo, 2007
		humano	F		HIQ	Filardo, 2006
	Ovário	humano	F		HIQ	Fujiwara, 2012
		humano	F		HIQ	Smith, 2009
		hamster	F	RT-PCR	HIQ/WB	Wang, 2007
	Útero	humano	F	RT-PCR	WB	Tian, 2013
		humano	F	RT-PCR	HIQ	Yuguchi, 2013
		humano	F	RT-PCR	HIQ	Long, 2012
		humano	F	RT-PCR	HIQ	Wang, 2011
		humano	F		HIQ	Liu, 2010
		humano	F		HIQ	He, 2009
		Placenta	humano	F		HIQ/WB
	Gônadas	rato	M	RT-PCR	WB	Hu, 2013
		humano	M		HIQ/WB	Franco, 2011
	Espermatócitos	rato	M	RT-PCR	WB, HIQ	Chimento, 2011
	Oócito	peixe	F	RT-PCR	HIQ	Pang, 2008
Glândula endócrina	Suprarrenal	humano		RT-PCR	HIQ	Baquedano, 2007
	Pâncreas	humano	M, F	RT-PCR	WB	Kumar, 2011
		rato	M, F	RT-PCR	WB	Balhuizen, 2010
Glândula exócrina	Salivar	rato	M	RT-PCR/HIS	HIQ	Chen, 2011
	Parótida	boi	M		HIQ	Mau, 2011
Pele e outros	Fibroblasto	humano	M, F	RT-PCR	HIQ	Luo, 2012
	Bexiga	humano		RT-PCR	HIQ	Teng, 2008
	Osteócitos	humano	M, F		HIQ	Hieno, 2008
	Osteoblasto	humano	M, F		HIQ	Hieno, 2008
	Condrócito	humano	M, F		HIQ	Hieno, 2008
		humano	M, F		HIQ	Chagin, 2007

Legenda: M: masculino, F: feminino, RT-PCR: reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa, HIS: hibridização *in situ*, HIQ: imuno-histoquímica, WB: Western blot.

Somente os estudos que avaliaram a expressão do GPER1 no sistema reprodutor analisaram amostras de tecido normal, benigno e maligno. Dois estudos compararam amostras de tecido uterino normal e com lesões benignas para encontrar uma possível diferença na expressão. Os resultados encontrados foram discordantes (Liu, 2010; Tian, 2012).

Com relação à metodologia, para a expressão gênica a maioria dos estudos utilizou a técnica de reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa (RT-PCR). Atualmente é a técnica de escolha devido a sua alta sensibilidade e facilidade de execução (Bustin, 2002; Pfaffl, 2004). A vantagem da utilização da imunohistoquímica em relação às outras técnicas para a determinação da expressão protéica é a visualização da localização da proteína no tecido alvo.

Através dessa revisão sistemática, verificou-se que pouco se sabe sobre a expressão do GPER1 na tireoide. Até o momento, somente três estudos avaliaram a expressão desse receptor. Dois deles foram realizados em células de linhagem estando o GPER1 expresso nas linhagens de carcinoma folicular de tireoide (WRO e FRO) e de carcinoma anaplásico de tireoide (ARO). Nas linhagens de carcinoma papilar de tireoide (NPA87 e KAT5) não há expressão desse receptor (Vivacqua, 2006; Kumar, 2010). Recentemente, Santin (Santin, 2013) demonstrou a presença do GPER1 em células foliculares normais cultivadas em cultura primária.

2.6 Transdução de sinal pelo GPER1

Vários estudos foram conduzidos a fim de elucidar o mecanismo de sinalização mediado pelo GPER1 através da ligação do E2 (revisado por Maggiolini, 2010). Com relação à proteína G acoplada, tanto a subunidade $G\alpha$ quanto a subunidade $G\beta\gamma$ são capazes de ativar proteínas (Thomas, 2005; Filardo, 2000), conforme ilustrado na Figura 4. A subunidade $G\alpha$ seria responsável em ativar a adenilato ciclase, aumentando os níveis de AMPc, que por sua vez, ativaria PKA, induzindo a transcrição de genes e efeitos celulares (Thomas, 2005). O aumento de cálcio intracelular já foi demonstrado (Revankar, 2005; Bologna, 2006). A proteína fosfolipase C parece não estar envolvida na sinalização (Revankar, 2005).

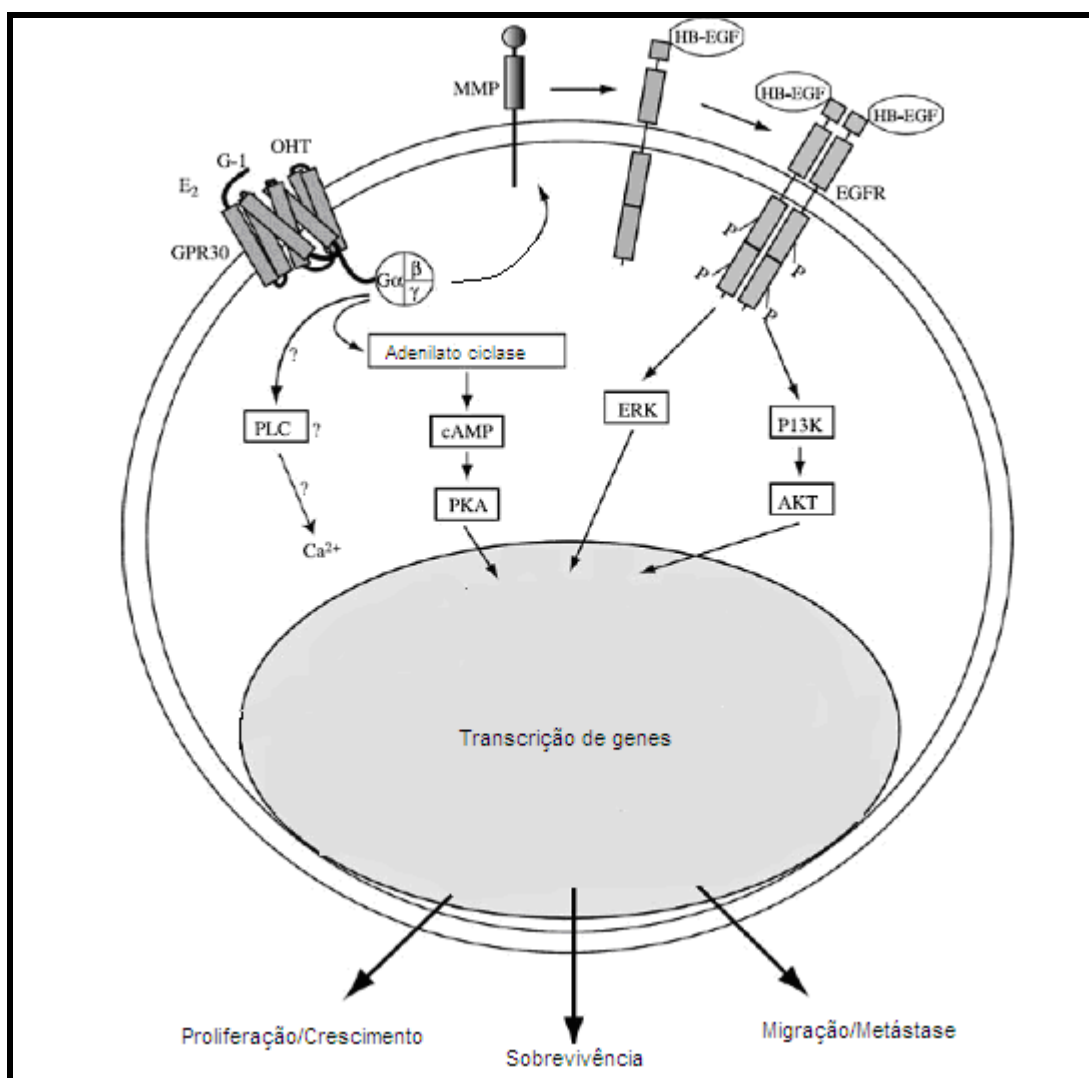


Figura 4. Representação esquemática da sinalização mediada pelo GPER1. (Modificado de Maggiolini, 2010)

A ligação do E2 ao receptor, via subunidade $G\beta\gamma$, pode ativar metaloproteases (MMP) presentes na membrana que, em sequência, promovem a translocação do fator de crescimento epidermal ligado a heparina (HB-EGF), a fim de formar o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR), induzindo a ativação da via de sinalização mediada pela proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (Filardo, 2000). A ativação da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) via GPER1 já foi demonstrada (Revankar, 2005).

Alguns estudos sugerem que GPER1, além das respostas rápidas, pode ativar a expressão de genes como *c-fos*, ciclina D2, cujos efeitos são de proliferação celular e inibição de Bcl-2, evitando apoptose. Porém, o resultado dessa sinalização não é imediato (Prossnitz, 2009).

Através desses estudos, verificou-se que outros ligantes podem atuar no GPER1 devido à similaridade estrutural com o E2: G1 – efeito agonista; G15 – efeito antagonista; genisteína – efeito agonista; tamoxifeno (OHT) – efeito agonista. Devido a esse último efeito descrito, explica-se em parte o motivo pelo qual alguns cânceres de mama possuem resistência ao tratamento com tamoxifeno (Thomas, 2005).

2.7 Efeitos não genômicos do E2 na tireoide

Os efeitos não genômicos do E2, já estudados em células da tireoide, estão representados na Tabela 3.

Tabela 3. Estudos de efeitos não genômicos do E2 em células de tireoide (Modificado de Santin, 2011).

Estudo	Célula	MAPK	PI3K	Ciclina D1	<i>c-fos</i>	Bcl-2	Bax
Kumar, 2010	NPA87	↑	↑				
	KAT5	↑	↑	↑			
	WRO	↑	↑	↑			
Zeng, 2007	KAT5					↑	↓
	FRO					↑	↓
	WRO					↑	↓
Vivacqua, 2006	WRO	↑		↑	↑		
	FRO	↑		↑	↑		
	ARO	↑		↑	↑		
Manole, 2001	HTC-TSHr	↑		↑			
	Bócio	↑		↑			
	XTC133	↑		↑			

Legenda: NPA87 e KAT5: linhagem celular de carcinoma papilar de tireoide, WRO e FRO: linhagem celular de carcinoma folicular de tireoide, ARO: linhagem celular de carcinoma anaplásico de tireoide, HTC-TSHr: linhagem celular de carcinoma com ausência do receptor endógeno de TSH, Bócio: cultura primária de células humana de tireoide isoladas de nódulos de tireoide, XTC-133: linhagem celular de câncer de tireoide de células de Hurthle. (↑): aumento, (↓): diminuição.

