CARLOS FLORES RODRIGUES JUNIOR

ESTUDO DAS BASES MOLECULARES ENVOLVIDAS NO EFEITO LIPOLÍTICO DO HORMÔNIO TIREOIDIANO NO TECIDO ADIPOSO BRANCO

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2011

CARLOS FLORES RODRIGUES JUNIOR

ESTUDO DAS BASES MOLECULARES ENVOLVIDAS NO EFEITO LIPOLÍTICO DO HORMÔNIO TIREOIDIANO NO TECIDO ADIPOSO BRANCO

Dissertação apresentada ao 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 Original

São Paulo
2011

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

© reprodução total

Rodrigues Junior, Carlos Flores.
Estudo das bases moleculares envolvidas no efeito lipolítico do hormônio tiroidiano no Tecido Adiposo Branco / Carlos Flores Rodrigues Junior. -- São Paulo, 2011.

Orientador: 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: Fisiologia Endocrina.

Versão do título para o inglês: Study of the molecular bases involved on lipolytic effects of thyroid hormone in White Adipose Tissue

Descritores: 1. Hormônios da Tireóide 2. Tireoidectomia 3. Tecido Adiposo 4. 5. 6. I. Nunes, Maria Tereza II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0113/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Carlos Flores Rodrigues Junior.

Título da Dissertação: Estudo das bases moleculares envolvidas no efeito lipolítico do hormônio tiroidiano no Tecido Adiposo Branco .

Orientador(a): 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 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **97** nas fls. **74** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Maria Tereza Nunes, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Estudo das bases moleculares envolvidas no efeito lipolítico do hormônio tireoideano no tecido adiposo branco** do qual participou(aram) o(s) alunos **Carlos Flores Rodrigues Júnior, Frederico Gerlinger Romero, Lucas Guimarães, Paula Bargi de Souza, Erika Lia Brunetto, Renata Marino Romano, Rafael Salgueiro, Caio Yogi Yonamine, Rafael Vianna Croffi e o pesquisador Fabio Bessa Lima,** 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 EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL* (CEEA) em **01.09.09,** com validade de 3 anos.

São Paulo, 03 de setembro de 2009.

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

Profa.Dra.PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA – ICB/USP

Dedico esta tese a Deus pela força, direção e provisão e a meus pais.

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre ao meu lado em todos os momentos da vida.

A meus pais Carlos Flores Rodrigues e Laurinda Roman Ferreira que sempre me deram o suporte necessário.

A minha orientadora Maria Tereza Nunes por ter me orientado e acreditado no meu trabalho.

A técnica Leonice Lourenço Poyares que sempre me deu bons conselhos e força nos momentos de desanimo.

A todos os meus amigos que estiveram ao meu lado durante este período.

A todos os colegas do laboratório 131.

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

Enfim a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigado!

"Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima."

Louis Pasteur

RESUMO

RODRIGUES JUNIOR, C. F. Estudo das bases moleculares envolvidas no efeito lipolítico do hormônio tireoidiano no tecido adiposo branco. 60 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciência Biomédicas, Universidade de São Paulo. 2011.

Os hormônios tireoidianos exercem um reconhecido e potente efeito lipolítico no Tecido Adiposo Branco (TAB); no entanto pouco se conhece acerca dos mecanismos moleculares envolvidos nessas ações. Sabe-se que os principais efetores da ação lipolítica nesse tecido são a lipase hormônio sensível (LHS) e a lipase dos triglicerídeos específica dos adipócitos (ATGL), as quais hidrolisam os triglicérides em ácidos graxos e glicerol. Outros componentes envolvidos na atividade lipolítica são os receptores beta adrenérgicos, que ao reconhecerem os seus ligantes, elevam o conteúdo de AMPc intracelular, com subseqüente aumento da atividade da PKA, e as perilipinas, proteínas que envolvem a gota de gordura, formando uma barreira protetora contra a ação da LHS e ATGL, de modo que precisa ser hidrolisada para que a LHS e ATGL possam exercer seu efeito lipolítico. Sabe-se que os hormônios tiroidianos aumentam a expressão dos receptores beta adrenérgicos em vários tecidos, podendo exercer parte do seu efeito lipolítico por meio desse mecanismo. Com relação à ação dos HT sobre a LHS, os trabalhos são escassos e inconclusivos; menos ainda se sabe sobre o seu efeito sobre a ATGL e a peripilina. Considerando a importância do tecido adiposo na homeostase energética e como fonte de citocinas, muitas das quais envolvidas na instalação de resistência insulínica, e que as ações lipolíticas dos HT têm sido muito pouco exploradas, é objetivo deste estudo investigar, em ratos, se os HT interferem com a expressão da LHS, ATGL, Perilipinas, bem como dos receptores beta-adrenérgicos, no tecido adiposo branco, o que poderia ampliar o campo de conhecimentos sobre os seus efeitos lipolíticos.

Palavras-chave: Lipólise. Hormônio tireoidiano. LHS. ATGL. Perilipinas. Receptores beta adrenérgicos.

ABSTRACT

RODRIGUES JUNIOR, C. F. Study of the molecular basis involved in the lipolytic effect of thyroid hormone in white adipose tissue. 60 f. Dissertation (Masters in Human Physiology) - Institute of Biomedical Science, University of São Paulo. 2011.

Thyroid hormones exert a recognized and potent lipolytic effect in white adipose tissue (TAB), yet little is known about the molecular mechanisms involved in these actions. It is known that the main effectors of the lipolytic action in this tissue is hormone-sensitive lipase (HSL) and lipase specific adipocyte triglycerides (ATGL), which hydrolyze triglycerides into fatty acids and glycerol. Other components involved in the lipolytic activity are the beta adrenergic receptors, which recognize their ligands to elevate intracellular cAMP content, with subsequent increased activity of PKA, and perilipin, proteins involving the fat droplet, forming a protective barrier against the action of HSL and ATGL, so that must be hydrolyzed to the HSL and ATGL lipolytic may exert its effect. It is known that thyroid hormones increase the expression of beta adrenergic receptors in various tissues, which may exert part of its lipolytic effect through this mechanism. With respect to the action of HT on the LHS, jobs are scarce and inconclusive, even less is known about its effect on ATGL and perilipin.Considering the importance of body fat for energy homeostasis and as a source of cytokines, many of which involved the installation of insulin resistance, and that the lipolytic actions of HT have been little explored aim of this study is to investigate in rats whether HT interfere with the expression of HSL, ATGL, Perilipin as well as beta adrenergic receptors in white adipose tissue, which could widen the field of knowledge of their lipolytic effects.

Keywords: Lipolysis. Thyroid hormone. HSL. ATGL. Perilipin. Beta adrenergic receptors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fig. 1: Efeito da tiroidectomia e do tratamento crônico com T3 sobre a expressão gênica (A) e protéica (B) de LHS no TAB periepididimal.....27

Fig. 2: Efeito da tiroidectomia e do tratamento crônico com T3 sobre a expressão gênica (A) e protéica (B) de ATGL no TAB periepididimal.....28

Fig. 3: Efeito da tiroidectomia e do tratamento crônico com T3 sobre a expressão gênica (A) e protéica (B) da perilipina no TAB periepididimal.....29

Fig. 4: Efeito da tireoidectomia (Tx) e do tratamento crônico com T3 sobre a expressão gênica do receptor beta 2 adrenérgico no TAB periepididimal.....30

Fig. 5: Efeito do tratamento agudo com T3 sobre a expressão gênica de LHS no TAB periepididimal de ratos tireoidectomizados.....31

Fig. 6: Efeito do tratamento agudo com T3 sobre a expressão gênica de ATGL no TAB periepididimal de ratos tireoidectomizados.....31

Fig. 7: Efeito do tratamento agudo de T3 sobre a expressão gênica da perilipina no TAB periepididimal.....32

Fig. 8: Efeito do tratamento agudo com T3 sobre a expressão gênica do receptor beta 2 adrenergico no TAB periepididimal.....32

Fig. 9: Representação gráfica do conteúdo de mRNA **(A)** e de proteína **(B)** de ATGL nas células 3T3-L1 controle (C) e submetidas a depleção de HT (TX).....34

Fig. 10: Representação gráfica do conteúdo de mRNA **(A)** e de proteína **(B)** de ATGL nas células 3T3-L1 controle (C) e submetidas a depleção de HT (TX).....35

Fig. 11: Representação gráfica do conteúdo de mRNA de Perilipina nas células 3T3-L1 controle (C) e submetidas a depleção de T3 (TX).....36

Fig. 12: Representação gráfica do conteúdo de mRNA de receptor beta 2 adrenérgico nas células 3T3-L1 controle (C) e submetidas a depleção de T3 (TX).....36

Fig. 13: Representação gráfica do conteúdo de mRNA de LHS nas células 3T3-L1 submetidas aos seguintes tratamentos: depleção de T3 (TX); grupo TX que recebeu T3 nas doses 10^{-9} M por 30 minutos, 2h e 24h (T3).....37

Fig. 14: Representação gráfica do conteúdo de mRNA de LHS nas células 3T3-L1 submetidas aos seguintes tratamentos: depleção de T3 (TX); grupo TX que recebeu T3 nas doses 10^{-8} M por 30 minutos, 2h e 24h (T3).....37

Fig. 15: Representação gráfica do conteúdo de mRNA de LHS nas células 3T3-L1 submetidas aos seguintes tratamentos: depleção de T3 (TX); grupo TX que recebeu T3 nas doses 10^{-7} M por 30 minutos, 2h e 24h (T3).....37

Fig. 16: Representação gráfica do conteúdo de mRNA de LHS nas células 3T3-L1 submetidas aos seguintes tratamentos: depleção de T3 (TX); grupo TX que recebeu T3 nas doses 10^{-6} M por 30 minutos, 2h e 24h (T3).....37

Fig. 17: Representação gráfica do conteúdo de mRNA de ATGL nas células 3T3-L1 submetidas aos seguintes tratamentos: depleção de T3 (TX); grupo TX que recebeu T3 nas doses 10^{-9} M por 30 minutos, 2h, 6h e 24h (T3).....39

Fig. 18: Representação gráfica do conteúdo de mRNA de ATGL nas células 3T3-L1 submetidas aos seguintes tratamentos: depleção de T3 (TX); grupo TX que recebeu T3 nas doses 10^{-8} M por 30 minutos, 2h, 6h e 24h (T3).....39

Fig. 19: Representação gráfica do conteúdo de mRNA de ATGL nas células 3T3-L1 submetidas aos seguintes tratamentos: depleção de T3 (TX); grupo TX que recebeu T3 nas doses 10^{-7} M por 30 minutos, 2h, 6h e 24h (T3).....39

Fig. 20: Representação gráfica do conteúdo de mRNA de ATGL nas células 3T3-L1 submetidas aos seguintes tratamentos: depleção de T3 (TX); grupo TX que recebeu T3 nas doses 10^{-6} M por 30 minutos, 2h, 6h e 24h (T3).....39

Fig. 21: Representação gráfica do conteúdo de mRNA de Perilipina nas células 3T3-L1 submetidas aos seguintes tratamentos: depleção de T3 (TX); grupo TX que recebeu T3 nas doses 10^{-9} M por 30 minutos, 2h, 6h e 24h (T3).....40

Fig. 22: Representação gráfica do conteúdo de mRNA de Perilipina nas células 3T3-L1 submetidas aos seguintes tratamentos: depleção de T3 (TX); grupo TX que recebeu T3 nas doses 10^{-8} M por 30 minutos, 2h, 6h e 24h (T3).....40

Fig. 23: Representação gráfica do conteúdo de mRNA de Perilipina nas células 3T3-L1 submetidas aos seguintes tratamentos: depleção de T3 (TX); grupo TX que recebeu T3 nas doses 10^{-7} M por 30 minutos, 2h, 6h e 24h (T3).....41

Fig. 24: Representação gráfica do conteúdo de mRNA de Perilipina nas células 3T3-L1 submetidas aos seguintes tratamentos: depleção de T3 (TX); grupo TX que recebeu T3 nas doses 10^{-6} M por 30 minutos, 2h, 6h e 24h (T3).....41

Fig. 25: Representação gráfica do conteúdo de mRNA de AR beta 2 nas células 3T3-L1 submetidas aos seguintes tratamentos: depleção de T3 (TX); grupo TX que recebeu T3 nas doses 10^{-9} M por 30 minutos, 2h e 24h (T3).....42

Fig. 26: Representação gráfica do conteúdo de mRNA de AR beta 2 nas células 3T3-L1 submetidas aos seguintes tratamentos: depleção de T3 (TX); grupo TX que recebeu T3 nas doses 10^{-8} M por 30 minutos, 2h e 24h (T3).....42

Fig. 27: Representação gráfica do conteúdo de mRNA de AR beta 2 nas células 3T3-L1 submetidas aos seguintes tratamentos: depleção de T3 (TX); grupo TX que recebeu T3 nas doses 10^{-7} M por 30 minutos, 2h, 6h e 24h (T3).....42

Fig. 28: Representação gráfica do conteúdo de mRNA de AR beta 2 nas células 3T3-L1 submetidas aos seguintes tratamentos: depleção de T3 (TX); grupo TX que recebeu T3 nas doses 10^{-6} M por 30 minutos, 2h, 6h e 24h (T3).....42

Fig. 29: Representação gráfica do conteúdo de mRNA (A) e proteína (B) de LHS nas células 3T3-L1 submetidas aos seguintes tratamentos: depleção de T3 (TX); grupo TX que recebeu T3 nas doses 10^{-9} M por 30 minutos, Tx que recebeu 1h antes da administração de T3 2ug/ml ActD (A) e CHX 44

Fig. 30: Representação gráfica do conteúdo de mRNA (A) e proteína (B) de ATGL nas células 3T3-L1 submetidas aos seguintes tratamentos: depleção de T3 (TX); grupo TX que recebeu T3 nas doses 10^{-9} M por 30 minutos, Tx que recebeu 1h antes da administração de T3 2ug/ml ActD (A) e CHX 45

Quadro. 1: Primers utilizados no PCR em tempo real.....24

Tabela. 1 – Peso cardíaco úmido (PCU, mg/100 g PC), peso cardíaco desidratado (PCD, mg/100g PC) e concentração sérica de TSH (ηg/mL) dos ratos controle, TX e tratados com T_3. Os valores estão expressos em média ± E.P.M...´´.....26

SUMÁRIO

1 **INTRODUÇÃO** 14

2. **JUSTIFICATIVA** 17

3. **OBJETIVO** 18

4. **MATERIAL E MÉTODOS** 19

4.1 Estudos in vivo 19

4.2 Estudos in vitro 20

4.3 Procedimentos 21

4.3.1 *Extração do RNA total* 21

4.3.2 *Real-time PCR* 23

4.3.3 *Western blotting* 25

4.4 **ANÁLISE ESTATÍSTICA** 25

5 **RESULTADOS** 26

5.1 Estudos in vivo 26

5.2 Estudos in vitro 33

6 DISCUSSÃO 47

REFERÊNCIAS* **55**

1 INTRODUÇÃO

O hormônio tireoidiano (HT) exerce seus efeitos biológicos por meio da interação com o seu receptor nuclear (TR), que se encontra associado a regiões específicas do DNA, conhecidas como elementos responsivos ao hormônio tireoidiano, mecanismo pelo qual promove a ativação ou inibição da transcrição de genes específicos (FONDELL et al., 1999, JEPSEN; ROSENFELD., 2002). Por meio dessas ações, eles estão envolvidos nas mais diversas funções do organismo, sendo de essencial importância no crescimento, desenvolvimento e metabolismo.

