



UNESP – Universidade Estadual Paulista

Faculdade de Medicina – Botucatu

Departamento de Clínica Médica – Laboratório Biologia Molecular

**AÇÃO DE DIFERENTES DOSES DE TRIIODOTIRONINA (T₃) SOBRE
A EXPRESSÃO GÊNICA DOS RECEPTORES DE HORMÔNIOS
TIREOIDIANOS E LEPTINA EM CULTURA CELULAR DE
ADIPÓCITOS, 3T3-L1**

Miriane de Oliveira

Botucatu

2012

MIRIANE DE OLIVEIRA

**AÇÃO DE DIFERENTES DOSES DE TRIIODOTIRONINA (T₃) SOBRE
A EXPRESSÃO GÊNICA DOS RECEPTORES DE HORMÔNIOS
TIREOIDIANOS E LEPTINA EM CULTURA CELULAR DE
ADIPÓCITOS, 3T3-L1**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
“Fisiopatologia em Clínica Médica – Área de
Concentração – Ciências da Saúde” da Faculdade de
Medicina da Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do
título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Célia Regina Nogueira

Botucatu

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Oliveira, Miriane de.

Ação de diferentes doses de Triiodotironina (T_3) sobre a expressão gênica dos receptores de hormônios tireoidianos e leptina em cultura celular de adipócitos, 3T3-L1 / Miriane de Oliveira. – Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Célia Regina Nogueira

Capes: 4010100

1. Hormônios tireoidianos. 2. Obesidade – Tratamento. 3. Peptídeos hormonais.

Palavras-chave: Leptina; Triiodotironina; $TR\alpha$; $TR\beta$; 3T3-L1.

“A vida me ensinou...

*A dizer adeus às pessoas que amo, sem tirá-las do meu coração;
Sorrir às pessoas que não gostam de mim, para mostrar que sou diferente do que elas pensam;
Calar-me para ouvir;
Aprender com meus erros, afinal eu posso ser sempre melhor;
A lutar contra as injustiças;
A ser forte quando os que amo estão com problemas;
Perdoar incondicionalmente, pois já precisei desse perdão;
Amar incondicionalmente, pois também preciso desse amor;
A sonhar acordada;
A acordar para a realidade (sempre que fosse necessário);
A aproveitar cada instante de felicidade;
A sentir a dor do adeus e do que se acaba, sempre lutando para preservar tudo o que é importante para a felicidade do meu ser;
A abrir minhas janelas para o amor;
A não temer o futuro;
Me ensinou e esta me ensinando a aproveitar o presente, como um presente que da vida recebi, e usá-lo como um diamante que eu mesma tenha que lapidar, lhe dando forma da maneira que eu escolher”.*

(Charles Chaplin)

Dedico á toda minha família, em especial, a meu marido Marcelo e a meus pais, Júlio e Ester.

Agradecimentos

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

Aos meus pais amados, por me ensinarem a alcançar meus objetivos, aos quais devo grande parte do que sou hoje.

Ao meu marido, Marcelo, simplesmente por existir e fazer parte da minha. Por acreditar na minha capacidade e lutar para realizarmos nossos sonhos.

Ao meu sogro Antonio Carlos e minha sogra Dirce por sempre me apoiarem em minha caminhada, por acolherem e cuidarem de mim.

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

Aos meus irmãos, Paulo César e Vitória; meus cunhados Milene, Eduardo e Camila.

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

À Profa. Dra. Gláucia MFS Mazeto 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.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani pelos ensinamentos e auxílio para a realização da análise estatística deste trabalho.

À Profa. Dra. Claudia Oller do Departamento de Fisiologia da UNIFESP pela oportunidade de estagiar em seu laboratório e pelo prazer de tê-la como banca na defesa de minha dissertação.

À Carol Biz que se tornou essencial para realização deste trabalho, por mais que eu lhe agradeça não será o bastante. Muito obrigada.

À Regiane e a Maria Teresa, o que dizer das minhas queridas amigas que me acolheram e me oferecem sua amizade incondicional desde do momento que cheguei no laboratório. A Regi com sua serenidade sempre me acalma e me dá paz; a Má indiscutivelmente sempre pronta a me ajudar, não só a mim, mas a todos que precisam, sem dúvida é uma companheira para todas as horas. Como já disse a vocês não sei se suportaria todas as dificuldades sem a amizade de vocês. Muito obrigada por tudo. Adoro vocês!!!

À Tamara, alguém muito especial, que veio acrescentar mais uma amizade para nós.

À Dona Inês e a Paula Sívio pela amizade e por sempre me acolherem.

À Fernanda pelo carinho e companherismo.

À Renata Luvizotto, amiga querida, você foi fundamental para a realização deste trabalho e é essencial para meu crescimento profissional.

À Patricia Pinto Saraiva, pela confiança, amizade e companherismo.

Ao Sandro Conde pelos ensinamentos e auxílio para o aprimoramento desta dissertação.

À Sueli Clara pela amizade e colaboração.

Aos amigos do Laboratório Experimental: Regina, Juliana Marino, Fábio, Vânia, Denise, Patrícia, André, Dijon, Paula, Sílvio, Loreta, Danielle, Sandrinha, Meleca, Marcelo, Ricardo, Morango, Zé, Mário, Camila Corrêa, Cora, Fernanda, Rogerinho, Boca, Elenize, Cris, Carlos, Renata, Paulinha, Adriana, Camila Bonomo, Daniele, Camila, Sueli Garcia, Ângelo, Vitor, De

Lalla, Bruna, Priscila. Obrigada a todos pela amizade e pelos momentos de descontração no dia a dia.

À Michele, Ana Paula, Marcela e Helga pelo companherismo e distração durante as nossas viagens para Botucatu.

À minha querida Mariane que mesmo longe sei que torce por mim, sinto muito sua falta. “Somos um mesmo sendo dois”.

Às minhas amigas Natália, Luanda, Juliane, Gabriela e ao meu amigo Rafa pelo carinho, companherismo e amizade.

Ao Keize que com seus questionamentos me fez buscar respostas, e com certeza sem saber me ensinou a explorar minha capacidade de ir além do que está a minha frente. Sentimos sua falta!!

Aos funcionários do Departamento de Clínica Médica (Ana Mengue, Elizangela, Bruno, Renato e Alexandre) pela simpatia com que sempre fui recebida e por estarem sempre prontos a me auxiliar.

Aos funcionários e amigos da seção de Pós-graduação (Regina, Nathanael, Janete, Andréa e Lílian) pelo carinho, simpatia e disposição em ajudar sempre!

Ao Beto, da Comissão de Ética em Experimentação Animal.

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

À bibliotecária Luciana Pizzani pela correção das referências desse trabalho.

Ao departamento de Clínica Médica e Laboratório Experimental – 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.

“Os sonhos não determinam o lugar em que você vai estar, mas produz a força necessária para tirá-lo do lugar em que está.”

(Augusto Cury)

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 de forma direta por meio de seus receptores TR α e TR β , ou de forma indireta, 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. A leptina é considerada um sinal adipostático ao cérebro e está envolvida na regulação do balanço energético, assim como os HT. Vários estudos têm procurado relacionar a síntese de leptina com os HT; entretanto, os resultados obtidos são controversos. Assim, nosso objetivo foi verificar a ação de diferentes doses de triiodotironina (T₃) sobre a expressão gênica de leptina e dos receptores TR α e TR β , além disso analisar se a ação desse hormônio é direta ou indireta na modulação desses genes. Para isto utilizamos células 3T3-L1, diferenciadas em adipócitos, e tratadas com diferentes concentrações de T₃ na presença ou ausência de ciclohexamida (CHX), inibidor de síntese protéica, divididas nos seguintes grupos: Controle (C), sem adição de T₃, Fisiológico (F), dose 10⁻⁸ M de T₃, Suprafisiológico I (SI), dose de 10⁻⁷ M de T₃, Suprafisiológico II (SII), dose de 10⁻⁶ M de T₃, dose fisiológica com CHX (FCH), dose suprafisiológica I com CHX (SICH) e dose suprafisiológica II com CHX (SIICH). Após a diferenciação as células 3T3-L1 foram incubadas por uma hora com os tratamentos descritos acima e a expressão de mRNA dos receptores de HT e da leptina foram analisados por PCR em tempo real. Os resultados desse estudo mostraram que a expressão de TR α é significativamente maior que a expressão de TR β em todos os grupos. O T₃ modula a expressão gênica de TR α nos grupos F e SI quando comparados aos grupos C e SII, aumentando sua expressão; resultados diferentes foram encontrados para o gene TR β , que apresentou diminuição da sua expressão apenas no grupo SII, quando comparado aos grupos C, F e SI. A expressão do mRNA de leptina aumentou nos grupos F, SI e SII em relação ao C. Os grupos tratados com CHX e T₃ (FCH, SICH e SIICH) diminuíram a expressão dos genes TR α e TR β , quando comparados aos grupos F, SI e SII, respectivamente; em relação ao gene da leptina houve diminuição apenas nos grupos SICH e SIICH quando comparados aos grupos SI e SII, respectivamente. De acordo com os resultados, podemos concluir que o gene TR α é aumentado por dose fisiológica e suprafisiológica I, porém não é modulado por concentração suprafisiológica II. A expressão

de TR β não se altera na presença de dose fisiológica ou suprafisiológica (10^{-7} M), contudo é suprimida com a administração de dose 10^{-6} M, sendo TR β modulado indiretamente nessa concentração. O hormônio tireoidiano, T $_3$, em dose fisiológica é um regulador direto da expressão do gene leptina, e sua expressão está correlacionada com a expressão do gene TR α , ou seja ocorre o aumento da expressão gênica de leptina em resposta aos níveis de expressão gênica de TR α aumentado; podemos especular que na dose 10^{-8} M ocorre modulação da expressão gênica de leptina pela ação clássica por intermédio do TR α , enquanto em doses suprafisiológicas o T $_3$ aumenta os níveis de expressão gênica da leptina de forma indireta em cultura celular de adipócitos, 3T3-L1. A inibição do aumento da expressão de mRNA pelo T $_3$ com a CHX indicam que os genes são indiretamente induzidos pelos HT, requerendo assim a síntese protéica.

Palavras-chave: Triiodotironina, TR α , TR β , leptina, 3T3-L1.

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 phosphatidyl inositol 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. Leptin is considered an adipostatic signal to the brain and is involved in the regulation of energy balance, as well as HT. Several studies have sought to relate the leptin synthesis with HT, however the results are controversial. The aim of this study was to investigate the action of different triiodothyronine (T₃) doses on leptin, and HT receptors (TR α and TR β) gene expressions, also to considering the action mechanisms of this hormone in these genes modulation. 3T3-L1 cells, differentiated into adipocytes and treated with different T₃ concentrations, in presence or absence of synthesis protein inhibitor, cycloheximide (CHX), were divided into: control (C), without T₃ addition, physiological T₃ dose (F), 10⁻⁸ M, supraphysiological I T₃ dose (SI), 10⁻⁷ M, supraphysiological II T₃ dose (SII), 10⁻⁶ M, physiological T₃ dose with CHX (FCH), supraphysiological I T₃ dose with CHX (SICH) and supraphysiological II T₃ dose with CHX (SIICH). After differentiating 3T3-L1 cells were incubated for one hour with the treatments and HT receptors and leptin mRNA levels were measured by real-time PCR. The results of this study showed that the TR α expression is significantly higher than TR β expression in all groups. T₃ modulates TR α mRNA expression in groups F and SI when compared to the C and SII groups, increasing its expression; different results were found for TR β , which showed decreased mRNA levels in the SII group compared to the C, F and SI groups. Leptin was found increased in the F, SI and SII groups in relation to C. The groups treated with CHX and T₃ (FCH, SICH and SIICH) showed decrease in the gene expression of TR α and TR β , when compared to the F, SI and SII groups, respectively; there was a decrease in leptin gene expression only in the SICH and SIICH groups when compared to the SI and SII. According to these results, we conclude that TR α gene expression is increased by physiological and supraphysiological I doses, but it is not modulated by 10⁻⁶ M dose. The TR β expression is not altered in physiological or supraphysiological I dose (10⁻⁷ M), but is suppressed by administration of 10⁻⁶ M dose, which modulated indirectly TR β mRNA level. The thyroid hormone, T₃, at physiological doses is a direct regulator of leptin gene expression, and its expression is correlated with the expression

of the TR α gene, whereas in supraphysiological doses the mRNA levels are increase indirectly in adipocytes cell cultures, 3T3-L1. Inhibition of increased mRNA expression by T₃ with CHX indicates that the genes are indirectly induced by HT, therefore requiring protein synthesis.

Key words: Leptin; Triiodothyronine; TR α ; TR β ; 3T3-L1.