Através desses estudos sugere-se que o E2 pode estimular a proliferação celular (Ciclina D1, *c-fos*), via aumento de MAPK e de PI3K, mediado pelo GPER1, já que a linhagem ARO, nesse estudo, não apresentou a expressão dos ER clássicos. O aumento de Bcl-2 e a diminuição de Bax (proteínas envolvidas na regulação da apoptose) sugerem um efeito positivo na sobrevivência celular (Zeng, 2007)

As cascatas de cAMP, MAPK e PI3K induzem a proliferação e manutenção da homeostase nas células foliculares. Qualquer forma de estimulação ou inibição de uma ou mais dessas cascatas, seja por moléculas sinalizadoras ou mutações genéticas, poderia resultar na proliferação anormal dessas células (Santin, 2013).

3 JUSTIFICATIVA

A maior prevalência de bócio, seja endêmico ou não, em mulheres sugere uma ação de hormônios sexuais na fisiopatologia dessa doença. A presença de ER clássicos na tireoide já foi demonstrada. Recentemente, um novo receptor, o GPER1, envolvido na sinalização de efeitos não genômicos do E2, foi descrito. Através dessa revisão verifica-se que ainda não há um consenso sobre a ação do GPER1 em células da tireoide, e que não existem estudos que avaliaram a expressão desse receptor em tecido de bócio.

Desse modo, justifica-se a realização dessa pesquisa já que a compreensão do papel que o GPER1 desempenha na tireoide normal e no bócio é de grande importância, pois ele pode ser um possível alvo de terapêutica, através do desenvolvimento de ligantes ativadores ou desativadores do mesmo.

4 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente estudo é avaliar a expressão gênica e protéica de GPER1 em tecido de tireoide humano normal e bócio.

4.1 Objetivos Específicos

- a) Estimar as prevalências de expressão gênica e protéica do GPER1 em tecido tireoidiano normal.
- b) Estimar as prevalências de expressão gênica e protéica do GPER1 em bócio.
- c) Comparar a expressão gênica do GPER1 em tecido tireoidiano normal e bócio.

5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO

- Arias-Pulido H, Royce M, Gong Y, Joste N, Lomo L, Lee SJ, et al. GPR30 and estrogen receptor expression: new insights into hormone dependence of inflammatory breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;123(1):51-8.
- Azevedo M, Sales B, Maia L, Leal E. Interpretação do testes de função tireoidiana. In: Vilar L. *Endocrinologia Clínica.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p.219-230.
- Balhuizen A, Kumar R, Amisten S, Lundquist I, Salehi A. Activation of G protein-coupled receptor 30 modulates hormone secretion and counteracts cytokine-induced apoptosis in pancreatic islets of female mice. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;320(1-2):16-24.
- Baquedano MS, Saraco N, Berensztein E, Pepe C, Bianchini M, Levy E, et al. Identification and developmental changes of aromatase and estrogen receptor expression in prepubertal and pubertal human adrenal tissues. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(6):2215-22.
- Bléchet C, Lecomte P, De Calan L, Beutter P, Guyétant S. Expression of sex steroid hormone receptors in C cell hyperplasia and medullary thyroid carcinoma. *Virchows Archiv.* 2007;450(4):433–39.
- Bologa CG, Revankar CM, Young SM, Edwards BS, Arterburn JB, Kiselyov AS, et al. Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30. *Nat Chem Biol.* 2006;2(4):207-12.

- Brailoiu E, Dun SL, Brailoiu GC, Mizuo K, Sklar LA, Oprea TI, et al. Distribution and characterization of estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 in the rat central nervous system. *J Endocrinol.* 2007;193(2):311-21.
- Brailoiu GC, Arterburn JB, Oprea TI, Chitravanshi VC, Brailoiu E. Bradycardic effects mediated by activation of G protein-coupled estrogen receptor in rat nucleus ambiguus. *Exp Physiol.* 2013;98(3):679-91.
- Burrow GN. The Thyroid: Nodules and Neoplasia. In: Felig P., Baxter J.D., Broadus A.E., Frohman L.A. *Endocrinology & Metabolism.* McGraw-Hill;1991. p. 351-370.
- Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol.* 2002;29(1):23-39.
- Carmina E, Gonzalez F, Vidali A, Stanczyk FZ, Ferin M, Lobo RA. The contributions of estrogen and growth factors to increased adrenal androgen secretion in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 1999; 4:307–311
- Carmeci C, Thompson DA, Ring HZ, Francke U, Weigel RJ. Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics.* 1997;45(3):607-17.
- Ceresini G, S. Morganti S, Graiani V, et al. Estrogen receptor (ER)- β , but not ER- α , is present in thyroid vessels: immunohistochemical evaluations in multinodular goiter and papillary thyroid carcinoma. *Thyroid.* 2006;16(12):1215–20.
- Chagin AS, Sävendahl L. GPR30 estrogen receptor expression in the growth plate declines as puberty progresses. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(12):4873-7.
- Chen GG, Vlantis AC, Zeng Q, Van Hasselt CA. Regulation of cell growth by estrogen signaling and potential targets in thyroid cancer. *Curr Cancer Drug Targets.* 2008;8(5): 367–377.

- Chen L, Mei XP, Gao CJ, Zhang GH, Sun XD. Histologic distribution, fragment cloning, and sequence analysis of g protein couple receptor 30 in rat submaxillary gland. *Anat Rec (Hoboken)*. 2011;294(4):706-11.
- Chimento A, Sirianni R, Delalande C, Silandre D, Bois C, Andò S, et al. 17 beta-estradiol activates rapid signaling pathways involved in rat pachytene spermatocytes apoptosis through GPR30 and ER alpha. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;320(1-2):136-44.
- Cho MA, Lee MK, K. Nam KH, Chung WY, Park CS, Lee JH, et al. Expression and role of estrogen receptor α and β in medullary thyroid carcinoma: different roles in cancer growth and apoptosis. *J Endocrinol*. 2007;195(2): 255–63.
- Cooper DS, Ladenson PN. Glândula Tireoide. In: Gardner DG, Shoback D. *Endocrinologia básica e clínica de Greenspan*. Porto Alegre: Artmed; 2013. p.163-214.
- Corrêa F, Vieira JBF, Silva YSP, Coelho G, Cavalcante FAC, Pereira MPL. Inquérito sobre a prevalência de bócio endêmico no Brasil em escolares de 6 a 14 anos. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health*. 2002;12(5):317-26.
- Del Senno L, Degli Uberti E, Hanau S, Piva R, Rossi R, Trasforini G. In vitro effects of estrogen on tgb and c-myc gene expression in normal and neoplastic human thyroids. *Mol Cell Endocrinol*, 1989;63(1-2):67–74.
- Ding Q, Gros R, Limbird LE, Chorazyczewski J, Feldman RD. Estradiol-mediated ERK phosphorylation and apoptosis in vascular smooth muscle cells requires GPR 30. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009;297(5):C1178-87.
- do Nascimento GR, Barros YV, Wells AK, Khalil RA. Research into Specific Modulators of Vascular Sex Hormone Receptors in the Management of Postmenopausal Cardiovascular Disease. *Curr Hypertens Rev*. 2009;5(4):283-306.

- Dumont JE, Lamy F, Roger P, Maenhaut C. Physiological and pathological regulation of thyroid cell proliferation and differentiation by thyrotropin and others factors. *Physiological Reviews*, 1992;72:667-697.
- Feng Y, Gregor P. Cloning of a novel member of the G protein-coupled receptor family related to peptide receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997; 231:651-4.
- Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol*. 2000;14(10):1649-60
- Filardo EJ. Epidermal growth factor receptor (EGFR) transactivation by estrogen via the G-protein-coupled receptor, GPR30: a novel signaling pathway with potential significance for breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2002;80(2):231-8.
- Filardo EJ, Graeber CT, Quinn JA, Resnick MB, Giri D, DeLellis RA, et al. Distribution of GPR30, a seven membrane-spanning estrogen receptor, in primary breast cancer and its association with clinicopathologic determinants of tumor progression. *Clin Cancer Res*. 2006;12(21):6359-66
- Filardo E, Quinn J, Pang Y, Graeber C, Shaw S, Dong J, et al. Activation of the novel estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 (GPR30) at the plasma membrane. *Endocrinology*. 2007;148(7):3236-45.
- Franco R, Boscia F, Gigantino V, Marra L, Esposito F, Ferrara D, et al. GPR30 is overexpressed in post-puberal testicular germ cell tumors. *Cancer Biol Ther*. 2011;11(6):609-13.
- Fujiwara S, Terai Y, Kawaguchi H, Takai M, Yoo S, Tanaka Y, et al. GPR30 regulates the EGFR-Akt cascade and predicts lower survival in patients with ovarian cancer. *J Ovarian Res*. 2012;5(1):35.