No período pré-natal, o HT exerce importantes ações sobre o desenvolvimento do sistema nervoso central, promovendo proliferação neuronal, sinaptogênese, mielinização e vascularização do tecido nervoso (FARWEEL et al., 2006). No período pós-natal é um importante indutor da expressão do gene do GH, aumentando a secreção de GH, que, por sua vez, aumenta a síntese de IGF-I hepática e a sua concentração plasmática (THISSEN; PUCILOWSKA; WUNDERWOOD, 1994), responsável pelo crescimento; desta forma, indivíduos hipotireoideos apresentam déficit de crescimento, e podem apresentar problemas no metabolismo lipídico, pois o GH estimula a atividade da Lipase Hormônio Sensível (LHS), que exerce importante efeito lipolítico (FAIN et al., 2008). Outros hormônios envolvidos na ação da LHS são o glucagon e as catecolaminas, que exercem uma forte ação ativadora desta, induzindo, desta maneira, a lipólise (ZIMMERMANN et al., 2004).

No tecido adiposo o HT acelera a diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos e induz a expressão das enzimas responsáveis pela síntese de ácidos graxos, a acetil-Coa carboxilase e ácido graxo sintetase. Ainda, nesse tecido, o HT

aumenta a expressão e, portanto, o número de receptores beta adrenérgicos, o que aumenta a sensibilidade desse tecido às catecolaminas. Estas, ao interagirem com os seus receptores, promovem ativação da adenilil ciclase e PKA, mecanismo pelo qual induzem a lipólise, provocando assim o aumento da liberação de glicerol e AGL do tecido adiposo, e a oxidação destes últimos (HELLSTRÖM et al.,1997; VIGUERIE et al., 2002).

Outra proteína, a perilipina, participa de forma importante da lipólise, já que se encontra na superfície da gotícula de gordura, formando uma barreira protetora que impede a ação da LHS. Portanto, ela precisa ser fosforilada em serina, pela ação de enzima PKA, para que sofra alterações conformacionais, e exponha os triglicérides (TG) à ação da LHS. Esta, que também é ativada por fosforilação pela PKA, age, então, na hidrólise dos TG em ácidos graxos e glicerol (DUNCAN et al., 2007).

Durante muito tempo, a lipase hormônio sensível foi considerada a única enzima essencial para regulação da mobilização de ácidos graxos do tecido adiposo branco. Entretanto, uma nova enzima denominada lipase dos triglicerídeos do adipócito (ATGL), ou desnutrina ou fosfolipase A2 ξ, foi encontrada no tecido adiposo branco e marrom, estando também envolvida na regulação do depósito e na mobilização de lipídios do tecido adiposo. Esta enzima usa os triacilgliceróis como substrato, e o produto desta hidrólise, o diacilglicerol, é o principal substrato fisiológico da LHS. A ação de ATGL e LHS nos substratos nos leva a crer que elas agem de forma coordenada na mobilização de ácidos graxos. A ATGL parece ser regulada pelos mesmos hormônios que a LHS, mas não é fosforilada pela PKA (proteína quinase dependente de AMPc) como na LHS (ZIMMERMANN et al., 2004). A ATGL, portanto,

parece executar o passo inicial da hidrólise dos triglicerides, favorecendo o catabolismo das gorduras armazenadas (SCHOENBOR et al.,2006).

2 JUSTIFICATIVA

O HT participa de forma importante para a manutenção da taxa metabólica, por meio da regulação transcricional e pós-transcricional de diferentes genes-alvo; sabe-se também que possui ação lipólitica, a qual ainda não é totalmente conhecida. Considerando que, é linha de pesquisa do nosso laboratório buscar potenciais genes-alvo do T3, nos parece interessante investigar se os genes que codificam a LHS, ATGL e perilipinas, envolvidos com a lipólise, seriam alvos dos HT. Além de pouco se conhecer sobre a regulação da expressão/atividade destas enzimas pelos HT no tecido adiposo branco, grande parte da população desenvolve doenças relacionadas à alta adiposidade, as comorbidades, o que torna importante a realização de estudos relacionados a esta questão. Pretendemos também explorar se a administração aguda de T3 altera a expressão desses genes o que poderia indicar possíveis ações não genômicas do T3 sobre os mesmos.

3 OBJETIVO

Considerando: (a) a importância do tecido adiposo na homeostase energética e como fonte de citocinas, muitas das quais envolvidas na instalação de resistência insulínica, e (b) a relevância do entendimento dos mecanismos hormonais envolvidos na lipólise, tais como os desencadeados pelos HT, cujas ações lipolíticas têm sido muito pouco exploradas, pretendemos investigar, em ratos se os HT interferem com a expressão e/ou atividade da LHS, ATGL, Perilipinas, bem como dos receptores beta adrenérgicos, no tecido adiposo branco.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Estudos in vivo

Foram utilizados ratos, da cepa Wistar, com cerca de 200-250 g. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12/12 h, numa temperatura de 23 ºC, no biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB-USP, onde permaneceram em gaiolas coletivas (máximo de cinco animais por gaiola) com alimentação e água à vontade.

Parte dos animais foi submetida à tireoidectomia cirúrgica, após anestesia por meio da utilização de ketamina e xilazina (100 e 10 mg/Kg de peso, respectivamente), e foi mantida por 21 dias com metimazol (0,03%) e CaCl (4,5 mM) adicionados à água de beber. Estes constituíram o grupo hipotireoideo (Tx).

Uma parcela destes animais Tx foi submetida a tratamento com T3 (5X a dose fisiológica – 1,5 µg/100 g), por tempos que variaram de 30 min a 24 h, constituindo os grupos: T3 30 min, T3 1h, T3 2h, T3 6h, T3 12h e T3 24h. Adicionamos um grupo de animais Tx tratados com a mesma dose de T3 especificada acima, porém por 5 dias, grupo que foi classificado como crônico. O grupo controle foi constituído por animais submetidos à tireoidectomia fictícia (SHAM).

Após os tempos de tratamento acima especificados, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (~10 mg/ 100 g), seguindo-se o sacrifício por decapitação, ao redor das 10:00 h, de forma a minimizar os efeitos de possíveis variações circadianas nos parâmetros avaliados.

O sangue foi coletado para mensuração do TSH sérico, bem como os corações dos animais dos diferentes grupos para determinação da relação peso do coração/peso corporal, como forma de comprovar a eficiência dos tratamentos realizados.

O tecido adiposo periepididimal dos animais foi rapidamente removido para extração do RNA total, para determinação da expressão gênica da LHS, ATGL, perilipina e receptores beta-adrenérgicos.

4.2 Estudos in vitro

Para os estudos in vitro foi utilizada a linhagem celular 3T3-L1, que são fibroblastos que, sob condições apropriadas, se diferenciam em adipócitos. As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 µl/ml de estreptomicina e 100 U/ml de penicilina, sob uma atmosfera de 5% de CO2 a uma temperatura de 37 °C. Elas foram mantidas em cultura, nessas condições, até atingirem a confluência de cerca de 70%; em seguida foram passadas para placas de 6 poços para realização de experimentos, nos quais avaliamos o conteúdo de mRNA de LHS, ATGL, perilipina e receptores beta-adrenérgicos. Assim, após terem atingido 100% de confluência, essas células foram submetidas a um processo de diferenciação, permanecendo por 3 dias em um meio contendo DMEM, 10% de SFB, 100mM de IBMX, 1mM dexametasona e 5mg/ml de insulina. Após esse período, as células ficaram por 7dias em meio contendo DMEM, 10% de SFB e 5mg/ml de insulina.

Posteriormente, após 80% das células 3T3-L1 terem se diferenciado em adipócitos, parte das células foi submetida à depleção do HT por 24 horas. Para isso, as células foram mantidas em meio DMEM suplementado com SFB depletado de HT. A

depleção do HT foi realizada por adsorção, com o uso da resina analítica por troca aniônica AG 2-X8, como descrito nos materiais e métodos (SAMUELS; STANLEY; CASANOVA, 1979). Após a depleção do HT as células foram submetidas aos tratamentos descritos a seguir:

a) grupo eutireoideo (C= controle);
b) grupo hipotireoideo (TX): células que foram incubadas em meio depletado de hormônio tireoidiano, por 24 horas;
c) grupo hipotireoideo (TX) + T3: células que foram incubadas em meio livre de hormônio tireoidiano por 24 horas e após esse período foram tratadas com concentrações crescentes de T3 (10^{-9} a 10^{-6} M), por 30 minutos, com o objetivo de se escolher a dose em que os efeitos que pretendemos estudar são mais acentuados;
d) grupo hipotireoideo (TX) + T3 + ActD (Actinomicina D): células que foram incubadas em meio livre de hormônio tireoidiano por 24 horas e após esse período foram tratadas com 2 µg/ml de ActD (antibiótico que bloqueia a transcrição) por 1 hora antes da administração de T3 na dose 10^{-9} M por 30 minutos;
e) grupo hipotireoideo (TX) + T3+ CHX (Cicloheximide): células que foram incubadas em meio depletado de hormônio tireoidiano por 24 horas, e após esse período foram tratadas com 10 µg/ml de CHX (antibiótico que bloqueia a tradução) por 1 hora antes da administração de T3 na dose 10^{-9} M por 30 minutos.

Após os tratamentos especificados, o meio foi retirado e as células foram lavadas com PBS gelado para retirar o excesso de meio. Todos os passos seguintes foram realizados a 4 °C.

4.3 Procedimentos

Para a análise da expressão dos referidos genes, foram realizados os seguintes procedimentos:

4.3.1 *Extração do RNA total*

A extração do RNA total foi baseada na metodologia da guanidina-fenol-clorofórmio e precipitação com isopropanol.

Para tal utilizamos 0,4 g de tecido adiposo periepididimal, que foi homogeneizado em 4,0 ml de solução D (4M tiocianato de guanidina; 25 mM citrato de sódio, pH 7,0; 0,5% lauril sarcosinato de sódio e 0,1 M 2-mercaptoetanol). O homogeneizado foi transferido para um tubo de 1,5 ml (eppendorf), onde foi adicionada solução contendo: acetato de sódio 2 M, pH 4,0; fenol saturado em água e solução de clorofórmio – isoamil (49:1), seguindo-se a incubação em gelo por 15 min e centrifugação a 10.000 g, por 20 min, a 4 ºC.

Ao final da centrifugação, foram visualizadas três fases distintas. A fase aquosa, contendo o RNA, foi transferida para um outro tubo, adicionando-se igual volume de isopropanol a –20 ºC. O tubo permaneceu em freezer a -20 ºC por, no mínimo 1h, fase em que se favorece a precipitação do RNA. Após esse período, realizou-se uma centrifugação a 10.000 g, a 4º C, por 20 min.

O sobrenadante foi desprezado e o precipitado (RNA) dissolvido em solução D e em 1 volume de isopropanol a – 20 ºC, seguindo-se incubação a – 20 ºC por, no mínimo, uma hora. Após incubação, o tubo foi novamente submetido à centrifugação por 10 min, a 4 ºC, e o sobrenadante desprezado. O precipitado foi ressuspenso em etanol 75% e incubado por 15 min à temperatura ambiente, seguindo-se nova centrifugação a 10.000 g, por 5 min. O pellet foi submetido à secagem no Speed-Vac, posteriormente dissolvido em 50 μL de água DEPC (dietilpirocarbonato, 0,1%) e levado ao banho-maria por 15 min, a 65 ºC. Este material foi estocado a –70 ºC para uso posterior.

A concentração do RNA foi estimada por densidade óptica, através de espectrofotometria. Foi utilizada a absorbância a 260 nm para o cálculo de

concentração do RNA, tendo como referência o valor de 40 μg/ml para cada unidade de densitometria óptica. As amostras de RNA foram então aliquotadas e liofilizadas no Speed-Vac para posterior uso.

