MARIANA DE FRANÇA OLIVEIRA DA SILVA

**EFEITOS DOS HORMÔNIOS TIREOIDIANOS SOBRE A REGULAÇÃO DA
EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS COM A LIPÓLISE NO TECIDO
ADIPOSO BRANCO SUBCUTÂNEO E VISCERAL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2015

MARIANA DE FRANÇA OLIVEIRA DA SILVA

**EFEITOS DOS HORMÔNIOS TIREOIDIANOS SOBRE A REGULAÇÃO DA
EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS COM A LIPÓLISE NO TECIDO
ADIPOSO BRANCO SUBCUTÂNEO E VISCERAL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Maria Tereza Nunes

Versão corrigida: A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Silva, Mariana de França Oliveira da.

Efeito dos hormônios tireoidianos sobre a regulação da expressão de proteínas envolvidas com a lipólise no tecido adiposo branco subcutâneo e visceral / Mariana de França Oliveira da Silva. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Maria Tereza Nunes.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Regulação hormonal da expressão gênica.

Versão do título para o inglês: Effects of thyroid hormones on the regulation of the expression of protein involved on lipolysis in subcutaneous and visceral white adipose tissue.

1. Lipase hormônio sensível 2. Lipase dos triglicerídeos do adipócito
3. Perilipina A 4. Receptor beta 3 adrenérgico 5. Hormônios
tireoidianos 6. Lipólise I. Nunes, Profa. Dra. Maria Tereza II.
Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB093/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Mariana de França Oliveira da Silva.

Título da Dissertação: Efeito dos hormônios tireoidianos sobre a regulação da expressão de proteínas envolvidas com a lipólise no tecido adiposo branco subcutâneo e visceral.

Orientador(a): Profa. Dra. Maria Tereza Nunes.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

(☐) **Aprovado(a)**

(☐) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **034** nas fls. **04** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Maria Tereza Nunes** Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Efeito do hormônio tireoideano sobre a regulação da expressão de proteínas envolvidas com a lipólise no tecido adiposo branco subcutâneo e visceral*" do qual participam o(s) aluno(s) **Mariana de França Oliveira da Silva** e o pesquisador **Angelo Rafael Carpinelli**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **29.05.2013, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 29 de maio de 2013.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Aos meus pais, Luiz e Dalva, por me trazerem à vida, por todo suporte educacional e dedicação. À professora Maria Raquel Querino de Sousa, pela inspiração.

Ao professor Manoel Adrião Gomes Filho por favorecer a realização de um sonho.

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as bênçãos, por permitir que eu vivesse experiências boas e ruins, que foram necessárias e favoreceram o meu amadurecimento moral e profissional.

Aos meus pais, Lucidalva da Silva e Luiz de França, que sempre apoiaram minhas escolhas e decisões. Obrigada por todo amor e por compreender que muitas vezes a distância é necessária para o nosso crescimento intelectual.

As minhas irmãs, Clara e Indira, pelo companheirismo e apoio.

A minha orientadora, Maria Tereza Nunes, por me proporcionar o conhecimento científico me aceitando como aluna no laboratório, por todos os ensinamentos e pelo suporte que me deu durante as dificuldades.

A técnica do laboratório, Lhô, pelos ensinamentos e conselhos nos momentos difíceis.

A Jamile, por sempre estar comigo nos bons momentos e por me dar suporte nos momentos ruins com palavras acolhedoras. Obrigada por ser esta pessoa a qual tenho orgulho de ter como amiga.

Ao Rafael Prévide, por ser meu companheiro de experimentos e por lembrar sempre que toda felicidade do mundo está em uma bola de sorvete. Obrigada pela amizade Rafa.

A Ana, por me ensinar a técnica do Western Blotting, sempre tirando dúvidas e dando conselhos para o aprimoramento dos meus resultados. Obrigada Ana, por isso e por ser essa grande amiga.

A Silvania, pela amizade, por estar comigo em um momento desafiante me dando todo suporte. Obrigada Sil, jamais vou esquecer o que você fez por mim.

A Carol, pela sensibilidade em notar quando algo está errado, por toda a ajuda que me deu, pelos momentos divertidos e pela amizade.

Ao Rafa Salgueiro, Fred e Croffi, por serem pessoas tão divertidas e incríveis.

Ao Rafa Dias, que apesar de conhecer a pouco tempo já se tornou um grande amigo e confidente na hora do almoço. À Cecília, pela diversão e pelo café.

A Paula por todo auxílio que me deu nesta última etapa do mestrado baseado na sua experiência científica. Muito obrigada Paula, tenha certeza que suas ideias enriqueceram muito meu trabalho.

Enfim, a todos os colegas de laboratório.

Ao João, pela amizade.

A Fernanda Sais e a Juliana Lucena, por todo auxílio e pela amizade.

Aos funcionários do biotério, pelo cuidado com os animais utilizados neste trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

Obrigada a todos!

RESUMO

OLIVEIRA DA SILVA, M. F. **Efeitos dos hormônios tireoidianos sobre a regulação da expressão de proteínas envolvidas com a lipólise no tecido adiposo branco subcutâneo e visceral.** 2015. 63 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Os hormônios tireoidianos (HT) exercem um papel lipolítico importante no Tecido Adiposo Branco (TAB), por meio da indução da expressão de receptores beta adrenérgicos na membrana do adipócito, o que aumenta a sensibilidade deste tecido às catecolaminas. Sabe-se que os principais efetores da ação lipolítica nesse tecido são a lipase hormônio sensível (LHS) e a lipase dos triglicerídeos dos adipócitos (ATGL), as quais hidrolisam os triglicerídeos em ácidos graxos e glicerol. Além disso, outros componentes estão envolvidos na atividade lipolítica, como as perilipinas, proteínas estas que envolvem a gota de gordura, formando uma barreira contra a ação da LHS e ATGL, de modo que precisam ser fosforiladas para que a LHS e, indiretamente, a ATGL possam exercer seu efeito lipolítico. Nesse estudo, nós investigamos em ratos se os HT poderiam interferir na expressão gênica e conteúdo proteico da LHS, ATGL, perilipina A e dos receptores beta3 adrenérgicos no tecido adiposo branco subcutâneo e visceral (depósitos omental e mesentérico). Para isso, avaliamos o efeito da tireoidectomia e do tratamento com T3 sobre a expressão das proteínas descritas e observamos que na ausência de HT há uma redução na expressão gênica e proteica da LHS no depósito mesentérico. No entanto, o tratamento com T3 reduziu o conteúdo do transcrito e aumentou o conteúdo proteico da LHS tanto no depósito mesentérico quanto no subcutâneo. Quanto à ATGL, verificamos uma redução da expressão gênica da enzima no depósito mesentérico dos animais tireoidectomizados e um aumento do conteúdo proteico da mesma frente ao tratamento com T3 nos depósitos subcutâneo e mesentérico. Embora tenhamos observado alterações na expressão gênica de perilipina e receptores beta3 adrenérgicos, nenhuma alteração no conteúdo proteico foi detectada. Nossos resultados apontaram que o T3 aumenta o conteúdo proteico da LHS e ATGL no tecido adiposo branco, provavelmente por uma ação pós-transcricional, mostrando que os HT atuam sobre a lipólise através de outros mecanismos além da via beta adrenérgica.

Palavras-chave: LHS. ATGL. Perilipina A. Receptores beta 3 adrenérgicos.

ABSTRACT

OLIVEIRA DA SILVA, M. F. **Effects of thyroid hormones on the regulation of the expression of proteins involved on lipolysis in subcutaneous and visceral white adipose tissue.** 2015. 63 p. Masters thesis (Human Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Thyroid hormones (TH) play an important lipolytic role on white adipose tissue (WAT), by means of the induction of beta-adrenergic receptors expression on adipocytes' membrane, mechanism by which they increase the sensitivity of WAT to catecholamines. The main effectors of the lipolytic action on WAT are the hormone sensitive lipase (HSL) and adipose triglyceride lipase (ATGL), which hydrolyze triglycerides into fatty acids and glycerol. Other components are also involved in the lipolytic activity, such as perilipins. These proteins involve the fat droplet, forming a protective barrier against HSL and ATGL action. In this study, we investigated in hypothyroid and T3-treated rats the ability of TH to regulate HSL, ATGL, perilipin A and beta-3 adrenergic receptor mRNA and protein expression on subcutaneous and visceral (mesenteric and omental) fat depot. Our data demonstrated that HSL mRNA and protein are decreased by hypothyroidism on mesenteric WAT. However, T3-treated rats exhibited a reduction of HSL's transcript and an increase at the HSL's protein content in subcutaneous and mesenteric depot. ATGL mRNA is reduced in hypothyroid rats' mesenteric depot and T3 treatment increased ATGL protein content on subcutaneous and mesenteric depot. Although alterations on perilipin and beta-3 adrenergic receptor were observed, the protein content remained unaffected. Our findings suggest that T3 positively regulates HSL and ATGL protein content on WAT most likely by post-transcriptional mechanisms. These results show that TH regulate lipolysis by other mechanisms besides beta adrenergic regulation.

Keywords: ATGL. HSL. Perilipin A. Lipolysis. Beta adrenergic receptors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática da ação lipolítica da LHS sobre a gota de gordura.	19
Figura 2 - Representação esquemática do controle da ação da ATGL sobre a gota lipídica.	21
Figura 3 - Representação esquemática do mesentério e omento (epiplon).	22
Figura 4 - Representação esquemática do TAB mesentérico.	22
Figura 5 - Representação esquemática do TAB omental.	23
Figura 6 - Representação gráfica do peso corporal de ratos controle tratados com salina (C), hipotireoideos tratados com salina (Tx) ou T3 nas doses 0,3 e 1,5 µg/100 g de peso corpora[Tx (0,3) e Tx (1,5), respectivamente].	33
Figura 7 - Conteúdo de mRNA total de <i>Rpl19</i> (A), <i>Ywhaz2</i> (B), <i>Ppia</i> (C), <i>Gapdh</i> (D) e <i>Actb</i> (E).	35
Figura 8 - Conteúdo de mRNA total do receptor beta3 adrenérgico (A), LHS (B), Perilipina A (C) e ATGL (D) nos TABs mesentérico, subcutâneo e omental.	36
Figura 9 - Conteúdo de mRNA total do receptor beta3 adrenérgico no TAB Subcutâneo (A), Mesentérico (B) e Omental (C) de ratos controle (C) e hipotireoideos tratados com salina (Tx).	37
Figura 10 - Conteúdo de mRNA total da LHS no TAB Subcutâneo (A), Mesentérico (B) e Omental (C) de ratos controle (C) e hipotireoideos tratados com salina (Tx).	37
Figura 11 - Conteúdo de mRNA total da Perilipina A no TAB Subcutâneo (A), Mesentérico (B) e Omental (C) de ratos controle (C) e hipotireoideos tratados com salina (Tx).	38
Figura 12 - Conteúdo de mRNA total da ATGL no TAB Subcutâneo (A), Mesentérico (B) e Omental (C) de ratos controle (C) e hipotireoideos tratados com salina (Tx).	39
Figura 13 - Conteúdo de mRNA total do receptor beta3 adrenérgico no TAB subcutâneo (A), mesentérico (B) e omental (C) de ratos controle tratados com salina (C), hipotireoideos tratados com salina (Tx) ou T3 nas doses de 0,3 e 1,5 µg/100 g de peso corporal [Tx (0,3) e Tx (1,5), respectivamente].	40
Figura 14 - Conteúdo de mRNA total da LHS no TAB subcutâneo (A), mesentérico (B) e omental (C) de ratos controle tratados com salina (C), hipotireoideos tratados com	

salina (Tx) ou T3 nas doses de 0,3 e 1,5 µg/100 g de peso corporal [Tx (0,3) e Tx (1,5), respectivamente].	41
Figura 15 - Conteúdo de mRNA total da Perilipina A no TAB subcutâneo (A), mesentérico (B) e omental (C) de ratos controle tratados com salina (C), hipotireoideos tratados com salina (Tx) ou T3 nas doses de 0,3 e 1,5 µg/100 g de peso corporal [Tx (0,3) e Tx (1,5), respectivamente].	41
Figura 16 - Conteúdo de mRNA total da ATGL no TAB subcutâneo (A), mesentérico (B) e omental (C) de ratos controle tratados com salina (C), hipotireoideos tratados com salina (Tx) ou T3 nas doses de 0,3 e 1,5 µg/100 g de peso corporal [Tx (0,3) e Tx (1,5), respectivamente].	42
Figura 17 - Representação gráfica do conteúdo proteico da LHS no TAB subcutâneo (A) e mesentérico (B) de ratos controle tratados com salina (C), hipotireoideos tratados com salina (Tx) ou T3 nas doses de 0,3 e 1,5 µg/100 g de peso corporal [Tx (0,3) e Tx (1,5), respectivamente].	43
Figura 18 - Representação gráfica do conteúdo da perilipina A no TAB subcutâneo (A), mesentérico (B) e omental (C) de ratos controle tratados com salina (C), hipotireoideos tratados com salina (Tx) ou T3 nas doses de 0,3 e 1,5 µg/100 g de peso corporal [Tx (0,3) e Tx (1,5), respectivamente].	44
Figura 19 - Representação gráfica do conteúdo da ATGL no TAB subcutâneo (A), mesentérico (B) e omental (C) de ratos hipotireoideos (Tx) e hipotireoideos tratados com T3 nas doses de 0,3 e 1,5 µg/100 g de peso corporal [Tx (0,3) e Tx (1,5), respectivamente].	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - <i>Primers</i> utilizados no PCR em tempo real.	28
Tabela 2 - Tampões utilizados na extração de proteínas.	29
Tabela 3 - Peso corporal (PC), Peso Seco Cardíaco (PSC) e razão PSC/PC de ratos controle tratados com salina (C), hipotireoideos tratados com salina (Tx) ou T3 [Tx (0,3) e Tx (1,5)].	32
Tabela 4 - Peso inicial, final e ΔP de ratos controle tratados com salina (C), hipotireoideos tratados com salina (Tx) ou T3 nas doses 0,3 e 1,5 $\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso corporal [Tx (0,3) e Tx (1,5), respectivamente].	33

