ANDRESSA HARUMI TORELLI HIJO

**Estudo das ações dos hormônios tireoidianos na morfologia da
parede intestinal e no conteúdo dos transportadores dos produtos
de hidrólise dos macronutrientes no epitélio intestinal de
camundongos**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Fisiologia e
Biofísica do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de mestre
em Ciências, área de concentração
Fisiologia Humana.

São Paulo

2019

ANDRESSA HARUMI TORELLI HIJO

**Estudo das ações dos hormônios tireoidianos na morfologia da
parede intestinal e no conteúdo dos transportadores dos produtos
de hidrólise dos macronutrientes no epitélio intestinal de
camundongos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências, área de concentração Fisiologia Humana.

Laboratório de fisiologia da barreira intestinal.

Orientador: Prof. Dr. Francemilson Goulart da Silva.

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

2019

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Torelli HIJO, ANDRESSA HARUMI

Estudo das ações dos hormônios tireoidianos na morfologia da parede intestinal e no conteúdo dos transportadores dos produtos de hidrólise dos macronutrientes no epitélio intestinal de camundongos / ANDRESSA HARUMI Torelli HIJO; orientador Francemilson Goulart da Silva. -- São Paulo, 2019.

57 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Impacto hormônio tireoidiano nas proteínas transportadoras. I. Goulart da Silva, Francemilson, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Andressa Harumi Torelli Hijo

Titulo da Dissertação: Estudo das ações dos hormônios tireoidianos na morfologia da parede intestinal e no conteúdo dos transportadores dos produtos de hidrólise dos macronutrientes no epitélio intestinal de camundongos

Orientador: Francemilson Goulart da Silva

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão publica realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Dedicatória

Dedico ao meu pai, que eu sei o quanto ele foi o melhor que ele pode ser e que até mesmo se sacrificou para dar sempre o melhor estudo para mim e para os meus irmãos.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Fran, que me orientou em cada detalhe e me ensinou muito mais do que a vida acadêmica. Foi um exemplo de pessoa que eu pude conhecer na área acadêmica e da vida.

Ao meu pai, que celebrou como ninguém este meu caminhar.

À toda a minha família.

À Tati, que me ajudou nessa jornada.

À Paula, que me ensinou muito mais do que as técnicas.

Financiamentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq) - (Número do processo: 132453/2017-7).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Parecer da Comissão de Ética animal

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Avaliação do impacto dos hormônios tireoidianos na morfologia da parede intestinal e nos mecanismos de transporte de macronutrientes em roedores.*", registrado sob o protocolo nº **28/2017**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **14/03/2017** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Francemilson Goulart da Silva**

- Departamento: *Fisiologia e Biofísica*

- Membros da Equipe: *Andressa Harumi Torelli Hijo (Pós-graduando)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Evaluation of the impact of thyroid hormones on the morphology of intestinal wall and macronutrient transport mechanisms in rodents*", protocol nº **28/2017**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **3/14/2017** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Francemilson Goulart da Silva**

- Team members: *Andressa Harumi Torelli Hijo (Graduate Student)*.

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Rattus norvegicus</i>	Wistar	Macho/male	75 dias/days	60
<i>Mus musculus</i>	C57BL/6	Macho/male	75 dias/days	51

São Paulo, 21 de março de 2017.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento
Secretário CEUA-ICB/USP

RESUMO

Hijo, AT. **Estudo das ações dos hormônios tireoidianos na morfologia da parede intestinal e no conteúdo dos transportadores dos produtos de hidrólise dos macronutrientes no epitélio intestinal de camundongos**. 2019. 55 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Os hormônios tireoidianos (HTs) são potentes reguladores do metabolismo dos nutrientes e, consequentemente, do balanço energético. O intestino delgado é o local de acesso dos nutrientes ao organismo, processo mediado por transportadores presentes na membrana apical dos enterócitos. O intestino possui receptores para os HTs e é sabido que esses hormônios estimulam a captação intestinal de glicose, porém o mecanismo responsável por essa captação ainda não está claro. Similarmente, ainda há poucas informações sobre o efeito dos HTs na captação dos peptídeos e dos lipídios da dieta. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi investigar o efeito do hipo e do hipertireoidismo na parede do intestino e na expressão dos transportadores de carboidratos, lipídios e proteínas no epitélio intestinal. Foram utilizados camundongos C57BL/6, machos, adultos, distribuídos em três grupos experimentais: controle (salina/veículo), hipotireoideo (PTU) e hipertireoideo (T3). Após 30 dias de tratamento com salina, PTU ou T3, os animais foram submetidos à eutanásia, e, na sequência, o intestino delgado foi removido e o sangue coletado para dosagem de lipídios. Em relação ao intestino, parte foi utilizada para análise histológica (vilos/criptas) e a outra parte foi utilizada para análise da expressão do SGLT1, GLUT2, GLUT5, PEPT1, NHE3, FATP4, CD36/SR-B2, NPC1L1, MTTP e L-FABP. Para esta análise o epitélio intestinal foi separado da mucosa e o mesmo foi homogeneizado em tampão adequado ou para RNAm ou para proteína. Os métodos empregados foram western blotting para análise da expressão proteica e PCR em tempo real para análise do conteúdo do RNAm. Em relação aos resultados obtidos, observamos que o hipertireoidismo aumentou o conteúdo proteico do GLUT2 e do CD36/SR-B2, mas não alterou as demais proteínas. O hipotireoidismo não modificou o conteúdo das proteínas avaliadas. Considerando que o T3 aumentou o conteúdo do GLUT2 e do CD36/SR-B2, avaliamos o conteúdo dos transcritos que codificam essas duas proteínas e observamos uma redução na expressão do mRNA do *Cd36* (CD36/SR-B2) pelo T3, enquanto que o conteúdo do mRNA do *Slc2a2* (GLUT2) não foi alterado. Considerando que o CD36/SR-B2 participa da captação dos lipídios e que o seu conteúdo aumentou após o tratamento com T3, avaliamos o triacilglicerol (TAG) e colesterol na circulação, mas não observamos alteração no TAG, enquanto que o colesterol sérico reduziu após o tratamento com T3, descartando um possível aumento da captação dos lipídios secundário ao aumento do CD36/SR-B2. O hipo ou hipertireoidismo não afetaram a altura dos vilos ou profundidade das criptas. Concluímos que o T3 aumenta o conteúdo do GLUT2 e do CD36/SR-B2 e que, aparentemente, esse efeito não tem relação com a regulação da expressão dos seus mRNAs ou com a altura dos vilos ou profundidade das criptas. Em relação ao GLUT2, é possível que esse efeito favoreça uma maior captação de glicose, pois há relatos de que o T3 estimula esse processo, condição que aumenta o aporte de substratos energéticos para o organismo, o que é relevante no hipertireoidismo, condição caracterizada por alta demanda metabólica.

Palavras-chave: Hipotireoidismo, hipertireoidismo, intestino, nutrientes, lipidemia e expressão gênica.

ABSTRACT

Hijo, AT. **Thyroid hormones actions on intestinal wall morphology and on the transporters content of macronutrient hydrolyzed products in the small intestine of mice.** 2019. 55 p. Master degree in human physiology – Institute of Biomedical Science, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2019.

Thyroid hormones (THs) are important regulators for the energy metabolism and, consequently, energy balance. Through the small intestine the nutrients access the organism by a process that could be regulated by THs, since small and large intestines express THs receptors. It is known that the THs stimulate the intestinal glucose uptake and modulate the peptide and lipid uptake, however the mechanism underlying these actions remains unclear and requires further investigation. Thus, the present study aimed to investigate the impact of hypo and hyperthyroidism on the intestinal wall investigating the content of carbohydrate, lipid and protein transporters. For this, adult mice (C57BL/6) were distributed in three experimental groups: control (vehicle/saline), hypothyroid (propylthiouracil/PTU) and hyperthyroid (triiodothyronine/T3). After 30 days of treatment with saline, PTU or T3, the animals were euthanized, and then the small intestine was removed and the blood was collected for lipid measurement. Regarding the intestine, part was used for histological analysis (villi/crypts) and the other part was used for the analysis of expression of SGLT1, GLUT2, GLUT5, PEPT1, NHE3, FATP4, CD36/SR-B2, NPC1L1, MTP and L-FABP. For this analysis, the intestinal epithelium was separated from the mucosa and homogenized in a suitable buffer for either mRNA or protein. The methods used were western blotting for protein expression analysis and real time PCR for mRNA content analysis. Our results showed that T3 only increased the protein content of GLUT2 and CD36/SR-B2, while the other protein transporters were not altered. Hypothyroidism did not modify the content of the evaluated proteins. Since hyperthyroidism increased GLUT2 and CD36/SR-B2 content, the mRNA content of the transcripts that encode these two proteins was evaluated by real-time PCR. Hyperthyroidism decreased *Cd36* mRNA (CD36/SR-B2) expression, while the content of *Slc2a2* mRNA (GLUT2) was not altered. Considering that the increase of CD36/SR-B2 may lead to high serum TAG and cholesterol concentration, we evaluated this hypothesis. No changes were observed in circulating TAG, whereas serum cholesterol decreased after T3 treatment, excluding the possibility of increasing of lipids absorption induced by T3. Hypo- or hyperthyroidism-induced did not modify neither the villi height or crypts depth. We conclude that T3 increases the protein content of GLUT2 and CD36/SR-B2, without alter their mRNA contents, and does not alter the villi height and crypts depth. Regarding the GLUT2, it is possible that this effect underlies the increased glucose uptake stimulated by T3, raising the supply of energetic substrates to the organism, which is important in hyperthyroidism, a condition characterized by high metabolic demand.

Keyword: Hypothyroidism, hyperthyroidism, nutrients, lipidemia and gene expression.

Lista de Abreviaturas e Siglas

AGs: Ácidos graxos

ATP: Trifosfato de adenosina

C57BL/6: Linhagem de camundongo (C57Black/6)

CD36/SR-B2: Cluster of differentiation 36 / a scavenger receptor class B protein (Aglomerado de diferenciação 36 / proteína classe B do receptor)

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação animal

D1: Desiodase tipo 1

D2: Desiodase tipo 2

D3: Desiodase tipo 3

DEPC: dicarbonato de dietila

dNTPs: Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

DTT: Ditionitrito

ECL: Quimioluminescência

EDTA: Ácido etilenodiamino-tetra-acético

FATP-4: Fatty acid transporter – 4 (Transportador de ácidos graxos – 4)

Fig: Figura

Gapdh: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase mRNA (RNAm de 3-fosfato desidrogenase de gliceraldeído)

GLUT2: Glucose transporter 2 (Transportador de glicose2)

GLUT5: Glucose transporter 5 (Transportador de glicose 5)

HE: Hematoxilina eosina

HTs: Hormônios tireoidianos

ICB: Instituto de Ciências Biomédicas

L-FABP: Liver fatty acid-binding protein (Proteína de ligação a ácidos graxos do fígado)

ML: Membrana luminal

MBL: Membrana basolateral

mRNA: RNA mensageiro

MTTP: Microsomal triglyceride transfer protein (Proteína de transferência de triglicerídeos microssômicos)

NHE3: Na⁺/H⁺ Exchanger 3 (Trocador Na⁺/H⁺ 3)

NPC1L1: Niemann-Pick C1-Like 1

PC: Peso Corporal

PEPT1: Peptide transporter 1 (Transportador de peptídeo 1)

pH: Potencial hidrogeniônico

PTU: Propiltiouracil

RNA: Ácido ribonucleico

RPM: Rotações por minuto

SGI: Sistema gastrointestinal

SGLT1: Sodium/glucose cotransporter member 1 (Cotransportador de Sódio e Glicose 1)

Slc2a2: Solute Carrier Family 2 Member 2 mRNA (Solute portador Família 2 Membro 2 RNAm)

Cd36: Cluster of differentiation 36 mRNA (Aglomerado de diferenciação 36 RNAm)

SNC: Sistema nervoso central

T3: Triiodotironina

T4: Tiroxina

TA: Temperatura ambiente

TAG: Triacilglicerol

TGI: Trato gastrointestinal

TRH: Hormônio liberador de tireotrofina

TSH: Hormônio tireoestimulante

***Tshb*:** Thyroid stimulating hormone beta mRNA

UCPs: Proteínas desacopladoras da cadeia respiratória

USP: Universidade de São Paulo

Lista de Figuras

Fig. 1: Transportadores de carboidratos no intestino delgado

Fig. 2: Transportadores de peptídeos no intestino delgado

Fig. 3: Transportadores de lipídios no intestino delgado

Fig. 4: O eixo hipotálamo-hipófise-tireoide. Clássico mecanismo de controle da produção hormonal por *feedback* negativo.

Fig. 5: fotomicrografia do epitélio intestinal de camundongos – coloração por H&E.

Fig. 6: Análise do comprimento/altura dos vilos e da profundidade das criptas de camundongos tratados com salina, T3 ou PTU por 30 dias.

Fig. 7: Conteúdo proteico da α -actinina, γ -tubulina e GAPDH no epitélio do intestino delgado de camundongos tratados com salina (C), T3 e PTU por 30 dias.

Fig. 8 Conteúdo proteico dos transportadores de carboidratos (SGLT1, GLUT2, GLUT5) no epitélio do intestino delgado de camundongos tratados com salina (C), T3 e PTU por 30 dias.

Fig. 9: Conteúdo proteico do PEPT1 e NHE3 no epitélio do intestino delgado de camundongos tratados com salina (C), T3 e PTU por 30 dias.

Fig. 10: Conteúdo proteico dos transportadores de lipídios no epitélio do intestino delgado de camundongos tratados com salina (C), T3 e PTU por 30 dias.

