ANA CAROLINA PANVELOSKI COSTA

**EFEITOS DO HORMÔNIO TIREOIDIANO NA
MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS
ENVOLVIDAS NA SINALIZAÇÃO DA INSULINA NA
VIGÊNCIA DE OBESIDADE OU DIABETES**

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

São Paulo
2015

ANA CAROLINA PANVELOSKI COSTA

**EFEITOS DO HORMÔNIO TIREOIDIANO NA
MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS
ENVOLVIDAS NA SINALIZAÇÃO DA INSULINA
NA VIGÊNCIA DE OBESIDADE OU DIABETES**

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

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Maria Tereza Nunes

Versão Corrigida

São Paulo
2015

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

reprodução não autorizada pelo autor

Costa, Ana Carolina Panveloski.

Efeitos do hormônio tireoidiano na modulação da expressão de citocinas envolvidas na sinalização da insulina na vigência de diabetes ou obesidade / Ana Carolina Panveloski Costa. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Maria Tereza Nunes.

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

Versão do título para o inglês: Effects of thyroid hormone in modulating the expression of cytokines involved in insulin signaling in diabetes or obesity.

1. Hormônio tireoidiano 2. Citocinas 3. Diabetes Mellitus 4. Obesidade 5. Resistência à insulina I. Nunes, Profa. Dra. Maria Tereza II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0127/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Ana Carolina Panveloski Costa.

Título da Tese: Efeitos do hormônio tireoidiano na modulação da expressão de citocinas envolvidas na sinalização da insulina na vigência de diabetes ou obesidade.

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **106** nas fls. **108** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Maria Tereza Nunes**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa *"Os efeitos do hormônio tireoidiano na modulação de citocinas envolvidas na sinalização da insulina na vigência de obesidade ou diabetes"* do qual participam o(s) alunos **Ana Carolina Panveloski Costa** e a pesquisadora **Silvania da Silva Teixeira**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **28.07.2011, com validade de 3 anos.**

São Paulo, 29 de julho de 2011.

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

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

Of.CEUA. 048.14

São Paulo, 24 1de julho de 2014.

REF.: Protocolo nº 106/11.

"Os efeitos do hormônio tireoidiano na modulação de citocinas envolvidas na sinalização da insulina na vigência de obesidade ou diabetes"

Prezado^(a) Professor^(a),

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, foi prorrogada até **28.07.17**.

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

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

Ilmo^(a) Sr.^(a)

Prof.^(a) Dr.^(a) Maria Tereza Nunes
Departamento de Fisiologia e Biofísica
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Eu dedico essa tese aos meus pais que sempre incentivaram a busca do conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de desenvolver esse trabalho, e talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.

Aos meus pais, Célia e Elisio, a gratidão eterna a todos os ensinamentos e suporte para que eu alcançasse cada vitória da minha vida.

Às minhas melhores amigas, queridas irmãs, Ana Luiza e Ana Célia, que sempre me deram suporte em cada obstáculo a ser vencido e a certeza de que eu nunca estarei sozinha em qualquer momento que seja da minha vida.

Ao meu grande amor, Alexandre, que trouxe à minha vida mais luz e que me mostrou que “tudo tem seu tempo determinado, e há tempo para todo propósito debaixo do céu” (Eclesiastes 3).

À querida mestre Maria Tereza Nunes, que abriu as portas do seu laboratório e me recebeu com muito carinho e confiança, compartilhando sempre o grande conhecimento que possui e incentivando o melhor de mim na pesquisa.

À melhor especialista de laboratório, Leonice, que me recebeu com muito carinho, teve o cuidado de me ensinar, não só, as boas práticas laboratoriais, mas também, um jeito mais leve e alegre de se viver.

À minha amiga Silvania, que foi uma grande companheira e mestre durante a realização dessa tese.

Aos meus amigos Caroline, Jamile, Rafa Prévide, Mariana, Rafa Salgueiro, Fred, Lucas, Rafa Croffi, Paula, Cecília, Aline, Fernanda, Izabela e Rodrigo, que colaboraram de alguma forma com este trabalho, e proporcionaram muitos momentos de alegria.

Aos professores Marília e Vagner, que abriram as portas do seu laboratório e permitiram que o conhecimento envolvido nesta pesquisa pudesse ser ampliado.

