

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA

Miriane de Oliveira

Diferentes doses de Triiodotironina (T3) aumentam a expressão gênica de leptina, adiponectina e TR α com o envolvimento da via fosfatidil inositol 3 quinase (PI3K) em adipócitos, 3T3-L1

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Célia Regina Nogueira

BOTUCATU

2016

Miriane de Oliveira

Diferentes doses de Triiodotironina (T3) aumentam a expressão gênica de leptina, adiponectina e TR α com o envolvimento da via fosfatidil inositol 3 quinase (PI3K) em adipócitos, 3T3-L1

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Célia Regina Nogueira

BOTUCATU

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Oliveira, Miriane de.

Diferentes doses de Triiodotironina (T3) aumentam a expressão gênica de leptina, adiponectina e TR α com o envolvimento da via fosfatidil inositol 3 quinase (PI3K) em adipócitos, 3T3-L1 / Miriane de Oliveira. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Célia Regina Nogueira
Capes: 20700008

1. Triiodotironina. 2. Adiponectina. 3. Expressão gênica.
4. Leptina.

Palavras-chave: Adiponectina; Leptina; Triiodotironina; PI3K; TR α .

Agradecimentos

A **Deus** por ser meu tudo e estar sempre comigo em todos os momentos, mesmo naqueles em que eu não mereço.

Ao meu marido, Marcelo, simplesmente por existir e fazer parte da minha. Por ter me dado a maior benção de nossas vidas, a nossa filha, Melissa.

À minha amada filha, Melissa, que me mostrou que sou mais forte do que eu imaginava.

Aos meus pais amados, aos quais devo grande parte do que sou hoje.

À minha família toda que direta ou indiretamente fizeram parte dessa jornada.

Ao meu sogro Antonio Carlos e minha sogra Dirce por sempre me apoiarem em minha caminhada, por estarem dispostos a sempre nos ajudar.

À minha orientadora, Profa. Dra. Célia Regina Nogueira, exemplo de profissional e pessoa. Obrigada pela orientação e disponibilidade.

À Profa. Dra. Paula Hokama pela disponibilidade e pelas considerações e sugestões durante o exame geral de qualificação que contribuíram imensamente para o aprimoramento deste trabalho.

Ao Prof^o. Dr. Robson F. Carvalho pelas considerações e sugestões durante o exame geral de qualificação que contribuíram imensamente para o aprimoramento da qualidade deste trabalho.

À Profa. Dra. Gabriella De Vita do Departamento de Medicina Molecular e Biotecnologia Médica da Universidade de Nápoles Frederico II pela oportunidade de estagiar em seu laboratório.

À Angela, Sara, Elena, Barbará e Roberta (Departamento de Medicina Molecular e Biotecnologia Médica da Universidade de Nápoles Frederico I), que saudade de vocês, pessoas especiais que além de me proporcionarem crescimento profissional se tornaram minhas amigas. Não sei se suportaria

todas as dificuldades de estar longe de casa sem a amizade de vocês. Muito obrigada por tudo. *Te voglio bene.*

À Regiane, Maria Teresa e Fernanda amigas e companheiras de trabalho por estarem sempre dispostas a ajudar. Obrigada meninas por tudo.

À Bruna e Sarah que vieram acrescentar mais uma amizade para nós.

Aos alunos de pós-graduação que sempre direta ou indiretamente ajudam na batalha diária que é a pós-graduação.

Aos profissionais da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX) por todo auxílio e pelos momentos de descontração no dia a dia. Obrigada a todos pela amizade.

À minha querida Mariane que mesmo longe sei que torce por mim, sinto muito sua falta.

Às minhas amigas Natália, Luanda e Bruna pelas longas conversas e pelos momentos de descontração.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Médica pela simpatia com que sempre fui recebida e por estarem sempre prontos a me auxiliar.

Aos funcionários e amigos da seção de Pós-graduação pelo carinho, simpatia e disposição em ajudar sempre.

À Comissão de Ética em Experimentação Animal.

À bibliotecária Rosemeire Aparecida Vicente pela confecção da ficha catalográfica deste trabalho.

Ao departamento de Clínica Médica e a UNIPLEX – Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro (processo nº 2010/16911-4) e por viabilizar a realização deste estudo.

“Você é quem decide o que vai ser eterno em você, no seu coração. Deus nos dá o dom de eternizar em nós o que vale a pena, e esquecer definitivamente aquilo que não vale...”

(Padre Fábio de Melo)

Resumo

Os hormônios tireoidianos (HT) são essenciais para a sobrevivência, estando envolvidos nos processos de desenvolvimento, crescimento e metabolismo. As ações dos HT são distintas para diferentes órgãos alvos, e podem ocorrer por meio de seus receptores $TR\alpha$ e $TR\beta$, ou por vias alternativas, as quais podem envolver a integrina $\alpha\beta_3$, as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e a fosfatidil inositol 3 quinase (PI3K). O tecido adiposo (TA) representa um importante alvo dos HT; produzem várias substâncias biologicamente ativas com diferentes funções fisiológicas, denominadas adipocinas, entre elas a leptina e adiponectina. A leptina é considerada um sinal adipostático ao cérebro e está envolvida na regulação do balanço energético. Adiponectina está envolvida em importantes efeitos metabólicos, como estimulação da oxidação de ácidos graxos, redução da gliconeogênese e aumento da termogênese. Vários estudos têm procurado relacionar a síntese de leptina e adiponectina com os HT; entretanto, os resultados obtidos são controversos. O objetivo desse trabalho foi avaliar o envolvimento da via PI3K nos efeitos da triiodotironina (T3) sobre a expressão gênica de leptina, adiponectina e do $TR\alpha$ em cultura de adipócitos, 3T3-L1. Para isso utilizamos inibidor da via PI3K, LY294002 e inibidor da síntese proteica (ciclohexamida - CHX), para verificar se ação do T3 é direta ou indireta. Após a diferenciação das células 3T3-L1 elas foram incubadas por uma hora com T3 na presença ou ausência dos inibidores citados acima. Posteriormente ao período de tratamento foi realizada a análise de expressão gênica de mRNA (leptina, adiponectina e $TR\alpha$) por RT-PCR e de proteína (leptina) pela técnica de Western Blot. Os resultados para leptina, assim como para $TR\alpha$, demonstraram a ativação da via de sinalização PI3K para ação do T3 na expressão gênica desses genes, sendo que essa ação pode ser indireta ou direta, dependendo da dose de hormônio administrada. Em relação a adiponectina, a dose suprafisiológica de T3 (sem a ativação da via PI3K) ou desativação da via PI3K eleva os níveis dessa adipocina, e constatamos que a ação do T3, nessa dose, sobre os níveis de mRNA de adiponectina é indireta em adipócitos, 3T3-L1. Em resumo, durante uma hora de tratamento, diferentes doses de T3 aumentam os níveis de expressão das adipocinas, leptina e adiponectina, e do $TR\alpha$ em cultura celular de adipócitos, 3T3-L1, e a via de sinalização PI3K se faz importante para a ação do T3.

Palavras chaves: Leptina, Adiponectina, Adipócitos, Triiodotironina, $TR\alpha$, PI3K

Abstract

The thyroid hormones (HT) are essential for survival, being involved in the processes of development, growth and metabolism. Process actions are distinct for different organs, and may occur either directly through its receptors TR α and TR β , or indirectly through alternative pathways, which may involve integrin α v β 3, the mitogen-activated protein kinases (MAPK) or phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K). Adipose tissue (TA) is an important target of HT; it produces various biologically active substances with different physiological functions, called adipokines, including leptin and adiponectin. Leptin is considered an adipostatic signal to the brain and is involved in the regulation of energy balance. Adiponectin is involved in important metabolic effects, such as stimulating fatty acid oxidation, reducing gluconeogenesis and increasing thermogenesis. Several studies have sought to relate the leptin and adiponectin synthesis with HT, however the results are controversial. The present study aimed to examine the effects of triiodothyronine (T3), on the modulation of leptin, adiponectin and TR α expression and the involvement of the PI3K signaling pathway in adipocytes, 3T3-L1, cell culture. Will be used pathway inhibitors PI3K, LY294002, and protein synthesis inhibitors (cycloheximide - CHX), to examine whether directly or indirectly T3 action. After the differentiation of the cells 3T3-L1 will be incubated by one hour with T3 in the presence or absence of the inhibitors mentioned above. After hormone treatment was measured the of leptin, adiponectin and TR α gene expression using RT-PCR in real time, it was also assessed the expression of leptin by Western blot. The results to leptin, as well as TR α , demonstrated that the activation of the PI3K signaling pathway has a role in TH-mediated direct or indirect gene expression, depending on the dose administered. Regarding adiponectin, T3 supraphysiological dose (without activation of the PI3K pathway) or deactivation of the PI3K pathway raises the levels of this adipokine in adipocytes, 3T3-L1. In summary, during an hour of treatment, different doses of T3 increase of adipokines levels of expression, leptin and adiponectin, and TR α in cell culture of adipocytes 3T3-L1 and PI3K signaling pathway becomes important for action T3.

Key words: Leptin, Adiponectin, Adipocytes, Triiodothyronine, TR α , PI3K

Sumário

1 Introdução.....	10
1.1 Hormônios tireoidianos e mecanismos de ação	11
1.2 Importância da via PI3K.....	16
1.3 Adipogênese	18
1.4 Hormônios tireoidianos e tecido adiposo. Efeito nas adipocinas, leptina e adiponectina	23
2 Hipótese.....	26
3 Objetivos	28
3.1 Objetivo Geral	29
3.2 Objetivos específicos.....	29
4 Resultados	30
4.1 Manuscrito 1	31
Materials and Methods	35
Results	37
Discussion	39
References	41
4.2 Resumos	45
Manuscrito 2: Efeitos rápidos da triiodotironina no receptor de hormônio tireoidiano alfa pela via PI3K em adipócitos, 3T3-L1	45
Manuscrito 3: Triiodotironina aumenta os níveis de mRNA e proteína da leptina em curto período de tempo pela ativação da via PI3K em adipócitos, 3T3-L1	46
5 Discussão	47
6 Conclusões.....	51
Referências.....	53
Anexos	63
1-Manuscrito 2	64
2-Manuscrito 3	69
3-Protocolo Comitê de Ética	76
4-Justificativa de Alteração do Título do Projeto de Pesquisa.....	77
5-Súmula Curricular	78

1 Introdução

1.1 Hormônios tireoidianos e mecanismos de ação

Nos humanos, os hormônios tireoidianos (HT) são essenciais para o desenvolvimento normal, crescimento e metabolismo, principalmente durante o desenvolvimento fetal e na infância (1). Em adultos, o principal efeito dos HT é acelerar o gasto energético. São observados efeitos diretos sobre o consumo de oxigênio, as mitocôndrias aumentam em tamanho e em número, ocorre aumento da atividade de *NaK-ATPase* em resposta ao HT, assim como no metabolismo de proteínas e vitaminas (1,2). Os HT estão envolvidos na regulação do metabolismo de lipídios e carboidratos no fígado, músculo esquelético e coração (3); também influenciam o metabolismo e o desenvolvimento do tecido adiposo (TA) por meio da modulação da proliferação e da diferenciação de adipócitos (3), além de estimularem tanto a lipólise quanto a lipogênese (5).

A fonte de HT é a glândula tireoide, que sintetiza e secreta tiroxina (T4) e triiodotironina (T3); sendo predominante a secreção de T4, da qual deriva por desiodação, a maior parte do T3 circulante (6). A atividade de praticamente todos os tecidos do organismo dependem da ação do T3, pois é ele que apresenta maior atividade biológica em relação ao T4. A atividade tireoidiana como também a geração intracelular de T3; dependem, respectivamente, da integridade do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide e da atividade de enzimas específicas, as desiodases; assim mantendo a atividade normal dos tecidos-alvo (6).

Os HT podem ter ações distintas para diferentes órgãos alvos e essas ações podem ocorrer por vias distintas, podendo ser iniciadas dentro do núcleo, na membrana plasmática, no citoplasma ou na mitocôndria das células (7).

A ação dos HT é mediada, principalmente, pela modificação da expressão gênica, por meio de receptores nucleares, fatores transcricionais regulados por ligantes que aderem à cromatina (7, 8). Os receptores de HT (TR) são proteínas pertencentes à superfamília de receptores hormonais nucleares, originados a partir dos genes do receptor de hormônio tireoidiano alfa ($TR\alpha$) e do receptor de hormônio tireoidiano beta ($TR\beta$) (9, 10). Cada um desses genes codifica várias proteínas ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\Delta\alpha 1$, $\Delta\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ e $\Delta\beta 3$), como resultado do *splicing* alternativo dos genes $TR\alpha$ e $TR\beta$ (7,11) (Fig. 1).

Os TR apresentam sítio de ligação ao hormônio e sítios de interações com outras proteínas situados na extremidade C-terminal, e domínio de ligação ao ácido desoxirribonucleico (DNA) localizado centralmente na proteína receptora (12). Estes receptores nucleares agem em genes específicos por meio de sequências nucleotídicas denominados elementos responsivos ao hormônio tireoidiano (TRE), localizados nas regiões promotoras dos genes alvos (13). Apesar dos TR serem primariamente receptores nucleares, aproximadamente 10% são encontrados no citoplasma (14).

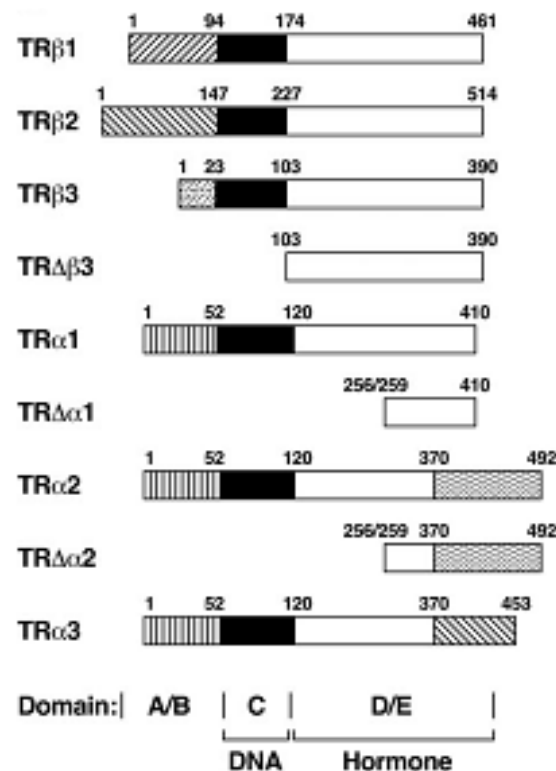


Figura 1. Representação esquemática das isoformas de receptores de hormônios tireoidianos (TR). TR são codificados pelos genes TR α e TR β , localizados nos cromossomos 17 e 13, respectivamente. Os TR compartilham sequência de homologia no domínio de ligação ao DNA (C) e ligação ao hormônio (D/E). Os domínios amino-terminal A/B são variáveis em comprimento e sequência de aminoácidos. Nas isoformas de TR truncado, TR $\Delta\beta$ 3, TR $\Delta\alpha$ 1 e TR $\Delta\alpha$ 2 falta o domínio amino-terminal A/B e o domínio de ligação ao DNA (C), mas mantém o domínio de ligação ao hormônio triiodotironina (T₃). Adaptada de Cheng, 2010 (7).

No modelo clássico ou genômico de indução da expressão gênica pelos HT, os TR ligam-se como heterodímeros em associação com o receptor de ácido retinóico (RXR) ou como homodímeros aos TRE (Fig. 2) (15). A ligação de alta afinidade do HT ao receptor pode induzir ou suprimir a expressão de genes-alvos. Nos genes-alvos regulados positivamente, a ausência do ligante favorece o recrutamento de co-repressores, enquanto que na presença de T₃ ocorre liberação de co-repressores e recrutamento de complexos co-ativadores, levando à ativação da transcrição gênica. Este mecanismo atrai um grande número de proteínas incluindo o complexo da RNA polimerase II para a transcrição do gene alvo. A ação clássica também pode levar ao aumento da expressão de genes desprovidos de TRE, os quais são genes alvos para fatores de transcrição induzidos por este mecanismo (16).

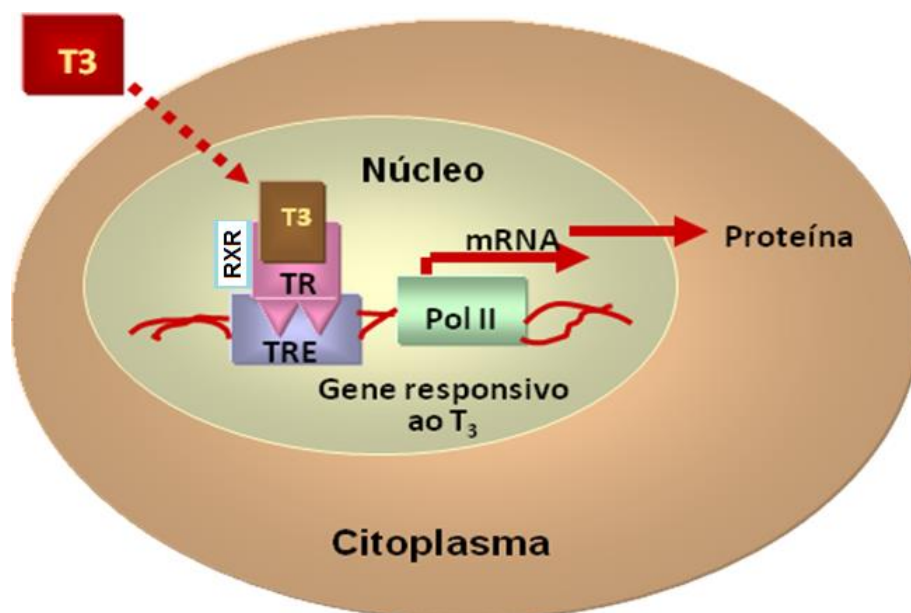


Figura 2. Ação clássica dos hormônios tireoidianos (HT). Ação genômica requer elemento responsivo ao hormônio tireoidiano (TRE) para transcrição de genes alvo. T₃, triiodotironina; TR, receptores de HT; RXR, receptor de ácido retinóico; Pol II, polimerase II; mRNA, ácido ribonúcleico mensageiro. Adaptada de Moeller et al., 2006 (16).

Os HT podem agir por meio de outros mecanismos (Fig. 4), além da ação clássica TR/TRE (15), esses mecanismos podem ser denominados não clássicos ou não genômicos por terem o sítio de iniciação na membrana plasmática ou no citoplasma. Os sítios de iniciação são proteínas caracterizadas como receptores de iodotironinas (7).

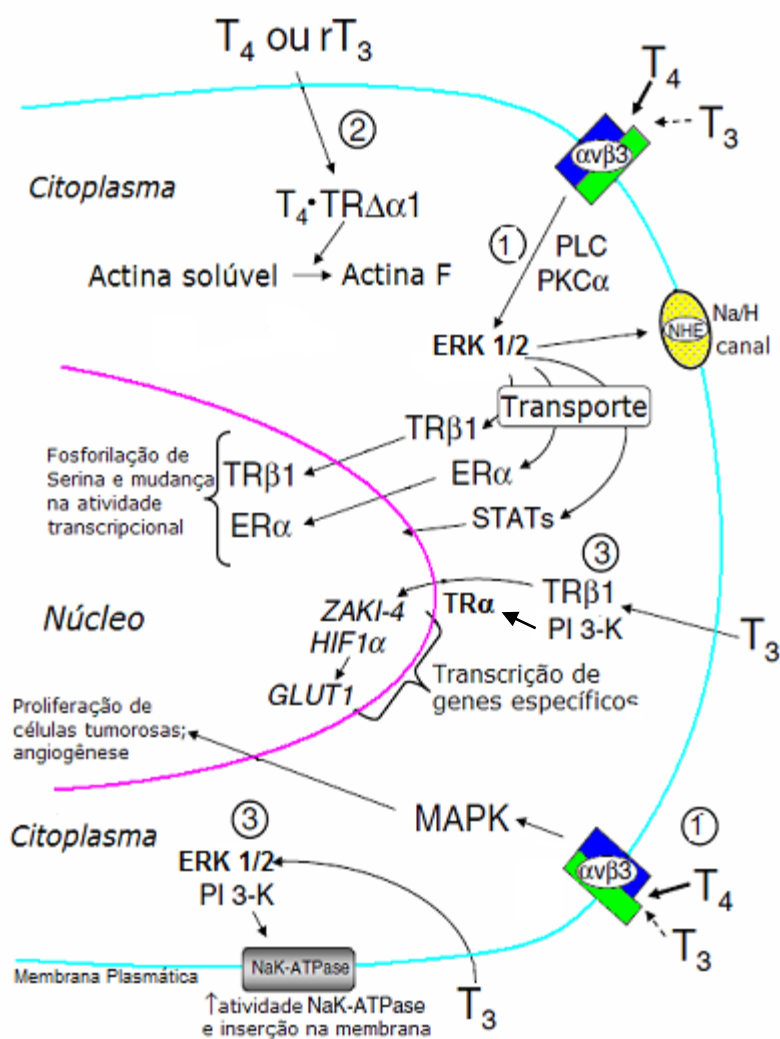


Figura 3. Representação esquemática de ações celulares não clássicas dos hormônios tireoidianos. 1) Ações de HT via integrina $\alpha\beta3$. 2) Ações de HT via TR $\Delta\alpha1$. 3) Ações de HT via PI3K. T₃, triiodotironina; T₄, tiroxina; TR α , receptor alfa dos HT; TR $\Delta\alpha1$, forma truncada de TR $\alpha1$; PLC, fosfolipase C; PKC α , proteína quinase C; TR $\beta1$, receptor beta dos HT; ER α , receptor alfa do estrógeno; STATs, transdutor de sinal e ativador de transcrição; PI3K, fosfatidil inositol 3

quinase; MAPK, proteínas quinases ativadas por mitógenos; ERK1/2, quinases reguladas por sinal extracelular; ZAKI-4, gene inibidor de calcineurina; HIF α 1, gene de fator indutor de hipoxia; GLUT1, transportador de glicose 1; NHE, trocador sódio-hidrogênio; Na, sódio; H, hidrogênio; K, potássio; ATPase, adenosina trifosfato. Retirado e modificado de Cheng et al., 2010 (7).