Fig. 11: Expressão gênica do mRNA do *Slc2a2* e do mRNA do *Cd36* no epitélio intestinal de camundongos tratados com salina (C), T3 e PTU por 30 dias.

Fig. 12: Esquema representativo de um enterócito em meio hipertireoideo.

Lista de Tabela

Tabela 01: Relação e informações dos *primers* utilizados (Nome, número do gene bank, primer e a sequência do primer 5'-3').

Tabela 02: Parâmetros morfométricos e expressão gênica do *Tshb* dos camundongos controles/eutireoideos, hipertireoideos e hipotireoideos.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Alimentação	14
1.2 Sistema Gastrointestinal	
1.3 Intestino	14
1.4 Digestão e Absorção	15
1.5 Tireoide e Hormônios Tireoidianos	19
1.6 Disfunção da Tireoide	20
1.7 TGI e HTs	22
2 JUSTIFICATIVA	23
3 OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo geral	23
3.2 Objetivos específicos	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Animais e tratamentos	24
4.2 Preparo do intestino e isolamento do epitélio absorptivo	24
4.3 Análise histológica	24
4.4 Extração de proteínas e Western blotting	24
4.5 Extração de RNA e PCR em tempo real	27
4.6 Concentração de Triglicérides e Colesterol Total	29
4.7 Análise estatística	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1 Parâmetros morfométricos e análise da expressão gênica do <i>Tshb</i>	30
5.2 Impacto do tratamento com T3 e PTU na histologia do epitélio intestinal	31
5.3 Análise das possíveis proteínas constitutivas para o nosso modelo experimental	33
5.4 Impacto do tratamento com PTU e T3 no conteúdo dos transportadores de carboidratos (SGLT1, GLUT2 e GLUT5), peptídeos (PEPT1), lipídios (CD36/SR-B2, NPC1L1, FATP4, MTP e L-FABP) e do trocador Sódio/Hidrogênio 3 (NHE3)	35
5.4.1 Transportadores de carboidratos (SGLT1, GLUT2 e GLUT5)	35
5.4.2 Transportadores de peptídeos (PEPT1) e trocador sódio/hidrogênio (NHE3)	37
5.4.3 Análise do conteúdo dos transportadores de lipídios (CD36/SR-B2, NPC1L1, FATP4, MTP e L-FABP) no epitélio intestinal e mensuração da concentração sérica dos TAGs e colesterol após indução do hipotireoidismo e hipertireoidismo	39
5.5 Impacto do tratamento com T3 na expressão gênica do <i>Slc2a2</i> e <i>Cd36</i>	42
CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	45
ANEXOS	50

1 INTRODUÇÃO

1.1 Alimentação

O ato de se alimentar é uma condição essencial à vida, pois é através da alimentação que os nutrientes são ingeridos, digeridos e absorvidos. Isso permite que os produtos da hidrólise dos macronutrientes sejam incorporados e metabolizados pelo organismo para produção de energia na forma de trifosfato de adenosina (ATP), condição necessária para a manutenção da homeostase e para o funcionamento celular. Uma dieta equilibrada contém uma proporção de aproximadamente 50-60% de carboidratos, 15-20% de proteínas e 25-30% de lipídios (FREEDMAN; KING; KENNEDY, 2001).

1.2 Sistema Gastrointestinal

O sistema gastrointestinal (SGI) ou trato gastrointestinal (TGI) tem início na cavidade oral, seguido pela faringe, esôfago, estômago, intestino delgado, intestino grosso e também por glândulas, tais como as glândulas salivares, glândulas gástricas (na parede interna do estômago), glândulas intestinais (na parede interna do intestino delgado), pâncreas e fígado. A função do TGI é digerir os alimentos, absorver os nutrientes e água e excretar o que não foi digerido e/ou absorvido (PERDUE; MCKAY, 1994). Além disso, por possuir órgãos linfoides distribuídos na sua parede, o TGI também protege o organismo de eventuais patógenos que possam invadir a sua parede (WILLIAMS et al., 2015).

1.3 Intestino

Conforme mencionado no item anterior, uma das funções do TGI é absorver os nutrientes digeridos e a principal porção do TGI responsável pela absorção dos nutrientes é o intestino delgado. Anatomicamente, ele é representado por um tubo longo, com cerca de 6 m e é dividido em três regiões: duodeno (25 cm), jejuno (2,5 m) e íleo (3,5 m) – valores descritos para os humanos (HAW; CORMACK, 1983). É neste tubo que a digestão é finalizada e é também neste segmento que ocorre a absorção dos nutrientes orgânicos, eletrólitos e água.

O intestino contém diversos tipos celulares, como os enterócitos (células absorptivas), as células caliciformes (produtoras de glicoproteínas, que compõem o muco que lubrifica a luz intestinal), as células enteroendócrinas (as quais secretam hormônios peptídicos), as células de Paneth (produção de fatores antimicrobianos), as células M (resposta imune) as células do sistema imune e as células-tronco presentes nas criptas, que se diferenciam em

vários tipos celulares e que se deslocam em direção ao topo do vilos, renovando o epitélio intestinal, em média, a cada cinco dias (MCKAY, 2005; VAN DER FLIER; CLEVERS, 2009).

As células absortivas superficiais contêm transportadores específicos na sua membrana plasmática para os diferentes nutrientes consumidos. Esses transportadores são expressos a partir de um RNA mensageiro (mRNA), como por exemplo o mRNA *Slc2a2* que codifica o GLUT2, que é uma proteína que transporta glicose, galactose e frutose, e o mRNA *Cd36* que codifica o transportador FAT/CD36 (*fatty acid transporter/cluster of differentiation 36*) ou CD36/SR-B2 (*cluster of differentiation 36/a scavenger receptor class B protein*), que é um transportador de ácido graxo de cadeia longa.

1.4 Digestão e Absorção

Conforme descrito por Sanioto S.M.L., in: Fisiologia de Margarida de Melo Aires (2012, p.956), os alimentos, ao adentrarem a boca, começam a ser digeridos pelo processo mecânico (mastigação) e químico (enzimático). Em relação ao processo enzimático, na saliva, encontramos a α -amilase, que ao se misturar com o alimento, inicia o processo de digestão dos carboidratos, processo que se estende até o estômago. Por ocasião da mistura do bolo alimentar com o suco gástrico, cessa a digestão dos carboidratos, pois a α -amilase é inativada por desnaturação proteica. Quando ocorre a mistura do bolo alimentar com o suco gástrico, o quimo é formado e nesse instante começa a digestão enzimática das proteínas e dos lipídios. O quimo segue para o intestino delgado, e é misturado com a bile e suco pancreático, que atua como emulsificante dos lipídios, favorecendo a ação das lipases pancreáticas secretadas na luz do intestino. Considerando que o pH alcalino favorece a atividade das enzimas digestivas, convém salientar que a acidez do quimo é previamente neutralizada pelo bicarbonato secretado nos sucos pancreáticos e biliar. Na luz do intestino e na borda em escova dos enterócitos, existem várias enzimas que finalizam a digestão dos carboidratos e das proteínas. Assim, os produtos de hidrólise dos macronutrientes são incorporados pelo organismo, o qual se dá principalmente por meio de transportadores específicos presentes no epitélio absortivo do TGI (DESESSO; JACOBSON, 2001). Os detalhes dos processos de digestão dos carboidratos, proteínas e lipídios são apresentados nas seções seguintes.

Carboidratos

A digestão dos carboidratos mais complexos é feita principalmente pela α -amilase salivar e pancreática, as quais hidrolisam o amido/glicogênio em maltose, maltotriose e

dextrina. A maltose, maltotriose e dextrina são digeridas em glicose pelas enzimas maltase, sacarase e dextrinase, respectivamente, presentes na borda em escova dos enterócitos. A lactose é quebrada pela lactase, gerando glicose e galactose, enquanto a sacarose é quebrada pela sacarase, gerando glicose e frutose (AIRES, 2002).

Em relação à absorção, os carboidratos hidrolisados à glicose e galactose deixam o compartimento luminal do intestino para o interior da célula absorviva por meio do cotransporte com o sódio através do SGLT1 (*sodium/glucose cotransporter member 1*), enquanto que a frutose é captada por difusão facilitada pelo GLUT5 (*glucose transporter 5*). A extrusão dessas moléculas para o interstício-vascular é feita, principalmente, por difusão facilitada através do GLUT2 (*glucose transporter 2*), presente na membrana basolateral do enterócito (TAKATA, 1996). Adicionalmente, o aumento da concentração de glicose no interior dos enterócitos promove a translocação do GLUT2 para a membrana apical dos enterócitos, otimizando a absorção dos carboidratos – conforme é demonstrado na figura 1 (KELLETT, 2001; KELLETT; BROT-LAROCHE, 2005).

Fig. 1: Transportadores de carboidratos no intestino delgado: Esquema aponta os transportadores de carboidratos e a regulação do transportador de glicose tipo 2 (GLUT2) secundário ao aumento intracelular de glicose no enterócito no período pós-prandial. O aumento intracelular de glicose provoca aumento do conteúdo do GLUT2 na membrana apical, processo que otimiza a absorção de glicose (KELLETT; EDITH, BROT-LAROCHE, 2005).

Estudos demonstram que há três vezes mais GLUT2 do que SGLT1 nos enterócitos, o que aponta para a relevância do GLUT2 na absorção dos carboidratos ingeridos (KELLETT; HELLIWELL, 2000), principalmente porque existem relatos de que o GLUT2 é um dos principais e mais abundantes transportadores de glicose na membrana apical, sendo assim, sua

ausência pode comprometer a absorção dos carboidratos (KELLETT; HELLIWELL, 2000). Por outro lado, existem estudos que apontam que a mutação do GLUT2 não afeta a absorção de glicose, mas que a mutação do SGLT1 afeta (WRIGHT; MARTÍN; TURK, 2003). Portanto, são necessários mais estudos para elucidar a importância do SGLT1 e do GLUT2 na captação da glicose.

Proteínas

As proteínas são hidrolisadas, inicialmente, pelas pepsinas presentes no estômago, as quais se tornam ativas em pH ácido secundário a secreção do ácido clorídrico pelas células parietais. No intestino delgado, as proteínas são quebradas pelas enzimas pancreáticas, presentes no suco pancreático, previamente ativadas pela enteropeptidase, e também por peptidases posicionadas na borda em escova dos enterócitos (KIELA; GHISHAN; 2016).

O principal produto da digestão e, consequentemente, da absorção proteica são os dipeptídeos e tripeptídeos (ADIBI; MERCER; 1973), os quais são absorvidos por cotransporte com o hidrogênio, mediado pelo transportador de peptídeos, o PEPT1 (*intestinal peptide transporter 1*) (HU et al., 2014). Entretanto, para garantir o aporte adequado de hidrogênio e sustentar a atividade do PEPT1, a membrana apical dispõe do trocador sódio/hidrogênio (NHE) principalmente do tipo 3 que absorve Na^+ e secreta hidrogênio na camada estacionária de água adjacente à membrana apical do enterócito, conforme demonstrado na figura 2 (GAWENIS et al., 2002). Os poucos aminoácidos gerados na luz do intestino por ação das exopeptidases são captados por vários transportadores organizados em vários sistemas de transporte.

Fig. 2: Transportadores de peptídeos no intestino delgado: Na ilustração acima, observamos que os dipeptídeos e tripeptídeos são captados com H^+ , depois são hidrolisados no compartimento intracelular e saem pela membrana basolateral dos enterócitos através dos transportadores específicos para aminoácidos (WANG et al., 2017).

Depois da captação e entrada nos enterócitos, os di- e tripeptídeos são clivados em aminoácidos pelas peptidases citoplasmáticas e transportados para o interstício através de transportadores específicos presentes na membrana basolateral (KIM; BIRTWHISTLE; KIM, 1972; KIELA; GHISHAN; 2016).

Lipídios

A digestão enzimática dos lipídios começa no estômago e participam dessa ação as lipases ácidas: gástrica e lingual (KIELA; GHISHAN; 2016). Ao adentrar no intestino delgado, essas enzimas são inativadas devido ao pH alcalino do suco pancreático e a digestão enzimática continua no intestino pelas lipases pancreáticas, com auxílio da bile que é uma solução não enzimática que contém sais biliares, os quais emulsificam a gordura e formam micelas, que são importantes para o transporte dos lipídios hidrolisados até a membrana apical dos enterócitos (KIELA; GHISHAN; 2016; MU; HOY; 2004).

O produto de hidrólise dos lipídios é captado pelo enterócito ou por difusão simples ou mediado por transportadores. Quando a concentração de ácidos graxos livres na luz do TGI é maior do que o intracelular predomina a difusão simples e quando a sua concentração no lúmen diminui e se torna igual ou menor do que o meio intracelular, as proteínas transportadoras passam a ter um papel mais importante na absorção dos produtos da hidrólise lipídica (HUSSAIN, 2014). Para os ácidos graxos (AGs), principalmente os de cadeia longa, os transportadores são FATP4 (*Fatty acid transport protein -4*) e CD36/SR-B2, enquanto que para o colesterol o transportador é o NPC1L1 (*Niemann-Pick C1-Like 1*) (ABUMRAD; DAVIDSON, 2012; GLATZ; LUIKEN, 2017). Após a captação dos produtos de hidrólise lipídica (AGs de cadeia longa, 2-monoacilgliceróis, lisofosfolipídios e colesterol), a proteína FABP (*fatty-acid-binding protein*) faz a translocação desses metabólitos lipídicos da membrana plasmática até o retículo endoplasmático (OCKNER; MANNING; 1974). Os lipídios são reesterificados no retículo endoplasmáticos, adicionados a apolipoproteínas, principalmente, apoB48, pela MTTP (*microsomal triglyceride transfer protein*), e então, secretados como quilomícrons (lipoproteínas de muito baixa densidade) ou armazenado como gotas de lipídio citoplasmático, os quais são hidrolisados e secretados mais tarde (KIELA; GHISHAN; 2016; HUSSAIN, 2014).