Aos especialistas em biotério, Vilson, Cleonice, Nair, Renata e toda equipe, que cuidaram com tanto carinho dos meus ratinhos, e tornaram possível esta pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP) que financiou esta pesquisa.

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer”.

RESUMO

COSTA, A. C. P. **Efeitos do hormônio tireoidiano na modulação da expressão de citocinas envolvidas na sinalização da insulina na vigência de obesidade ou diabetes**. 2015. 75 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O diabetes mellitus (DM) é a endocrinopatia mais prevalente no planeta. Na vigência de DM e de obesidade a inflamação subclínica, em decorrência do aumento de infiltrado de células inflamatórias e aumentada expressão de citocinas inflamatórias em tecidos essenciais no controle da homeostase glicêmica, tem importante participação no desenvolvimento da resistência à insulina. Em estados de hipo ou hipertireoidismo ocorre redução captação de glicose em resposta à insulina no tecido adiposo e muscular esquelético, o que reforça a importância da integridade da função tireoidiana para o controle glicêmico. Recentemente, diversos estudos vem apontando uma correlação positiva entre DM e disfunções tireoidianas. Neste contexto, a hipótese do presente estudo foi de que o tratamento com triiodotironina (T3) promove efeito benéfico na sensibilidade à insulina em modelos experimentais de DM ou obesidade, por modulação da expressão de citocinas inflamatórias. Para testar nossa hipótese, ratos DM tipo 1 – DM1 (indução por aloxana) ou obesos (indução por dieta de cafeteria) foram tratados com T3 por 4 semanas. Os ratos DM1 apresentaram hipotireoidismo primário e aumento de infiltrado de células inflamatórias no tecido adiposo branco periepídídimo (TAB) e da expressão de fator de necrose tumoral – α (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6) no TAB e no músculo sóleo. O tratamento com T3 promoveu redução da glicemia, aumento da sensibilidade à insulina, e redução da expressão de TNF- α e IL-6 no TAB e no músculo sóleo. Os animais obesos apresentaram hipertireoidismo subclínico, aumento da glicemia, e redução da sensibilidade à insulina. O tratamento com T3 nesse modelo experimental promoveu aumento da sensibilidade à insulina e da tolerância à glicose e redução da expressão de TNF- α e IL-6 no TAB e no músculo sóleo. Apesar dos efeitos colaterais do excesso de T3 na função cardíaca, não foi observado nenhuma alteração na pressão arterial dos animais DM1 tratados com T3. A partir do presente estudo, pode-se concluir que o tratamento com T3 promove melhora da sensibilidade à insulina em ratos DM1 e obesos, mecanismo que envolve a redução da expressão de citocinas inflamatórias no tecido adiposo e muscular esquelético.

Palavras-chave: Hormônio tireoidiano. Citocinas. Diabetes Mellitus. Obesidade. Resistência à insulina.

ABSTRACT

COSTA, A. C. P. **Effects of thyroid hormone in modulating the expression of cytokines involved in insulin signaling during obesity or diabetes.** 2015. 75 p. Ph.D. Thesis (Human Physiology). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Diabetes melitus (DM) is the most prevalent endocrinopathy in the world. The subclinical inflammation in DM and obesity has important role on insulin resistance development and is caused in consequence of increased inflammatory cells infiltration and expression of inflammatory cytokines in tissues which are essential to glucose homeostasis. Hipo or hiperthyroidism states there is decreased insulin-induced glucose uptake in adipose tissue and skeletal muscle, which reinforces the importance of thyroid function integrity to glycemia control. Lately, several studies have pointed positive relationship between DM and thyroid dysfunctions. In this context, we hypothesis of the present study was that triiodothyronine (T3) could promotes beneficial effects on insulin sensitivity by altering expression of inflammatory cytokines in experimental models of DM or obesity. In order to test this hypothesis, type 1 DM - DM1 (alloxan induced) or obese (cafeteria diet induced) rats were treated with T3 during 4-week period. The DM1 rats presented primary hypothyroidism and increased inflammatory cells infiltration and expression of inflammatory tumoral necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) on epididymal white adipose tissue (WAT) and soleus skeletal muscle. The treatment with T3 promoted reduction of glycemia, improvement of insulin sensitivity and decrease on expression of TNF- α and IL-6 in WAT and soleus skeletal muscle. The obese rats presented subclinical hyperthyroidism, increased glycemia and reduction of insulin sensitivity. The treatment with T3 in this experimental model promoted increase on insulin sensitivity and glucose tolerance, furthermore, reduction in expression of TNF- α and IL-6 in WAT and soleus skeletal muscle. Even though, side effects of T3 excess on cardiac function, it was not observed any alteration in arterial pressure of DM1 rats treated with T3. Taken together the results of the present study, it could be conclude that treatment with T3 promotes improvement on insulin sensitivity in DM1 and obese rats, mechanism which involves reduction in expression of inflammatory cytokines on adipose tissue and skeletal muscle.