4.3.2 *Real-time PCR*

Para estimar a abundância dos valores relativos de mRNA da LHS, ATGL, Perilipina e receptores β-adrenérgicos em animais dos grupos controle, hipotireoideo (Tx) e Tx tratados com T3, foi utilizado o método de detecção em tempo real do produto do PCR pela quantificação de fluorescência avaliada pelo detector de sequência ABI 7300 (Applied Biosystems), baseado na metodologia corrente. As amplificações do RT-PCR foram executadas com 2 μL do produto da reação de transcrição reversa diluídos em um tampão de reação contendo: 5 μL de SYBR Green (Applied Biosystems), 1 μL (10 μM) de cada primer, os quais estão listados abaixo. Os ciclos consistiram de duas fases: uma a 50 ºC por 2 min (ativação da enzima) e outra a 95 ºC por 10 min (desnaturação), seguidas por 45 ciclos de duas fases: primeira a 95 ºC, por 20 s (desnaturação) e segunda a 72 ºC, por 60 s (anelamento). Primers utilizados no PCR em tempo real foram da LHS, ATGL, Perilipina e receptores β-adrenérgicos

O ponto inicial do ciclo (CT) do real-time RT-PCR foi avaliado em triplicata para cada amostra. Os valores CT correspondem ao número do ciclo do PCR e representam a intensidade da fluorescência emitida pelo produto do RT-PCR amplificado do gene alvo, e são inversamente proporcionais ao conteúdo do mRNA da amostra. O valor da variação de CT (ΔCT) foi calculado subtraindo-se o valor do CT do gene de interesse do valor de CT do gene usado como referência (RPL-19). Todas as amostras foram

normalizadas pela média da variação do valor de CT (ΔCT) dos animais controle, originando um valor chamado de ΔΔCT.

QUADRO 1: Primers utilizados no PCR em tempo real.

Primers	Sequência
HSL sense	TTT CCA CCC ACG GCG CTC AA
HSL Antisense	TCC AGA GCG CAC GCC ACA AG
ATGL sense	AGA CTC AAC GAG GCC CTG CT
ATGL Antisense	CGC ACT GGC AGC ATG TTG GA
Beta adrenérgico sense	GTA TCC ATG AAA TAA GTG GTT ACA GG
Beta adrenérgico Antisense	GCA GTA CAT AAT TTA CAC AGA AGC AAT
Perilipina Sense	TAT GTC CCG CTT CCC AGG CT
Perilipina Anti- Sense	ACC CTT TGC GCT CCA CCT CT
RPL-19 Sense	CCAATGAAACCAACGAAATCG
RPL-19 Antisense	TCAGGCCATCTTTGATCAGCT

4.3.3 *Western blotting*

As amostras de tecido coletado (0,05-0,3 g) foram homogeneizadas em 1,0 mL de tampão de extração (100 mM Trizma, pH 7,5, 10 mM EDTA, 1% SDS, 10 mM pirofosfato de sódio, fluoreto de sódio 100 mM, 10 ortovanadato sódica, 2 mM PMSF e 0,25 mg de aprotinina (inibidor de protease). Os lisados foram incubadas com 10% de Triton X-100 por 30 min e centrifugadas a 14.000 rpm por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e a concentração de proteína foi determinada por meio do ensaio de Bradford (Bio-Rad, Hercules, Califórnia), usando albumina bovina (BSA) como padrão de referência. O Immunoblotting de extratos protéicos TAB foi realizado utilizando anticorpo ATGL (1:1.000; Cell signaling), Perilipina (1:5.000; abcam), LHS e GAPDH (1:1.000; Santa Cruz), seguido pela incubação com anticorpo secundário apropriado conjugado com peroxidase. A detecção das bandas foi obtida em autro – radiografias, por quimioluminescência, após exposição em filmes de raios X, por tempo aproximado de 1 minuto. A abundância das proteínas foi estimada por meio da análise densitométrica das bandas (método semi- quantitativo).

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados por análise de variância (ANOVA), com pós-teste em Student-Newman-Keuls. Quando envolvendo dois grupos, utilizamos teste t de Student. As diferenças foram consideradas significativas para valores de $p<0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Estudos in vivo

Para avaliar a eficiência dos modelos experimentais propostos de tireoidectomia e do tratamento crônico com T3, o peso úmido do coração e o peso corporal foram mensurados, para o cálculo da relação peso do coração/peso corporal (%), bem como o TSH sérico, conforme mostra a tabela 1.

Tabela 1 – Peso cardíaco úmido (PCU, mg/100 g PC), peso cardíaco desidratado (PCD, mg/100g PC) e concentração sérica de TSH (ηg/mL) dos ratos controle, TX e tratados com T_3. Os valores estão expressos em média ± E.P.M.

Grupos	PCU (mg/100 g PC)	PCD (mg/100 g PC)	TSH sérico (ηg/mL)
Controle	$305,1 \pm 10,1^{a}$	$88,9 \pm 6,4^{c}$	$1,47 \pm 0,25^{a,c}$
TX	$272,6 \pm 28,1^{b,c}$	$70,5 \pm 2,8^{d}$	$22,86 \pm 1,46^{d}$
$TXT3_{crônico}$	$381,1 \pm 7,5^{b,d}$	$103,8 \pm 1,5^{d}$	$0,39 \pm 0,07^{b,c}$

a e b diferem entre si $p<0,05$
c e d diferem entre si $p<0,001$

Observa-se que a indução do estado hipotireoideo levou a uma diminuição significativa do peso do coração em relação ao peso corporal total e a um acentuado aumento do TSH. O oposto ocorreu com o grupo tratado cronicamente com T3, indicando o sucesso do modelo proposto.

A seguir o efeito do hipotireoidismo e do tratamento crônico com T3 sobre a expressão do mRNA e da proteína LHS, ATGL, PERILIPINA e do receptor beta 2 adrenérgico em TAB periepidimal.

Os resultados deste estudo estão apresentados nas quatro figuras (1 a 4) que se seguem.

A figura 1 (A e B) ilustra, respectivamente, os dados da expressão gênica (mRNA) e protéica da lipase hormônio sensível (LHS) em tecido adiposo periepididimal de ratos submetidos ao hipotireoidismo, seguido ou não de tratamento crônico (5 dias) com T3.

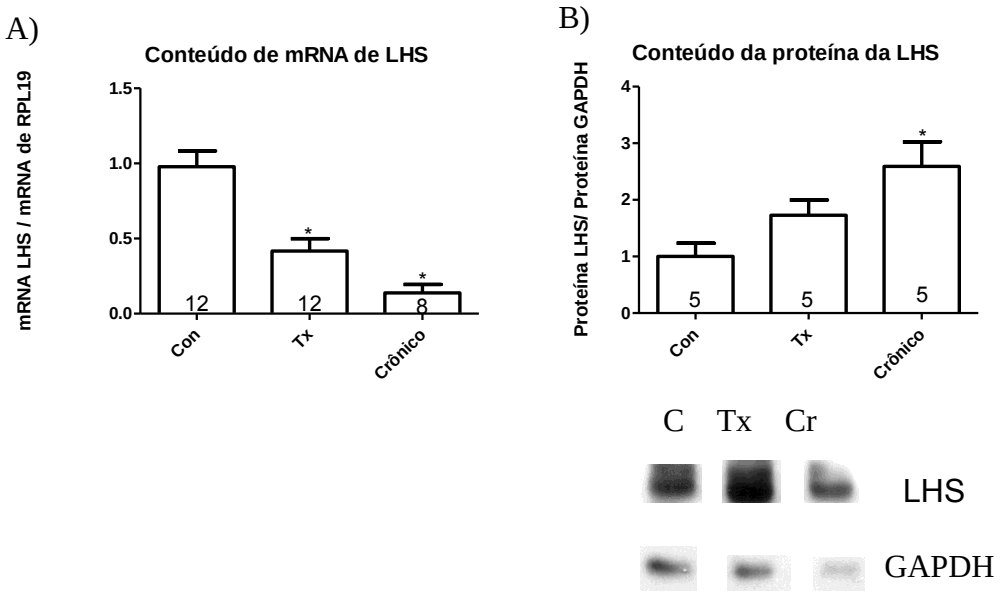

Fig.1 Efeito da tireoidectomia e do tratamento crônico com T3 sobre a expressão gênica (A) e protéica (B) de LHS no TAB periepididimal. Abaixo da figura 1 B encontra-se um autoradiograma tipico de 1 experimento num total de 3 que foram realizados.One- way ANOVA, seguida pelo pós-teste Student Newman- Keuls. *p<0,001: C vs Tx e Tx vs T3 crônico.

Os dados demonstram que o conteúdo de mRNA de LHS apresentou uma redução de 60% no hipotireoidismo (Controle 1,0 ± 0,10 vs Tx 0,40 ± 0,08; P < 0,001) e que

o tratamento dos ratos Tx por 5 dias com T3 provocou uma redução ainda maior do mesmo, estimada em 70%, em relação ao grupo Tx (Tx 0,40 ± 0,08 vs Tx + T3 crônico 0,13 ± 0,05; P < 0,001). Já o conteúdo da proteína LHS apresentou-se elevado, embora não significativamente, nos ratos Tx, sendo que o tratamento dos ratos Tx por 5 dias com T3 provocou um aumento significativo (aproximadamente 2,6 vezes) no seu conteúdo em relação ao grupo controle (controle 1,0 ± 0,23 vs Tx + T3 crônico 2,59 ± 0,4; P < 0,05).

Na figura 2 (A e B) estão apresentados os dados referentes aos efeitos do hipotireoidismo seguido ou não pelo tratamento crônico com T3 sobre o conteúdo de mRNA e da proteína ATGL no tecido adiposo branco periepididimal (TAB).

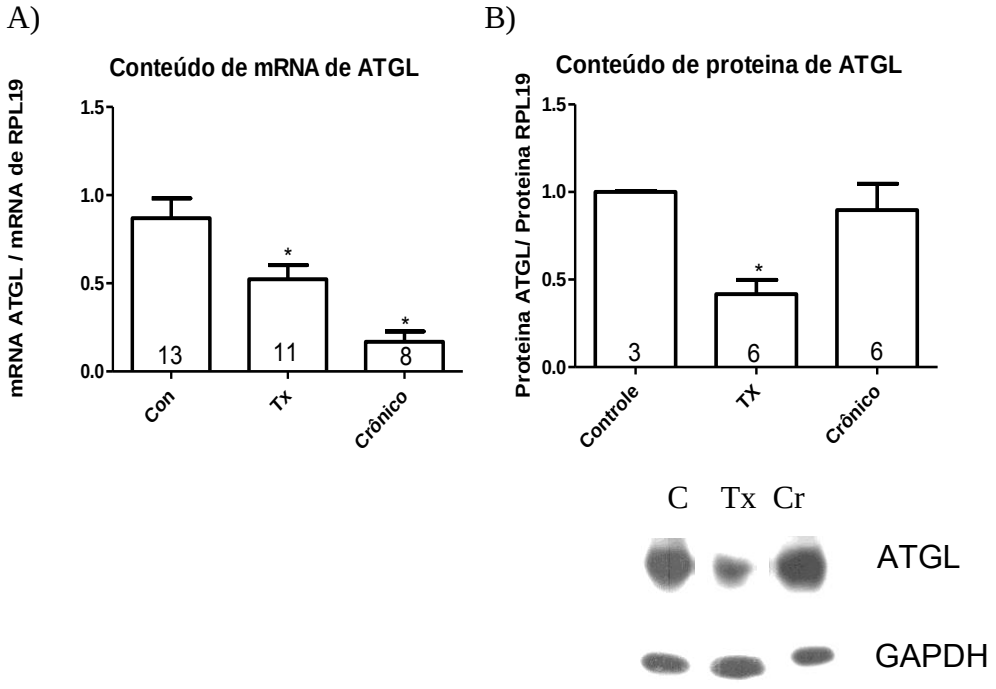

Fig. 2 Efeito da tireoidectomia e do tratamento crônico com T3 sobre a expressão gênica (A) e protéica (B) de ATGL no TAB periepididimal. Abaixo da figura 1 B encontra-se um autoradiograma tipico de 1 experimento num total de 3 que foram realizados.One- way ANOVA, seguida pelo pós-teste Student Newman- Keuls. *p<0,001: C vs Tx e Tx vs T3 crônico.

Observa-se um padrão de resposta similar ao que ocorreu com a LHS, já que o hipotireoidismo promoveu uma redução de 40% no conteúdo de mRNA de ATGL (Controle 0,86 ± 0,11 *vs* Tx 0,52 ± 0,07; P < 0,001), e o tratamento de ratos Tx com T3 por 5 dias levou a uma redução de 70% (Tx 0,52 ± 0,07 vs Tx + T3 crônico 0,16 ± 0,05; P < 0,001) do conteúdo deste mRNA em relação ao grupo Tx. Observa-se que no hipotireoidismo o conteúdo de ATGL é reduzido em 60% (Controle 1,0 ± 0,006 vs Tx 0,41 ± 0,08; P < 0,05) e que o tratamento dos ratos Tx por 5 dias com T3 provocou uma aumento do conteúdo da proteína de aproximadamente 60% em relação ao grupo Tx (Tx 0,40 ± 0,08 vs Tx + T3 crônico 0,89 ± 0,14; P < 0,05).

A figura 3 (A e B) apresenta os dados obtidos com relação aos efeitos dos HT sobre a expressão do mRNA e da proteína de Perilipina.