Uma das vias consideradas não clássica é a ativação da integrina $\alpha\text{v}\beta 3$ pelos HT. A integrina $\alpha\text{v}\beta 3$ é uma proteína localizada na membrana plasmática e possui sítios de ligação para os HT. Pelo receptor de integrina os HT estimulam as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e proteínas pertencentes ao grupo das MAPK, como as quinases reguladas por sinal extracelular 1 e 2 (ERK1/2) (Fig. 3.1). Ao ser estimulada pelos HT, a MAPK ativa a proliferação de células tumorais ou a angiogênese. Por meio da fosfolipase C (PLC) e proteína quinase C (PKC α), o hormônio ativa a ERK1/2 promovendo o transporte de proteínas específicas situadas no citoplasma para o núcleo, onde ocorre a fosforilação de nucleoproteínas, assim fosforilando proteínas alvo, como receptor de estrógeno alfa (ER α) ou TR β 1 (17). Ações não genômicas podem ocorrer, também, via citoplasma, onde a ativação da fosfatidil inositol 3 quinase (PI3K) pelos HT, envolvendo o TR α ou TR β 1 residentes do citoplasma, resulta na transcrição de genes específicos, como os genes: fator indutor de hipoxia (HIF-1 α), gene transportador de glicose 1 (GLUT1) e o gene inibidor de calcineurina (ZAKI4 α), dentre outros (Fig. 3.3) (7, 15, 18).

Essas ações não genômicas dos HT podem ocorrer em ambientes extra nucleares, independentes da presença de TR e agir rapidamente em proteínas não necessitando modular a expressão do gene (16). A forma truncada de TR α 1 (TR $\Delta\alpha$ 1), localizada no citoplasma, mediada pela ação de T4 e T3 reverso (rT3), mostrou regular a actina no citoesqueleto sem o envolvimento do núcleo (Fig. 3.2) (7, 17). O T3 age sobre a PI3K ativando ERK1/2, que por sua vez estimula canais de potássio ativados por voltagem, que diminuem a excitabilidade da membrana e a secreção hormonal, independente do núcleo (7, 19).

Os mecanismos denominados não genômicas podem influenciar potencialmente a expressão gênica. O início da via de ação é não genômica, por dependerem de vias alternativas, mas as consequências incluem aumento da transcrição (15). Isto demonstra que pode haver uma inter-relação entre os eventos genômicas e não genômicas de ação dos HT.

Os HT podem ativar a transcrição gênica de um gene alvo de forma direta ou indireta por meio da ação clássica ou não clássica. Estudos realizados por Moeller *et al.* (18) com fibroblastos humanos demonstram o aumento da expressão dos genes HIF-1 α , GLUT1, fosfofrutoquinase (PFKP) e transportador de mocarboxilato (MCT4) pelo T3. Eles associaram ao T3 a ciclohexamida

(CHX), inibidor de síntese proteica, com o uso dessa droga consegue-se definir se o HT age direta ou indiretamente na transcrição. Verificaram que a ação do T3 sobre HIF-1 α é direta, pois na presença de CHX a expressão gênica desse gene se manteve, não precisando de um gene precursor que traduzisse uma proteína que estimularia a expressão do HIF-1 α ; porém os genes GLUT1, PFKP e MCT4 tiveram sua expressão diminuída na presença de CHX. Para o GLUT1 já era esperado esse resultado, pois sua expressão depende do gene alvo HIF-1 α , que por sua vez é modulado por meio da via PI3K, ativada pelo T3 (18). A inibição do aumento da expressão de mRNA pelo T3 com a CHX indicam que os genes são indiretamente induzidos pelos HT, requerendo assim a síntese proteica anterior a expressão do gene alvo (Figura 4).

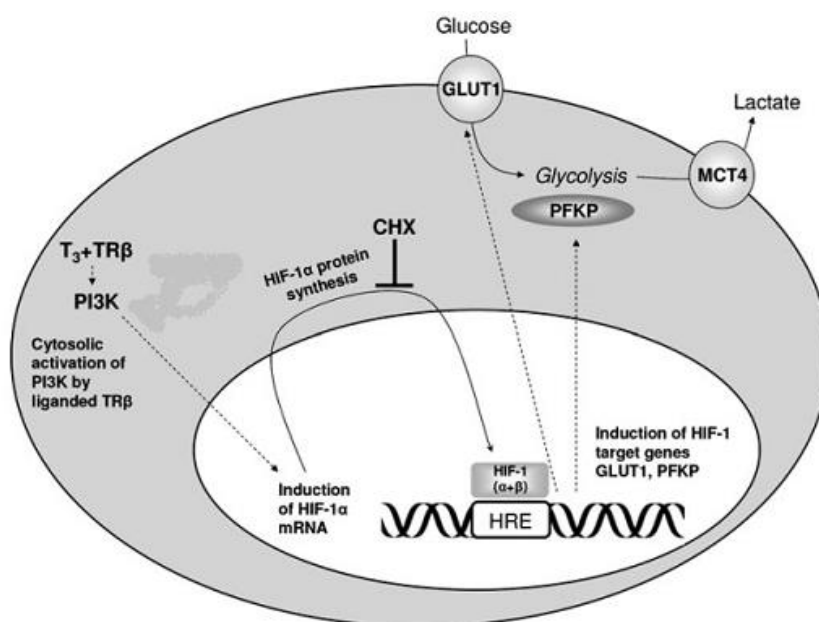


Figura 4. Indução dos genes, fator indutor de hipoxia (HIF1- α); GLUT1, transportador de glicose 1 fosfofrutoquinase (PFKP) e transportador de monocarboxilato (MCT4) pelo hormônio triiodotironina (T3). Ativação da fosfatidil inositol 3 quinase (PI3K) no citoplasma pelo T3 que se liga ao TR β modulando diretamente o gene HIF1- α que é traduzido (síntese proteica), e a proteína HIF1- α se liga ao elemento responsivo (HRE) localizado próximo a região promotora do gene alvo, assim o T3 age de forma indireta sobre a expressão gênica dos genes GLUT1, PFKP e MCT4. Com a administração de ciclohexamida (CHX) ocorre a inibição da ação indireta do T3. Adaptado de Moeller et al. (18).

1.2 Importância da via PI3K

A participação da via PI3K se faz importante em vários processos celulares, incluindo tráfego intracelular, organização de citoesqueleto, crescimento e transformação celular, e prevenção

de apoptose (20, 21). Além de ter um papel fundamental na diferenciação de diversas linhas celulares, incluindo os adipócitos (22,23).

A PI3K não é uma única enzima, mas sim uma família de diferentes subtipos. A família da PI3K é dividida em três diferentes classes (classe I, classe II e classe III) (24). Entre estas, a classe I da via PI3K é a melhor compreendida e pode ser dividida em dois grupos: classe IA (p110, p110 β e p110 δ) e Classe IB (p110 γ) (25).

A via PI3K é conhecido por interagir com o substrato do receptor de insulina (IRS) e é intimamente ligada com o supressor de tumor homólogo da fosfatase e tensina (PTEN), que inibe a PI3K. Quando o IRS é ativado pela insulina, ele ativa a PI3K e, então, regula a glicose por diversos eventos de fosforilação. Em detalhe, a PI3K ativa a fosforilação do grupo hidroxil na posição 3 do anel inositol da fosfatidilinositol (PtdIns) para produzir PtdIns(3,4,5)P₃, provindas da PtdIns(4,5)P₂ (26,27). A PtdIns(3,4,5)P₃ ativa um dos principais alvos da via PI3K, a proteína quinase B (Akt), para regular o crescimento e a migração celular. A ativação da Akt ocorre pela fosforilação de seu domínio regulatório carboxi-terminal, a mesma migra para o citoplasma e fosforila, ativa ou inibe outros alvos para regular a função celular. Uma vez ativada, a Akt fosforila diferentes substratos envolvidos na regulação de sobrevivência, crescimento, proliferação e metabolismo celular (28, 29, 30) (Fig. 5).

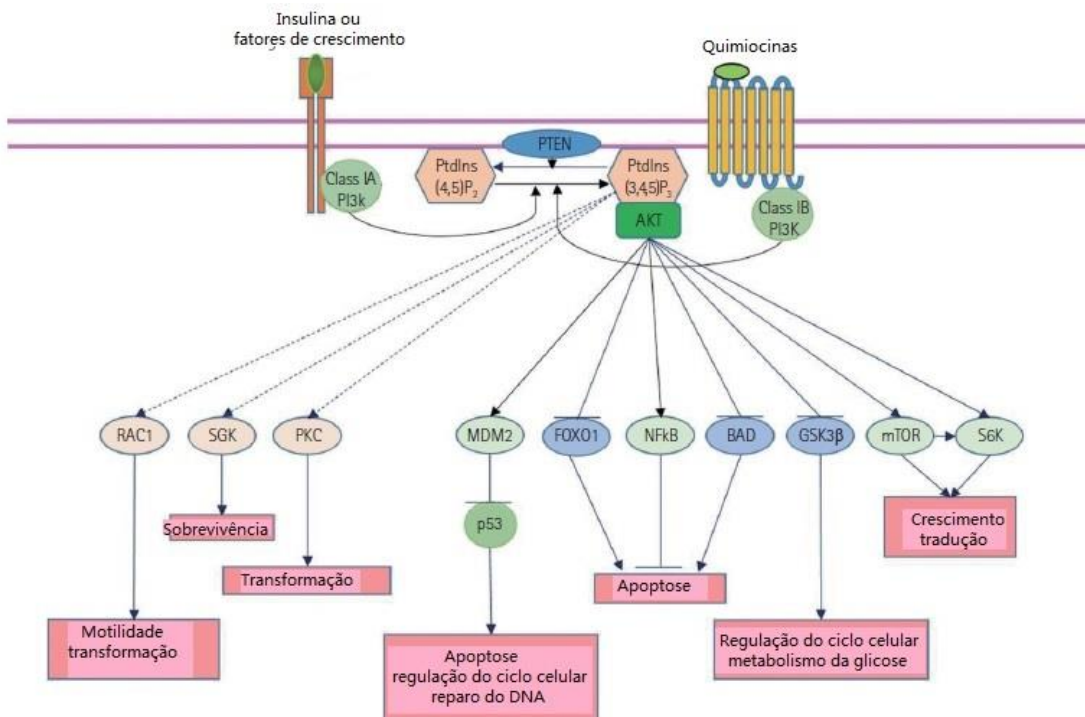


Figura 5. Papel celular da via fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K). Akt: protein kinase B, BAD: Bcl-2-associated death promoter, FOXO1: forkhead box protein O1, GSK3 β : glycogen synthase kinase 3 β , MDM2: mouse double minute 2 homolog, mTOR: mammalian target of rapamycin, NF- κ B: nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells, PKC: protein kinase C, PtdIns: phosphatidylinositol, PTEN: phosphatase and tensin homolog, RAC1: Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, SGK: serine/threonine-protein kinase, S6K: ribosomal protein S6 kinase.. Adaptado de Koh & Lo, 2015 (30).

O controle normal de ativação ou inibição da via de sinalização PI3K/Akt/ alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), em especial a ativação por fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), integra uma das respostas fisiológicas fundamentais para um envelhecimento saudável e longevidade (31), uma vez que regula metabolismo, crescimento e sobrevivência celular (29).

O hormônio tireoidiano T3 ativa a via PI3K, mas não está ligada à proliferação celular, e sim com o tráfico de certas proteínas intracelulares, como o tráfico de TR α do citoplasma para núcleo, e para a transcrição de genes específicos; porém T4 é incapaz de ativar a via PI3K (32).

A sinalização através da via PI3K é um evento necessário para a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos (adipogênese). A diminuição da atividade da via PI3K, por meio de uso de inibidores (wortmanina ou LY294002) demonstrou a diminuição da adipogênese (33, 34).

1.3 Adipogênese

Os adipócitos, precursores do TA, são essenciais para a regulação da homeostase energética, não só por servir como uma reserva de energia enorme, mas também, porque através da secreção de hormônios e citocinas afetam a ingestão de alimentos ou regulação metabólica (35, 36). Os adipócitos maduros não sofrem divisão celular, o número destas células aumenta do resultado da diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos maduros (35, 36). Estudos *in vitro*, com linhagens celulares que podem ser induzidas a se diferenciar em adipócitos proporcionaram a compreensão, especialmente a nível da transcrição, da diferenciação dos adipócitos (33).

A diferenciação dos adipócitos é regulada por hormônios, fatores de crescimento e citocinas; os componentes essenciais para diferenciação incluem adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP), insulina e glicocorticóides (37-40). A diferenciação pode ser caracterizada por alterações cronológicas da expressão de numerosos genes, incluindo, a lipase de lipoproteína (LPL), receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomas (PPAR- γ), transportador de glicose (GLUT4),

desidrogenase glicerol-3-fosfato (G3PDH) e a leptina, que aparecem durante as diferentes fases de diferenciação, levando a alterações características de morfologia e acúmulo de triglicerídeos no citoplasma (37, 39).

O modelo mais bem caracterizado para estudo de adipogênese, são os pré-adipócitos da linhagem celular 3T3-L1 (células oriundas de embriões de camundongos suíços extraídas prematuramente) (41).

O emprego de coquetéis estimulantes constituídos classicamente por insulina (Ins), dexametasona (Dex), 1-metil-3-isobutilxantina (IBMX) e soro fetal bovino (SFB) desencadeiam o processo de adipogênese (42).

A diferenciação dos adipócitos compreende estágios precisamente controlados: expansão clonal, parada do ciclo celular e diferenciação (eventos iniciais, intermediários e terminais), por meio da ativação de centenas de genes anteriormente silenciosos. A exposição de uma placa de pré-adipócitos 3T3-L1 confluentes ao coquetel adipogênico ativa receptores de glicocorticóides (pela dexametasona), receptor de IGF-1 (pela insulina) e a via de sinalização do cAMP (pelo IBMX, um inibidor de fosfodiesterases), o que leva à ativação dos eventos iniciais representados pela expressão das proteínas ligantes ao amplificador C/EBPs (*CCAAT/enhancer binding proteins*): C/EBP- β e C/EBP- δ . As células, então, reiniciam o ciclo celular, sofrem divisão celular de forma regulada (expansão clonal), saem permanentemente do processo de ciclo celular e entram em diferenciação terminal por ativação do PPAR γ ; o PPAR γ juntamente com o C/EBP- α , são dois reguladores centrais do processo adipogênico (43) (Fig. 6).



Figura 6. Modelo simplificado da adipogênese. Pré-adipócitos são induzidos para se diferenciar em adipócitos imaturos sob controle do PPAR γ principalmente, o qual também induz a expressão de C/EBP α . PPAR γ e C/EBP α

atuam coordenadamente para regular a conversão de adipócitos imaturos em adipócitos maduros. Retirada de Queiroz et al, 2009 (47).

Na confluência, os pré-adipócitos expressam os marcadores muito precoces de diferenciação, como LPL e colágeno tipo VI, a qual é induzida pelo contato célula-célula (45, 46). Após uma hora da adição do coquetel, ocorre a expressão transiente de proto-oncogenes *c-fos*, *c-jun* e *myc*, que dão início à mitose pós-confluente, importante para que ocorra o desenovelamento das hélices de DNA, permitindo o acesso de fatores de transcrição a elementos responsivos presentes em genes-alvos envolvidos na modulação do fenótipo do adipócito maduro, cuja expressão cessa entre duas e três horas depois do tratamento (47). C/EBP- β e - δ são os primeiros fatores de transcrição induzidos após a exposição das células ao coquetel de diferenciação - de forma que é postulado o fato de estarem diretamente envolvidos no processo de diferenciação, em resposta a indutores hormonais. A expressão do C/EBP- δ cessa após 48 horas, enquanto que o declínio do C/EBP- β é mais gradual - por volta do oitavo dia pós-diferenciação. C/EBP- β e C/EBP- δ ativam a expressão de PPAR γ , que é transcricionalmente induzida durante o segundo dia pós-indução da diferenciação, sendo máxima por volta do terceiro ou quarto dia. C/EBP- β e C/EBP- δ também induzem a expressão de C/EBP- α , que chega a expressão máxima entre o quarto e o quinto dia da diferenciação (48, 49). Uma vez ativados os reguladores centrais da adipogênese, C/EBP- α e PPAR γ , estes se autorregulam positivamente para se manter expressos, ou seja, retroalimentam a indução da sua própria expressão, apesar da redução da expressão de C/EBP- β e - δ (49) (Fig. 7).

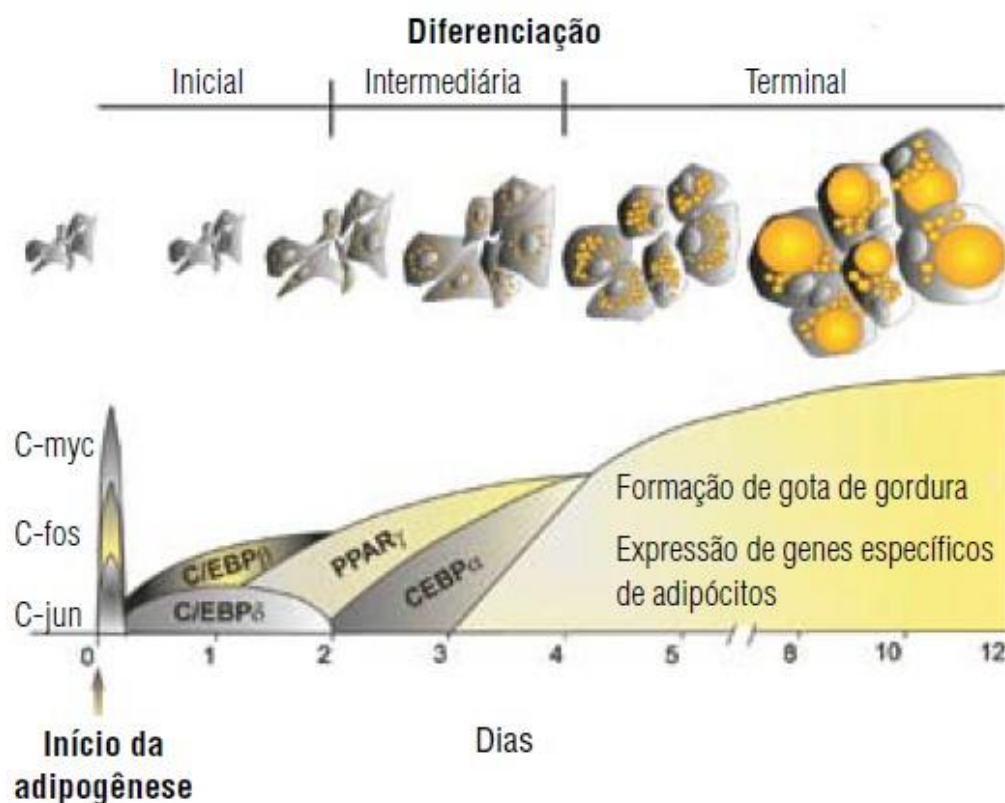


Figura 7. Diferenciação de adipócitos. Eventos da diferenciação dos adipócitos estão representados cronologicamente. As áreas demarcadas com os respectivos fatores de transcrição representam o período da expressão gênica durante a diferenciação. Os vários estágios da diferenciação (inicial, intermediária e terminal) também estão evidenciados. Na diferenciação terminal, quando ocorre a formação da gota de gordura, os genes $PPAR\gamma$ e $CEBP\alpha$ também são expressos. Uma vez ativados, esses dois fatores centrais da adipogênese regulam um ao outro positivamente, para manter sua expressão gênica, apesar da redução da expressão de $C/EBP\beta$ e δ . $C/EBP\alpha$ e $PPAR\gamma$ induzem a transcrição de muitos genes do adipócito, incluindo enzimas e proteínas envolvidas na geração e na manutenção do fenótipo dessa célula. Entretanto, embora ambos os fatores sejam importantes nos estágios tardios de diferenciação, eles não estão envolvidos no desenvolvimento inicial, pois não são expressos nesta fase. Adaptada de: Ntambi & Young-Cheul, 2000 (42).

$C/EBP-\alpha$ e $PPAR\gamma$ induzem transcrição de mais de uma centena de genes-alvos anteriormente silenciosos, incluindo enzimas e proteínas envolvidas na geração e na manutenção do fenótipo do adipócito, como aquelas envolvidas no transporte de glicose sensível à insulina, lipogênese, lipólise e síntese e secreção de adipocinas. Os dois fatores são críticos e decisivos para os estágios tardios de diferenciação de maneira cooperativa e sinérgica, mas não são expressos em altos níveis nos pré-adipócitos e não estão envolvidos no desenvolvimento inicial (50).

Em adição aos $C/EBPs$ e $PPAR\gamma$ (fatores integrados a uma rede transcricional controladora da adipogênese), outros fatores também regulam esse processo (43). Em roedores e humanos,

ácidos graxos de cadeia longa atuam no estágio inicial e induzem a formação dos adipócitos. A primeira evidência de que os ácidos graxos estão envolvidos na adipogênese foi obtida após purificação do principal componente adipogênico do soro fetal bovino, o ácido araquidônico (ARA, C20:4 ω -5). *In vitro*, o ARA é um fator adipogênico que atua no pré-adipócito como precursor de prostaciclina (51). O efeito adipogênico do ARA é parcialmente bloqueado por anticorpos inibidores de ciclo-oxigenase e antiprostaciclina adicionados ao meio de cultura, sendo este efeito reproduzido por carbaciclina, um análogo estável da prostaciclina (52).

Modificações no tamanho (diâmetro e volume) de adipócitos maduros ocorrem em resposta a ativação de suas ações metabólicas típicas, que são a lipogênese e a lipólise. Alterações, tais como modificações no tamanho (diâmetro e volume), de adipócitos maduros variam de acordo com a necessidade de incorporação ou liberação de lipídeos, que dependem, entre outros fatores, do estado nutricional do indivíduo, do seu gasto energético, da influência de hormônios (catabólicos ou anabólicos), da atividade de enzimas envolvidas nestes processos e da heterogeneidade característica existente entre os diversos grupamentos adiposos do organismo (53). Por outro lado, modificações no número de adipócitos (hiperplasia) dependem da diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos, que é o processo de adipogênese (35, 36).

1.4 Hormônios tireoidianos e tecido adiposo. Efeito nas adipocinas, leptina e adiponectina

O TA é um alvo importante para os HT, influenciando o metabolismo e desenvolvimento, por meio da modulação da proliferação e diferenciação de adipócitos (1), principalmente o T3. De acordo com Yen *et al.* (1) e Hernandez & Obregon (54) pelo fato do TA, tanto branco quanto o marrom expressarem os TR, α e β , são suscetíveis a ação dos HT, sendo TR α 1 a isoforma predominante (54, 55).