Keywords: Thyroid hormone. Cytokines. Diabetes Mellitus. Obesity. Insulin Resistance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Desenho experimental esquematizado do modelo de Diabetes Mellitus tipo 1.....	24
Figura 2 - Desenho experimental esquematizado do modelo de Obesidade.....	25
Figura 3 - Representação gráfica da concentração sérica de TSH, T4 e T3 de ratos diabéticos.....	32
Figura 4 - Representação gráfica do conteúdo proteico de NIS (A) , TSHR (B) e Tg (C) na tireoide de ratos diabéticos.....	33
Figura 5 - Imagem representativa de cortes histológicos da tireoide de ratos diabéticos.....	34
Figura 6 - Representação gráfica da expressão de mRNA de Dio1 no fígado de ratos diabéticos.....	35
Figura 7 - Representação gráfica do peso corpóreo (A) , da glicemia (B) e da sensibilidade à insulina (C) de ratos diabéticos.....	36
Figura 8 - Representação gráfica do grau de fosforilação da proteína Akt, antes e após estímulo com insulina, no músculo sóleo (A) , músculo EDL (B) e tecido adiposo periepididimal (C) de ratos diabéticos.....	37
Figura 9 - Representação gráfica do conteúdo de MCP-1 (A) , TNF- α (B) e IL-6 (C) sérico de ratos diabéticos.....	38
Figura 10 - Representação gráfica do conteúdo de TNF- α no músculo sóleo (A) , músculo EDL (B) e tecido adiposo periepididimal (C) de ratos diabéticos.....	39
Figura 11 - Representação gráfica do conteúdo de IL-6 no músculo sóleo (A) , músculo EDL (B) e tecido adiposo periepididimal (C) de ratos diabéticos.....	40
Figura 12 - Imagem representativa de cortes histológicos do tecido adiposo periepididimal de ratos diabéticos.....	41
Figura 13 - Representação gráfica da concentração sérica de triglicérides (A) e colesterol (B) de ratos diabéticos.....	42
Figura 14 - Gráfico representativo do peso corpóreo no período experimental de ratos obesos.....	45

Figura 15 - Representação gráfica da concentração sérica de TSH (A) , T4 (B) e T3 (C) de ratos obesos.....	46
Figura 16 - Representação gráfica da glicemia (A) , das curvas da glicemia durante o ITT (B) , sensibilidade à insulina (C) ; das curvas da glicemia durante o GTT (D) , da área sobre a curva (AUC) do GTT (E) e da insulinemia (F) de ratos obesos.....	48
Figura 17 - Representação gráfica do conteúdo de TNF- α no músculo sóleo (A) , músculo EDL (B) e tecido adiposo periepídídimo (C) de ratos obesos.....	49
Figura 18 - Representação gráfica do conteúdo de IL-6 no músculo sóleo (A) , músculo EDL (B) e tecido adiposo periepídídimo (C) de ratos obesos.....	50
Figura 19 - Representação gráfica da concentração sérica de triglicérides e colesterol de ratos obesos.....	51