Há relatos de que o CD36 é importante para a formação e secreção dos quilomícrons e, além de participar da absorção de AGs, ele pode facilitar a absorção do colesterol livre no intestino proximal (NAULI et al., 2006; WERDER et al., 2001). Outro estudo mostrou que camundongos CD36-knock out não apresentaram uma redução de absorção dos AGs, mas sim

uma deficiência na secreção dos triacilgliceróis na linfa e na depuração dos quilomícrons no sangue (DROVER et al.; 2005). De qualquer forma, apesar do CD36 participar da absorção do colesterol, é o NPC1L1 o transportador de colesterol mais conhecido e estudado. O NPC1L1 faz o transporte do colesterol para o interior do enterócito por endocitose (ABUMRAD; DAVIDSON, 2012; GLATZ; LUIKEN, 2017). Uma vez captado, parte do colesterol é reesterificado no retículo endoplasmático do enterócito, empacotados com proteínas para formar os quilomícrons/lipoproteínas, e secretados para o interstício, de onde seguem para a circulação linfática e, depois, para a circulação venosa (HUSSAIN, 2014). Esses mecanismos estão demonstrados na figura 3.

Fig. 3: Transportadores de lipídios no intestino delgado: Ilustração que aponta para os principais transportadores de lipídios (CD36: Cluster of differentiation 36; NPC1L1: Niemann-Pick C1-Like 1 e FATPs Fatty acid transporter), sua captação e envio para o retículo endoplasmático e para o aparelho de Golgi para, então, serem secretados na circulação como quilomícrons (HUSSAIN, 2014).

1.5 Tireoide e Hormônios Tireoidianos

A tireoide é uma glândula importante do corpo e está localizada na porção anterior do pescoço e produz dois principais hormônios tireoidianos (HTs): tiroxina (T4) e triiodotironina (T3), os quais contêm iodo em sua estrutura e, por isso, a carência nutricional do iodo pode ser a causa de uma desordem hormonal. Esses hormônios controlam vários processos biológicos, tais como crescimento, desenvolvimento, diferenciação celular e metabolismo energético (ZHANG; LAZAR; 2000).

A maioria do T4 produzido é convertido periféricamente para T3 através de uma reação enzimática na qual o iodo é removido por desiodação e que envolve a enzima desiodase do tipo I (D1) e essa enzima é encontrada principalmente no fígado, rim, tireóide e hipófise (BIANCO et al., 2002). Essa enzima é bloqueada por uma droga conhecida como propiltiouracil (PTU) utilizado para tratar o hipertireoidismo (GEREBEN et al., 2008). Outras desiodases são: a desiodase do tipo 2 (D2) que catalisa a conversão do T4 para T3 e está presente no SNC, hipófise, entre outros órgãos, e a desiodase do tipo 3 (D3) que catalisa a desiodação do T4 e do T3, resultando na formação de metabólitos com pouca atividade biológica descrita, tais como o T3 reverso (rT3) e a diiodotironina (T2), respectivamente (BIANCO et al., 2002). O PTU também inibe a tireoperoxidase (TPO), inibindo a produção de T4 e T3 (Chopra, 1977).

O mecanismo de ação molecular dos HTs ocorre principalmente pela ligação do T3 com receptores nucleares, cuja interação induz ou inibe a expressão gênica, ou por atuação direta do T3 ou do T4 em vias de sinalização intracelular, assim como pela ligação com receptores de membrana plasmática, por exemplo, a integrina $\alpha V\beta 3$ (SHIBUSAWA; HOLLENBERG; WONDISFORD; 2003; WE; KOENIG; 2000; CODY; DAVIS; DAVIS; 2007).

O eixo hipotálamo-hipófise-tireoide regula a produção dos HTs através do mecanismo de *feedback* negativo que pode ser resumido da seguinte forma: o hipotálamo produz o hormônio liberador da tireotrofina (TRH) que estimula a hipófise a produzir o hormônio estimulante da tireoide (TSH) que, por sua vez, estimula a tireoide a produzir os HTs. Quando há uma alta concentração dos HTs na circulação, o hipotálamo e a hipófise são inibidos e a produção dos HTs diminui. Quando há redução dos HTs na circulação, a inibição desse eixo é diminuída, o que significa um aumento na atividade da glândula tireoide (YUSTA et al., 1998). O excesso ou a escassez dos HTs causam desordens no organismo.

1.6 Disfunções da Tireoide

As desordens tireoidianas são cada vez mais comuns na população, sendo mais frequentes em mulheres e em indivíduos com mais de 40 anos e afetam tanto os tecidos periféricos como o SNC. As doenças autoimunes são as causas mais comuns de transtornos tireoidianos (SCALON; HALL, 1995; LARSEN; INGBAR, 2003). O hipotireoidismo é caracterizado pela carência dos HTs, enquanto o hipertireoidismo, pelo seu excesso.

1.6.1 Hipotireoidismo

O hipotireoidismo é caracterizado pela ineficiência na produção ou da ação biológica dos HTs (SETIAN, 2007) e tem como consequência um retardo nos processos metabólicos, podendo levar a distúrbios cognitivos, mudanças de humor, irritabilidade, psicose, desatenção, comprometimento da memória, percepção prejudicada e constipação (WHYBROW; BAUER, 2000). Contudo, a depressão é o sintoma mais comum e pode vir acompanhada de ansiedade e insônia (WHYBROW; BAUER, 2000).

1.6.2 Hipertireoidismo

No hipertireoidismo, o indivíduo apresenta excesso dos HTs, condição que leva à hiperfagia, mas sem que haja aumento de peso, pois o metabolismo também está acelerado (SZÉKELY M; SZELÉNYI, 2005). Além disso, como os HTs são potentes indutores da termogênese, observa-se aumento da temperatura corporal no hipertireoidismo devido ao aumento das proteínas desacopladoras da cadeia respiratória (UCPs), o que aumenta a demanda pelos substratos energéticos (MARTINEZ DE MENA; SCANLAN; OBREGON, 2010). Os sinais e sintomas relatados pelos pacientes com hipertireoidismo são intolerância ao calor, palpitações, irritabilidade, diarreias (KATHOL; DELAHUNT, 1986; TRZEPACZ ET AL., 1988). O excesso de HTs também induz hipertrofia cardíaca por aumento de proteínas contrateis no coração (DILLMANN, 2010).

Fig. 4: O eixo hipotálamo-hipófise-tireoide. Clássico mecanismo de controle da produção hormonal por *feedback* negativo. O excesso dos hormônios tireoidianos (HT) inibe a secreção do TRH (hormônio liberador de tireotrofina) e do TSH (hormônio estimulante da tireoide) e, consequentemente, a produção dos HTs diminui (SILVERTHORN, 2010).

1.7 TGI e HTs

O TGI expressa receptores nucleares para os HTs, principalmente a isoforma alfa, e, portanto, o TGI é alvo desses hormônios, os quais sabidamente aumentam a motilidade intestinal e a contração do esfíncter de Oddi (HSU; BRENT, 1998; LAUKKARINEN et al., 2002; RAHMAN et al., 1991). Além disso, a deficiência de T3 pode prejudicar o desenvolvimento intestinal dos mamíferos com poucas semanas de vida (HASEBE et al., 2013). Há relatos de que, em camundongos, o receptor tireoidiano α -1 promove a maturação do intestino no estágio de desenvolvimento, assim como induz proliferação de células-tronco intestinais no animal adulto (KRESS; SAMARUT; PLATEROTI, 2009).

Alguns dados disponíveis na literatura apontam que os HTs aumentam a atividade de oligossacaridasas da membrana apical, assim como, da captação de glicose pelo enterócito (SHINDER; RAKHIMOV; USMANOVA, 1995). Em relação à captação de glicose, o T3 estimula a captação de D-glicose por mecanismo sódio-dependente presente na borda em escova do enterócito (BRATUSCH-MARRAIN; GASIĆ; WALDHÄUSL, 1984; DEBIEC; CROSS; PETERLIK, 1989; PRAGER; CROSS; PETERLIK, 1990). Contudo, não se sabe se o T3 regula o conteúdo de SGLT1 ou de GLUT2, duas importantes proteínas no processo de captação de glicose. Há relatos de que o T3 estimula o conteúdo do GLUT2 no fígado, efeito acompanhado de aumento da mobilização hepática de glicose para a circulação (WEINSTEIN et al., 1994), mas sua ação no GLUT2 do intestino precisa ser investigada.

Não existem estudos sobre a cinética de captação da frutose pelos HTs, tampouco se os HTs regulam o conteúdo do transportador de frutose (GLUT5) no intestino de animais adultos. Entretanto, em ratos neonatos durante o processo de desmame, os HTs estimulam a expressão gênica do GLUT5 (MOCHIZUKI; SAKAGUCHI; GODA, 2007), mas ainda há muito que se entender sobre o efeito dos HTs na captação de frutose ou regulação do seu transportador.

Em relação aos demais transportadores de nutrientes, os HTs regulam negativamente o conteúdo do PEPT1 tanto no intestino de ratos quanto em células Caco-2 (ASHIDA et al., 2002, 2004), assim como diminui o conteúdo total do CD36/SR-B2 no músculo esquelético e cardíaco de ratos (HEATHER et al., 2010; LOMBARDI et al., 2012). Ainda não se sabe se os HTs impactam a quantidade e atividade do NHE3 no intestino, porém estudos mostram que o T3 regula positivamente esta proteína no rim de ratos (CANO; BAUM; MOE, 1999).

Já o impacto dos HTs na expressão e nos conteúdos do FATP4 e NPC1L1 permanece desconhecido, apesar de estar bem estabelecido que os HTs são potentes indutores do metabolismo lipídico por ativação da lipólise e redução do colesterol sérico (PUCCI;

CHIOVATO; PINCHERA, 2000).

Deste modo, os dados na literatura sobre a ação dos HTs na regulação dos transportadores de nutrientes são escassos e assim mais estudos são necessários para esclarecer o efeito dos HTs na regulação dos transportadores de nutrientes, os quais são importantes, pois o conteúdo e atividade desses transportadores afetam diretamente o processo de absorção dos nutrientes da dieta.

2 JUSTIFICATIVA

O TGI é uma estrutura alvo dos HTs, porém há poucos estudos sobre como estes hormônios agem nesse segmento. Por essa razão, faz-se necessário estudar o impacto que os HTs exercem na estrutura da parede intestinal, assim como nos mecanismos de transporte dos nutrientes orgânicos, principalmente, devido à forte atuação desses hormônios no metabolismo energético. Salientamos que, atuar na barreira intestinal significa controlar o acesso dos nutrientes ao organismo, o que tem forte repercussão orgânica, haja vista que a rota metabólica desses nutrientes sustenta energeticamente todo o organismo e que os HTs têm participação nos processos metabólicos. Adicionalmente, é cada vez mais comum encontrarmos distúrbios da tireoide na população, o que reforça a relevância de se avaliar o papel dos HTs nesse sistema orgânico, para que possamos compreender o impacto desses distúrbios no TGI e estabelecer estratégias terapêuticas, caso seja necessário.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Considerando que os HTs são potentes reguladores do metabolismo energético, que os distúrbios tireoidianos são muito comuns na sociedade contemporânea, e que sua ação no intestino é pouco explorada, torna-se importante avaliar o impacto desses hormônios no intestino delgado e, entender seu efeito nos mecanismos de absorção, ampliará os conhecimentos de fisiologia endócrina e digestória.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Avaliar o conteúdo proteico dos transportadores de carboidratos (SGLT1, GLUT2, GLUT5), peptídeos (PEPT1) e lipídios (CD36/SR-B2, NPC1L, FATP4, MTP, L-FABP), além do NHE3 frente às disfunções tireoidianas;
- 2- Avaliar o aspecto morfológico da mucosa do TGI, com ênfase na altura dos vilos (compartimento funcional) e profundidade das criptas (compartimento proliferativo);

- 3- Avaliar a expressão dos genes referentes aos transportadores dos nutrientes orgânicos, cujo conteúdo foi alterado pela condição do hipotireoidismo ou hipertireoidismo;
- 4- Avaliar o conteúdo de triacilgliceróis (TAG) e colesterol na circulação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e Tratamentos:

Nossas abordagens experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos no Uso de Animais em Experimentação elaborados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação animal (CONCEA) e os procedimentos com os animais descritos no projeto foram aprovados pela CEUA-ICB (certificado nº 28/2017).

Para este estudo, utilizamos camundongos da linhagem C57BL/6, machos e adultos, adquiridos do Centro de Bioterismo (Faculdade de Medicina, Rede USP de Biotérios), os quais foram mantidos no Biotério de Experimentação do Departamento de Fisiologia e Biofísica, em gaiolas coletivas (5 animais/gaiola) e condições padronizadas de: ciclo claro/escuro de 12 horas (início do ciclo claro: 6:00 da manhã; início do ciclo escuro: 18:00 da tarde), umidade relativa do ar ($55 \pm 15\%$) e temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). A água e a ração comercial (22% proteína, 5% lipídios e 73% de carboidrato) foram oferecidas *ad libitum*.

A partir dos 75 dias de vida, os animais foram distribuídos em três grupos experimentais: controles (salina/veículo), hipotireoideos (Propiltiouracil/PTU: 12,5 mg/Kg peso corporal) e hipertireoideos (Triiodotironina/T3: 0,25µg/g peso corporal) (WANG et al., 2010; TANCEVSKI, et al., 2008; LOSACCO et al., 2018). Os animais receberam salina, PTU ou T3 por via subcutânea na região interescapular, uma vez ao dia, durante 30 dias consecutivos. No final dos tratamentos, os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação sob anestesia (inalação de isoflurano), no período da manhã (8:00 até 12:00), e os seguintes órgãos foram removidos: hipófise para análise da expressão gênica do *Tshb*, coração, gordura perigonadal, tíbia e intestino delgado. O sangue foi coletado para mensuração do colesterol e TAG.