O TA é especializado no transporte, na síntese, armazenamento e mobilização de lipídios. A sua função principal é o armazenamento de energia sob a forma de triglicerídeos, o que constitui um reservatório de energia a ser usado em tempos de privação calórica (56); além de segregar hormônios denominados, quimiocinas e citocinas (comumente referido como adipocinas) que são importantes como parácrino /endócrino reguladores (57).

A leptina e a adiponectina são adipocinas sintetizadas e secretadas pelo TA. A leptina atua principalmente no sistema nervoso central, exercendo efeito anorexígeno, estimulando o gasto energético (58). A adiponectina está envolvida em importantes efeitos metabólicos, como estimulação da oxidação de ácidos graxos, redução da gliconeogênese e aumento da termogênese (24). Ambas as adipocinas possuem efeitos comuns aos dos HT.

Vários autores sugerem que o estado tireoidiano em seres humanos (60,61) e roedores (62) pode regular a produção de leptina e adiponectina, apesar de existir muita divergência na literatura.

Viguerie *et al.* (63) mostraram, por microarray, que 19 genes do TA branco em humanos são regulados pelo HT. Esses genes dão origem a proteínas envolvidas na transdução de sinais, metabolismo de lipídios, apoptose e respostas inflamatórias. Os HT inibem a proliferação e estimulam a diferenciação dos adipócitos, regulam o metabolismo de lipídeos pela regulação positiva da expressão de enzimas lipolíticas, aumentam o consumo de oxigênio e modulam a sensibilidade do tecido a outros hormônios (63).

Desde que foi descoberto que a leptina aumenta a taxa metabólica basal (TMB), vários estudos têm procurado relacioná-la com os HT (64). A relação entre leptina e HT foi evidenciada durante restrição alimentar, onde atividade da tireoide cai levando a redução do gasto energético. A secreção de leptina também diminuiu com a restrição de alimentos, sugerindo que a leptina e a tireoide podem responder paralelamente (65).

Estudo do nosso grupo mostrou que a administração de dose fisiológica de T3 em ratos obesos submetidos à restrição alimentar aumentou a expressão de leptina no TA (66). Contudo, a metodologia desse estudo não permitiu verificar se os HT agem diretamente sobre o TA modulando a expressão de leptina.

Um estudo realizado por Kautzky-Willer *et al.* (67) demonstrou que a concentração plasmática de leptina estava aumentada em pacientes obesos com hipotireoidismo, comparado a obesos com hipertireoidismo, apesar de graus semelhantes de obesidade e massa de gordura corpórea. Assim, a elevação plasmática de leptina parece caracterizar pacientes obesos com hipotireoidismo, e não somente reflete mudanças no peso corporal, secundário ao problema tireoidiano.

Escobar-Morreale *et al.* (68), em seu estudo com ratas tireodectomizadas, demonstraram que a infusão de T3 ou T4 levou a diminuição dos níveis séricos de leptina nesses animais, concluindo que os HT exercem um efeito inibitório sobre as concentrações circulantes de leptina nesses animais. Por outro lado, Yoshida *et al.* (69) demonstraram, *in vitro*, que o T3 aumentou significativamente a expressão de mRNA de leptina e elevou os níveis de secreção desta proteína em adipócitos, 3T3-L1. Segundo Yoshida *et al.* (70), concentrações fisiológicas de T3 aumentam a expressão de mRNA e secreção de leptina nestas células; estes resultados sugerem que concentrações fisiológicas de HT são necessários para a secreção apropriada de leptina.

No que concerne a adiponectina, alguns estudos sugerem que a função tireoidiana exerce influência sobre seus níveis séricos, relatando que a concentração desta adipocina apresentou-se mais elevada no hipertireoidismo não tratado, em relação ao eutireoidismo e ao hipotireoidismo (60, 61). Cabanelas *et al.* (71) concluíram em seus estudos que os HT regulam de forma tecido específica a expressão de mRNA de adiponectina, sem alterar a sua secreção no tecido adiposo branco de ratos.

Aragão *et al.* (72) demonstraram que em ratos a concentração de adiponectina estava aumentada em animais hipertireoideos, mas não apresentava alterações nos animais hipotireoideos, por outro lado Kokkinos *et al.* (62), demonstraram resultado inverso, os animais hipotireoideos apresentavam concentrações elevadas de adiponectina, enquanto os animais hipertireoideos não apresentaram mudanças.

Em cultura de TA marrom de camundongos, observou-se o estímulo na secreção e na expressão da adiponectina, após tratamento com T3 na concentração de 1 μ M (73). Entretanto, em estudo *in vitro*, realizado com linhagem celular de adipócitos 3T3-L1, não houve alteração

significativa da expressão do mRNA da adiponectina em função da administração de T3, na concentração de 1 μ M com exposição das células por 16 horas na presença do hormônio (74).

Em estudos recentes realizados por nosso grupo com cultura celular de adipócitos, 3T3-L1, verificamos que diferentes doses de T3 modulam a expressão de mRNA de TR α , (75,76) leptina e adiponectina (77,78), aumentando ou diminuindo a expressão desses genes dependendo da dose e tempo de incubação.

Pelo fato da via PI3K participar de vários processos celulares, incluindo a diferenciação dos adipócitos, além de que alguns estudos demonstram sua ativação pelo T3 para modulação de genes específicos, a mesma foi foco de pesquisa de nosso trabalho. Com base em nossos estudos anteriores determinamos o tempo de incubação de uma hora (1h) com T3 para avaliar a participação da via PI3K na modulação da leptina, adiponectina e TR α e conforme Yoshida *et al.* (69) estabelecemos a dose de 10nM como fisiológica e acima dessa dose como supra fisiológica.

Definir a via de ação do T3 sobre as adipocinas em adipócitos, especificando a via de ação se faz importante, pois pode-se pensar em uma aplicação clínica usando o hormônio tireoidiano para ativar as vias de ação ou seus receptores que ativarão rapidamente a expressão da leptina ou adiponectina e estas irão exercer suas funções sobre o balanço energético, podendo levar a perda de peso na obesidade.

2 Hipótese

Diferentes doses de T3, fisiológica e supra fisiológica, elevam a expressão gênica de leptina, adiponectina e TR α , após uma hora de tratamento por meio da via PI3K em cultura celular de adipócitos.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

O objetivo desse trabalho foi avaliar se ocorre ação de diferentes doses de T3 nas adipocinas leptina e adiponectina, e no receptor TR α em uma hora de tratamento por meio da via PI3K.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar se ocorre ação do T3 no nível de transcrito do mRNA de adiponectina com participação da via PI3K.
- Avaliar se ocorre ação do T3 no nível de transcrito do mRNA de TR α com participação da via PI3K.
- Avaliar se ocorre ação do T3 na expressão gênica da leptina com participação da via PI3K.

4 Resultados

4.1 Manuscrito 1

T3 supraphysiological dose and PI3K deactivation up-regulated adiponectin gene expression in adipocytes, 3T3-L1

Dose supra fisiológica de T3 ou desativação da via PI3K aumentam a expressão do gene adiponectina em adipócitos, 3T3-L1

Miriane de Oliveira¹, Maria Teresa De Sibio¹, Regiane Marques Castro Olimpio¹, Fernanda Cristina Fontes Moretto¹, Célia Regina Nogueira¹.

¹Department of Internal Clinic, Botucatu Medicine School, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil

Corresponding Author:

Miriane de Oliveira

Botucatu Medical School, São Paulo State University - UNESP

Distrito de Rubião Jr s/n, Botucatu, SP, Brazil, 18618-000

Telephone: (55) 14 3881 6213

Fax: (55) 14 3881 6424

E-mail: miriane.deoliveira@yahoo.com.br

Manuscrito formatado de acordo com as normas da revista Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia.

Resumo

Objetivo: O objetivo do presente estudo foi analisar os efeitos do hormônio tireoidiano (HT), triiodotironina (T3), na modulação da expressão de mRNA da adiponectina e o envolvimento da via de sinalização fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) em adipócitos, 3T3-L1. **Materiais e métodos:** Foi examinado o envolvimento da via PI3K nos efeitos do T3 nos tratamentos de adipócitos, 3T3-L1 nas doses fisiológica (P = 10nM) ou suprafisiológica (SII = 1000 nM) durante uma hora (tempo curto), na ausência ou na presença do inibidor da PI3K (LY294002). A ausência de qualquer tratamento foi considerada o grupo controle (C). RT-qPCR foi utilizado para analisar a expressão do mRNA. Para as análises dos dados, utilizou-se ANOVA complementada com o teste de Tukey a 5% de significância. **Resultados:** T3 não modulou a expressão de mRNA de adiponectina em P ($0,85 \pm 0,04$, $p > 0,05$), mas elevou a expressão em SII ($2,87 \pm 0,11$, $p < 0,001$) em comparação com o grupo C ($1 \pm 0,22$). Este aumento em SII, foi afetado pelo LY294002 ($3,55 \pm 0,48$, $p < 0,05$). Curiosamente, a inibição da via PI3K demonstrou aumentar os níveis de adiponectina independentes de T3. Para examinar se a adiponectina está diretamente ou indiretamente aumentada pelo T3, foi utilizado o ciclohexamida (CHX), inibidor da tradução. Em SII a presença de CHX anulou completamente os níveis de mRNA de adiponectina ($0,69 \pm 0,09$, $p > 0,001$) aumentados pelo T3. **Conclusão:** Esses resultados demonstram que a ativação da via de sinalização de PI3K não é necessária na expressão do gene adiponectina mediada indiretamente pelo T3, em adipócitos, 3T3-L1. Porém, está envolvida na modulação desse gene independente do T3.

Palavras-chave

Triiodotironina; adipócitos; adiponectina; PI3K

Abstract

Objective: The present study aimed to examine the effects of thyroid hormone (TH), triiodothyronine (T3), on the modulation of adiponectin mRNA expression and the involvement of the phosphatidyl inositol 3 kinase (PI3K) signaling pathway in adipocytes, 3T3-L1, cell culture.

Materials and methods: We examined the involvement of this pathway in mediating TH effects by treating 3T3-L1 adipocytes with physiological (P=10nM) or supraphysiological (SII=1000 nM) T3 dose during one hour (short time), in the absence or the presence of PI3K inhibitor (LY294002). The absence of any treatment was considered the control group (C). RT-qPCR was used for mRNA expression analyzes. For data analyzes ANOVA complemented with Tukey's test was used at 5% significance.

Results: T3 no modulate adiponectin mRNA expression in P (0.85 ± 0.04 , $p > 0.05$), but increased expression in SII (2.87 ± 0.11 , $p < 0.001$) compared to C group (1 ± 0.22). This increase in SII was affected by LY294002 (3.55 ± 0.48 , $p < 0.05$). Interestingly, the inhibition of PI3K pathway demonstrated raise adiponectin levels independent of T3. To examine whether adiponectin is directly or indirectly induced by T3, we used the translation inhibitor cycloheximide (CHX). In SII the presence of CHX completely abrogated the levels mRNA adiponectin (0.69 ± 0.09 , $p > 0.001$) increased by T3.

Conclusion: These results demonstrate that the activation of the PI3K signaling pathway no is necessary in T3-mediated indirect adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. However, it is involved in the modulation of this gene independent of T3.

Keywords

Triiodothyronine; adipocytes; adiponectin; PI3K

Introduction

Thyroid hormones (TH), especially triiodothyronine (T3), is indeed an important determinant of energy expenditure and contributes to appetite regulation. On the other hand, secretory products from the adipose tissue (AT), hormones, chemokines and adipokines, act on the central nervous system to inform on the quantity of energy stores, and this may have an impact on the activity of the hypothalamus–pituitary–thyroid axis (1)

T3 modulate the proliferation and differentiation of adipocytes (2), which making up the AT, and are involved in cellular processes such as signal transduction, apoptosis, and inflammatory response. The adiponectin is an adipokine synthesized and secreted by the AT, expressed exclusively in differentiated adipocytes, and is involved in important metabolic effects, such as stimulating fatty acid oxidation, reducing gluconeogenesis and increasing thermogenesis (3-6).

The interaction between TH and adiponectin concentration remains unclear, with one study having shown that therapy to normalize hyperthyroidism significantly reduced circulating adiponectin levels (7) and another that did not find any alteration (8).

Previous studies, with cell culture, by our group showed that supraphysiological T3 dose increased adiponectin mRNA in minutes or hours (9). In other studies from our group showed that T3 supraphysiological dose decreases adiponectin mRNA expression in obese animals subjected to diet restriction (10).

The concept regarding the TH action has been diversified, including non-classical actions of T3 and thyroxine (T4). T3 has been shown as an activator of the phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K), which leads to an increase in certain genes, such as Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1 α), calcineurin inhibitor (ZAKI-4 α) (11, 12) and leptin (13).

The relationship between TH and adiponectin is controversial and scarcely addressed. Hence, the present study assessed the effect of physiological and supraphysiological T3 dose in adiponectin mRNA expression levels at 3T3-L1, adipocytes culture, after one hour of treatment. We have evaluated the influence of protein synthesis in the adiponectin transcription rate regulated by T3 using the translation inhibitor cycloheximide (CHX). LY294002 was used to check if the non-classical pathway (PI3K) was involved in the T3 action in the adiponectin mRNA levels. We have found that the activation of the PI3K signaling pathway, by supraphysiological T3 dose, no has a role in TH-mediated indirect adiponectin gene expression and inhibition this pathway elevated adiponectin mRNA levels in 3T3-L1 adipocytes.

Materials and Methods

Chemicals

Isobutylmethylxanthine (IBMX), dexamethasone, insulin, cycloheximide (CHX), triiodothyronine (T3), LY294002 (LY), Dimethyl Sulfoxide (DMSO), Sodium hydroxide (NaOH) and Charcoal Stripped fetal bovine serum (FBS) were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum and Antibiotic-Antimycotic 100X solution were purchased from Gibco BRL (Grand Island, NY, USA).

Cell culture and differentiation

For the in vitro study, the 3T3-L1 cell line was used as described previously by de Oliveira and cols. (13). After cell confluence, the differentiation process was initiated by culture for 3 days in DMEM containing 10% FBS, 0.5 mM IBMX, 1mM dexamethasone, and 1mg/ml insulin. After this period, the cells were maintained for 7 days in DMEM containing 10% FBS and 1mg/ml insulin. Following the period of cell differentiation, the adipocytes were subjected to hormone depletion for 24 h in DMEM supplemented with charcoal-stripped fetal serum. Subsequently, the cells were treated with: either physiological T3 dose (10 nM, named P group) or supraphysiological T3 dose (1000 nM, named SII group) during one hour (1h). A non-treated group, only 0.1% NaOH (diluent T3), was used as control (C). For the one-hour time period, it was also formed groups of P and SII added with CHX (10µg/ml) (12) and groups that were added with LY (50µM) (12). The inhibitors LY294002 and CHX were added to the medium 1 h before T3 treatment.

Oil red O staining

After 10 days of differentiation, the cells were washed twice with PBS, fixed with 37% formaldehyde for 30 min at room temperature, and then washed twice more with PBS. After fixation, the cells were stained for 2 h at room temperature with Oil red O solution (5%, Sigma-Aldrich, St. Louis USA) and then washed twice with distilled water (Sigma-Aldrich Co., LLC). The cell differentiation was evaluated by the presence of lipid droplets stained with Oil Red O positive as previously described (13).

Gene expression

Total RNA was extracted from 3T3-L1 cells by Trizol (Invitrogen) method, according to the manufacturer's instructions. The High Capacity cDNA reverse transcription kit for RT-PCR® (Invitrogen, São Paulo, Brazil) was used for the synthesis of 20 µL complementary DNA (cDNA) from 1000 ng of whole RNA. Adiponectin (assay Mm00456425_m1 - Applied Biosystems) levels were determined by RT-qPCR. Quantitative measurements were made in the "Applied Biosystems StepOne Plus" detection system using the TaqMan qPCR commercial kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Cycling conditions were as follows: enzyme activation at 50°C during 2 min, denaturation at 95°C during 10 min, cDNA products were amplified during 40 cycles of denaturation at 95°C during 15 s and annealing/extension at 60°C during 1 min. Gene expression was quantified in relation to the values of the C group after normalization by an internal control, cyclophilin (Mm00434759_m1), by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, as previously described (14)

Statistical analysis

Gene expression was analyzed using the analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation. The significance level was set at 5%.

Results

3T3-L1 cell culture and differentiation

As described previously by de Oliveira and cols. (13), the cell differentiation, whose main characteristic is the presence of a great amount of cytoplasmic lipid droplets, was evaluated by the presence of lipid droplets stained with Oil Red.

Adiponectin mRNA levels modulated by supraphysiological dose T3 after one hour of incubation

Figure 2 shows that T3 increased the levels of adiponectin mRNA in 3T3-L1 adipocytes in SII if compared to the C group after one hour of incubation.

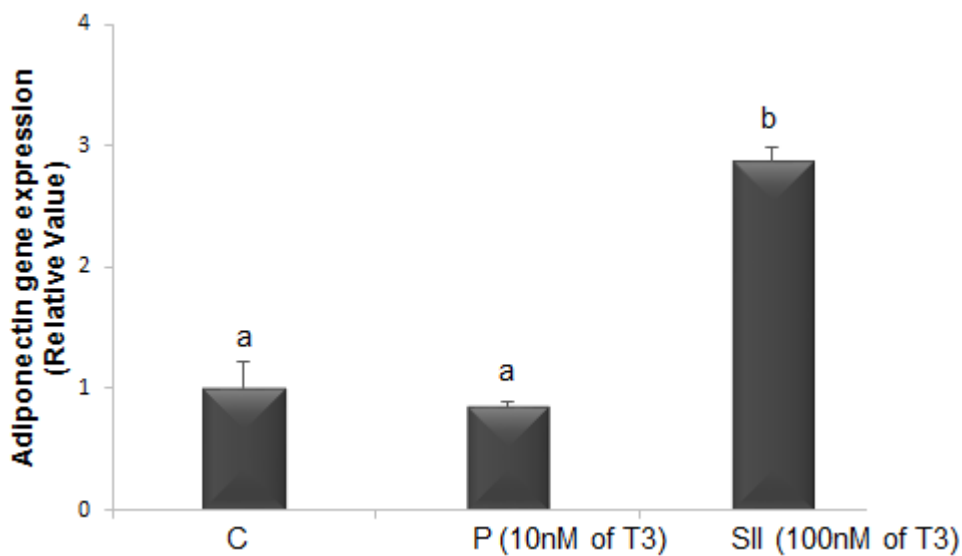


Figure 1. Dose-response for T3 effects upon adiponectin mRNA expression and protein in 1h. P =10 nM T3, SII = 1000 nM C = without T3. A) T3 effects in adiponectin mRNA expression by 10 nM and 1000 nM doses. Data expressed in average and standard deviation (ANOVA supplemented with Tukey's test). Similar letters indicate that there was no statistical difference, and different letters indicate that there was a statistical difference at $p < 0.05$. Assays were performed in triplicate ($n = 3$ for each treatment).

The increase of Adiponectin mRNA induced by T3 action is no sensitive to LY294002

In order to check if PI3K pathway is involved in the mediation of adiponectin mRNA expression, before incubation with T3, group SII was treated with a PI3K inhibitor (LY294002), during one hour. Figure 2 shows that the treatment with LY no altered adiponectin gene expression in SII, but LY group elevated adiponectin level when compared to C.

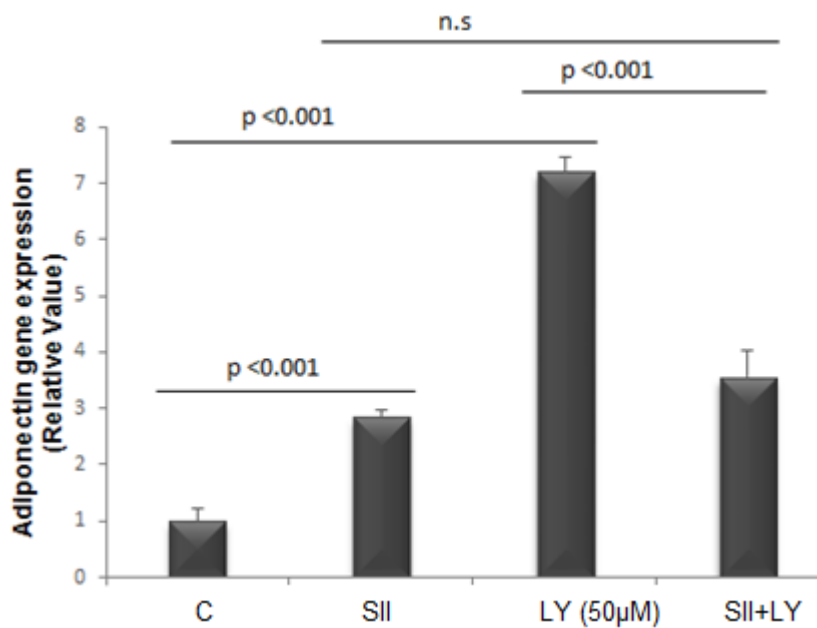


Figure 2. T3 influence (1000 nM) on adiponectin gene expression in the presence/absence of LY in one hour. SII = 1000 nM T3, C = no T3, and LY = 50 µM LY294002. ANOVA with Tukey's test. ns =non-significant; n = 3 per treatment.

Effects of the protein synthesis inhibition upon the modulation of T3 induced adiponectin mRNA levels

3T3-L1 adipocytes were cultured with T3 at dose that influenced adiponectin mRNA levels to determine the need for protein synthesis during one hour exposure. CHX was added to the SII group. The addition of CHX to the SII group demonstrated complete abrogation of the T3-induced mRNA increase by CHX indicates that the adiponectin gene is indirectly induced by TH and requires prior protein synthesis (Figure 3). However, CHX alone had significant influence on adiponectin mRNA levels.