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Peso Cardíaco e Parâmetros Hemodinâmicos	44
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AUC – Área sob a Curva
DM – Diabetes Mellitus
DM1 – Diabetes Mellitus tipo 1
DM2 – Diabetes Mellitus tipo 2
Dio1 - 5'- Desiodase do Tipo I
dp/dt_{max} - 1º Derivada Temporal da Pressão Ventricular no Período de Aumento
dp/dt_{min} - 1º Derivada Temporal da Pressão Ventricular no Período de Queda
EDL - Extensor Digital Longo
GC-1 – Agonista Seletivo do Receptor β Tireoidiano
GLUT-4 – Transportador de Glicose do Tipo 4
GTT – Teste de Tolerância à Glicose
HeE - Hematoxilina e Eosina
HT – Hormônio Tireoidiano
IC -Índice de Contratilidade Cardíaca
IL-1 β – Interleucina 1-beta
IL-6 – Interleucina-6
IRP - dp/dt no Período de Relaxamento Isovolumétrico
IRS - Substratos de Receptores de Insulina
ITT - Teste de Tolerância à Insulina
JAK - Janus Quinase
MCP-1 - Proteína Quimiotática de Monócitos-1
NIS - Co-transportador Sódio-Iodeto
NPY – Neuropeptídeo Y
PAD - Pressão Arterial Diastólica
PAM - Pressão Arterial Média
PAS - Pressão Arterial Sistólica
PC - Peso Corpóreo
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
PEPCK - Fosfoenolpiruvato Carboxiquinase
PI3K – Fosfoinositol 3-Quinase
PIC - Coquetel inibidor de protease
PMSF – Fluoreto de Fenil-Metil-Sulfonil
RT - Transcrição Reversa
SOCS-3 - Supressor da Sinalização de Citocinas do Tipo 3
STAT - Sinal de Transdução e Ativação da Transcrição
T3 – Triiodotironina
T4 – Tiroxina
TAU - Tempo de Relaxamento Isovolumétrico
TG - Tiroglobulina
TNF- α - Fator de Necrose Tumoral-alfa
TR – Receptor de Hormônio Tireoidiano
TRH – Hormônio Liberador de Tireotrofina
TSH – Hormônio Tireoestimulante
TSHR – Receptor de TSH

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Diabetes Mellitus tipo 1	23
3.2 Obesidade	24
3.3 Obtenção de tecidos e soro para análise	25
3.4 Análises Bioquímicas	25
3.5 Análises Moleculares	26
3.6 Análise Histológica	30
3.7 Análise da Função Cardíaca	30
3.8 Análise Estatística	31
4 RESULTADOS	32
4.1 Função Tireoidiana no Diabetes Mellitus.....	32
4.2 Efeitos do tratamento com T3 na expressão do mRNA de D1 no fígado de ratos diabéticos	35
4.3 Efeitos do tratamento com T3 no peso corpóreo, glicemia e sensibilidade à insulina de ratos diabéticos	36
4.4 Efeitos do tratamento com T3 na sinalização da insulina no sóleo, EDL e TAB de ratos diabéticos	37
4.5 Efeitos do tratamento com T3 na concentração sérica de MCP-1, TNF-α e IL-6 de ratos diabéticos	38
4.6 Efeitos do tratamento com T3 na expressão tecidual de TNF-α de ratos diabéticos	39
4.7 Efeitos do tratamento com T3 na expressão tecidual de IL-6 de ratos diabéticos	40

4.8 Histologia do tecido adiposo periepídídimo de ratos diabéticos tratados ou não com T3	41
4.9 Efeitos do tratamento com T3 na concentração sérica de colesterol e triglicérides de ratos diabéticos	42
4.10 Efeitos do tratamento com T3 na função cardíaca de ratos diabéticos	43
4.11 Eficiência da dieta de cafeteria na indução de obesidade	45
4.12 Efeitos do tratamento com T3 na concentração sérica de TSH, T4 e T3 de ratos obesos	46
4.13 Teste de tolerância à insulina e à glicose de ratos obesos tratados ou não com T3	47
4.14 Efeitos do tratamento com T3 na expressão de TNF- α de ratos obesos	49
4.15 Efeitos do tratamento com T3 na expressão de IL-6 de ratos obesos	50
4.16 Efeito do tratamento com T3 na concentração sérica de triglicérides e colesterol de ratos obesos	51
 5 DISCUSSÃO	 52
 6 CONCLUSÃO	 61
 REFERÊNCIAS.....	 62
 ANEXOS	
A - Material Suplementar.....	72
B - Thyroid hormone reduces inflammatory cytokines improving glycemia in type 1 diabetic rats	75

1 INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é a endocrinopatia mais prevalente no planeta. Atualmente, aproximadamente 387 milhões de pessoas no mundo possuem diabetes mellitus, e a expectativa é que em 2035 o número de indivíduos diabéticos aumente para 592 milhões (IDF 2013). O DM é caracterizado por deficiência na produção da insulina, decorrente da apoptose das células beta pancreática (DM1) ou à exaustão das mesmas decorrente de uma resistência à ação deste hormônio (DM2), de importância reconhecida na regulação do metabolismo da glicose, lipídios e proteínas (DESHPANDE; HARRIS-HAYES; SCHOOTMAN, 2008).