- Funakoshi T, Yanai A, Shinoda K, Kawano MM, Mizukami Y. G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;346(3):904-10.
- Furlanetto TW, Nguyen LQ, Jameson LJ. Estradiol increases proliferation and down-regulates the sodium/iodide symporter gene in FRTL-5 cells. *Endocrinology*, 1999;140(12): 5705–5711.
- Furlanetto TW, Nunes RB, Sopelsa AMI, Maciel RMB. Estradiol decreases iodide uptake by rat thyroid follicular FRTL-5 cells. *Braz J Med Biol Res*, 2001; 34(2): 259–263.
- Glinoeer D, Fernandez-Deville M, Ermas AM. Use of direct thyroxine-binding globulin measurement in the evaluation of thyroid function. 1978;1(4):329-35.
- Gown AM. Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer. *Modern Pathology*, 2008; 21(2):S8–S15.
- Gros R, Ding Q, Davis M, Shaikh R, Liu B, Chorazyczewski J, et al. Delineating the receptor mechanisms underlying the rapid vascular contractile effects of aldosterone and estradiol. *Can J Physiol Pharmacol*. 2011;89(9):655-63.
- Haas E, Meyer MR, Schurr U, Bhattacharya I, Minotti R, Nguyen HH, et al. Differential effects of 17beta-estradiol on function and expression of estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta, and GPR30 in arteries and veins of patients with atherosclerosis. *Hypertension*. 2007;49(6):1358-63.
- Hansen JT. Embryology and Surgical Anatomy of the Lower Neck and Superior Mediastinum. In: Falk SA. *Thyroid Disease: Endocrinology, Surgery, Nuclear Medicine, Radiotherapy*. New York: Lippincott-Raven; 1997. p.15-28.
- Hauache OM. Receptores acoplados à proteína G: implicações para a fisiologia e doenças endócrinas. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2011;45(3):228-39.
- He YY, Cai B, Yang YX, Liu XL, Wan XP. Estrogenic G protein-coupled receptor 30 signaling is involved in regulation of endometrial carcinoma by promoting

- proliferation, invasion potential, and interleukin-6 secretion via the MEK/ERK mitogen-activated protein kinase pathway. *Cancer Sci.* 2009;100(6):1051-61.
- Heino TJ, Chagin AS, Sävendahl L. The novel estrogen receptor G-protein-coupled receptor 30 is expressed in human bone. *J Endocrinol.* 2008;197(2):R1-6.
- Houssay AB. Fisiologia da tireoide. In: Cingolani HE, Houssay AB. *Fisiologia Humana de Houssay*. Porto Alegre: Artmed; 2004. p. 638-55.
- Hu Y, Li D, Lu Y, Han X. Monobutyl phthalate induces the expression change of G-Protein-Coupled Receptor 30 in rat testicular Sertoli cells. *Folia Histochem Cytobiol.* 2013;51(1):18-24.
- Ignatov A, Ignatov T, Weissenborn C, Eggemann H, Bischoff J, Semczuk A, et al G-protein-coupled estrogen receptor GPR30 and tamoxifen resistance in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;128(2):457-66.
- Junqueira LC, Carneiro J. Comunicações celulares por meio de sinais químicos. In: Junqueira LC, Carneiro J *Biologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997. p.104 -116
- Karnik SS, Gogonea C, Patil S, Saad Y, Takezako T. Activation of G-protein-coupled receptors: a common molecular mechanism. *Trend Endocrin Met.* 2003;14(9):431-37.
- Kastenberger I, Lutsch C, Schwarzer C. Activation of the G-protein-coupled receptor GPR30 induces angiogenic effects in mice, similar to oestradiol. *Psychopharmacology (Berl).* 2012;221(3):527-35
- Kristiansen K. Molecular mechanism of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptor: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacol Therapeut.* 2004;103:21-80.
- Kumar A, Klinge CM, Goldstein RE. Estradiol-induced proliferation of papillary and follicular thyroid cancer cells is mediated by estrogen receptors alpha and beta. *Int J Oncol.* 2010;36(5):1067-80.

- Kumar R, Balhuizen A, Amisten S, Lundquist I, Salehi A. Insulinotropic and antidiabetic effects of 17 β -estradiol and the GPR30 agonist G-1 on human pancreatic islets. *Endocrinology*. 2011;152(7):2568-79.
- Knudsen N, Laurberg P, Perrild H, Bulow I, Ovesen L, Jorgensen T. Risk factors for goiter and thyroid nodules. *Thyroid*. 2002;12: 879-88.
- Kuo WH, Chang LY, Liu DL, Hwa HL, Lin JJ, Lee PH, et al. The interactions between GPR30 and the major biomarkers in infiltrating ductal carcinoma of the breast in an Asian population. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2007;46(2):135-45.
- Kvingedal AM, Smeland EB. A novel putative G-protein-coupled receptor expressed in lung, heart and lymphoid tissue. *FEBS Lett*,1997;407:59-62.
- Lebesgue D, Chevaleyre V, Zukin RS, Etgen AM. Estradiol rescues neurons from global ischemia-induced cell death: multiple cellular pathways of neuroprotection. *Steroids*. 2009;74(7):555-61.
- Lin BC, Suzawa M, Blind RD, Tobias SC, Bulun SE, Scanlan TS, et al. Stimulating the GPR30 estrogen receptor with a novel tamoxifen analogue activates SF-1 and promotes endometrial cell proliferation. *Cancer Res*. 2009;69(13):5415-23.
- Lindsey SH, Carver KA, Prossnitz ER, Chappell MC. Vasodilation in response to the GPR30 agonist G-1 is not different from estradiol in the mRen2.Lewis female rat. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011;57(5):598-603.
- LiVolsi V. Pathology of Thyroid Disease. In: Falk SA. *Thyroid Disease: Endocrinology, Surgery, Nuclear Medicine, Radiotherapy*. New York: Lippincott-Raven; 1997. p.65-104.
- Liu HD, Yan Y, Cao XF, Tan PZ, Wen HX, Lv CM, et al. The expression of a novel estrogen receptor, GPR30, in epithelial ovarian carcinoma and its correlation with MMP-9. *Sheng Li Xue Bao*. 2010;62(6):524-8.

- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP. *Biologia celular e molecular*. Porto Alegre: Artmed; 2005. p. 540-49.
- Long L, Cao Y, Tang LD. Transmembrane estrogen receptor GPR30 is more frequently expressed in malignant than benign ovarian endometriotic cysts and correlates with MMP-9 expression. *Int J Gynecol Cancer*. 2012;22(4):539-45.
- Louet JF, LeMay C, Mauvais-Jarvis F. Antidiabetic actions of estrogen: insight from human and genetic mouse models. *Curr Atheroscler Rep*, 2004;6:180-185.
- Luo LJ, Liu F, Lin ZK, Xie YF, Xu JL, Tong QC, et al. Genistein regulates the IL-1 beta induced activation of MAPKs in human periodontal ligament cells through G protein-coupled receptor 30. *Arch Biochem Biophys*. 2012;522(1):9-16.
- Maggiolini M, Picard D. The unfolding stories of GPR30, a new membrane-bound estrogen receptor. *J Endocrinol*. 2010;204(2):105-14.
- Man EB, Jones WS. Thyroid function in human pregnancy. V. Incidence of maternal serum low butanol-extractable iodines and of normal gestational TBG and TBPA capacities; retardation of 8-month-old infants. *Am J Obstet Gynecol*. 1969;104(6):898-908.
- Manole D, Schildknecht B, Gosnell B, Adams E, Derwahl M. Estrogen promotes growth of human thyroid tumor cells by different molecular mechanisms. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001;86(3):1072–1077.
- Matsuda K, Sakamoto H, Mori H, Hosokawa K, Kawamura A, Itose M, et al. Expression and intracellular distribution of the G protein-coupled receptor 30 in rat hippocampal formation. *Neurosci Lett*. 2008;441(1):94-9.
- Mau M, Mielenz M, Südekum KH, Obukhov AG. Expression of GPR30 and GPR43 in oral tissues: deriving new hypotheses on the role of diet in animal physiology and the development of oral cancers. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2011;95(3):280-5.

- Mizukami Y. In vivo functions of GPR30/GPER-1, a membrane receptor for estrogen: from discovery to functions in vivo. *Endocr J.* 2010;57(2):101-7.
- Moura PR, Vidal FAP. Transdução de sinais: uma revisão sobre proteína G. *Scientia Medica.* 2011;21(1):31-36.
- Nilsson O, Chrysis D, Pajulo O, Boman A, Holst M, Rubinstein J, et al. Localization of estrogen receptors-alpha and -beta and androgen receptor in the human growth plate at different pubertal stages. *J Endocrinol,* 2003;177:319–326.
- Nobrega FM. Inibidor da atividade tireoperoxidase encontrado em bócios humanos: caracterização parcial [dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006.
- O'Dowd BF, Nguyen T, Marchese A, Cheng R, Lynch KR, Heng HH, et al. Discovery of three novel G-protein-coupled receptor genes. *Genomics.* 1998;47(2):310-3.
- Otto C, Rohde-Schulz B, Schwarz G, Fuchs I, Klewer M, Brittain D, et al. G protein-coupled receptor 30 localizes to the endoplasmic reticulum and is not activated by estradiol. *Endocrinology.* 2008;149(10):4846-56.
- Owman C, Blay P, Nilsson C, Lolait SJ. Cloning of human cDNA encoding a novel heptahelix receptor expressed in Burkitt's lymphoma and widely distributed in brain and peripheral tissues. *Biochem Biophys Res Commun,* 1996;228:285-92.
- Pang Y, Dong J, Thomas P. Estrogen signaling characteristics of Atlantic croaker G protein-coupled receptor 30 (GPR30) and evidence it is involved in maintenance of oocyte meiotic arrest. *Endocrinology.* 2008;149(7):3410-26.
- Pietras RJ, Szego CM. Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature.* 1977; 6(265):69-72.
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample

- integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett*,2004;26:509-15.
- Poola I, Abraham J, Liu A, Marshalleck JJ, Dewitty RL. The Cell Surface Estrogen Receptor, G Protein- Coupled Receptor 30 (GPR30), is Markedly Down Regulated During Breast Tumorigenesis. *Breast Cancer (Auckl)*. 2008;1:65-78.
- Prossnitz ER, Maggiolini M. Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30. *Mol Cell Endocrinol*. 2009;308(1-2):32-8.
- Prossnitz ER, Barton M. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2011;7(12):715-26.
- Raffetto JD, Qiao X, Beaugard KG, Khalil RA. Estrogen receptor-mediated enhancement of venous relaxation in female rat: implications in sex-related differences in varicose veins. *J Vasc Surg*. 2010;51(4):972-81.
- Rae JM, Johnson MD. What does an orphan G-protein-coupled receptor have to do with estrogen? *Breast Cancer Res*. 2005;7(6):243-4.
- Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*. 2005;307(5715):1625-30.
- Santin AP, Furnaletto TW. Role of estrogen in thyroid function and growth regulation. *J Thyroid Res*. 2011; 2011:875125.
- Santin AP. Estudo de Hormônios Sexuais em Células Foliculares de Tireoide Humana em Cultura Primária [tese]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.
- Sakamoto H, Matsuda K, Hosokawa K, Nishi M, Morris JF, Prossnitz ER, et al. Expression of G protein-coupled receptor-30, a G protein-coupled membrane estrogen receptor, in oxytocin neurons of the rat paraventricular and supraoptic nuclei. *Endocrinology*. 2007;148(12):5842-50.