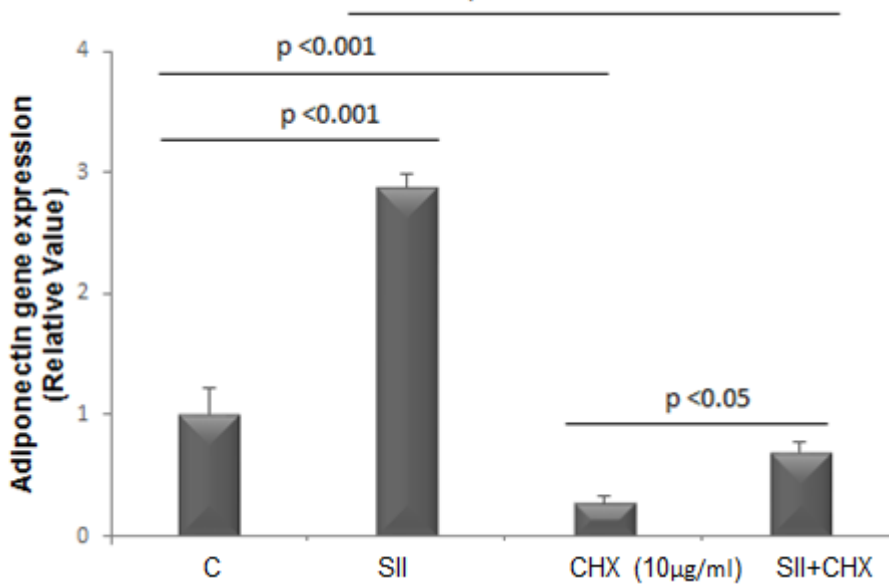


Figure 3. T3 influence (1000 nM) on adiponectin gene expression in the presence/absence of CHX in one hour. SII= 1000 nM T3, C = no T3, and CHX = 10 µg/mL. ANOVA with Tukey's test. n.s. = non-significant; n = 3 per treatment.

Discussion

Adiponectin is secreted exclusively by adipocytes. Although the details on all factors regulating their synthesis, secretion and clearance is not entirely known, plasma adiponectin levels decrease with weight gain (15); and is involved in the regulation of energy balance, just like TH(16).

Studies from our group showed that a T3 physiological and supraphysiological dose, at different times, modulated adiponectin in adipocytes, 3T3-L1 (9), and these results suggest that T3 has rapid effects.

In this study, we evaluated AT responses to different T3 levels based on adiponectin mRNA expression without interference from systemic factors that occur *in vivo*, for one hour. As an experimental model, we used 3T3-L1 cells that were differentiated *in vitro* into adipocytes. These cells represent a well established adipogenesis model (17) and adiponectin mRNA levels was quantified using RT-qPCR.

Adiponectin augments sensitivity to insulin and has antiatherogenic and anti-inflammatory properties (18, 19). A prior study of rats with hyperthyroidism found an increase in the serum

adiponectin concentration (20). In humans, hyperthyroidism has been associated with both similar (8, 21) and elevated adiponectin concentrations (22, 23). In the study of Luvizotto and cols. (24), the supraphysiological dose of 50 fold greater (25µg of T3/100g animal body weight) than physiological dose (0.5µg of T3/100g animal body weight), significantly reduced adiponectin gene expression and serum levels in obese rats, administered every day for the last 2 weeks of the study. In the present study with adipocytes, 3T3-L1, we found that administration of 1000 nM T3 dose, 100 fold greater than dose administered to the group P (10nM), increase adiponectin gene expression in SII group. To the best of our knowledge, our findings are the first to show that TH, at the dose of 1000 nM increase adiponectin gene expression, *in vitro*, suggesting that TH modulates adiponectin expression in supraphysiological dose in one hour.

TH may function through other mechanisms than TH receptors (TR)/TH responsive elements (TRE) (11). Alternative mechanisms may be referred as a non-classical or non-genomic because initiation sites are located in the plasma membrane, such as activation of $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin, or the cytoplasm where TH may activate mitogen-activated protein (MAPK) or the phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K) pathway. Initiation sites are proteins that are characterized as iodothyronine receptors (12, 25). PI3K participates in a wide variety of cellular process, including intracellular trafficking, organization of the cytoskeleton, cell growth and transformation, and prevention of apoptosis (26, 27). PI3K has a role in differentiation of several cell lines (28), including adipocytes.

In this study, we used the LY294002 inhibitor to evaluate the need for PI3K pathway activation in modulating adiponectin mRNA by T3 during a one hour period. Within the one hour period, T3 no change adiponectin mRNA expression in P (Figure 1). The inhibition this pathway in SII no affected, significantly, T3 action (Figure 2B, proving that pathway activation is not necessary for T3 to increase adiponectin levels. However, the inhibition of PI3K, with LY294002, increased basal adiponectin mRNA expression, demonstrating a need this pathway to adiponectin mRNA expression in normal cell condition. Aubin and cols. (28) used wortmannin, other PI3K pathway inhibitor, in human preadipocytes, and found significant inhibition in triacylglycerol accumulation and in the induction of fatty acid synthase protein expression was observed, but on adiponectin a nonsignificant trend toward increased expression was observed.

In addition, inhibition of protein synthesis with CHX completely blocked T3-induced increase in adiponectin mRNA levels into SII group (Figure 3), showing that it is a gene indirectly up regulated by T3, depending on the synthesis of a yet unknown protein. Moreover, CHX group

(without T3) compared with control group decreases the basal levels of adiponectin mRNA, indicating the existence of certain short-lived proteins essential for the expression of this gene in normal conditions.

In summary, these data suggest that supraphysiological dose of T3 increase adiponectin mRNA expression after one hour of incubation. After one hour of T3 treatment, there is an indirect increase in adiponectin levels when using 1000nM dose. Since adiponectin is an important antiatherogenic and anti-inflammatory and it was observed that it is modulated by T3 and increase expression when deactivation of PI3K cytosolic pathway, the understanding of its mechanism of action is of utter importance.

References

1. Duntas LH & Biondi B. The interconnections between obesity, thyroid function, and autoimmunity: the multifold role of leptin. *Thyroid* 2013 23 646–653.
2. Darimont C, Gaillard D, Ailhaud G, Negrel R. Terminal differentiation of mouse preadipocyte cells: adipogenic and antimitogenic role of triiodothyronine. *Mol Cell Endocrinol.* 1993; 98(1):67-73.
3. Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, et al. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98(4):2005-10.
4. Tomas E, Tsao TS, Saha AK, Murrey HE, Zhang CC, Itani SI, et al. Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99(25):16309-13.
5. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein Kinase. *Nat Med.* 2002; 8(11):1288-95.

6. Qi Y, Takahashi N, Hileman SM, Patel HR, Berg AH, Pajvani UB, et al. Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. *Nat Med.* 2004; 10(5):524-9. Erratum in: *Nat Med.* 2004; 10(6):649.
7. Saito T , Kawano T , Saito T , Ikoma A , Namai K , Tamemoto H , Kawakami M, Ishikawa SE . Elevations of serum adiponectin levels in Basedow disease. *Metabolism.* 2005; 54: 1461 – 1466
8. Iglesias P, Alvarez FP, Codoceo R, Díez JJ. Serum concentrations of adipocytokines in patients with hyperthyroidism and hypothyroidism before and after control of thyroid function . *Clin Endocrinol (Oxf).* 2003; 59: 621 – 629
9. Oliveira Md, de SÍbio MT, Olimpio RM, Moretto FC, Luvizotto Rde A, Nogueira CR. Triiodothyronine modulates the expression of leptin and adiponectin in 3T3-L1 adipocytes. *Einstein (Sao Paulo).* 2015;13(1):72-8.
10. Luvizotto RA, Conde SJ, SÍbio MT, Nascimento AF, Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, et al. Administration of physiologic levels of triiodothyronine increases leptin expression in calorie-restricted obese rats, but does not influence weight loss. *Metabolism.* 2010;59(1):1-6.
11. Moeller LC, Broecker-Preuss M. Transcriptional regulation by non-classical action of thyroid hormone. *Thyroid Res.* 2011; 4 Suppl 1: S6.
12. Moeller LC, Dumitrescu AM, Refetoff S (2005) Cytosolic action of thyroid hormone leads to induction of hypoxia-inducible factor-1alpha and glycolytic genes. *Mol Endocrinol* 19: 2955-2963.
13. de Oliveira M, Luvizotto Rde A, Olimpio RM, De Sibio MT, Conde SJ, Biz Rodrigues Silva C, et al. Triiodothyronine increases mRNA and protein leptin levels in short time in 3T3-L1 adipocytes by PI3K pathway activation. *PLoS One.* 2013; 18; 8(9):e74856.
14. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; 25: 402-408.

15. Gray SL, Vidal-Puig AJ. Adipose tissue expandability in the maintenance of metabolic homeostasis. *Nutr Rev.* 2007;65(6 Pt 2):S7-12.
16. Vendrell J, Broch M, Vilarrasa N, Molina A, Gómez JM, Gutiérrez C, et al. Resistin, adiponectin, ghrelin, leptin, and pro inflammatory cytokines: relationships in obesity. *Obes Res.* 2004;12(6):962-71.
17. Green H, Meuth M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell.* 1974; 3: 127-133.
18. Goldstein BJ, Scalia R. Adipokines and vascular disease in diabetes. *Curr Diab Rep.* 2007; 7: 25 – 33.
19. Ouchi N , Kihara S , Arita Y , Okamoto Y , Maeda K , Kuriyama H , Hotta K, Nishida M , Takahashi M , Muraguchi M , Ohmoto Y , Nakamura T , Yamashita S , Funahashi T, Matsuzawa Y . Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation.* 2000; 102 : 1296 – 1301
20. Aragao CN, Souza LL, Cabanelas A, Oliveira KJ, Pazos-Moura CC. Effect of experimental hypo- and hyperthyroidism on serum adiponectin. *Metabolism.* 2007; 56: 6 – 11
21. Santini F, Marsili A, Mammoli C, Valeriano R, Scartabelli G, Pelosini C, Giannetti M, Centoni R, Vitti P, Pinchera A. Serum concentrations of adiponectin and leptin in patients with thyroid dysfunctions. *J Endocrinol Invest* 2004; 27: RC5 – RC7
22. Yaturu S, Prado S, Grimes SR. Changes in adipocyte hormones leptin, resistin, and adiponectin in thyroid dysfunction. *J Cell Biochem* 2004; 93: 491 – 496
23. Saito T, Kawano T, Saito T, Ikoma A, Namai K, Tamemoto H, Kawakami M, Ishikawa SE. Elevations of serum adiponectin levels in Basedow disease. *Metabolism* 2005; 54: 1461 – 1466

24. Luvizotto RDAM, Nascimento AFD, SÍbio MTD, Olímpio RMC, Conde SJ, et al. Experimental Hyperthyroidism Decreases Gene Expression and Serum Levels of Adipokines. *Obesity. Scientific World Journal*. 2012; 2012:780890. doi: 10.1100/2012/780890.
25. Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev*. 2010; 31:139-70.
26. Toker A, Cantley LC. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature*. 1997; 387:673-6.
27. Vanhaesebroeck B, Leervers SJ, Panayotou G, Waterfield MD. Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci*. 1997; 22:267-72.
28. Aubin D, Gagnon A, Sorisky A. Phosphoinositide 3-kinase is required for human adipocyte differentiation in culture. *Int J Obes*. 2005; 29:1006-9.

Acknowledgments

We are grateful to Sueli A. Clara, Jose C. Georgete, Mario B. Bruno, Camila R. C. Camacho and Keize Nagamati Junior for their technical support. We thank CAPES and Fapesp (# 2010/16911-4) for financial support. The authors declare no conflicts of interest in the present study.

Funding

This work was supported by Sao Paulo Research Foundation (Fapesp), process number 2010/16911-4, and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

Disclosure

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

4.2 Resumos

Manuscrito 2: Efeitos rápidos da triiodotironina no receptor de hormônio tireoidiano alfa pela via PI3K em adipócitos, 3T3-L1

Objetivo: O objetivo do presente estudo foi analisar os efeitos do hormônio tireoidiano (HT), triiodotironina (T3), na modulação da expressão de mRNA do receptor alfa ($TR\alpha$) de HT e o envolvimento da via de sinalização da via fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) em adipócitos, 3T3-L1. **Materiais e métodos:** Foi examinado o envolvimento da via PI3K nos efeitos do T3 nos tratamentos de adipócitos, 3T3-L1, nas doses fisiológica ($P = 10\text{nM}$) ou suprafisiológica ($SI = 100\text{nM}$) durante uma hora (tempo curto), na ausência ou na presença do inibidor da PI3K (LY294002). A ausência de qualquer tratamento foi considerada o grupo controle (C). RT-qPCR foi utilizado para analisar a expressão do mRNA. Para as análises dos dados, utilizou-se ANOVA complementada com o teste de Tukey a 5% de significância. **Resultados:** O T3 aumentou a expressão de mRNA de $TR\alpha$ em P ($1,91 \pm 0,13$, $p < 0,001$) e SI ($2,14 \pm 0,44$, $p < 0,001$) em comparação com o grupo C ($1 \pm 0,08$). Esse aumento foi completamente abolido por LY294002 em P ($0,53 \pm 0,03$, $p < 0,001$) e SI ($0,31 \pm 0,03$, $p < 0,001$). Para examinar se a expressão de $TR\alpha$ foi diretamente induzida pelo T3, utilizou-se o inibidor de tradução, ciclohexamida (CHX). A presença de CHX reduziu os níveis de mRNA de $TR\alpha$ em P ($1,15 \pm 0,05$, $p > 0,001$) e SI ($0,99 \pm 0,15$, $p > 0,001$), induzidos pelo T3. **Conclusão:** Esses resultados demonstram que a ativação da via de sinalização de PI3K tem um papel importante na expressão do gene $TR\alpha$ mediada indiretamente pelo T3, em adipócitos 3T3-L1.

Palavras Chave

Triiodotironina; adipocitos; $TR\alpha$; PI3K

Manuscrito completo no **ANEXO 1**

Manuscrito 3: Triiodotironina aumenta os níveis de mRNA e proteína da leptina em curto período de tempo pela ativação da via PI3K em adipócitos, 3T3-L1

O presente estudo teve como objetivo analisar os efeitos do hormônio da tireoide (TH), mais precisamente a triiodotironina (T3), na modulação da expressão do mRNA da leptina e o envolvimento da via de sinalização fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) em cultura de adipócitos, 3T3-L1. Nós examinamos o envolvimento desta via na mediação dos efeitos do TH pelo tratamento de adipócitos, 3T3-L1, com dose fisiológica (P = 10 nM) ou suprafisiológica (SI = 100 nM) de T3 durante uma hora (tempo curto), na ausência ou na presença do inibidor de PI3K (LY294002). A ausência de qualquer tratamento foi considerada o grupo controle (C). RT-qPCR foi utilizado para análises de expressão de mRNA. Para análise dos dados foi utilizada ANOVA complementada com o teste de Tukey a 5% de significância. T3 aumentou a expressão de mRNA de leptina em P ($2,26 \pm 0,36$, $p < 0,001$), SI ($1,99 \pm 0,22$, $p < 0,01$) em comparação com o grupo C ($1 \pm 0,18$). Este aumento foi completamente abolido por LY294002 em P ($1,31 \pm 0,05$, $p < 0,001$) e em SI ($1,33 \pm 0,31$, $p < 0,05$). A análise por Western blot confirmaram estes resultados a nível de proteína, indicando a dependência da via PI3K. Para examinar se a leptina foi diretamente induzida por T3, foi utilizado o ciclohexamida (CHX), inibidor de tradução. Em P, a presença de CHX manteve os níveis de mRNA de leptina, porém em SI ($1,14 \pm 0,09$, $p > 0,001$) foi completamente abolida. Estes resultados demonstram que a ativação da via de sinalização PI3K tem um papel na expressão do gene da leptina, direta e indiretamente, mediada pelo TH em adipócitos 3T3-L1.

Palavras-chave

Triiodotironina; adipócitos; leptina; PI3K

Manuscrito completo no **ANEXO 2**

5 Discussão

O TA é controlado por múltiplos fatores neuroendócrinos, entre eles os HT que influenciam o desenvolvimento dos adipócitos e o metabolismo. O hipertireoidismo induz a hiperplasia do tecido adiposo, concomitante à redução do tamanho da célula, o oposto é observado no hipotireoidismo (79). O T₃ modula a proliferação e diferenciação dos adipócitos (4). Viguerie *et al.* (63) concluíram que os processos celulares, tais como, transdução de sinal, apoptose e resposta inflamatória, podem ser regulados pelos HT. Portanto, conforme Yen *et al.* (1) e Obregon *et al.* (56) afirmaram, o TA representa um importante alvo para os HT, visto que apresenta a expressão de TR α e TR β , produtos de dois genes diferentes, receptores de HT (80), sendo esses receptores encontrados em TA branco e marrom.

As células adiposas produzem várias substâncias biologicamente ativas, as adipocinas, com diferentes funções fisiológicas, entre elas leptina e adiponectina (81-83).

Buscando uma maneira de estudar a resposta do tecido TA ao T₃ sem a interferência de fatores sistêmicos, utilizamos a linhagem celular 3T3-L1, células embrionárias de *mus musculus* diferenciadas *in vitro* em adipócitos. Conforme Yoshida *et al.* (69), consideramos como dose fisiológica de T₃ a concentração de 10 nM, dose administrada ao grupo P. As concentrações acima dessa dosagem foram consideradas suprafisiológicas, 100nM (grupo SI) e 1000nM (grupo SII). Neste trabalho foram estudadas a expressão gênica das adipocinas, adiponectina e leptina, e do TR α .

A adiponectina aumenta a sensibilidade à insulina e tem propriedades antiaterogênicas e anti-inflamatórias (84, 85). Em estudo com ratos hipertireoideos encontrou-se um aumento na concentração de adiponectina no soro em relação ao eutireoideo (86).

No estudo de Luvizotto *et al.* (87), a dose supra fisiológica de T₃ de 50 vezes maior (25 μ g de T₃ / 100g peso corporal do animal) do que dose fisiológica (0,5 μ g de T₃ / 100g de peso do corpo do animal), reduziram significativamente os níveis de expressão de mRNA de adiponectina e no soro de ratos obesos, a administração do T₃ foi realizada por duas semanas. No presente estudo com adipócitos, 3T3-L1, verificou-se que a administração da dose de T₃ 1000 nM, 100 vezes maior do que a dose administrada ao grupo P (10 nM), aumentou a expressão de mRNA de adiponectina no grupo SII, em incubação de uma hora, porém a dose fisiológica de 10nM não alterou os níveis dessa adipocina. Resultados divergentes, em relação a estudo *in vivo* e *in vitro*, demonstram o possível efeito de fatores sistêmicos na ação do T₃.

A leptina, assim como a adiponectina, é um produto do TA e em conjunto com os HT está envolvida no balanço energético (83). Os resultados do presente estudo sugerem que o T₃ tem efeitos rápidos na modulação da expressão de leptina, visto que as doses 10nM (P) e 100nM (SII) elevaram os níveis de mRNA e proteína dessa adipocina em apenas uma hora de incubação. Estes

resultados estão de acordo com os achados de Yoshida *et al.* (69), que foram os primeiros a mensurar os níveis de secreção de leptina em células 3T3-L1, na presença de T3. No entanto, eles observaram aumento nos níveis de mRNA de leptina após 24 horas de incubação.

A expressão de TR α é superior à de TR β em adipócitos, 3T3-L1 (75), que está de acordo com os achados de Jiang *et al.* (88). Em estudos anteriores verificou-se que as doses 10nM e 100nM elevaram os níveis de TR α (75).

Os HT podem agir mecanismos, além do clássico TR/ Elemento responsivo ao HT (TRE) (15). Estes mecanismos podem ser chamados de não-clássicos ou não-genômicos, porque o sítio de iniciação pode estar na membrana plasmática, tal como a ativação da via integrina avp3, ou no citoplasma, onde o HT ativa MAPK ou via PI3K (7, 18).

Sabe-se que a via PI3K está envolvida na diferenciação dos adipócitos (17). Com intuito de verificar se ação das diferentes doses de T3 sobre os genes estudados é por meio da via PI3K, utilizamos o inibidor LY294002 associado ou não ao T3. A associação do LY294002 as doses de 10nM e 100nM de T3 acarretou na diminuição dos níveis de TR α e leptina (manuscrito 2 e 3, respectivamente) inicialmente elevados pelo hormônio, demonstrando a ativação dessa via para modulação de ambos os genes. No que concerne a adiponectina, a presença do inibidor LY294002 não causou efeito na ação do T3 sobre esse gene, porém a presença do inibidor na ausência de T3 elevou os níveis de adiponectina em relação ao controle, demonstrando a necessidade da via para manutenção dos níveis de adiponectina (manuscrito 3). Aubin *et al.* (22) observou em seus estudos uma tendência não significativa de aumento de adiponectina com a inibição da via PI3K em adipócitos humanos.

Com intuito de verificar a ação direta ou indireta do T3 sobre adiponectina, leptina e TR α foi utilizada o inibidor da síntese de proteínas, CHX, em paralelo a utilização do inibidor de PI3K. Os níveis de adiponectina elevados por T3, na dose de 1000nM, foram diminuídos na presença de CHX, evidenciando ação indireta do T3 com a necessidade da síntese de uma proteína antes da transcrição do gene alvo (manuscrito 1). A expressão de mRNA de leptina aumentada pela dose de 10nM de T3, não sofreu alteração na presença de CHX, caracterizando ação direta do T3 na dose fisiológica. Porém a dose de 100nM de T3 na presença de CHX demonstrou a diminuição dos níveis de leptina (manuscrito 3), assim como é observado para o TR α em ambas as doses 10nM e 100nM (manuscrito2); indicando ação indireta do T3 para modulação da leptina na dose supra fisiológica e para o TR α em ambas fisiológica e supra fisiológica.

Em resumo, durante uma hora de tratamento, diferentes doses de T3 aumentam os níveis de expressão das adipocinas, leptina e adiponectina, e do TR α em cultura celular de adipócitos, 3T3-L1, e a via de sinalização PI3K se faz importante para a ação do T3.

6 Conclusões

- 1- O aumento da expressão do gene adiponectina, pela dose supra fisiológica de T3, ocorre indiretamente e não é mediada pela via de sinalização PI3K em adipócitos, 3T3-L1.
- 2- O aumento da expressão do gene TR α , pelas doses fisiológica e supra fisiológica de T3, ocorre indiretamente e é mediada pela via de sinalização PI3K.
- 3- O aumento da expressão do gene e proteína leptina, pelas doses fisiológica e supra fisiológica de T3; ocorre diretamente e indiretamente, respectivamente, e é mediada pela via de sinalização PI3K.