Uma das ações mais conhecidas da insulina é a de promover aumento da captação de glicose pelas células. Essa ação se dá por meio da sua interação com receptores de insulina (IR) presentes na membrana plasmática, e depende de uma série de eventos, dentre os quais a fosforilação dos substratos de receptores de insulina (IRS) em tirosina é crucial. Esta etapa da sinalização da insulina encontra-se comprometida na maioria dos casos de resistência à insulina sistêmica (WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2005) e mais recentemente também foi demonstrado que tal comprometimento também se apresenta no DM1 (BJORNSTAD et al., 2015; PANG; NARENDRAN, 2008; YKI-JÄRVINEN; KOIVISTO, 1986).

O TNF- α é considerado um importante mediador da resistência à insulina pela sua capacidade de redução da atividade tirosina cinase do IR, conforme mostram estudos em que o tratamento de células adiposas com TNF- α induziu a fosforilação do IRS-1 em serina e, portanto, conversão do IRS-1 em um inibidor da atividade tirosina cinase do IR (HOTAMISLIGIL et al., 1996).

Assim como o TNF- α , sabe-se que a IL-6 reduz a captação de glicose, porém por mecanismo que envolve a indução da expressão de supressor da sinalização de citocinas do tipo 3 (SOCS-3) via Janus Quinase – Sinal de Transdução e Ativação da Transcrição (JAK-STAT) (HEINRICH et al., 1998). A SOCS-3 inibe a fosforilação do IRS-1/2 em tirosina e sua subsequente associação à subunidade regulatória (p85) da fosfoinositol 3-quinase (PI3-k), promovendo, portanto, menor translocação de

transportador de glicose tipo 4 (GLUT-4) para a membrana plasmática (HOWARD; FLIER, 2006).

Os adipócitos e, principalmente as células do sistema imune, são fontes de citocinas diabetogênicas potentes tais como a interleucina (IL)-1 β e o TNF- α . Estudos clínicos demonstraram que alguns fármacos que bloqueiam a atividade do IL-1 β ou do TNF- α , reduzem a inflamação e a resistência à insulina em pacientes com DM2 (BERCHTOLD et al., 2009; LARSEN et al., 2009; OFEI et al., 1996; YAZDANI-BIUKI et al., 2004).

Embora o tecido adiposo seja, predominantemente, o órgão onde as citocinas são expressas em resposta à obesidade, outros como fígado (CAI et al., 2005), pâncreas (EHSES et al., 2007), cérebro (De SOUZA et al., 2005) e tecido muscular (SAGHIZADEH et al., 1996) também expressam citocinas pró-inflamatórias na vigência da obesidade.

Recentemente, diversos estudos vem apontando uma correlação positiva entre DM e disfunções tireoidianas (BALSAMO et al., 2015; FURUKAWA et al., 2014; PALMA et al., 2013). De fato, o hipotireoidismo tem sido considerado fator de risco para resistência à insulina (CETTOUR-ROSE, 2005; SINGH; GOSWAMI; MALLIKA, 2010), fato corroborado pelo nosso grupo, que demonstrou em ratos hipotireoideos uma redução da sensibilidade à insulina, que foi acompanhada por diminuição do conteúdo de GLUT-4 no tecido muscular esquelético de ratos (BRUNETTO et al., 2012). Por outro lado vários estudos também apontam um quadro de intolerância à glicose na vigência de hipertireoidismo (AHREN, 1986; FOSS et al., 1990).

Ao mesmo tempo, há evidências de que ratos com indução de DM1 por estreptozotocina apresentam redução da atividade do eixo TRH-TSH-HT (MITSUMA; NOGIMORI, 1982; RONDEEL et al., 1992) e alterações tireoidianas características de hipotireoidismo, em decorrência do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio nesse tecido (SANTOS et al., 2013).

Neste contexto, é de extrema relevância estudos para a compreensão dos mecanismos pelos quais as disfunções tireoidianas são associadas ao diabetes mellitus.