- Smith HO, Arias-Pulido H, Kuo DY, Howard T, Qualls CR, Lee SJ, et al. GPR30 predicts poor survival for ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2009;114(3):465-71.
- Sotoca AM, Van den Berg H, Vervoort Jet. Influence of cellular ER α /ER β ratio on the ER α -agonist induced proliferation of human T47D breast cancer cells. *Toxicol Sci*. 2008;105(2):303–311.
- Spary EJ, Chapman SE, Sinfield JK, Maqbool A, Kaye J, Batten TF. Novel G protein-coupled oestrogen receptor GPR30 shows changes in mRNA expression in the rat brain over the oestrous cycle. *Neurosignals*. 2013;21(1-2):14-27.
- Takada Y, Kato C, Kondo S, Korenaga R, Ando J. Cloning of cDNAs encoding G protein-coupled receptor expressed in human endothelial cells exposed to fluid shear stress. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997;240:737-41.
- Takanami K, Sakamoto H, Matsuda K, Hosokawa K, Nishi M, Prossnitz ER, et al. Expression of G protein-coupled receptor 30 in the spinal somatosensory system. *Brain Res*. 2010;1310:17-28.
- Teng J, Wang ZY, Prossnitz ER, Bjorling DE. The G protein-coupled receptor GPR30 inhibits human urothelial cell proliferation. *Endocrinology*. 2008;149(8):4024-34.
- Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology*. 2005;146(2):624-32.
- Tian R, Wang Z, Shi Z, Li D, Wang Y, Zhu Y, et al. Differential expression of G-protein-coupled estrogen receptor-30 in human myometrial and uterine leiomyoma smooth muscle. *Fertil Steril*. 2013;99(1):256-63.
- Tian Z, Wang Y, Zhang N, Guo YY, Feng B, Liu SB, et al. Estrogen receptor GPR30 exerts anxiolytic effects by maintaining the balance between GABAergic and glutamatergic transmission in the basolateral amygdala of ovariectomized mice after stress. *Psychoneuroendocrinology*. 2013.

- Tunbridge WM, Evered DC, Hall R, Appleton D, Brewis M, Clark F, et al. The spectrum of thyroid disease in a community: the Wickham survey. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1977;7:481-93.
- Vaiman M, Olevson Y, Habler L, Kessler A, Zehavi S, Sandbank J. Diagnostic value of estrogen receptors in thyroid lesions. *Med Sci Monit*. 2010;16(7): 203–07.
- Vaisman M, Rosenthal D, Carvalho DP. Enzimas Envolvidas na Organificação Tireoideana do Iodo. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2004;48(1):9-15.
- Vanderpump MPJ, Tunbridge WMG. *Thyroid Disease*. 4^a edition. New York: Oxford University Press; 2008.
- Vannucchi G, Perrino M, Rossi S, Colombo C, Vicentini L, Dazzi D, et al. Clinical and molecular features of differentiated thyroid cancer diagnosed during pregnancy. *Eur J Endocrinol*. 2010; 162(1): 145–51.
- Vivacqua A, Bonofiglio D, Albanito L, Madeo A, Rago V, Carpino A, et al. 17beta-estradiol, genistein, and 4-hydroxytamoxifen induce the proliferation of thyroid cancer cells through the g protein-coupled receptor GPR30. *Mol Pharmacol*. 2006;70(4):1414-23.
- Zeng Q, Chen GG, Vlantis AC, Van Hasselt CA. Oestrogen mediates the growth of human thyroid carcinoma cells via an oestrogen receptor-ERK pathway. *Cell Proliferation*. 2007;40(6): 921–35.
- Wang C, Prossnitz ER, Roy SK. Expression of G protein-coupled receptor 30 in the hamster ovary: differential regulation by gonadotropins and steroid hormones. *Endocrinology*. 2007;148(10):4853-64.
- Wang A, Ji L, Shang W, Li M, Chen L, White RE, et al. Expression of GPR30, ER α and ER β in endometrium during window of implantation in patients with polycystic ovary syndrome: a pilot study. *Gynecol Endocrinol*. 2011;27(4):251-5.
- Winters A, Friedlander P, Jaffe BM, Khalek MA, Moroz K, Kandil E. A postmenopausal woman with gross cystic disease fluid protein-15 and

estrogen receptor-positive recurrence of papillary thyroid cancer. *Thyroid*. 2010; 20(12):1413–17.

Yates MA, Li Y, Chlebeck PJ, Offner H. GPR30, but not estrogen receptor-alpha, is crucial in the treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral ethinyl estradiol. *BMC Immunol*. 2010;11:20.

Yuguchi H, Tanabe A, Hayashi A, Tanaka Y, Okuda K, Yamashita Y, et al. The Expression Status of G Protein-Coupled Receptor GPR30 Is Associated with the Clinical Characteristics of Endometriosis. *Endocr Res*. 2013.

6 ARTIGOS EM INGLÊS

6.1 Escolha do gene de referência

Artigo submetido na revista *Molecular Biotechnology* (ISSN: 1559-0305).

Validation of Reference Genes for Normalizing Gene Expression in Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR in Human Normal Thyroid and Goiter Tissue

Raquel Weber¹, Ana Paula Santin Bertoni², Laura Walter Bessestil³, Beatriz Maria de Azevedo Assis Brasil⁴, Ilma Simoni Brum³, Tania Weber Furlanetto¹

¹ Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde, Porto Alegre, RS, Brazil

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

⁴ Serviço de Patologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil

Short title: reference gene and human thyroid tissues

Corresponding author

Tania Weber Furlanetto

Rua Ramiro Barcellos 2350/700

Porto Alegre, RS, Brazil

90035-903

Telephone: 00 55 51 3359.8152

Fax: 00 55 51 3359.8152

e-mail: taniafurlanetto@gmail.com

Abstract

Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) has been recognized as the most accurate method for quantifying mRNA transcripts, but normalization of samples is a prerequisite for correct data interpretation. So, this study aimed to evaluate the most stable reference gene for RT-qPCR in human normal thyroid and goiter tissues. Beta-actin (*ACTB*); glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*); succinate dehydrogenase, subunit A, flavoprotein (Fp) (*SDHA*); hypoxanthine phosphoribosyl- transferase I (*HPRTI*); tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide (*YWHAZ*); and beta-2-microglobulin (B2M) were evaluated in 14 thyroid tissue samples (7 normal and 7 goiter) by RT-qPCR. The mean Ct and the maximum fold change (MFC) and NormFinder software were used to assess the stability of the genes. As results, *ACTB* gene was more stable than *GAPDH*, *SDHA*, *HPRTI*, *YWHAZ* and B2M. In conclusion, *ACTB* could be used to normalize RT-qPCR data in normal thyroid and goiter tissues.

Keywords: RT-qPCR, Gene reference, Thyroid, Gene expression, Goiter.

Introduction

Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) has been recognized as the most accurate, sensitive, and easy method for quantifying mRNA transcripts in biological samples (Bustin, 2002; Pfaffl, 2004). Nevertheless, normalization of samples is a prerequisite for correct data interpretation, since its accuracy is significantly affected by sample quality, reagent, and operator technique. (Bustin, 2009)

Cell number, quantification of rRNA or total RNA, and reference genes are some standardization methods that have been proposed so far (Thellin, 1999; Bustin, 2002; Vandesompele, 2002). Normalization with another gene, which is assumed to have stable expression, is the method of choice, because this reference gene is exposed to the same preparation steps as the gene of interest (Radóncic, 2004). Therefore, a full procedure control is obtained during the whole assay.

A good reference gene needs to present low variation in its expression in the different samples which would be evaluated, demonstrating to be minimally regulated during the individual experiment or pathological condition. Therefore, there is a need to validate genes to allow the accuracy of RNA transcription analysis (Radóncic, 2004; Bustin, 2009). Nowadays, there is emerging evidence that reference genes could vary their expression in different cellular development stages and in other conditions (Thellin, 1999; Haller, 2004; Dundas, 2012).

The thyroid normal gland is a fairly homogenous structure, but in goiter a genetic heterogeneity is described in follicular cells, some nodules have a polyclonal origin, others a monoclonal origin. These changes may be related to mutations in oncogenes which do not produce malignancy *per se*, but would alter growth and function (Studer, 1989; Krohn, 2005). These alterations could modify the expression of many thyroid genes, including the ones usually described as reference genes so the evaluation of candidates to normalize RT-qPCR is necessary.

Little is known about the expression stability of reference genes in thyroid cells or tissue, as shown in Table 1. Considering the species, there are many differences in reference genes stability evaluated in these studies. Although in human tissues the

same software was used to analyze data, differences in RT-qPCR and cells status, could have contributed to this findings. In addition, a stable expression of a reference gene in one tumor type does not predict a stable expression in another tumor type (Haller, 2004). In this way, there is no universal reference gene being necessary to validate potential reference genes for any experimental condition. So, this study aimed to evaluate the most stable reference gene for RT-qPCR in human normal thyroid, and goiter tissues.

Table 1: Stability of genes candidates to normalize RT-qPCR for thyroid derived biological material

Study	Material	Reference Gene Stability	Method
Santin, 2013	Human normal cells	ACTB>TBP>GAPDH>B2M	NormFinder
Chantawibul, 2012	Human tissues*	GAPDH>ACTB>B2M>RPLIA>HPRT1	NormFinder
Lecchi, 2012	Bovine tissues, including thyroid	SF3A1=HBMS>ACTB HMBS>ACTB>GAPDH	geNorm NormFinder
Li, 2011	Porcine thyroid tissue	18S rRNA> Ubiquitin> Histone H3> ACTB 18S rRNA> Ubiquitin> Histone H3> ACTB >GAPDH	geNorm NormFinder
Lisowski, 2008	Bovine thyroid tissue	TBP=HPRT1>YWHAZ>ACTB	geNorm

* 13 goiters, 6 adenomas, 4 carcinomas (2 follicular+ 2 papillary), 2 lymphocytic thyroiditis

Material and Methods

Tissue acquisition

Normal thyroid and goiter tissues were obtained from patients who underwent total thyroidectomy as part of treatment for differentiated thyroid cancer in the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). After macroscopic and frozen sections evaluation of surgical specimens by two pathologists, samples of normal thyroid or goiter tissue were frozen in liquid nitrogen and stored at - 80°C until further processing. This study was approved by the Ethics Committee of HCPA (GPPG: 12-0272).

RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNA was extracted using Trizol[®] (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. The RNA concentration and purity was assessed with the NanoDrop 1000 Spectrophotometer

(Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) and stored at -80°C . 1 μg total RNA was reverse transcribed to produce cDNA using random and oligo-dT primers and Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen Life Technologies) in total reaction volumes of 20 μl . All cDNA samples were diluted 10-fold with diethyl pyrocarbonate (DEPC)- treated water and stored at -20°C .

Gene selection and quantitative Real-time PCR

Six genes commonly used as reference in real-time PCR gene expression experiments were selected (Table 1): beta-actin (*ACTB*, related to cell structure); glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*, related to carbohydrate metabolism); succinate dehydrogenase, subunit A, flavoprotein (Fp) (*SDHA*, related to energy metabolism); hypoxanthine phosphoribosyl- transferase I (*HPRTI*, related to nucleotide metabolism); tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide (*YWHAZ*, related to cell growth and death); and beta-2-microglobulin (*B2M*, related to major histocompatibility complex). Primers were based described previously (Souza, 2012). Quantification of amplified samples was performed based on a standard curve with five successive ten-fold dilution points of a pool of cDNA samples.

Real-time PCR was performed using Applied Biosystems[®] StepOne[™] Real-Time PCR System using Kit Platinum SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The Real-time PCR was performed with an initial denaturation (10 min at 95°C), followed by 40 cycles of denaturation (15 s at 95°C), annealing and extension (45 s at 60°C). Melting curve was acquired to ensure that a single product was amplified in each reaction.

Statistics

To evaluate the stability of the candidate reference genes in thyroid normal and goiter tissues, the NormFinder algorithm was used (Andersen, 2004). In addition, the analysis of raw cycle threshold (Ct) values of each gene was used to evaluate their stability. Mean Ct values, standard deviation (SD), coefficient of variation (CV) and maximum fold change (MFC, the ratio of the maximum and minimum values observed within the dataset) were calculated.

Results

Six reference genes were amplified in 14 thyroid samples: 7 normal, and 7 goiter. All RT-qPCR assays produced a single peak in the melting curve. The mean Ct values, SD, CV, and MFC obtained for each gene in goiter and normal thyroid are described in Table 2. Analyzing these data, none of the genes had a constant expression. Moreover, B2M showed higher variability in Ct values. Thereby, we proceeded the analysis of quantification data using the NormFinder algorithm. The values of stability of the candidate genes obtained from the NormFinder analysis are shown in Table 3. The most stable genes were ACTB for goiter and GAPDH for normal thyroid tissue. When all samples were analyzed together, the most stable genes were SDHA, and ACTB. Stability values and intra/intergroup variations are shown, respectively, in Table 4 and Figure 1.

Table 2. Dispersion data of raw Ct values for candidate reference genes in goiter and normal thyroid tissue.

Tissue	Symbol Gene	Mean Ct	SD	CV(%)	Minimum	Maximum	MFC
Goiter	ACTB	21.88	1.78	8.1	19.78	25.00	1.26
	B2M	20.83	2.59	9.3	18.10	26.11	1.44
	GAPDH	21.18	1.95	9.2	19.54	25.60	1.31
	HPRT1	30.10	3.10	10.3	25.48	35.24	1.38
	SDHA	31.17	2.21	7.1	29.51	34.56	1.17
	YWHAY	27.48	2.47	9.0	22.71	30.93	1.36
Normal	ACTB	23.56	1.92	8.1	19.99	25.69	1.29
	B2M	24.63	5.08	20.6	18.53	32.65	1.76
	GAPDH	22.84	1.78	7.8	20.54	26.20	1.28
	HPRT1	32.12	3.06	9.5	25.65	35.66	1.39
	SDHA	33.94	3.20	9.4	29.54	39.39	1.33
	YWHAY	26.29	2.35	8.9	22.83	29.25	1.28

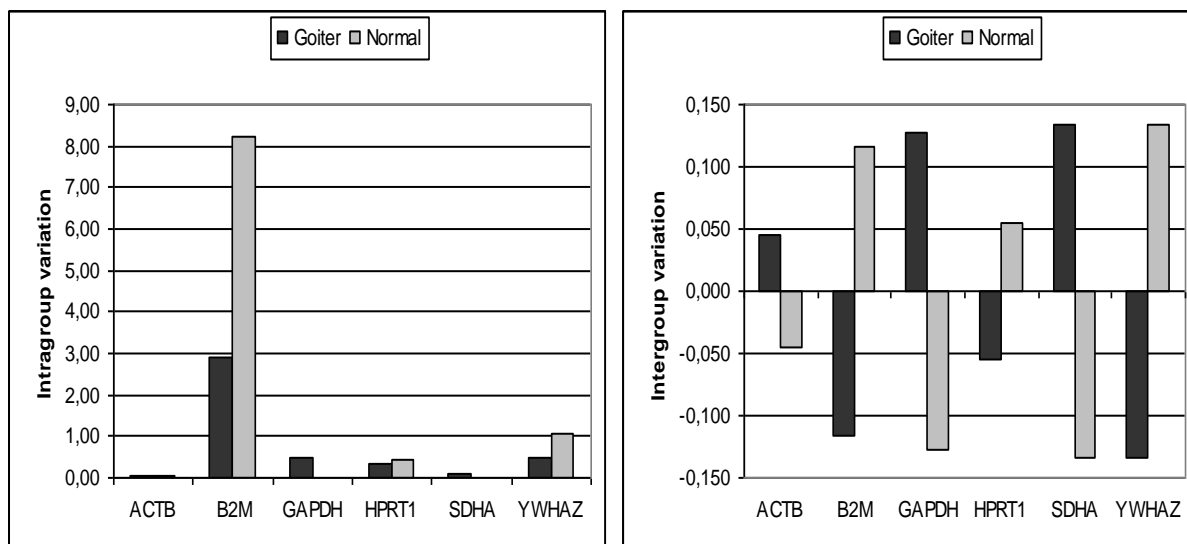
SD: standard deviation; CV: coefficient of variation; MFC: maximum fold change (the ratio of the maximum and minimum values); *ACTB*: beta-actin; *GAPDH*: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *SDHA*: succinate dehydrogenase, subunit A, flavoprotein (Fp); *HPRT1*: hypoxanthine phosphoribosyl- transferase I; *YWHAY*: tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide; *B2M*: beta-2-microglobulin.

Table 3. Stability values of reference genes candidates calculated by the NormFinder software for each tissue.

Tissue	Symbol Gene	Stability value
Goiter	ACTB	0.228
	SDHA	0.298
	HPRT1	0.567
	GAPDH	0.685
	YWHAZ	0.688
	B2M	1.711
Normal	GAPDH	0.114
	SDHA	0.114
	ACTB	0.221
	HPRT1	0.643
	YWHAZ	1.026
	B2M	2.867

Table 4. Stability values of reference candidate genes calculated by the NormFinder software for all tissues.

Symbol Gene	Stability value
SDHA	0.076
ACTB	0.082
GAPDH	0.150
HPRT1	0.221
YWHAZ	0.311
B2M	0.830



ACTB: beta-actin; *GAPDH*: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *SDHA*: succinate dehydrogenase, subunit A, flavoprotein (Fp); *HPRT1*: hypoxanthine phosphoribosyl- transferase I; *YWHAZ*: tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide; *B2M*: beta-2-microglobulin.

Figure 1. Intra and intergroup variation of six candidate reference genes in goiter and normal thyroid tissues samples.

Discussion

In this study, we evaluated 6 reference genes in 14 thyroid specimens (7 normal thyroid and 7 goiter) using RT-qPCR. The genes with the lowest variations in expression for normal samples, goiter, and all samples, were, respectively, GAPDH, ACTB, and SDHA and ACTB, when evaluated by the NormFinder.

According to de Jonge et al. (de Jonge, 2007), a good candidate gene should present a small coefficient of variation and a MFC <2. Moreover, a mean expression level lower than the maximum expression level subtracted with 2 SD is a prerequisite for a candidate reference gene. By these criteria, only B2M and GAPDH genes could be used as internal control for goiter, and none of these genes could be used for normal thyroid, although all had MFC<2.

The NormFinder algorithm was used to rank the candidate reference genes based on their stability values. The gene expression is more stable when this value is closer to zero. The stability value less than 0.15 is the cut-off for an acceptable reference gene (Vandesompele, 2002). Considering this criteria, none of the selected genes could be used to normalize RT-qPCR data for goiter tissues, and GAPDH and SDHA could be used for normal thyroid. When all data were analyzed together,

SDHA and ACTB genes had the lowest stability values, respectively, 0.076 and 0.082. We suggest using ACTB as reference gene, when comparing gene expression in normal thyroid and goiter, because this gene had the lowest intra and intergroup variation. Our results differ somewhat from those of Chantawibul et al. who found the highest stability value for HPRT1, while the GAPDH had the lowest stability value (Chantawibul, 2012). These differences may partly be explained by the sample selection, which included goiters, adenomas, carcinomas, and lymphocytic thyroiditis.

ACTB mRNA is expressed at moderately abundant levels in most cell types and its protein play a key role in the cytoskeleton maintenance. Recently, some studies have suggested that this gene does not satisfy the basic requirements for application as internal control, due to change in expression under various biomedical stimuli (Selvey, 2001; Ruan, 2007). Nevertheless, in normal thyroid cells, ACTB expression appeared to be stable in response to different experimental treatments (Santin, 2013). Other studies have demonstrated that ACTB can be used as reference gene (Mori, 2008; Mehta, 2010; Hayashi, 2012) for different cell types.

In conclusion, the results of the present study suggest that ACTB gene is more stable than SDHA, GAPDH, HPRTI, YWHAZ and B2M when evaluating human normal thyroid and goiter together.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge FIPE/HCPA, CAPES/PROF and CNPq for financial support.