4.2 Preparo do intestino e isolamento do epitélio absorptivo:

Considerando que o jejuno é o local de maior absorção dos nutrientes orgânicos, removemos esse segmento para as análises propostas nos objetivos. Após laparotomia, o intestino foi removido, os cinco centímetros iniciais do intestino proximal a partir da região do piloro foram descartados, e os 10 centímetros (cm) seguintes foram coletados (DESESSO; JACOBSON, 2001). Uma vez removido, o intestino foi colocado em salina gelada (Cloreto de

sódio 0,9%), cortado em pequenos pedaços (< 1 cm), a mucosa foi exposta e o conteúdo luminal removido para o procedimento de isolamento do epitélio intestinal.

O protocolo para separar o epitélio absorptivo da mucosa intestinal foi adaptado de Santos, Curi e Fava-de-Morais (1992) e os detalhes metodológicos estão descritos a seguir. Os pedaços de intestino foram colocados em solução de lavagem (3.2 mM de DTT e 3 mM de azida sódica diluídos em salina) por cinco minutos em temperatura ambiente (TA). Na sequência, a solução de lavagem foi removida e tampão fosfato-salina (PBS) foi adicionado aos intestinos por 20 minutos à 4 °C. No final, os intestinos foram colocados em solução de incubação (0,5 mM de DTT e 1.5 mM de EDTA, sem cálcio e magnésio, diluído- em PBS) e mantidos sob agitação constante (200 rpm) à 37 °C por 1 h (*Orbital Shaker, Thermo Scientific, Modelo 420*). Essa abordagem inicial permite o isolamento do epitélio, pois a solução de incubação contém ditioneitol (DTT), para desnaturar proteínas de matriz extracelular que prendem o epitélio a mucosa, assim como o ácido etilenodiamino-tetraacético (EDTA), quelante do cálcio e magnésio, íons importantes no processo de adesão e estabilidade epitélio-mucosa mediada por proteínas (MILLINGTON; CRITCHLEY; TOVELL, 1966).

No final da agitação, os pedaços de intestino foram descartados e o líquido, contendo o epitélio, foi transferido para dois tubos cônico de 50 mL: um tubo para análise de proteína e outro tubo para análise do RNA. Nos tubos, o líquido foi centrifugado a 2000 rotações por minuto (rpm), por 10 minutos (min) à 4 °C (*Centrifuga Eppendorf, Modelo 5804 R*). O precipitado gerado no final da centrifugação e que corresponde ao epitélio intestinal foi dissolvido em 600 µL de tampão de lise (DALMASSO et al., 2011) - para extração de proteínas totais - ou em 500 µL Trizol® -para extração do RNA total. Os homogenatos foram congelados a -20 °C por 6 h, e, transferidos para o freezer -80 °C, onde permaneceram até o dia do processamento: western blotting e RT-PCR em tempo real. A eficiência de isolamento do epitélio intestinal dos camundongos foi confirmada pela técnica de coloração por HE (imagem abaixo), e esse dado está publicado no periódico Life Sciences (LOSACCO et al., 2018).

4.3 Análise Histológica:

Para esta análise, descartamos os primeiros três centímetros do intestino delgado a partir da região do piloro, e coletamos os dois centímetros seguintes. O intestino foi posicionado e aberto sobre um papel filtro, e colocado em solução de formaldeído 10% por 24h em TA (fixação). No dia seguinte, o material foi colocado em álcool 70% (pós-fixação), e

mantido assim, até o dia do processamento na parafina. O material foi incluído em parafina e cortes de cinco μm /espessura foram feitos em micrótomo (*Leica RM2245*). Os cortes do intestino, sob a lâmina, foram submetidos à técnica de coloração com hematoxilina e eosina (H&E) para análise dos compartimentos funcional (vilos) e proliferativo (criptas). O programa utilizado para medir a altura dos vilos e a profundidade das criptas foi o Image-Pro-Plus 5.1, e a quantidade de vilos e criptas analisados foram 10 e 30, respectivamente, por animal.

Fig. 5: fotomicrografia representativa do epitélio intestinal de camundongo – coloração por H&E. Imagem comprovando a eficiência de isolamento do epitélio intestinal dos camundongos. Epitélio está indicado na figura por uma seta vermelha (LOSACCO et al., 2018).

4.4 Extração de Proteínas e Western blotting:

O homogenato de proteínas foi descongelado e centrifugado a 13.000 rpm por 20 min a 4 °C. O precipitado, gerado no final da centrifugação (*Centrifuga Eppendorf, Modelo 5804 R*), foi descartado e o sobrenadante transferido para outro tubo, devidamente identificado. Para evitar a degradação proteica, o sobrenadante foi fracionado em vários tubos e armazenado a -80 °C. Seguiu-se com a determinação colorimétrica da concentração de proteínas no sobrenadante pelo método descrito por Bradford (1976) em espectrofotômetro (*Epoch™ Microplate Spectrophotometer*), preparo da amostra em solução de Laemmli,

seguido de aquecimento a 37 °C por 30 min em banho-maria.

Concentrações equivalentes de proteínas (90 µg) foram aplicadas em SDS-PAGE (8%), submetida à eletroforese e eletrotransferência (2x de 50 min a 80 Volts). Para localizarmos a banda das proteínas de interesse, nós aplicamos no primeiro poço do gel um padrão contendo proteínas com massa molecular conhecida (*Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder – Thermo Fischer Scientific*). Para confirmar a eficiência da transferência das proteínas do gel para a membrana, esta foi corada com Ponceau S e digitalizadas.

No final da transferência, foi feito bloqueio da membrana com leite em pó desnatado (5%) por 1 hora (h) a TA, seguido de incubação com anticorpo primário específico *overnight*, em agitação. Os anticorpos primários foram diluídos em leite em pó desnatado 2,5%, e as diluições foram feitas de acordo com as orientações do fabricante. Com exceção dos anticorpos contra SGLT1 (Merck Millipore), GLUT5 (GeneTex) e MTTP (LifeSpan BioScience), todos os demais foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology.

Após 12 h, o anticorpo primário foi removido, as membranas lavadas quatro vezes com PBS mais 0,1% Tween 20 (PBST) e submetidas à incubação com anticorpo secundário (1:5000) apropriado por 75 min a TA sob agitação, seguida de quatro lavagens com PBST. A detecção das bandas/*blots* foi feita por quimioluminescência (ECL) em fotodocumentador (*Amersham Imager 600*). A densitometria dos *blots* referentes ao conteúdo das proteínas de interesse foi feita por meio do *Software Image J*, que expressa a densidade dos mesmos em unidades arbitrárias.

4.5 Extração de RNA e PCR em Tempo Real:

A extração do RNA foi realizada de acordo as orientações do fabricante, na seguinte ordem: degelo da amostra, incubação em TA por 5 min para a dissociação do complexo nucleoproteico, adição de clorofórmio, agitação, incubação em TA por 3 min, centrifugação (12.000 g por 15 min a 4°C) para coleta e transferência da fase aquosa superior (com RNA) para outro tubo cônico, adição de álcool isopropílico, incubação em TA por 10 min e centrifugação (12.000 g por 10 min a 4 °C). Nessa etapa, o sobrenadante foi descartado e o precipitado/pellet foi preservado. Em seguida, foi adicionado etanol 75% e as amostras foram novamente centrifugadas (7.500 g por 5 min a 4 °C). No final, o sobrenadante foi descartado e o excesso de etanol removido, utilizando uma centrífuga concentradora de vácuo (*Vaccum Dry*). O precipitado foi dissolvido em água tratada com DEPC (dicarbonato de dietila) e aquecido a 65 °C por 5 min em banho-maria.

A quantificação do RNA foi feita por espectrofotometria utilizando o programa Gen 1.10 e o aparelho *Epoch™ Microplate Spectrophotometer* acoplado ao dispositivo Take3™ Multi-Volume Plate (BioTek, Winooski, VT, USA). Foi utilizada a absorbância de 260 nanômetro (nm) para o cálculo da concentração do RNA e a razão de absorbâncias 260/280 para análise da pureza do RNA. A integridade dos RNAs foi checada por meio de eletroforese de ácidos nucleicos em gel de agarose 1%, e as amostras degradadas foram excluídas do grupo experimental. Consideramos amostras degradadas aquelas onde não foi possível identificar as bandas dos rRNAs 18S e 28S.

Para a transcrição reversa, 1 µg do RNA total, previamente tratado com DNase, foi acrescido de 0,5 µg de OligoDT, mantidos a 65 °C por 10 min, incubado por 5 min a 4 °C. Em seguida, foram adicionados dNTPs (Desoxirribonucleotídeos Fosfatados, 10 mM), tampão da enzima (50 mM de Tris-HCl pH 8,3, 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂ e 10 mM DTT) e a enzima M-MLV Transcriptase Reversa. Essa mistura de RNA e reagentes foi incubada a 37 °C por 1 h. Para inativação da enzima, essa mistura foi aquecida a 72 °C por 15 min. O produto de RT foi estocado a -20 °C. Todos os reagentes e enzimas utilizados para a transcrição reversa foram adquiridos da Promega Biotecnologia do Brasil.

Para a amplificação do produto do RT, foram adicionados o SYBR Green e os *primers sense* e *anti-sense* (10 nM). O processo de amplificação envolve três etapas: desnaturação da fita dupla (95 °C/15 s), anelamento dos *primers* (60 °C/15 s) e extensão do fragmento de DNA (72 °C/30 s), formando uma nova dupla fita. As três etapas correspondem a um ciclo e, para adequada amplificação do nosso fragmento, foram realizados 40 ciclos em termociclador (*Corbett RotorGene*). A fluorescência emitida em cada ciclo foi detectada por meio do *Software Rotor-Gene Q*. Para a normalização e análise da expressão dos genes de interesse, foram utilizadas as seguintes constitutivas: gene *Gapdh* como controle interno para o gene *Tshb*, e *18S* para *Slc2a2* (GLUT2) e *Cd36* (FAT/CD36). O cálculo para análise da expressão relativa dos genes foi realizado de acordo com o método descrito por Livak e Schmittgen (2001).

Os *primers* utilizados no PCR foram desenhados e checados com o auxílio dos seguintes websites: *Rat Genome Database* (rgd.mcw.edu); *Blast* (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) e *Primer-blast* (ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast). A eficiência dos *primers* e a melhor diluição do produto do RT para a análise da expressão dos genes de interesse (*Gapdh* e *Tshb*) foram definidas a partir de uma curva realizada por Bargi-Souza (2015). Para o gene *18S*, a eficiência foi de 1,03, para o *Slc2a2* foi de 0,98 e para o *Cd36* foi de 0,95. As sequências dos *primers* estão na tabela abaixo.

Tabela 1: Relação e informações dos *primers* utilizados (Nome, número do gene bank, *primer* e a sequência do *primer* 5'-3').

Nome / Gene Bank#	Primer	Sequência (5'-3')
<i>Slc2a2</i> NM_031197.2	sense	TCTGTCTGTGTCCAGCTTTG
	anti-sense	CCAACATTGCTTTGATCCTTCC
<i>Cd36</i> NM_001159558 (v1); NM_007643 (v2); NM_001159555 (v3); NM_001159557 (v4); NM_001159556 (v5);	sense	GCTAAATGAGACTGGGACCAT
	anti-sense	CACCACTCCAATCCCAAGTAA
<i>18S</i> NR_003278	sense	GCGAATGGCTCATTAAATGAGT TA
	anti-sense	TGGTTTTGATCTGATAAATGCA CG
<i>Gapdh</i> NM_001289726 (v1) ; 008084 (v2)	sense	GGGCTGCCCAGAACATCAT
	anti-sense	CCGTTCACTCTGGGATGAC
<i>Tshb</i> NM_009432 (v1); NM_001165939 (v2); NM_001165940 (v3);	sense	GGCAAACCTGTTTCTTCCCAA
	anti-sense	GTTGGTTTTGACAGCCTCGT

4.6 Concentração de Triglicérides e Colesterol Total:

As concentrações séricas de TAG e colesterol foram determinadas utilizando um método colorimétrico por meio de kit comercial [Triglicérides Liquiform e Colesterol Liquiform (Labtest, Lagoa Santa, MG)]. Para este procedimento, 5 µL de soro e 300 µL do reagente foram adicionados à placa de 96 poços e incubados por 10 min à 37 °C. Para determinar a concentração de TAG e colesterol no soro, o comprimento de onda do espectrofotômetro (*SynergyH1/Biotek, Winooski, VT, EUA*) foi ajustado a 500 nm e os valores em absorbância de cada amostra determinados a partir da leitura da microplaca. O cálculo da concentração de TAG e colesterol foi realizado de acordo com as orientações do fabricante e os valores estão expressos em mg/dL.

4.7 Análise Estatística:

Os dados obtidos a partir dos experimentos estão expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). Considerando que temos três grupos experimentais e o tratamento como fator/variável, optamos pelo ANOVA *one-way*. Para os dados com distribuição normal e igualdade de variâncias, aplicamos o teste paramétrico, com pós-teste de Tukey, quando apropriado. Para os dados não paramétricos, optamos pelo Teste Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de Dunn's, quando apropriado. Os detalhes dos testes estatísticos constam na legenda. Os resultados foram considerados com significância estatística quando o “p” foi menor que 0,05. O programa utilizado para os testes estatísticos foi o GraphPad Prism 7.04.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Parâmetros morfométricos e análise da expressão gênica do *Tshb*

Para comprovar a efetividade dos tratamentos com PTU e T3, avaliamos alguns parâmetros que, se alterados, podem indicar condição de hipotireoidismo ou hipertireoidismo.