Lista de Figuras

Figura 1: Representação esquemática das isoformas dos receptores de hormônios tireoidiano (TR).....	20
Figura 2: Ação genômica dos hormônios tireoidianos (HT).....	21
Figura 3: Representação esquemática de ações celulares não genômicas dos hormônios tireoidianos.....	22
Figura 4: Indução dos genes fator indutor de hipoxia (HIF1- α); GLUT1, transportador de glicose 1 fosfofrutoquinase (PFKP) e transportador de mocarboxilato (MCT4) pelo hormônio triiodotironina (T ₃).....	24
Figura 5: Ação central da leptina no balanço energético.....	26
Figura 6: Imagem das células 3T3-L1.....	35
Figura 7: Gráfico expressão gênica do receptor de hormônio tireoidiano TR α com diferentes doses Triiodotironina de (T ₃).....	38
Figura 8: Gráfico expressão gênica do receptor de hormônio tireoidiano TR α com diferentes doses de Triiodotironina (T ₃) e Ciclohexamida (CHX).....	39
Figura 9: Gráfico expressão gênica do receptor de hormônio tireoidiano TR β com diferentes doses de Triiodotironina de (T ₃).....	40
Figura 10: Gráfico expressão gênica do receptor de hormônio tireoidiano TR β com diferentes doses de Triiodotironina de (T ₃) e Ciclohexamida (CHX).....	41
Figura 11: Gráfico expressão gênica de leptina com diferentes doses de Triiodotironina (T ₃).....	42
Figura 12: Gráfico expressão gênica de leptina com diferentes doses de Triiodotironina de (T ₃) e Ciclohexamida (CHX).....	43

Lista de Tabelas

Tabela 1: Ensaios utilizados para RT-q PCR.....	34
Tabela 2: Expressão gênica dos genes receptores de hormônios tireoidianos, TR α e TR β	37
Tabela 3: Correlação entre a expressão gênica de TR α e leptina.....	44
Tabela 4: Correlação entre a expressão gênica de TR α e leptina.....	45

Lista de Abreviaturas

AgRP - Peptídio agouti
ANOVA - Análise de Variância
C - Grupo Controle
CART - Transcrito regulado por cocaína e anfetamina
cDNA - Ácido Desoxirribonucléico Complementar
CHX – Ciclohexamida
DMEM - Dulbecco's Modificado
DNA - Ácido Desoxirribonucleico
ERK1/2 - Quinases reguladas por sinal extracelular 1 e 2
ER α - Receptor de estrógeno alfa
F - Grupo Fisiológico
FCH - Grupo Fisiológico + Ciclohexamida (CHX)
GLUT1 - Transportador de glicose 1
HHA - Hipotálamo-hipófise-adrenal
HIF-1 α - Fator indutor de hipoxia
HRE – Elemento Responsivo ao HIF-1 α
HT - Hormônios tireoidianos
IBMX - 1-metil-3-isobutilxantina
MAPK - Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MIQE - Minimum information for Publication of
Quantitative Real-Time PCR Experiment
MCT4 - Transportador de mocarboxilato
mRNA - Ácido Ribonucleico Mensageiro
NPY - Neuropeptídeo Y
PBS - Tampão fosfato salino
PFKP – Fosfofrutoquinase
PI3K - Fosfatidil Inositol 3 Quinase
PKC α - Proteína quinase C
PLC - Fosfolipase C
POMC – Propiomelanocortina
RNA - Ácido Ribonucleico

Rpm - Rotações por minuto
RT-qPCR - Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
RT - Transcrição reversa
rT3 - T3 reverso
SFB - Soro fetal bovino
SI - Grupo Suprafisiológico I
SICH - Grupo Suprafisiológico I + Ciclohexamida
SII - Grupo Suprafisiológico II
SIICH - Grupo Suprafisiológico II + CHX
T₃ - Triiodotironina
T₄ - Tiroxina
TA - Tecido adiposo
TR - Receptores de Hormônios Tireoideanos
TRE - Elementos Responsivos aos Hormônios Tireoideanos
TR α - Receptor de hormônio tireoidiano alfa
TR β - Receptor de hormônio tireoidiano beta
UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro
ZAKI4 α - Inibidor de calcineurina
 α -MSH - Peptídeo de melanocortina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Hormônios Tireoidianos	19
1.2 Leptina	24
1.3 Hormônios Tireoidianos e Leptina.....	27
2 HIPÓTESE.....	29
3 OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo Geral.....	30
3.2 Objetivos específicos.....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 Protocolo Experimental	31
4.1.1 Estudo <i>in vitro</i>	31
4.1.2 Constatação da Diferenciação das Células 3T3-L1	32
4.2 Avaliação da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR) após Transcrição Reversa (RT).....	32
4.2.1 Extração de RNA.....	32
4.2.2 Análise da qualidade do RNA.....	33
4.2.3 Reação de Transcrição Reversa (mRNA).....	33
4.2.4 PCR quantitativo em Tempo Real (mRNA)	33
4.3 Análise Estatística	34
5 RESULTADOS	35
5.1 Aspectos morfológicos do cultivo das células 3T3-L1	35
5.2 Expressão gênica	36
6 DISCUSSÃO	46
7 CONCLUSÕES.....	50
REFERÊNCIAS.....	51

ANEXOS	58
1- Protocolo Comitê de Ética	58
2- Justificativa de Alteração do Título do Projeto de Pesquisa	59
APÊNDICES	60
A1 - Qualidade da extração de RNA e visualização em gel de agarose 1%	60
A2- Visualização das curvas de amplificação de PCR em tempo real.....	64

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hormônios Tireoidianos

Nos humanos, os hormônios tireoidianos (HT) são essenciais para o desenvolvimento normal, crescimento e metabolismo, principalmente durante o desenvolvimento fetal e na infância. Em adultos, o principal efeito dos HT é acelerar o gasto energético. São observados efeitos diretos sobre o consumo de oxigênio, assim como no metabolismo de proteínas e vitaminas (Yen, 2001).

Os HT estão envolvidos na regulação do metabolismo de lipídios e carboidratos no fígado, músculo esquelético e coração (Santini *et al.*, 2004); também influenciam o metabolismo e o desenvolvimento do tecido adiposo por meio da modulação da proliferação e da diferenciação de adipócitos (Darimont *et al.*, 1993), além de estimularem tanto a lipólise quanto a lipogênese (Oppenheimer *et al.*, 1991).

A fonte de HT é a glândula tireóide, que secreta predominantemente tiroxina (T_4), da qual deriva por desiodação, a maior parte da triiodotironina (T_3) circulante. É do T_3 , hormônio que apresenta atividade biológica no mínimo cinco vezes maior que a do T_4 , que depende a atividade de praticamente todos os tecidos do organismo. Desta forma, para a manutenção da atividade normal dos tecidos-alvo, concentrações intracelulares adequadas de T_3 devem ser garantidos, o que está na dependência não só da atividade tireoidiana como também da geração intracelular deste hormônio; esse processo depende, respectivamente, da integridade do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide e da atividade de enzimas específicas, as desiodases (Nunes, 2003).

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 (Cheng *et al.*, 2010).

A ação dos HT é mediada, principalmente, pela modificação da expressão gênica, por meio de receptores nucleares, fatores transcripcionais regulados por ligantes que aderem à cromatina (Chin & Yen, 1997; Cheng *et al.*, 2010). Os receptores de hormônios tireoidianos (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 ($TR\beta$) (Williams, 2000; Macchia *et al.*, 2001) que, nos humanos, localizam-se nos cromossomos 17 e 3, respectivamente. 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 α e TR β (Fig. 1) (Flamant & Samarut, 2003).

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 (Forrest & Vennström, 2000). Estes receptores nucleares agem em genes específicos por meio de seqüências nucleotídicas denominadas elementos responsivos ao hormônio tireoideano (TRE), localizados nas regiões promotoras dos genes alvos (Glass, 1994). Apesar dos TR serem primariamente receptores nucleares, aproximadamente 10% são encontrados no citoplasma (Baumann *et al.*, 2001).

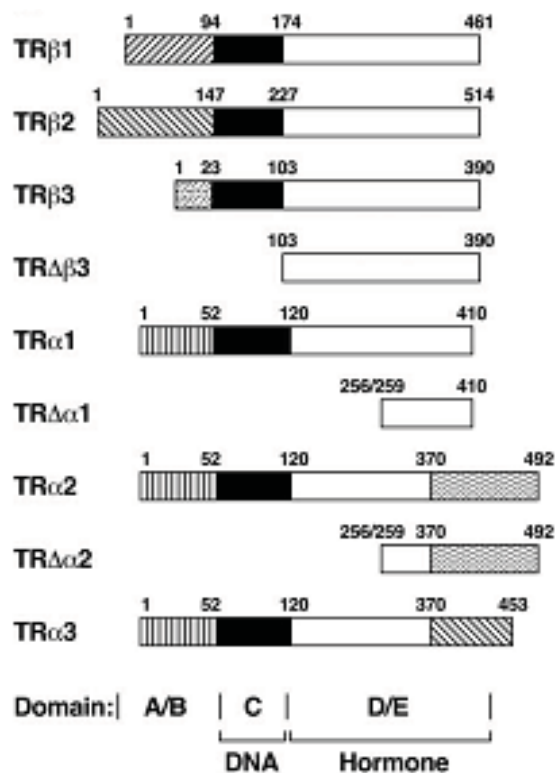


Figura 1. Representação esquemática das isoformas de receptores de hormônios tireoidianos (TR). TR são codificados pelos genes TR α e TR β , localizados nos cromossomos 17 e 13, respectivamente. O *splicing* alternativo de transcritos primários dá origem a quatro TR β e cinco TR α , isoformas de TR. Os TR compartilham seqüência de homologia no domínio de ligação ao DNA (C) e ligação ao domínio de ligação ao hormônio (D/E). Os domínios amino-terminal A/B são variáveis em comprimento e seqüência 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 *et al.*, 2010.

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) (Moeller & Broecker-Preuss, 2011). 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 T_3 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 (Moeller *et al.*, 2006).

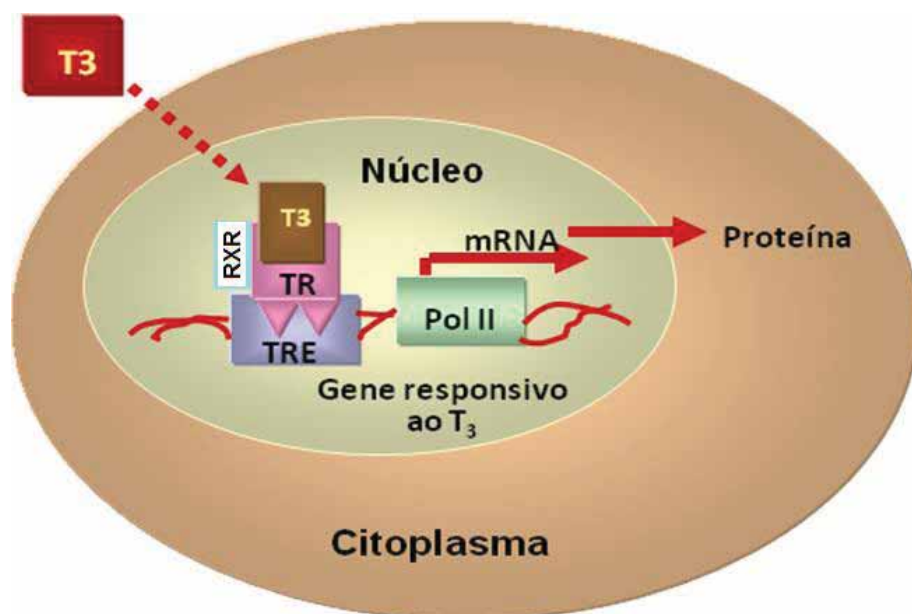


Figura 2. Ação clássica dos hormônios tireoidianos (HT). Ação genômica requer elemento responsivo ao hormônio tireoidiano (TRE) para transcrição de genes alvos. T_3 , triiodotironina; TR, receptores de HT; RXR, receptor de ácido retinóico; Pol II, polimerase II; mRNA, ácido ribonucleico mensageiro. Adaptada de Moeller *et al.*, 2006.

Recentemente evidenciou-se que os HT podem agir por meio de outros mecanismos (Fig. 3), além da ação clássica TR/TRE (Moeller, 2011), 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 (Cheng *et al.*, 2010).

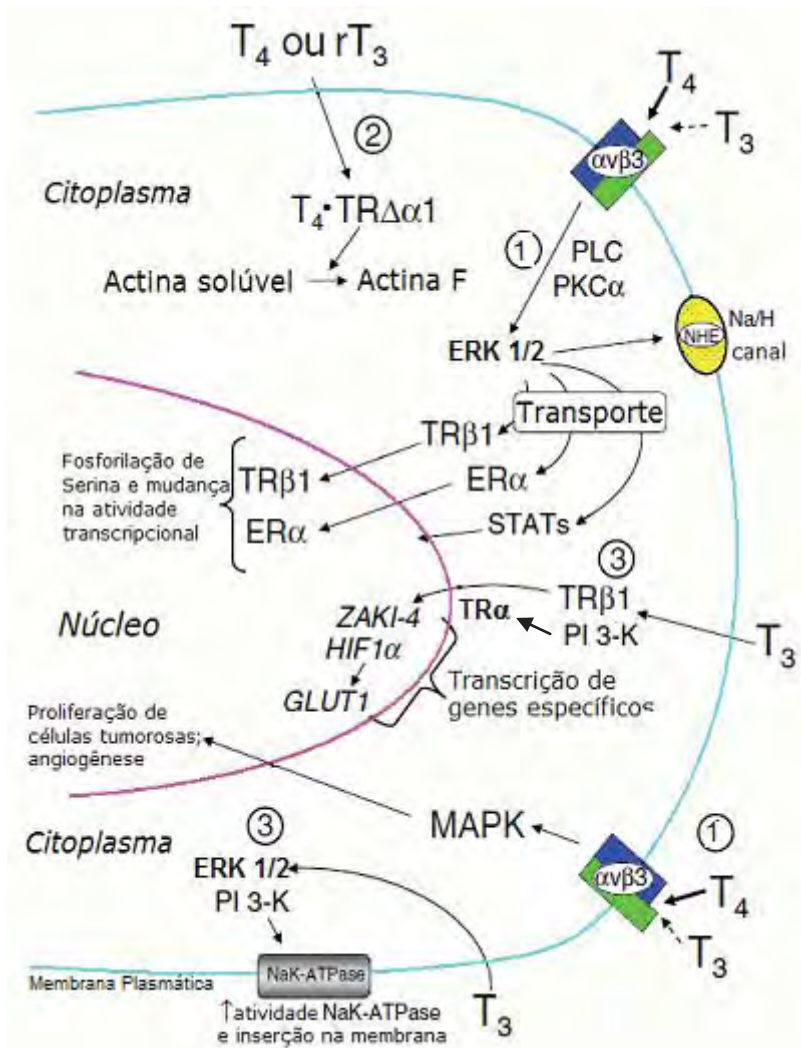


Figura 3. Representação esquemática de ações celulares não clássicas dos hormônios . 1) Ações de HT via integrina $\alpha v\beta 3$. 2) Ações de HT via $TR\Delta\alpha 1$. 3) Ações de HT via PI3K. T_3 , triiodotironina; T_4 , tiroxina; $TR\alpha$, receptor alfa dos HT; $TR\Delta\alpha 1$, forma truncada de $TR\alpha 1$; PLC, fosfolipase C; $PKC\alpha$, proteína quinase C; $TR\beta 1$, receptor beta dos HT; $ER\alpha$, 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; HIF1 α , 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.

Uma das vias consideradas não clássica é a ativação da integrina $\alpha v\beta 3$ pelos HT. A integrina $\alpha v\beta 3$ 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 (Davis *et al.*, 2008). 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) (Moeller *et al.* 2005; Cheng, 2010; Moeller & Broecker-Preuss, 2011).