Referências

- 1.Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev.* 2001; 81(3):1097-142.
- 2.Hall JE, Guyton AC. *Tratado de Fisiologia Médica*. 11ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006; 931-943.
- 3.Santini F, Marsili A, Mammoli C, Valeriano R, Scartabelli G, Pelosini C, *et al.* Serum concentrations of adiponectin and leptin in patients with thyroid dysfunctions. *J Endocrinol Invest.* 2004; 27(2):RC5-7.
- 4.Darimont C, Gaillard D, Ailhaud G, Negrel R. Terminal differentiation of mouse preadipocyte cells: adipogenic and antimitogenic role of triiodothyronine. *Mol Cell Endocrinol.* 1993; 98(1):67-73.
- 5.Oppenheimer JH, Schwartz HL, Lane JT, Thompson MP. Functional relationship of thyroid hormone- induced lipogenesis, lipolysis, and thermogenesis in the rat. *J Clin Invest.* 1991; 87(1):125-32.
- 6.Nunes MT. Hormônios tiroideanos: mecanismo de ação e importância biológica. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2003; 47(6):640.
- 7.Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev.* 2010, 31(2):139-70.
- 8.Chin WW, Yen PM. Molecular mechanisms of nuclear thyroid hormone action. In: Braverman LE, editor. *Diseases of the thyroid*. Totowa: Humam Press; 1997. p.1-15.
- 9.Williams G. Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptors b isoforms. *Mol Cell Biol.* 2000; 20(22):8329-42.

10. Macchia PE, Takeuchi Y, Kawai T, Cua K, Gauthier K, Chassande O, *et al.* Increased sensitivity to thyroid hormone in mice with complete deficiency of thyroid hormone receptor alpha. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98(1):349-54.
11. Flamant F, Samarut J. Thyroid hormone receptors: lessons from knockout and knock-in mutant mice. *Trends Endocrinol Metab*. 2003; 14:85-90
12. Forrest D, Vennström B. Functions of thyroid hormone receptors in mice. *Thyroid*. 2000; 10(1):41-52.
13. Glass C. Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers and heterodimers. *Endocr Rev*. 1994; 15(3):391-407.
14. Baumann CT, Maruvada P, Hager GL, Yen PM. Nuclear cytoplasmic shuttling by thyroid hormone receptors. multiple protein interactions are required for nuclear retention. *J Biol Chem*. 2001; 276(14):11237-45.
15. Moeller LC, Broecker-Preuss M. Transcriptional regulation by onclassical action of thyroid hormone. *Thyroid Res*. 2011; 3(4 Suppl 1):S6.
16. Moeller LC, Cao X, Dumitrescu AM, Seo H, Refetoff S. Thyroid hormone mediated changes in gene expression can be initiated by cytosolic action of the thyroid hormone receptor beta through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Nucl Recept Signal*. 2006; 4:e020.
17. Davis PJ, Leonard JL, Davis FB. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Front Neuroendocrinol*. 2008; 29:211-8.
18. Moeller LC, Dumitrescu AM, Refetoff S. Cytosolic action of thyroid hormone leads to induction of hypoxia-inducible factor-1alpha and glycolytic genes. *Mol Endocrinol*. 2005; 19(12):2955-63.

19. Storey NM, Gentile S, Ullah H, Russo A, Muessel M, Erxleben C, *et al.* Rapid signaling at the plasma membrane by a nuclear receptor for thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103(13):5197-201.
20. Toker A, Cantley LC. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature*. 1997; 387: 673-676.
21. Vanhaesebroeck B, Leevers SJ, Panayotou G, Waterfield MD. Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem*. 1997; *Sci* 22: 267-272.
22. Aubin D, Gagnon A, Sorisky A. Phosphoinositide 3-kinase is required for human adipocyte differentiation in culture. *Int J Obes*. 2005; 1006-1009.
23. Fang J, Ding M, Yang L, Liu LZ, Jiang BH. PI3K/PTEN/AKT signaling regulates prostate tumor angiogenesis. *Cell Signal*. 2007; 19:2487-2497.
24. Leevers SJ, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD. Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage. *Curr Opin Cell Biol*. 1999;11:219-225.
25. Vanhaesebroeck B, Guillermet-Guibert J, Graupera M, Bilanges B. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11:329-341.
26. Knight ZA, Gonzalez B, Feldman ME, Zunder ER, Goldenberg DD, Williams O, *et al.* A pharmacological map of the PI3-K family defines a role for p110alpha in insulin signaling. *Cell*. 2006;125:733-747.
27. Auger KR, Serunian LA, Soltoff SP, Libby P, Cantley LC. PDGF-dependent tyrosine phosphorylation stimulates production of novel polyphosphoinositides in intact cells. *Cell*. 1989;57:167-175.
28. Huang J, Manning B. A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochem Soc Trans*. 2009; 37(Pt 1) : 217-222.

29. Kitagishi Y, Kobayasho M, Kikuta K, Matsud S. Roles of PI3K/AKT/GSK3/mTOR Pathway in Cell Signaling of Mental Illnesses. *Depress Res Treat*, 2012; 2012:752563.
- 30.Koh SH, Lo EH. The Role of the PI3K Pathway in the Regeneration of the Damaged Brain by Neural Stem Cells after Cerebral Infarction. *J Clin Neurol*. 2015;11(4):297-304.
- 31.O' NEILL, C. PI3-kinase/Akt/mTOR signaling: Impaired on/off switches in aging,cognitive decline and Alzheimer's disease. *Exp Gerontol*. 2013; 48 (7):647–653.
- 32.Lin HY, Sun M, Tang HY, Lin C, Luidens MK, Mousa SA, Incerpi S, Drusano GL, Davis FB, Davis PJ . L-Thyroxine vs. 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and cell proliferation: activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009; 296:C980–C991.
33. McDonald OA, Lane MD. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu Rev Biochem*. 1995; 64:345–373.
- 34.Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev*. 1994; 8:1224–1234.
- 35.Spiegelman BM, Flier JS. Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell*. 1996; 87:377–389.
- 36.Hwang CS, Loftus TM, Mandrup S, Lane MD. Adipocyte differentiation and leptin expression. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 1997;1 3:231–259.
37. Sorisky A. From preadipocyte to adipocyte: differentiation-directed signals of insulin from the cell surface to the nucleus. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 1999; 36:1-34.

38. Font de Mora J, Porras A, Ahn N, Santos E: Mitogen-activated protein kinase activation is not necessary for, but antagonizes, 3T3-L1 adipocytic differentiation. *Mol Cell Biol.* 1997; 17:6068 – 6075.
39. Gregoire FM, Smas CM, Sul HS: Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev.* 1997; 78:783 –809.
40. Camp HS, Tafuri SR. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 1997; 272:10811 –10816.
41. Green H, Kehinde O. Formation of normally differentiated subcutaneous fat pads by an established preadipose cell line. *J Cell Physiol.* 1979;101:169-172.
42. Ntambi JM, Young-Cheul K. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr.* 2000;130(12):3122-6.
43. Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab.* 2006;4(4):263-73.
44. Queiroz JC, Alonso-Vale MI, Curi R, Lima FB. Controle da adipogênese por ácidos graxos. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2009;53(5):582-94.
45. Cornelius P, Enerback S, Bjursell G, Olivercrona T, Pekala PH. Regulation of lipoprotein lipase mRNA content in 3T3–L1 cells by tumor necrosis factor. *Biochem J.* 1988; 249:765-769.
46. Dani C, Amri EZ, Bertrand B, Enerback S, Bjursell G. Expression and regulation of pOb24 and lipoprotein lipase genes during adipose conversion. *J Cell Biochem.* 1990; 43:103-110.
47. Cornelius P, MacDougald OA, Lane MD. Regulation of adipocyte development. *Annu. Rev. Nutr.* 1994; 14:99-129.

48. Erickson RL, Longo KA, Ross SE, Hemati N, MacDougald OA. (2000) Structure and function of C/EBP α . Ntambi, J. M. eds. Adipocyte Biology and Hormone Signaling IOS Press, Inc Burke, VA.
49. Lane MD, Tang Q, Jiang M. Role of the CCAAT enhancer binding proteins (C/EBPs) in adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 266:677-683.
50. Brun RP, Tontonoz P, Forman BM, Ellis R, Chen J, Evans RM, Spiegelman BM. Differential activation of adipogenesis by multiple PPAR isoforms. *Genes Dev*. 1996; 10:974-984
51. Gaillard D, Négrel R, Lagarde M, Ailhaud G. Requirement and role of arachidonic acid in the differentiation of pre-adipose cells. *Biochem J*. 1989;257(2):389-97.
52. Darimont C, Vassaux G, Ailhaud G, Négrel R. Differentiation of preadipose cells: paracrine role of prostacyclin upon stimulation of adipose cells by angiotensin-II. *Endocrinology*. 1994;135(5):2030-6.
53. Jensen MD. Health consequences of fat distribution. *Health consequences of fat distribution Horm Res*. 1997;48 Suppl 5:88-92.
54. Hernandez A, Obregon MJ. Presence and mRNA expression of T3 receptors in differentiating rat brown adipocytes. *Mol Cell Endocrinol*. 1996;121:37-46.
55. Bianco AC, Silva JE. Cold exposure rapidly induces virtual saturation of brown adipose tissue nuclear T3 receptors. *Am J Physiol*. 1988;255:E496-503.
56. Obregon MJ. Thyroid hormone and adipocyte differentiation. *Thyroid*. 2008; 18(2):185-95. Review.

- 57.Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:415-45. Review
- 58.Flier JS. Clinical review 94: What's in a name? In Search of leptin's physiologic role. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(5):1407-13. Review.
- 59.Qi Y, Takahashi N, Hileman SM, Patel HR, Berg AH, Pajvani UB, et al. Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. *Nat Med*. 2004; 10(5):524-9. Erratum in: *Nat Med*. 2004;10(6):649.
- 60.Yaturu S, Prado S, Grimes SR. Changes in adipocyte hormones leptin, resistin, and adiponectin in thyroid dysfunction. *J Cell Biochem*. 2004; 93(3):491-6.
- 62.Saito T, Kawano T, Saito T, Ikoma A, Namai K, Tamemoto H, Kawakami M, Ishikawa SE. Elevation of serum adiponectin levels in Basedow disease. *Metabolism*. 2005; 54(11):1461-6.
- 62.Kokkinos A, Mourouzis I, Kyriaki D, Pantos C, Katsilambros N, Cokkinos DV. Possible implications of leptin, adiponectin and ghrelin in the regulation of energy homeostasis by thyroid hormone. *Endocrine*. 2007; 32(1):30-2.
- 63.Viguerie N, Millet L, Avizou S, Vidal H, Larrouy D, Langin D. Regulation of human adipocyte gene expression by thyroid hormone. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(2):630-4.
- 64.Näslund E, Andersson I, Degerblad M, Kogner P, Kral JG, Rössner S, et al. Associations of leptin, insulin resistance and thyroid function with long-term weight loss in dieting obese men. *J Intern Med*. 2000; 248:299-308.
- 65.Pinkney JH, Goodrick SJ, Katz J, Johnson AB, Lightman SL, Coppack SW, Mohamed-Ali V. Leptin and the pituitary – thyroid axis: a comparative study in lean, obese, hypothyroid and hyperthyroid subjects. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1998;49(5):583-8.
- 66.Luvizotto RA, Conde SJ, SÍbio MT, Nascimento AF, Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Padovani CR, Cicogna AC, Nogueira CR. Administration of physiologic levels of

triiodothyronine increases leptin expression in calorie-restricted obese rats, but does not influence weight loss. *Metabolism*. 2010; 59(1):1-6.

67.Kautzky-Willer A, Ludwig C, Nowotny P, Roden A, Huemer C, Widhalm K, Vierhapper H, Waldhäusl W, Roden M. Elevation of plasma leptin concentrations in obese hyperinsulinaemic hypothyroidism before and after treatment. *Eur J Clin Invest*. 1999; 29(5):395-403.

68.Escobar-Morreale HF, Escobar del Rey F, Morreale de Escobar G. Thyroid hormones influence serum leptin concentrations in the rat. *Endocrinology*. 1997;138(10):4485-8.

69.Yoshida T, Monkawa T, Hayashi M, Saruta T. Regulation of expression of leptin mRNA and secretion of leptin by thyroid hormone in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 232(3):822-6.

70.Yoshida T, Momotani N, Hayashi M, Monkawa T, Ito K, Saruta T. Serum leptin concentrations in patients with thyroid disorders. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1998; 48(3):299-302.

71.Cabanelas A, Cordeiro A, Santos Almeida NA, Monteiro de Paula GS, Coelho VM, Ortega-Carvalho TM, Pazos-Moura CC. Effect of triiodothyronine on adiponectin expression and leptin release by white adipose tissue of normal rats. *Horm Metab Res*. 2010; 42(4):254-60.

72.Aragão CN, Souza LL, Cabanelas, A, Oliveira KJ, Pazos-Moura CC. Adiponectin serum concentration is increased in experimental hyperthyroidism. *Metabolism*. 2007; 56:6-11.

73.Fujimoto N, Matsuo N, Sumiyoshi H, Yamaguchi K, Saikawa T, Yoshimatsu H, Yoshioka H. Adiponectin is expressed in the brown adipose tissue and surrounding immature tissues in mouse embryos. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1731(1):1-12.

74.Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R. Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3–L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 290(3):1084-9.

75. de Oliveira M, Luvizotto R de A, Olimpio RM, de Sibio MT, Silva CB, Conde SJ, et al. Modulation of thyroid hormone receptors, TR α and TR β , by using different doses of triiodothyronine (T3) at different times. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2013;57:368-74.
76. Oliveira Md, Olimpio RM, Sibio MT, Moretto FC, Luvizotto Rde A, Nogueira CR. Short-term effects of triiodothyronine on thyroid hormone receptor alpha by PI3K pathway in adipocytes, 3T3-L1. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2014;58(8):833-7.
77. Oliveira Md, de SÍbio MT, Olimpio RM, Moretto FC, Luvizotto Rde A, Nogueira CR. Triiodothyronine modulates the expression of leptin and adiponectin in 3T3-L1 adipocytes. *Einstein (São Paulo).* 2015;13(1):72-8.
78. de Oliveira M, Luvizotto Rde A, Olimpio RM, De Sibio MT, Conde SJ, Biz Rodrigues Silva C, et al. Triiodothyronine increases mRNA and protein leptin levels in short time in 3T3-L1 adipocytes by PI3K pathway activation. *PLoS One.* 2013; 18; 8(9):e74856.
79. Levacher C, Sztalryd C, Kinebanyan MF, Picon L. Effects of thyroid hormones on adipose tissue development in Sherman and Zucker rats. *Am J Physiol.* 1984; 246:C50-6.
80. Reyne Y, Nougues J, Cambon B, Viguerie-Bascands N, Casteilla L. Expression of c-erbA α , c-erbA β and Rev-erbA α mRNA during the conversion of brown adipose tissue into white adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol.* 1996; 116:59-65.
81. H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation, and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6(10):772-83.
82. Rondinone CM. Adipocyte-derived hormones, cytokines, and mediators. *Endocrine.* 2006; 29(1):81-90.
83. Vendrell J, Broch M, Vilarrasa N, Molina A, Gómez JM, Gutiérrez C, Simón I, Soler J, Richart C. Resistin, adiponectin, ghrelin, leptin, and proinflammatory cytokines: relationships in obesity *Obes Res.* 2004 ;12(6):962-71.

84. Goldstein BJ, Scalia R. Adipokines and vascular disease in diabetes. *Curr Diab Rep.* 2007; 7: 25 – 33
85. Ouchi N , Kihara S , Arita Y , Okamoto Y , Maeda K , Kuriyama H , Hotta K, Nishida M , Takahashi M , Muraguchi M , Ohmoto Y , Nakamura T , Yamashita S , Funahashi T, Matsuzawa Y. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation.* 2000; 102 : 1296 – 1301
86. Aragão CN, Souza LL, Cabanelas A, Oliveira KJ, Pazos-Moura CC. Effect of experimental hypo- and hyperthyroidism on serum adiponectin. *Metabolism.* 2007; 56: 6 – 11.
87. Luvizotto RDAM, Nascimento AFD, SÍbio MTD, Olímpio RMC, Conde SJ, et al. Experimental Hyperthyroidism Decreases Gene Expression and Serum Levels of Adipokines. *Obesity. Scientific World Journal.* 2012; 2012:780890.
88. 2 Jiang W, Miyamoto T, Kakizawa T, Sakuma T, Nishio S, Takeda T, et al. Expression of thyroid hormone receptor alpha in 3T3-L1 adipocytes; triiodothyronine increases the expression of lipogenic enzyme and triglyceride accumulation. *J Endocrinol.* 2004; 182:295-302.

Short-term effects of triiodothyronine on thyroid hormone receptor alpha by PI3K pathway in adipocytes, 3T3-L1

Efeitos rápidos da triiodotironina no receptor de hormônio tireoidiano alfa pela via PI3K em adipócitos, 3T3-L1

Miriane de Oliveira¹, Regiane Marques Castro Olimpio¹, Maria Teresa De Sibio¹, Fernanda Cristina Fontes Moretto¹, Renata de Azevedo Mello Luvizotto², Célia Regina Nogueira¹

ABSTRACT

Objective: The present study aimed to examine the effects of thyroid hormone (TH), more precisely triiodothyronine (T3), on the modulation of TH receptor alpha (TR α) mRNA expression and the involvement of the phosphatidyl inositol 3 kinase (PI3K) signaling pathway in adipocytes, 3T3-L1, cell culture. **Materials and methods:** It was examined the involvement of PI3K pathway in mediating T3 effects by treating 3T3-L1 adipocytes with physiological (P = 10nM) or supraphysiological (SI = 100 nM) T3 doses during one hour (short time), in the absence or the presence of PI3K inhibitor (LY294002). The absence of any treatment was considered the control group (C). RT-qPCR was used for mRNA expression analyzes. For data analyzes ANOVA complemented with Tukey's test was used at 5% significance level. **Results:** T3 increased TR α mRNA expression in P (1.91 ± 0.13 , $p < 0.001$), SI (2.14 ± 0.44 , $p < 0.001$) compared to C group (1 ± 0.08). This increase was completely abrogated by LY294002 in P (0.53 ± 0.03 , $p < 0.001$) and SI (0.31 ± 0.03 , $p < 0.001$). To examine whether TR α is directly induced by T3, we used the translation inhibitor cycloheximide (CHX). The presence of CHX completely abrogated levels TR α mRNA in P (1.15 ± 0.05 , $p > 0.001$) and SI (0.99 ± 0.15 , $p > 0.001$), induced by T3. **Conclusion:** These results demonstrate that the activation of the PI3K signaling pathway has a role in T3-mediated indirect TR α gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2014;58(8):833-7

Keywords

Triiodothyronine; adipocytes; TR α ; PI3K

RESUMO

Objetivo: O objetivo do presente estudo foi analisar os efeitos do hormônio tireoidiano (HT), triiodotironina (T3), na modulação da expressão de mRNA do receptor alfa (TR α) de HT e o envolvimento da via de sinalização da via fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) em adipócitos, 3T3-L1. **Materiais e métodos:** Foi examinado o envolvimento da via PI3K nos efeitos do T3 nos tratamentos de adipócitos, 3T3-L1, nas doses fisiológica (P = 10nM) ou supra fisiológica (SI = 100 nM) durante uma hora (tempo curto), na ausência ou na presença do inibidor da PI3K (LY294002). A ausência de qualquer tratamento foi considerada o grupo controle (C). RT-qPCR foi utilizado para analisar a expressão do mRNA. Para as análises dos dados, utilizou-se ANOVA complementada com o teste de Tukey a 5% de significância. **Resultados:** O T3 aumentou a expressão de mRNA de TR α em P ($1,91 \pm 0,13$, $p < 0,001$) e SI ($2,14 \pm 0,44$, $p < 0,001$) em comparação com o grupo C ($1 \pm 0,08$). Esse aumento foi completamente abolido por LY294002 em P ($0,53 \pm 0,03$, $p < 0,001$) e SI ($0,31 \pm 0,03$, $p < 0,001$). Para examinar se a expressão de TR α foi diretamente induzida pelo T3, utilizou-se o inibidor de tradução, ciclohexamida (CHX). A presença de CHX reduziu os níveis de mRNA de TR α em P ($1,15 \pm 0,05$, $p > 0,001$) e SI ($0,99 \pm 0,15$, $p > 0,001$), induzidos pelo T3. **Conclusão:** Esses resultados demonstram que a ativação da via de sinalização de PI3K tem um papel importante na expressão do gene TR α mediada indiretamente pelo T3, em adipócitos 3T3-L1. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2014;58(8):833-7

Descritores

Triiodotironina; adipócitos; TR α ; PI3K

¹ Department of Internal Medicine, Botucatu School of Medicine, University of São Paulo State (Unesp), Botucatu, SP, Brazil
² Institute of Health Sciences, Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), Sinop, MT, Brazil

Correspondence to:

Miriane de Oliveira
Botucatu Medical School,
Universidade Estadual Paulista
Distrito de Rubião Jr s/n
18618-000 – Botucatu, SP, Brazil
miriane.deoliveira@yahoo.com.br

Received on Feb/20/2014

Accepted on Aug/18/2014

DOI: 10.1590/0004-2730000003295

INTRODUCTION

Thyroid hormone (TH) influences the metabolism and development of adipose tissue (AT) and modulates the proliferation and differentiation of adipocytes (1), mainly 3,5,3'-triiodothyronine (T3) (2). TH also stimulates lipolysis and lipogenesis (3) and is involved in regulation of lipid and carbohydrate metabolism in liver, skeletal muscle and heart tissues (4).

TH receptors (THR) are proteins that belong to the nuclear hormone receptor superfamily and originate from TH receptor alpha (TR α) and TH receptor beta (TR β) genes (5,6) located on chromosomes 17 and 3 in humans, respectively. These nuclear receptors act on certain genes according to nucleotide sequences called TH responsive elements (TRE) located in the promoter sites of target genes (7). Although THR are primarily nuclear receptors, approximately 10% are located in the cytoplasm (8). All isoforms of THR, TR α 1, TR α 2, and TR β 1, are expressed in white and brown adipose tissue, being TR α 1 the predominant THR isoform (9,10). T3 and other hormones regulate the different TR isoforms.

TH may function through other mechanisms than THR/TRE (11). Alternative mechanisms may be referred as a non-classical or non-genomic because initiation sites are located in the plasma membrane, such as activation of $\alpha\beta$ 3 integrin, or the cytoplasm where TH may activate mitogen-activated protein (MAPK) or the phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K) pathway. Initiation sites are proteins that are characterized as iodothyronine receptors (12,13).