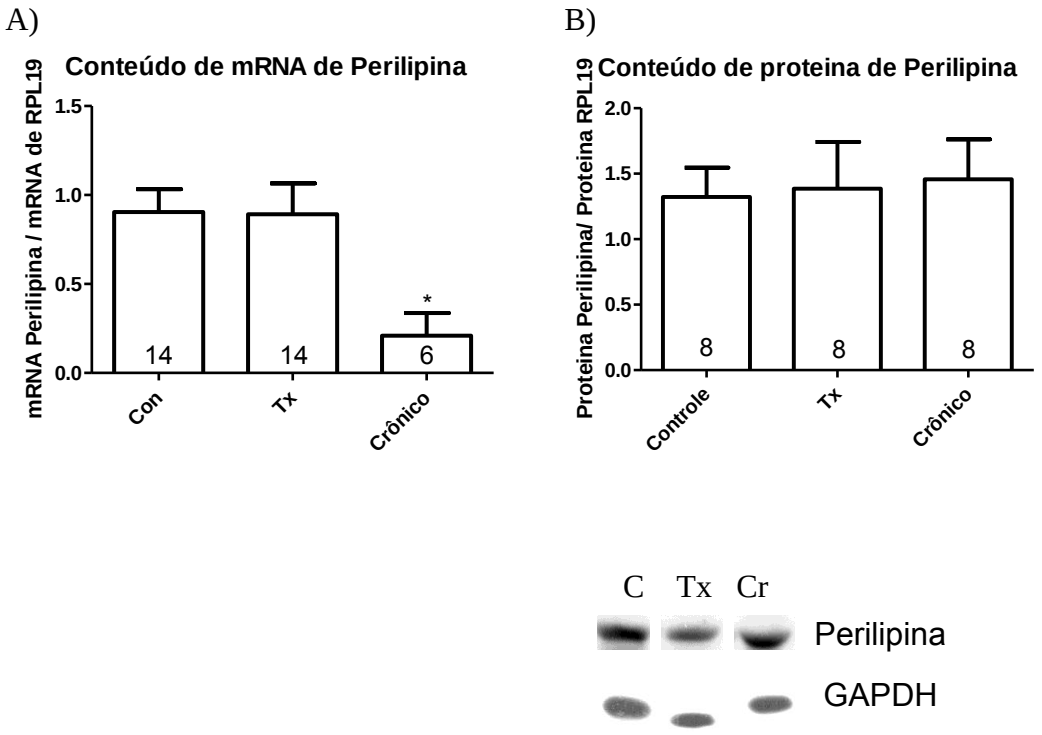

Fig.3 Efeito da tireoidectomia e do tratamento crônico com T3 sobre a expressão gênica (A) e protéica (B) da perilipina no TAB periepididimal. Abaixo da figura 1 B encontra-se um autoradiograma tipico de 1 experimento num total de 3 que foram realizados.One- way ANOVA, seguida pelo pós-teste Student Newman- Keuls. *p<0,001: C vs Tx e Tx vs T3 crônico.

Não houve alteração significativa no conteúdo de mRNA da perilipina do TAB do animal hipotireoideo em relação ao controle (Controle 0,90 ± 0,12 vs Tx 0,89 ± 0,17). Contudo, o grupo de ratos Tx tratados com T3 por 5 dias apresentou uma redução significativa de 88% (Tx 0,89 ± 0,17 vs Tx + T3 crônico 0,20 ± 0,12; P < 0,001) do conteúdo deste mRNA em relação ao grupo Tx e Controle. Quanto à proteína ATGL, observa-se que seu conteúdo manteve-se inalterado nos animais do grupo controle, Tx e Tx tratado cronicamente com T3. No entanto, enquanto o padrão de expressão da ATGL manteve-se semelhante ao do mRNA nos animais do grupo C e Tx, houve um aumento expressivo do seu conteúdo com o tratamento crônico com T3, quando relacionamos esse dado ao do mRNA.

Na figura 4 observam-se os resultados obtidos com relação à expressão do mRNA do receptor β2 adrenérgico, nos mesmos grupos experimentais.

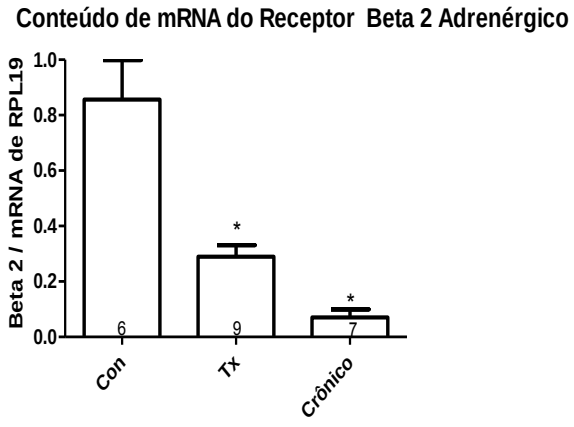

Fig.4 Efeito da tireoidectomia (Tx) e do tratamento crônico com T3 sobre a expressão gênica do receptor beta 2 adrenérgico no TAB periepididimal. One- way ANOVA, seguida pelo pós-teste Student Newman- Keuls**.** *p<0,001: C *vs* Tx e Tx *vs* T3 cronico

O conteúdo de mRNA de receptor β2 adrenérgico foi reduzido em 68% no hipotireoidismo (Controle 0,85 ± 0,14 vs Tx 0,28 ± 0,04; P < 0,001) e o tratamento por 5 dias com T3 provocou uma redução significativamente maior - 75% (Tx 0,28 ± 0,04 vs Tx crônico 0,07 ± 0,02; P < 0,001) do mesmo em relação ao grupo Tx.

A seguir o efeito do hipotireoidismo e do tratamento agudo com T3 sobre a expressão do mRNA da LHS, ATGL, perilipina e do receptor beta 2 adrenérgico em TAB periepidimal.

As figuras seguintes (5 a 8) mostram os resultados obtidos quando avaliamos o efeito da administração aguda de T3 (1,5 µg/µl) sobre a expressão dos mRNAs da LHS, ATGL, perilipina e do receptor beta 2 adrenérgico, respectivamente.

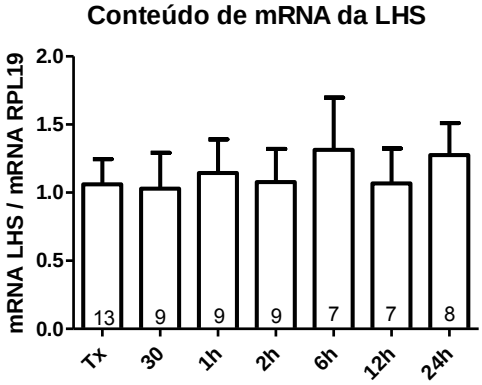

Fig.5 Efeito do tratamento agudo com T3 sobre a expressão gênica de LHS no TAB periepididimal de ratos tireoidectomizados. One- way ANOVA, seguida pelo pós-teste Student Newman-Keuls.

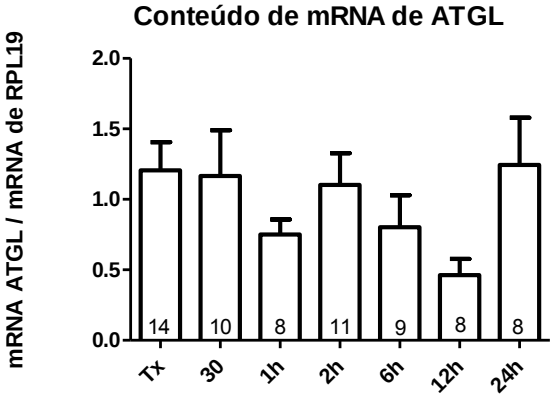

Fig.6 Efeito do tratamento agudo com T3 sobre a expressão gênica de ATGL no TAB periepididimal de ratos tireoidectomizados. One- way ANOVA, seguida pelo pós-teste Student Newman- Keuls.

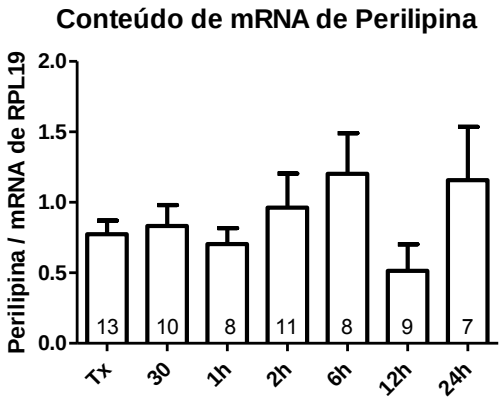

Fig.7 Efeito do tratamento agudo de T3 sobre a expressão gênica da perilipina no TAB periepididimal. One- way ANOVA, seguida pelo pós-teste Student Newman- Keuls.

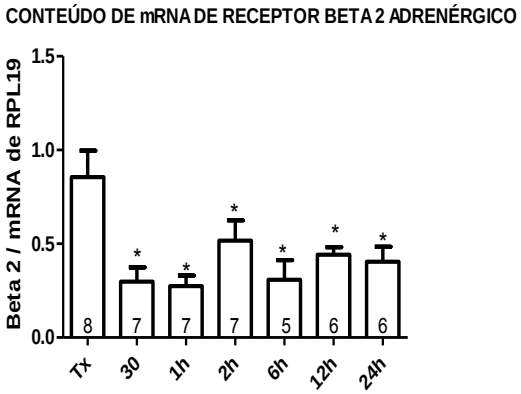

Fig.8 Efeito do tratamento agudo com T3 sobre a expressão gênica do receptor beta 2 adrenergico no TAB periepididimal. One- way ANOVA, seguida pelo pós-teste Student Newman- Keuls**. *** $p < 0,05$ vs Tx

A figura 5 se refere à expressão do mRNA da LHS no TAB de ratos TX e TX submetidos à administração aguda de T3, onde se observa que o tratamento agudo com T3 não resultou em modificações na expressão deste transcrito ($p > 0,05$).

Os dados do efeito do hipotireoidismo, seguido ou não pelo tratamento agudo com T3, sobre o conteúdo de mRNA de ATGL no TAB encontra-se apresentado na figura 6.

Observa-se que a administração aguda de T3 não alterou significativamente o conteúdo de mRNA em relação ao TX nos tempos apresentados, embora após 12h do tratamento, tenha havido uma redução mais acentuada do conteúdo de mRNA de ATGL.

A figura 7 ilustra os dados acerca do efeito do tratamento agudo com T3 sobre a expressão do mRNA da perilipina. Observa-se que o tratamento agudo com T3 não

alterou significativamente o mRNA da perilipina, embora após 12h do tratamento tenha havido uma redução mais acentuada do conteúdo de mRNA.

Na figura 8 observam-se os resultados obtidos com relação à expressão do mRNA do receptor β2 adrenérgico, nos mesmos grupos experimentais. Observa-se que houve redução da mesma ao redor de 65% após 30 min da administração de T3 (Tx 0,83 ± 0,15 vs Tx 30min 0,29 ± 0,07; $P < 0,05$ vs Tx), efeito que persistiu ao longo das 24 h da administração do hormônio.

5.2 Estudos in vitro

A seguir o efeito da depleção e do tratamento agudo com T3 sobre a expressão dos mRNAs e das proteinas LHS E ATGL e mRNAs da perilipina e receptor beta 2 adrenérgico em células 3T3-L1 .

A figura 9 ilustra os dados obtidos com relação à análise da expressão do mRNA **(A)** e da proteína LHS **(B)**, em células 3T3-L1 depletadas de HT. Os dados demonstram que o conteúdo de mRNA de LHS em células 3T3 L1 sofreu redução de 20% na ausência de HT (Controle 1,1 ± 0,07 vs Tx 0,9 ± 0,05; $P < 0,05$), condição em que a expressão da proteína não foi significativamente afetada.

Os dados obtidos com relação à análise da expressão do mRNA **(A)** e da proteína ATGL **(B)**, em células 3T3 L1 que foram depletadas de HT encontram-se apresentados na figura 10. Observa-se um padrão de resposta similar ao que ocorreu com a LHS, já que a depleção de HT promoveu uma redução de 20% no conteúdo de

mRNA de ATGL (Controle 1,0 ± 0,05 vs Tx 0,8 ± 0,06; $P < 0,05$). O conteúdo de ATGL também não sofreu alteração significativa no grupo Tx.

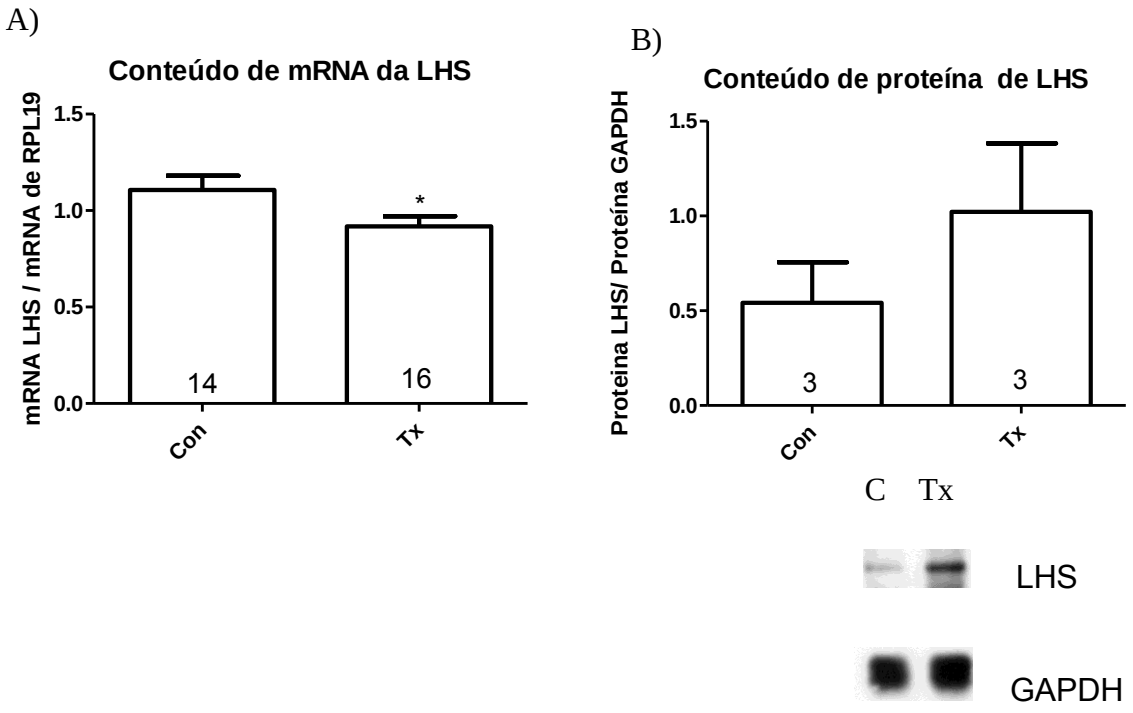

Fig. 9 Representação gráfica do conteúdo de mRNA (A) e de proteína (B) de LHS nas células 3T3-L1 controle (C) e submetidas a depleção de HT (TX). Abaixo da figura 1 B encontra-se um autoradiograma tipico de 1 experimento num total de 2 que foram realizados. Teste t de Student * $P<0.05$ vs Controle.