O hormônio tireoidiano (HT) exerce seus efeitos fisiológicos a nível celular por meio da sua interação com receptores nucleares específicos (TRs), que são fatores de transcrição induzidos por hormônio (KATZ; LAZAR, 1993), mecanismo pelo qual promove suas ações clássicas, denominadas de genômicas, nucleares ou transcricionais (BASSETT; HARVEY; WILLIAMS, 2003; MOELLER; BROECKER-PREUSS, 2011).

Os TRs se encontram associados a regiões promotoras de genes alvo do HT, e a interação HT-TRs promove repressão ou indução da transcrição dos mesmos. Nesta última condição, ocorre a síntese de proteínas específicas, que causam efeitos biológicos que variam desde ações no desenvolvimento embrionário à manutenção da homeostase energética em adultos (MOTOMURA; BRENT, 1998).

Embora a maioria dos efeitos conhecidos dos HT decorra de suas ações transcricionais, há evidências de que muitas das suas ações são desencadeadas fora do núcleo, e envolvem diferentes vias de sinalização (SENESE et al., 2014). Essas ações não clássicas dos HT, também denominadas de não genômicas, são ainda pouco compreendidas, mas surgem como importante mecanismo acessório das ações dos HT.

Elas são desencadeadas por meio da interação do HT com sítios de ligação presentes na membrana plasmática, citoplasma e citoesqueleto (CHENG; LEONARD; DAVIS, 2010; WRUTNIAK-CABELLO; CASAS; CABELLO, 2001), e incluem efeitos sobre: (a) o comprimento da cauda poli(A) de mRNAs específicos, o que está diretamente relacionado à estabilidade dos mesmos e à sua taxa de tradução em proteínas (BRUNETTO et al., 2012; ROMANO et al., 2013) e (b) etapas pós-traducionais da expressão gênica, interferindo, por exemplo, com a fosforilação de proteínas, mecanismo pelo qual o HT pode aumentar ou reduzir a atividade de enzimas específicas (CAO et al., 2005; TANG et al., 2004) ou também, promovendo a ativação do sistema proteassoma-ubiquitina, a via mais importante de degradação proteica em células de eucariotos (DACE et al., 2000).

Outras etapas de regulação da expressão gênica, como metilação do DNA (SUI; LI, 2012), acetilação de histonas (HADDAD et al., 2010; SUI; LI, 2010), expressão de

microRNAs (ZHAO; SRIVASTAVA, 2007) também podem representar importantes sítios de controle do T3, o que tem sido muito pouco explorado.

O HT influencia diversos processos no nosso organismo. Flutuações dos níveis plasmáticos destes hormônios alteram a taxa de consumo de oxigênio e a produção de calor pelos tecidos, a replicação e o desenvolvimento celular, e o metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas (DIMITRIADIS et al., 2001; POTENZA; VIA; YANAGISAWA et al., 2009). Apesar da noção geral de que a insulina é o principal hormônio responsável pelo controle glicêmico, existem várias evidências biológicas de efeitos sinérgicos do T3 e da insulina no metabolismo glicídico e lipídico (KIM et al., 2002). Um exemplo marcante da relação entre esses hormônios é que a expressão do gene que codifica o GLUT4, proteína altamente expressa no tecido muscular esquelético, cardíaco e adiposo e principal responsável pela manutenção da homeostase glicêmica no período pós-prandial, é regulada positivamente pelo T3 (BRUNETTO et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2012). Da mesma forma, algumas enzimas da lipogênese, como a enzima málica, tem sua síntese estimulada tanto pela insulina, quanto pelo T3 (KATSURADA et al., 1988).

Por outro lado, o aumento da demanda de glicose em estados hipertireoideos é suprido por aumento da sua produção hepática via gliconeogênese, estimulada pelo T3, o qual ativa enzimas importantes desse processo como a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) (WAHRENBERG; WENNLUND; ARNER 1994; WENNLUND et al., 1986). Os substratos utilizados na gliconeogênese são, principalmente, os aminoácidos derivados da proteólise (RIIS et al., 2008) e o glicerol derivado da lipólise, processo que também é regulado pelo T3, via alteração na concentração de norepinefrina local e/ou de receptores adrenérgicos (HALUZIK et al., 2003; NEDVIDKOVA et al., 2004; RIIS et al., 2002;). Além disso, em estados hipertireoideos, observa-se no músculo esquelético aumento do conteúdo de GLUT-4 e da translocação deste para a membrana plasmática (HEATHER et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2013; WEINSTEIN; WATTS; HABER, 1991).