As lipid metabolism is closely associated with a number of health problems, the regulation of adipocytes represents an area of emerging interest. So far, TR has been implicated as a major factor in the regulation of the development and function of adipose tissue (14-16). In this study it was assessed the effects of different levels of T3 (physiological and supraphysiological) on TR α gene expression in adipocyte cell culture, 3T3-L1, by real-time PCR (RT-qPCR), during one-hour exposure. The influence of protein synthesis on regulation of TR α transcription by T3 and possible activation of a non-classical pathway (PI3K), by T3, to modulate this gene was also evaluated. Our observations suggest that mRNA TR α levels modulated by T3 depends on activation of the PI3K pathway.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Isobutylmethylxanthine (IBMX), dexamethasone, insulin, cycloheximide (CHX), triiodothyronine (T3), LY294002 (LY), dimethyl sulfoxide (DMSO), sodium hydroxide (NaOH) and Charcoal Stripped fetal bovine serum (FBS) were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum and antibiotic-antimycotic 100X solution were purchased from Gibco BRL (Grand Island, NY, USA).

Cell culture and differentiation

The experimental protocol was approved by the Ethics Committee on Animal Experiments of the Botucatu School of Medicine-Unesp (protocol n° 752).

Mouse 3T3-L1 pre-adipocytes were obtained from the Cell Bank of Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, RJ, Brazil) and grow in polystyrene 6-well plates at 37°C in DMEM supplemented with 10% FBS and 1% antibiotic-antimycotic 100 $\times$ solution. Upon cell confluence (designated as day 0), differentiation was initiated with 1 μ g/mL insulin, 1 μ M DEX, and 0.5 mM IBMX in DMEM containing 10% FBS. After a 4-day incubation, culture media was replaced by DMEM supplemented with 10% FBS and 1 μ g/mL insulin, and the cells were fed every two days with DMEM containing 10% FBS. 3T3-L1 cells were fully differentiated by day 8. After differentiation, cells were incubated for 24 hours in DMEM supplemented with 10% charcoal stripped FBS (to deplete T3) and 1 μ g/mL insulin. After incubation, cells were treated with physiological T3 (10 nM; P group) or supraphysiological T3 (100 nM; SI) (17-19) for one hour. A non-treated group, that received 0.1% NaOH (diluent T3), served as the control (C). P and SI groups were also treated with CHX (10 μ g/mL) (13) and LY (50 μ M) (13) for one hour.

LY was used to determine if the non-classical pathway (PI3K) was involved in T3 action on TR α mRNA levels. CHX was used to determine if T3 directly or indirectly modulates TR α during the one-hour exposure.

Oil red O staining

3T3-L1 cells were grown on 6-well plates and induced to differentiate as previously described. After an 8-day incubation (day 8), plates were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), fixed with 37% formalde-

hyde for 30 minutes at room temperature, and washed twice again with PBS. After fixation, cells were stained for two hours at room temperature with a filtered oil red O solution (0.5 g oil red O (Sigma) in 100 mL isopropanol), washed twice with distilled water, and visualized to confirm differentiation.

Gene expression

Whole RNA was extracted from 3T3-L1 cells using Trizol (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. A high capacity cDNA reverse transcription kit for RT-PCR® (Invitrogen, Sao Paulo, Brazil) was used to synthesize 20 μ L of complementary DNA (cDNA) from 1,000 ng of whole RNA.

TR α (assay Mm00617505_m1 – Applied Biosystems) mRNA levels were determined by real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR). Quantitative measurements were determined with the Applied Biosystems StepOne Plus detection system using a Taq-Man qPCR commercial kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Cycling conditions were as follows: enzyme activation at 50°C for 2 min, denaturation at 95°C for 10 min, cDNA product amplification for 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 s, and annealing/extension at 60°C for 1 min. Gene expression was quantified relative to C group values after normalization by an internal cyclophilin (assay Mm00434759_m1- Applied Biosystems) control using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method as previously described (20).

Statistical analysis

Gene expression was analyzed using analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation. The significance level was set at 5%.

RESULTS

Different T3 concentrations up-regulation TR α mRNA by PI3K pathway

Figure 1 shows the up-regulation of TR α levels in 3T3-L1 adipocytes, and to verify PI3K pathway involvement in mediating the action of T3 on TR α mRNA expression the P and SI groups were treated with the PI3K pathway inhibitor LY. We showed that LY associated with T₃ led to decreased TR α mRNA levels (Figure 1A and B).

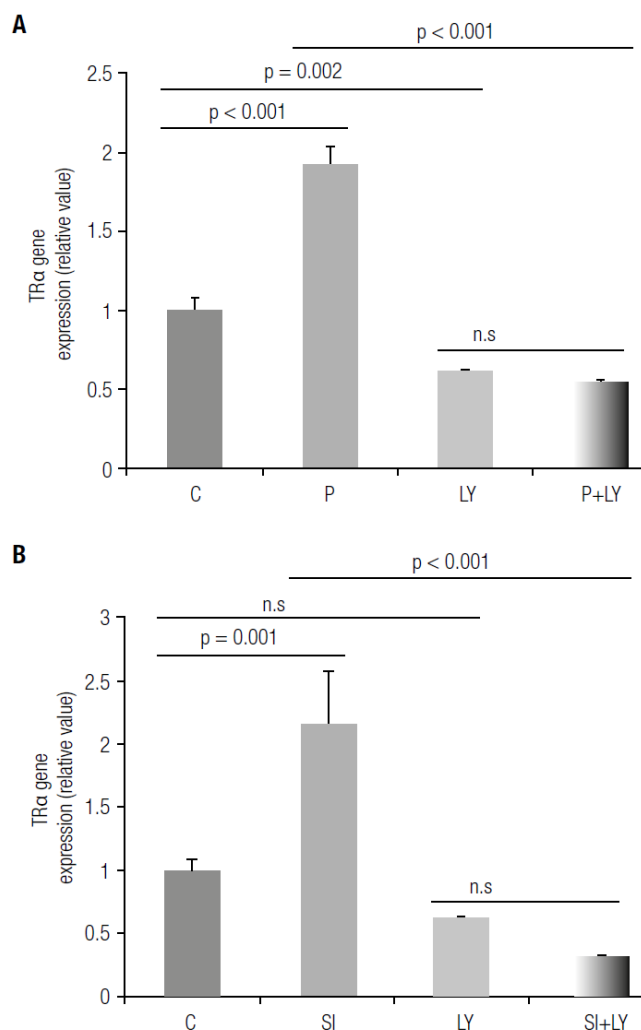


Figure 1. Effects of T3 and LY294002 on modulation of TR α mRNA levels in one hour. P = 10 nM T3, SI = 100 nM T3, C = no T3, and LY = 50 μ M LY294002. **(A)** T3 influence (10 nM) on TR α gene expression in the presence/absence of LY. **(B)** T3 influence (100 nM) on TR α gene expression in the presence/absence of LY. ANOVA with Tukey's test. n.s. = non-significant; n = 3 per treatment.

Effect of inhibition of protein synthesis on T3-induced modulation of TR α mRNA levels

3T3-L1 adipocytes were cultured with T3 at doses that influenced TR α mRNA levels to determine the need for protein synthesis during one hour exposure. CHX was added to the P and SI groups. Complete abrogation of the T3-induced mRNA increase by CHX indicates that the TR α gene is indirectly induced by TH and requires prior protein synthesis (Figure 2A and B). However, CHX alone had significant influence on TR α mRNA levels.

DISCUSSION

AT is a target of TH and expresses THR that are important factors in regulating tissue development and func-

tion (16,21). In this paper we evaluated AT responses to different T₃ levels based on TR α mRNA expression without interference from systemic factors that occur *in vivo*. As an experimental model, we used 3T3-L1 cells (embryonic *Mus musculus* cells) that were differentiated *in vitro* into adipocytes. TR α mRNA levels were quantified using RT-qPCR.

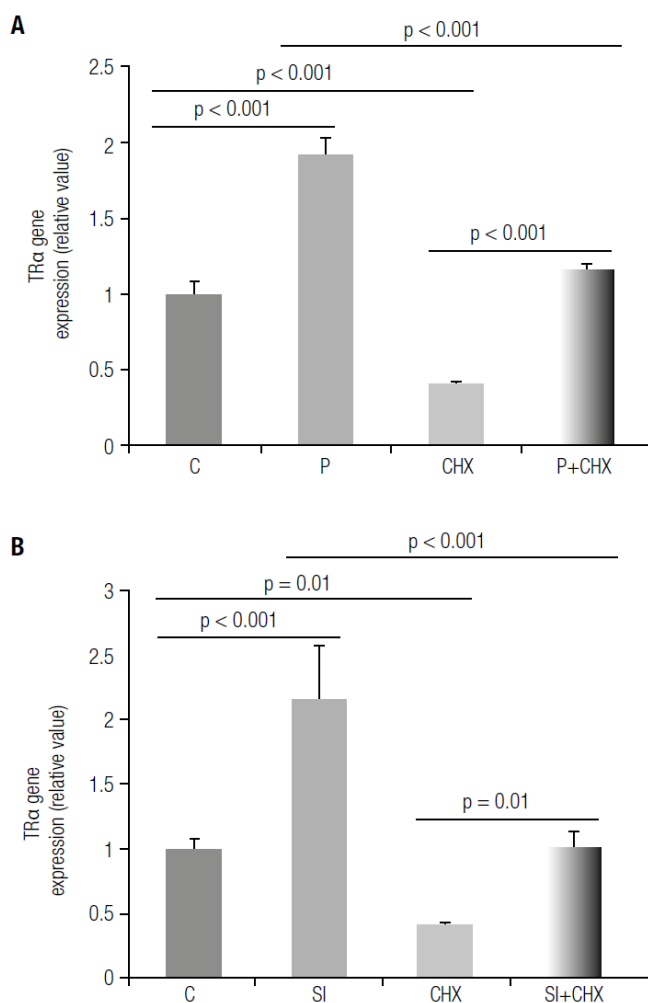


Figure 2. Effects of T3 and CHX on modulation of TR α mRNA levels in one hour. P = 10 nM T3, SI = 100 nM T3, C = no T3, and CHX = 10 μ g/mL. (A) T3 influence (10 nM) on TR α gene expression in the presence/absence of CHX. (B) T3 influence (100 nM) on TR α gene expression in the presence/absence of CHX. ANOVA with Tukey's test. n.s. = non-significant; n = 3 per treatment.

3T3-L1 pre-adipocytes represent a well-established model for adipogenesis (22). TR α expression is higher than TR β in 3T3-L1 adipocytes (18), which is in accordance with the findings of Jiang and cols. (2004) (23). Studies from our group showed that a T3 physiological and supraphysiological dose, at different times, increase TR α in adipocytes, 3T3-L1 (18).

It is known that TH may act by mechanisms other than the classical TR/Thyroid Hormone Responsive

Elements (TRE) (11). These mechanisms can be called non-classical or non-genomic because their initiation sites may be in the plasma membrane, like the activation of integrin $\alpha\beta$ 3 pathway, or in the cytoplasm, where the TH activates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) or PI3K pathway. The initiation sites are proteins that are characterized as iodothyronine receptors (13,21).

PI3K participates in a wide variety of cellular process, including intracellular trafficking, organization of the cytoskeleton, cell growth and transformation, and prevention of apoptosis (24,25). PI3K has a role in differentiation of several cell lines (26,27), including adipocytes. PI3K pathway activation by TH originates in the cytoplasm and involves TR α or TR β , resulting in specific gene transcription, including hypoxia inducing factor (HIF-1 α), glucose transporter 1 (GLUT1), calcineurin inhibitor (ZAKI4 α) and leptin (11,13,21,22). In this study, we used the LY294002 inhibitor to evaluate the need for PI3K pathway activation in modulating TR α mRNA by T3 during a one hour time period. Within the one hour period, the increased on TR α mRNA levels in the P and SI groups were suppressed by LY (Figure 1A and B), proving that pathway activation is necessary for T3 to increase TR α levels. However, the inhibition of PI3K decreased basal TR α mRNA expression demonstrating a need this pathway to TR α mRNA expression in normal cell condition.

In addition, inhibition of protein synthesis with CHX completely blocked T3-induced increase in TR α mRNA levels (Figure 2A and B), showing that it is a gene indirectly up-regulated by T3, depending on the synthesis of a yet unknown protein. Moreover, CHX group (without T3) compared with control group decreases the basal levels of TR α mRNA, indicating the existence of certain short-lived proteins essential for the expression of this gene in normal conditions. Monden and cols. (28) demonstrated that CHX blocks the reduction in TR α levels caused by T3 in HTB-185 cells, suggesting that down-regulation of TR α by T3 requires synthesis of a new protein.

In summary, during one hour of treatment, increased TR α levels in the P and SI groups were indirectly modulated by T3 and depended on activation of the PI3K pathway. This is the first study to demonstrate TR α modulation by T3 in a very short time period (one hour) and assess PI3K pathway activation by TH on this gene in adipocytes, 3T3-L1.

Acknowledgments: we are grateful to Sueli A. Clara, José C. George, Mário B. Bruno, Camila R. C. Camacho and Keize Nagamati Junior for their technical support. We also would like to thank Dr. Luis C. O. Magalhães for the translation of the manuscript into English. This manuscript has been proofread by native English speakers with related background in BioMed Proofreading. We thank CAPES and Fapesp (# 2010/16911-4) for financial support. The authors declare no conflicts of interest in the present study.

Funding: this work was supported by São Paulo Research Foundation (Fapesp), process number 2010/16911-4, and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

Disclosure: no potential conflict of interest relevant to this article was reported.

REFERENCES

1. Darimont C, Gaillard D, Ailhaud G, Negrel R. Terminal differentiation of mouse preadipocyte cells: adipogenic and antimitogenic role of triiodothyronine. *Mol Cell Endocrinol.* 1993;98:67-73.
2. Ailhaud G, Grimaldi P, Negrel R. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu Rev Nutr.* 1992;12:207-33.
3. Oppenheimer JH, Schwartz HL, Lane JT, Thompson MP. Functional relationship of thyroid hormone-induced lipogenesis, lipolysis, and thermogenesis in the rat. *J Clin Invest.* 1991;87:125-32.
4. Santini F, Marsili A, Mammoli C, Valeriano R, Scartabelli G, Pelosini C, et al. Serum concentrations of adiponectin and leptin in patients with thyroid dysfunctions. *J Endocrinol Invest.* 2004;27:RC5-7.
5. Williams GR. Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms. *Mol Cell Biol.* 2000;20:8329-42.
6. Macchia PE, Takeuchi Y, Kawai T, Cua K, Gauthier K, Chassande O, et al. Increased sensitivity to thyroid hormone in mice with complete deficiency of thyroid hormone receptor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:349-54.
7. Glass CK. Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr Rev.* 1994;15:391-407.
8. Baumann CT, Maruvada P, Hager GL, Yen PM. Nuclear cytoplasmic shuttling by thyroid hormone receptors. Multiple protein interactions are required for nuclear retention. *J Biol Chem.* 2001;276:11237-45.
9. Hernandez A, Obregon MJ. Presence and mRNA expression of T3 receptors in differentiating rat brown adipocytes. *Mol Cell Endocrinol.* 1996;121:37-46.
10. Bianco AC, Silva JE. Cold exposure rapidly induces virtual saturation of brown adipose tissue nuclear T3 receptors. *Am J Physiol.* 1988;255:E496-503.
11. Moeller LC, Broecker-Preuss M. Transcriptional regulation by non-classical action of thyroid hormone. *Thyroid Res.* 2011;4 Suppl 1:S6.
12. Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev.* 2010;31:139-70.
13. Moeller LC, Dumitrescu AM, Refetoff S. Cytosolic action of thyroid hormone leads to induction of hypoxia-inducible factor-1alpha and glycolytic genes. *Mol Endocrinol.* 2005;19:2955-63.
14. Flores-Delgado G, Marsch-Moreno M, Kuri-Harcuch W. Thyroid hormone stimulates adipocyte differentiation of 3T3 cells. *Mol Cell Biochem.* 1987;76:35-43.
15. Chawla A, Lazar MA. Induction of Rev-ErbA alpha, an orphan receptor encoded on the opposite strand of the alpha-thyroid hormone receptor gene, during adipocyte differentiation. *J Biol Chem.* 1993;268:16265-9.
16. Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev.* 2001;81:1097-142.
17. Yoshida T, Monkawa T, Hayashi M, Saruta T. Regulation of expression of leptin mRNA and secretion of leptin by thyroid hormone in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;232:822-6.
18. de Oliveira M, Luvizotto R de A, Olimpio RM, de Sibio MT, Silva CB, Conde SJ, et al. Modulation of thyroid hormone receptors, TR α and TR β , by using different doses of triiodothyronine (T3) at different times. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2013;57:368-74.
19. de Oliveira M, Luvizotto R de A, Olimpio RM, De Sibio MT, Conde SJ, Biz Rodrigues Silva C, et al. Triiodothyronine increases mRNA and protein leptin levels in short time in 3T3-L1 adipocytes by PI3K pathway activation. *PLoS One.* 2013;18(9):e74856.
20. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods.* 2001;25:402-8.
21. Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev.* 2010;31:139-70.
22. Green H, Meuth M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell.* 1974;3:127-33.
23. Jiang W, Miyamoto T, Kakizawa T, Sakuma T, Nishio S, Takeda T, et al. Expression of thyroid hormone receptor alpha in 3T3-L1 adipocytes; triiodothyronine increases the expression of lipogenic enzyme and triglyceride accumulation. *J Endocrinol.* 2004;182:295-302.
24. Toker A, Cantley LC. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature.* 1997;387:673-6.
25. Vanhaesebroeck B, Leeyers SJ, Panayotou G, Waterfield MD. Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci.* 1997;22:267-72.
26. Aubin D, Gagnon A, Sorisky A. Phosphoinositide 3-kinase is required for human adipocyte differentiation in culture. *Int J Obes.* 2005;29:1006-9.
27. Fang J, Ding M, Yang L, Liu LZ, Jiang BH. PI3K/PTEN/AKT signaling regulates prostate tumor angiogenesis. *Cell Signal.* 2007;19:2487-97.
28. Monden T, Nakajima Y, Hashida T, Ishii S, Tomaru T, Shibusawa N, et al. Expression of thyroid hormone receptor isoforms down-regulated by thyroid hormone in human medulloblastoma cells. *Endocr J.* 2006;53:181-7.

Triiodothyronine Increases mRNA and Protein Leptin Levels in Short Time in 3T3-L1 Adipocytes by PI3K Pathway Activation

Miriane de Oliveira^{1*}, Renata de Azevedo Melo Luvizotto¹, Regiane Marques Castro Olimpio¹, Maria Teresa De Sibio¹, Sandro José Conde¹, Carolina Biz Rodrigues Silva², Fernanda Cristina Fontes Moretto¹, Célia Regina Nogueira¹

1 Department of Internal Medicine, Botucatu School of Medicine, University of São Paulo State (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil, **2** Department of Physiology, Federal University of São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil

Abstract

The present study aimed to examine the effects of thyroid hormone (TH), more precisely triiodothyronine (T3), on the modulation of leptin mRNA expression and the involvement of the phosphatidyl inositol 3 kinase (PI3K) signaling pathway in adipocytes, 3T3-L1, cell culture. We examined the involvement of this pathway in mediating TH effects by treating 3T3-L1 adipocytes with physiological ($P=10\text{ nM}$) or supraphysiological ($SI=100\text{ nM}$) T3 dose during one hour (short time), in the absence or the presence of PI3K inhibitor (LY294002). The absence of any treatment was considered the control group (C). RT-qPCR was used for mRNA expression analyzes. For data analyzes ANOVA complemented with Tukey's test was used at 5% significance. T3 increased leptin mRNA expression in P (2.26 ± 0.36 , $p < 0.001$), SI (1.99 ± 0.22 , $p < 0.01$) compared to C group (1 ± 0.18). This increase was completely abrogated by LY294002 in P (1.31 ± 0.05 , $p < 0.001$) and SI (1.33 ± 0.31 , $p < 0.05$). Western blotting confirmed these results at protein level, indicating the PI3K pathway dependency. To examine whether leptin is directly induced by T3, we used the translation inhibitor cycloheximide (CHX). In P, the presence of CHX maintained the levels mRNA leptin, but was completely abrogated in SI (1.14 ± 0.09 , $p > 0.001$). These results demonstrate that the activation of the PI3K signaling pathway has a role in TH-mediated direct and indirect leptin gene expression in 3T3-L1 adipocytes.

Citation: Oliveira Md, Luvizotto RdAM, Olimpio RMC, De Sibio MT, Conde SJ, et al. (2013) Triiodothyronine Increases mRNA and Protein Leptin Levels in Short Time in 3T3-L1 Adipocytes by PI3K Pathway Activation. PLoS ONE 8(9): e74856. doi:10.1371/journal.pone.0074856

Editor: Victor Sanchez-Margalet, Virgen Macarena University Hospital, School of Medicine, Spain

Received: June 18, 2013; **Accepted:** August 7, 2013; **Published:** September 18, 2013

Copyright: © 2013 Oliveira et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by FAPESP (2010/16911-4) for financial support for project development, and CAPES granted scholarship for the student to develop the project. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: miriane.deoliveira@yahoo.com.br

Introduction

Thyroid hormones (THs) actions are especially important during development, this actions regulate the growth and maturation of many organs and tissues during the fetal and neonatal life [1,2]. Many tissues are regulated by THs up to their complete development, including actions on groups of genes involved in the differentiation program. The adipose tissue (AT) is an important target for THs. The AT is specialized in the transport, synthesis, storage, and mobilization of lipids. Its main function is the storage of energy in the form of triglycerides, and it constitutes a reservoir of energy to be used in times of caloric deprivation [3]. AT is the largest endocrine organ in the body, secreting hormones, chemokines, and cytokines (commonly referred to as *adipokines*) that are important paracrine/endocrine regulators [4].

The leptin is an AT product and together with THs are involved in the energy balance [5]. TH status also influences leptin, various studies try to correlate leptin with TH [6]. Administration of 3,5,3'- triiodothyronine (T3) to hypothyroid rats also decreased leptin mRNA expression in adipose tissue and circulating leptin levels [7]. However, in other reports, THs up-regulate leptin in differentiated adipocytes. T3, but not thyroxine (T4), stimulated ob mRNA expression and leptin secretion in 3T3-L1 adipocytes [8], cells in which leptin expression is less than 1% of intact adipose tissue. Additionally, human studies show no conclusive evidence on the relationship between TH and leptin levels [9,10].