Um parâmetro muito afetado pelo hipertireoidismo é a massa cardíaca, pois está bem estabelecido na literatura que o excesso dos HTs promove hipertrofia do coração por adição de proteínas contráteis e, conseqüentemente, aumento das unidades de sarcômeros (DILLMANN, 2010). De fato, nos camundongos tratados com T3, observamos aumento da massa cardíaca, ou seja, hipertrofia do coração, o que indica que os animais estavam hipertireoideos (Tabela 2).

O mRNA do *Tshb* da hipófise, que codifica a subunidade β da proteína TSH – potente regulador da função tireoidiana, respondeu aos tratamentos com PTU e T3, conforme esperado. A administração do PTU promoveu aumento do conteúdo de mRNA do *Tshb*, enquanto o T3 induziu redução da sua expressão (Tabela 2). O aumento do *Tshb* é um achado esperado no hipotireoidismo, enquanto o inverso é esperado no hipertireoidismo, pois o gene do *Tshb* é regulado negativamente pelos HTs, o que torna o TSH um importante indicador da condição tireoidiana do animal (ORTIGA-CARVALHO et. al., 2016).

O peso corporal (PC) dos animais foi avaliado, pois é sabido que os HTs aceleram o gasto energético, o que pode repercutir na massa corporal, reduzindo-a. Entretanto, não observamos qualquer alteração no peso corporal que pudesse sinalizar um distúrbio tireoidiano (Tabela 2).

Adicionalmente, avaliamos a massa adiposa perigonadal, mas apesar dos HTs estimularem a lipólise, que reduz a massa adiposa (SZÉKELY M; SZELÉNYI, 2005), não observamos qualquer alteração desse parâmetro entre os animais (Tabela 2).

Considerando que o intestino é o órgão de interesse no nosso estudo, avaliamos o seu comprimento, pois é sabido que os HTs promovem maturação do intestino, portanto, participa do seu desenvolvimento e promove proliferação de células-tronco intestinais no animal adulto (ISRAEL et al., 1987; HASEBE et al., 2013; KRESS; SAMARUT; PLATEROTI, 2009), e, como não sabemos se essa ação pode repercutir na extensão/comprimento do intestino, optamos por checar o seu tamanho nos animais submetidos à diferentes condições tireoidianas, contudo, não encontramos qualquer alteração desse parâmetro (Tabela 2).

Tabela 2**Parametros morfométricos e expressão do mRNA *Tshb* por PCR em tempo real**

	C	T3	PTU
<i>Tshb</i> mRNA/ <i>Gapdh</i> mRNA	1,08 ± 0,50	0,02 ± 0,03*	2,11 ± 0,85*
Massa cardíaca/PC	6,87 ± 0,60	9,37 ± 1,05****	6,55 ± 1,05
Massa cardíaca/Tíbia	0,45 ± 0,05	0,59 ± 0,06****	0,44 ± 0,08
Peso Corporal	27 ± 1,99	28 ± 1,82	26,00 ± 1,76
Gordura perigonadal/PC	1,47 ± 0,52	1,33 ± 0,27	1,51 ± 0,31
Comprimento do Intestino/PC	154 ± 8,82	154 ± 8,13	160 ± 7,10
Comprimento do Intestino/Tíbia	23 ± 1,13	24 ± 1,15	24 ± 0,98

****p < 0.0001 vs C e PTU e * p < 0.05 vs C.

5.2 Impacto do tratamento com T3 e PTU na histologia do epitélio intestinal

Conforme mencionado anteriormente, os HTs estimulam a proliferação de células-tronco no intestino de animais adultos, o que pode repercutir no tamanho dos vilos e das criptas, pois há descrição de aumento da altura dos vilos e da profundidade das criptas em ratos hipertireoideos, enquanto o oposto foi observado nos animais hipotireoideos (FABIYI E FASANMADE, 2015). Contudo, não observamos qualquer alteração desses parâmetros no hipo ou hipertireoidismo induzido, pois após o tempo (30 dias) de tratamento com T3 ou PTU, a altura dos vilos (Fig. 6-A e -B) e a profundidade das criptas (Fig. 6C e -D) permaneceram similares ao observado nos animais controles.

Convém dizer que camundongos da mesma linhagem (C57BL/6) alimentados com dieta contendo 10% de calorias provenientes dos lipídios apresentaram aumento da altura dos vilos após tratamento com T3 e PTU, enquanto os animais hipertireoideos alimentados com dieta hiperlipídica (60%) apresentaram aumento da profundidade das criptas (LOSACCO et al., 2018), mas considerando que a dieta dos animais utilizados neste estudo contém menos calorias provenientes dos lipídios, ou seja, apenas 5%, essa diferença pode ser justificada. Outro achado válido de se mencionar é que os animais do grupo T3 apresentaram dilatação dos vilos, mais precisamente na sua porção superior, conforme apresentado na fotomicrografia (Fig. 6-A/seta vermelha), o que talvez seja um indicativo de processo inflamatório.

Fig. 6: Análise do comprimento/altura dos vilos e da profundidade das criptas de camundongos tratados com salina, T3 ou PTU por 30 dias. Em A e C, fotomicrografias dos vilos e das criptas, respectivamente. Em B e D, histograma representando a altura dos vilos e a profundidade das criptas, respectivamente. O “N”, posicionado acima dos gráficos corresponde ao número de animais utilizados. Os dados apresentados correspondem a dois experimentos independentes. Os dados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão (DP), submetidos ao ANOVA paramétrico uma via. Não houve diferença significativa. Seta vermelha indica dilatação dos vilos.

5.3 Análise das possíveis proteínas constitutivas para o nosso modelo experimental

Previamente às análises dos *blots* correspondentes ao conteúdo das proteínas de interesse, checamos se a α -actinina, γ -tubulina e GAPDH eram, de fato, boas constitutivas para o nosso modelo experimental. Como observado na Fig. 7, não houve diferença significativa entre o conteúdo da α -actinina (7-A) e da γ -tubulina (7-B) entre os três grupos experimentais. Por outro lado, o conteúdo do GAPDH (7-C) aumentou no grupo T3, o que nos levou a descartar essa proteína como normalizadora. Com base nos resultados, optamos pela α -actinina, γ -tubulina e Ponceau S como controles internos.

Fig. 7: Conteúdo proteico da α -actinina, γ -tubulina, GAPDH no epitélio do intestino delgado de camundongos tratados com salina (C), T3 e PTU por 30 dias. Os blots referentes ao conteúdo proteico estão posicionados acima da barra. O “N”, posicionado sobre a barra, corresponde ao número de animais utilizados. Os dados apresentados foram corrigidos pela média dos controles e correspondem a dois experimentos independentes. Os dados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão (DP). Utilizamos o teste Kruskal-Wallis para análise da α -actinina (A) e da γ -tubulina (B), enquanto o GAPDH (C) e o Ponceau (D) foram submetidos à ANOVA paramétrico uma via. Não houve diferença significativa entre os grupos, exceto para o GAPDH: $p < 0.005$ T3 vs C e PTU.

5.4 Impacto do tratamento com PTU e T3 no conteúdo dos transportadores de carboidratos (SGLT1, GLUT2 e GLUT5), peptídeos (PEPT1), lipídios (CD36/SR-B2, NPC1L1, FATP4, MTP e L-FABP) e do trocador Sódio/Hidrogênio 3 (NHE3):

5.4.1 Transportadores de carboidratos (SGLT1, GLUT2 e GLUT5)

Em relação aos transportadores de carboidratos, observamos que o T3 aumentou o conteúdo do GLUT2 no intestino delgado dos camundongos quando comparado aos animais controles (Fig 8-B), enquanto que o tratamento com PTU não afetou esse parâmetro. Já os conteúdos do SGLT1 e do GLUT5 permaneceram inalterados frente ao tratamento com T3 ou PTU (Fig. 8-A e 8-C).

O nosso achado é de extrema relevância, pois é sabido que os HTs estimulam a captação de glicose pelo intestino, efeito observado em várias espécies, inclusive nos roedores (ALTHAUSEN; STOCKHOLM, 1938; BRATUSCH-MARRAIN; GASÍĆ; WALDHÄUSL, 1984; DEBIEC, CROSS; PETERLIK, 1989; PRAGER; CROSS; PETERLIK, 1990). Nesse sentido, o aumento do GLUT2 no enterócito dos animais hipertireoideos pode favorecer a absorção de glicose, principalmente no período pós-prandial, pois se sabe que nesse momento há translocação do GLUT2 para a membrana apical do enterócito (KELLETT; HELLIWELL, 2000).

Por outro lado, Debiec, Cross e Peterlik (1989) citam que a captação da glicose induzida pelos HTs é resultado da ativação de um mecanismo dependente de sódio; contudo, nós não observamos qualquer alteração no conteúdo do SGLT1 (Fig. 8A) que justifique essa proposta, apesar de que existem relatos de aumento do mRNA do SGLT1 em células Caco-2 induzido pelo T3 (MATOSIN et al., 1996; MATOSIN-MATEKALO et al., 1998). Entretanto, algumas ponderações são necessárias, pois, apesar de Debiec e colaboradores (1989) concluírem que a captação de glicose depende de um mecanismo acoplado ao sódio, não foi avaliado o conteúdo do SGLT1 nem sua atividade e, além disso, o estudo foi desenvolvido com intestino de frangos, e diferenças de resposta entre espécies podem ser observadas. Por outro lado, assim como o SGLT1, o GLUT2 é uma proteína importante para a captação de glicose, e está localizada na membrana apical e basolateral do enterócito (KELLETT; BROTLAROCHE, 2005), e, conforme observado, essa proteína está aumentada nos animais tratados com T3, o que nos leva a deduzir que o GLUT2 participa da captação de glicose, assim como do seu efluxo para o interstício-vascular (KELLETT; BROTLAROCHE, 2005). De qualquer forma, outros estudos são necessários para elucidar se o SGLT1 ou GLUT2 ou ambos participam do processo de captação de glicose.

Fig. 8: Conteúdo proteico dos transportadores de carboidratos (SGLT1, GLUT2, GLUT5) no epitélio do intestino delgado de camundongos tratados com salina (C), T3 e PTU por 30 dias. Em A, SGLT1, em B, GLUT2, e, em C, GLUT5. Os blots das proteínas de interesse e da constitutiva (α -actinina) estão posicionados acima dos gráficos. O “N”, posicionado acima das barras, corresponde ao número de animais utilizados. Os dados apresentados foram corrigidos pela média dos controles, estão expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP) e correspondem a dois experimentos independentes. O SGLT1 foi submetido ao ANOVA paramétrico uma via, enquanto que GLUT2 e GLUT5 foram submetidos ao Teste não paramétrico (Kruskal-Wallis), seguido de pós-teste de Dunn’s (apenas para o GLUT2). SGLT1 e GLUT5 não significativo; GLUT2: $p < 0.05$ T3 vs C.

5.4.2 Transportadores de peptídeos (PEPT1) e trocador sódio/hidrogênio 3 (NHE3)

Em relação ao PEPT1, observamos que não houve alteração do seu conteúdo no intestino dos camundongos tratados ou com T3 ou com PTU quando comparados com os animais controles (Fig. 9-A). Nosso achado difere do encontrado na literatura que aponta os HTs como reguladores negativos do PEPT1 - o estudo demonstra que, após a administração do T4, os ratos apresentaram uma diminuição do PEPT1 na mucosa intestinal (ASHIDA et al., 2002, 2004), o que pode ter repercussão negativa na absorção de proteínas. Entretanto, nós não observamos o mesmo que Ashida. Conforme já mencionado, algumas ponderações são necessárias: primeiro, os estudos com PEPT1 e HTs são escassos, o que dificulta a consolidação do real efeito dos HTs no conteúdo dessa proteína; segundo, nossos estudos foram realizados com camundongos e os estudos de Ashida desenvolvidos em ratos, o que pode explicar tal diferença de resposta quando se avalia espécies distintas, e, terceiro: Ashida utilizou o T4 e nós o T3, e isso pode, também, ser um fator de diferença na resposta.

Fig. 09: Conteúdo proteico do PEPT1 e NHE3 no epitélio do intestino delgado de camundongos tratados com salina (C), T3 e PTU por 30 dias. Em A, PEPT1, e, em B, NHE3. Os *blots* das proteínas de interesse e da constitutiva (α -actinina) estão posicionados acima dos gráficos. O “N” corresponde ao número de animais utilizados e está posicionado acima dos gráficos. Os dados apresentados foram corrigidos pela média dos controles e correspondem a dois experimentos independentes. Os dados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão (DP) e submetidos à ANOVA paramétrica de uma via.

Considerando que a atividade do PEPT1 depende de um aporte de hidrogênio, fornecido pelo NHE3, que é um importante trocador de sódio/hidrogênio da membrana apical do enterócito, avaliamos o seu conteúdo no epitélio intestinal. Conforme apresentado na Fig. 9-B, não observamos qualquer alteração significativa no conteúdo do NHE3 em animais tratados ou com T3 ou com PTU em relação aos seus controles; entretanto, observamos que os animais do grupo T3 apresentam um leve e sustentado aumento do NHE3 em relação aos demais grupos experimentais (Salina e PTU), mas que não foi significativo do ponto de vista estatístico. Há relatos de que no córtex renal de ratos os HTs aumentaram tanto a atividade quanto a quantidade de NHE3, estimulando a reabsorção de NaCl e NaHCO₃ (CANO; BAUM; MOE, 1999), mas no que diz respeito ao NHE3 do intestino, não observamos qualquer alteração significativa.