LISTA DE ABREVIATURAS

Abhd5 α/β hydrolase domain-containing protein-5

AC *Adenylyl Cyclase* (Adenilil Ciclase)

AG Ácidos Graxos

AMPcíclico Monofosfato de Adenosina Cíclico

ATGL *Adipose Triglyceride Lipase* (Lipase dos Triglicerídeos do Adipócito)

ATP *Adenosine Triphosphate* (Trifosfato de Adenosina)

CaCl Cloreto de Cálcio

CGI-58 *Comparative Gene Identification 58*

DAG Diacilglicerol

EDTA *Ethylenediamine Tetraacetic Acid* (Ácido Etilenoamino Tetra-Acético)

FFA *Free Fatty Acids*

G0S2 *G₀/G₁ Switch Gene 2*

HCl Ácido Clorídrico

HSL *Hormone Sensitive Lipase* (Lipase Hormônio Sensível)

HT Hormônios Tireoidianos

KCl Cloreto de Potássio

MAG Monoacilglicerol

MGL Monoglicerídeo Lipase

MgCl₂ Cloreto de Magnésio

NaCl Cloreto de Sódio

PKA Proteína Quinase A

PIC Aprotinina

PMSF *Phenylmethylsulfonyl Fluoride*

Pnpla2 *Patatin-like phospholipase domain containing protein 2*

RT *Reverse Transcription* (Transcrição Reversa)

TR *Thyroid Hormone Receptors*

TSH *Thyroid Stimulating Hormone* (Hormônio Tireotrófico)

T3 3,3',5-triiodo-l-tironina

T4 3,5,3',5'-tetraiodo-l-tironina

TAB Tecido Adiposo Branco

TAM Tecido Adiposo Marrom

TAS Tecido Adiposo Subcutâneo

TAV Tecido Adiposo Visceral

TA Temperatura Ambiente

TGs Triglicerídeos

TAG Triacilglicerol

Actb *Actin Beta* (Beta Actina)

Ppia *Peptidylprolyl Isomerase A* (Ciclofilina A)

Rpl19 *Ribosomal Protein L19* (Proteína Ribossomal L19)

Gapdh *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*

Ywha2 *Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan monooxygenase*

SDS *Sodium Dodecyl Sulfate*

APS *Ammonium persulfate* (Persulfato de Amônio)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.	17
2 JUSTIFICATIVA.	24
3 OBJETIVO.	25
4 MATERIAL E MÉTODOS.	26
4.1 Protocolo animal.	26
4.2 Avaliação da expressão gênica.	27
4.2.1 <i>Extração do RNA total.</i>	27
4.2.2 <i>Reação de transcrição reversa e Real-Time PCR.</i>	27
4.3 Avaliação da expressão de proteínas.	29
4.3.1 <i>Extração de Proteínas Totais e Quantificação.</i>	29
4.3.2 <i>Preparo das amostras, Eletroforese em Gel de Poliacrilamida – SDS (SDS-PAGE) e Western Blotting.</i>	30
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.	31
6 RESULTADOS.	32
6.1 Avaliação da eficiência dos tratamentos.	32
6.2 Avaliação do efeito da tireoidectomia e do tratamento com T3 nas doses fisiológica (0.3) e supra-fisiológica (1.5) por 5 dias sobre o peso corporal de ratos.	32
6.3 Avaliação da variação na expressão gênica do receptor beta3 adrenérgico, LHS, perilipina A e ATGL nos TABs subcutâneo, mesentérico e omental.	33
6.4 Efeito da tireoidectomia sobre o conteúdo de mRNA do receptor beta3 adrenérgico, LHS, Perilipina A e ATGL no tecido adiposo branco (TAB) subcutâneo, mesentérico e omental.	36
6.5 Efeito do tratamento com T3 nas doses fisiológica (0,3 ug/ 100 g de PC) e supra fisiológica (1,5 ug/ 100 g de PC) sobre o conteúdo de mRNA do receptor beta3 adrenérgico, LHS, Perilipina A e ATGL no tecido adiposo branco (TAB) subcutâneo, mesentérico e omental.	39
6.6 Efeito da tireoidectomia e do tratamento com T3 nas doses fisiológica (0,3 ug/ 100g de PC) e supra fisiológica (1,5 ug/ 100g de PC) sobre o conteúdo proteico da LHS, perilipina A e ATGL nos tecidos adiposo branco (TAB) subcutâneo, mesentérico e omental.	42
7 DISCUSSÃO.	45
8 CONCLUSÕES.	54

REFERÊNCIAS.....55

1 INTRODUÇÃO

Os hormônios tireoidianos (HT) exercem a maior parte dos seus efeitos biológicos por meio da interação com os seus receptores nucleares (TR), que estão associados a regiões do DNA do gene-alvo, denominadas elementos responsivos aos hormônios tireoidianos (FONDELL et al., 1999; JEPSEN et al., 2002). Por meio dessas ações, designadas genômicas, os HT regulam a expressão de proteínas específicas envolvidas no crescimento, desenvolvimento e metabolismo. Mais recentemente, ações não genômicas dos HT vem sendo descritas, as quais independem de sua reconhecida ação a nível nuclear regulando a expressão de genes (BARGI-SOUZA et al., 2015; DAVIS & DAVIS, 1996).

Sob a ação do hormônio tireotrófico (TSH) hipofisário, a glândula tireóide sintetiza e secreta T4 (3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina ou tiroxina) e T3 (3,3',5-triiodo-L-tironina) na circulação. A forma predominante de HT liberada no plasma é o T4, no entanto o T3 é considerado o principal HT biologicamente ativo, sob o ponto de vista nuclear. Assim, grande parte do T3 plasmático é produto da monodesiodação periférica do T4, reação catalisada pelas desidases tipo I e II, que removem um iodo da posição 5 do anel externo (5') do T4 (CHOPRA, 1976). Ao entrar na célula-alvo, o T3, proveniente do plasma ou da monodesiodação intracelular do T4, liga-se ao receptor de HT e promove a ativação ou a inibição da transcrição de genes específicos (KIMURA, 2012).

Os HT exercem um importante papel no metabolismo lipídico. Sabe-se que eles aumentam a expressão, bem como a atividade de algumas enzimas envolvidas na lipogênese, como a acetil-CoA carboxilase, ácido graxo sintase, enzima málica e glicose-6-fosfato desidrogenase (CHEN et al., 2015). Além disso, o T3 acelera a diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos no tecido adiposo (DARIMONT et al., 1993). Sabe-se também que este hormônio tem um papel importante na lipólise, pois aumenta a expressão e, portanto, o conteúdo de receptores beta adrenérgicos no tecido adiposo, o que aumenta a sensibilidade do mesmo às catecolaminas, as quais são reconhecidos agentes lipolíticos (HELLSTRÖM et al., 1997; VIGUERIE et al., 2002).

Três subtipos de adrenoreceptores beta coexistem na membrana do adipócito, beta1, beta2 e beta3, no entanto, a quantidade relativa de cada subtipo difere de acordo com a espécie e depósitos de gordura (FÉVE et al., 1991; MUZZIN et al., 1992). O receptor beta3 adrenérgico foi descoberto a partir de observações de que antagonistas beta 1 e beta 2 adrenérgicos falharam em inibir a lipólise em adipócitos de ratos. Adicionalmente, os adipócitos de roedores são mais

responsivos a agonistas beta adrenérgicos com pouca ação sobre os subtipos beta1 e beta2 (GERMACK et al., 1997; LOWELL; FLIER, 1995). Em ratos, a lipólise é mediada pelos adrenoreceptores beta1 e beta3, sendo o receptor beta3 o subtipo mais abundante, estando presente tanto no tecido adiposo branco (TAB) subcutâneo e visceral, quanto no tecido adiposo marrom (TAM) e trato gastrointestinal destes animais (EVANS et al., 1996; GERMACK et al., 1997, 2000; GRANNEMAN; LAHNERS, 1992; MUZZIN et al., 1991).

Os receptores beta adrenérgicos pertencem a uma superfamília de proteínas integrais de membrana cujos efeitos são mediados por proteínas reguladoras de nucleotídeos de guanina (proteínas G). Ao interagirem com esses receptores, as catecolaminas são capazes de promover a ativação da adenilil ciclase, via proteína G estimulatória, levando à produção do segundo mensageiro AMP cíclico que, por sua vez, promove a ativação da proteína quinase A (PKA). Esta fosforila diferentes substratos relacionados à lipólise, processo catabólico que é complexo e depende da atividade de três enzimas: a lipase dos triglicerídeos do adipócito (ATGL), a lipase hormônio sensível (LHS) e a monoglicerídeo lipase (MGL) (GIROUSSE et al., 2012; KRAEMER; SHEN, 2002; SCHWEIGER et al., 2006). Estas hidrolisam os triglicerídeos (TGs) estocados no tecido adiposo, com subsequente liberação de ácidos graxos (AG) e glicerol (NAHMIAS et al., 1991; TAVERNIER et al., 2005). Em resumo, a PKA catalisa a fosforilação em serina da LHS e das perilipinas, proteínas que se encontram associadas à gota de gordura formando uma barreira que impede a ação da LHS (BLANCHETTE-MACKIE et al., 1995; LAFONTAN et al., 2009). Uma vez fosforiladas, as perilipinas sofrem alterações conformacionais expondo os TGs à ação hidrolítica da LHS, cuja atividade catalítica também é ativada por fosforilação pela PKA (DUNCAN et al., 2007; FAIN; GARCIA-SAINZ, 1983) (Fig. 1).

Figura 1 - Representação esquemática da ação lipolítica da LHS sobre a gota de gordura. (a) Mediadores da lipólise (ex. catecolaminas) se ligam a receptores acoplados à proteína G estimulatória ativando a adenilil ciclase (AC). (b) A AC aumenta o conteúdo intracelular de AMPc que, por sua vez, ativa a proteína quinase A (PKA). (c) A PKA fosforila a LHS, aumentando sua atividade catalítica, e a perilipina, que sofre uma mudança conformacional permitindo o acesso da LHS à gota lipídica (Adaptado de Londos, 2000).

A LHS apresenta uma ampla gama de substratos, atuando sobre todos os acilgliceróis: triacilglicerol (TAG), diacilglicerol (DAG) e monoacilglicerol (MAG), além de ésteres de colesterol, ésteres de ácidos graxos, ésteres de retinil e ésteres de paranitrofenil. A atividade desta enzima era considerada passo limitante para a hidrólise do TAG. No entanto, a demonstração de que camundongos *knockout* para LHS exibiam peso corpóreo normal e mantinham a capacidade de catabolizar as gorduras armazenadas sugeriu a presença de uma outra TAG hidrolase no tecido adiposo. Além disso, os animais *knockout* para LHS apresentaram um acúmulo de DAG em vários tecidos, mostrando um papel específico desta enzima no catabolismo do DAG (HAEMMERLE et al., 2001; HOLM et al., 2000; KRAEMER et al., 2002).

A ATGL, enzima identificada e caracterizada em 2004, tem como substrato o TAG, e remove especificamente o primeiro ácido graxo desta molécula, gerando o DAG, principal substrato fisiológico da LHS (SCHWEIGER et al., 2006). A ATGL, portanto, parece executar o passo inicial da hidrólise do TAG, favorecendo o catabolismo das gorduras armazenadas (SCHOENBOR et al., 2006). A ação da ATGL e da LHS sobre os substratos nos leva a entender que elas agem de forma coordenada na mobilização de AG (RACLOT et al., 2001; ZIMMERMANN et al., 2004; WANG et al., 2001).

Atualmente são reconhecidas 4 isoformas de perilipina: 2 delas, a perilipina A e B, são expressas nos adipócitos, a C é expressa em tecidos esteroideogênicos e a D é predita de transcrito do qual ainda não se detectou a proteína gerada. As múltiplas isoformas da perilipina são resultado do *splicing* alternativo de um único gene. A perilipina A é a isoforma mais abundante associada

com a gota de gordura nos adipócitos e controla tanto a lipólise basal quanto a estimulada (CHAVES et al., 2011; LONDOS et al., 1999; TANSEY et al., 2001).