References

Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 2004;64(15):5245-50.

- Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol.* 2002;29(1):23-39.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009;55(4):611-22.
- Chantawibul S, Anuwong A, Leelawat K. Validation of Appropriate Reference Genes for Gene Expression Studies in Human Thyroid Gland Using Real-Time RT-PCR. *J Med Assoc Thai.* 2012;95(3):S36-S40.
- de Jonge HJM, Fehrmann RSN, de Bont ESJM, Hofstra RMW, Gerbens F, Kamps W A. et al. Evidence Based Selection of Housekeeping Genes. *PLoS One.* 2007;2(9):e898.
- Dundas J, Ling M. Reference genes for measuring mRNA expression. *Theory Biosci.* 2012;131(4):215-23.
- Haller F, Kulle B, Schwager S, Gunawan B, von Heydebreck A, Sülthmann H, et al. Equivalence test in quantitative reverse transcription polymerase chain reaction: confirmation of reference genes suitable for normalization. *Anal Biochem.* 2004;335:1-9.
- Hayashi R, Hayashi S, Arai K, Chikuda M, Obara Y. Effects of antioxidant supplementation on mRNA expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase, β -actin, and 18s rRNA in the anterior capsule of the lens in cataract patients. *Exp Eye Res.* 2012;96:48-54.
- Krohn K, Fuhrer D, Bayer Y, Eszlinger M, Brauer V, Neumann S, et al. Molecular pathogenesis of euthyroid and toxic multinodular goiter. *Endocr Rev.* 2005;26:504-24.
- Lecchi C, Dilda F, Sartorelli P, Cecilian F. Widespread expression of SAA and Hp RNA in bovine tissue after evaluation of suitable reference gene. *Vet Immunol Immunopathol.* 2012;145:556-562.

- Li Q, Domig KJ, Ettle T, Windisch W, Mair C, Schedle K. Evaluation of Potential Reference Gene for Relative Quantification by RTq-PCR in Different Porcine Tissues Derived from Feeding Studies. *Int J Mol Sci.* 2011;12:1727-1734.
- Lisowski P, Pierzchala M, Goscik J, Pareek CS, Zwierzchowski L. Evaluation of reference genes for studies of gene expression in the bovine liver, kidney, pituitary, and thyroid. *J Appl Genet.* 2008;49(4):367-372.
- Mehta R, Birerdinc A, Hossain N, Afendy A, Chandhoke V, Younossi Z, et al. Validation of endogenous reference genes for qRT-PCR analysis of human visceral adipose samples. *BMC Mol Biol.* 2010;11(39):1-10.
- Mori R, Wang Q, Danenberg KD, Pinski JK, Danenberg PV. Both β -Actin and GAPDH are Useful Reference Genes for Normalization of Quantitative RT-PCR in Human FFPE Tissue Samples for Prostate Cancer. *Prostate.* 2008;68:1555-1560.
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett.* 2004;26:509-515.
- Radónic A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nistche A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;313:856-862.
- Ruan W, Lai M. Actin, a reliable marker of internal control? *Clin Chim Acta.* 2007;385:1-5.
- Santin AP, Souza AFD, Brum IS, Furnaletto TW. Validation of Reference Genes for Normalizing Gene Expression in Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR in Human Thyroid Cells in Primary Culture Treated with Progesterone and Estradiol. *Mol Biotechnol.* 2013;54:278-282.
- Selvey S, Thompson EW, Matthaei K, Lea RA, Irving MG, Griffiths LR. β -Actin-an unsuitable internal control for RT-PCR. *Mol Cell Probes.* 2001;15:307-311.

- Souza AF, Brum IS, Neto BS, Berger M, Branchini G. Reference gene for primary culture of prostate cancer cells. *Mol Biol Rep.* 2013;40:2955-62
- Studer H, Peter HJ, Gerber H: Natural heterogeneity of thyroid cells: The basis for understanding thyroid function and nodular growth. *Endocr Rev*, 1989;10:125.
- Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol.*1999;75:291-295
- Vandesompele J, De Preter K., Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002;3:1-12.

6.2 Expressão gênica e protéica do GPER1 em tecido normal e bocio

Esse artigo será submetido na revista *International Journal of Molecular Medicine* (ISSN: 1107-3756).

Short Communication

Decreased expression of GPER1 gene and protein in goiter

Raquel Weber¹, Ana Paula Santin Bertoni², Laura Walter Bessestil³, Ilma Simoni Brum³, Tania Weber Furlanetto¹

¹ Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde, Porto Alegre, RS, Brazil.

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

Short title: GPER1 in goiter tissue.

Corresponding author

Tania Weber Furlanetto

Rua Ramiro Barcellos 2350/700

Porto Alegre, RS, Brazil

90035-903

Telephone: 00 55 51 3359.8152

Fax: 00 55 51 3359.8152

e-mail: taniafurlanetto@gmail.com

Abstract

Goiter is more common in women, suggesting that estrogen could be involved in its physiopathology. The presence of classical estrogen receptors (ER α and ER β) has been described in thyroid tissue, suggesting a direct effect of estrogen on the gland. A non-classic estrogen receptor, the G-protein coupled estrogen receptor (GPER1), has been described recently in several tissues. However, in goiter, the presence of this receptor has not been studied yet. We investigated GPER1 gene and protein expressions in normal thyroid and goiter using real-time quantitative RT-PCR and Western blot, respectively. In normal thyroid (n=16) and goiter (n=19), GPER1 gene was expressed in all samples, while GPER1 protein was expressed in all samples of normal thyroid (n=15) but in only 72% of goiter samples (n=13). When comparing GPER1 gene and protein levels in both conditions, gene expression and protein levels were higher in normal thyroid than in goiter, suggesting a role of this receptor in this condition. Further studies are needed to elucidate the role of GPER1 in normal thyroid and goiter.

Key-words: GPER1, goiter, thyroid, protein, gene expression

Introduction

17 β -Estradiol (E2) is a member of the family of steroid hormones which controls many aspects of mammalian physiology (Krolik, 2012). Although its ability to stimulate breast cell proliferation is one of E2 normal roles, it increases the risk of breast cancer (Baggio, 2013; Krolik, 2012).

Classically, E2 actions are mediated upon binding on two intracellular nuclear receptors, estrogen receptor (ER) alfa and ER beta, which bind to DNA and control gene expression (Klinge, 2004). Like other steroid hormones, it enters passively into cells where it binds to and activates ERs. It is well known that E2 has direct and indirect effects on the thyroid, and this subject has been recently reviewed (Santin, 2011). These effects could explain the larger prevalence of goiter and thyroid cancer in women (Vanderpump, 2011). Although many studies have shown the expression of ER in thyroid cancer (Santin, 2011), there is no study associating aggressiveness of thyroid cancer and absence of ER, as it is seen in breast cancer (Chacon, 2010).

A novel 7-transmembrane G protein-coupled receptor, which responds to E2 stimulation with rapid cellular signaling, including ERK activation, PI3K activation, calcium mobilization, and cAMP production, has been extensively studied (Prossnitz, 2008). This receptor was named G-protein estradiol receptor 30 (GPR30), G-protein estradiol receptor (GPER), and, more recently, G-protein estradiol receptor 1 (GPER1). It has been shown to be expressed in many estradiol-responsive tissues, and some studies have proposed a potential use of selective antagonists of GPER1 as a new targeted therapy for cancer (Revankar, 2005; Thomas, 2005).

GPER1 expression was described in thyroid carcinoma cell lines (Kumar, 2010; Vivacqua, 2006), but has not been studied yet in normal or benign thyroid tissues or cells. The knowledge of the expression of this receptor in normal and non-malignant thyroid could be a potential tool to better understand the non-genomic effects of E2, contributing to develop targets to treatment of diseases. So, the aim of

this study was to evaluate the expression of GPER1 in human normal thyroid, and goiter.

Materials and Methods

Human thyroid tissues

Thyroid samples were obtained from 16 normal thyroid and 19 goiter patients who underwent total thyroidectomy as part of treatment for differentiated thyroid cancer in the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). After macroscopic and frozen sections evaluation of surgical specimens by two pathologists, normal thyroid or goiter tissue, which would be discharged, were frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until further processing. This study was approved by the interdisciplinary Ethics Committee of HCPA (GPPG: 12-0272). The pattern used to confirm the presence of goiter were a well-defined fibrous capsule with a mixture of macrofollicles and microfollicles and, in some cases, some degenerative changes such as fibrosis and hemorrhage (Baloch; 2002).

RNA extraction

Total RNA was isolated from thyroid tissues using TRI Reagent[®] (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), and quantified using a Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE) via absorbance measurements at 260 and 280 nm. Only samples that presented A260/A280 ratios between 1.80 and 2.04 were used in this study. RNA was then stored at -80°C until reverse transcription (RT) into cDNA.

cDNA synthesis

cDNA was synthesized from 2 µg of total RNA in a 20 µL reaction using oligo-dT primers and the SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's guidelines. cDNA samples were stored at -20°C.

RT-qPCR

GPER1 and β -actin gene were amplified in parallel using Applied Biosystems[®] StepOne[™] Real-Time PCR System (Invitrogen Life Technologies) and Kit Platinum SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen Life Technologies). The reaction for both genes was initiated by preheating at 95 °C for 10s, followed by 40 cycles of denaturation 15 s at 95 °C, annealing 30 s at 58 °C min, and extension 30 s at 72 °C. Primer pairs used were described previously by Maggiolini et al. for GPER1 (Maggiolini, 2004) and by Souza et al. for β -actin (Souza, 2013). The specificity of the products was verified by melting curve analysis and 2.0% agarose gel electrophoresis containing 0.025 μ g/ml ethidium bromide.

The GPER1 and β -actin quantification in samples was performed based on amplification of a standard curve with five successive ten-fold dilution points of a pool of cDNA samples.