5.4.3 Análise do conteúdo dos transportadores de lipídios (CD36/SR-B2, NPC1L1, FATP4, MTTP e L-FABP) no epitélio intestinal e mensuração da concentração sérica do TAG e do colesterol após indução do hipotireoidismo e hipertireoidismo.

Nesta abordagem, observamos que os conteúdos do NPC1L1 (Fig. 10-B), FATP4 (Fig. 10-C), MTTP (10-D) e L-FABP (10-E) permaneceram inalterados após tratamento com T3. Entretanto, o T3 aumentou o conteúdo do CD36/SR-B2 no epitélio intestinal dos camundongos (Fig. 10-A), similarmente ao que foi observado anteriormente nos animais alimentados com dieta hiperlipídica (LOSACCO et al, 2018), o que reforça que essa proteína é regulada positivamente pelo T3 no intestino. Já o tratamento com PTU não afetou o conteúdo dos transportadores de lipídio (Fig. 10). No que diz respeito às concentrações séricas do TAG, não observamos qualquer alteração induzida pelo T3 (Fig. 10-F), mas por outro lado, observamos que os animais tratados com T3 apresentaram redução do colesterol sérico (Fig. 10-G), ação que era esperada, pois é sabido que o T3 diminui o colesterol no sangue (BOYD; OLIVER, 1960) por regular o seu metabolismo hepático (SCHWARTZ et. al, 1992).

O PTU não afetou o TAG e colesterol circulantes, conforme apresentado na Fig. 10, o que diverge da literatura que indica aumento das concentrações séricas de TAG e do colesterol no hipotireoidismo, porém este estudo foi conduzido em humanos e o nosso em camundongos (JUNG et al., 2017) e, talvez, as respostas sejam diferentes em camundongos.

Em relação ao aumento do CD36/SR-B2 no intestino, poderíamos supor que o mesmo é responsável pela maior captação dos ácidos graxos, principalmente os de cadeia longa, pois é sabido que o CD36/SR-B2 transporta ácidos graxos da luz do intestino para o interior dos enterócitos e seguem para a circulação na forma de lipoproteínas, os quilomícrons.

Adicionalmente, poderíamos ter um aumento da captação do colesterol, pois há relatos de que o CD36/SR-B2 participa do transporte do colesterol através do epitélio intestinal (NAULI et al., 2006). Contudo, atualmente se questiona se o CD36/SR-B2 é relevante no processo de absorção desses lipídios, pois o seu conteúdo na membrana plasmática dos enterócitos reduz no início do período pós-prandial (TRAN et al., 2011). Por outro lado, o CD36/SR-B2 participa do processamento intracelular dos lipídios no enterócito, favorecendo a produção e a secreção dos quilomícrons para a circulação, um processo que envolve o aumento da proteína MTTP (TRAN et al., 2011). Entretanto, o tratamento com T3 não afetou o conteúdo da MTTP nem as concentrações séricas do TAG, conforme apresentado, o que nos permite descartar que o aumento do CD36/SR-B2 no intestino dos animais hipertireoideos está associado ao aumento de TAG na circulação.

Fig. 10: Conteúdo proteico dos transportadores de lipídios no epitélio do intestino delgado de camundongos tratados com salina (C), T3 e PTU por 30 dias. Em A, CD36/SR-B2, em B, NPC1L1, em C, FATP4, em D, MTTTP e em E, L-FABP. Os blots referentes às proteínas de interesse e da constitutiva estão posicionados acima dos gráficos, com exceção do L-FABP que foi normalizado pelo Ponceau S. Em F, TAG sérico e em G, colesterol sérico. O “N” corresponde ao número total de animais utilizados nmos experimentos. Os dados apresentados foram corrigidos pela média dos controles, exceto para o TAG e colesterol circulantes, e correspondem a dois experimentos independentes. Os dados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão (DP) e foram submetidos à ANOVA paramétrico uma via. CD36/SR-B2: $p < 0.01$ T3 vs C e PTU; Colesterol: $p < 0.01$ T3 vs C e PTU.

5.5 Impacto do tratamento com T3 na expressão gênica do *Slc2a2* e *Cd36*

Considerando que o tratamento com T3 aumentou o conteúdo proteico do GLUT2 e do CD36/SR-B2, optamos por avaliar a expressão dos genes codificantes dessas duas proteínas para confirmar ou descartar uma possível ação transcricional do T3. Os resultados obtidos por PCR em tempo real demonstraram que o T3 não afetou o conteúdo do mRNA do *Slc2a2*, gene codificante do GLUT2, quando comparado aos animais controles (Fig. 11-A), apesar do relato na literatura de que o T3 diminui a expressão gênica do *Slc2a2* em células Caco-2 (MATOSIN et al., 1996), mas considerando que essas células são originárias de um tumor intestinal (adenocarcinoma colorretal), esse achado não é de todo surpresa. Talvez, o aumento da proteína GLUT2 no intestino após o tratamento com T3 possa ser decorrente de alguma alteração pós-traducional que leva, em última instância, ao aumento do conteúdo da dessa proteína.

Por outro lado, o tratamento com T3 provocou diminuição do mRNA do *Cd36*, que codifica a proteína CD36/SR-B2 (Fig. 11-B), o que não era o esperado, haja vista o T3 aumentou o conteúdo do CD36/SR-B2 no intestino. Apesar disso, é possível que a redução do mRNA total do *Cd36* seja decorrente de uma alta taxa de renovação, pois estudos prévios do nosso grupo apontam para uma meia-vida do CD36/SR-B2 inferior a 24 horas (*dados submetidos à publicação*), o que pode explicar o baixo conteúdo do mRNA paralelo ao alto conteúdo da proteína.

Fig. 11: Expressão gênica do mRNA do *Slc2a2* e do mRNA do *Cd36* no epitélio intestinal de camundongos tratados com salina (C) e T3 por 30 dias. Em A, mRNA do *Slc2a2* e em B, mRNA do *Cd36* analisados por PCR em tempo real e normalizados pela 18S. O “N” corresponde ao número total de animais utilizados nos experimentos. Os dados apresentados foram corrigidos pela média dos controles e correspondem a dois experimentos independentes. Os dados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão (DP) e foram submetidos à ANOVA one-way; *Cd36* 2: $p < 0.001$ T3 vs C.

CONCLUSÃO

Os nossos achados nos levam a sugerir que o aumento total do GLUT2 no intestino pode favorecer uma maior captação de glicose, e, conseqüentemente, maior absorção. Esse resultado pode justificar os dados presentes na literatura de aumento da captação de glicose após a administração do T3. Considerando que os animais hipertireoideos apresentam aumento do seu metabolismo (LANNI et al., 2001), o que significa maior consumo de substratos energético para atender essa demanda, o aumento do GLUT2 pode garantir esse aporte energético ao favorecer uma maior entrada de glicose na circulação, conforme apresentado na ilustração abaixo. Por outro lado, apesar do aumento do CD36/SR-B2, um transportador de AGs com ação no processamento intracelular dos lipídios, não podemos inferir que o aumento dessa proteína é responsável pelo aumento do TAG ou do colesterol na circulação, pois não observamos alterações na concentração sérica desses lipídios, tampouco, das proteínas de processamento intracelular (MTTP e L-FABP).

Fig. 12: Esquema representativo de um enterócito exposto a altas concentrações de T3.

REFERÊNCIAS*

- ABUMRAD, N. A.; DAVIDSON, N. O. Role of the gut in lipid homeostasis. **Physiol Rev.**, v. 92, p. 1061-1085, 2012.
- ADIBI S. A.; MERCER D. W. Protein digestion in human intestine as reflected in luminal, mucosal, and plasma amino acid concentrations after meals. **J Clin Invest.** v. 52, p. 1586-94, 1973.
- AIRES, Margarida de Mello Fisiologia. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara. Koogan, 2012, p. 951). (ISBN 978-85-277-2100-4 1).
- AIRES, Margarida de Mello Fisiologia. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara. Koogan, 2012, p. 956-957). (ISBN 978-85-277-2100-4 1).
- ALTHAUSEN, T. L.; STOCKHOLM, M. Influence of the thyroid gland on absorption in the digestive tract. **Amer. J. Physiol.**, v.123, p. 577-588, 1938.
- ALTMANN, S. W. Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 33586-33592, 2004.
- ASHIDA, K.; KATSURA, T.; MOTOHASHI, H.; SAITO, H.; INUI, K. Thyroid hormone regulates the activity and expression of the peptide transporter PEPT1 in Caco-2 cells. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 282, p. 617-623, 2002.
- ASHIDA, K.; KATSURA, T.; SAITO, H.; INUI, K. Decreased activity and expression of intestinal oligopeptide transporter PEPT1 in rats with hyperthyroidism in vivo. **Pharm Res.**, v. 21, p. 969-975, 2004.
- BARGI-SOUSA, P. Ações rápidas da triiodotironina (T3) sobre a expressão e secreção de TSH: novos mecanismos envolvidos no feedback negativo. 2010. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2015.
- BOYD G. S.; OLIVER M. F. Thyroid hormones and plasma lipids. **Br Med Bull.** V. 16, p. 138-42, 1960.
- BIANCO A. C.; SALVATORE D.; GEREBEN B.; BERRY M. J.; LARSEN P. R. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. **Endocr Ver.** v, 23, p. 38-89, 2002.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRATUSCH-MARRAIN, P. R.; GASIĆ, S.; WALDHÄUSL, W. K. Triiodothyronine increases splanchnic release and peripheral uptake of glucose in healthy humans. **Am J Physiol.**, v. 247, p. 681-687, 1984.
- CANO, A.; BAUM, M.; MOE, O. W. Thyroid hormone stimulates the renal Na/H exchanger NHE3 by transcriptional activation. **Am J Physiol.**, v. 276, p. C102-C108, 1999.
- CELI F. S.; ZEMSKOVA M.; LINDERMAN J. D.; SMITH S. DRINKARD B. SACHDEV V.; SKARULIS M. C.; KOZLOSKY M.; CSAKO G.; COSTELLO R.; PUCINO F. J Clin Endocrinol Metab. 2011 Nov; 96(11):3466-74. – mostrando que houve a diminuição do colesterol
- CHOPRA I. J. A study of extrathyroidal conversion of thyroxine (T4) to 3,3',5-triiodothyronine (T3) in vitro. **Endocrinology.** v.101, p. 453-63, 1977.
- CODY V.; DAVIS P. J.; DAVIS F. B. Molecular modeling of the thyroid hormone interactions with alpha v beta 3 integrin. **Steroids.** V. 72, p. 165-70, 2007.
- DALMASSO, G.; NGUYEN, H. T.; YAN, Y.; LAROU, H.; CHARANIA, M. A.; OBERSTONE, T. S.; SITARAMAN, S. V.; MERLIN, D. MicroRNA-92b regulates expression of the oligopeptide transporter PepT1 in intestinal epithelial cells. **Am J Physiol Gastrointest**

Liver Physiol., v. 200, p. 52-59, 2011.

DAVIS P. J.; DAVIS F. B.; CODY V. Membrane receptors mediating thyroid hormone action. **Trends Endocrinol Metab.** v. 16, p. 429-35, 2005.

DAVIS, H. R.; ZHU, L. J.; HOOS, L. M.; TETZLOFF, G.; MAGUIRE, M.; LIU, J.; YAO, X.; LYVER, S. P.; LAM, M. H.; LUND, E. G.; DETMERS, P. A.; GRAZIANO, M. P.; DEBIEC, H.; CROSS, H. S.; PETERLIK, M. D-glucose uptake is increased in jejunal brush-border membrane vesicles from hyperthyroid chicks. **Acta Endocrinol (Copenh)**, v. 120, p. 435-441, 1989.

DESESSO, J. M.; JACOBSON, C. F. Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. **Food Chem Toxicol.**, v.39, p. 209-228, 2001.

DILLMANN, W. Cardiac hypertrophic and thyroid hormone signaling. **Heart Fail Rev.**, v. 15, p. 125-132, 2010.

DROVER V. A.; AJMAL M.; NASSIR F.; DAVIDSON N. O.; NAULI A. M.; SAHOO D.; TSO P.; ABUMRAD N. A. CD36 deficiency impairs intestinal lipid secretion and clearance of chylomicrons from the blood. **J Clin Invest.**, v. 115, p. 1290-7, 2005.

FABIYI, D. T.; FASANMADE, A. A. Effects of Hypothyroidism and Exogenous Thyroxine on Gastrointestinal Organs of Rat. **Niger J Physiol Sci.** v. 30, p. 59-64, 2015.

FREEDMAN M. R.; KING J.; KENNEDY E. Popular diets: a scientific review. **Obes Res.** v. 9, p. 1S-40S, 2001.

GAWENIS, L. R.; STIEN, X.; SHULL, G. E.; SCHULTHEIS, P. J.; WOO, A. L.; WALKER, N. M.; CLARKE, L. L. Intestinal NaCl transport in NHE2 and NHE3 knockout mice. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 282, p. G776-G784, 2002.

GEREBEN B.; ZEÖLD A.; DENTICE M.; SALVATORE D.; BIANCO A. C. Activation and inactivation of thyroid hormone by deiodinases: local action with general consequences. **Cell Mol Life Sci.** v. 65, p. 570-90, 2008.

GEREBEN B.; ZEÖLD A.; DENTICE M.; SALVATORE D.; BIANCO A. C. Activation and inactivation of thyroid hormone by deiodinases: local action with general consequences. **Cell Mol Life Sci.** v. 65, p.570-90, 2008.

GLATZ, J. F.; LUIKEN, J. J. From fat to FAT (CD36/SR-B2): Understanding the regulation of cellular fatty acid uptake. **Biochimie.**, v. 136, p. 21-26, 2017.

HAM, A. W.; CORMACK, D. H. Histologia. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Op. cit., p. 636, 1983.