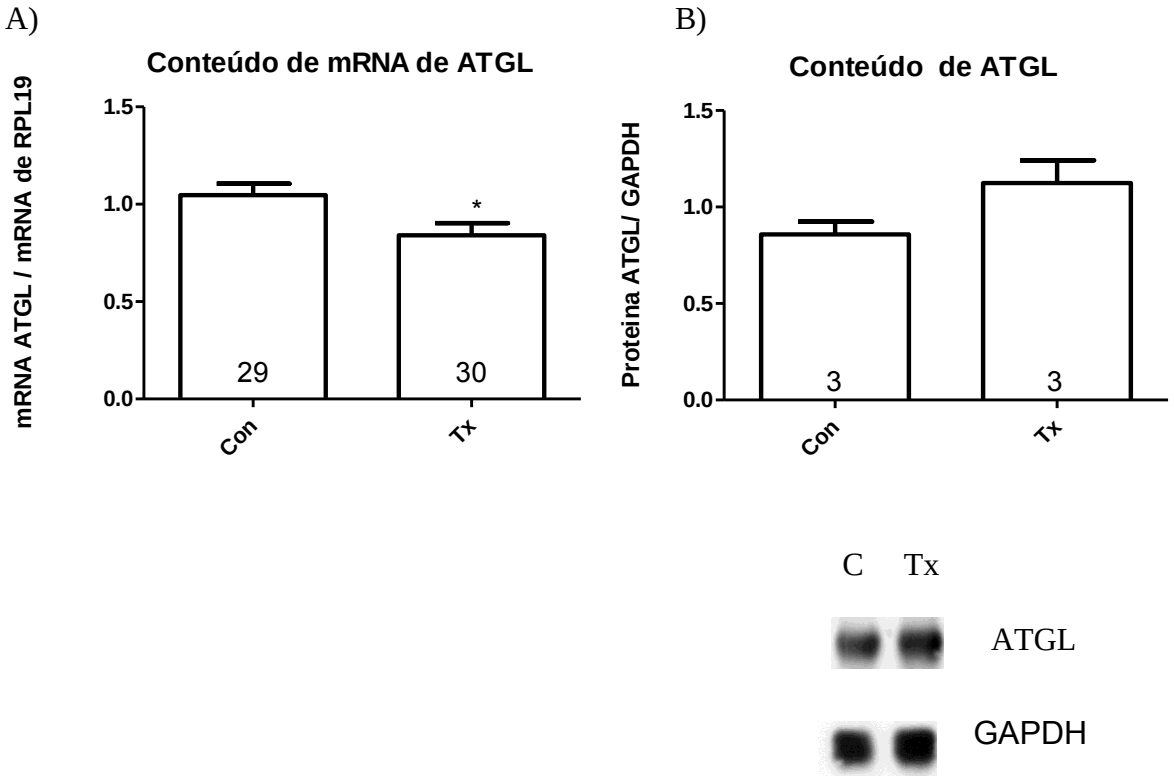

Fig. 10 Representação gráfica do conteúdo de mRNA **(A)** e de proteína **(B)** de ATGL nas células 3T3-L1 controle (C) e submetidas a depleção de HT (TX). Abaixo da figura 1 B encontra-se um autoradiograma tipico de 1 experimento num total de 2 que foram realizados. Teste t de Student * P<0.05 vs Controle.

A figura 11 ilustra a expressão de mRNA da perilipina em células 3T3-L1 depletadas de HT. Observa-se que na ausência de T3 não houve mudanças significativas na expressão deste gene.

A figura 12 apresenta a expressão do conteúdo de mRNA dos receptores beta 2 adrenérgicos em células 3T3 L1 na ausência de HT. Assim como ocorreu com a LHS e ATGL houve diminuição de 40% no conteúdo de mRNA do receptor beta 2 adrenérgico nas células depletadas de HT (Controle 1,0 ± 0,1 vs Tx 0,6 ± 0,13; P < 0,05).

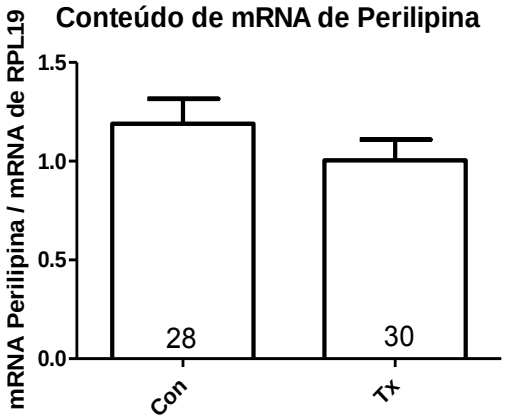

Fig.11 Representação gráfica do conteúdo de mRNA de Perilipina nas células 3T3-L1 controle (C) e submetidas a depleção de T3 (TX). teste t de Student.

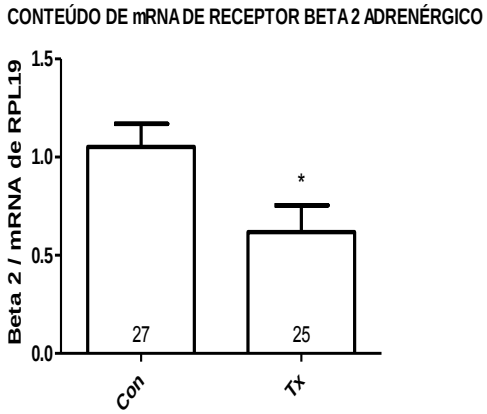

Fig.12 Representação gráfica do conteúdo de mRNA de receptor beta 2 adrenérgico nas células 3T3-L1 controle (C) e submetidas a depleção de T3 (TX). teste t de Student * P<0.05 vs controle.

As figuras seguintes (13 a 28) mostram os resultados obtidos quando avaliamos o efeito da administração aguda de T3, em diferentes doses (10^{-6} M a 10^{-9} M), L1 sobre a expressão dos mRNAs da LHS, ATGL, perilipina e do receptor beta 2 adrenérgico em células 3T3.

T3 10^{-9} M

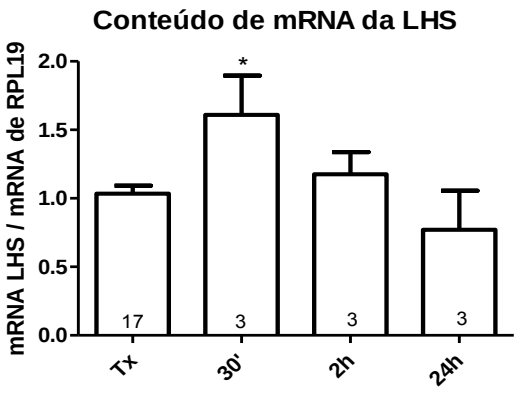

Fig.13 Representação gráfica do conteúdo de mRNA de LHS nas células 3T3-L1 submetidas aos seguintes tratamentos: depleção de T3 (TX); grupo TX que recebeu T3 nas doses 10^{-9} M por 30 minutos, 2h e 24h (T3). One- way ANOVA, seguida pelo pós-teste Student Newman- Keuls. *p< 0,05 vs todos.

T3 10^{-8} M

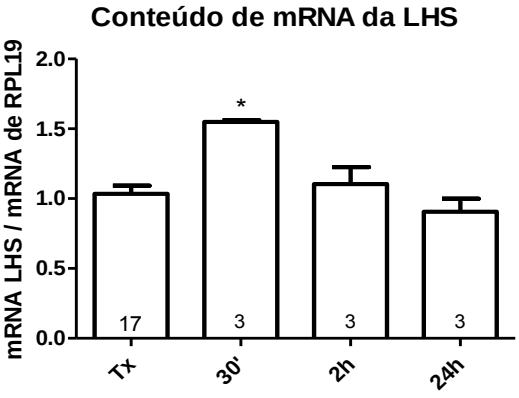

Fig.14 Representação gráfica do conteúdo de mRNA de LHS nas células 3T3-L1 submetidas aos seguintes tratamentos: depleção de T3 (TX); grupo TX que recebeu T3 nas doses 10^{-8} M por 30 minutos, 2h e 24h (T3). One- way ANOVA, seguida pelo pós-teste Student Newman-Keuls. *p< 0,05 vs todos

T3 10^{-7} M

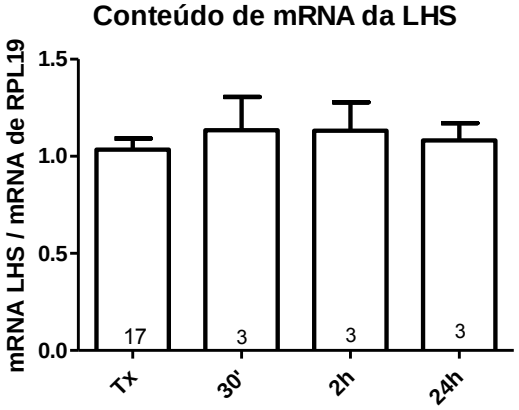

Fig. 15 Representação gráfica do conteúdo de mRNA de LHS nas células 3T3-L1 submetidas aos seguintes tratamentos: depleção de T3 (TX); grupo TX que recebeu T3 nas doses 10^{-7} M por 30 minutos, 2h e 24h (T3). One- way ANOVA, seguida pelo pós-teste Student Newman- Keuls.

T3 10^{-6} M

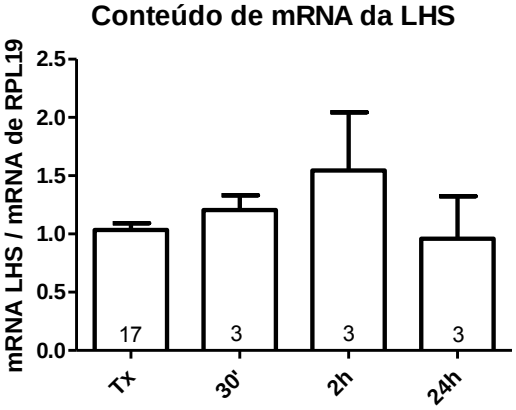

Fig. 16 Representação gráfica do conteúdo de mRNA de LHS nas células 3T3-L1 submetidas aos seguintes tratamentos: depleção de T3 (TX); grupo TX que recebeu T3 nas doses 10^{-6} M por 30 minutos, 2h e 24h (T3). One- way ANOVA, seguida pelo pós-teste Student Newman- Keuls.

O conteúdo de mRNA de LHS apresentou aumento significativo de 54% após 30 min da administração de T3 na dose de 10^{-9} M (Tx 1,03 ± 0,05 vs Tx 30min 1,6 ± 0,28; $P < 0,05$ vs Tx). Esse aumento é seguido de uma redução, que é tempo dependente, de modo que após 24 h da administração do T3 e expressão deste transcrito já se encontra similar ao grupo Tx, conforme mostra a Fig. 13.

A administração de T3 na dose de10^{-8} M também promoveu aumento (~50%) significativo do conteúdo de mRNA de LHS nas células após 30 min do tratamento (Tx 1,03 ± 0,05 vs Tx 30min 1,55 ± 0,01; $P < 0,05$ vs Tx), seguindo-se uma queda da expressão desse transcrito ao nível do controle, após 24 h da administração do hormônio. Esta resposta foi semelhante à observada quando as células foram tratadas com T3 na dose de 10^{-9} M.

As figuras 15 e 16 se ilustram os dados referentes à expressão do mRNA da LHS em células 3T3 L1 submetidas à administração aguda de T3 nas doses de 10^{-7} M e 10^{-6} M, respectivamente, onde se observa que o T3 não resultou em modificações na expressão de mRNA de LHS nestas celulas ($p > 0,05$) nos tempos estudados.

Quanto à expressão do mRNA da ATGL, observa-se padrão de resposta semelhante à LHS, já que o T3 nas doses de 10^{-9} M e 10^{-8} M promoveu, em 30 min, um aumento de 45% (Tx 1,04 ± 0,04 vs 30min 1,46 ± 0,15; $P < 0,05$) e 40% (Tx 1,04 ± 0,04 vs 30min 1,38 ± 0,12; $P < 0,05$), respectivamente, no conteúdo do transcrito, como mostram as figuras 17 e 18.

T3 10^{-9} M

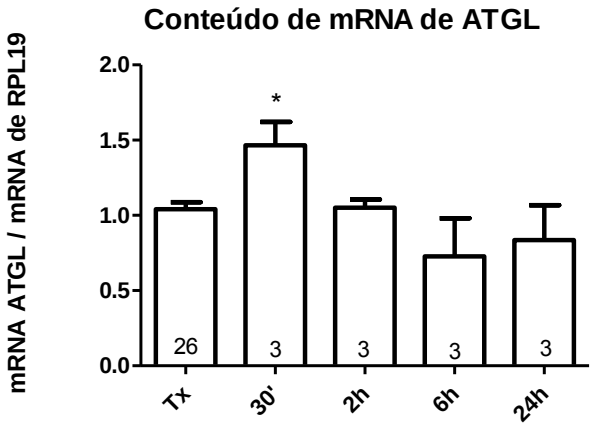

Fig.17 Representação gráfica do conteúdo de mRNA de ATGL nas células 3T3-L1 submetidas aos seguintes tratamentos: depleção de T3 (TX); grupo TX que recebeu T3 nas doses 10^{-9} M por 30 minutos, 2h, 6h e 24h (T3). One- way ANOVA, seguida pelo pós-teste Student Newman- Keuls. * $p < 0,05$ vs todos

T3 10^{-8} M

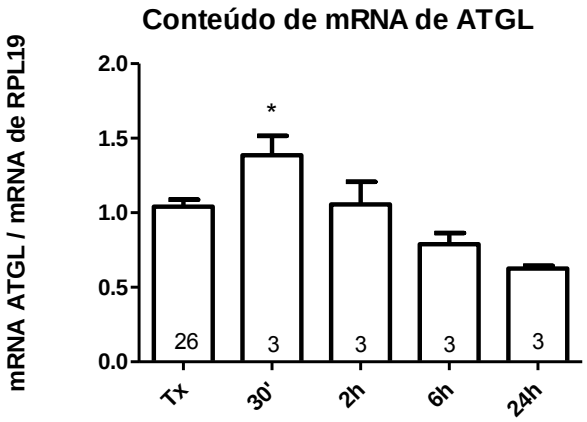

Fig. 18 Representação gráfica do conteúdo de mRNA de ATGL nas células 3T3-L1 submetidas aos seguintes tratamentos: depleção de T3 (TX); grupo TX que recebeu T3 nas doses 10^{-8} M por 30 minutos, 2h, 6h e 24h (T3). One- way ANOVA, seguida pelo pós-teste Student Newman- Keuls. * $p < 0,05$ vs todos.