The presence of thyroid hormone receptors (TRs) in AT suggests that there might be a direct interference of the thyroid activity in the production of adipokines at AT [11]. Studies in a microarray investigation, showed that the THs regulates 19 genes from humans white AT [12]. These genes originate

proteins that are involved in signal transduction, lipid metabolism, apoptosis, and inflammatory responses.

Studies from our group showed that a T3 physiological dose increases leptin gene expression in obese animals subjected to diet restriction [13]. However, animals subjected to supraphysiological doses of T3 showed a diminishment in leptin mRNA expression [14]. These findings suggest that THs physiological levels might be necessary for the adequate leptin secretion [13]. Notwithstanding, our methodology did not enable us to verify if THs acts directly on AT modulating leptin expression.

The concept regarding the THs action has been diversified, including non-classical actions of T3 and T4. T3 has been shown as an activator of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), which leads to an increase in certain genes, such as Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1 α) and calcineurin inhibitor (ZAKI-4 α) [15,16]. Hence, the present study assessed the effect of physiological and supraphysiological T3 doses in leptin mRNA and protein expression levels at 3T3-L1 adipocytes culture, after one hour of treatment.

We have evaluated the influence of protein synthesis in the leptin transcription rate regulated by T3 using the translation-inhibitor cycloheximide (CHX). LY294002 was used to check if the non-classical pathway (PI3K) was involved in the T3 action in the leptin mRNA levels. We have found that T3 increases the leptin expression levels in one hour (short time) of treatment, and such increase occurs directly in T3 physiological dose and indirectly in supraphysiological dose, but both depend on the activation of PI3K pathway.

Materials and Methods

2.1: Chemicals and antibodies

Isobutylmethylxanthine (IBMX), dexamethasone, insulin, cycloheximide (CHX), triiodothyronine (T3), LY294002 (LY), Dimethyl Sulfoxide (DMSO), Sodium hydroxide (NaOH) and Charcoal Stripped fetal bovine serum (FBS) were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum and Antibiotic-Antimycotic 100X solution were purchased from Gibco BRL (Grand Island, NY, USA). The Rabbit polyclonal to leptin antibody (AB9749) and the mouse monoclonal GAPDH antibody (AB97069) were obtained from ABCAM (Abcam, Cambridge, UK). The anti-rabbit and anti-mouse secondary antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (CA, USA). Enhanced chemiluminescence (ECL) reagents were obtained Amersham Biosciences (NJ, USA).

2.2 Cell culture and differentiation

Mouse 3T3-L1 preadipocytes were obtained from the Cell Bank of Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, RJ, Brazil), and were grown in polystyrene six-well plates, at 37°C in DMEM supplemented with 10% FBS (Sigma), and 1% Antibiotic-Antimycotic 100X solution (Gibco). After cell confluence (designated as day 0), differentiation was initiated with 1 μ g/ml insulin, 1 μ M dexamethasone (DEX), and 0.5 mM IBMX in DMEM containing 10% FBS. After a 4-day incubation the culture media were replaced by DMEM supplemented with

10% FBS and 1 μ g/ml insulin, and the cells were then fed every two days with DMEM containing 10% FBS. 3T3-L1 cells were fully differentiated by day 8. After differentiation, cells were incubated for 24 hour in DMEM supplemented with 10% Charcoal Stripped FBS (to deplete T3) and 1 μ g/ml insulin. After incubation, cells were treated with: either physiological T3 dose (10 nM, named P group) or supraphysiological T3 dose (100 nM, named SI group) during one hour (1h). A non-treated group, only 0.1% NaOH (diluent T3), was used as control (C). For the one-hour time period, it was also formed groups of P and SI added with CHX (10 μ g/ml) [16] and groups that were added with LY (50 μ M) [16]. The inhibitors LY294002 and CHX were added to the medium 1 h before T3 treatment.

2.3: Oil red O staining

3 T3-L1 cells were grown on 6-well plates and induced to differentiate as previously described. After an 8-day incubation (day 8), plates were twice washed with phosphate-buffered saline (PBS), fixed with 37% formaldehyde during 30 minutes at room temperature, and then washed twice again with PBS. After fixation, cells were stained for 2h at room temperature with a filtered oil red O solution (0.5 g oil red O (Sigma) in 100 ml isopropanol), washed twice with distilled water and visualized to confirm differentiation.

2.4: Gene expression

Total RNA was extracted from 3T3-L1 cells by Trizol (Invitrogen) method, according to the manufacturer's instructions. The High Capacity cDNA reverse transcription kit for RT-PCR® (Invitrogen, São Paulo, Brazil) was used for the synthesis of 20 μ L complementary DNA (cDNA) from 1000 ng of whole RNA.

Leptin (assay Mm00434759_m1*- Applied Biosystems) levels were determined by RT-qPCR. Quantitative measurements were made in the "Applied Biosystems StepOne Plus" detection system using the TaqMan qPCR commercial kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Cycling conditions were as follows: enzyme activation at 50°C during 2 min, denaturation at 95°C during 10 min, cDNA products were amplified during 40 cycles of denaturation at 95°C during 15 s and annealing/extension at 60°C during 1 min. Gene expression was quantified in relation to the values of the C group after normalization by an internal control, cyclophilin (Mm00434759_m1), by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, as previously described [17].

2.5: Western blot analysis

Following treatment with T3, cells were washed twice with cold PBS, and lysed with 100 μ L of lysis buffer containing 500 mM Tris (pH 8), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), and 0.5% deoxycholate of sodium. The homogenate was centrifuged at 4°C for 20 minutes at 12000 rpm. The supernatant was collected and total protein content was determined by the Bradford Method [18] using Albumin Serum Bovine (BSA) as standard. Samples containing 50 μ g of protein were subjected to 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in polyacrylamide gels. After electrophoresis, proteins were electro-transferred to

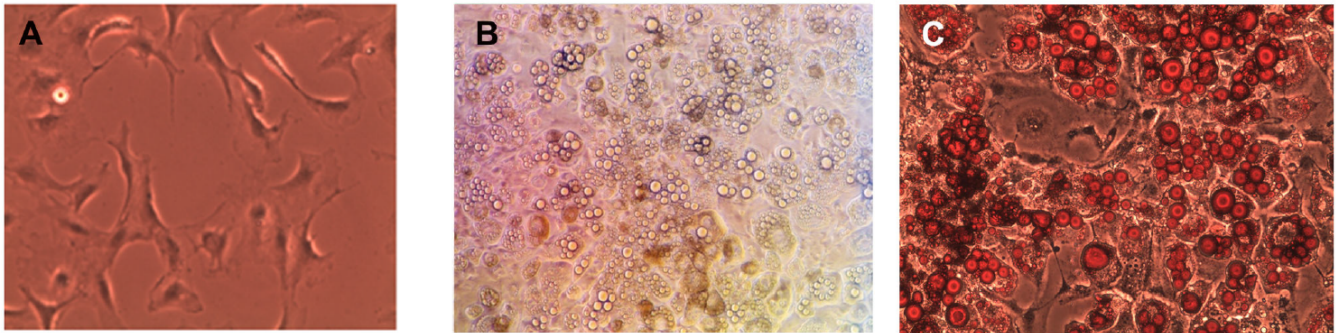


Figure 1. 3T3-L1 cells before and after their differentiation into adipocytes. A) Non-differentiated cells. B) Cells with ten days of differentiation. C) Cells in *oil red O* after ten days differentiation. Arrows show adipocyte with cytoplasmic lipid droplet.

doi: 10.1371/journal.pone.0074856.g001

nitrocellulose membrane using a semidry transfer system (BioRad Biosciences; NJ, USC). The blotted membrane was then blocked 5% BSA in Tris buffered saline (TBS) with 0.1% Tween-20 (T) for 1 h at room temperature (RT) and incubated with specific antibodies overnight at 4°C. The primary antibodies used were rabbit polyclonal anti-leptin 1: 5000 and mouse monoclonal anti-GAPDH 1: 1000. After incubation with secondary anti-rabbit (1: 1000) and anti-mouse (1: 10000) in 5% BSA in TBS-T for 1h RT, blots were developed using the SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate kit (Pierce) and exposed to Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences). Quantitative analysis of immunoblot images was performed using Gel Logic (6000 PRO) with Carestream MI software. Results are shown as the squared pixels ratio between leptin and GAPDH, and represented as fold activation relatively to cells exposed to assay media.

2.6: Statistical analysis

Gene expression was analyzed using the analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation. The significance level was set at 5%.

Results

3.1: 3T3-L1 cell culture and differentiation

Figure 1A presents 3T3-L1 cells before differentiation. In the presence of a differentiation mix (insulin, dexamethasone, and IBMX) the pre-adipocytes turn into adipocytes presenting the morphology of mature adipocytes (Figure 1B and 1C), whose main characteristic is the presence of a great amount of cytoplasmic lipid droplets. *Oil red O* makes these droplets more evident and lipids are stained red (1C).

3.2: Leptin mRNA and protein levels increase after one hour of T3 incubation

Figure 2 shows that T3 increased the levels of leptin mRNA (Figure 2A) and protein (Figure 2B) in 3T3-L1 adipocytes in P and SI if compared to the C group after one hour of incubation.

3.3: The increase of Leptin mRNA and protein induced by T3 action is sensitive to LY294002

In order to check if PI3K pathway is involved in the mediation of leptin mRNA and protein expression after one hour of incubation with T3, groups P and SI were treated with a PI3K inhibitor (LY294002). Figure 3 shows that the addition of LY to different T3 doses led to the diminishment of leptin expression that were increased in P and SI (Figure 3A, B, C and D).

3.4: Effects of the protein synthesis inhibition upon the modulation of T3 induced leptin mRNA levels

In order to determine the need of protein synthesis for T3 regulation of leptin mRNA levels after one hour of treatment, groups P and SI were incubated with CHX. The addition of CHX to the P group did not change the levels of leptin mRNA (Figure 4A). However, CHX decreased the mRNA leptin levels in SI (Figure 4B).

Discussion

Since the adipose tissue is a target of thyroid hormones [19,20], some authors suggest that the leptin and thyroid might have a parallel response [21]. However, many studies investigating the possible relationship between thyroid hormone and leptin levels, reported conflicting results. Whereas some studies show no association between leptin serum concentration and thyroid hormone levels [6,22,23], others report a negative [24,25] or a positive correlation [26,27]. These divergent results may occur due to the use of different models, which demonstrate that THs might have different actions according to the model and the systemic factors involved. Thus, the present study aims to elucidate the AT response to different T3 doses on leptin mRNA expression without the interference of systemic factors.

Experimental model of 3T3-L1 cells (embryonic *Mus musculus* cells) (Figure 1A) were differentiated *in vitro* into adipocytes (Figure 1B and C). These cells represent a well-established adipogenesis model [28]. Our findings suggest that T3 has rapid effects in the modulation of leptin expression, since P and SI showed an increase in leptin gene expression (Figure 2A) and protein (Figure 2B) after 1 hour of T3

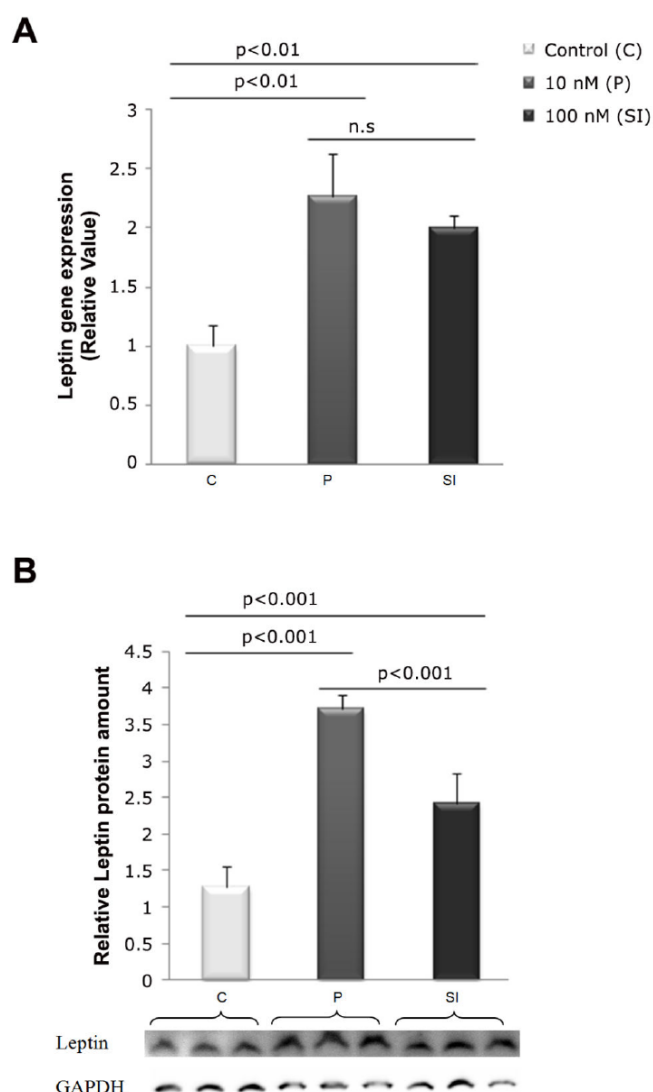


Figure 2. Dose-response for T3 effects upon leptin mRNA expression and protein in 1h. P = 10 nM T3, SI = 100 nM T3, C = without T3. A) T3 effects in leptin mRNA expression by 10 nM and 100 nM doses. B) T3 effects in leptin protein by 10 nM and 100 nM doses. Data expressed in average and standard deviation (ANOVA supplemented with Tukey's test). n.s = non-significant; n = 3 in each treatment.

doi: 10.1371/journal.pone.0074856.g002

incubation. These results agree with the findings of Yoshida et al. [8], who were the first to measure the leptin secretion levels in 3T3-L1 cells in the presence of T3. However, they have observed an increase in leptin mRNA levels after 24 hours of incubation. Expression of leptin increases during adipocyte differentiation, and peaks as mature adipocytes fill with lipids [29] and in Jiang et al. [30] showed that administration of T3 to the differentiating 3T3-L1 cells enhanced the accumulation of triglyceride.

At physiological concentration of 10nM of T3, administered to the P group, there was no increased in both mRNA expression and secretion of leptin. Findings of Luvizotto et al. [13] suggest

that physiologic levels of thyroid hormone are necessary for appropriate leptin expression and this dose of T3 could be used safely in the treatment of obesity because, at this level, T3 increases the expression of leptin, a hormone with central actions that cause a reduced food intake and an increase in energy expenditure, but does not decrease body protein.

Several studies have shown that neither chronic hyperthyroidism nor acute T3 treatment has affected serum leptin levels [31,32]. In the study of Luvizotto et al. [14,33], the supraphysiological dose of 50 fold greater than physiological levels, significantly reduced leptin gene expression. In hyperthyroid patients, plasma leptin levels were unaffected by treatment for 12–28 weeks with methimazole [34]. These data indicate that, in humans, the plasma leptin status in individuals with relatively low plasma leptin levels is little affected by thyroid status. However, Yoshida et al. [8] and the present study reported that T3 enhanced the accumulation of leptin mRNA as well as leptin release by mouse 3T3-L1 cells, in supraphysiological concentration of 100nM of T3. One reason for the difference between *in vivo* and *in vitro* expressions is due the fact that leptin expression levels in 3T3-L1 and 3T3-F442A cells is less than 1% compared to intact adipose tissue [35,36].

It is known that THs may act by mechanisms other than the classical TRs/Thyroid Hormone Responsive Elements (TREs) [15]. These mechanisms can be called non-classical or non-genomic because their initiation sites may be in the plasma membrane, like the activation of integrin $\alpha\beta 3$ pathway, or in the cytoplasm, where the TH activates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) or PI3K pathway. The initiation sites are proteins that are characterized as iodothyronine receptors [16,37].

PI3K participates in a wide variety of cellular process, including intracellular trafficking, organization of the cytoskeleton, cell growth and transformation, and prevention of apoptosis [38,39]. PI3K has a role in differentiation of several cell lines [40,41], including adipocytes.

We used specific inhibitor of PI3K, LY294002, signaling cascades regarding leptin expression, because T3 have been reported to activation at these signaling pathways to modulate specific genes [15,16]. It was observed that leptin mRNA and protein levels that were T3-increased in P and SI, were then suppressed by the presence of LY294002 (Figure 3A, B, C and D), without cell toxicity. These findings strongly suggest that up-regulation of leptin gene transcription is mediated via the PI3K pathway by T3.

In order to check if the T3 action was direct or indirect upon the modulation of leptin gene, it was used a protein synthesis inhibitor in parallel with the use of a PI3K pathway inhibitor. The addition of CHX, which is a protein synthesis inhibitor, induced a leptin mRNA levels diminishment in group SI (Figure 4B), indicating that the effects of T3 upon this gene need protein synthesis prior to transcription. Under physiological T3 dose (group P) the CHX did not display any effect in leptin mRNA (Figure 4A), indicating that T3 has direct action upon the leptin mRNA expression increase. To our knowledge, this is the first study using CHX to determine the direct/indirect action of T3 upon the levels of leptin.

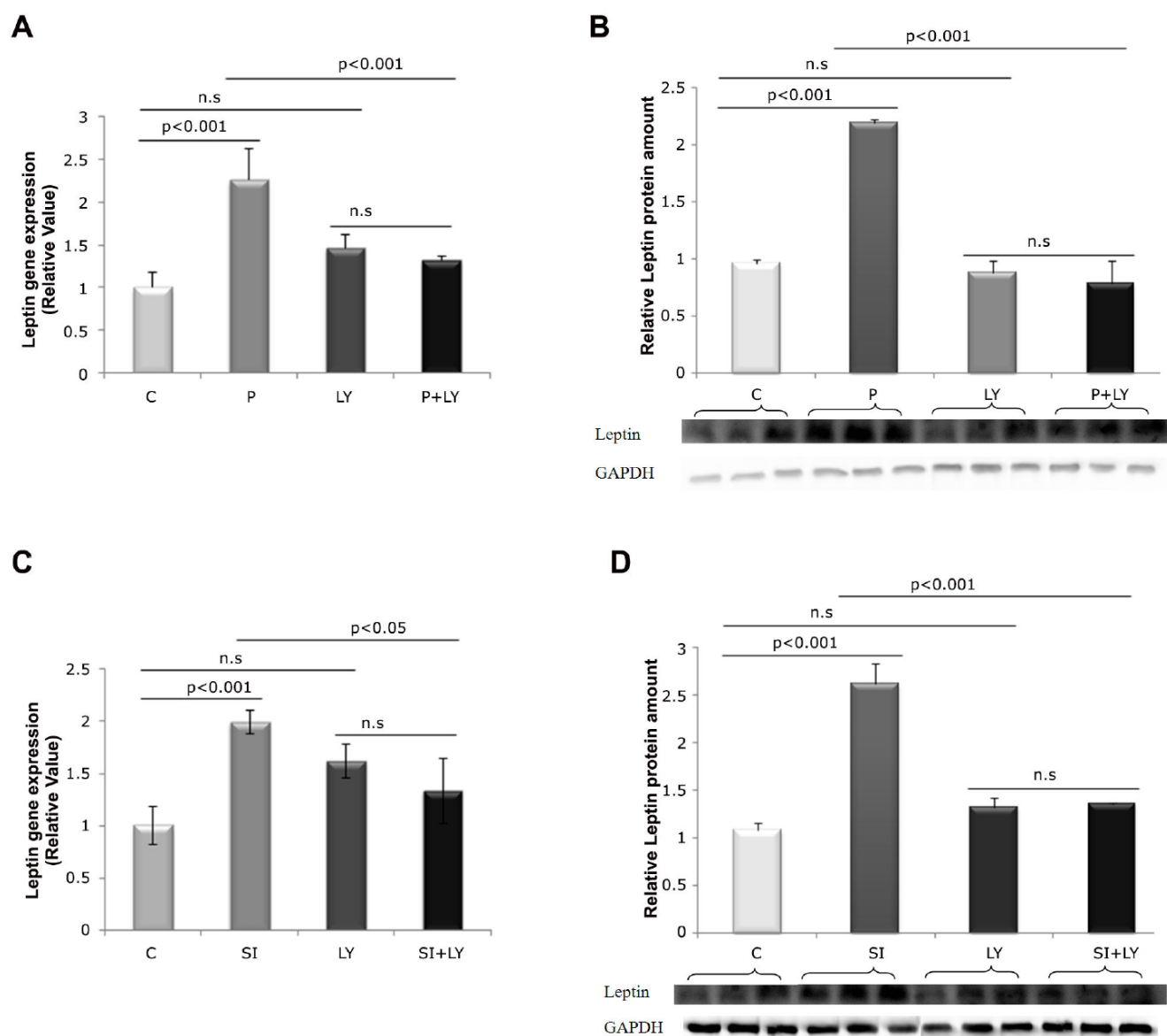


Figure 3. Effects of T3 and LY294002 upon the modulation of leptin mRNA and protein levels in 1h of treatment. P = 10 nM T3, SI = 100 nM T3, C = without T3, LY = 50 μ M LY294002. A) T3 influence (10 nM) in the leptin gene expression under the presence/absence of LY. B) T3 influence (10 nM) in the leptin protein under the presence/absence of LY. C) T3 influence (100 nM) in the leptin gene expression under the presence/absence of LY. D) T3 influence (100 nM) in the leptin protein under the presence/absence of LY (ANOVA supplemented with Tukey's test). n.s. = non-significant; n = 3 in each treatment.

doi: 10.1371/journal.pone.0074856.g003

In summary, these data suggest that physiological and supraphysiological dose of T3 increase leptin mRNA expression after one hour of incubation without the characterization of a dose-dependent event. After one hour of T3 treatment, there is a direct increase in leptin levels when using physiological dose, whereas supraphysiological dose show an indirect leptin levels increase that depends on the PI3K pathway activation. Since leptin is an important adipostatic signal to the brain and it was observed that it is modulated by T3 through the activation of PI3K cytosolic pathway, the understanding of its mechanism of action is of utter importance.

Acknowledgements

We are grateful to Sueli A Clara, José C Georgete, Mário B Bruno, Camila R C Camacho and Keize Nagamati Junior for their technical support. We also would like to thank Dr. Luis C O Magalhães for the translation of the manuscript into English. This manuscript has been proofread by native English speakers with related background in Biomed Proofreading.