A perilipina A apresenta seis sítios de fosforilação para a PKA (resíduos de serina), três na extremidade N-terminal (Sítios 1, 2 e 3 = Serinas 81, 223, 277) relacionados à lipólise mediada pela LHS, e três na extremidade C-terminal (Sítios 4, 5 e 6 = Serinas 433, 492 e 517) relacionados à ação da ATGL. A ATGL é também denominada *patatin-like phospholipase domain containing protein 2* (PNPLA2), desnutrina ou fosfolipase cálcio independente, e é membro de uma superfamília de lipases com domínio *patatin*, pois possui uma sequência N-terminal característica da *patatin*, uma proteína da batata com atividade acil hidrolase, acil transferase e esterase (KERSHAW et al., 2006; SMIRNOVA et al., 2006). O domínio *patatin* é essencial para a atividade hidrolase da ATGL, que é regulada pelo *Comparative Gene Identification-58* (CGI-58), também conhecido como *α/β hydrolase domain-containing protein-5* (ABHD5).

O CGI-58 atua como um co-fator, aumentando a atividade da ATGL cerca de 20 vezes na vigência da lipólise estimulada (GRUBER et al., 2010; LORD et al., 2012). Este co-fator se encontra associado à perilipina (extremidade C-terminal) e esta interação é regulada por estimulação hormonal. Assim, embora a atividade da ATGL não seja diretamente regulada pela PKA, a fosforilação da perilipina libera o CGI-58 permitindo a interação deste com a ATGL, favorecendo a ativação desta enzima. O *G₀/G₁ Switch Gene 2* (G0S2) é um regulador negativo da ATGL, que se liga ao domínio *patatin* da enzima inibindo sua atividade TAG hidrolase mesmo na presença do CGI-58. Esta proteína foi primeiramente identificada em células mononucleares sanguíneas, devido à associação da sua expressão com a passagem das células da fase G₀ para a fase G₁ do ciclo celular, no entanto, o papel do G0S2 no ciclo celular ainda não foi estabelecido (SCHWEIGER et al., 2012; YANG et al., 2010) (Fig. 2).

Figura 2 - Representação esquemática do controle da ação da ATGL sobre a gota lipídica. A fosforilação e consequente mudança conformacional da perilipina favorece a interação do CGI-58 com a ATGL, aumentando a atividade catalítica da enzima (Adaptada do site <http://www.cell.com>).

O acúmulo exagerado de lipídios é acompanhado por diversas desordens metabólicas, no entanto, a distribuição dessa gordura é mais importante do que sua quantidade total. O tecido adiposo branco (TAB) se distribui em diversos depósitos no organismo, os quais são anatomicamente classificados como tecido adiposo subcutâneo (TAS) e tecido adiposo visceral (TAV). O TAS é representado pelos depósitos abaixo da pele e o TAV constitui o tecido depositado próximo ou mesmo no interior das vísceras abdominais. A funcionalidade, metabolismo e estrutura celular do TAB variam de região para região (FONSECA-ALANIZ et al., 2006; PORTILLO et al., 2000).

A maioria dos estudos envolvendo roedores utiliza o TAV perigonadal como principal depósito para determinar a função biológica do TAB, pela fácil acessibilidade e ponto de referência anatômica. No entanto, o TAV perigonadal é drenado sistemicamente via veia cava inferior, enquanto outros depósitos viscerais como o TAB mesentérico e omental são drenados via veia porta hepática. Consequentemente, todo aporte de AG provenientes da hidrólise dos TGs nesses dois últimos depósitos alcança primariamente o fígado (RYTKA et al., 2011).

O fluxo exagerado de AG via veia porta para o fígado, que ocorre em indivíduos com alta adiposidade visceral, resulta em uma resistência hepática à insulina. O aumento de AG no interior do hepatócito favorece o acúmulo de um intermediário de três átomos de carbono, que participa da biossíntese dos AG, o Malonil CoA. O Malonil CoA inibe alostericamente as enzimas da via glicolítica, favorecendo um acúmulo de glicose no interior do hepatócito, tornando o gradiente de concentração desfavorável à entrada da mesma via Glut 2 (ciclo de Randle) (LENINGHER, 2007). Adicionalmente, a secreção de citocinas inflamatórias [Interleucina 6 (IL-6), Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), *Macrophage Chemoattractant Protein-1* (MCP-1) e Resistina] pelo TAV

visceral também favorece a manifestação de resistência à insulina e a concentração dessas citocinas é maior na veia porta que nas artérias sistêmicas (FONTANA et al., 2007; HANAUER, S., 2005).

O TAB mesentérico corresponde à gordura acumulada no mesentério, membrana intra-abdominal formada pelo peritônio que sustenta o intestino delgado, enquanto o TAB omental é representado pela gordura acumulada no omento ou epiplon, que são duas membranas peritoneais unidas que revestem principalmente o estômago e duodeno proximal (Figura 3, 4 e 5).

Figura 3 - Representação esquemática do mesentério e omento (epiplon) (Adaptado do site <http://www.pt.wikipedia.org/Omento>).

Figura 4 - Representação esquemática do TAB mesentérico (Adaptado do site <http://www.digestivouq.blogspot.com>).

Figura 5 - Representação esquemática do TAB omental (epiplon) (Adaptado do site <http://www.lookfordiagnosis.com>).

O compartimento clássico associado ao estoque do excesso de gordura é o subcutâneo, que também tem um papel importante como isolante térmico na vigência de baixas temperaturas. Apesar de a elevada adiposidade visceral estar fortemente associada a várias desordens metabólicas (resistência à insulina, aterosclerose, hipertensão e dislipidemia), essa associação parece ser muito menos consistente em relação à gordura subcutânea. No entanto, em média 20% dos ácidos graxos que alcançam a veia porta e 14% do total de ácidos graxos que chegam à circulação sistêmica são derivados da gordura visceral, indicando que a maior parte dos ácidos graxos circulantes é proveniente do TAB subcutâneo (KLEIN, S., 2004; NIELSEN et al, 2004). Assim, por apresentar funções biológicas e atividades metabólicas distintas, os mecanismos de acúmulo e mobilização (lipólise) podem diferir de forma significativa entre os depósitos.

Devido à importância clínica dos diferentes depósitos de gordura, estudos relacionados ao controle da expressão depósito-específica de proteínas como LHS, ATGL, Perilipina A e Receptor beta3 adrenérgico (envolvidas com a lipólise) pelo T3 podem fornecer informações importantes sobre a capacidade deste hormônio de regular o conteúdo e distribuição da gordura corpórea, o que é de grande interesse devido à alta incidência de obesidade e desordens metabólicas relacionadas. Apesar de os HT apresentarem uma reconhecida ação lipolítica mediada pelas catecolaminas, via receptores beta adrenérgicos, a mobilização de gordura é um processo coordenado por vários processos enzimáticos, o que torna relevante a busca de informações relacionadas a uma ação mais direta desses hormônios sobre os mesmos.

2 JUSTIFICATIVA

Os HT participam de forma importante na manutenção da taxa metabólica, por meio da regulação transcricional e pós-transcricional de diferentes genes-alvo (NYGARD 2006; YANG; PRIVALSKY, 2001).

Apesar do T3 apresentar um reconhecido efeito lipolítico, são escassos os dados na literatura que estabeleçam o papel deste hormônio na regulação da expressão da LHS, da ATGL, da perilipina A e dos receptores beta3 adrenérgicos no tecido adiposo branco. Sendo a linha de pesquisa do nosso laboratório buscar potenciais genes regulados pelos hormônios tireoidianos, nos pareceu interessante investigar se os genes que codificam as proteínas citadas, seriam alvos do T3, e se esta possível regulação difere no TAB visceral e subcutâneo. Além disso, doenças metabólicas como obesidade e suas co-morbidades estão ganhando proporções epidêmicas e vários estudos têm mostrado que o impacto da obesidade no desenvolvimento de patologias como diabetes tipo 2 e aterosclerose é determinado pelo padrão de distribuição do tecido adiposo branco, o que torna importante a realização de estudos relacionados a esta questão.

3 OBJETIVO

Investigar a participação dos hormônios tireoidianos na regulação da expressão gênica e proteica da ATGL, LHS e perilipina A e expressão gênica de receptores beta3 adrenérgicos no TAB subcutâneo e visceral (depósitos omental e mesentérico) de ratos na ausência de HT (tireoidectomia) e após sua reposição em doses fisiológicas e supra-fisiológicas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Protocolo animal

Foram utilizados ratos machos da cepa Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com cerca de 200–250 g, provenientes do biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, onde foram mantidos em condições padronizadas de temperatura ambiente (23 ± 2 °C) e ciclo claro/escuro (12/12 h; luzes são acesas às 06:00 h). Eles permaneceram em gaiolas coletivas (máximo de 5 animais por gaiola) com alimentação e água *ad libitum*.

Inicialmente os animais foram divididos em grupo Controle (C) e hipotireoideo (Tx). Para indução do estado hipotireoideo, os animais foram submetidos à tireoidectomia cirúrgica, após anestesia por meio da utilização de ketamina e xilazina (100 e 10 mg/kg de peso corporal respectivamente), por via intraperitoneal. A tireoidectomia consistiu em uma incisão na parte ventral do pescoço do animal após tricotomia e higienização da região. Em seguida, o tecido subcutâneo foi divulsionado e os músculos pré-tireoidianos esterno-hióideo e esterno-tireóideo foram afastados para permitir o acesso e remoção da glândula tireóide. Adicionalmente, os animais receberam metimazol (0,03%) e CaCl (4,5 mM) na água de beber. Depois de um período de 20 dias, os animais Tx foram subdivididos em grupo hipotireoideo (Tx), grupo Tx tratado com T3 na dose fisiológica [Tx (0,3)] e grupo Tx tratado com T3 na dose suprafisiológica (5 X a dose fisiológica) [Tx (1,5)]. Os grupos controle e Tx foram tratados com salina, e os grupos Tx (0,3) e Tx (1,5) foram tratados, respectivamente, com 0,3 µg e 1,5 µg de T3/100 g de peso corporal, por via intraperitoneal durante 5 dias.

Após os tratamentos acima descritos os animais foram anestesiados com ketamina e xilazina, na dose acima especificada, e eutanasiados por decapitação. A eutanásia foi realizada ao redor das 10:00 h, de forma a manter os animais dentro de um quadro hormonal semelhante, evitando a interferência de possíveis variações circadianas nos parâmetros avaliados. Em seguida, o TAB subcutâneo, mesentérico e omental foram removidos, imediatamente congelados no nitrogênio e posteriormente mantidos a uma temperatura de -80° C para posterior análise. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal, com protocolo registrado sob nº 34 na folha 04 do livro 03.

4.2 Avaliação da expressão gênica

4.2.1 Extração do RNA total

A extração de RNA total foi realizada através do método de extração em coluna (Pure Link RNA Mini Kit; Ambion, Life Technologies, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Após homogeneização do tecido em trizol e repouso de 5 minutos em temperatura ambiente (TA), foi adicionado ao homogeneizado 200 µl de clorofórmio. As amostras foram agitadas (vórtex), incubadas por 2-3 minutos em TA e centrifugadas a 12.000 g, por 15 minutos, a 4 °C.

Após a centrifugação, foram transferidos 500 µl da fase aquosa para um novo eppendorf, onde foram adicionados 500 µl de álcool 70%. As amostras foram agitadas (vórtex) e posteriormente, 500 µl da solução foram adicionados a um cartucho de spin com tubo coletor. Seguiu-se com a centrifugação a 12.000 g, por 15 segundos em TA.

Após descarte do sobrenadante, foram adicionados 700 µl de *Wash Buffer I* ao centro da coluna e em seguida as amostras foram novamente centrifugadas a 12.000 g, por 15 segundos em TA. O sobrenadante foi descartado, 500 µl de *Wash Buffer II* foi adicionado e as amostras foram centrifugadas a 12.000 g, por 15 segundos em TA. O procedimento foi repetido; logo após as amostras foram centrifugadas a 12.000 g, por 2 minutos e o tubo coletor foi descartado.

O cartucho de spin foi encaixado em um eppendorf devidamente identificado e foram adicionados 30 µl de *Water RNAase- FREE* no centro do cartucho. As amostras foram então incubadas por 1 minuto em TA, centrifugadas a 12.000 g, por 2 minutos em TA e estocadas a -80 °C.

Após extração e purificação, a concentração das amostras foi estimada por densitometria óptica, através de espectrofotometria, a um comprimento de onda de 260 nm. Para verificar a integridade do RNA, 1 µg de RNA total foi plotado em gel de agarose (1%) corado com gel *red* para visualização das bandas 28S e 18S do RNA ribossomal.

4.2.2 Reação de transcrição reversa e Real-Time PCR

Para reação de transcrição reversa (RT) foram utilizados 2 µg de RNA mais 1 µl de oligo (dT) (0,5 µg/µl). As amostras foram incubadas a 65 °C por 10 minutos, favorecendo a desnaturação do RNA e o anelamento com o oligo (dT). Posteriormente foi adicionado um mix contendo: 4 µl do tampão da enzima Transcriptase Reversa (50 mM DDT; 3 mM de MgCl₂; 75

mM de KCl; 50 mM de Tris-HCl pH 8,3), 1 µl de dNTPs (10 mM) e 1 µl de M-MLV *Reverse Transcriptase* (50,000 U; Promega, EUA). Para obtenção de um volume final de 20 µl, foi adicionado H₂O DEPC. Em seguida, as amostras foram incubadas por 1 hora a 42 °C para formação de um híbrido (uma fita de DNA e uma de mRNA) a partir da ação da Transcriptase Reversa. A reação foi inativada à temperatura de 72 °C por 10 minutos e em seguida as amostras foram estocadas a -20 °C.