Essas ações não genômicas dos HT podem ocorrer em ambientes extranucleares, independentes da presença de TR e agir rapidamente em proteínas não necessitando modular a expressão do gene (Moeller *et al.*, 2006). 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) (Davis *et al.*, 2008; Cheng, 2010). 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 (Storey *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2010).

Os mecanismos denominados não genômicos 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. (Moeller & Broecker-Preuss, 2011). Isto demonstra que pode haver uma inter-relação entre os eventos genômicos e não genômicos 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.* (2005) 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 protéica, 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 era 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 (Moeller *et al.*, 2005). 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 protéica anterior a expressão do gene alvo (Figura 4).

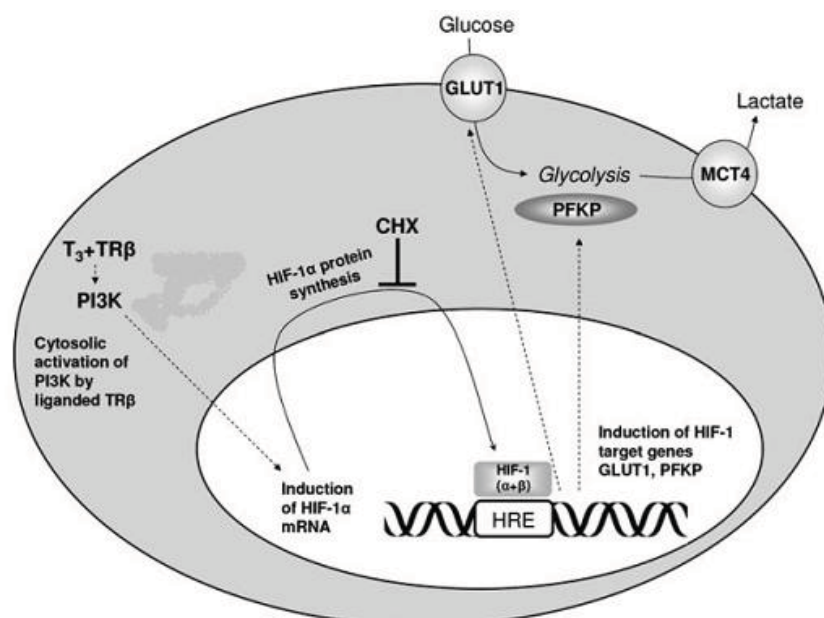


Figura 4. Indução dos genes fator indutor de hipoxia (HIF1- α); GLUT1, transportador de glicose 1 fosfofrutoquinase (PFKP) e transportador de mocarboxilato (MCT4) pelo hormônio triiodotironina (T₃). Ativação da fosfatidil inositol 3 quinase (PI3K) no citoplasma pelo T₃ que se liga ao TR β modulando diretamente o gene HIF1- α que é traduzido (síntese proteica), e a proteína HIF-1 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.*, 2005).

1.2 Leptina

O tecido adiposo (TA) participa ativamente na regulação da energia corporal. As células adiposas produzem várias substâncias biologicamente ativas, as adipocinas, com diferentes funções fisiológicas, destacadamente a leptina (Tilg & Moschen, 2006). A leptina é uma proteína sérica de 16 kDa com meia vida de 25 – 40 minutos (Flier *et al.*, 2000); essa proteína, produto do gene obeso (*ob*), é composta por 167 aminoácidos. Apesar de ser sintetizada e secretada principalmente pelos adipócitos, a leptina pode ser encontrada na placenta, coração, ovários, glândulas mamárias e endotélio gástrico (Zhang *et al.*, 1994; Campfield *et al.* 1995; Paracchini *et al.*, 2005).

A partir da descoberta da leptina em 1994 pelo grupo do Dr. Friedman, da Universidade Columbia de Nova York (Rodrigues *et al.*, 2003), o TA deixou de ser visto apenas como um depósito de energia e passou a ser considerado um importante órgão endócrino (Friedman & Halaas, 1998). A leptina tem sido apontada como sinalizador para o sistema nervoso central (SNC), principalmente para o hipotálamo, do estoque de gordura corporal (Houseknecht & Portocarrero, 1998; Sansinanea *et al.*, 2001).

Os efeitos da leptina são mediados por seus receptores encontrados predominantemente no hipotálamo, os quais são essenciais para que haja os efeitos centrais e periféricos (Bell-Anderson & Bryson, 2004). Alguns estudos indicam que a leptina pode circular na forma livre, ou ainda ligada a receptores solúveis (sOB-R), o que parece postergar a meia vida desse hormônio. Entretanto, apesar dos receptores solúveis aumentarem a meia-vida da leptina, a sua forma livre parece ser a mais biologicamente ativa (Chan *et al.*, 2002; Mann *et al.*, 2003).

A leptina é considerada um sinal adipostático ao cérebro sobre o balanço energético. Nesse sentido, a leptina age no hipotálamo, principalmente no núcleo arqueado, por meio de duas populações de neurônios: os orexígenos (subpopulação 1), que basicamente secretam o neuropeptídeo Y (NPY) e o peptídeo agouti (AgRP); e os anorexígenos (subpopulação 2), que secretam o transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART) e o peptídeo de melanocortina (α -MSH), derivado do proopiomelanocortina (POMC). Sinais em resposta à ingestão ou à privação de alimentos são capazes de se ligar aos receptores nessas duas populações de neurônios regulando a ingestão de alimentos e/ou o gasto energético. A leptina exerce diferentes respostas nessas sub-regiões hipotalâmicas (Bouret & Simerly, 2004); a ligação da leptina aos seus receptores (Ob-Rb) nos neurônios orexígenos inibe a atividade dessas células e reduz a liberação de NPY e AgRP. Por outro lado, a leptina estimula a atividade dos neurônios anorexígenos, aumentando a liberação de α -MSH e CART. Dessa forma, situações que aumentam a concentração plasmática de leptina levam à inibição dos neurônios NPY/AgRP e à estimulação dos neurônios α -MSH/CART, causando diminuição da ingestão alimentar. Já, situações em que ocorre diminuição na concentração de leptina, os neurônios anorexígenos não são suficientemente estimulados e os neurônios orexígenos deixam de ser inibidos, levando ao aumento da ingestão alimentar (Fig. 5) (Bouret & Simerly, 2004). A queda na concentração de leptina devido ao jejum leva a supressão do eixo hipotalâmico-pituitário-gonadal sinalizando a fome (El-Haschimi *et al.*, 2000), uma exposição prolongada ao jejum diminui os níveis plasmáticos de leptina, ao passo que alimentação excessiva aumenta sua concentração.

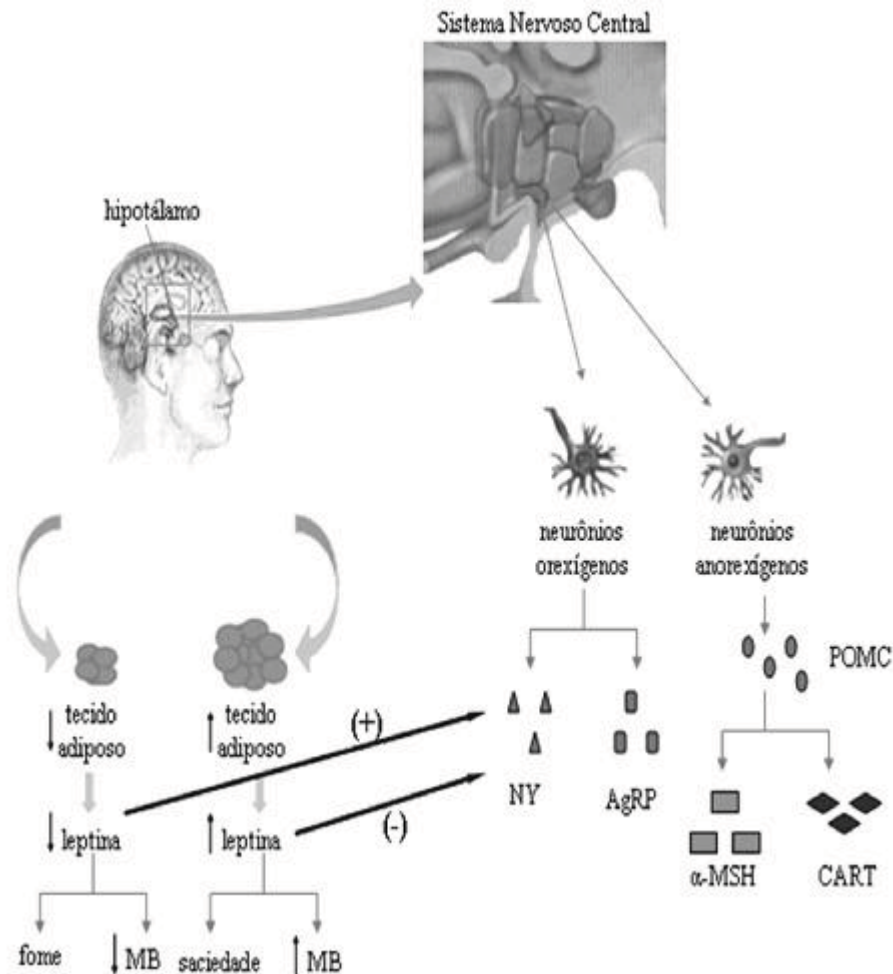


Figura 5. Ação central da leptina no balanço energético. MB, Metabolismo Basal; NY, Neuropeptídeo Y; AgRP, proteína relacionada a agouti; POMC, proteína derivada da pro-priomelanocortina; α -MSH, peptídeos de melanocortina; CART, peptídeo derivado da cocaína. Ribeiro et al., 2007.

A função da leptina vai além da regulação do peso corpóreo pois também participa da fisiologia da puberdade e da reprodução, informando ao cérebro se as reservas energéticas são suficientes para sustentar o início da puberdade e da reprodução.

A leptina também é responsável por estimular a oxidação de ácidos graxos e a captação de glicose, impedindo assim o acúmulo de gordura nos tecidos não-adiposos, causando prejuízo nas suas funções, devido à “lipotoxicidade”, causada pelo excesso de triglicerídeos nos tecidos como músculos, fígado, coração e pâncreas. É provável que a leptina interfira indiretamente sobre a massa óssea por meio da sua relação com a massa gordurosa, fonte importante de esteróides sexuais no climatério. Além desses fatores, a leptina tem papel fundamental sobre os sistemas imunológico, hematopoiético e cardiovascular (Schwartz *et al.*, 1995; Minokoshi *et al.*, 2002).

1.3 Hormônios Tireoidianos e Leptina

Vários autores sugerem que o estado tireoideano em seres humanos (Yaturu *et al.*, 2004; Saito *et al.*, 2005) e roedores (Kokkinos *et al.*, 2007) pode regular a produção de leptina, apesar de existir muita divergência na literatura.

O TA representa um importante alvo dos HT (Obregon, 2008). Juntamente com o sistema nervoso simpático o TA tornou-se um dos mais importantes reguladores do balanço energético e termogênese em animais homeotérmicos (Silva, 2006). A leptina, produto do TA, está envolvida na regulação do balanço energético assim como os HT (Vendrell *et al.*, 2004).

Desde que foi descoberto que a leptina aumenta a taxa metabólica basal (TMB), vários estudos têm procurado relacioná-la com os HT (Näslund *et al.*, 2000). Viguerie *et al.* (2002) 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 (Darimont *et al.*, 1993), 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 (Viguerie *et al.*, 2002). Existe a possibilidade da interferência direta do estado tireoidiano sobre a produção de adipocinas no TA, uma vez que este possui todos os TR, sendo TR α 1 a isoforma predominante (Saito *et al.*, 2005).

Outra relação entre leptina e HT foi mostrada durante restrição alimentar, onde atividade da tireóide cai levando a redução do gasto energético. A secreção de leptina também diminui com a restrição de alimentos, sugerindo que a leptina e a tireóide podem responder paralelamente (Pinkey *et al.*, 1998).

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 (Luvizotto *et al.*, 2010). 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.* (1999) mostrou que a concentração plasmática de leptina encontrou-se 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.* (1997), em seu estudo com ratas tireodectomizadas, demonstraram que a infusão de T_3 ou T_4 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.* (1997) demonstraram, *in vitro*, que o T_3 aumentou significativamente a expressão de mRNA leptina e elevou os níveis de secreção desta proteína em adipócitos 3T3-L1. Segundo Yoshida *et al.* (1998), concentrações fisiológicas de T_3 aumentam a expressão de mRNA e secreção de leptina nestas células; estes resultados sugerem concentrações fisiológicas de HT são necessários para a secreção apropriada de leptina.

2 HIPÓTESE

Os hormônios tireoidianos estão envolvidos na regulação do tecido adiposo e este é responsável pela síntese e liberação da leptina. Assim hipotetizamos que diferentes doses de T_3 aumentam a expressão gênica de leptina, por ação direta do hormônio.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito de diferentes doses de T_3 na expressão gênica de leptina em cultura celular de adipócitos 3T3-L1.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar a expressão gênica dos receptores de HT, $TR\alpha$ e $TR\beta$, nas células 3T3-L1.
- Verificar a modulação do $TR\alpha$ e $TR\beta$ por diferentes doses de T_3 .
- Verificar se ação do T_3 é direta ou indireta na modulação da expressão dos genes leptina, $TR\alpha$ e $TR\beta$, em células 3T3-L1.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Protocolo Experimental

4.1.1 Estudo *in vitro*

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP (anexo 01).

Para o estudo *in vitro* foi utilizada a linhagem celular 3T3-L1, célula que apresenta morfologia semelhante à fibroblastos com, características de pré-adipócitos que, sob condições apropriadas, se diferenciam em adipócitos. Essas células foram adquiridas do Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e foram cultivadas em meio Dulbecco's Modificado (DMEM) (Gibco®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco®), 1% antibiótico/antimicótico (Sigma®), sob uma atmosfera de 5% de CO₂ a uma temperatura de 37°C. As células foram mantidas em cultura nessas condições até atingirem a confluência de aproximadamente 100% e em seguida foram transferidas para placas de seis poços, para realização dos experimentos. Após atingirem 100% de confluência nos poços, as células foram submetidas a um processo de diferenciação, permanecendo três dias em meio DMEM, contendo 10% de SFB, 100 mM de 1-metil-3-isobutilxantina (IBMX) (Sigma®), 1mM de dexametasona (Sigma®) e 5mg/L de insulina (Sigma®). Após esse período, as células ficaram sete dias em meio DMEM contendo, 10% de SFB e 5 mg/ml de insulina. Após o período de diferenciação celular os adipócitos foram submetidos à depleção do HT por 36h. Para isso as células foram mantidas em meio DMEM suplementado com soro fetal Charcoal Stripped (Sigma®), depletado de HT. Após a depleção do HT as células foram submetidas aos tratamentos em triplicata biológica, descritos a seguir.