HASEBE, T.; FU, L.; MILLER, T.C.; ZHANG, Y.; SHI, Y. B.; ISHIZUYA-OKA, A. Thyroid hormone-induced cell-cell interactions are required for the development of adult intestinal stem cells. **Cell Biosci.**, v. 3, p. 18, 2013.

HEATHER, L. C.; COLE, M. A.; ATHERTON, H. J.; COUMANS, W. A.; EVANS, R. D.; TYLER, D. J.; GLATZ, J. F.; LUIKEN, J. J.; CLARKE, K. Adenosine monophosphate-activated protein kinase activation, substrate transporter translocation, and metabolism in the contracting hyperthyroid rat heart. **Endocrinology**, v. 151, p. 422-431, 2010.

HSU, J. H.; BRENT, G. A. Thyroid hormone receptor gene knockouts. **Trends Endocrinol Metab.**, v. 09, p. 103-112, 1998.

HU, Y.; XIE, Y.; WANG, Y.; CHEN, X.; SMITH, D. E. Development and characterization of a novel mouse line humanized for the intestinal peptide transporter PEPT1. **Mol Pharm.**, v. 11, p. 3737-3746, 2014.

HUSSAIN, M. M.; Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation. **Curr Opin Lipidol.**, v. 25, p. 200-206, 2014.

ISRAEL, E. J.; PANG, K. Y.; HARMATZ, P. R.; WALKER, W. A. Structural and functional maturation of rat gastrointestinal barrier with thyroxine. **Am J Physiol.**, v. 252, p. 762-767, 1987.

JUNG K. Y.; AHN H. Y.; HAN S. K.; PARK Y. J.; CHO B. Y.; MOON M. K. Association

- between thyroid function and lipid profiles, apolipoproteins, and high-density lipoprotein function. **J Clin Lipidol.** V. 11, p. 1347-1353, 2017.
- Junli Wanga Xiao Yanb RonghuaLubXiaolinMengbGuoxingNieb Peptide transporter 1 (PepT1) in fish: A review *Aquaculture and Fisheries* Volume 2, Issue 5, September 2017, Pages 193-206
- KATHOL R. G.; DELAHUNT J. W. The relationship of anxiety and depression to symptoms of hyperthyroidism using operational criteria. **Gen. Hosp. Psychiatry.** V. 8, p. 23-28, 1986
- KELLETT, G. L. The facilitated component of intestinal glucose absorption. **J Physiol.**, v. 531, p. 585-95., 2001.
- KELLETT, G. L.; BROT-LAROCHE, E. Apical GLUT2 A Major Pathway of Intestinal Sugar Absorption. **Diabetes.** v. 54, p. 3056-3062, 2005.
- KELLETT, G. L.; HELLIWELL, P. A. The diffusive component of intestinal glucose absorption is mediated by the glucose-induced recruitment of GLUT2 to the brush-border membrane. **Biochem J.**, v. 350, p. 155-162, 2000.
- KIELA P. R.; GHISHAN F. K. Physiology of Intestinal Absorption and Secretion *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* v. 30, p. 145-159, 2016.
- KIM B. Thyroid hormone as a determinant of energy expenditure and the basal metabolic rate. **Thyroid.** V.18, p. 141-4, 2008.
- KIM, Y. S. ; BIRTWHISTLE, W. ; KIM, Y. W. Peptide hydrolases in the brush border and soluble fractions of small intestinal mucosa of rat and man. **J Clin Invest.**, v. 51, p. 1419-1430, 1972.
- KRESS, E.; SAMARUT, J.; PLATEROTI, M. Thyroid hormones and the control of cell proliferation or cell differentiation: paradox or duality? **Mol Cell Endocrinol.** v. 313, p.36-49, 2009.
- LANNI, A.; MORENO, M.; LOMBARDI, A.; DE LANGE, P.; GOGLIA, F. Control of energy metabolism by iodothyronines. **J Endocrinol Invest.**, v. 24, p. 897-913, 2001.
- LAUKKARINEN, J.; SAND, J.; AITTOMÄKI, S.; PÖRSTI, I.; KÖÖBI, P.; KALLIOYALKAMA, J.; SILVENNOINEN, O.; NORDBACK, I. Mechanism of the prorelaxing effect of thyroxine on the sphincter of Oddi. **Scand J Gastroenterol.**, v. 37, p. 667-673, 2002.
- 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 p. 402-408, 2001.
- LOMBARDI, A.; DE MATTEIS, R.; MORENO, M.; NAPOLITANO, L.; BUSIELLO, R.A.; SENESE, R.; DE LANGE, P.; LANNI, A.; GOGLIA, F. Responses of skeletal muscle lipid metabolism in rat gastrocnemius to hypothyroidism and iodothyronine administration: a putative role for FAT/CD36. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v. 303, p. E1222-E1233, 2012.
- LOSACCO, M.C.; DE ALMEIDA, C. F. T.; HIJO, A. H. T.; BARGI-SOUZA, P.; GAMA, P.; NUNES, M. T.; GOULART-SILVA, F. High-fat diet affects gut nutrients transporters in hypo and hyperthyroid mice by PPAR- α independent mechanism. **Life Sci.**, v. 202, p. 35-43, 2018.
- MARTINEZ DE MENA, R.; SCANLAN, T. S.; OBREGON, M.J. The T3 receptor beta1 isoform regulates UCP1 and D2 deiodinase in rat brown adipocytes. **Endocrinology.** V. 151, P. 5074-83, 2010.
- MATOSIN, M.; ALLISON, G. G.; ILUNDAIN, A. A.; SHIRAZI-BEECHEY, S. P.; BROT-LAROCHE, E. GLUT1 to 5 & SGLT1 expression in thyroid-hormone-treated Caco-2 cells. **Biochem Soc Trans.**, v. 24, p. 238S, 1996.
- MATOSIN-MATEKALO, M.; MESONERO, J.E.; DELEZAY, O.; POIREE, J. C.; ILUNDAIN, A. A.; BROT-LAROCHE, E. Thyroid hormone regulation of the Na⁺/glucose

- cotransporter SGLT1 in Caco-2 cells. **Biochem J.**, v. 334, p. 633-640, 1998.
- MCKAY, D. M. Good bug, bad bug: in the case of enteric inflammatory disease does the epithelium decide? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 100, p.205-210, 2005
- MILLINGTON, P. F.; CRITCHLEY, D. R.; TOVELL, P. W.; The role of calcium in the isolation of brush borders from epithelial cells of rat small intestine. **J Cell Sci.**, v. 1, p. 415-24, 1966.
- MOCHIZUKI, K.; SAKAGUCHI, N.; GODA, T. Triiodothyronine (T3) and fructose coordinately enhance expression of the GLUT5 gene in the small intestine of rats during weaning period. **Biosci Biotechnol Biochem.**, v. 71, p. 1345-1347, 2007.
- MU H.; HØY C. E. The digestion of dietary triacylglycerols. **Prog Lipid Res.** v. 43, p.105-33, 2004.
- NAULI A. M.; NASSIR F.; ZHENG S.; YANG Q.; LO C. M.; VONLEHMEDEN S.B.; LEE D.; JANDACEK R. J.; ABUMRAD N. A. Tso P CD36 is important for chylomicron formation and secretion and may mediate cholesterol uptake in the proximal intestine. **Gastroenterology.** v. 131, p. 1197-207, 2006.
- Ockner R. K.; Manning J. A.; Fatty acid-binding protein in small intestine. Identification, isolation, and evidence for its role in cellular fatty acid transport. **J Clin Invest.** v. 54, p. 326-38, 1974.
- ORTIGA-CARVALHO, T. M.; CHIAMOLERA, M. I.; PAZOS-MOURA, C. C.; WONDISFORD, F. E. Hypothalamus-Pituitary-Thyroid Axis. **Compr Physiol.**, v. 13, p. 1387-428, 2016.
- PERDUE M. H.; MCKAY D.M. Integrative immunophysiology in the intestinal mucosa. **Am J Physiol (Gastrointest Liver Physiol)** v. 267, p. G151-G165, 1994.
- PHAN C. T.; TSO P. Intestinal lipid absorption and transport. **Front Biosci.** v. 1, p. 299-319, 2001.
- PRAGER, C.; CROSS, H. S.; PETERLIK, M. Triiodothyronine stimulates 2-deoxy-D-glucose uptake by organ cultured embryonic chick small intestine. **Acta Endocrinol. (Copenh)**, v. 122, p. 585-591, 1990.
- PUCCI, E.; CHIOVATO, L.; PINCHERA, A. Thyroid and lipid metabolism. **Int J Obes Relat Metab Disord.**, v. 24, p. 109-112, 2000.
- RAHMAN, Q.; HABOUBI, N. Y.; HUDSON, P. R.; LEE, G.S.; SHAH, I.U. The effect of thyroxine on small intestine motility in the elderly. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 35, p. 443-446, 1991.
- SANTOS, M. F.; CURI, R.; FAVA-DE-MORAIS, F. Possible role of the submandibular glands in the control of glucose metabolism in mouse enterocytes. **Braz J Med Biol Res.**, v. 25, p. 957-960, 1992.
- SCHWARTZ H. L.; STRAIT K. A.; LING N. C.; OPPENHEIMER J. H. Quantitation of rat tissue thyroid hormone binding receptor isoforms by immunoprecipitation of nuclear triiodothyronine binding capacity. **J Biol Chem.** V.267, p. 11794-9, 1992.
- SETIAN N. S. Hypothyroidism in children: diagnosis and treatment. **J Pediatr. (Rio J).** v. 83, p.209-16, 2007.
- SHIBUSAWA N.; HOLLENBERG A. N.; WONDISFORD F. E. Thyroid hormone receptor DNA binding is required for both positive and negative generegulation. **J Biol Chem.** v. 278, p.732-8, 2003.
- SHINDER, D. A.; RAKHIMOV, K. R.; USMANOVA, O. D. Delay in natural decline of lactase activity in the small intestine of prematurely weaned rats as related to changes in their thyroid status. **Comp Biochem Physiol A Physiol.**, v. 111, p. 453-459, 1995.
- ST GERMAIN DL, GALTON VA, HERNANDEZ A. Minireview: Defining the roles of the iodothyronine deiodinases: current concepts and challenges. **Endocrinology.** v.150, p.1097-107, 2009.

- SZÉKELY M.; SZELENYI Z. Regulation of energy balance by peptides: a review. *Curr Protein Pept Sci* 2005;6:327– 53. *Trends Endocrinol Metab.* 2005 Nov;16(9):429-35. Epub 2005 Oct 7. Review.
- TAKATA, K. Glucose transporters in the transepithelial transport of glucose. **J Electron Microsc (Tokyo)**, v. 45, p. 275-284, 1996.
- TANCEVSKI I.; WEHINGER A.; DEMETZ E.; ELLER P.; DUWENSEE K.; HUBER J.; HOCHEGGER K.; SCHGOER W.; FIEVET C.; STELLAARD F.; MATS RUDLING M.; PATSCH J. R.; RITSCH A. Reduced Plasma HDL Cholesterol in Hyperthyroid Mice Coincides with Decreased Hepatic ABCA1 Expression *Endocrinology*. v. 149, p. 3708–3712, 2008.
- TANCEVSKI I.; WEHINGER A.; DEMETZ E.; ELLER P.; DUWENSEE K.; HUBER J.; HOCHEGGER K.; SCHGOER W.; FIEVET C.; STELLAARD F. Reduced plasma highdensity lipoprotein cholesterol in hyperthyroid mice coincides with decreased hepatic adenosine 5'-triphosphate cassette transporter 1 expression, **Endocrinology** v. 149, p. 3708–3712, 2008.
- TRAN T. T.; POIRIER H.; CLÉMENT L.; NASSIR F.; PELSERS M. M.; PETIT V.; DEGRACE P.; MONNOT M C.; GLATZ J. F.; ABUMRAD N. A.; BESNARD P.; NIOT I. Luminal lipid regulates CD36 levels and downstream signaling to stimulate chylomicron synthesis. **J Biol Chem.** v. 286, p. 25201-10, 2011.
- TRZEPACZ, P.T.; MCCUE, M.; KLEIN, I.; LEVEY, G.S.; GREENHOUSE, J. A psychiatric and neuropsychological study of patients with untreated Graves' disease. **Gen. Hosp. Psychiatry** v. 10, p. 49-55, 1988.
- VAN DER FLIER, L. G.; CLEVERS, H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. **Annu Rev Physiol.** V. 71, p. 241-60, 2009.
- WANG Y.Y.; MORIMOTO S.; DU C.K.; LU Q.W.; ZHAN D.Y.; TSUTSUMI T.; IDE T.; MIWA Y.; TAKAHASHI-YANAGA F.; SASAGURI T. Up-regulation of type 2 iodothyronine deiodinase in dilated cardiomyopathy, **Cardiovasc. Res.** v. 87, p. 636–646, 2010.
- WEINSTEIN, S. P.; O'BOYLE, E.; FISHER, M.; HABER, R. S. Regulation of GLUT2 glucose transporter expression in liver by thyroid hormone: evidence for hormonal regulation of the hepatic glucose transport system. **Endocrinology**, v. 135, p. 649-654, 1994.
- WERDER M.; HAN C. H.; WEHRLI E.; BIMMLER D.; SCHULTHESS G.; HAUSER H. Role of scavenger receptors SR-BI and CD36 in selective sterol uptake in the small intestine. **Biochemistry.** v. 40, p.11643-50, 2001.
- WHYBROW, P.C.; BAUER, M. Behavioral and psychiatric aspects of hypothyroidism. In "Werner & Ingbar's The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text" (L. E. Braverman and R. D. Utiger, eds.), 8th ed., p. 837-842, 2000. Lippincott Williams & Wilkins.
- WILLIAMS C. F.; WALTON G. E.; JIANG L.; PLUMMER S.; GARAIOVA I.; GIBSON G. R.; Comparative analysis of intestinal tract models. **Annu Rev Food Sci Technol.** v. 6, p. 329-50, 2015.
- WRIGHT, E. M.; MARTÍN, M. G.; TURK, E. Intestinal absorption in health and disease—sugars. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 17, p. 943-56, 2003.
- WU Y.; KOENIG R. J. Gene regulation by thyroid hormone. **Trends Endocrinol Metab.** v. 11, p. 207-11, 2000.
- YUSTA B.; ALARID E. T.; GORDON D. F.; RIDGWAY E. C.; MELLON P. L. The thyrotropin beta-subunit gene is repressed by thyroid hormone in a novel thyrotrope cell line, mouse T alphaT1 cells. **Endocrinology.** v.139, p. 4476-82, 1998.
- ZHANG J.; LAZAR M. A.; The mechanism of action of thyroid hormones. **Annu Rev Physiol.** v. 62, p. 439-66, 2000.