A quantidade relativa de cDNA gerada para cada gene de interesse foi verificada por PCR em Tempo Real empregando o reagente GoTaq qPCR Master Mix SYBR *Green* (Promega). Para amplificação dos genes da LHS (*Lipe*), ATGL (*Pnpla2*), Perilipina A (*Plin 1*), Receptor beta 3 adrenérgico (*Adrb3*), Beta actina (*Actb*), Ciclofilina A (*Ppia*), Proteína Ribossomal L19 (*Rpl19*), Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*) e *Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan monooxygenase* (*Ywha2*) foi utilizado 1 µl do produto da reação de transcrição reversa, ao qual foi adicionado 11,5 µl de uma solução contendo: 5 µl de Sybr *Green*; 0,5 µl de *Primer* sense (10 pmol); 0,5 µl de *Primer* anti-sense (10 pmol) e 5,5 µl de H₂O DEPC. A tabela 1 apresenta a sequência dos *Primers* utilizados neste estudo.

Tabela 1 - *Primers* utilizados no PCR em tempo real.

PRIMERS	SEQUÊNCIA
LHS (<i>Lipe</i>) SENSE	5'- TTTCCACCCACGGCGCTCAA - 3'
LHS (<i>Lipe</i>) ANTISENSE	5'- TCCAGAGCGCACGCCACAAG - 3'
ATGL (<i>Pnpla2</i>) SENSE	5'- AGACTCAACGAGGCCCTGCT - 3'
ATGL (<i>Pnpla2</i>) ANTISENSE	5'- CGCATCGGCAGCATGTTGGA - 3'
Perilipina (<i>Plin 1</i>) SENSE	5'- TAGGTCCCGCTTCCCAGGCT - 3'
Perilipina (<i>Plin 1</i>) ANTISENSE	5'- ACCCTTTGCGCTCCACCTCT - 3'
Receptor Beta 3 Adrenérgico (<i>Adrb3</i>) SENSE	5'- CAGGCAGAACTCACCGCTC - 3'
Receptor Beta 3 Adrenérgico (<i>Adrb3</i>) ANTISENSE	5'- TGCTAGATCTCCATGGTCC - 3'
Beta Actina (<i>Actb</i>) SENSE	5'- AAGATTTGGCACCACACT - 3'
Beta Actina (<i>Actb</i>) ANTISENSE	5'- AGGTGAGCAGCACAGGGT - 3'
Ciclofilina A (<i>Ppia</i>) SENSE	5'- CTGTCTCTTTTCGCCGCTTG - 3'
Ciclofilina A (<i>Ppia</i>) ANTISENSE	5'- TCTGCAAACAGCTCGAAGCA - 3'
Proteína Ribossomal L19 (<i>Rpl19</i>) SENSE	5'- CCAATGAAACCAACGAAATCG - 3'
Proteína Ribossomal L19 (<i>Rpl19</i>) ANTISENSE	5'- TCTGCAAACAGCTCGAAGCA - 3'

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (<i>Gapdh</i>)	5' - CCGCATCTTCTTGTGCAGTG - 3'
SENSE	
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (<i>Gapdh</i>)	5' - CTTGACTGTGCCGTTGAACT - 3'
ANTISENSE	
Tyrosine3-monooxygenase/tryptophan monooxygenase (<i>Ywha2</i>) SENSE	5'-CAACGATACCAAGAAGCATTGTA- 3'
Tyrosine3-monooxygenase/tryptophan monooxygenase (<i>Ywha2</i>) ANTISENSE	5' - GGGCCAGACCCAGTCTGA - 3'

4.3 Avaliação da expressão de proteínas

4.3.1 Extração de Proteínas Totais e Quantificação

As amostras de tecido adiposo subcutâneo, mesentérico e omental foram homogeneizadas em tampões apropriados (Tabela 2) e transferidas para tubos eppendorf devidamente identificados. Prosseguiu-se com a centrifugação a 12.000 rpm, a 4 °C, por 40 min. A avaliação da concentração proteica foi realizada pelo método de Bradford (Bio-Rad, Dye Reagent Concentrate).

Tabela 2 - Tampões utilizados na extração das proteínas.

Proteína:	Tampão:
ATGL e Perilipina A	Azida de sódio 5 mM; EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético) 2 mM; Sacarose 250 mM; Hepes 20 mM; Fluoreto de sódio 10 mM; Pirofosfato de sódio 100 mM; Ortovanadato de sódio 10 mM; Ácido Okadaico 1:1000; Fenilmetil sulfonil (PMSF) e aprotinina (PIC) 1:100.
LHS	NaCl 1,5M; KCl 200mM; MgCl ₂ 200mM; EDTA 200mM; Pirofosfato de Na ⁺ 0,5M; Triton X-100 20%; Glicerol 75%; Tris-base pH 7,8; Ortovanadato de sódio 10 mM; Ácido Okadaico 1:1000; PMSF e PIC 1:100.

4.3.2 Preparo das amostras, Eletroforese em Gel de Poliacrilamida – SDS (SDS-PAGE) e Western Blotting

Após a quantificação proteica, as amostras foram aquecidas por 5 min a 100 °C em tampão Laemmli (0.05 M Tris HCl pH 6,8, SDS 10%, 15% glicerol, mercaptoetanol 6% e 0.05% azul de bromofenol), e separadas por meio de eletroforese [SDS-PAGE: Gel de empacotamento - Água Milli-Q (qsp), acrilamida 30%, Tris 1,0 M (pH= 6,8), SDS (*sodium dodecyl sulfate*) 10%, APS (*persulfato de amônio*) 10% e Temed; Gel de separação - Água Milli-Q (qsp), acrilamida 30%, Tris 1,5 M (pH= 8,8), SDS 10%, APS 10% e Temed] em tampão contendo 192 mM de glicina (ácido aminoacético), 25 mM de Tris – Base e SDS 0,1%. No primeiro poço do gel foram aplicados 4 µl de marcador de peso molecular (Thermo Scientific) para posterior identificação da proteína correspondente.

Após a eletroforese, foi feita a transferência das proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose em tampão de transferência (25 mM de Tris – Base, 192 mM de Glicina e Metanol 20%). A membrana foi corada com Vermelho Ponceau para verificar se a transferência ocorreu adequadamente e se a quantidade relativa de proteínas depositadas em cada poço foi semelhante (controle de *loading*). Em seguida a membrana foi lavada em solução contendo 0,05 M Tris HCl, 1,5 M NaCl, Tween 20 e NP-40, por 5 minutos, para remoção do corante, e após, incubada em solução de bloqueio [0,05 M Tris HCl, Tween 20, NP-40, azida sódica e albumina] por duas horas, sob agitação constante em temperatura ambiente, para evitar ligações inespecíficas do Ac à membrana.

As membranas foram incubadas com anticorpos específicos [anti - ATGL (1:1000; Cell Signaling), anti - LHS (1:1000; Abcam), anti - perilipina (1:1000; Abcam)], *overnight*, à 4 °C sob agitação constante, lavadas 4 vezes, por 15 minutos, na solução acima especificada, e incubadas com anticorpo secundário anti - *rabbit* [1:5000; Peroxidase- conjugated affinipure *goat* anti-*rabbit* IgG (H+L) Jackson Imuno Research], por 1 h, sob agitação constante, em temperatura ambiente. Seguiu-se uma nova lavagem da membrana (4 vezes, por 15 minutos cada) na solução descrita acima.

As bandas proteicas foram detectadas por quimioluminescência (ECL), após exposição a filmes de raios X (1 min), e analisadas por densitometria através do programa Image J.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados utilizando-se a análise de variância (one-way ANOVA) e o pós-teste de múltiplas comparações Student-Newman-Keuls (Package: Prism Graph Pad – Version: 6.0). Os dados estão expressos por média $\pm$ SEM, e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

6 RESULTADOS

6.1 Avaliação da eficiência dos tratamentos

Para avaliar a eficiência dos tratamentos foram analisados o peso corporal (PC), o peso seco do coração (PSC) e a relação PSC/PC. O PSC foi determinado após manter o órgão em estufa a 36 °C *overnight*.

Observa-se na Tabela 3 que os animais Tx (hipotireoideos) apresentaram uma redução significativa do PC e PSC. A redução do peso cardíaco foi confirmada pelo cálculo da razão PSC/PC, corrigindo, dessa maneira, reduções nesses valores em decorrência da diminuição do peso corpóreo total que foi também observada nos animais. O tratamento com T3, conforme esperado, promoveu aumento da razão PSC/PC, o que se deveu à perda de peso observada. Não observamos uma hipertrofia cardíaca quando os animais tireoidectomizados foram tratados com T3, no entanto, é importante salientar que 5 dias de tratamento não são suficientes para permitir este efeito devido ao quadro de hipotireoidismo já instalado.

Tabela 3 – Peso corporal (PC), Peso Seco Cardíaco (PSC) e razão PSC/PC de ratos controle tratados com salina (C), hipotireoideos tratados com salina (Tx) ou T3 [Tx (0,3) e Tx (1,5)].

GRUPOS	PC (g)	PSC (g)	PSC/PC [§]
C	358 ± 11,08	0,27 ± 0,01	0,7 ± 0,02
Tx	251,4 ± 8,2*	0,15 ± 0,002*	0,6 ± 0,01*
Tx (0.3)	259,9 ± 7,6*	0,19 ± 0,009*	0,74 ± 0,02
Tx (1.5)	247,9 ± 7,3*	0,2 ± 0,006*	0,83 ± 0,03*

Médias ± SEM: * P = 0,001 vs C. § valores multiplicados por 1000 (n=10).

6.2 Avaliação do efeito da tireoidectomia e do tratamento com T3 nas doses fisiológica (0.3) e supra-fisiológica (1.5) por 5 dias sobre o peso corporal de ratos.

Os animais dos diferentes grupos experimentais apresentaram o mesmo peso corporal inicial (~250 g). Pode-se notar que 20 dias após a tireoidectomia houve uma redução no peso corpóreo (grupo Tx) quando comparados aos animais controle (C), os quais ganharam peso nesse período. Após 5 dias de tratamento com T3 nas doses fisiológica [Tx (0.3)] e supra-fisiológica [Tx

(1.5)] observamos uma redução adicional significativa do peso corpóreo dos animais (figura 6). Dessa forma o ΔP [peso inicial (g) – peso final (g)] do grupo controle foi maior ($\Delta P = 85,5$ g) que o dos animais Tx ($\Delta P = -29,75$), Tx (0.3) ($\Delta P = -28$) e Tx (1.5) ($\Delta P = -42$), indicando que o crescimento dos animais foi comprometido pela tireoidectomia (vs controle), e que o tratamento com T3 reduziu ainda mais o peso corporal dos animais (tabela 3).

Figura 6 - Representação gráfica do peso corporal de ratos controle tratados com salina (C), hipotireoideos tratados com salina (Tx) ou T3 nas doses 0,3 e 1,5 $\mu\text{g}/100$ g de peso corporal [Tx (0,3) e Tx (1,5), respectivamente]. Na abscissa o dia 0 corresponde ao peso dos animais no dia da tireoidectomia cirúrgica, o 20º dia representa o início dos tratamentos com T3, e o 25º dia corresponde ao dia do sacrifício dos animais. Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM. * $p < 0.05$ vs C (n=8).

Tabela 4 - Peso inicial, final e ΔP de ratos controle tratados com salina (C), hipotireoideos tratados com salina (Tx) ou T3 nas doses 0,3 e 1,5 $\mu\text{g}/100$ g de peso corporal [Tx (0,3) e Tx (1,5), respectivamente].

Grupos	Peso Inicial (PI)	Peso Final (PF)	ΔP
Controle (C)	267 $\pm$ 3,8	352,8 $\pm$ 16,3	85,75 $\pm$ 18,3
Tx	254,5 $\pm$ 8,7	224,8 $\pm$ 5,2*	- 29,75 $\pm$ 9,8*
Tx (0.3)	270,5 $\pm$ 7,8	242,5 $\pm$ 7,7*	- 28 $\pm$ 6,3*
Tx (1.5)	260,5 $\pm$ 12,3	218 $\pm$ 7*	- 42 $\pm$ 11,6*

Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM. * $p < 0,0001$ vs C (n = 8).

6.3 Avaliação da variação da expressão gênica do Receptor beta 3 adrenérgico, LHS, Perilipina A e ATGL entre os depósitos de TAB subcutâneo, mesentérico e omental.

Para análise da variação na expressão dos genes estudados nos diferentes depósitos de TAB, selecionamos um possível gene constitutivo para normalização dos valores obtidos como

mostra a figura 7. A expressão gênica da Proteína Ribossomal L19 (*Rpl19*) foi maior no TAB subcutâneo, em relação aos outros dois depósitos. Com relação à expressão da Ciclofilina A (*Ppia*), Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*), *Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan monooxygenase* (*Ywha2*) e Beta Actina (*actb*) não houve diferença significativa entre os tecidos. No entanto, o gene de escolha foi o *Actb* (Beta Actina), pois os valores de dCT estão mais próximos de 1 [TAB mesentérico utilizado como referência (normalizador)].