Western blot analysis

Thyroid tissues were homogenized in RIPA buffer containing 20 mM (pH 8.0) Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10% glycerol, plus 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, and 0.1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). Lysates were centrifuged at 12.000 x g for 30 min at 4°C, and supernatants were used for the assay. Protein content was measured by the Bradford assay (Bradford, 1976), and 100 micrograms of protein were separated in a 12% SDS-polyacrylamide gel with a standard molecular weight marker (Spectra[™] Multicolor Broad, Thermo Fisher Scientific Inc, Rockford, IL, USA). Proteins were transferred to Immobilon-P polyvinylidene difluoride (0.45 μ m, PVDF) blotting membrane with a semi-dry transfer cell (Bio-Rad Trans-Blot[®] SD, Hercules, CA, USA). Afterwards, membranes were blocked by incubation with Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20 and 3% nonfat dry milk for 2 h at room temperature. Thereafter, membranes were incubated with rabbit anti-GPR30 antibodies (1:500, Santa Cruz Biotechnology), or with mouse anti- α -tubulin antibody (1:1.000, Invitrogen) overnight at 4°C. Membranes were then incubated in horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse immunoglobulin (1:7.500, Santa Cruz Biotechnology). Antigen-antibody complexes were detected by chemiluminescence and exposed to Kodak medical X-ray processor 102 (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA). Films were scanned and the

optical density of each specific band analyzed using the Image Station 4000MM PRO[®] (Rochester, NY, USA).

Statistical analysis

Comparisons between the two groups were performed by the Mann Whitney test, using SPSS Statistical significance was established at p values of <0.05.

Results

GPER1 mRNA was present in all samples studied (Figure 1). Results from RT-qPCR are shown as the ratio of GPER1 expression versus β -actin expression in arbitrary units (AU), and data are shown as median [percentile25/percentile75 (P25/P75)]. GPER1 mRNA was less expressed in goiter than in normal thyroid with median (P25/P75), respectively: 0.8620 (0.09/4.68), and 9.6085 (0.44/16.12).

GPER1 protein levels were evaluated in 15 samples of normal thyroid and 13 samples of goiter. The presence of a band with a molecular weight of ~38 KDa (Figure 2A and 2B, upper panel); indicated the presence of GPER1. All normal thyroid samples expressed GPER1 protein and it was not expressed in four of the goiter samples (28%). Control with β -tubulin in the same blot demonstrated mRNA viability in all samples. These data are shown in Figure 2A and 2B.

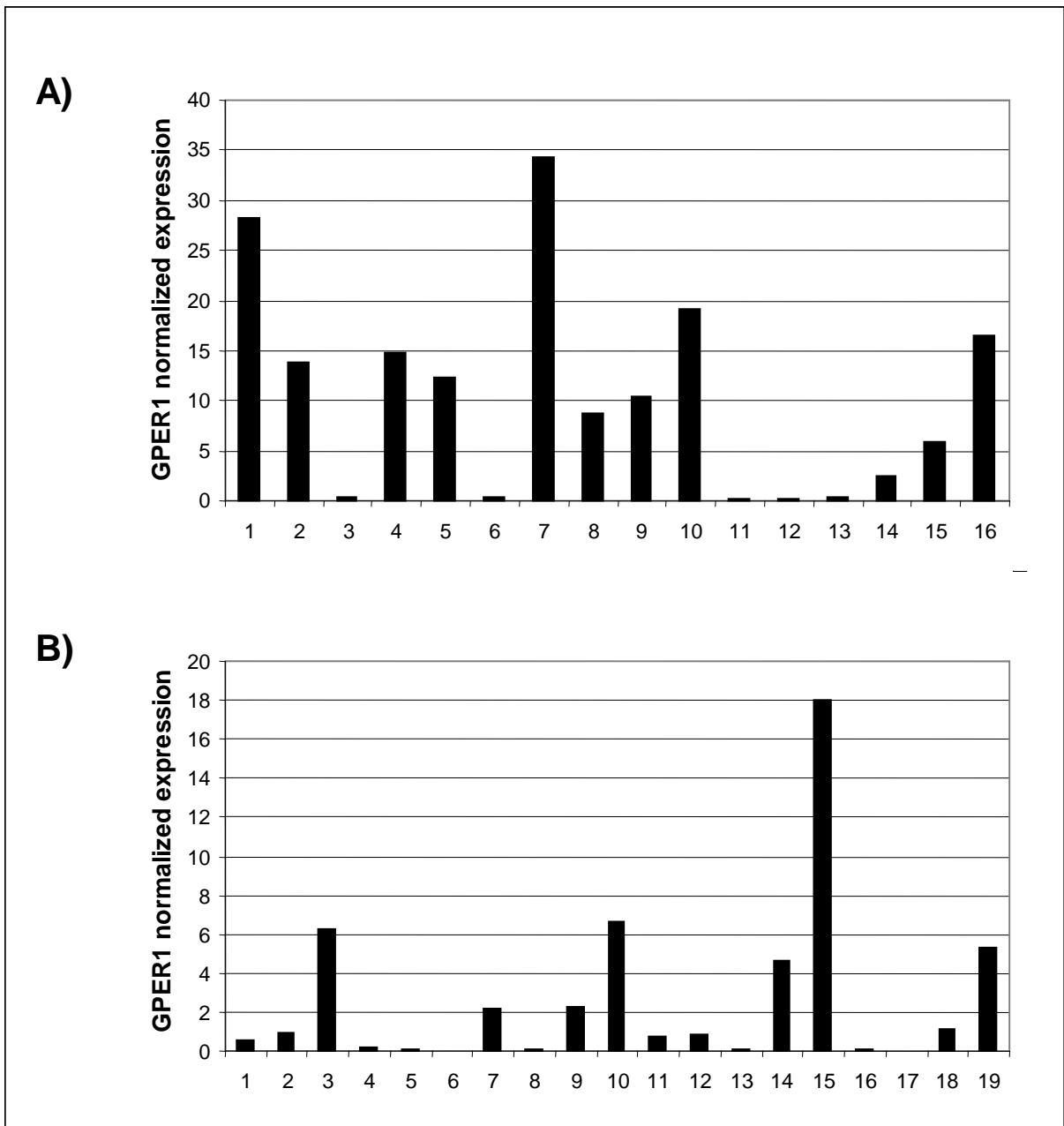


Figure 1: GPER1 gene expression by RT-qPCR in human thyroid. (A) in normal thyroid samples; (B) in goiter samples. β -actin was the reference gene. Each sample was obtained from one patient.

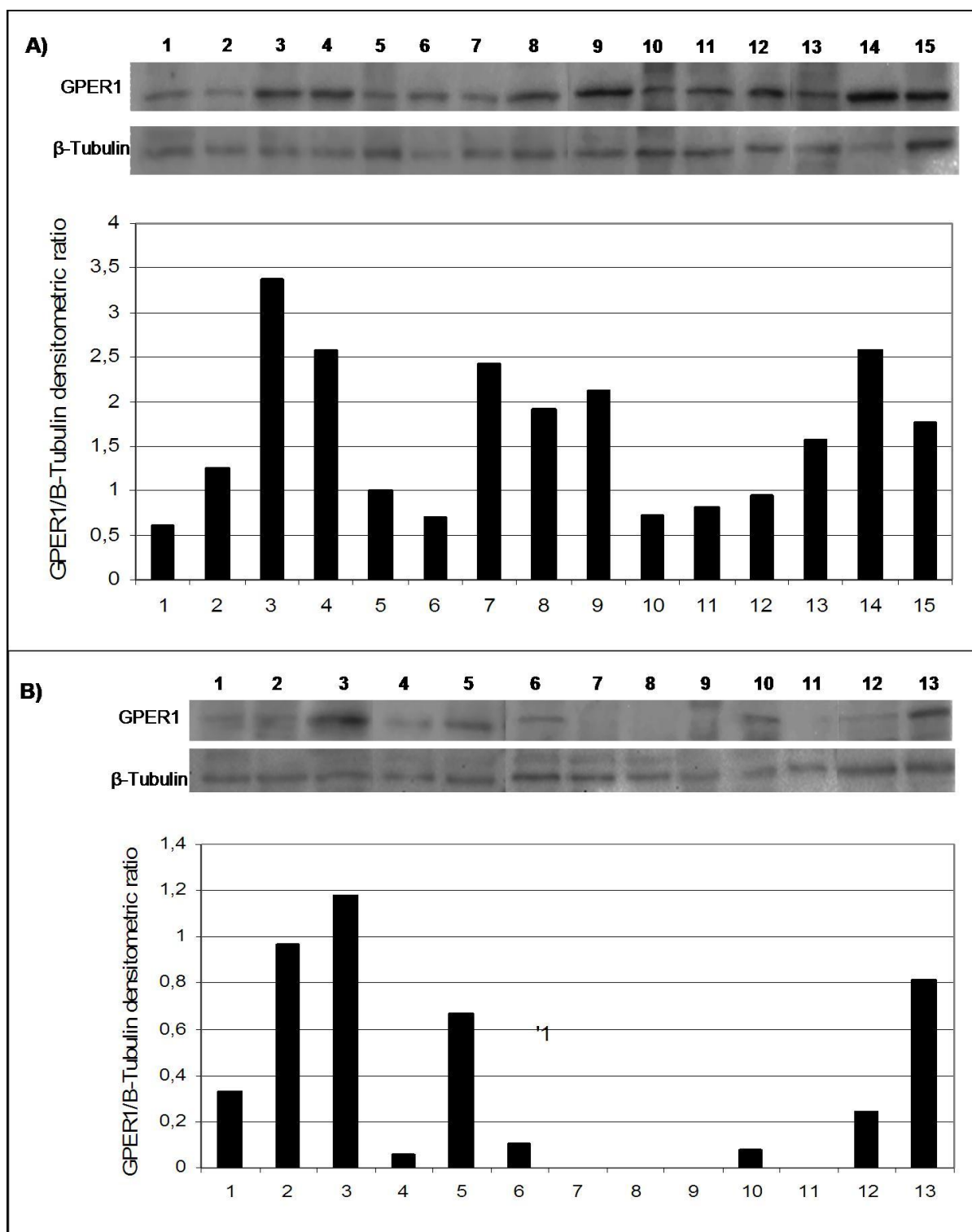


Figure 2: GPER1 protein expression by Western blot in human thyroid. (A) normal samples; (B) goiter samples. β -tubulin was used as loading control. Each sample was obtained from one patient.