1. Grupo Controle - (C): células que foram incubadas em meio depletado de HT.
2. Grupo Fisiológico - (F): células que foram tratadas com concentração de 10⁻⁸ M de T₃, por 1 hora.
3. Grupo Fisiológico + Ciclohexamida (CHX) - (FCH): células que foram tratadas com concentração de 10⁻⁸ M de T₃ mais 10ug/ml de inibidor de síntese protéica (CHX), por 1 hora.
4. Grupo Suprafisiológico I - (SI): células que foram tratadas com concentração de 10⁻⁷ M de T₃, por 1 hora.

5. Grupo Suprafisiológico I + CHX - (SICH): células que foram tratadas com concentração de 10^{-7} M de T_3 mais 10ug/ml de inibidor de síntese protéica (CHX), por 1 hora.
6. Grupo Suprafisiológico II (SII): células que foram tratadas com concentração de 10^{-6} M de T_3 , por 1 hora.
7. Grupo Suprafisiológico II + CHX - (SIICH): células que foram tratadas com concentração de 10^{-6} M de T_3 mais 10ug/ml de inibidor de síntese protéica (CHX), por 1 hora.

Após os tratamentos especificados, o meio foi retirado e as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) para retirar o excesso de meio.

4.1.2 Constatação da Diferenciação das Células 3T3-L1

Após 10 dias de diferenciação foi retirado o meio de cultura das células e foram lavadas duas vezes com PBS. Posteriormente acrescentou-se 1ml de formaldeído e deixado por 30 minutos a temperatura ambiente, após esse tempo lavou-se as células três vezes com PBS. Em seguida colocou-se 300µl de corante *Oil Red O* (Sigma®), incubou-se por 2 horas a 37°C. Após esse período foram lavadas três vezes com água destilada e colocadas na estufa para secar. As células foram observadas no microscópio para constatar a diferenciação pela coloração em vermelho das células adiposas.

4.2 Avaliação da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR) após Transcrição Reversa (RT)

Os experimentos de RT-qPCR foram realizados seguindo as orientações do *Minimum information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiment* (MIQE) (Bustin et. al, 2009).

4.2.1 Extração de RNA

Após o tempo de tratamento, o meio de cultura DMEM foi removido e as células foram retiradas das placas com 400µl de Trizol® (Life Tech, EUA). A extração de RNA foi realizada com Trizol® (Life Tech, EUA), seguindo-se a recomendação do fabricante.

4.2.2 Análise da qualidade do RNA

Para verificar a integridade do RNA, amostras de um μL do RNA total foram diluídas em oito μL de água ultrapura e um μL de corante (Orange G, Acros Organics, New Jersey, USA), aplicadas em gel de agarose 1% (0,3 g agarose, 30 mL de TAE Buffer 1x, três μL de brometo de etídio) e submetidas a uma voltagem de 80 mV (Power Pac Basic™ Bio-Rad, Hercules, CA, USA) por 30 minutos. Terminada a eletroforese o gel foi colocado sobre o Foto UV/WhiteDarkroom (UVP Laboratory Products) que, corado com laranja de acridina, permitiu que o RNA fosse visualizado e fotografado. A integridade do RNA foi constatada pela visualização das bandas de RNA ribossômico, 28S, 18S e 5S.

Além da verificação da integridade do RNA pelo gel, as amostras de RNA total foram analisadas com auxílio de um espectrofotômetro (NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer Thermo Scientific). As amostras, cujas razões 260/280 estavam inferiores a 1,6, foram descartadas por apresentarem contaminação por proteínas. As amostras íntegras foram mantidas a -80°C até o momento de uso.

4.2.3 Reação de Transcrição Reversa (mRNA)

Transcrição reversa é um processo que converte as moléculas do RNA em ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA). O cDNA foi sintetizado a partir de um μg de RNA por reação de transcrição reversa utilizando-se do High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, foram adicionados ao RNA: dois μl de tampão 10x, 0,8 μl do mix de dNTP 100 mM, dois μl de random primer, um μl de inibidor de RNase, um μl da enzima Transcriptase Reversa e 11,2 μl de água livre de nuclease. Em seguida, as amostras foram incubadas a 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 85°C por 5 segundos e mantida a 4°C . Ao final da reação a amostra foi mantida em gelo e o cDNA foi estocado em freezer -20°C .

4.2.4 PCR quantitativo em Tempo Real (mRNA)

Cada amostra de cDNA foi analisada com ensaios *TaqMan* (Life Technologies, EUA), contendo primers específicos (Tabela 1) para o(s) mRNA alvo(s). Para cada reação, foram utilizados 10 μL de TaqMan® Universal PCR Master Mix (Life Technologies, EUA), 4 μL do

produto da reação de transcrição reversa e o volume final ajustado para 20 μ L com água livre de nucleases. As amostras foram normalizadas pelo controle interno *Ciclofilina* e a quantificação da expressão realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

Tabela 1. Ensaios utilizados para PCR em Tempo Real (Life Tech, CA, EUA).

Gene	Código <i>Ensaio</i>
Lep	Mm00434759_m1
TRβ	Mm00437044_m1*
TRα	Mm00617505_m1*
Ciclo	Mm00434759_m1

Lep: leptina; TR α : receptor α para HT; TR β : receptor β para HT. Ciclo: ciclofilina, controle interno para as reações do RT-qPCR. * Os ensaios são correspondentes a sequência homóloga para todas as diferentes isoformas dos TR.

4.3 Análise Estatística

Todos os dados foram expressos como média \pm desvio padrão.

Os tratamentos dentro dos grupos foram comparados por análise de variância (ANOVA) para modelos de dois fatores, complementada por teste de comparações múltiplas de Tukey. Os tratamentos entre os grupos foram comparados por ANOVA para modelos com um fator, complementada por teste de comparações múltiplas de Tukey. Para verificar correlação entre a expressão gênica de diferentes genes, utilizamos o teste de correlação linear de Pearson. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

5.1 Aspectos morfológicos do cultivo das células 3T3-L1

A figura 6 apresenta as células 3T3-L1 em A e B, antes da diferenciação. As células na presença do coquetel de diferenciação (insulina, dexametasona e IBMX) convertem-se de pré-adipócitos para adipócitos, com morfologia de adipócitos maduros, representados em C e D, caracterizados pela grande quantidade de gotículas lipídicas no citoplasma. Essas gotículas tornam-se mais evidentes na coloração com *oil red* (D), podemos observar em vermelho os lipídeos.

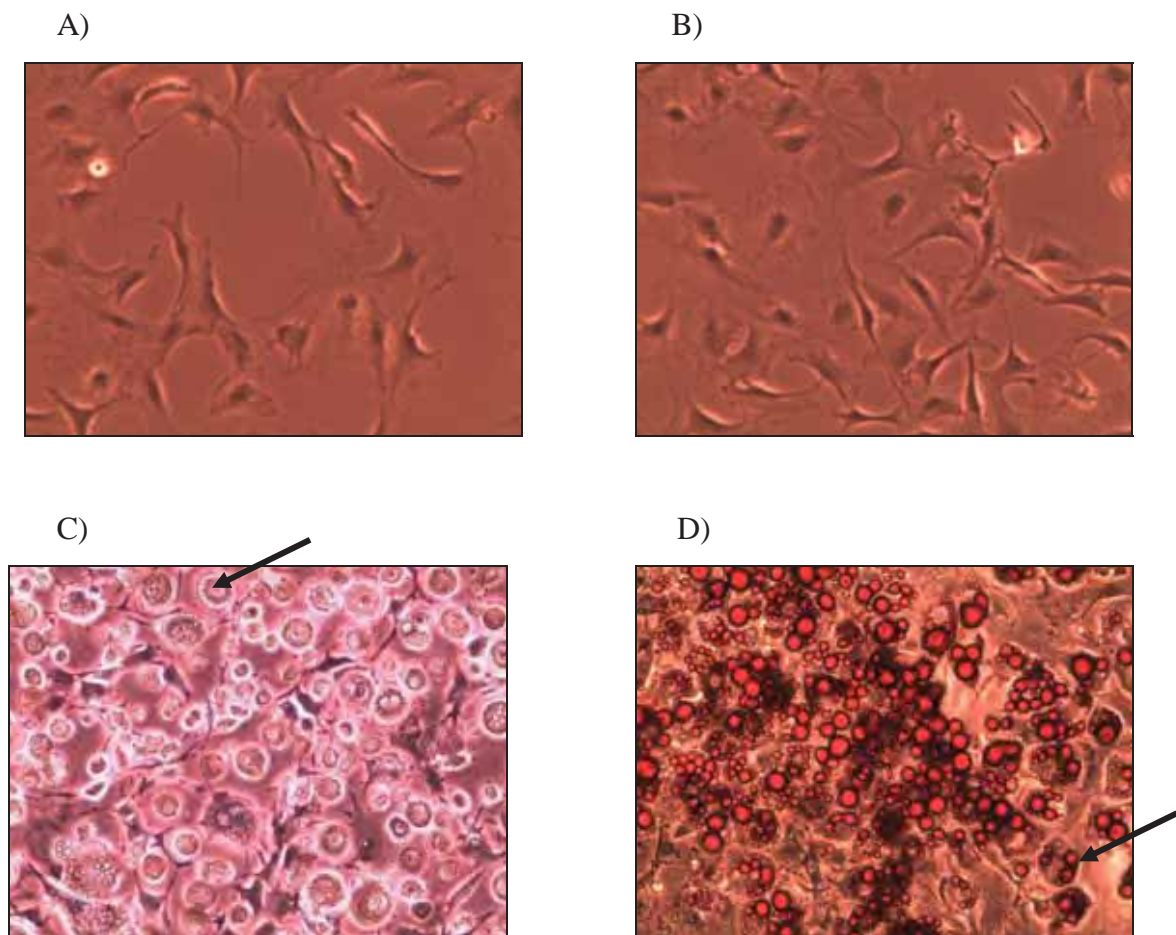


Figura 6. Imagem das células 3T3-L1. A) Células indiferenciadas não confluentes. B) Células indiferenciadas quase confluentes. C) Células após 10 dias de diferenciação. D) Células como *oil red* após 10 dias de diferenciação. As setas indicam um adipócito com gotículas lipídicas no citoplasma.

5.2 Expressão gênica

Para quantificação da expressão gênica por PCR quantitativo (a visualização das curvas de amplificação de PCR em tempo real para cada gene está apresentada na seção apêndice – A2), foi utilizado amostra de 3 tratamentos por grupo (a qualidade da extração de RNA e visualização em gel de agarose 1% para todos os grupos estão apresentadas na seção apêndice – A1).

A Tabela 2 mostra a expressão de mRNA dos receptores de HT, TR α e TR β . A expressão de TR α se mostra maior que a expressão TR β em todos os grupos do experimento. Podemos observar que mesmo antes dos tratamentos, no grupo C, a expressão de TR β é aproximadamente 100 vezes menor que a expressão do TR α . No grupo F, onde foi administrada dose fisiológica de T₃, expressão de de TR α se mostra 176 vezes maior que a de TR β . No grupo SI o TR β comparado ao TR α tem sua expressão 213 vezes menor.

Tabela 2. Comparação entre a expressão gênica dos genes receptores de HT, TR α e TR β para os grupos controle (C), F (fisiológico), fisiológico com ciclohexamida (FCH), suprafisiológico I (SI), suprafisiológico I com ciclohexamida (SICHX), suprafisiológico II (SII) e suprafisiológico II com ciclohexamida (SIICH).

Grupo	Expressão Gênica		
	Tr α	Tr β	<i>p</i>
C	1 \pm 0,085	0,012 \pm 0,002	< 0,001
F	1,78 \pm 0,21	0,013 \pm 0,0005	< 0,001
FCH	1,15 \pm 0,05	0,010 \pm 0,002	< 0,001
SI	2,14 \pm 0,43	0,009 \pm 0,003	< 0,001
SICH	0,99 \pm 0,15	0,008 \pm 0,0009	< 0,001
SII	0,86 \pm 0,12	0,005 \pm 0,0003	< 0,001
SIICH	0,53 \pm 0,03	0,003 \pm 0,0005	< 0,01

Foi utilizado ANOVA complementada com o teste de Tukey. Comparação entre colunas, diferença de expressão gênica de TR α e TR β entre os grupos. Dados expressos em média \pm desvio-padrão. As amostras foram normalizadas pelo controle interno (ciclofilina) e o grupo C, TR α , foi ajustado para 1. Todos os grupos, independente do gene, foram normalizados pelo grupo C de TR α . C, controle (ausência de T₃); F, dose fisiológica de T₃ (10⁻⁸ M); SI, dose supra fisiológica I de T₃ (10⁻⁷ M); SII, dose supra fisiológica II de T₃ (10⁻⁶ M); FCH, dose fisiológica de T₃ (10⁻⁸ M) e CHX ; SICH dose supra fisiológica I de T₃ (10⁻⁷ M) e CHX; SIICH, dose supra fisiológica II de T₃ (10⁻⁶ M). Valor de *p*<0, 05, considerado significativo.

A figura 7 mostra a expressão de mRNA de TR α na presença de diferentes doses de T $_3$. As amostras foram normalizadas pelo controle interno (ciclofilina) e o grupo C foi ajustado para um. A expressão de TR α aumentou nos grupos F e SI em relação ao C e SII. A expressão gênica de TR α no grupo SII não se alterou em relação ao C.