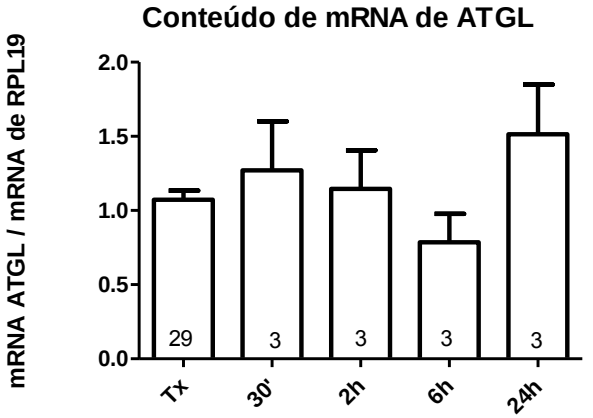

Fig.19 Representação gráfica do conteúdo de mRNA de ATGL nas células 3T3-L1 submetidas aos seguintes tratamentos: depleção de T3 (TX); grupo TX que recebeu T3 nas doses 10^{-7} M por 30 minutos, 2h, 6h e 24h (T3). One- way ANOVA, seguida pelo pós-teste Student Newman- Keuls.

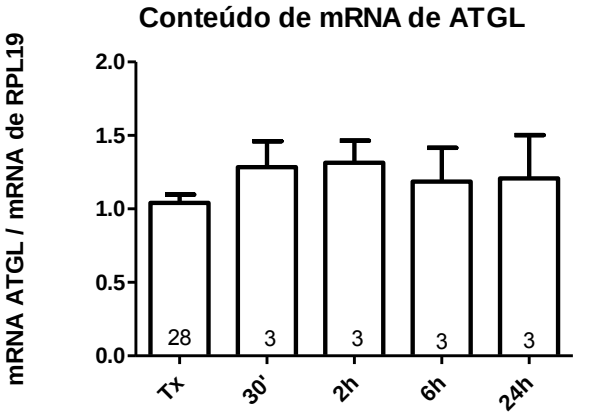

Fig. 20 Representação gráfica do conteúdo de mRNA de ATGL nas células 3T3-L1 submetidas aos seguintes tratamentos: depleção de T3 (TX); grupo TX que recebeu T3 nas doses 10^{-6} M por 30 minutos, 2h, 6h e 24h (T3). One- way ANOVA, seguida pelo pós-teste Student Newman- Keuls.

Nas figuras 19 e 20 observa-se que o tratamento agudo das células 3T3-L1 com T3 nas doses de 10^{-7} M e 10^{-6} M , respectivamente, não resultou em modificações na expressão do mRNA de ATGL($p > 0,05$).

As figuras 21, 22, 23 e 24 ilustram, respectivamente, os dados acerca do efeito do tratamento agudo com T3, nas doses de 10^{-9} a 10^{-6} M sobre a expressão do mRNA da perilipina. Observa-se que o tratamento agudo com T3 em todas as doses testadas não alterou significativamente o conteúdo deste transcrito.

T3 10^{-9} M

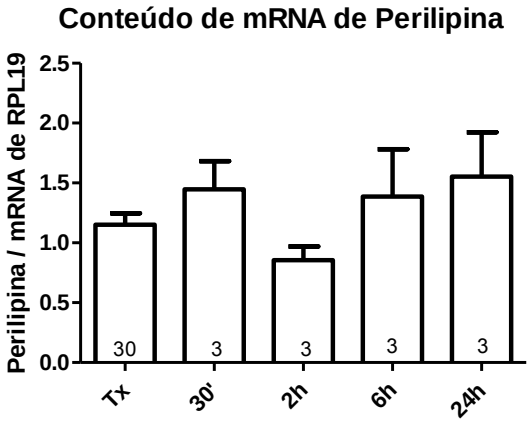

Fig.21 Representação gráfica do conteúdo de mRNA de Perilipina nas células 3T3-L1 submetidas aos seguintes tratamentos: depleção de T3 (TX); grupo TX que recebeu T3 nas doses 10^{-9} M por 30 minutos, 2h, 6h e 24h (T3). One- way ANOVA, seguida pelo pós-teste Student Newman-Keuls.

T3 10^{-8} M

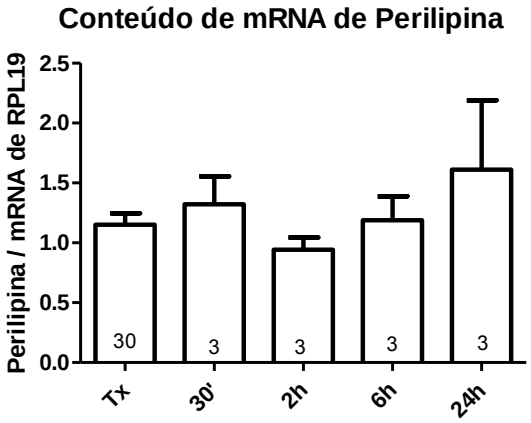

Fig.22 Representação gráfica do conteúdo de mRNA de Perilipina nas células 3T3-L1 submetidas aos seguintes tratamentos: depleção de T3 (TX); grupo TX que recebeu T3 nas doses 10^{-8} M por 30 minutos, 2h, 6h e 24h (T3). One- way ANOVA, seguida pelo pós-teste Student Newman- Keuls.

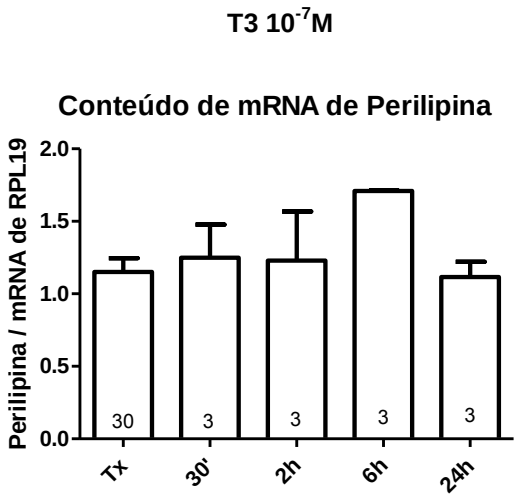

Fig.23 Representação gráfica do conteúdo de mRNA de Perilipina nas células 3T3-L1 submetidas aos seguintes tratamentos: depleção de T3 (TX); grupo TX que recebeu T3 nas doses 10^{-7} M por 30 minutos, 2h, 6h e 24h (T3). One- way ANOVA, seguida pelo pós-teste Student Newman- Keuls.

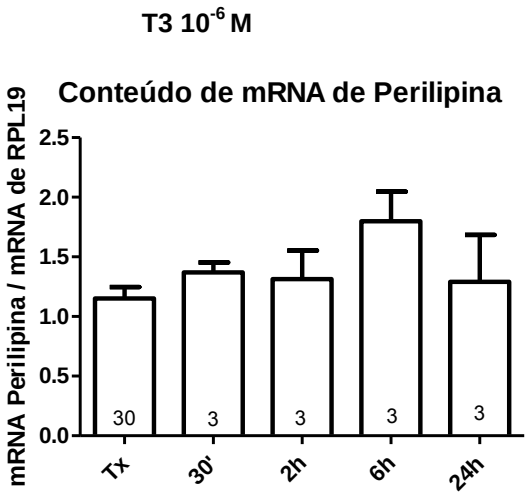

Fig.24 Representação gráfica do conteúdo de mRNA de Perilipina nas células 3T3-L1 submetidas aos seguintes tratamentos: depleção de T3 (TX); grupo TX que recebeu T3 nas doses 10^{-6} M por 30 minutos, 2h, 6h e 24h (T3). One- way ANOVA, seguida pelo pós-teste Student Newman- Keuls.

A figura 25 ilustra os dados relativos ao efeito do tratamento com T3, na dose de 10^{-9}M, por 30 minutos, 2h e 24h, sobre a expressão do mRNA do receptor β2 adrenérgico em células 3T3-L1. Observa-se que o tratamento com esta dose de T3 por 24 h provocou um aumento da mesma, embora ele não tenha sido significativo. Todavia, quando o tratamento com T3 foi efetuado na dose de 10^{-7} M, observou-se um aumento significativo da expressão deste mRNA (Figura 27). Nas doses de 10^{-8} M e 10^{-6} M não ocorreram alterações na expressão deste transcrito em nenhum dos tempos estudados. (figura 26 e 28).

T3 10^{-9} M

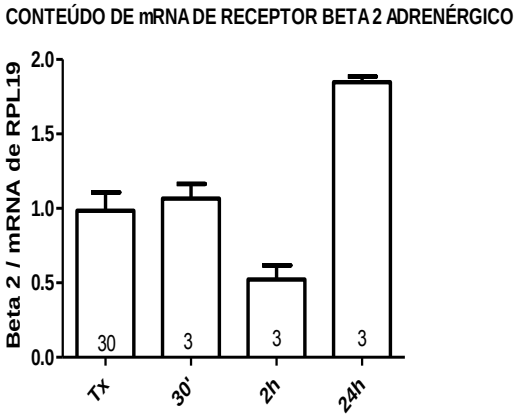

Fig 25: Representação gráfica do conteúdo de mRNA de AR beta 2 nas células 3T3-L1 submetidas aos seguintes tratamentos: depleção de T3 (TX); grupo TX que recebeu T3 nas doses 10^{-9} M por 30 minutos, 2h e 24h (T3). One- way ANOVA, seguida pelo pós-teste Student Newman- Keuls

T3 10^{-8} M

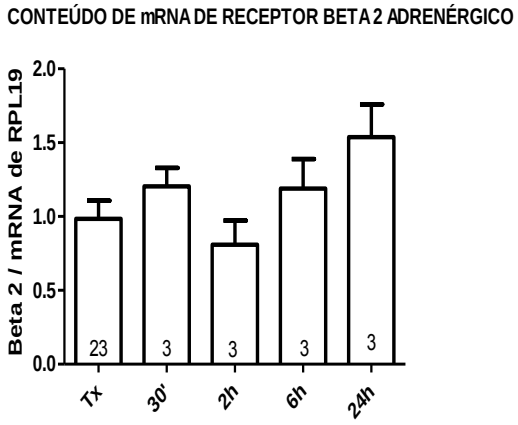

Fig.26 Representação gráfica do conteúdo de mRNA de AR beta 2 nas células 3T3-L1 submetidas aos seguintes tratamentos: depleção de T3 (TX); grupo TX que recebeu T3 nas doses 10^{-8} M por 30 minutos, 2h e 24h (T3). One- way ANOVA, seguida pelo pós-teste Student Newman- Keuls.

T3 10^{-7} M

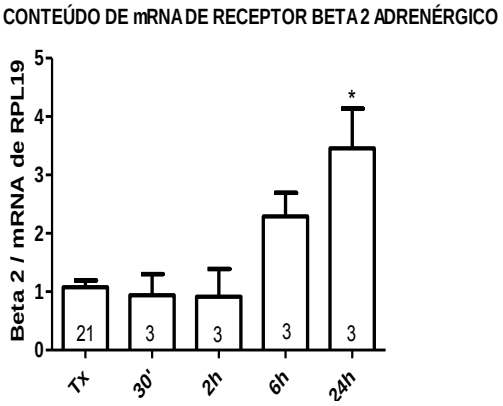

Fig.27 Representação gráfica do conteúdo de mRNA de AR beta 2 nas células 3T3-L1 submetidas aos seguintes tratamentos: depleção de T3 (TX); grupo TX que recebeu One- way ANOVA, seguida pelo pós-teste Student Newman- Keuls.

T3 10^{-6} M

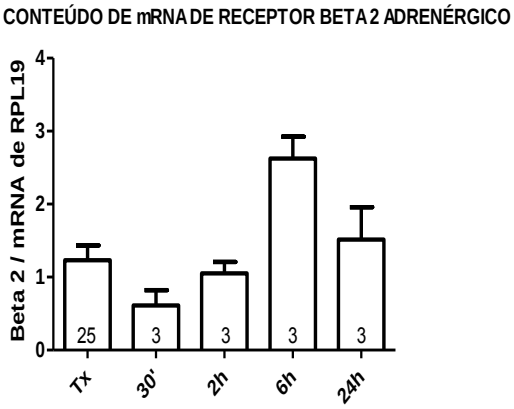

Fig. 28 Representação gráfica do conteúdo de mRNA de AR beta 2 nas células 3T3-L1 submetidas aos seguintes tratamentos: depleção de T3 (TX); grupo TX que recebeu T3 nas doses 10^{-6} M por 30 minutos, 2h, 6h e 24h (T3). One- way ANOVA, seguida pelo pós-teste Student Newman- Keuls.

A seguir o efeito do tratamento agudo com T3 no conteúdo total de mRNA e das proteínas LHS E ATGL em células 3T3-L1 previamente tratadas com actinomicina D (bloqueador da transcrição).

Para avaliar se o aumento do conteúdo de mRNA de LHS (Fig. 13) e ATGL (Fig. 17), observado 30 minutos após a administração de T3, foi decorrente de uma ação genômica ou não genômica, as células 3T3-L1 submetidas à depleção de T3 (TX) foram tratadas com 10^{-9} M de T3 na presença de actinomicina D (ACT D). Esses dados estão apresentados nas figuras 29 A e 30 A e mostram que o uso da droga foi capaz de bloquear o efeito agudo do T3.