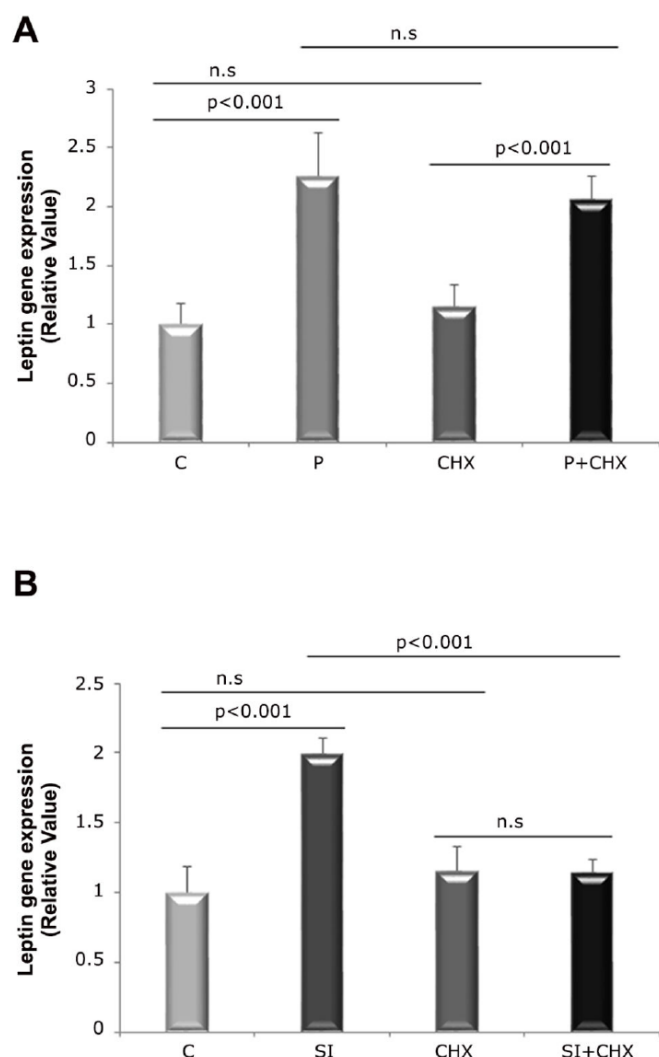


Figure 4. Effects of T3 and CHX upon the modulation of leptin mRNA levels in 1h treatment. P = 10 nM T3, SI = 100 nM T3, C = without T3, CHX = 10 µg/ml CHX. A) T3 influence (10 nM) in the leptin gene expression under the presence/absence of CHX. B) T3 influence (100 nM) in the leptin gene expression under the presence/absence of CHX (ANOVA supplemented with Tukey's test). n. s = non-significant; n = 3 in each treatment.

doi: 10.1371/journal.pone.0074856.g004

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MO CRN RAML. Performed the experiments: MO FCFM RMCO MTS. Analyzed

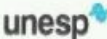
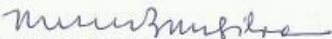
References

- Bernal J (2002) Action of thyroid hormone in brain. *J Endocrinol Invest* 25: 268–288. PubMed: 11936472.
- Morreale de Escobar G, Obregon MJ, Escobar del Rey F (2004) Role of thyroid hormone during early brain development. *Eur J Endocrinol* 151 Suppl 3: U25–U37. doi:10.1530/eje.0.151U025. PubMed: 15554884.
- Obregon MJ (2008) Thyroid hormone and adipocyte differentiation. *Thyroid* 18: 185–195. doi:10.1089/thy.2007.0254. PubMed: 18279019.
- Gregor MF, Hotamisligil GS (2011) Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol* 29: 415–445. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101322. PubMed: 21219177.
- Vendrell J, Broch M, Vilarrasa N, Molina A, Gómez JM et al. (2004) Resistin, adiponectin, ghrelin, leptin, and proinflammatory cytokines: relationships in obesity. *Obes Res* 12: 962–971. doi:10.1038/oby.2004.118. PubMed: 15229336.

the data: MO CRN SJC RMCO MTS. Contributed reagents/materials/analysis tools: MO RAML CBRS CRN. Wrote the manuscript: MO CRN RAML SJC.

6. Näslund E, Andersson I, Degerblad M, Kogner P, Kral JG et al. (2000) Associations of leptin, insulin resistance and thyroid function with long-term weight loss in dieting obese men. *J Intern Med* 248: 299-308. doi: 10.1046/j.1365-2796.2000.00737.x. PubMed: 11086640.
7. Fain JN, Bahouth SW (1998) Effect of tri-iodothyronine on leptin release and leptin mRNA accumulation in rat adipose tissue. *Biochem J* 332: 361-366. PubMed: 9601064.
8. Yoshida T, Monkawa T, Hayashi M, Saruta T (1997) Regulation of expression of leptin mRNA and secretion of leptin by thyroid hormone in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 232: 822-826. doi:10.1006/bbrc.1997.6378. PubMed: 9126361.
9. Obermayer-Pietsch BM, Frühauf GE, Lipp RW, Sendhofer G, Pieber TR (2001) Dissociation of leptin and body weight in hyperthyroid patients after radioiodine treatment. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25: 115-120. doi:10.1038/sj.ijo.0801724. PubMed: 11244466.
10. Simó R, Hernández C, Zafon C, Galofré P, Castellanos JM et al. (2000) Short-term hypothyroidism has no effect on serum leptin concentrations. *Diabetes Obes Metab* 2: 317-321. doi:10.1046/j.1463-1326.2000.00086.x. PubMed: 11225748.
11. Saito T, Kawano T, Saito T, Ikoma A, Namai K et al. (2005) Elevation of serum adiponectin levels in Basedow disease. *Metabolism* 54: 1461-1466. doi:10.1016/j.metabol.2005.05.011. PubMed: 16253634.
12. Viguerie N, Millet L, Avizou S, Vidal H, Larrouy D et al. (2002) Regulation of human adipocyte gene expression by thyroid hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 630-634. doi:10.1210/jc.87.2.630. PubMed: 11836296.
13. Luvizotto RA, Conde SJ, Sibio MT, Nascimento AF, Lima-Leopoldo AP et al. (2010) Administration of physiologic levels of triiodothyronine increases leptin expression in calorie-restricted obese rats, but does not influence weight loss. *Metabolism* 59: 1-6. doi:10.1016/S0026-0495(10)00136-8. PubMed: 19846169.
14. Luvizotto RA, Sibio MT, Olímpio RM, Nascimento AF, Lima-Leopoldo AP et al. (2011) Supraphysiological triiodothyronine doses diminish leptin and adiponectin gene expression, but do not alter resistin expression in calorie restricted obese rats. *Horm Metab Res* 43: 452-457. doi:10.1055/s-0031-1277187. PubMed: 21557150.
15. Moeller LC, Broecker-Preuss M (2011) Transcriptional regulation by nonclassical action of thyroid hormone. *Thyroid Res* 4 Suppl 1: S6. doi: 10.1186/1756-6614-4-6. PubMed: 21835053.
16. Moeller LC, Dumitrescu AM, Refetoff S (2005) Cytosolic action of thyroid hormone leads to induction of hypoxia-inducible factor-1 α and glycolytic genes. *Mol Endocrinol* 19: 2955-2963. doi:10.1210/me.2004-0542. PubMed: 16051672.
17. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262. PubMed: 11846609.
18. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3. PubMed: 942051.
19. Darimont C, Gaillard D, Ailhaud G, Negrel R (1993) Terminal differentiation of mouse preadipocyte cells: adipogenic and antimitogenic role of triiodothyronine. *Mol Cell Endocrinol* 98: 67-73. doi:10.1016/0303-7207(93)90238-F. PubMed: 7511547.
20. Yen PM (2001) Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev* 81: 1097-1142. PubMed: 11427693.
21. Pinkney JH, Goodrick SJ, Katz J, Johnson AB, Lightman SL et al. (1998) Leptin and the pituitary-thyroid axis: a comparative study in lean, obese, hypothyroid and hyperthyroid subjects. *Clin Endocrinol (Oxf)* 49: 583-588. doi:10.1046/j.1365-2265.1998.00573.x. PubMed: 10197072.
22. Torgerson JS, Carlsson B, Stenlöf K, Carlsson LM, Bringman E et al. (1999) A low serum leptin level at baseline and a large early decline in leptin predict a large 1-year weight reduction in energy-restricted obese humans. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 4197-4203. doi:10.1210/jc.84.11.4197. PubMed: 10566672.
23. Reinehr T, Andler W (2002) Thyroid hormones before and after weight loss in obesity. *Arch Dis Child* 87: 320-326. doi:10.1136/adc.87.4.320. PubMed: 12244007.
24. Escobar-Morreale HF, Escobar del Rey F, Morreale de Escobar G (1997) Thyroid hormones influence serum leptin concentrations in the rat. *Endocrinology* 138: 4485-4488. doi:10.1210/en.138.10.4485. PubMed: 9322968.
25. Zabrocka L, Klimek J, Swierczynski J (2006) Evidence that triiodothyronine decreases rat serum leptin concentration by down-regulation of leptin gene expression in white adipose tissue. *Life Sci* 79: 1114-1120. doi:10.1016/j.lfs.2006.03.009. PubMed: 16624326.
26. Yoshida T, Momotani N, Hayashi M, Monkawa T, Ito K et al. (1998) Serum leptin concentrations in patients with thyroid disorders. *Clin Endocrinol* 48: 299-302. doi:10.1046/j.1365-2265.1998.00408.x. PubMed: 9578819.
27. Nakamura T, Nagasaka S, Ishikawa S, Hayashi H, Saito T et al. (2000) Association of hyperthyroidism with serum leptin levels. *Metabolism* 49: 1285-1288. doi:10.1053/meta.2000.9520. PubMed: 11079817.
28. Green H, Meuth M (1974) An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* 3: 127-133. doi: 10.1016/0092-8674(74)90116-0. PubMed: 4426090.
29. Yu YH, Zhu H (2004) Chronological changes in metabolism and functions of cultured adipocytes: a hypothesis for cell aging in mature adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286: E402-E410. PubMed: 14625202.
30. Jiang W, Miyamoto T, Kakizawa T, Sakuma T, Nishio S et al. (2004) Expression of thyroid hormone receptor alpha in 3T3-L1 adipocytes; triiodothyronine increases the expression of lipogenic enzyme and triglyceride accumulation. *J Endocrinol* 182: 295-302. doi:10.1677/joe.0.1820295. PubMed: 15283690.
31. Corbetta S, Englano P, Giambona S, Persani L, Blum WF et al. (1997) Lack of effects of circulating thyroid hormone levels on serum leptin concentrations. *Eur J Endocrinol* 137(6): 659-663. doi:10.1530/eje.0.1370659. PubMed: 9437233.
32. Kristensen K, Pedersen SB, Langdahl BL, Richelsen B (1999) Regulation of leptin by thyroid hormone in humans: studies in vivo and in vitro. *Metabolism* 48: 1603-1607. doi:10.1016/S0026-0495(99)90252-4. PubMed: 10599995.
33. Luvizotto RDM, Nascimento AFD, Sibio MTD, Olímpio RMC, Conde SJ, et al. (2012) Experimental Hyperthyroidism Decreases Gene Expression and Serum Levels of Adipokines in Obesity. *Scientific World Journal*. doi:10.1100/2012/780890. PubMed: 22645452.
34. Valcavi R, Zini M, Peino R, Casanueva FF, Dieguez C (1997) Influence of thyroid status on serum immunoreactive leptin levels. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 1632-1634. doi:10.1210/jc.82.5.1632. PubMed: 9141562.
35. MacDougald OA, Hwang CS, Fan H, Lane MD (1995) Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 9034-9037. doi: 10.1073/pnas.92.20.9034. PubMed: 7568067.
36. Mandrup S, Loftus TM, MacDougald OA, Kuhajda FP, Lane MD (1997) Obese gene expression at in vivo levels by fat pads derived from s.c. implanted 3T3-F442A preadipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 4300-4305. doi:10.1073/pnas.94.9.4300. PubMed: 9113984.
37. Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ (2010) Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev* 31: 139-170. doi:10.1210/er.2009-0007. PubMed: 20051527.
38. Toker A, Cantley LC (1997) Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 387: 673-676. doi: 10.1038/42648. PubMed: 9192891.
39. Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Panayotou G, Waterfield MD (1997) Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci* 22: 267-272. doi:10.1016/S0968-0004(97)01061-X. PubMed: 9255069.
40. Aubin D, Gagnon A, Sorisky A (2005) Phosphoinositide 3-kinase is required for human adipocyte differentiation in culture. *Int J Obes* 29: 1006-1009. doi:10.1038/sj.ijo.0802961. PubMed: 15852047.
41. Fang J, Ding M, Yang L, Liu LZ, Jiang BH (2007) PI3K/PTEN/AKT signaling regulates prostate tumor angiogenesis. *Cell Signal* 19: 2487-2497. doi:10.1016/j.cellsig.2007.07.025. PubMed: 17826033.

3 - Protocolo Comitê de Ética

	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CAMPUS DE BOTUCATU FACULDADE DE MEDICINA		 Comissão de Ética em Experimentação Animal  Criada através da Portaria DFM nº 30 de 28/04/99
Certificado			
Certificamos que o (Protocolo CEEA 959-2012) "Determinação do mecanismo de ação da triiodotironina na modulação da expressão de mRNA e proteína da leptina e TRalpha", a ser conduzido por Miriane de Oliveira, orientada pela Profª Drª Célia Regina Nogueira, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) - Material utilizado: Células 3T3-L1			
Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEEA em 02/08/2012.			
 Profª Drª Maria Rosa Bet Moraes Silva Presidente da CEEA		 Alberto Santos Capelluppi Secretário da CEEA	
Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-970 Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143 e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br			

4- Justificativa de Alteração do Título do Projeto de Pesquisa



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



MUDANÇA DE TÍTULO EM PROJETO DE PESQUISA*

Objetivo Acadêmico: Tese de Doutorado

Título constante no parecer inicial de aprovação:

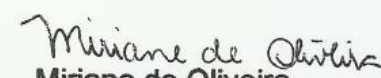
Determinação do mecanismo de ação da triiodotironina na modulação da expressão de mRNA e proteína da leptina e TR α

Título final: Diferentes doses de Triiodotironina (T3) aumentam a expressão gênica de leptina, adiponectina e TR α com o envolvimento da via fosfatidil inositol 3 quinase (PI3K) em adipócitos, 3T3-L1

Data da reunião do CEP que aprovou o parecer inicial: 02/08/2012

Declaramos que o trabalho não sofreu alterações nos objetivos e/ou conteúdo metodológico da época de apresentação para análise do CEP.


Célia Regina Nogueira
Nome/assinatura original do Orientador(a)


Miriane de Oliveira
Nome/assinatura original do Orientado(a)

15:51 22/01/2016 000000 COMITE DE ETICA EM PESQUISA FMB - UNESP

* Projetos submetidos via Plataforma Brasil: preencher o formulário, digitalizar e postar no sistema plataforma brasil (vide instruções contidas no Of. 06/2014-CEP); a seguir, imprimir "print screen" da tela comprovando o aceite pelo CEP da solicitação de alteração;

* Projetos submetidos anteriormente a Plataforma Brasil: preencher o formulário em duas vias e protocolar no CEP que emitiu o Parecer inicial de aprovação

5 - Súmula Curricular – Miriane de Oliveira

1) Formação

Ano	Título ou Atividade	Instituição
2016	Doutorado em Fisiopatologia em Clínica Médica	Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP
2012	Mestrado em Fisiopatologia em Clínica Médica	Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP
2008	Iniciação Científica	Universidade do Sagrado Coração- USC
2009	Graduação em Ciências Biológicas	Universidade do Sagrado Coração- USC

2) Histórico Profissional

a) Experiência Profissional em Pesquisa

2012-2016: Diferentes doses de Triiodotironina (T3) aumentam a expressão gênica de leptina, adiponectina e TR α com o envolvimento da via fosfatidil inositol 3 quinase (PI3K) em adipócitos, 3T3-L1. Funcional: **Doutorado**- Dedicção exclusiva. Financiamento: CAPES

2013 – 2014: The role of non coding RNA in human health and disease" (FP7-PEOPLE-2012-IRSES, Marie Curie Actions "International Research Staff Exchange Scheme (IRSES)"). **Funcional:** Doutorado Sanduíche.

2010 – 2012: Ação Genômica e Não Genômica da Triiodotironina (T3) na Expressão Gênica e Protéica da Leptina e Adiponectina em Células 3T3-L1. Funcional: **Mestrado** - Dedicção exclusiva. Financiamento: CAPES e FAPESP. Processo: 2010/16911-4

2007-2008: Avaliação do efeito do valerato de estradiol no ciclo estral e na histologia da veia poplítea de ratas. Funcional: **Iniciação Científica**.

b) Cursos de curta duração ministrados:

1. Como desenhar primer (2011)

c) Organização de eventos

1. I Workshop Internacional Sobre Envelhecimento (2011)
2. 2º Curso de Atualizações em Técnicas Laboratoriais (2011)

d) Prêmios

2015- 2º lugar da categoria: Ciências Básicas e Medicina Experimental do "Prêmio Eric Roger Wroclawski 2015". Revista Einstein (São Paulo)

2012- Menção Honrosa pelo trabalho científico: Triiodotironina (T3) induz o aumento da expressão gênica de leptina e TR α por meio da via fosfatidil inositol 3 quinase (PI3K) em cultura celular de adipócitos. Departamento de Tireoide da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia-SBEM.

3) Publicações

Artigos completos publicados em periódicos

Primeiro Autor

Oliveira Md, de SÍbio MT, Olimpio RM, Moretto FC, Luvizotto Rde A, Nogueira CR. Triiodothyronine modulates the expression of leptin and adiponectin in 3T3-L1 adipocytes. *Einstein* (São Paulo). 2015;13(1):72-8.

Oliveira Md, Olimpio RM, Sibio MT, Moretto FC, Luvizotto Rde A, Nogueira CR. Short-term effects of triiodothyronine on thyroid hormone receptor alpha by PI3K pathway in adipocytes, 3T3-L1. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2014;58(8):833-7.

de Oliveira M, Luvizotto R de A, Olimpio RM, de Sibio MT, Silva CB, Conde SJ, et al. Modulation of thyroid hormone receptors, TR α and TR β , by using different doses of triiodothyronine (T3) at different times. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2013;57:368-74.

de Oliveira M, Luvizotto Rde A, Olimpio RM, De Sibio MT, Conde SJ, Biz Rodrigues Silva C, et al. Triiodothyronine increases mRNA and protein leptin levels in short time in 3T3-L1 adipocytes by PI3K pathway activation. *PLoS One*. 2013; 18; 8(9):e74856.

Co-autoria

Bertuloso BD, Podratz PL, Merlo E, de Araújo JF, Lima LC, de Miguel EC, de Souza LN, Gava AL, de Oliveira M, Miranda-Alves L, Carneiro MT, Nogueira CR, Graceli JB. Tributyltin chloride leads to adiposity and impairs metabolic functions in the rat liver and pancreas. *Toxicol Lett*. 2015; 19;235(1):45-59.

Cury SS, Oliveira M, SÍbio MT, Clara S, Luvizotto Rde A, Conde S, Jorge EN, Nunes Vdos S, Nogueira CR, Mazeto GM. Gene expression of estrogen receptor-alpha in orbital fibroblasts in Graves' ophthalmopathy. *Arch Endocrinol Metab*. 2015; 59(3):273-6.

Cury SS, Oliveira M, SÍbio MT, Clara S, Luvizotto RD, Conde S, Jorge EN, Nunes VD, Nogueira CR, Mazeto GM. Graves ophthalmopathy: low-dose glucocorticoid increases peroxisome proliferator-activated receptor-gammagene expression. *Arq Bras Oftalmol*. 2014; 77(5):339-340.

De Sibio MT, de Oliveira M, Moretto FC, Olimpio RM, Conde SJ, Luvizon AC, Nogueira CR.. Triiodothyronine and breast cancer. World J Clin Oncol. 2014; 5(3) : 503-508.

De Sibio MT, Luvizotto RA, Olimpio RM, Corrêa CR, Marino J, de Oliveira M, Conde SJ, Ferreira AL, Padovani CR, Nogueira CR. A Comparative Genotoxicity Study of a Supraphysiological Dose of Triiodothyronine (T3) in Obese Rats Subjected to Either Calorie-Restricted Diet or Hyperthyroidism. Plos One. 2013; 8(2): e56913.

c) Capítulo de Livro

1. Renata de A. M. Luvizotto, Sandro J. Conde, **Miriane de Oliveira**, Maria Teresa de Sibio, Keize Nagamti Jr and Célia Regina Nogueira. Obesity and Weight Loss: The Influence of Thyroid Hormone on Adipokines. Editora (InTech). ISBN 980-953-307-179-9; p. 213-250, 2012.

4) Financiamentos

“NADA A DECLARAR”

5) Orientações com bolsa

“NADA A DECLARAR”

6) Indicadores quantitativos

a) Publicações em periódicos: 11

b) Capítulos de livros: 1

d) Quantidade de citações recebidas na literatura científica internacional: 17

7) Outras informações

a) Co-orientações:

1. Rafaela Oliveira Mascarenhas, bolsista PIBIC Junior _CNPQ durante o primeiro e segundo semestre de 2011.

2. Carlos Eduardo Ribeiro Arruda, bolsista PIBIC Junior _CNPQ no período de 08/2012 a 08/2013

b) Participação em banca:

1. Avaliador de trabalho na 1º fase do XXIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP. 2011. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

2. Avaliador de trabalho na 1º fase do XXIV Congresso de Iniciação Científica da UNESP. 2012. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

c) Representante Discente, suplente, junto ao Conselho do Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica, duração do mandato de um ano (2011-2012).

d) Estágios

Setembro/Outubro 2014 - Estágio docência em Fisiologia. Depto. de Fisiologia (IB/Botucatu) - Curso de Graduação em Medicina - FMB – Unesp

Outubro/Junho 2014 - Estágio docência em Endocrinologia e Metabologia. Depto. de Clínica Médica - Curso de Graduação em Medicina - FMB – Unesp

Junho 2012/Junho 2013- Doutorado Sanduíche na “UNIVERSITA DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II” e inserida no projeto "The role of non coding RNA in human health and disease" (FP7-PEOPLE-2012-IRSES, Marie Curie Actions International Research Staff Exchange Scheme (IRSES))

e)Revisão de Periódicos 2013 a 2015

Molecular and Cellular Biochemistry

Translational Research: the journal of laboratory and clinical medicine

Journal of Endocrinology, Diabetes & Obesity

Mediators of Inflammation (Print)

Expert Review of Neurotherapeutics