Figura 7 - Conteúdo de mRNA total de *Rpl19* (A), *Ywhaz2* (B), *Ppia* (C), *Gapdh* (D) e *Actb* (E). Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM. *Rpl19*: * $p < 0,01$ vs TAB mesentérico e omental ($n = 6$).

A diferença na expressão gênica da ATGL (*Pnpla2*), LHS (*Lipe*), Perilipina A (*Plin 1*) e receptor beta 3 adrenérgico (*Adrb3*) no TAB subcutâneo, mesentérico e omental está representada na figura 8. Observa-se uma maior expressão da LHS, Perilipina A e Receptor beta 3 adrenérgico no depósito visceral mesentérico com relação à gordura subcutânea. Nota-se também que o conteúdo de mRNA tanto da LHS (não significativo) quanto do receptor beta 3 adrenérgico na gordura mesentérica é maior que na gordura omental. Contrariamente ao observado nos outros genes estudados, a expressão da ATGL mostrou-se significativamente maior na gordura subcutânea. Os cálculos de dCT foram baseados em Livak; Schmittgen (2001), utilizando o gene *Actb* como normalizador e multiplicando os valores por 100.

Figura 8 - Conteúdo de mRNA total da Receptor beta 3 adrenérgico (A), LHS (B), Perilipina A (C) e ATGL (D) nos TABs mesentérico, subcutâneo e omental. Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM. *Adrb3* (Receptor beta 3 adrenérgico): [#] $p < 0,05$ vs TAB subcutâneo e omental, ^{*} $p < 0,05$ vs TAB omental. *Lipe* (LHS): ^{*} $p < 0,01$ vs TAB Subcutâneo. *Plin 1* (Perilipina A): [#] $p < 0,05$ vs TAB subcutâneo e omental. *Pnpla2* (ATGL): ^{*} $p < 0,05$ vs TAB subcutâneo, [#] $p < 0,05$ vs TAB Omental (n = 6).

6.4 Efeito da tireoidectomia sobre o conteúdo de mRNA do Receptor beta 3 adrenérgico, LHS, Perilipina A e ATGL nos tecidos adiposo branco (TAB) subcutâneo, mesentérico e omental.

A avaliação do efeito da tireoidectomia sobre o conteúdo total de mRNA do receptor beta 3 adrenérgico, LHS, Perilipina A e ATGL nos depósitos estudados, estão representados nas figuras 9, 10, 11 e 12, respectivamente.

Figura 9 - Conteúdo de mRNA total do receptor beta 3 adrenérgico no TAB subcutâneo (A), mesentérico (B) e omental (C) de ratos controle (C) e hipotireoideos tratados com salina (Tx). Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM. ** $p < 0,01$ e # $p < 0,05$ vs C (n = 8).

Figura 10 - Conteúdo de mRNA total da LHS no TAB subcutâneo (A), mesentérico (B) e omental (C) de ratos controle (C) e hipotireoideos tratados com salina (Tx). Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ vs C (n=8).

A)

B)

C)

Figura 11 - Conteúdo de mRNA total da Perilipina A no TAB subcutâneo (A), mesentérico (B) e omental (C) de ratos controle (C) e hipotireoideos tratados com salina (Tx). Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM (n = 8).

A)

B)

Figura 12 - Conteúdo de mRNA total da ATGL no TAB subcutâneo (A), mesentérico (B) e omental (C) de ratos controle (C) e hipotireoideos tratados com salina (Tx). Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM. ** $p < 0,01$ vs C (n = 8).

A tireoidectomia promoveu na gordura mesentérica uma redução significativa no conteúdo de mRNA do receptor beta 3 adrenérgico, LHS e ATGL nos animais tireoidectomizados (Tx) (figuras 9, 10 e 12). Já, no TAB subcutâneo houve um aumento significativo da expressão gênica tanto da LHS como do receptor beta 3 adrenérgico, além de uma tendência ao aumento da expressão da ATGL e perilipina. No TAB omental o conteúdo de todos os mRNAs estudados não sofreu alteração com a tireoidectomia, com exceção do mRNA que codifica a perilipina, que se apresentou aumentado, embora não significativo (figura 11).

6.5 Efeito do tratamento com T3 nas doses fisiológica (0,3 $\mu\text{g}/100\text{g}$ de PC) e supra fisiológica (1,5 $\mu\text{g}/100\text{g}$ de PC) sobre o conteúdo de mRNA do Receptor beta 3 adrenérgico, LHS, Perilipina A e ATGL nos tecidos adiposo branco (TAB) subcutâneo, mesentérico e omental.

A avaliação do efeito do tratamento com T3 sobre o conteúdo total de mRNA do receptor beta 3 adrenérgico, LHS, Perilipina A e ATGL nos depósitos estudados, estão representados na figura 13, 14, 15 e 16, respectivamente.

C)

Figura 13 - Conteúdo de mRNA total do receptor beta 3 adrenérgico no TAB subcutâneo (A), mesentérico (B) e omental (C) de ratos hipotireoideos tratados com salina (Tx) ou T3 nas doses de 0,3 e 1,5 $\mu\text{g}/100$ g de peso corporal [Tx (0,3) e Tx (1,5), respectivamente]. A linha tracejada representa os valores do grupo controle. Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM.

A)

B)

C)

Figura 14 - Conteúdo de mRNA total da LHS no TAB subcutâneo (A), mesentérico (B) e omental (C) de ratos hipotireoideos tratados com salina (Tx) ou T3 nas doses de 0,3 e 1,5 $\mu\text{g}/100$ g de peso corporal [Tx (0,3) e Tx (1,5), respectivamente]. A linha tracejada representa os valores do grupo controle. Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM. ** $p < 0,01$ vs Tx; # $p < 0,05$ vs Tx; * $p < 0,05$ vs Tx (n = 8).

Figura 15 - Conteúdo de mRNA total da Perilipina A no TAB subcutâneo (A), mesentérico (B) e omental (C) de ratos hipotireoideos tratados com salina (Tx) ou T3 nas doses de 0,3 e 1,5 $\mu\text{g}/100$ g de peso corporal [Tx (0,3) e Tx (1,5), respectivamente]. A linha tracejada representa os valores do grupo controle. Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM. ** $p < 0,01$ vs Tx; * $p < 0,05$ vs Tx (n = 8).

Figura 16 - Conteúdo de mRNA total da ATGL no TAB subcutâneo (A), mesentérico (B) e omental (C) de ratos hipotireóides tratados com salina (Tx) ou T3 nas doses de 0,3 e 1,5 µg/100 g de peso corporal [Tx (0,3) e Tx (1,5), respectivamente]. A linha tracejada representa os valores do grupo controle. Os dados estão expressos pela média ± SEM (n = 8).

Observa-se que o tratamento com T3 não causou alterações significativas na expressão gênica da ATGL (Figura 16) e nem do receptor beta 3 adrenérgico (Figura 13) em nenhum dos depósitos estudados, vs grupo Tx.

No entanto, houve uma redução significativa do conteúdo de mRNA da LHS (Figura 14) e Perilipina A (Figura 15) no TAB subcutâneo dos animais tratados com dose fisiológica de T3. O mesmo tratamento também reduziu a expressão gênica da LHS nos depósitos mesentérico e omental (Figura 14). O tratamento com dose supra fisiológica de T3 reduziu significativamente o conteúdo de mRNA tanto da LHS (Figura 14) quanto da Perilipina A (Figura 15) no TAB subcutâneo quando comparado aos animais Tx. O mesmo foi observado no TAB mesentérico com relação ao gene da Perilipina A (Figura 15).

6.6 Efeito da tireoidectomia e do tratamento com T3 nas doses fisiológica (0,3 µg/ 100 g de PC) e supra fisiológica (1,5 µg/ 100 g de PC) sobre o conteúdo proteico da LHS, Perilipina A e ATGL nos tecidos adiposo branco (TAB) subcutâneo, mesentérico e omental.

A avaliação do efeito da tireoidectomia e do tratamento com T3 sobre o conteúdo proteico da LHS, Perilipina A e ATGL nos depósitos estudados está representada nas figuras 17, 18 e 19.

Figura 17 - Representação gráfica do conteúdo proteico de LHS no TAB subcutâneo (A) e mesentérico (B) de ratos controle tratados com salina (C), hipotireoideos tratados com salina (Tx) ou T3 nas doses de 0,3 e 1,5 µg/100 g de peso corporal [Tx (0,3) e Tx (1,5), respectivamente]. Os dados estão expressos pela média ± SEM. TAB Subcutâneo: * $p < 0,05$ vs C; & $p < 0,05$ e && $p < 0,01$ vs Tx; # $p < 0,05$ vs Tx (1,5). TAB Mesentérico: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ vs C; ### $p < 0,001$ vs Tx; **** $p < 0,0001$ vs C e Tx; && $p < 0,01$ vs Tx (0,3). (n=6).

Houve uma redução significativa do conteúdo proteico da LHS no TAB subcutâneo, mesentérico e omental dos animais hipotireoideos em comparação aos animais controle. O tratamento com uma dose fisiológica de T3 restaurou os níveis da LHS a valores próximos aos dos animais controle, enquanto o tratamento com uma dose supra fisiológica do hormônio aumentou significativamente a expressão proteica da LHS em aproximadamente 50% com relação aos animais controle e 75% com relação aos animais tireoidectomizados (Tx) no depósito mesentérico, e aproximadamente 35% e 60%, respectivamente no depósito subcutâneo.

Figura 18 - Representação gráfica do conteúdo de Perilipina A no TAB subcutâneo (A), mesentérico (B) e omental (C) de ratos controle tratados com salina (C), hipotireóides tratados com salina (Tx) ou T3 nas doses de 0,3 e 1,5 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de peso corporal [Tx (0,3) e Tx (1,5), respectivamente]. Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM ($n = 12$).

Observou-se uma tendência ao aumento do conteúdo proteico da Perilipina A nos grupos Tx, Tx (0,3) e Tx (1,5) no depósito subcutâneo. Nos demais depósitos de tecido adiposo, não houve mudança no conteúdo desta proteína em nenhum dos grupos.

Figura 19 - Representação gráfica do conteúdo de ATGL no TAB subcutâneo (A), mesentérico (B) e omental (C) de ratos hipotireoideos (Tx) e hipotireoideos tratados com T3 nas doses de 0,3 e 1,5 µg/100 g de peso corporal [Tx (0,3) e Tx (1,5), respectivamente]. Os dados estão expressos pela média ± SEM, TAB subcutâneo: ^{##} $p < 0,01$ vs Tx; ^{****} $p < 0,0001$ vs C e Tx; TAB mesentérico: * $p < 0,05$ vs Tx e Tx (0.3) (n = 12).

No TAB subcutâneo ocorreu um aumento significativo do conteúdo desta proteína no grupo hipotireoideo tratado com T3 na dose fisiológica quando comparado ao grupo hipotireoideo. Adicionalmente houve um aumento significativo do conteúdo proteico desta enzima no grupo tratado com T3 na dose suprafisiológica quando comparado ao grupo controle e ao grupo hipotireoideo. Ainda, neste depósito o grupo hipotireoideo apresentou uma tendência à redução da expressão da ATGL.

No TAB mesentérico, o conteúdo proteico dessa enzima aumentou significativamente no grupo tratado com T3 na dose suprafisiológica.

7 DISCUSSÃO

Os hormônios tireoidianos (HT), por induzirem a expressão do gene que codifica os receptores beta-adrenérgicos, aumentam a sensibilidade do tecido adiposo às catecolaminas, sendo, por essa razão, reconhecidos como importantes agentes lipolíticos. Porém, não há dados na literatura referentes às ações destes hormônios sobre outras proteínas envolvidas na lipólise, bem como sobre a resposta dos diferentes depósitos de gordura a eles. Neste estudo, avaliamos o papel dos HT sobre a expressão gênica e o conteúdo da lipase dos triglicerídeos do adipócito (ATGL), lipase hormônio sensível (LHS) e perilipina A, bem como da expressão gênica do receptor beta3 adrenérgico, no TAB subcutâneo e visceral (mesentérico e omental) de ratos hipotireoideos submetidos ou não a tratamento com T3.

Os tratamentos oferecidos se mostraram eficientes, uma vez que a relação peso seco cardíaco/ peso corpóreo nos animais tireoidectomizados se mostrou reduzida, e o contrário ocorreu nos animais tireoidectomizados que foram tratados com T3 em ambas as doses. Esses dados eram esperados e corroboram os dados da literatura que apontam o coração como um órgão alvo bastante importante do T3, onde este hormônio induz a síntese de várias proteínas, como a cadeia pesada da miosina (alfaMHC) e Ca^{2+} -ATPase (SERCA), razão pela qual nos estados hipertireoideos ocorre a hipertrofia cardíaca (KLAIN; DANZI., 2007).