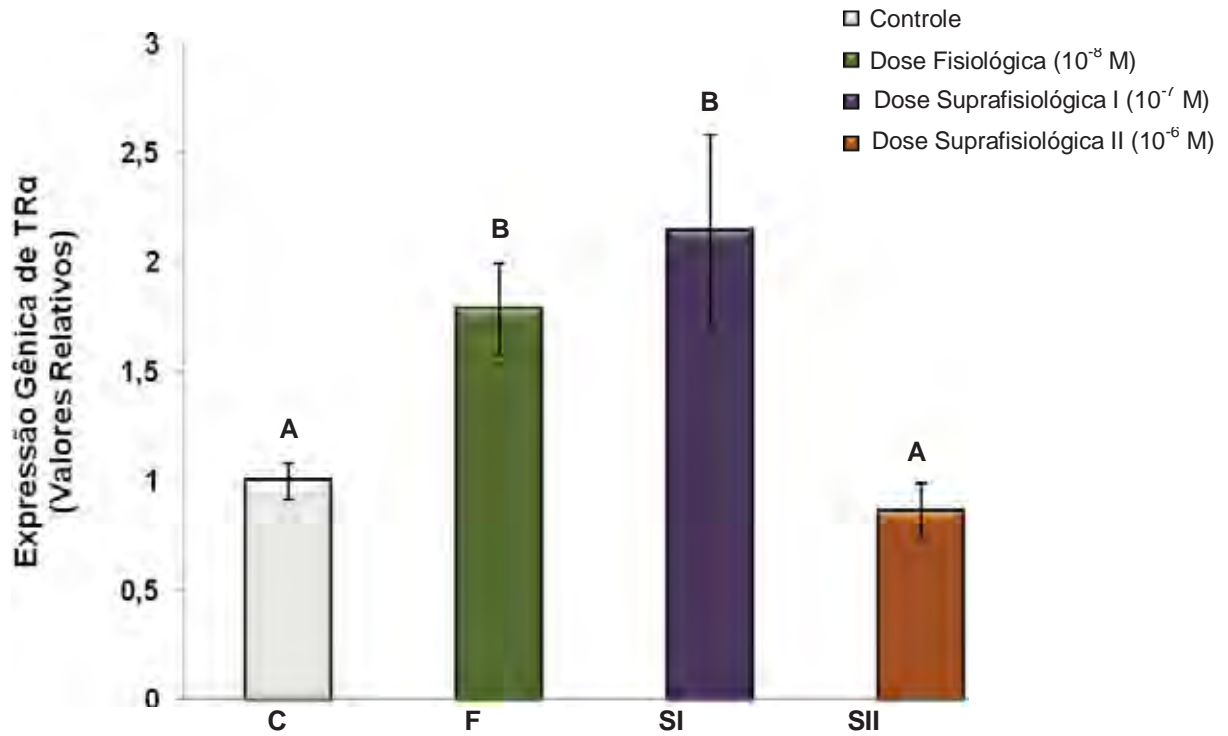


Figura 7. Influência das diferentes doses de T $_3$ sobre a expressão gênica de TR α em adipócitos, 3T3-L1. C, controle (ausência de T $_3$); F, dose fisiológica de T $_3$ (10 $^{-8}$ M); SI, dose supra fisiológica I de T $_3$ (10 $^{-7}$ M); SII, dose supra fisiológica II de T $_3$ (10 $^{-6}$ M); T $_3$, triiodotironina. O experimento foi realizado em duplicata e foram utilizadas 3 amostras por grupo. Dados expressos em média e desvio-padrão. Foi utilizada a técnica ANOVA complementada com o teste de Tukey. Letras iguais = $p > 0,05$; letras diferentes = $p < 0,05$.

Na figura 8 pode-se observar o efeito da ciclohexamida na expressão gênica de TR α em relação aos grupos F, SI e SII, em A, B e C, respectivamente. As amostras foram normalizadas pelo controle interno (ciclofilina) e os grupos F, SI e SII foram ajustados para um. Os grupos FCH (A), o grupo SICH (B) e o grupo SIICH (C) apresentaram diminuição da expressão de mRNA de TR α em relação aos grupos F, SI e SII, respectivamente.

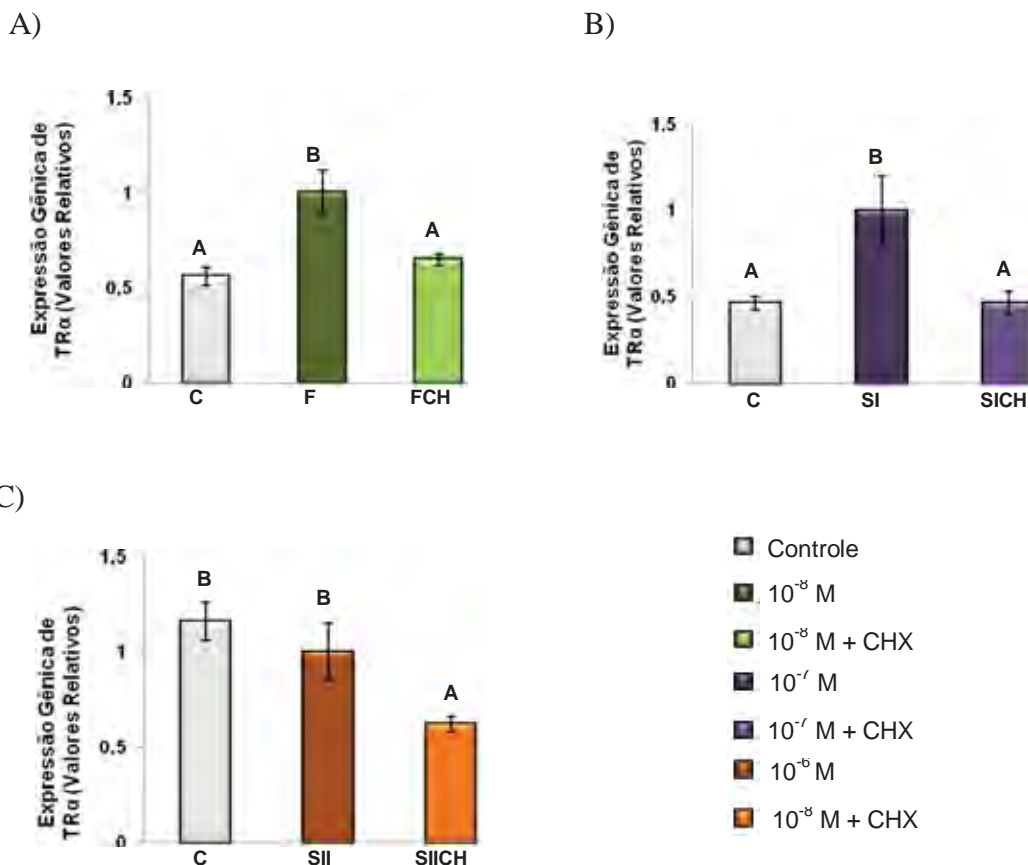


Figura 8. A) O efeito do T₃ em dose fisiológica sobre os níveis de mRNA de TR α na presença do Inibidor de Síntese Proteica, CHX, em adipócitos 3T3-L1. B) O efeito do T₃ em dose supra fisiológica I, dez vezes mais que a fisiológica, sobre os níveis de mRNA de Leptina na presença do Inibidor de Síntese Proteica, CHX. C) O efeito do T₃ em dose supra fisiológica II, cem vezes mais que a fisiológica, sobre os níveis de mRNA de Leptina na presença do Inibidor de Síntese Proteica, CHX. T₃, triiodotironina; CHX, ciclohexamida; C, controle (ausência de T₃); F, dose fisiológica de T₃ (10⁻⁸ M); SI, dose supra fisiológica I de T₃ (10⁻⁷ M); SII, dose supra fisiológica II de T₃ (10⁻⁶ M); FCH, dose fisiológica de T₃ (10⁻⁸ M) e CHX ; SICH dose supra fisiológica I de T₃ (10⁻⁷ M) e CHX; SIICH, dose supra fisiológica II de T₃ (10⁻⁶ M) e CHX . O experimento foi realizado em duplicata e foram utilizadas três amostras por grupo. Dados expressos em média e desvio-padrão. Foi utilizada a técnica ANOVA, complementada com o teste de Tukey. Letras iguais = p>0,05; letras diferentes = p<0,05.

Podemos observar na figura 9 a expressão gênica de TR β para os diferentes grupos de tratamento com T $_3$. As amostras foram normalizadas pelo controle interno (ciclofilina) e o grupo C foi ajustado para um. A expressão de TR β não se alterou nos grupos F e SI quando comparados ao C. No grupo SII a expressão de TR β mostrou-se diminuída em relação aos grupos C, F e SI.

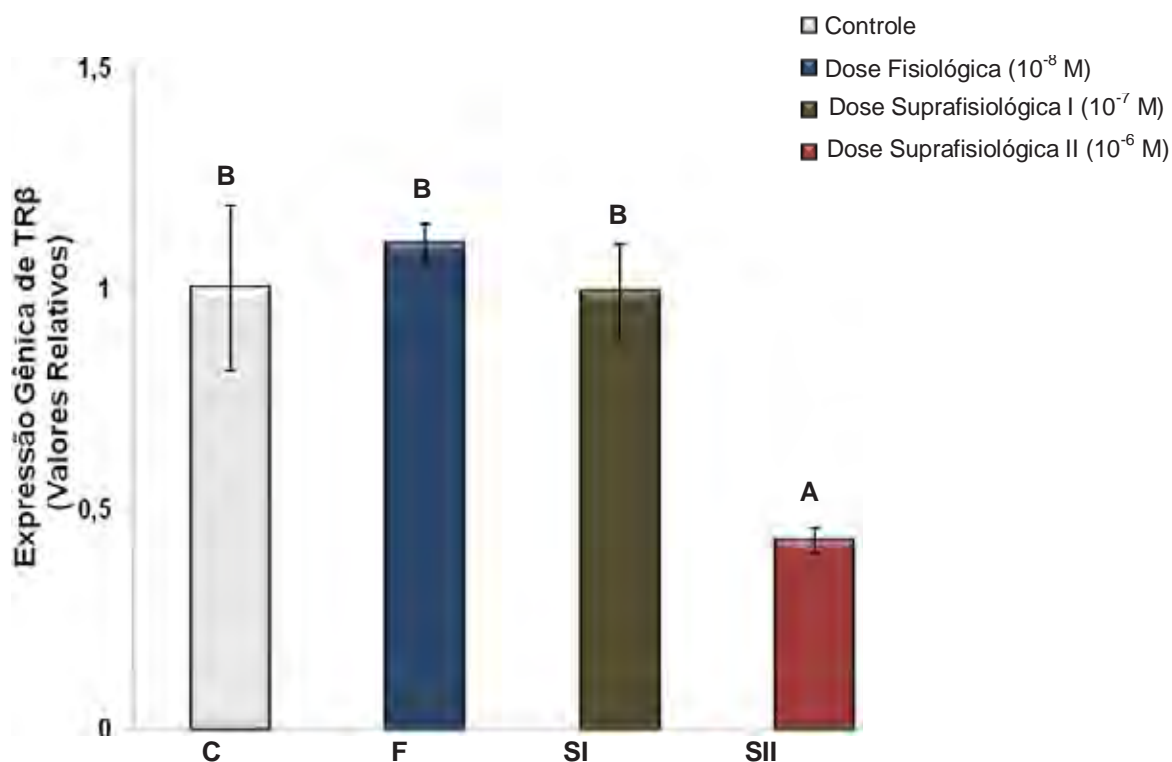


Figura 9. Influência das diferentes doses de T $_3$ sobre a expressão gênica de TR β em adipócitos, 3T3-L1. C, controle (ausência de T $_3$); F, dose fisiológica de T $_3$ (10^{-8} M); SI, dose supra fisiológica I de T $_3$ (10^{-7} M); SII, dose supra fisiológica II de T $_3$ (10^{-6} M); T $_3$, triiodotironina. O experimento foi realizado em duplicata e foram utilizadas três amostras por grupo. Dados expressos em média e desvio-padrão. Foi utilizada a técnica ANOVA complementada com o teste de Tukey. Letras iguais = $p > 0,05$; letras diferentes = $p < 0,05$.

Na figura 10 observamos o efeito da ciclohexamida na expressão gênica de TR β em relação aos grupos F, SI e SII, em A, B e C, respectivamente. As amostras foram normalizadas pelo controle interno (ciclofilina) e os grupos F, SI e SII foram ajustados para um. Pode-se verificar que a expressão de mRNA de TR β está diminuída no grupo FCH quando comparado do grupo F (A). O grupo SICH não mostrou diferença na expressão de TR β em relação ao grupo SI (B). O grupo SIICH tem a expressão de TR β diminuída em relação ao grupo SII (C).