Densitometric scanning of the 38 kDa band showed lower expression of GPER1 protein levels in goiter, when compared with normal thyroid ($p = 0.002$), with median (P25/P75), respectively, 0.3332 (0.09/0.88) and 1.5804 (0.81/2.43).

Discussion

As female sexual hormones could be directly involved in the pathogenesis of multinodular goiter, we studied GPER1 gene and protein expression in 35 samples of normal thyroid and goiter. GPER1 gene expression was lower in goiter, when compared to normal thyroid. Likewise, GPER1 protein levels were higher in normal thyroid than goiter, but the presence of GPER1 protein was not observed in all samples of goiter.

This was the first time GPER1 gene expression was studied in goiter, nevertheless, Gombos et al. observed previously a lower expression of this gene, as measured by high-density oligonucleotide array, confirmed by RT-qPCR, in benign and malignant thyroid tumors, when compared to normal thyroid (Gombos, 2007). Similarly, Kumar et al., studying papillary ($n=2$) and follicular ($n=1$) carcinoma cell lines, identified very low or absent levels of GPER1 gene expression (Kumar, 2010). On the other hand, Vivacqua et al. were able to prevent estradiol-induced transduction pathways using specific inhibitors for GPER1 in follicular ($n=1$) and anaplastic ($n=2$) thyroid carcinoma cell lines (Vivacqua, 2006).

In other tissues, GPER1 mRNA has also been evaluated. Poola et al. reported that GPER1 mRNA levels were significantly down-regulated in breast cancer tissues, in comparison with their matched normal tissues. Interestingly, the receptor expression levels were lower in tumor tissues from patients who had lymph node metastasis, when with tumors without this condition (Poola, 2008). Equally, GPER1 gene expression was observed to be lower in infiltrating ductal carcinoma than in non-tumor mammary tissues (Kuo, 2007), and, also, lower in the polycystic ovary syndrome group than in normal group (Wang, 2011). On the other hand, GPER1 mRNA levels were higher in malignant than benign ovarian endometriotic cysts (EAO), and correlated with matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) expression,

suggesting that the abnormal expression of this receptor may be involved in malignant transformation, invasion, and metastasis of EAOC (Long, 2012).

Although there are no studies concerning the functional activity of GPER1 neither in normal thyroid cells nor in goiter, the lower gene and protein expression in goiter suggests a role of this gene in its pathogenesis. Other studies have shown discrepancies in GPER1 protein levels in normal and abnormal tissues. Filardo et al. demonstrated by immunohistochemistry that GPER1 was positive in all samples of normal breast while in primary breast cancer only 42% were GPER1 positive (Filardo, 2006). However, in endometrial carcinoma, epithelial ovarian cancer, and uterine leiomyomas, the expression of this protein was higher, when compared with their matched normal or benign tissues (He, 2009; Liu, 2010; Tian, 2012),

These data together suggested that GPER1 abnormal gene and protein expressions could be involved in the pathogenesis of many diseases in E2 responsive tissues. Although the effects of E2 in activating the growth of thyroid cells was shown to be an action directly mediated by ER α (Furlanetto, 1999), Manole et al. have shown that non-genomic mechanisms were involved (Manole, 2001). The physiopathological implications of the lower GPER1 gene and protein expressions in goiter are unknown. Functional studies using follicular cells isolated from normal thyroid and goiter are necessary to better understand the difference in GPER1 expression, and its mechanisms, in thyroid cells.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge FIPE/HCPA, CAPES/PROF and CNPq for financial support.

References

- Baggio G, Corsini A, Floreani A, Giannini S, Zagonel V. 2013. Gender medicine: a task for the third millennium. *Clin Chem Lab Med* 51:713-27
- Baloch ZW, Livolsi VA. 2002. Follicular-patterned lesions of the thyroid: the bane of the pathologist. *Am J Clin Pathol* 117:143-50

- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54
- Chacon RD, Costanzo MV. 2010. Triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res* 12 Suppl 2:S3
- Filardo EJ, Graeber CT, Quinn JA, Resnick MB, Giri D, et al. 2006. Distribution of GPR30, a seven membrane-spanning estrogen receptor, in primary breast cancer and its association with clinicopathologic determinants of tumor progression. *Clin Cancer Res* 12:6359-66
- Furlanetto TW, Nguyen LQ, Jameson JL. 1999. Estradiol increases proliferation and down-regulates the sodium/iodide symporter gene in FRTL-5 cells. *Endocrinology* 140:5705-11
- Gombos K, Zele E, Kiss I, Varjas T, Puskas L, et al. 2007. Characterization of microarray gene expression profiles of early stage thyroid tumours. *Cancer Genomics Proteomics* 4:403-9
- He YY, Cai B, Yang YX, Liu XL, Wan XP. 2009. Estrogenic G protein-coupled receptor 30 signaling is involved in regulation of endometrial carcinoma by promoting proliferation, invasion potential, and interleukin-6 secretion via the MEK/ERK mitogen-activated protein kinase pathway. *Cancer Sci* 100:1051-61.
- Klinge CM, Jernigan SC, Mattingly KA, Risinger KE, Zhang J. 2004. Estrogen response element-dependent regulation of transcriptional activation of estrogen receptors alpha and beta by coactivators and corepressors. *J Mol Endocrinol* 33:387-410
- Krolik M, Milnerowicz H. 2012. The effect of using estrogens in the light of scientific research. *Adv Clin Exp Med* 21:535-43

- Kuo WH, Chang LY, Liu DL, Hwa HL, Lin JJ, Lee PH, et al. 2008. The interactions between GPR30 and the major biomarkers in infiltrating ductal carcinoma of the breast in an Asian population. *Taiwan J Obstet Gynecol* 46:135-45.
- Kumar A, Klinge CM, Goldstein RE. 2010. Estradiol-induced proliferation of papillary and follicular thyroid cancer cells is mediated by estrogen receptors alpha and beta. *Int J Oncol* 36:1067-80
- Liu HD, Yan Y, Cao XF, Tan PZ, Wen HX, Lv CM, et al. 2010. The expression of a novel estrogen receptor, GPR30, in epithelial ovarian carcinoma and its correlation with MMP-9. *Sheng Li Xue Bao* 62(6):524-8.
- Long L, Cao Y, Tang LD. 2012. Transmembrane estrogen receptor GPR30 is more frequently expressed in malignant than benign ovarian endometriotic cysts and correlates with MMP-9 expression. *Int J Gynecol Cancer* 22:539-45.
- Maggiolini M, Vivacqua A, Fasanella G, Recchia AG, Sisci D, et al. 2004. The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17beta-estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells. *J Biol Chem* 279:27008-16
- Manole D, Schildknecht B, Gosnell B, Adams E, Derwahl M. 2001. Estrogen promotes growth of human thyroid tumor cells by different molecular mechanisms. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1072-1077.
- Poola I, Abraham J, Liu A, Marshalleck JJ, Dewitty RL. 2008. The Cell Surface Estrogen Receptor, G Protein- Coupled Receptor 30 (GPR30), is Markedly Down Regulated During Breast Tumorigenesis. *Breast Cancer (Auckl)*1:65-78.
- Prossnitz ER, Oprea TI, Sklar LA, Arterburn JB. 2008. The ins and outs of GPR30: a transmembrane estrogen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 109:350-3
- Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. 2005. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 307:1625-30

- Santin AP, Furlanetto TW. 2011. Role of estrogen in thyroid function and growth regulation. *J Thyroid Res* 2011:875125
- Souza AF, Brum IS, Neto BS, Berger M, Branchini G. 2013. Reference gene for primary culture of prostate cancer cells. *Mol Biol Rep* 40:2955-62
- Tian R, Wang Z, Shi Z, Li D, Wang Y, Zhu Y, et al. 2013. Differential expression of G-protein-coupled estrogen receptor-30 in human myometrial and uterine leiomyoma smooth muscle. *Fertil Steril* 99:256-63.
- Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J. 2005. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* 146:624-32
- Vanderpump MP. 2011. The epidemiology of thyroid disease. *Br Med Bull* 99:39-51
- Vivacqua A, Bonofiglio D, Albanito L, Madeo A, Rago V, et al. 2006. 17beta-estradiol, genistein, and 4-hydroxytamoxifen induce the proliferation of thyroid cancer cells through the g protein-coupled receptor GPR30. *Mol Pharmacol* 70:1414-23
- Wang A, Ji L, Shang W, Li M, Chen L, White RE, et al. 2011. Expression of GPR30, ER α and ER β in endometrium during window of implantation in patients with polycystic ovary syndrome: a pilot study. *Gynecol Endocrinol* 27:251-5.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme os dados apresentados no primeiro artigo, conclui-se que não existe um gene de referência universal que possa ser utilizado indiscriminadamente em diferentes amostras e tecidos para normalizar resultados da RT-qPCR. Devidos aos diferentes estímulos e mecanismos de regulação celular, um gene, em células de uma mesma amostra, pode apresentar diferentes níveis de expressão. Além disso, a RT-qPCR, por ser constituída de múltiplos passos de realização, exige um método de normalização a fim de minimizar o efeito das variações experimentais na interpretação das informações quantitativas geradas a partir da amplificação do material genético, com o objetivo de permitir comparações acuradas entre diferentes amostras. Sem uma normalização apropriada, o perfil de expressão de um gene alvo pode ser erroneamente interpretado. Apesar de muitos estudos desaconselharem o uso da beta-actina como gene de referência, para a tireoide, esse gene apresentou uma estabilidade adequada, e pode ser utilizado como referência para comparação dos resultados da RT-qPCR em amostras de tecido normal de tireoide e bócio.

Apesar da ação do E2 na tireoide, e a expressão dos receptores clássicos e do GPER1 em tecido normal de tireoide e em linhagens celulares de câncer de tireoide já ter sido relatada, esse trabalho avaliou, pela primeira vez, a expressão protéica do GPER1 em bócio. No segundo artigo, demonstrou-se que esse receptor apresenta uma menor expressão gênica e protéica em bócio, quando comparado ao tecido normal de tireoide. A partir dessa evidência, e embasado em dados de outros pesquisadores que avaliaram o nível de expressão desse receptor em outros tecidos normais e anormais, é possível que o E2, via GPER1, pode estar envolvido na

fisiopatologia dessa doença. Estudos funcionais são necessários para esclarecer esses achados.