Observamos também que a tireoidectomia prejudicou o crescimento dos animais, cujo ganho de peso foi inferior ao observado no grupo controle durante o período estudado. No entanto, sabe-se que os HT são importantes indutores da expressão do gene do GH que, diretamente, ou via IGF-I, atua promovendo a síntese protéica em vários tecidos (BINNERTS et al., 2008; RISS et al., 2002). O próprio HT também atua fisiologicamente estimulando o anabolismo protéico. Um estudo recente demonstrou que camundongos tireoidectomizados tiveram a gordura periepididimal, o peso corpóreo e o diâmetro dos adipócitos reduzidos, além de um aumento de 100 vezes nos níveis plasmáticos de TSH (ENDO; KOBAYASHI, 2012), hormônio que vem sendo apontado como tendo uma ação lipolítica (ELGADI et al., 2010; GAGNON et al., 2010, 2014; JANSON; MARCUS, 1997; JANSON et al., 1998). Assim, a elevação do TSH plasmático, que é característica dos animais Tx, pode ser um fator a se considerar no conjunto dos dados. Em suma, na ausência de HT o comprometimento no ganho de massa dos animais já era esperado.

O tratamento com T3 nas doses fisiológica e supra fisiológica não reverteu os efeitos da tireoidectomia sobre o peso corpóreo dos animais que, por sua vez, tiveram perda de peso adicional, embora não significativa. Contudo, podemos observar que os animais Tx que foram tratados com doses fisiológicas de T3 foram os que apresentaram menor perda de peso neste

período de 5 dias, seguindo-se o grupo Tx e o Tx tratado com doses supra-fisiológicas de T3. Acreditamos que o tratamento com T3 na dose fisiológica poderia ter promovido uma reversão parcial do quadro, caso o tratamento fosse prolongado. Já, a perda de peso observada no grupo tratado com doses supra-fisiológicas de T3 era esperada, em função dos efeitos catabólicos do hormônio sobre o metabolismo proteico e lipídico (LEWIS; LEFKOWITZ, 1977; MULLER; SEITZ, 1984; PFEIFLE et al., 1981; RUBIO et al., 1995).

Antes de avaliarmos os efeitos dos HT sobre a expressão gênica e proteica das proteínas alvo do nosso estudo, fizemos uma análise comparativa da expressão das mesmas nos diferentes depósitos de gordura visando compreender o possível impacto dos HT nos mesmos. Nesse sentido, inicialmente testamos vários genes constitutivos para selecionarmos um cuja expressão sofresse menor variação entre os diferentes tecidos, já que um gene constitutivo usado para uma determinada condição pode não ser o ideal para outra.

Assim, observamos que o gene *Rpl19* apresenta-se mais expresso no TAB subcutâneo. De fato, este gene não tem sido utilizado como normalizador em estudos que comparam a expressão gênica nos diferentes depósitos. Arvidsson et al. (2004) comparou a diferença na expressão gênica da Perilipina A entre os depósitos subcutâneo e omental utilizando o gene *Gapdh* como constitutivo, corroborando nosso estudo que mostra que a expressão desse gene não varia significativamente entre os depósitos. Um outro estudo que comparou a expressão gênica de diferentes genes constitutivos entre 10 depósitos de TAV, mostrou que os genes *Actb* e *RpII* (RNA Polimerase II) se apresentaram mais estáveis, seguidos do gene *Gapdh* e *Hprt I* (*Hypoxanthine phosphoribosyl transferase I*), conforme observamos nas nossas análises em relação a *Actb* e *Gapdh* (MEHTA et al., 2010). No entanto, na presença de diabetes mellitus tipo 2 e obesidade, variações na expressão desses genes foram encontradas no TAB subcutâneo e visceral, mostrando a influência das condições experimentais (CATALAN et al, 2007). *Actb* e *Gapdh* têm sido os genes de referência mais utilizados em estudos de expressão gênica no tecido adiposo, sendo assim, e baseado nas nossas análises, utilizamos o *Actb* como normalizador na avaliação da expressão diferencial depósito-específica.

Assim, os resultados relativos à expressão diferencial dos genes que codificam as proteínas lipolíticas nos depósitos de gordura estudados mostraram que o conteúdo de mRNA de LHS, perilipina A e receptor beta 3 adrenérgico foi significativamente maior na gordura mesentérica, em relação à subcutânea. No depósito omental, observou-se também uma maior expressão do mRNA da LHS e receptor beta 3 adrenérgico, porém não significativa. A expressão gênica da perilipina A no TAB omental foi semelhante ao TAB subcutâneo. No que concerne a

ATGL, observou-se um predomínio do conteúdo de mRNA dessa enzima no depósito subcutâneo sobre os depósitos mesentérico e omental.

Já foi reportado que o TAV apresenta uma alta capacidade lipolítica, o que tem sido relacionado a um aumento do conteúdo de receptores adrenérgicos nesse depósito (ARNER et al., 1990; PALOU et al., 2010; PORTILLO et al., 2000). Adicionalmente, estudos *in vitro* mostraram que adipócitos provenientes da gordura visceral apresentam uma maior resposta as catecolaminas quando comparados aos derivados do tecido subcutâneo (REBUFFÉ-SCRIV et al., 1989). Em humanos, o receptor beta3 está presente predominantemente no TAB visceral, sendo pouco expresso na gordura subcutânea, dados que foram corroborados pelos nossos estudos (DENG et al., 1996).

Embora nosso trabalho tenha apontado um predomínio do conteúdo de mRNA da ATGL no depósito subcutâneo com relação ao visceral, outro estudo mostrou que a expressão gênica da ATGL foi maior no depósito visceral retroperitoneal (significativo) e mesentérico com relação ao depósito subcutâneo (PALOU et al., 2009). Com relação à LHS, nossos dados corroboram o estudo de Palou et al. (2009), no qual a expressão gênica desta enzima foi maior nos depósitos viscerais (retroperitoneal e mesentérico). Os depósitos regionais específicos de tecido adiposo branco têm tamanhos celulares, organização estrutural e funções biológicas diferentes (GIORGINO et al., 2005). O padrão diferencial de expressão gênica nestes depósitos é responsável por esta funcionalidade específica, e nossas análises mostram que essa variação tem sido também observada em relação à regulação da lipólise, conforme descrito em outros trabalhos (JENSEN et al., 1997; MARTIN et al., 1991).

Quanto ao mRNA da perilipina observamos um predomínio na sua expressão no depósito mesentérico, sobre os depósitos omental e subcutâneo. Entretanto, vários trabalhos em humanos com obesidade têm mostrado que o conteúdo deste transcrito é maior no TAB subcutâneo, quando comparado à gordura visceral (omental) (ARVIDSSON et al., 2004; RAY et al., 2009; WANG et al., 2003).

Conforme apontado anteriormente, o HT é reconhecido como importante agente lipolítico, por suas ações indutoras do gene que codifica os receptores beta adrenérgicos no TA. Os nossos estudos também foram nessa direção, uma vez que detectamos uma redução significativa na expressão do mRNA do receptor beta 3 adrenérgico no depósito mesentérico do grupo hipotireoideo. Contudo, essa regulação não foi observada nos outros depósitos analisados, ocorrendo até um aumento dela no TA subcutâneo. Além disso, o tratamento com T3 não alterou o conteúdo de mRNA desse receptor em nenhum dos depósitos estudados. Assim, nossos dados não

corroboram os de estudos que mostram uma elevação de 72% na expressão gênica dos receptores beta3 adrenérgicos no estado hipertireoideo. Algumas diferenças no protocolo experimental poderiam justificar, ao menos em parte, essa disparidade. Por exemplo, nesses estudos a dose de T3 utilizada foi de 0,5 mg/kg, ou seja, 33 vezes superior a dose utilizada na condução do nosso estudo (15 µg/kg), e 167 vezes maior que a dose de T3 considerada fisiológica (3 µg/Kg). Além disso, a duração do tratamento também foi superior (7 dias vs 5 dias). Ainda, tais estudos foram realizados no TAB periepididimal, e já é descrito que o padrão de expressão gênica difere entre os depósitos de TAB (GERMACK et al., 2000).

Quanto aos resultados relativos à expressão gênica da LHS, observou-se uma redução significativa na expressão dessa enzima no TAB mesentérico e um aumento na expressão da mesma no TAB subcutâneo dos animais hipotireoideos com relação aos animais controle. O tratamento com T3 (na dose fisiológica) reduziu o conteúdo de mRNA dessa enzima em todos os depósitos de TAB estudados. Observa-se assim, um padrão similar ao que foi detectado com o mRNA do receptor beta 3 adrenérgico. Com relação à expressão proteica da LHS, esta mostrou-se reduzida nos animais tireoidectomizados, quando comparada aos animais controle, reproduzindo os dados de expressão gênica. Porém, o tratamento com T3 tanto nas doses fisiológica como na supra fisiológica elevou o conteúdo desta proteína em todos os depósitos de TAB analisados. Esses dados, aparentemente contraditórios, que mostram queda do conteúdo de mRNA com elevação da sua proteína correspondente, são frequentemente evidenciados quando mecanismos pós-transcricionais de regulação da expressão gênica são acionados (LANDMARK et al., 1993; LE ROCH et al., 2004). De fato, eles foram negligenciados por muitos anos, por serem interpretados como sendo erros procedimentais. Atualmente há várias evidências de ações pós-transcricionais de HT promovendo, por mecanismos ainda não completamente conhecidos, um recrutamento rápido de mRNAs para a maquinaria de tradução, o que resulta no aumento do conteúdo de proteínas codificadas por esses mRNAs (BRUNETTO et al., 2010; SILVA et al., 2012). Essas ações levam eventualmente a uma redução do conteúdo dos mRNAs alvo do estudo, e muitas vezes, precedem as ações transcricionais que são desencadeadas pelo mesmo agente. É possível que na dose e tempo de tratamento de T3 utilizados neste estudo que, conforme apontado anteriormente diferiram expressivamente do modelo experimental utilizado em que se detectou aumento de mRNA de receptor beta 3 adrenérgico em resposta ao T3, tenha ocorrido inicialmente uma ação pós-transcricional do T3, nos moldes descritos acima, gerando assim o aumento do conteúdo de LHS. É possível, ainda, que a ação transcricional do T3, aumentando o conteúdo de mRNA da LHS, possa vir a ser detectada com um tratamento mais prolongado com esta mesma

dose de T3. Adicionalmente, uma outra possibilidade para o aumento do conteúdo proteico da LHS seria uma ação do T3 reduzindo a proteólise desta proteína.

A LHS foi a primeira triglicerídeo hidrolase identificada no interior do adipócito e é a enzima efetora da lipólise em resposta as catecolaminas. No estado inativo, esta enzima está localizada no citoplasma e a translocação da LHS para a gota lipídica (lipossoma) é um evento crítico para que a lipólise ocorra (HOLM et al., 2000). Sabemos que o T3 aumenta a sensibilidade desse tecido às catecolaminas que, via AMPc, promovem ativação da PKA, a qual é requerida para aumentar a atividade catalítica e favorecer a translocação da LHS para o lipossoma (MIYOSHI et al., 2006). No entanto, nossos dados sugerem um efeito regulatório direto do T3 sobre a expressão dessa enzima, dado que ainda não foi descrito na literatura e que aponta uma ação direta do T3 na lipólise. Vale comentar que demonstramos que a expressão do gene que codifica a LHS é maior no depósito mesentérico do que no subcutâneo (Figura 8). Assim, embora o T3 aumente a expressão dessa enzima em ambos os territórios, é possível que, se houver paralelamente aumento da atividade da LHS, os efeitos do T3 no TA mesentérico tragam maiores repercussões fisiológicas dada as características desse depósito, embora se saiba que a maior parte dos AG circulantes sejam provenientes do depósito subcutâneo (KLEIN S., 2004; NIELSEN et al., 2004).

Sabe-se que a habilidade da PKA em estimular a lipólise também é mediada em grande parte pela fosforilação da perilipina, proteína estrutural associada à gota lipídica (BRASAEMLE et al., 2007). Estudos mostram que a translocação da LHS para a gota lipídica depende da fosforilação da perilipina pela PKA (SU et al., 2003), enzima que, conforme comentado, pode ser ativada pelas catecolaminas. Embora estudo de Miyoshi et al. (2006) tenha questionado ser a fosforilação da perilipina necessária para a translocação da LHS, sabemos que a fosforilação da perilipina é essencial para que a ação hidrolítica da LHS sobre o lipossoma aconteça. De fato, estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que níveis reduzidos ou a ausência da perilipina resultam em uma redução da lipólise estimulada pelas catecolaminas (MIYOSHI et al., 2007).

O tratamento com T3 reduziu significativamente a expressão gênica da perilipina A no TAB subcutâneo e mesentérico. Além disso, no depósito omental observou-se uma tendência à redução da expressão deste mRNA. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que níveis reduzidos ou ausência de perilipina no TAB resultaram em um aumento da lipólise basal e diminuição da lipólise mediada pelas catecolaminas (MARTINEZ-BOTAS et al., 2000; MIYOSHI et al., 2007; ZHANG et al., 2003). Considerando que os hormônios tireoidianos aumentam a lipólise estimulada pelas catecolaminas, a regulação negativa da expressão gênica desta proteína pelo T3

prejudicaria a ação adrenérgica pela ausência do principal substrato lipolítico da PKA. No entanto, a expressão proteica da perilipina A não foi alterada pelo T3, efeito rebote que anulou um possível prejuízo da lipólise estimulada, visto que é a proteína quem vai exercer o efeito biológico.