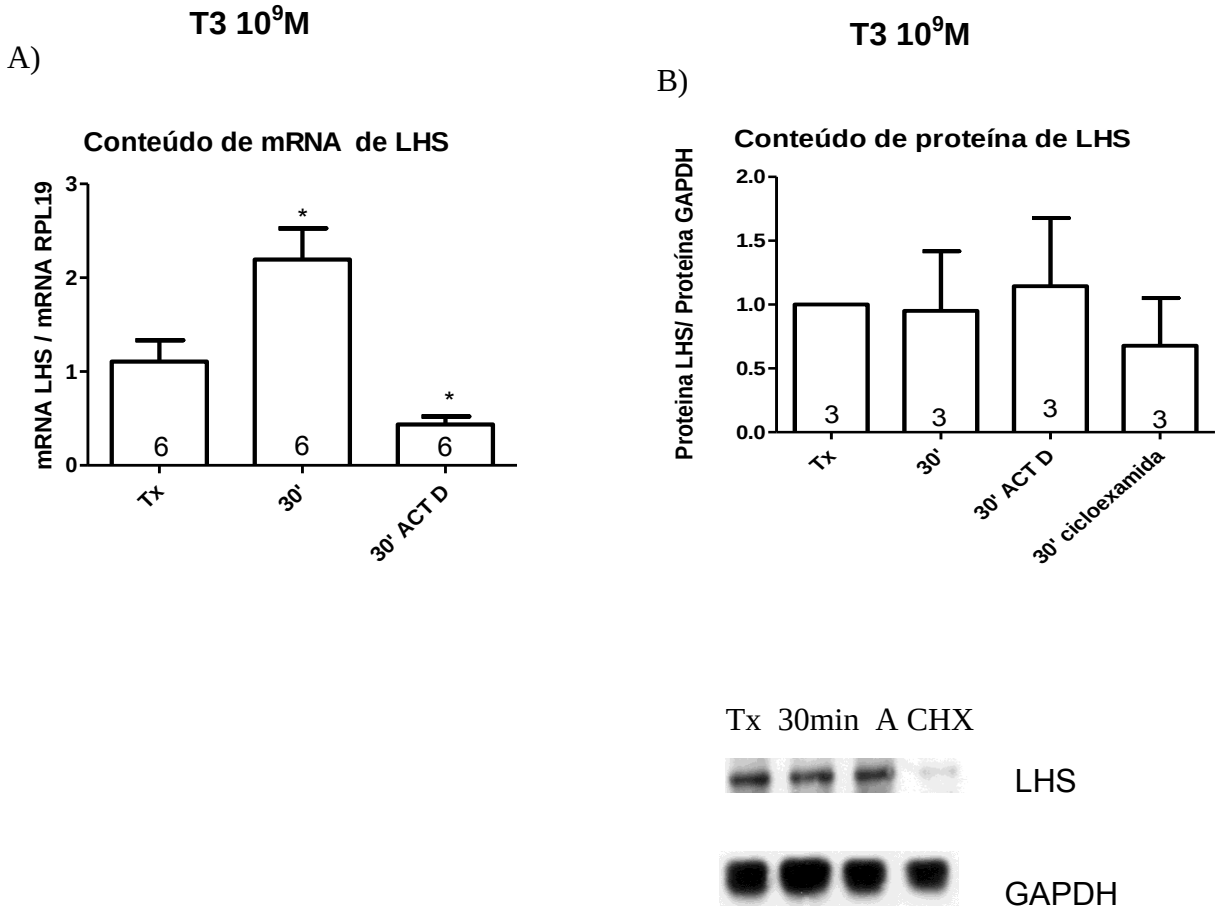

Fig. 29 Representação gráfica do conteúdo de mRNA (A) e proteína (B) de LHS nas células 3T3-L1 submetidas aos seguintes tratamentos: depleção de T3 (TX); grupo TX que recebeu T3 nas doses 10^{-9} M por 30 minutos, Tx que recebeu 1h antes da administração de T3 2ug/ml ActD (A) e CHX . Abaixo da figura 1 B encontra-se um autoradiograma tipico de 1 experimento num total de 4 que foram realizados.One- way ANOVA, seguida pelo pós-teste Student Newman- Keuls. *p< 0,05 vs todos

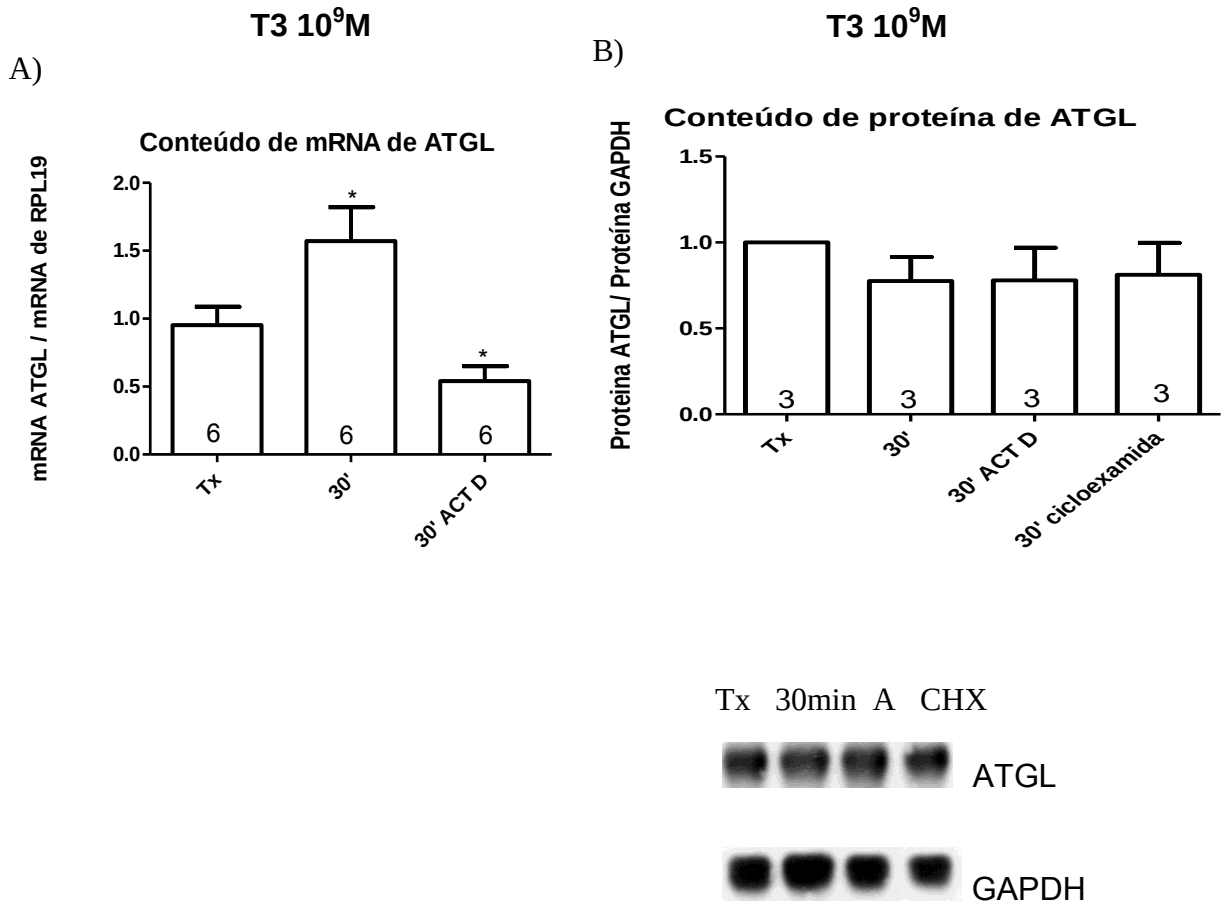

Fig.30 Representação gráfica do conteúdo de mRNA (A) e proteína (B) de ATGL nas células 3T3-L1 submetidas aos seguintes tratamentos: depleção de T3 (TX); grupo TX que recebeu T3 nas doses 10^{-9} M por 30 minutos, Tx que recebeu 1h antes da administração de T3 2ug/ml ActD (A) e CHX . Abaixo da figura 1 B encontra-se um autoradiograma tipico de 1 experimento num total de 4 que foram realizados.One- way ANOVA, seguida pelo pós-teste Student Newman-Keuls. *p< 0,05 vs todos.

Assim, observou-se que o aumento de 100 % da expressão do mRNA da LHS após 30 min da administração de T3 (10^{-9} M) (Tx 1,1 ± 0,2 vs T3 + 30min 2,1 ± 0,3; P < 0,05) foi abolido pelo tratamento prévio das células com ActD (T3 + 30min 2,1 ± 0,3 vs T3 + 30min ActD 0,4 ± 0,08; P < 0,05). O mesmo ocorreu com a expressão do mRNA da ATGL, cujo aumento de 60% induzido pelo tratamento com T3 10^{-9} M (Tx 0,9 ± 0,13

vs T3 + 30min 1,5 $\pm$ 0,2; $P < 0,05$), foi abolido pela ActD (T3 + 30min 1,5 $\pm$ 0,2 vs T3 30min actinomicina D 0,5 $\pm$ 0,1; $P < 0,05$).

Avaliamos também se o tratamento com T3 (10^{-9} M) por 30 min levava ao aumento do conteúdo de LHS e ATGL, de modo semelhante ao que provoca na expressão dos respectivos mRNAs, bem como o efeito da ActD e da cicloheximide (CHX), bloqueador de tradução, sobre esse parâmetro. Os dados deste estudo encontram-se apresentados nas Figuras 29 B e 30B, respectivamente, e mostram que a elevação do conteúdo dos mRNAs não repercutiu em aumento das respectivas proteínas, ao menos no período de tempo estudado 30 min. Tampouco houve alteração no conteúdo da LHS e ATGL quando as células foram tratadas com ActD e CHX.

6 DISCUSSÃO

Embora os efeitos lipolíticos dos hormônios tireoidianos sejam apontados em vários estudos, pouco se conhece sobre as bases moleculares dessas ações. No presente estudo pretendeu-se avaliar se o HT exerce um controle sobre a expressão dos genes que codificam a lipase hormônio sensível (LHS), lipase dos triglicerídeos do adipócito (ATGL) e perilipina, proteínas que participam da lipólise, atuando na gota de gordura do adipócito, e os receptores β2 adrenérgicos. Para tal utilizamos o tecido adiposo periepididimal de ratos, o qual vem sendo largamente empregado como padrão para avaliar respostas frente a diferentes condições experimentais, embora, atualmente, se saiba que há diferenças nas respostas lipolíticas e lipogênicas de tecido adiposo de diferentes origens (epididimal ou retroperitoneal) (ARVIDSSON et al., 2004).

Constata-se que a relação peso do coração/peso corpóreo dos animais que sofreram a cirurgia para retirada da tiróide mostrou-se significativamente diminuída, em paralelo aos altos níveis de TSH. Estes resultados indicam o sucesso na indução do estado hipotireoideo dos animais, uma vez que está amplamente demonstrado na literatura que na ausência do HT (hipotireoidismo) ocorre menor expressão de proteínas da maquinaria contrátil, bem como de outras nesse tecido, o que leva à redução da massa cardíaca (KLEIN; DANZI., 2007). A elevação do TSH sérico também aponta que o efeito de retroalimentação negativa dos HT sobre os tirotrofos hipofisários está reduzida (NUNES, 2003). O contrário ocorreu nos animais tratados por 5 dias com T3.

Com relação à expressão dos genes estudados, verificamos que, com exceção da perilipina, o hipotireoidismo provocou redução do conteúdo dos mRNAs da LHS,

ATGL e do Receptor β2 adrenérgico no tecido adiposo periepididimal, o que indica que o T3 exerce um papel fisiológico na indução da expressão desses genes. Em conformidade com o mRNA da perilipina, não houve alteração do conteúdo desta proteína frente ao hipotireoidismo, situação em que, em paralelo à queda do mRNA da ATGL, ocorreu diminuição da proteína ATGL. Quanto ao conteúdo da proteína de LHS detectou-se uma elevação não significativa da mesma no hipotireoidismo, embora o conteúdo do seu mRNA estivesse reduzido. Embora a avaliação do conteúdo do receptor beta adrenérgico ainda não tenha sido realizada, a redução da expressão dos mRNAs que o codificam aponta para uma redução na expressão do mesmo, e sugere um comprometimento da lipólise no hipotireoidismo.

Em estudos realizados em humanos com hipotireoidismo comparados com indivíduos normais, foi observado que o hipotireoidismo levou a diminuição da concentração e taxa de oxidação de lipídios e aumento da concentração de triacilglicerol comparado com o sem a disfunção (GJEDDE et al., 2010). Estes resultados em humanos condizem com os nossos experimentos, mostrando que a lipólise de alguma forma foi comprometida em indivíduos hipotireoideos, pois a expressão gênica das principais proteínas envolvidas na lipólise foi comprometida em ratos hipotireoideos nos estudos realizados em nosso laboratório.

No entanto, o tratamento crônico com T3 promoveu redução ainda maior do conteúdo desses mRNAs, incluindo-se aqui o da perilipina, cujo conteúdo protéico manteve-se inalterado, o que pode indicar que a queda do mRNA decorra de um aumento da síntese dessa proteína, ou que o T3 reduza a degradação dessa proteína. Em contraste com o mRNA da ATGL, que se apresentou reduzido pelo tratamento

crônico com T3, o conteúdo da proteína ATGL foi aumentado aos níveis do grupo controle com esse procedimento. É possível que, de forma similar ao que sugerimos para a perilipina, a queda do mRNA seja reflexo de um aumento da síntese de ATGL, ou que o T3, cronicamente administrado, reduza a degradação dessa proteína. Quanto ao conteúdo de LHS, a sua elevação, embora não significativa, nos animais hipotireoideos poderia indicar também uma maior taxa de tradução do mRNA, que embora reduzido em conteúdo nessa condição experimental, poderia ter sua cauda poli(A) alongada, o que lhe conferiria maior estabilidade e explicaria o seu maior conteúdo (VOLPATO et al., 2000). O conteúdo de LHS apresentou-s maior no estado de hipertireoidismo. O fato de a LHS ter sido a única proteína a ter o seu conteúdo aumentado no hipertireoidismo em relação ao grupo eutireoideo (controle) poderia indicar que ela tenha um papel relevante na lipólise observada nos estados de hipertireoidismo, já que as demais proteínas estudadas nesse trabalho, apesar de apresentarem sua expressão elevada com o tratamento crônico com T3 em relação ao grupo hipotireoideo, apenas mantiveram sua expressão em valores similares ao estado eutireoideo. A análise do conteúdo do receptor beta adrenérgico ainda não foi realizada.