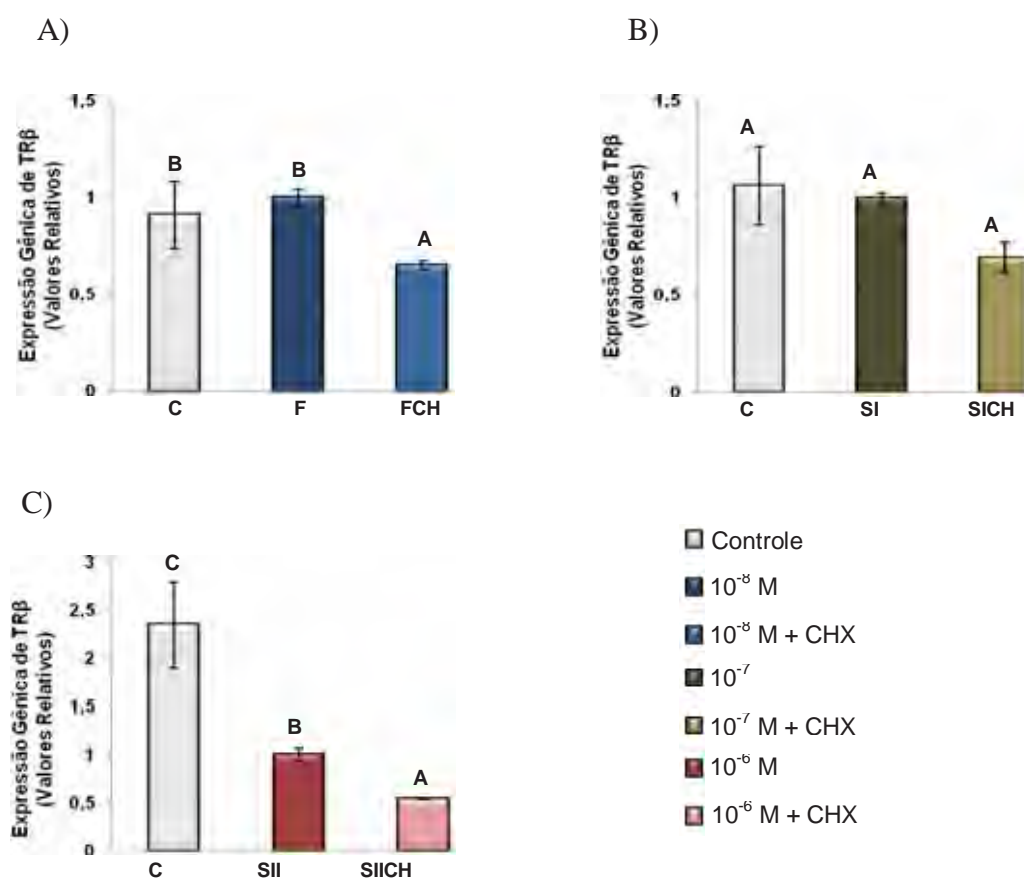


Figura 10. A) O efeito do T₃ em dose fisiológica sobre os níveis de mRNA de TR β na presença do Inibidor de Síntese Protéica, CHX, em adipócitos 3T3-L1. B) O efeito do T₃ em dose supra fisiológica I, dez vezes mais que a fisiológica, sobre os níveis de mRNA de Leptina na presença do Inibidor de Síntese Proteica, CHX. C) O efeito do T₃ em dose supra fisiológica II, cem vezes mais que a fisiológica, sobre os níveis de mRNA de Leptina na presença do Inibidor de Síntese Proteica, CHX. T₃, triiodotironina; CHX, ciclohexamida; C, controle (ausência de T₃); F, dose fisiológica de T₃ (10⁻⁸ M); SI, dose supra fisiológica I de T₃ (10⁻⁷ M); SII, dose supra fisiológica II de T₃ (10⁻⁶ M); FCH, dose fisiológica de T₃ (10⁻⁸ M) e CHX ; SICH dose supra fisiológica I de T₃ (10⁻⁷ M) e CHX; SIICH, dose supra fisiológica II de T₃ (10⁻⁶ M) e CHX . O experimento foi realizado em duplicata e foram utilizadas três amostras por grupo. Dados expressos em média e desvio-padrão. Foi utilizada a técnica ANOVA, complementada com o teste de Tukey. Letras iguais = p>0,05; letras diferentes = p<0,05.

A figura 11 apresenta a expressão gênica de leptina nos diferentes grupos de tratamento com T_3 . As amostras foram normalizadas pelo controle interno (ciclofilina) e o grupo C foi ajustado para um. A expressão de leptina está aumentada em todos os grupos tratados com T_3 .

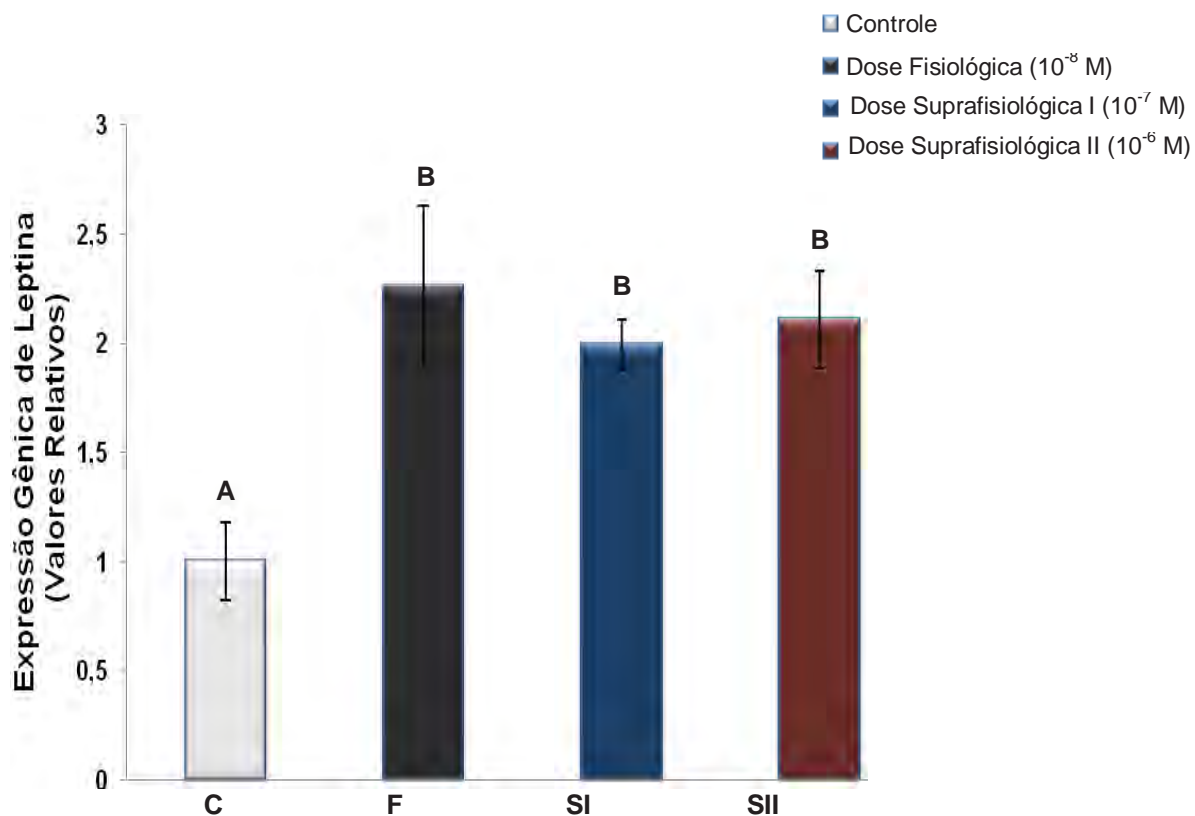


Figura 12. Influência das diferentes doses de T_3 sobre a expressão gênica de Leptina em adipócitos, 3T3-L1. C, controle (ausência de T_3); F, dose fisiológica de T_3 (10^{-8} M); SI, dose supra fisiológica I de T_3 (10^{-7} M); SII, dose supra fisiológica II de T_3 (10^{-6} M); T_3 , triiodotironina. O experimento foi realizado em duplicata e foram utilizadas três amostras por grupo. Dados expressos em média e desvio-padrão. Foi utilizada a técnica ANOVA complementada com o teste de Tukey. Letras iguais = $p > 0,05$; letras diferentes = $p < 0,05$.

A figura 12 mostra o efeito da ciclohexamida na expressão gênica de leptina em relação aos grupos F, SI e SII. As amostras foram normalizadas pelo controle interno (ciclofilina) e os grupos F, SI e SII foram ajustados para um. O grupo FCH não tem a expressão gênica de leptina alterada quando comparado ao grupo F (A). Os grupos SICH (B) e SIIC (C) apresentaram diminuição da expressão de mRNA em relação aos grupos SI e SII, respectivamente.

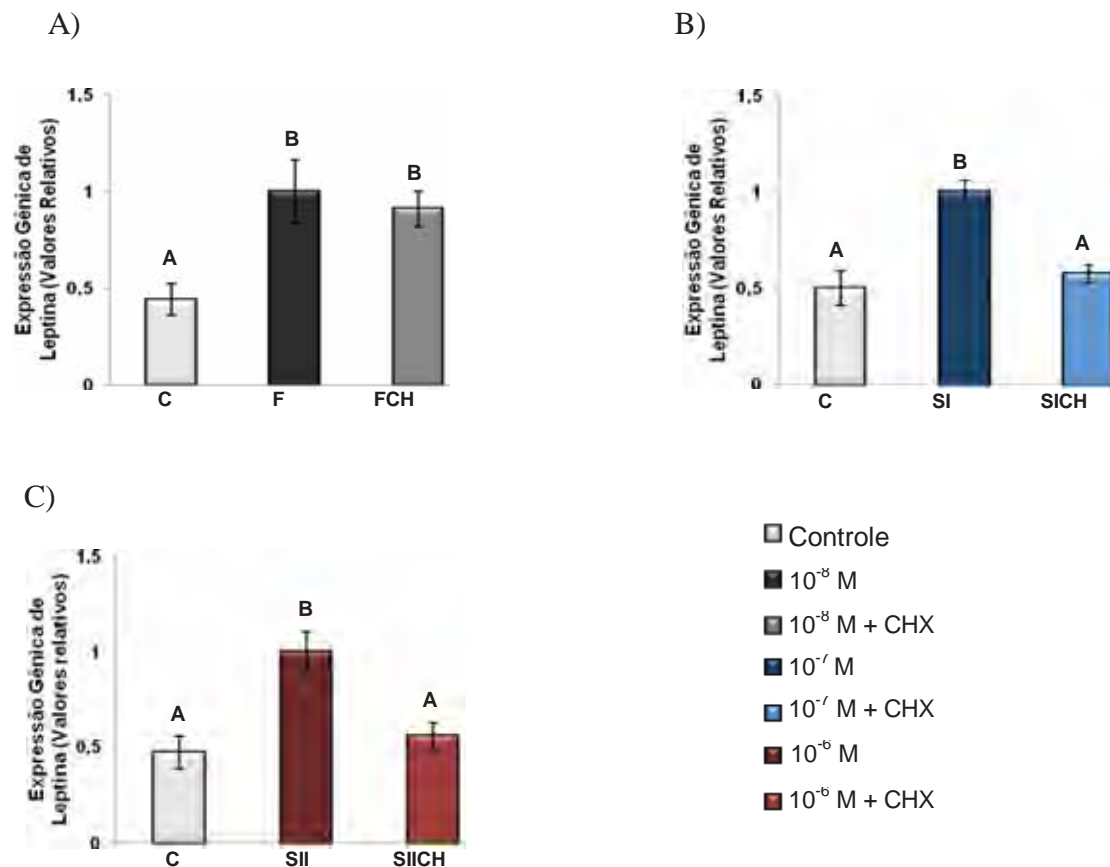


Figura 12. A) O efeito do T_3 em dose fisiológica sobre os níveis de mRNA de Leptina na presença do Inibidor de Síntese Protéica, CHX, em adipócitos 3T3-L1. B) O efeito do T_3 em dose supra fisiológica I, dez vezes mais que a fisiológica, sobre os níveis de mRNA de Leptina na presença do Inibidor de Síntese Protéica, CHX. C) O efeito do T_3 em dose supra fisiológica II, cem vezes mais que a fisiológica, sobre os níveis de mRNA de Leptina na presença do Inibidor de Síntese Protéica, CHX. T_3 , triiodotironina; CHX, ciclohexamida; C, controle (ausência de T_3); F, dose fisiológica de T_3 (10^{-8} M); SI, dose supra fisiológica I de T_3 (10^{-7} M); SII, dose supra fisiológica II de T_3 (10^{-6} M); FCH, dose fisiológica de T_3 (10^{-8} M) e CHX ; SICH dose supra fisiológica I de T_3 (10^{-7} M) e CHX; SIICH, dose supra fisiológica II de T_3 (10^{-6} M) e CHX . O experimento foi realizado em duplicata e foram utilizadas três amostras por grupo. Dados expressos em média e desvio-padrão. Foi utilizada a técnica ANOVA, complementada com o teste de Tukey. Letras iguais = $p > 0,05$; letras diferentes = $p < 0,05$.

A Tabela 3 mostra a correlação entre a expressão gênica de TR α e leptina. Ocorre correlação significativa e positiva entre a expressão desses dois genes apenas no grupo F.

Tabela 3. Correlação entre a expressão gênica de TR α e leptina para os grupos controle (C), F (fisiológico), fisiológico com ciclohexamida (FCH), suprafisiológico I (SI), suprafisiológico I com ciclohexamida (SICHX), suprafisiológico II (SII) e suprafisiológico II com ciclohexamida (SIICH).

Correlação entre TRα e Leptina		
Grupos	r	p
F	0,99	< 0,05
SI	0,94	> 0,05
SII	-0,06	> 0,05
FCH	-0,64	> 0,05
SICH	0,45	> 0,05
SIICH	-0,46	> 0,05

Foi utilizado teste de Correlação Linear de Pearson. F, dose fisiológica de T₃ (10⁻⁸ M); SI, dose supra fisiológica I de T₃ (10⁻⁷ M); SII, dose supra fisiológica II de T₃ (10⁻⁶ M); FCH, dose fisiológica de T₃ (10⁻⁸ M) e CHX ; SICH dose supra fisiológica I de T₃ (10⁻⁷ M) e CHX; SIICH, dose supra fisiológica II de T₃ (10⁻⁶ M). Valor de p<0, 05, considerado significativo.

A Tabela 4 mostra a correlação entre a expressão gênica de TR β e leptina. Não ocorreu correlação significativa entre a expressão desses dois genes.

Tabela 4. Correlação entre a expressão gênica de TR β e leptina para os grupos controle (C), F (fisiológico), fisiológico com ciclohexamida (FCH), suprafisiológico I (SI), suprafisiológico I com ciclohexamida (SICHX), suprafisiológico II (SII) e suprafisiológico II com ciclohexamida (SIICH).

Correlação entre TRβ e Leptina		
Grupos	r	p
F	0,97	> 0,05
SI	-0,5	> 0,05
SII	-0,68	> 0,05
FCH	0,42	> 0,05
SICH	-0,96	> 0,05
SIICH	-0,12	> 0,05

Foi utilizado teste de Correlação Linear de Pearson. F, dose fisiológica de T₃ (10⁻⁸ M); SI, dose supra fisiológica I de T₃ (10⁻⁷ M); SII, dose supra fisiológica II de T₃ (10⁻⁶ M); FCH, dose fisiológica de T₃ (10⁻⁸ M) e CHX ; SICH dose supra fisiológica I de T₃ (10⁻⁷ M) e CHX; SIICH, dose supra fisiológica II de T₃ (10⁻⁶ M). Valor de p<0, 05, considerado significativo.

6 DISCUSSÃO

O tecido adiposo 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 (Levacher *et al.*, 1984). O T₃ modula a proliferação e diferenciação dos adipócitos (Darimont *et al.*, 1993). Viguerie *et al.* (2002) concluíram que os processos celulares, tais como, transdução de sinal, apoptose e resposta inflamatória, podem ser regulados pelos HT. Portanto, conforme Yen *et al.* (2001) e Obregon *et al.* (2008) 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 (Reyne *et al.*, 1996), sendo esses receptores encontrados em TA branco e marrom.