A ATGL é uma lipase recentemente identificada como uma importante e específica triglicerídeo hidrolase que promove o catabolismo da gordura estocada no tecido adiposo (ZIMMERMAN et al., 2004). Esta enzima hidrolisa preferencialmente a primeira ligação éster do triacilglicerol, e sua presença no tecido adiposo foi sugerida a partir de estudos que mostraram que animais *knockout* para LHS mantêm uma atividade lipolítica e exibem um acúmulo de diacilglicerol (DAG) em vários tecidos (HAEMMERLE et al., 2006; RYDÉN et al., 2007; SMIRNOVA et al., 2006). Sendo assim, a ATGL é a enzima iniciadora da lipólise, razão pela qual a incluímos no nosso estudo.

Observou-se uma tendência à queda no conteúdo da ATGL, no TAB subcutâneo e mesentérico nos animais hipotireoideos, o qual aumentou significativamente quando os animais foram tratados com T3, efeito que foi mais proeminente quando da administração da dose supra fisiológica do hormônio. Vale ressaltar que no TAB subcutâneo o aumento do conteúdo de ATGL foi significativo, mesmo com o tratamento com T3 em dose fisiológica, dado que chama a atenção considerando que detectamos ser a expressão gênica de *Pnpla2* expressivamente maior no depósito subcutâneo do que nos demais. O conjunto desses dados sugere fortemente que o T3 regula positivamente a expressão proteica da ATGL.

Quanto à expressão gênica, verificou-se uma redução significativa nos níveis de mRNA da ATGL no TAB mesentérico dos animais tireoidectomizados, reproduzindo os dados relativos à expressão proteica, e uma tendência ao aumento da expressão gênica desta enzima no TAB subcutâneo. O tratamento com T3, entretanto, não reverteu a redução da ATGL observada no depósito mesentérico dos animais hipotireoideos e não alterou a expressão gênica dessa enzima nos outros depósitos. Apesar disso, observou-se em um outro estudo um aumento do conteúdo de mRNA da ATGL em cultura de hepatócitos de ratos com esteatose hepática tratados com T3 (dado não discutido no artigo) (GRASSELLI et al., 2014). O fato do T3 reduzir a expressão gênica da ATGL e aumentar o seu conteúdo proteico no depósito mesentérico, sugere, tal qual comentado para a LHS, uma ação pós-transcricional do T3 aumentando a tradução desse transcrito. Consequentemente, não podemos descartar um papel importante do T3 na regulação da expressão gênica da ATGL (*Pnpla2*). Adicionalmente, estudos comparativos realizados pelo nosso laboratório e por outros grupos mostraram que a expressão gênica da ATGL difere de acordo com

o depósito de gordura, o que justifica o fato do T3 regular diferentemente a expressão desta enzima nos depósitos de TAB descritos (PALOU et al., 2009).

Em resumo, os dados apresentados nesse estudo mostram mais uma vez a importância dos hormônios tireoidianos como indutores do metabolismo lipídico, especialmente no que se refere à lipólise. Eles apontam uma provável ação direta do T3 no controle da expressão dos genes que codificam a LHS e ATGL, a nível pós-transcricional, sem descartar uma possível ação transcricional, ao menos no depósito mesentérico, já que a tireoidectomia reduziu significativamente o conteúdo destes transcritos. Estudos subsequentes deverão ser desenvolvidos para investigar esses dois aspectos, tais como: (1) avaliação do perfil polissomal, procedimento que dará informações sobre a validade da nossa hipótese de que o T3 poderia atuar aumentando a taxa de tradução dos transcritos que codificam a LHS e ATGL e (2) análise da atividade do promotor desses genes, por meio de estudos em adipócitos tratados com T3.

8 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nesse estudo, concluímos que os hormônios tireoidianos medeiam à lipólise de uma forma mais direta, aumentando a expressão proteica da LHS e ATGL no TAB subcutâneo e mesentérico de ratos, dado que é inédito e que coloca as duas principais enzimas envolvidas no processo lipolítico no rol das proteínas reguladas pelo T3. Além disso, mostramos nesse estudo que o T3 regula diferentemente a lipólise de acordo com o depósito de gordura em questão. Não se deve descartar a possibilidade dos HTs atuarem regulando a atividade destas enzimas, estudo que não é o foco do presente trabalho.

REFERÊNCIAS*

ARNER, P.; HELLSTROM, L.; WAHRENBERG, H.; BRONNEGARD, M. Beta-adrenoceptor expression in human fat cells from different regions. *J. Clin. Invest.*, v. 86, n. 5, p. 1595-1600, 1990.

ARVIDSSON, E.; BLOMVIST, E.; RYDÉN, M. Depot-specific differences in perilipin mRNA but not protein expression in obesity. *J. Intern. Med.*, v. 255, n. 5, p. 595-601, 2004.

BARGI-SOUZA, P.; GOULART-SILVA, F.; RENDON L. M.; FIODERLISIO, T., NUNES, M. T. Triiodothyronine inhibits TSH secretion through a non-genomic mechanism. Presented at Society for Endocrinology BES 2015 Dublin, IE. Endocrine Abstracts 37 ep 709.

BLANCHETTE-MACKIE, E. J.; DMYER, N. K.; BARBER, T.; COXEY, R. A.; TAKEDA, T.; RONDONINE, C. M.; THEODORAKIAS, J. L.; GRENNBERG A. S.; LONDOS, C. Perilipin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets in adipocytes. *J. Lipid. Res.*, v. 36, p. 1211-1226, 1995.

BINNERTS, A., et al. The effect of growth hormone administration in growth hormone deficient adult on bone, protein, carbohydrate and lipid homeostasis, as well as on body composition. *Clinical Endocrinology*, v. 37, p. 79-87, 2008.

BRASAEMLE, D. L. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and controls of lipolysis. *J. Lipid. Res.*, v. 48, p. 2547-2559, 2007.

BRUNETTO, E. L.; TEIXEIRA, S. S.; GIANNOCO, G.; MACHADO, U. F.; NUNES, M. T. T3 rapidly increases SLC2A4 gene expression. An GLUT 4 trafficking to the plasma membrane in skeletal muscle of rat and improves glucose homeostasis. *Thyroid*, v. 22, n. 1, p. 70-79, 2012.

CATALAN, V., et al. Validation of endogenous control genes in human adipose tissue: Relevance to obesity and obesity-associated type 2 diabetes mellitus. *Horm. Metab. Res.*, v. 39, n. 7, p. 495-500, 2007.

CHAVES, V. E.; FRASSON, D.; KAWASHITA, N. H. Several agents and pathways regulate lipolysis in adipocytes. *Biochimie.*, v. 93, p. 1631-1640, 2011.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CHOPRA, I. J. An assessment of daily production and significance of thyroidal secretion of 3, 3', 5'-triiodothyronine (reverse T3) in man. *J. Clin. Invest.*, v. 58, p. 32–40, 1976.

DAVIS, P. J.; DAVIS, F. B. Nongenomic actions of thyroid hormone. *Thyroid*, v. 6, n. 5, p. 467-504, 1996.

DENG, C., et al. Respective degree of expression of beta 1, beta 2 and beta 3 adrenoreceptors in human brown and white adipose tissues. *Br. J. Pharmacol.*, v. 118, n. 4, p. 929-934, 1996.

DORN, C., et al. Expression of fatty acid synthase in nonalcoholic fatty liver disease. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, v. 3, p. 505-514, 2010.

DUNCAN, R. E.; AHMADIAN, M.; JAWORSKI, K.; SARKADI-NAGY, E.; SUL, H. S. Regulation of Lipolysis in Adipocytes. *Annu. Rev. Nutr.*, v. 27, p. 79–101, 2007.

ELGADI, A.; ZEMACK, H.; MARCUS, C.; NORNGREN, S. Tissue-specific *knockout* of TSHr in white adipose tissue increases adipocyte size and decreases TSH-induced lipolysis. *Biochem. Biophys. Res.*, v. 393, n. 3, p. 526-530, 2010.

ENDO, T.; KOBAYASHI, T. Expression of functional TSH receptor in white adipose tissue of hyt/hyt mice induces lipolysis in vivo. *Am J Physiol. Endocrinol. Metabol.*, v. 302, p. 569-575, 2012.

EVANS, B. A.; PAPAIOANNOU, M.; BONAZZI, V. R.; SUMMERS, R. J. Expression of beta 3 adrenoreceptor mRNA in rat tissues. *Br. J. Pharmacol.*, v. 117, n. 1, p. 210-216, 2006.

FAIN, J. N.; GARCIA-SAINZ, J. A. Adrenergic regulation of adipocyte metabolism. *J. Lipid. Res.*, v. 24, p. 945–966, 1983.

FEVE, B.; EMORINE, L. J.; LASNIER, F.; BLIN, N.; BAUDE, B.; NAHMIAS, C.; STROSBURG, A. D.; PAIRAULT, J. Atypical beta-adrenergic receptor in 3T3-F442A adipocytes: pharmacological and molecular relationship with the human b3-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.*, v. 266, p. 20329-20336, 1991.

FONDELL J. D.; GUERMAH M.; MALIK S.; ROEDER R. G. Thyroid hormone receptor associated proteins and general positive cofactors mediate thyroid hormone receptor function in the absence of the TATA box-binding protein-associated factors of TFIID. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, v. 96, n. 5, p. 1959-1964, 1999.

FONSECA- ALANIZ, M. H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M. I. C.; LIMA, F. B. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v. 50, n. 2, p. 216-222, 2006.

FONTANA, L.; EAGON, J. C.; TRUJILLO, M. E.; SCHERER, P. E.; KLEIN, S. Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes*, v. 56, n. 4, p. 1010- 1013, 2007.

GAGNON, A.; LANGILLE, M. L.; CHAKER, S.; ANTUNES, T. T.; DURAND, J.; SORISKY, A. TSH signaling pathway that regulate MCP-1 in human differentiated adipocytes. *Metabolism*, v. 63, p. 812-821, 2014.

GAGNON, A.; ANTUNES, T. T.; LY, T.; PONQSUWAN, P.; GAVIN, C.; LOCHNAN, H. A.; SORISKY, A. Thyroid-stimulating hormone stimulates lipolysis in adipocytes in culture and raises serum free fatty acid levels in vivo. *Metabolism*, v. 50, n. 4, p. 547-553, 2010.

GERMACK, R.; STARZEC, A. B.; VASSY, R.; PERRET, G. Y. Beta-adrenoceptor subtype expression and function in rat white adipocytes. *Br. J. Pharmacol.*, v. 120, p. 201-210, 1997.

GERMACK, R.; STARZEC, A. B.; PERRET, G. Y. Regulation of beta 1- and beta 3-adrenergic agonist-stimulated lipolytic response in hyperthyroid and hypothyroid rat white adipocytes. *Br. J. Pharmacol.*, v. 129, n. 3, p. 448-456, 2000.

GIORGINO, F.; LAVIOLA, L.; ERIKSSON, J. W. Regional differences of insulin action in adipose tissue: insights from in vivo and in vitro studies. *Acta Physiol. Scand.*, v. 183, p. 13-30, 2005.

GIROUSSE, A.; LANGIN, D. Adipocyte lipases and lipid droplet associated proteins: insight from transgenic mouse models. *International Journal of Obesity*, v. 36, p. 581-594, 2012.

GRANNEMAN, J. G.; LAHNERS, K. N. Differential adrenergic regulation of beta1- and beta3-adrenoreceptor messenger ribonucleic acids in adipose tissues. *Endocrinology*, v. 130, p. 109- 114, 1992.

GRASSELLI, E.; VOCI, A.; CANESI, L.; SALIS, A.; DAMONTE, G.; COMPALATI, A. D.; GOGLIA, F.; GALLO, G.; VERGANI, L. 3,5-diiodo-L-thyronine modifies the lipid droplet composition in a model of hepatosteatosis. *Cell Physiol. Biochem.*, v. 33, p. 344-356, 2014.

GRUBER, A., et al. The N-terminal region of comparative gene identification-58 (CGI-58) is important for lipid droplet binding and activation of adipose triglyceride lipase. *J. Biol. Chem.*, v. 285, p. 12289-12298, 2010.

HAEMMERLE, G., et al. Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science*, v. 312, p. 734, 2006.

HANNAUER, S. B. Obesity and visceral fat- A growing inflammatory disease. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.*, v. 2, n. 6, p. 245, 2005.

HELLSTRÖM, L.; WAHRENBERG, H.; REYNISDOTTIR, S.; ARNER P. Catecholamine-Induced Adipocyte Lipolysis in Human Hyperthyroidism. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 82, p. 159–166, 1997.

HOLM, C.; OSTERLUND, T.; LAURELL, H.; CONTRERAS, J. A. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Annu. Rev. Nutr.*, v. 20, p. 365–393, 2000.

JASON, A.; RAWET, H.; PERBECK, L.; MARCUS, C. Presence of thyrotropin receptor in infant adipocytes. *Pediatr. Res.*, v. 43, p. 555-558, 1998.