ANEXO

1. Artigo publicado como coautora na Life Sciences v. 202, p. 35-43, 2018. Título do trabalho: **High-fat diet affects gut nutrients transporters in hypo and hyperthyroid mice by PPAR-a independent mechanism.**

Life Sciences 202 (2018) 35–43

High-fat diet affects gut nutrients transporters in hypo and hyperthyroid mice by PPAR-a independent mechanism

Mariana Cerqueira Losacco^a, Carolina Fernanda Theodora de Almeida^a,
 Andressa Harumi Torelli Hijo^a, Paula Bargi-Souza^a, Patricia Gama^b, Maria Tereza Nunes^a,
 Francemilson Goulart-Silva^{a,*}

^a Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Brazil

^b Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Thyroid hormones
 Small intestine
 Nutrients transporters
 Nutrition
 Diets and PPAR alpha

ABSTRACT

Aims: High fat diet consumes and thyroid hormones (THs) disorders may affect nutrients metabolism, but their impact on the absorptive epithelium, the first place of nutrients access, remains unknown. Our aim was to evaluate the intestinal morphology and nutrients transporters content in mice fed standard (LFD) or high fat (HFD) diets in hypo or hyperthyroidism-induced condition.

Material and methods: C57BL/6 male mice fed LFD or HFD diets for 12 weeks, followed by saline, PTU (anti-thyroid drug) or T3 treatment up to 30 days. The mice were euthanized and proximal intestine was removed to study GLUT2, GLUT5, PEPT1, FAT-CD36, FATP4, NPC1L1 and NHE3 distribution by Western blotting. Since PPAR-α is activated by fatty acids, which is abundant in the HFD, we also evaluated whether PPAR-α affects nutrients transporters. Thus, mice were treated with fenofibrate, a PPAR-α agonist.

Key findings: HFD decreased GLUT2, PEPT1, FAT-CD6 and NPC1L1, but increased NHE3, while GLUT5 and FATP4 remained unaltered. THs did not alter distribution of nutrients transporters neither in LFD nor in HFD groups, but they increased villi length and depth crypt in LFD and HFD, respectively. Fenofibrate did not affect content of nutrients transporters, excluding PPAR-α involvement on the HFD-induced changes.

Significance: We assume that chronic HFD consumption reduced most of the nutrients transporters content in the small intestine of mice, which might limit the entrance of nutrients and gain weight. Since NHE3 promotes sodium absorption, and it was increased in HFD group, this finding could contribute to explain the hypertension observed in obesity.

2. Participação em Congressos

- a) **IUPS 38th World Congress.** Congresso realizado no Riocentro – Pavilhão 5 (RJ), entre os dias 1 e 5 de agosto de 2017. Participação como congressista e apresentadora de trabalho científico. Título do trabalho: “**Analysis of the impact of obesity induced by diet and genetic obesity in the macronutrients transporters expression in the intestine epithelium**” apresentado na forma de pôster, de autoria de: Hijo AHT e Goulart-Silva F.

IUPS 38th World Congress <http://iups2017.com/> (<http://iups2017.com/>)

« Back to search

PO - 024 - GASTROINTESTINAL AND LIVER PHYSIOLOGY | 05/08/2017 de 09:00 às 18:00, HALL 201

829 - ANALYSIS OF THE IMPACT OF OBESITY INDUCED BY DIET AND GENETIC OBESITY IN THE MACRONUTRIENTS TRANSPORTERS EXPRESSION IN THE INTESTINE EPITHELIUM

ANDRESSA HARUMI TORELLI HUO; FRANCEMILSON GOULART-SILVA.
UNIVERSITY OF SAO PAULO, SAO PAULO - SP - BRAZIL.

Introduction: The obesity and its comorbidity are a public health problem. This condition results from the imbalances between the energy intake and expenditure or by the mutation that affects the expression or signaling of satiety hormones, such as leptin. Anyway, obesity may affects organic nutrients absorption by interfere with their transporters expression on the intestine, but this hypothesis needs further investigation. **Aim:** Therefore, current study has the aim to compare the impact of the diet-induced obesity and the genetic obesity on the expression of carbohydrate, lipids and protein tranporters in the intestine epithelium. **Methods:** Our study was carried out in two steps. Firstly: mice C57bl/6 were fed standard diet (control) or high fat diet (HFD) for 12 weeks. Second: wild mice or *ob/ob* mice (leptin-deficient), both C57bl/6 strain, were fed standard chow. The animals were killed at five months of age and intestine epithelium were removed to evaluate the expression of carbohydrate (SGLT-1, GLUT-2 and GLUT-5), protein (PEPT-1) and lipids transporters (NPC1L1, FAT-CD36 and FATP-4) by Western blotting technique. Also, NHE-3 expression in the intestine was evaluated as well, since it plays a important role in the protein absorption. **Results:** Compare to the controls, animals fed HFD showed reduction of the GLUT-2, PEPT-1, FAT-CD36 and NPC1L1, and significantly increase of NHE-3 contents. The SGLT-1, GLUT-5 and FATP-4 remained unaltered. The *ob/ob* animals showed reduction of NPC1L1 and increase of SGLT-1 compared to the controls. The others proteins did not have any alteration. **Conclusion:** We conclude that obesity induced by high fat consumption affects negatively the expression of macronutrients transporters, which may be a physiological mechanism of regulation to limit the nutrients entrance through intestine and prevent worsen of the obesity. On the other hand, genetic obesity had a low impact in the macronutrients transportes expression, which allow us to suggest that excess of lipids from diet may trigger mechanisms in the enterocyte to regulate organic nutrients uptake, which exclude a direct effect of the obesity.

- b) Resumo publicado pelo **ECE 2018 (European Congress of Endocrinology)** que foi realizado no Centre Convencions Internacional Barcelona (CCIB), na Espanha entre os dias 19 e 22 de maio de 2018. Título do trabalho: **“T3 enhances GLUT2, PEPT1 and CD36/SR-B2 content in the intestinal epithelium of mice”**, de autoria de: Hijo AHT e Goulart-Silva F.

Endocrine Abstracts (2018) 56 GP252 | DOI: [10.1530/endoabs.56.GP252](https://doi.org/10.1530/endoabs.56.GP252)

T3 enhances GLUT2, PEPT1 and CD36/SR-B2 content in the intestinal epithelium of mice

Andressa Harumi Torelli Hijo & Francemilson Goulart-Silva

Author affiliations

Introduction and aim: Thyroid hormones (THs) regulates metabolism in adults, such as controlling energy balance by regulating energy expenditure and its storage. Hyperthyroidism increases thermogenesis, which results in the increase of the metabolic rate. THs, when combined with their receptor, can induce the expression of some genes, which can reflect on the content and activity of specific proteins. There are studies showing that THs affect the uptake of nutrients, such as glucose and peptides, but it is not well known how it works. Therefore, the current study has the aim to evaluate the impact of hypo and hyperthyroidism in the nutrients transporters content, such as carbohydrate, peptides and lipids transporters in the intestinal epithelium.

Materials and methods: In this study, mice C57BL/6, male and adults were distributed in three groups: control (vehicle/saline), hypothyroid (Propylthiouracil - PTU) and hyperthyroid (Triiodo-L-thyronine - T3). The animals were injected with saline, PTU (12.5 mg/Kg) or (T3 0.25 µg/g) for 30 days. At the end of the treatment, the mice were killed and the intestinal epithelium was removed to evaluate the transporters of carbohydrates (SGLT1, GLUT2 e GLUT5), protein hydrolysate (PEPT1) and lipids (NPC1L1, CD36/SR-B2 e FATP4) by Western blotting technique. Since NHE3 plays an important role in the sodium and peptides absorption, it was evaluated as well.

Results: Hyperthyroidism increased the GLUT2, CD36/SR-B2 and PEPT1 content when compared to the control mice. SGLT1, GLUT5, FATP4 and NPC1L1 remained unchanged after T3 treatment. T3 induced a little increase of NHE3, but not statistically yet. The hypothyroidism did not affect the nutrients transporters nor NHE3 compared to the control group.

Conclusion: Since THs increase the glucose uptake by intestine through sodium independent mechanism, which is well-established, the increased GLUT2 in the intestine after T3 treatment could explain how THs stimulate glucose absorption. Furthermore, T3 also increased PEPT1 and CD36/SR-B2 content, which could be a physiological mechanism to provide nutrients (glucose, amino acids and fatty acids) and sustain the high metabolic demand and thermogenesis, which are common findings in the hyperthyroidism condition.

- c) Resumo publicado pelo **ECE 2018 (European Congress of Endocrinology)** que foi realizado no Centre Convencions Internacional Barcelona (CCIB), na Espanha entre os dias 19 e 22 de maio de 2018. Título do trabalho: **“Temporal analysis of the HFD consumption in the mice small intestine physiology: possible correlation between metabolic disorders and HFD-induced obesity”**, de autoria de: Camille Perella Coutinho, Tatiana Carolina Alba-Loureiro, Andressa Harumi Torelli Hijo e Francemilson Goulart-Silva.

Endocrine Abstracts (2018) 56 P583 | DOI: [10.1530/endoabs.56.P583](https://doi.org/10.1530/endoabs.56.P583)

Temporal analysis of the HFD consumption in the mice small intestine physiology: possible correlation between metabolic disorders and HFD-induced obesity

Camille Perella Coutinho, Tatiana Carolina Alba-Loureiro, Andressa Harumi Torelli Hijo & Francemilson Goulart-Silva

Author affiliations

Introduction and aim: Obesity is a public health problem characterized by metabolic and endocrine disorders. Currently, it has been observed an increase of the obesity induced by high fat diet (HFD) and, considering that small intestine is the most important absorptive site of the nutrients, it is very interesting to evaluate the impact of HFD intake on that first place of nutrients entry, that is, the small intestine. Taken into account that dyslipidemia and hypertension are obesity common findings, we attempted to evaluate whether HFD consumption affects the microsomal triglyceride transfer protein (MTTP) and NHE3, since they promote triglyceride and sodium absorption, respectively. Considering that nutrients absorption could contribute to body weight gain and obesity, we also evaluated the nutrients transporters: SGLT1, GLUT2 and GLUT5 for carbohydrates, PEPT1 for peptides, FATP4, CD36/SR-B2 and NPC1L1 for long-chain fatty acids and cholesterol, respectively.

Methods: C57bl/6 male mice were fed standard diet (LFD) or HFD for three, six, nine or twelve weeks. At the end of each time, mice were killed and small intestine was removed and opened to detach the absorptive epithelium from mucosa. The epithelium was homogenate in appropriate lysis buffer and submitted to Western blotting (WB) technique for MTTP, NHE3, SGLT1, GLUT2, GLUT5, PEPT1, FATP4, CD36/SR-B2 and NPC1L1. PKA and PKC activities were analyzed by ELISA.

Results: HFD consumption from third up to 12th week increased MTTP and NHE3 content, but decreased the GLUT2, PEPT1 and NPC1L1. HFD also decreased the CD36/SR-B2 content, but only from 9th up to 12th week. HFD did not affect the SGLT1, GLUT5 and FATP4 content at any time-course studied. HFD also decreased PKA and PKC activities at 12th week.

Conclusion: Considering that mice began to gain weight from the third week after HFD consumption, the reduction of GLUT2, PEPT1 and NPC1L1 might interpose to the nutrients uptake, which could constitute a counter-regulation mechanism to limit the gain weight and adiposity. That condition could be reinforced by the decreased CD36/SR-B2 content observed from ninth week of HFD. Regarding the increase of MTTP and NHE3, we could infer that MTTP contributes to dyslipidemia and NHE3 contributes to hypertension both observed in the obesity and that constitutes the risk factors for cardiovascular diseases. Besides, all of these alterations might be linked to the reduction of PKA and PKC activities, at least for the NHE3, whose activity is known to be decreased by PKA.

- d) **II Encontro Científico do Departamento de Fisiologia e Biofísica.** Encontro realizado na Universidade de São Paulo, dia 08 de dezembro de 2017. Participação como congressista e apresentadora de trabalho científico. Título do trabalho: **“Avaliação do impacto dos hormônios tireoidianos no conteúdo dos transportadores de macronutrientes em camundongos”**, apresentado na forma de pôster, de autoria de: Hijo AHT e Goulart-Silva F.
- e) **III Encontro Científico do Departamento de Fisiologia e Biofísica.** Encontro realizado na Universidade de São Paulo, dia 07 de dezembro de 2018. Participação como congressista e apresentadora de trabalho científico. Título do trabalho: **“Análise da influência dos hormônios tireoidianos no conteúdo dos transportadores de macronutrientes no intestino delgado de camundongos”**, apresentado na forma de pôster, de autoria de: Hijo AHT e Goulart-Silva F.