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* (Fig. 6A e B) diferenciados *in vitro* em adipócitos (Fig. 6C e D). Conforme Yoshida *et al.* (1997), consideramos como dose fisiológica de T₃ a concentração de 10⁻⁸ M (10 nmol/l), dose administrada aos grupos F e FCH, sendo este último associado a ciclohexamida. As concentrações acima dessa dosagem foram consideradas supra-fisiológicas. Neste trabalho foi estudada a expressão gênica dos receptores α e β de hormônios tireoidianos e da leptina.

Os TR são apontados como fatores importantes na regulação do desenvolvimento e função do TA (Flores-Delgado *et al.*, 1987; Chawla & Lazar, 1993; Yen, 2001). No presente estudo observamos que a expressão gênica do gene TR α é maior que a do TR β . O grupo C, sem adição de T₃, mostrou expressão gênica de TR α aproximadamente 100 vezes maior que a expressão de TR β , em alguns grupos de tratamento essa diferença passou dos 200% (Tabela 2). Esses resultados corroboram com os encontrados por Jiang *et al.* (2004), onde verificaram que o TR α estava expresso em todos os estágios de diferenciação das células 3T3-L1, ao contrário do TR β que foi dificilmente detectado em qualquer fase. Jiang *et al.* (2004), também afirmaram que o TR α 1 é a isoforma predominante de TR no TA.

O gene TR α é amplamente expresso nos estágios iniciais de desenvolvimento enquanto o gene TR β é restrito inclusive em estágios tardios na embriogênese, quando é induzido no cérebro, pituitária e outros tecidos (Bradley *et al.*, 1992). A expressão diferencial dos genes TR sugere que eles mediam funções distintas (Forrest *et al.*, 1996).

Visto o importante papel dos TR no tecido adiposo, verificamos a expressão de TR α e TR β na presença de diferentes doses de T₃ em cultura celular de adipócitos, 3T3-L1.

Os grupos F e SI quando comparados ao grupo C e SII, mostraram um aumento significativo na expressão de TR α , porém o grupo SII comparado ao grupo C não mostrou mudança significativa (Fig. 7). Jiang *et al.* (2004) analisaram a expressão de TR α no período de diferenciação de células 3T3-L1, na ausência ou presença de T₃, na concentração de 10⁻⁷ M, apesar do grupo tratado ter apresentado maior acúmulo de triglicérides a expressão de TR α foi igual para células tratadas e não tratadas, resultados controversos aos encontrados em nossos estudos. Kanamori & Brown (1992) demonstraram que o T₃ modulou a expressão de mRNA de TR α em girinos, porém não tiveram nenhum efeito sobre cultura de células epiteliais embrionárias de *Xenopus laevis*. Em concordância, Liu *et al.* (2007) verificaram que o miocárdio de ratos hipertireoideos apresentavam um aumento de 51% de expressão da isoforma TR α 1 e 58% de diminuição da isoforma TR α 2, quando comparados ao miocárdio de ratos eutireoideos.

Em relação à expressão gênica de TR β não houve diferença nos grupos F e SI quando comparados com o C, porém o grupo SII mostrou diminuição na expressão desse gene em relação aos grupos C, F e SI (Fig. 9). Conforme Jiang *et al.* (2004) pouca expressão de TR β é observada em células 3T3-L1, isso pode ter levado a não modulação de TR β nos grupos F e SI, porém com a administração de dose 100 vezes maior que a fisiológica no grupo SII. T₃ modulou a expressão de TR β , diminuindo-a. Estudos anteriores de nosso grupo mostraram que doses fisiológicas de T₃ diminuíram a expressão gênica de TR β do TA de animais obesos submetidos à restrição alimentar (Luvizotto *et al.*, 2010). Por outro lado, Liu *et al.* (2007) constataram que a expressão gênica de TR β permanece inalterada em miocárdio de ratos hipertireoideos quando comparado ao miocárdio de ratos eutireoideos.

Pelo fato dos TR estarem expressos no TA, e por este ser um importante alvo dos HT, existe a possibilidade da interferência direta do estado tireoideo sobre a produção de adipocinas no TA (Reyne *et al.*, 1996; Saito *et al.*, 2005). A leptina, produto do TA, está envolvida na regulação do balanço energético, assim como os HT (Vendrell *et al.*, 2004), portanto examinamos o efeito do T₃ sobre os níveis de mRNA de leptina em 3T3-L1 no período de uma hora de incubação.

Em estudo anterior, verificamos que doses fisiológicas de T₃ aumentam a expressão gênica de leptina em animais obesos submetidos a restrição alimentar (Luvizotto *et al.*, 2010), entretanto quando os animais foram submetidos a doses suprafisiológicas de T₃ houve a diminuição da expressão mRNA de leptina (Luvizotto, *et al.*, 2011). Esses achados sugerem que níveis fisiológicos de hormônios tireoidianos podem ser necessários para que haja uma apropriada secreção de leptina (Yoshida *et al.*, 1997).

No presente estudo, os níveis de leptina em cultura celular em adipócitos dos grupos F, SI e SII tratados com 10^{-8} M (10 nmol/l), 10^{-7} M (100 nmol/l) e 10^{-6} M (1000 nmol/l), respectivamente, depois de uma hora de incubação foram significativamente maiores do que o nível do grupo C, sem tratamento com T_3 (Fig. 11). Nossos resultados estão de acordo com os encontrados por Yoshida *et al.* (1997), primeiros a mensurar o nível de secreção de leptina em células 3T3-L1 na presença de T_3 , que observaram modulação da expressão de leptina a partir de 24 horas de incubação; porém nós verificamos os mesmos resultados com apenas uma hora de incubação. Nossos achados sugerem que o T_3 pode ter efeitos rápidos na modulação da expressão de leptina.

Verificamos se a ação do T_3 é direta ou indireta na modulação dos genes estudados, $TR\alpha$, $TR\beta$ e leptina.

Observamos que os grupos tratados com ciclohexamida, FCH, SICH e SIICH tiveram a expressão de $TR\alpha$ diminuída quando comparados aos grupos F, SI e SII, respectivamente, mostrando que as doses fisiológica e supra-fisiológicas de T_3 não modulam o aumento da expressão de $TR\alpha$ diretamente (Fig. 8A, B e C).

Para o $TR\beta$ os grupos tratados com ciclohexamida, FCH e SIICH, demonstraram uma diminuição dos níveis de mRNA (Fig. 10A e C). Esses resultados corroboram com os encontrados por Kanamori & Brow (1992) em cultura de células epiteliais embrionárias de *Xenopus laevis*, onde na presença de ciclohexamida a expressão de $TR\beta$ foi diminuída, sugerindo que há a necessidade do envolvimento de uma proteína intermediária, possivelmente, induzida pelo próprio HT.

Nesse estudo foi verificado que diferentes concentrações de T_3 possuem ações distintas na modulação da leptina. Verificamos que a concentração de 10^{-8} M, dose fisiológica, aumentou a expressão de leptina e na presença de CHX essa expressão se manteve, grupo FCH (Fig. 12A), mostrando que o T_3 em doses fisiológicas age diretamente na expressão mRNA de leptina em células 3T3-L1. Demonstramos a correlação positiva entre a expressão gênica de leptina e $TR\alpha$ no grupo F (Tabela 3), ou seja ocorre o aumento da expressão gênica de leptina em resposta aos níveis de expressão gênica de $TR\alpha$ aumentado; podemos especular que na dose 10^{-8} M ocorre modulação da expressão gênica de leptina pela ação clássica por intermédio do $TR\alpha$. Também foi mostrado que nos grupos SICH e SIICH a expressão de leptina está diminuída em relação aos grupos SI e SII (Fig. 12B e C), esses resultados indicam que a ação do T_3 em doses supra-fisiológicas sobre a expressão de mRNA de leptina é indireta, necessitando da síntese protéica antes da transcrição do gene da leptina, podendo ser sua ação dependente de uma via alternativa à clássica dos HT. Estudo de

Moeller *et al.* (2005) demonstrou que o T₃ ativa a via PI3K no citoplasma 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 seu 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. Em nossos estudos verificamos que o T₃ pode modular indiretamente os genes TR α , TR β e leptina, porém não definimos qual é a via de ação e o gene traduzido em proteína que estimula a modulação dos genes estudados.

Não encontramos associação significativa entre expressão de leptina e TR β (Tabela 4), conforme Jiang *et al.* (2004) e aos nossos achados há pouca expressão de TR β nas células 3T3-L1, isso pode ser a razão de não haver correlação da expressão gênica desse receptor com a leptina. Paralelamente não encontramos na literatura estudos que associam a expressão dos TR com a leptina, porém foram encontrados trabalhos de associação de níveis de leptina e função tireoidiana. Alguns desses estudos mostram aumento nos níveis de leptina em estado de hipertireoidismo (Nakamura *et al.*, 2000), outros apresentam diminuição (Pinkney *et al.*, 1998) e outros não mostram associação (Yoshida *et al.*, 1998). Em estado de hipotireoidismo, alguns estudos encontraram aumento nos níveis de leptina (Pinkney *et al.*, 1998; Kautzky-Willer *et al.*, 1999), outros encontraram uma diminuição desses níveis (Yoshida *et al.*, 1998), e ainda alguns não apresentam associação entre níveis de leptina e função tireoidiana normal (Torgerson *et al.*, 1999; Näslund *et al.*, 2000; Reinehr & Andler, 2002). Ainda há divergências, na literatura, sobre a associação de níveis de leptina e função tireoidiana.

Estudos que demonstram o mecanismo pelo qual os HT podem modificar a expressão gênica pode oferecer novas possibilidades terapêuticas (Moeller & Broecker-Preuss, 2011).

7 CONCLUSÕES

Concluimos que a expressão gênica de TR α é significativamente maior que a do TR β em todos os grupos, portanto o gene TR α é o receptor de HT predominantemente expresso em células 3T3-L1. O gene TR α tem a sua expressão aumentada pelas doses fisiológica e suprafisiológica I de T₃ de forma indireta.

A expressão de TR β não se altera na presença de dose fisiológica ou suprafisiológica I, porém é suprimida com a administração de dose 10⁻⁶ M, e essa supressão ocorre de forma indireta no modelo experimental estudado.

As doses fisiológica e suprafisiológicas de T₃ modulam a expressão gênica de leptina em cultura celular de adipócitos, 3T3-L1, aumentando sua expressão. A concentração fisiológica de T₃ modula a expressão do gene leptina de forma direta e as doses supra fisiológicas modulam esse gene de forma indireta.

Existe correlação de expressão dos genes TR α e leptina somente no grupo tratado com dose fisiológica de T₃. Não encontramos correlação com expressão do gene TR β e a leptina nesse estudo.

Pelo nosso conhecimento este é o primeiro estudo a avaliar ação direta ou indireta do T₃ sobre a expressão gênica de leptina em adipócitos. Outros estudos são necessários para que definamos por qual via os HT agem modulando a expressão gênica de leptina, TR α e TR β .

REFERÊNCIAS

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.

Bell-Anderson KS, Bryson JM. Leptin as a potencial treatment for obesity. *Treat Endocrinol.* 2004; 3:11-8.

Bouret SG, Simerly RB. Minireview: leptin and development of hypothalamic feeding circuits. *Endocrinology.* 2004; 145:2621-6.

Bradley DJ, Towle HC, Young WS. Spatial and temporal expression of alpha- and beta-thyroid hormone receptor mRNAs, including the beta 2-subtype, in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci.* 1992; 12(6):2288-302.

Bustin, S. A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009; 55, 611-22.

Campfield L, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science.* 1995; 269(5223):546-9.

Chan JL, Bluher S, Yiannakouris N, Suchard MA, Kratzch J, Mantzoros CS. Regulation of circulating soluble leptin receptor levels by gender, adiposity, sex steroids and leptin. *Diabetes.* 2002; 51(7):2105-12.

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(22):16265-9.

Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev.* 2010, 31(2):139-70.

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.

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.

Davis PJ, Leonard JL, Davis FB. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Front Neuroendocrinol.* 2008; 29:211-8.

El-Haschimi K, Pierroz DD, Hileman SM, Bjorbaek C, Flier J. Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *J Clin Invest.* 2000; 105(12):1827-32.

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

Flamant F, Samarut J. Thyroid hormone receptors: lessons from knockout and knock-in mutant mice. *Trends Endocrinol Metab.* 2003; 14:85-90.

Flier JS. What's in a name? In search of leptin's physiologic role. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83(5):1407-13.

Flores-Delgado G, Marsch-Moreno M, Kuri-Harcuch W. Thyroid hormone stimulates adipocyte differentiation of 3T3 cells. *Mol Cell Biochem.* 1987; 76(1):35-43.

Forrest D, Hanebuth E, Smeyne RJ, Everds N, Stewart CL, Wehner JM, *et al.* Recessive resistance to thyroid hormone in mice lacking thyroid hormone receptor beta: evidence for tissue-specific modulation of receptor function. *Embo J.* 1996; 15(12):3006-15.

Forrest D, Vennström B. Functions of thyroid hormone receptors in mice. *Thyroid.* 2000; 10(1):41-52.

Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 1998; 395(6704):763-70.

Glass C. Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers and heterodimers. *Endocr Rev*. 1994; 15(3):391-407.

Houseknecht KL, Portocarrero CP. Leptin and its receptors: regulators of whole-body energy homeostasis. *Domest Anim Endocrinol*. 1998; 15(6):457-75.

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(2):295-302.

Kanamori A, Brown DD. The regulation of thyroid hormone receptor beta genes by thyroid hormone in *Xenopus laevis*. *J Biol Chem*. 1992; 267(2):739-45.

Kautzky-Willer A, Ludwig C, Nowotny P, Roden A, Huemer C, Widhalm K, *et al*. Elevation of plasma leptin concentrations in obese hyperinsulinaemic hypothyroidism before and after treatment. *Eur J Clin Invest*. 1999; 29:395-403.

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.

Lazar MA. Sodiumbutyrate selectively alters thyroid hormone receptor gene expression in GH3 cells. *J Biol Chem*. 1990; 265:17474–17477.

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.

Liu CR, Li LY, Shi F, Zang XY, Liu YM, Sun Y, *et al*. Effects of hyper and hypothyroid on expression of thyroid hormone receptor mRNA in rat myocardium. *J Endocrinol*. 2007; 195(3):429-38.

Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001; 25, 402-8.