Na verdade, não há dados na literatura que indiquem qualquer relação entre os HT e a expressão desses genes, embora se saiba que os HT exercem efeitos lipolíticos. Porém esses estudos baseiam-se principalmente no fato de que os hormônios da tiróide induzem a expressão de receptores beta adrenérgicos no tecido adiposo, aumentando à resposta destes às catecolaminas, as quais exercem reconhecido efeito lipolítico.

Há uma aparente regulação diferencial da expressão dos subtipos dos receptores adrenérgicos pelo T3. Alguns estudos apontam que em roedores é o subtipo β3, e não o β1 que é induzido pelo T3. Estudos referentes ao β2 são poucos, sendo a maioria realizada em tecido adiposo humano; estes mostram que o T3 aumenta o conteúdo protéico deste subtipo. Ainda, tratamentos de explantes de tecido adiposo humano com T3 revelou que este regula diretamente a expressão de genes que controlam o nível intracelular de AMPc e assim contribui para a maior capacidade das catecolaminas para induzirem a lipólise (VIGUERIE et al., 2003).

Nossos dados mostram que o tratamento crônico com T3 reduz o conteúdo do mRNA do receptor β2 adrenérgico. É interessante comentar que estudos realizados com tecido adiposo subcutâneo de humanos mostraram que o conteúdo do receptor β2 adrenérgico aumentou significativamente no hipertireoidismo (VIGUERIE et al.,2002). Em outros estudos, também em adipócitos humanos, o T3 aumentou o conteúdo de mRNA do receptor beta 2 adrenérgico e da proteína, sem nenhuma alteração do receptor beta 1 (HELLSTROM et al.,1997). Vale comentar que não temos, ainda, os dados da expressão protéica do receptor β2 adrenérgico e que nossos estudos foram realizados em tecido adiposo periepididimal de ratos. É possível que haja variações da expressão desses receptores, ou mesmo das outras proteínas aqui estudadas, dependendo da origem do tecido e da espécie animal, sendo desejável que avaliemos a expressão de outros subtipos de receptores β adrenérgicos em tecidos adiposos de diferentes origens.

Embora os efeitos da administração de T3 sobre a indução da expressão desses diferentes subtipos de receptores adrenérgicos não estejam claros, os realizados em

roedores mostram que no hipotireoidismo há redução da expressão do mRNA do receptor adrenérgico β1 e β3. Nossos estudos indicam que o mesmo ocorre com os receptores β2, o que ainda não havia sido mostrado na literatura.

Embora pareça conflitante o fato da expressão dos receptores β2 adrenérgicos estar reduzida no hipotireoidismo e mais ainda com o tratamento crônico com T3, vale lembrar que há evidências de que alterações no estado tireoidiano modificam a sinalização adrenérgica nos adipócitos por mecanismos pós-receptores (MALBON; RAPIEJKO; WATKINS.,1988). É possível que no hipertireoidismo, em paralelo à facilitação de vias de sinalização por mecanismos pós-receptores favorecendo a lipólise, ocorra alguma sinalização para que se reduza a expressão dos genes envolvidos nesse processo, como uma resposta homeostática, o que merece ser investigado. Ainda, não se pode descartar que a indução do estado hipertireoideo, após o hipotireoidismo, possa incrementar a tradução dos mRNAs alvos deste estudo. Assim, faz-se necessária a avaliação da expressão protéica numa próxima etapa do estudo.

Como já foi explicitado, o aumento da resposta às catecolaminas induzido pelos HT promove o aumento da lipólise, por aumentar a atividade da LHS. Esse efeito não se reproduz com a expressão do mRNA da LHS, a qual apresentou-se mais reduzida ainda que no hipotireoidismo, quando os animais foram tratados por 5 dias com T3. Esse padrão de resposta ocorreu com todos os genes estudados, excetuando a perilipina, cuja expressão do mRNA não sofreu alteração no hipotireoidismo, mas foi reduzida com o hipertireoidismo.

Os dados demonstram que houve uma diminuição da Perilipina (não significativa) e ATGL (significativa) no estado hipotireoideo, assim levando ao comprometimento da lipólise, pois a perilipina quando fosforilada libera um coativador chamado CGI-58 que aparentemente ativa ATGL que por sua vez hidroliza o triacilglicerol (LAFONTAN, 2009). Na literatura ainda não foi encontrado nada a respeito da ação dos hormônios tireoidianos sobre estas proteínas.

Quando ratos hipotireoideos foram tratados agudamente com o T3, também não observamos variações no conteúdo do mRNA nos tempos estudados, que variaram de 30 min a 24 h. Apenas o conteúdo do mRNA da receptor β2 adrenérgico sofreu redução significativa após administração aguda do T3, nos diferentes períodos de tempo estudados; as alteração observadas nos dois primeiros períodos de tempo sugerem que ações não genômicas possam estar sendo desencadeadas pelo hormônio, tempos em que a avaliação do conteúdo protéico deste subtipo de receptor merece ser realizada.

Nossos estudos em células 3T3L1 corroboram os resultados obtidos com os experimentos in vivo no estado hipotireoideo, uma vez que a depleção do HT provocou uma redução significativa no conteúdo de mRNA de LHS, ATGL e Receptores Beta 2 adrenérgico. No entanto a administração aguda de T3 não apresentou a mesma resposta em alguns transcritos dos experimentos in vivo.

Os conteúdos de mRNAs da LHS e ATGL apresentaram-se significativamente aumentados nos estudos in vitro em 30min, utilizando-se as doses de 10^{-9} e 10^{-8} M, sub-fisiológica e fisiológica de T3, respectivamente. Para avaliar se as ações do T3 evidenciadas eram genômicas, investigamos se o aumento no conteúdo dos mRNAs de LHS e ATGL, observado nas células 3T3-L1 30 min após a administração T3, se

mantinha mesmo na presença da actinomicina D, um potente inibidor da transcrição gênica. Observou-se que a actinomicina D preveniu a ação do T3 (figura 29 e 30), o que não ocorreu no conteúdo das proteínas totais. Este fato provavelmente se deve a algum mecanismo da célula que preveniu a degradação proteica na presença do antibiótico.

Observamos também que quando as células 3T3-L1 foram tratadas previamente com cycloheximide, um forte inibidor da tradução, e submetidas a T3 por 30 min, o conteúdo de ambas as proteínas (LHS e ATGL) também não foi alterado em relação ao Tx. É possível que o T3 tenha promovido um aumento da estabilidade e da meia vida desta proteína, o que explicaria o conteúdo total de ATGL e LHS não ter sofrido alterações, mesmo na presença de cycloheximide, ou ainda que essa inibição da tradução tenha ocorrido em tempo insuficiente para que alterações no conteúdo de proteínas possam ter sido evidenciadas. Quanto ao mRNA de receptores beta 2 adrenérgico nos estudos in vitro, a ação envolvida no aumento da expressão deste gene provavelmente é genômica, pois ocorre somente no tempo de 24h. Este efeito já foi descrito anteriormente na literatura com cultura de adipócitos humanos (VIGUERIE et al.,2002).

7 CONCLUSÃO

O panorama dos dados aqui apresentados indica que o HT regula de alguma forma a expressão dos genes das proteínas envolvidas na lipólise. Fica mais evidente essa ação fisiológica reguladora da lipólise, quando se observam os dados obtidos nos animais hipotireóideos e nas células depletadas de hormônios tireoidianos (hipotireoidismo), os quais nos mostram claramente uma redução da expressão das proteínas estudadas neste trabalho. Quanto aos efeitos crônicos do T3 sobre a expressão dessas proteínas, ainda há estudos a serem desenvolvidos, uma vez que nessa condição, ocorreu elevação apenas da expressão da LHS, enquanto o conteúdo de ATGL se elevou ao nível do controle. Essas proteínas são de fundamental importância para a indução da lipólise, de modo que esses dados são indicativos de que os HT induzem lipólise, também por atuarem na expressão dessas proteínas, e não só pelo efeito permissivo que exercem sobre a expressão de receptores beta adrenérgicos. Todavia estudos posteriores deverão ser realizados para melhor esclarecimento desses efeitos e dos mecanismos que os desencadeiam.

REFERÊNCIAS*

ALONSO-VALE, M. I. C. et al. Melatonin enhances leptin expression by rat adipocytes in the presence of insulin. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** v288, p. E805-E812, 2005.

ARVIDSSON, L. BLOMQVIST & M. RYDÉN. Depot-specific differences in perilipin mRNA but not protein expression in obesity. Journal of Internal Medicine. V.255, p595–601, 2004.

DAVIS, J. P.; LEONARD, J.L.; DAVIS, F.B. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. **Front. Neuroendocrinol**. v.16, p. 429-435, 2008.

DEGERMANE.; BELFRAGE P.; MANGANIELLO, V. C. Structure, localization, and regulation of cGMP-inhibited phosphodiesterase (PDE3). **J. Biol. Chem.** v.272, p.6823–26, 1997.

DIGIROLAMO, M.; MEDLINGER, S.; FERTIG, J. W. A simple method to determine cell size and number in four mammalian species. **Am. J. Physiol.** v221, p850-8, 1971.

DUNCAN, R. E. et al. Regulation of lipolysis in adipocytes. ***Annu. Rev. Nutr***. v27, p.79–101, 2007.

ELKS M. L, MANGANIELLO V C. Effects of thyroid hormone on regulation of lipolysis and adenosine 3_,5_-monophosphate content and phosphodiesterase activities. **Endocrinology.** v.117, 947 -53, 1985.

ENGFELDT, P. et al. Phosphodiesterase activity in human adipose tissue in hyper- and hypothyroidism. **J. Clin. Endocrinol. Metab. v**54, p.625-9, 1982.

FAIN, J. N. et al. Stimulation of human omental adipose tissue lipolysis by growth hormone plus dexamethasone. **Molecular and Cellular Endocrinol,** v295, p.101-5,2008.

FARWELL.A. P. et al.Dynamic nongenomic actions of thyroid hormone in the developing rat brain. **Endocrinology,** v147, p.2567-2574, 2006.

FONDELL J. D. et al. 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 TFllD. **Proc. Nat. Acad. Sci**. *USA*, v96 p1959-64, 1999.

GJEDDE, S. et al. Decreased lipid lntermediate levels and lipid oxidation rates despite normal lipolysis in patients with hypothyroidism. **Thyroid**, v20, p.843-849, 2010**.**

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

HELLSTROM L. et al. Catecholamineinduced adipocyte lipolysis in human hyperthyroidism. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v82, p 159–66,1997.

JEPSEN, K.; ROSENFELD M.G. Biological roles and mechanistic actions of corepressor complexes. **J. Cell Sci.** v115, 689-98, 2002.

KLEIN, I.; DANZI, S. Thyroid disease and the heart. **Circulation,** v. 116, p. 1725-35, 2007.

LAFONTAN, M.; BERLAN, M. Fat cell alpha 2-adrenoceptors: the regulation of fat cell function and lipolysis. **Endocr, Rev,** v16, p716–38,1995.

LAFONTAN, M. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. **Progr Lipid Res**. v48, p275–297. 2009.

MALBON, C. C.; RAPIEJKO, P. J. ; WATKINS, D. C. Permissive hormone regulation of hormone-sensitive efector systems. **Trends p Harmacol. Sci**., v.9, p. 3336, 1988.

MEZOSI, E. et al.Nongenomic effect of thyroid hormone on free-radical production in human polymorphonuclear leukocytes. J. **Endocrinol**. V. 185, p. 121-129, 2005.

NUNES, MT. Thyroid hormones: mechanism of action and biological significance. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v47, p.639-643, 2003.

PUCCI, E., CHIOVATO, L., PINCHERA, A. Thyroid and lipid metabolism. **Int. J. Obes**, Suppl 2:S109-12. 2000.

RODBELL, M. Metabolism of isolated fat cells. Effects of hormones on glucose metabolism and lipids. **J. Biol. Chem.** v239, p.357–380, 1964.

SAMUELS, H. H.; STANLEY, F.; CASANOVA, J. Depletion of L-3,5,3min- triiodothyronine and L-thyroxine in euthyroid calf serum for use in cell culture studies of the action of thyroid hormone. **Endocrinology**, v. 105, p. 80-85, 1979.

SCHOENBOR, V. et al. The *ATGL* gene is associated with free fatty acids, triglycerides, and type 2 Diabetes. **Diabetes**, v.55. p.1270-5.2006.

THISSEN, J. P.; PUCILOWSKA, J. B.; UNDERWOOD, L. E. Eifferential regulation of insuline-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding protein-1 messenger ribonucleic acid by amino acid availability and growth hormone in rat hepatocyte primary culture. **Encocrinology**, v134,1570-1576 1994.

VIGUERIE, N. et al. Regulation of human adipocytes gene expression by thyroid hormone. **The J. Clin Endocrinol . Metab**., v.87 p630-40, 2002.

VIGUERIE, N. et al. Effect of thyroid hormone on gene expression. **Curr Opin Clin Nutr Metab. Care** v6, p377–381, 2003.

VOLPATO, C. B. et al.Thyroid hormone modulates the polyadenylation of growth hormone mRNA in rats. **Endocr.J.** v. 47, p. 169, 2000.

ZIMMERMAN, R. et al. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. **Science**, v.306, p.1383-1386, 2004.