JASON, A.; MARCUS, C. The lipolytic effects of thyrotropin and isoprenaline are not affected by growth hormone in infant adipocytes. *Horm. Metab. Res.*, v. 29, p. 164-167, 1997.

JENSEN, M. D. Lipolysis: contribution from regional fat. *Annu. Rev. Nutr.*, v. 17, p. 127-139, 1997.

JEPSEN K.; ROSENFELD M. G. Biological roles and mechanistic actions of corepressor complexes. *Journal of Cell Science*, v. 115, p. 689-698, 2002.

KERSHAW, E. E.; HAMM, J. K.; VERHAGEN, L. A. W.; PERONI, O.; KATIC, M.; FLIER, J. S. Adipose triglyceride lipase: function, regulation by insulin, and comparison with adiponutrin. *Diabetes*, v. 55, p. 148-157, 2006.

KIMURA, E. T. Glândula Tireoide. In: AIRES, M. M. *Fisiologia*. 4. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. cap. 68, p.1055-1077.

KLEIN, I.; DANZI, S. Thyroid disease and heart. *Circulation*, v.116, p. 1725-1735, 2007.

KLEIN, S. The case of visceral fat: Argument for the defense. *J. Clin. Invest.*, v. 113, n. 11, p. 1530-1532, 2004.

KRAEMER, F. B.; SHEN, W. J. Hormone-sensitive lipase: control of intracellular tri-(di)acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis. *J. Lipid Res.*, v. 43, n. 10, p. 1585-1594, 2002.

LAFONTAN, M. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog. Lipid. Res.*, v. 48, p. 275-297, 2009.

LANDMARK, B. F.; OYEN, O.; SKALHEGG, B. S.; FAUSKE, B.; JAHNSEN, T.; HANSSON, V. Celular location and age-dependent changes of the regulatory subunits of cAMP-dependent protein kinase in rat testis. *J. Reprod. Fertil.*, v. 99, n. 2, p. 323-334, 1993.

LEHNINGER, A. L. Biossíntese de lipídios. In: LEHNINGER, A. L. *Princípios de bioquímica*. São Paulo: Sarvier, 2007. p. 600.

LE ROCHE, K. G., et al. Global analysis of transcript and protein levels across the Plasmodium falciparum life cycle. *Genome Res.*, v. 14, n. 11, p. 2308-2318, 2004.

LEWIS, W. T.; LEFROWITZ, R. T. Thyroid hormone regulation of beta adrenergic receptor number. *J. Biol. Chem.*, v. 252, n. 8, p. 2787-2789, 1977.

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*, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LONDOS, C.; BRASAEMLE, D. L.; SCHULTZ, C. J.; ADLER-WAILES, D. C.; LEVIN, D. M.; KIMMEL, A. R.; RONDINONE, C. M. On the Control of Lipolysis in Adipocytes. *Ann. N Y Acad. Sci.*, v. 18, p. 155-168, 1999.

LORD, C. C., et al. CGI-58/ABHD5-Derived signaling lipids regulate systemic inflammation and insulin action. *Diabetes*, v. 61, p. 355-363, 2012.

LOWELL, B. B.; FLIER, J. S. The potencial significance of beta 3 adrenergic receptors. *J. Clin. Invest.*, v. 95, n. 3, p. 923, 1995.

MARTIN, M. L.; JENSEN, M. D. Effects of body fat distribution on regional lipolysis in obesity. *J. Clin. Invest.*, v. 88, p. 609-613, 1991.

MARTINEZ-BOTAS, J. et al. Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in *Lepr (db/db)* mice. *Nature genetics*, v. 26, p. 474-479, 2000.

MIYOSHI, H.; PERFIELD II, J.; SOUZA, S. C.; SHEN, W. J.; ZHANG, H. H.; STANCHEVA, Z. S.; KRAEMER, F. B.; OBIN, M. S.; GREENBERG, A. S. Control of adipose triglycerides lipase action by serine 517 of perilipin A globally regulates protein kinase A-stimulated lipolysis in adipocytes. *J. Biol. Chem.*, v. 282, p. 996-1002, 2007.

MIYOSHI, H., et al. Perilipin promotes hormone-sensitive lipase mediated adipocyte lipolysis via phosphorylation dependent and independent mechanisms. *J. Biol. Chem.*, v. 281, p. 15837-15844, 2006.

MULLER, M. J.; SEITZ, H. J. Thyroid hormone action on intermediary metabolism. Part III. Protein metabolism in hyper- and hypothyroidism. *Klin Wochenschr.*, v. 62, p. 97-102, 1984.

MUZZIN, P.; REVELLI, J. P.; FRASER, C. M.; GIACOBINO, J. P. Radioligand binding studies of the atypical beta3-adrenergic receptor in rat brown adipose tissue using [3H]-CGP-12177. *FEBS Lett.*, v. 298, p. 162 – 164, 1992.

MUZZIN, P.; REVELLI, J. P.; KUHNE, F.; GOCAYNE, J. D.; MCCOMBIE, W. R.; VENTER, J. C.; GIACOBINO, J. P.; FRASER, C. M. An adipose tissue-specific, beta-adrenergic receptor. Molecular cloning and down-regulation in obesity. *J. Biol. Chem.*, v. 266, p. 24053-24058, 1991.

NAHMIAS, C.; BLIN, N.; ELALOUF, J. M.; MATTEI, M. G.; STROSBERG, A. D.; EMORINE, L. J. Molecular characterization of the mouse beta 3 adrenergic receptor: Relationship with the atypical receptor of adipocytes. *EMBO J.*, v. 10, n. 12, p. 3721-3727, 1991.

NIELSEN, T. S.; JENSEN, N.; JORGENSEN, O.; MOLLER, N.; LUNA, S. Disserting adipose tissue lipolysis: molecular regulation and implications for metabolic disease. *J. Mol. Endocrinol.*, v. 52, n. 3, p. 199-222, 2004.

NYGARD, M. Regulation of gene transcription by the thyroid hormone receptors. 2006. 37 f. PhD Thesis - Department of Biociences and Nutrition, Karolinska Instituted, Stockholm.

PALOU, M.; PRIEGO, T.; SÁNCHEZ, J.; RODRIGUEZ, A. M.; PALOU, A.; PICÓ, C. Gene expression patterns in visceral and subcutaneous adipose depots in rats are linked to their morphologic features. *Cell. Physiol. Biochem.*, v. 24, p. 547-556, 2009.

PFEIFLE, B.; PFEIPLE, R.; FAULHABER, J. D.; DITSCHUNEIT, H.; Thyroid hormone effects on beta-adrenergic receptors in isolated fat cells in rats. *Horm. Metab. Res.*, v. 13, n. 4, p. 218-221, 1981.

PORTILLO, M. P.; VILLARO, J. M.; TOBRES, M. I.; MACARULLA, M. T. In vivo lipolysis in adipose tissue from two anatomical locations measured by microdialysis. *Life Sci.*, v. 67, n. 4, p. 437-445, 2000.

RACLOT, T.; HOLM, C.; LANGIN, D. Fatty acid specificity of hormone-sensitive lipase: implication in the selective hydrolysis of triacylglycerols. *J. Lipid. Res.*, v. 42, p. 2049-2057, 2001.

RAY, H.; PINTEUR, C.; FRERING, V.; BEYLOT, M.; LARGE, V. Depot-specific differences in perilipin expression and hormone-sensitive lipase expression in lean and obese. *Lipids Health Dis.*, v. 8, n. 58, 2009.

REBUFFÉ-SCRIV, M.; CULLBERG, G.; LUNDBERG, P. A., et al. Anthropometric variables and metabolism in polycystic ovarian disease. *Horm. Metab. Res.*, v. 21, p. 391-397, 1989.

RIIS, A. L.; GRAVHOLT, C. H.; DJURHUUS, C. B.; NØRRELUND, H.; JØRGENSEN, J. O. L.; WEEKE, J.; MØLLER, N. Elevated Regional Lipolysis in Hyperthyroidism. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. v. 87, p. 4747-4753, 2002.

RUBIO, A.; RAASMAJA, A.; SILVA, J. E. Thyroid hormone and norepinephrine signaling in brown adipose tissue. II: Differential effects of thyroid hormone on beta 3 adrenergic receptors in brown and white adipose tissue. *Endocrinology*, v. 136, n. 8, p. 3277-3284, 1995.

RYDÉN, M., et al. Comparative studies of the role of hormone-sensitive lipase and adipose triglyceride lipase in human fat cell lipolysis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, v. 292, p. 1847-1855, 2007.

RYTKA, J. M.; WUEEST, S.; SCHOENLE, E. J.; KONRAD, D. The portal theory supported by venous drainage-selective fat transplantation. *Diabetes*, v. 60, n. 1, p. 56-63, 2011.

SCHOENBOR, V.; HEID, I. M.; VOLLMERT, C.; LINGENHEL, A.; ADAMS, T. D.; HOPKINS, P. N.; ILLIG, T.; ZIMMERMANN, R.; ZECHNER, R.; HUNT, S. C.; KRONENBERG, F. The *ATGL* Gene Is Associated With Free Fatty Acids, Triglycerides, and Type 2 Diabetes. *Diabetes*, v. 55, p. 1270-1275, 2006.

SHWEIGER, M.; SCHREIBER, R.; HAEMMERLE, G.; LASS, A.; FLEDELIUS, C.; JACOBSEN, P.; TORNQVIST, H.; ZECHNER, R.; ZIMMERMANN, R. Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism. *J. Biol. Chem.*, v. 281, p. 40236-40241, 2006.

SCHWEIGER, M., et al. G0/G1 Switch gene-2 regulates human adipocyte lipolysis by affecting activity and localization of adipose triglyceride lipase. *J. Lipid. Res.*, v. 53, n. 11, p. 2307-2317, 2012.

SMIRNOVA, E.; GOLDBERG, E. B.; MAKAROVA, K. S.; LIN, L.; BROWN, W. J.; JACKSON, C. L. ATGL has a key role in lipid droplet/adiposome degradation in mammalian cells. *EMBO reports*, v. 7, p. 106-113, 2006.

SILVA, F. G.; GIANNOCO, G.; LUCHESSI, A. D.; CURI, R.; NUNES, M. T. T3 acutely increases GH mRNA translation rate and GH secretion in hypothyroid. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v. 317, n. 1-2, p. 1-7, 2010.

SU, C. L.; SZTALRY, D. C.; CONTRERAS, J. A.; HOLM, C.; KIMMEL, A. R.; LONDOS, C. Mutational analysis of the hormone-sensitive lipase translocation reaction in adipocytes. *J. Biol. Chem.*, v. 278, n. 44, p. 43615-43619, 2003.

TANSEY, J., et al. Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhances leptin production and resistance to diet-induced obesity. *Proc Natl. Acad. Sc.*, v. 98, p. 6494-6499, 2001.

TAVERNIER, G.; JIMENEZ, M.; GIACOBINO, J. P.; HULO, N.; LAFONTAN, M.; MUZZIN, P.; LANGIN, D. Norepinephrine Induces Lipolysis in beta1/beta2/beta3-Adrenoceptor Knockout Mice. *Mol. Pharmacol.*, v. 68, p. 793-799, 2005.

VIGUERIE, N.; MILLET, L.; AVIZOU, S.; VIDAL, V.; LARROUY, D.; LANGIN, D. Regulation of human adipocytes gene expression by thyroid hormone. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.*, v. 87, n. 2, p. 630-634, 2002.

WANG, S.; LAURIN, P. N.; HIMMS-HAGEN, J.; RUDNICKI, M. A.; LEVY, E.; ROBERT, M. F.; PAN, L.; OLIGNY, L.; MITCHELL, G. A. The adipose tissue phenotype of hormone-sensitive lipase deficiency in mice. *Obes. Res.*, v. 9, p. 119-128, 2001.

WANG, Y., et al. Perilipin expression in human adipose tissue: effects of severe obesity, gender and depot. *Obes. Res.*, v. 11, n. 8, p. 930-936, 2003.

YANG, X.; LU, X.; LOMBES, M.; RHA, G. B.; CHI, Y. I.; GUERIN, T. M.; SMART, E. J.; LIU, J. The G(0)/G(1) switch gene 2 regulates adipose lipolysis through association with adipose triglyceride lipase. *Cell. Metabol.*, v. 11, n. 3, p. 194-205, 2010.

YANG, Z.; PRIVALSKY, M. L. Isoform-Specific Transcriptional Regulation by Thyroid Hormone Receptors: Hormone-Independent Activation Operates through a Steroid Receptor Mode of Coactivator Interaction. *Molecular Endocrinology.*, v. 15, n. 7, p.1170–1185, 2001.

ZHANG, H. H., et al. Lipase-selective functional domains of perilipin A differentially regulate constitutive and protein kinase A stimulated lipolysis. *J. Biol. Chem.*, v. 278 (51), p. 51535-51542, 2003.

ZIMMERMAN, R.; STRAUSS, J. G.; HAEMMERLE, G.; SCHOISWOHL, F.; BIRNER-GRUENBERGER, R.; RIEDERER, M.; LASS, A.; NEUBERGER, G.; EISENHABER, F.; HERMETTER, A.; ZECHNER, R. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science*, v. 306, p. 1383-1386, 2004.