Luvizotto RA, Conde SJ, SÍbio MT, Nascimento AF, Leopoldo APL, Leopoldo AS, *et al.* Administration of physiological levels of triiodothyronine (T) increase leptin expression in calorie restricted obese rats, but not influence weight loss. *Metabolism*. 2010; 59(1):1-6.

Luvizotto RA, SÍbio MT, Olímpio RM, Nascimento AF, Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Padovani CR, Cicogna AC, Nogueira CR. Supraphysiological triiodothyronine doses diminish leptin and adiponectin gene expression, but do not alter resistin expression in calorie restricted obese rats. *Horm Metab Res*. 2011; 43(7):452-7.

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.

Mann DR, Johnson AOK, Gimpel T, Castracane VD. Changes in circulating leptin, leptin receptor, and gonadal hormones from infancy until advanced age in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88:3339-45.

Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D, *et al.* Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature*. 2002; 17(415):339-43.

Moeller LC, Broecker-Preuss M. Transcriptional regulation by onclassical action of thyroid hormone. *Thyroid Res*. 2011; 3(4 Suppl 1):S6.

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.

Nakamura T, Nagasaka S, Ishikawa S, Hayashi H, Saito T, Kusaka I, *et al.* Association of hyperthyroidism with serum leptin levels. *Metabolism*. 2000; 49:1285-8.

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.

Nunes MT. Hormônios tiroideanos: mecanismo de ação e importância biológica. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2003; 47(6):640.

Obregon MJ. Thyroid hormone and adipocyte differentiation. *Thyroid.* 2008; 18:185-95.

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.

Paracchini V, Pedotti P, Taioli E. Genetics of leptin and obesity: a huge review. *Am J Epidemiol.* 2005; 162(2):101-14.

Pinkney JH, Goodrick SJ, Katz J, Johnson AB, Lightman SL, Coppack SW, et al. Leptin and the pituitary-thyroid axis: a comparative study in lean, obese, hypothyroid and hyperthyroid subjects. *Clin Endocrinol.* 1998; 49:583-8.

Reinehr T, Andler W. Thyroid hormones before and after weight loss in obesity. *Arch Dis Child.* 2002; 87:320 – 6.

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.

Ribeiro SML, Santos ZA, Silva RJ, Louzada E, Donato JJ, Tirapegui J. Leptina: aspectos sobre o balanço energético, exercício físico e amenorréia do esforço. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2007; 51(1):11-24.

Rodrigues AM, Suplicy HL, Radominski RB. Controle neuroendócrino do peso orporal: implicações na gênese da obesidade. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2003; 47(4):398-409.

Saito T, Kawano T, Saito T, Ikoma A, Namai K, Tamemoto H, *et al.* Elevation of serum adiponectin levels in Basedow disease. *Metabolism*. 2005; 54(11):1461-6.

Sansinanea AS, Cerone SI, Zonco I, Garcia C, Auza N. Serum leptin levels in cattle with different nutritional conditions. *Nutr Res*. 2001; 21:1045-52.

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.

Schwartz MW, Dallman MF, Woods SC. Hypothalamic response to starvation: implications for the study of wasting disorders. *Am J Physiol*. 1995; 269(5 Pt 2):R949-57.

Silva JE. Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. *Physiol Rev*. 2006; 86:435-64.

Stanley F, Tsai JS, Samuels HH. Stimulation of facilitated [³H]uridine transport by thyroid hormone in GH1 cells. Evidence for regulation by the thyroid hormone nuclear receptor. *J Biol Chem*. 1986; 261:9400-9404.

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.

Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation, and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6(10):772-83.

Torgerson JS, Carlsson B, Stenlöf K, Carlsson LMS, Bringman E, Sjöström L. 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*. 1999; 84:4197-203.

Vendrell J, Broch M, Vilarrasa N, Molina A, Gómez JM, Gutiérrez C, *et al.* Resistin, adiponectin, ghrelin, leptin, and proinflammatory cytokines: relationships in obesity. *Obes Res.* 2004; 12(6):962-71.

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.

Williams G. Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptors b isoforms. *Mol Cell Biol.* 2000; 20(22):8329-42.

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.

Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev.* 2001; 81(3):1097-142.

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.

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

Zhang Y, Proença R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994; 372(6505):425-32.

ANEXOS

1- Protocolo Comitê de Ética

 **Universidade Estadual Paulista**
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-8143
e-mail secretaria: capellupi@fmb.unesp.br
Instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 20 de 28/04/98



CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o Protocolo n.º 752 sobre o projeto de pesquisa "Ação genômica e não genômica do T3 na expressão gênica e proteica da leptina em células de rato 3T3-L1", a ser conduzido por Miriane de Oliveira, orientada pela Prof.ª Dr.ª Célia Regina Nogueira, Co-orientada por Patrícia Pinto Saraiva, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os "ratos", são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a sanidade dos mesmo.

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEEA em 27/08/2009.


Prof.ª Dr.ª Regina H. Garcia Martins
Presidente da CEEA


Alberto Santos Capellupi
Secretário da CEEA

2- Justificativa de Alteração do Título do Projeto de Pesquisa



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



JUSTIFICATIVA DE ALTERAÇÃO NO TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA

Declaramos que o Projeto de Pesquisa *"Ação genômica do T3 na expressão gênica e proteica da leptina em células de rato 3T3-L1"* aprovado pelo CEP em 27/08/2009, teve seu título alterado para *"Ação de diferentes doses de triiodotironina (T3) sobre a expressão gênica dos receptores de hormônios tireoidianos e leptina em cultura celular de adipócitos, 3T3-L1"*, sem nenhuma alteração no seu conteúdo metodológico da época de apresentação para análise do CEP.

A presente alteração foi efetuada somente para adequação do título da Dissertação de Mestrado

Botucatu, 16 /01/2012

Miniane de Oliveira
Miniane de Oliveira

Célia Regina Nogueira
Célia Regina Nogueira

Programa de Pós Graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica

- Preencher formulário em 2 vias e protocolar no respectivo CEP

d200 - Os 4.285c - 4.1015-3 - 1.107/107/11/21-81

APÊNDICES

A1 - Qualidade da extração de RNA e visualização em gel de agarose 1%

Quadro A. Quantificação de RNA para amostras do grupo C

Amostra	A ₂₆₀	A ₂₈₀	Razão	[] RNA
1hC1	54,261	26,613	2,04	2170,4
1hC2	60,1	29,8	2,01	2000,9
1hC3	51,7	27,02	1,91	2190,3

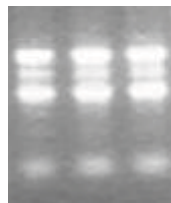


Figura A. Visualização em gel de agarose 1% da integridade do RNA para o grupo C

Quadro B. Quantificação de RNA para amostras do grupo F

Amostra	A ₂₆₀	A ₂₈₀	Razão	[] RNA
1h10(-8)1	51,601	24,568	2,1	2064
1h10(-8)2	45,764	22,54	2,03	1830,5
1h10(-8)3	48,68	24,7	1,97	1947

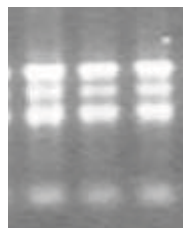


Figura B. Visualização em gel de agarose 1% da integridade do RNA para o grupo F.

Quadro C. Quantificação de RNA para amostras do grupo FCH

Amostra	A ₂₆₀	A ₂₈₀	Razão	[] RNA
1h10(-8)+C1	51,472	24,757	2,08	2058,9
1h10(-8)+C2	52,641	26,207	2,01	2105,7
1h10(-8)+C3	52,05	25,48	2,04	2082,3

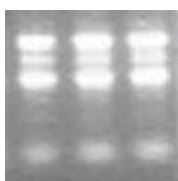


Figura C. Visualização em gel de agarose 1% da integridade do RNA para o grupo FCH.

Quadro D. Quantificação de RNA para amostras do grupo SI

Amostra	A ₂₆₀	A ₂₈₀	Razão	[] RNA
1H10(-7)1	56,728	27,774	2,04	2269,1
1H10(-7)2	46,296	22,652	2,04	1851,9
1H10(-7)3	51,51	25,21	2,04	2060,5

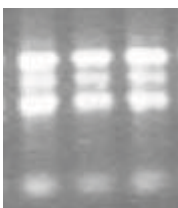


Figura D. Visualização em gel de agarose 1% da integridade do RNA para o grupo SI

Quadro E. Quantificação de RNA para amostras do grupo SICH

Amostra	A ₂₆₀	A ₂₈₀	Razão	[] RNA
1H10(-7)+C1	54,699	26,522	2,06	2187,9
1H10(-7)+C2	45,912	22,552	2,04	1836,5
1H10(-7)+C3	50,3	24,53	2,05	2012,2

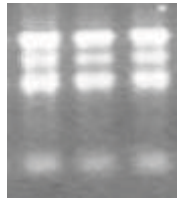


Figura E. Visualização em gel de agarose 1% da integridade do RNA para o grupo SICH

Quadro F. Quantificação de RNA para amostras do grupo SII

Amostra	A ₂₆₀	A ₂₈₀	Razão	[] RNA
1H10(-6)1	40,824	20,113	2,03	1836,5
1H10(-6)2	43	20,96	2,05	1720
1H10(-6)3	41,91	20,53	2,04	1778

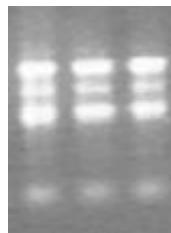


Figura F. Visualização em gel de agarose 1% da integridade do RNA para o grupo SII

Quadro G. Quantificação de RNA para amostras do grupo SIICH

Amostra	A ₂₆₀	A ₂₈₀	Razão	[] RNA
1H10(-6)+C1	37,872	18,033	2,1	1544,9
1H10(-6)+C2	39,367	19,376	2,03	1574,7
1H10(-6)+C3	38,61	18,704	2,064264	1514,8

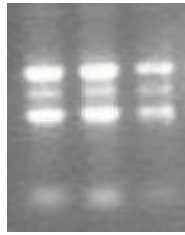


Figura G. Visualização em gel de agarose 1% da integridade do RNA para o grupo SIICH.

A2- Visualização das curvas de amplificação de PCR em tempo real

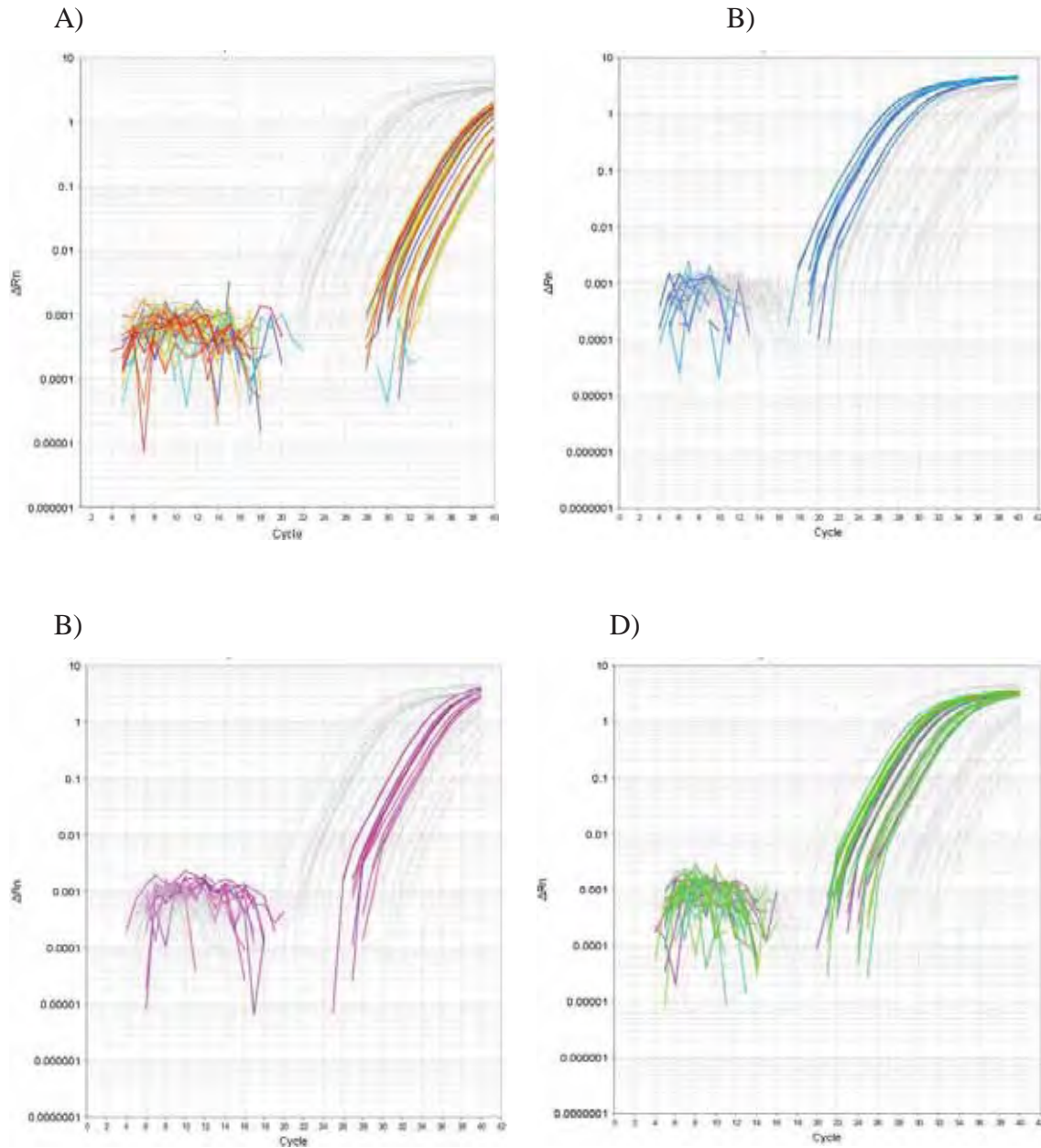


Figura H. A) Curvas de amplificação do experimento de PCR em tempo real para o gene da leptina; B) Curvas de amplificação do experimento de PCR em tempo real para o gene do TR α ; C) Curvas de amplificação do experimento de PCR em tempo real para o gene do TR β ; D) Curvas de amplificação do experimento de PCR em tempo real para o gene da ciclofilina (normalizador).