Embora os HT interfiram em diferentes etapas do metabolismo energético, a captação de glicose em resposta a insulina apresenta-se reduzida em pacientes com

hipotireoidismo (DIMITRIADIS et al., 2006), e há evidências de que o mesmo ocorre na vigência de hipertireoidismo (MARATOU et al., 2010).

O nosso grupo investigou as ações do HT na expressão do gene SLC2A4, e da proteína codificada por ele, o GLUT4, a qual, conforme já explicitado, é essencial para a manutenção da homeostase glicêmica no período pós-prandial. Essa proteína vem sendo foco de muitos estudos, em função do aumento alarmante das morbidades associadas ao aumento da resistência à insulina na população mundial. Assim, observamos que o tratamento crônico (5 dias: 5 µg/100 g PC) ou agudo (30 minutos: 100 µg/100 g PC) promoveu melhora da sensibilidade à insulina e aumento do conteúdo total de mRNA e da proteína GLUT4, bem como da translocação desta para a membrana plasmática no tecido muscular esquelético e tecido adiposo de ratos hipotireoideos (BRUNETTO et al., 2012).

Lin e Sun (2010) demonstraram que o T3 estimula a captação de glicose em células adiposas 3T3-L1, via aumento da fosforilação da Akt; no entanto este efeito só pode ser observado na presença de insulina.

Adicionalmente, estudos *in vitro* desenvolvidos no nosso laboratório em células musculares esqueléticas L6 demonstraram que o cultivo destas em meio depletado de HT leva à redução do conteúdo de mRNA e da proteína GLUT4, e da sua translocação para a membrana plasmática, bem como da captação de glicose. A administração de T3 ao meio promoveu reversão rápida dessas alterações (30 minutos). Além disso, observou-se melhor resposta à ação da insulina quando esta foi administrada concomitantemente ao T3, sem que tal associação resultasse em um maior aumento do conteúdo de GLUT4 na membrana plasmática (TEIXEIRA et al., 2012).

Justificativa:

Considerando que na vigência de DM1 e DM2 observa-se resistência à insulina e aumento concomitante da produção de citocinas (GERNER et al., 2013; HALL et al., 2013) e sabendo-se que o hormônio tireoidiano aumenta a captação de glicose pelos tecidos e a sensibilidade à insulina, entendeu-se como pertinente elaborar modelos experimentais de DM1 e obesidade e avaliar os efeitos do T3 na sensibilidade à insulina e na expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF-α e IL-6.

2 OBJETIVOS

Investigar os possíveis efeitos do tratamento crônico com T3 na modulação da expressão de citocinas, que interferem com a sinalização da insulina, no tecido adiposo branco periepididimal e muscular, bem como suas repercussões sobre a homeostase glicídica, em:

- (a) ratos diabéticos, por indução com aloxana.
- (b) ratos obesos, por administração de dieta com alto teor de ácidos graxos saturados (dieta de cafeteria).

Para tal avaliamos:

- a concentração sérica de glicose, colesterol, triglicérides, citocinas bem como, de T3, T4 e TSH;
- a sensibilidade à insulina em resposta ao tratamento com T3 ou GC-1;
- o conteúdo protéico de TNF- α e IL-6 nos tecidos musculares (sóleo e EDL) e adiposo branco periepididimal;
- aspectos histológicos do tecido adiposo branco periepididimal e tireóide;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Diabetes Mellitus tipo 1

Foram utilizados ratos machos Wistar, jovens, com peso em torno de 200–250 g, provenientes do biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, onde foram mantidos sob condições padronizadas de temperatura ambiental (23 ± 2 °C) e ciclo claro/escuro (12/12 h diárias). A água e a alimentação foram fornecidas *ad libitum*. Para indução do diabetes mellitus, parte dos animais recebeu uma injeção única de aloxana (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) intraperitonealmente (150 mg/Kg de peso corpóreo) (SALIL; NEVIN; RAJAMOHAN, 2011). Após 15 dias, a glicemia foi quantificada e os animais que apresentaram valores de glicemia maiores que 250 mg/dL foram incluídos no estudo. Os animais diabéticos foram então subdivididos em grupos que receberam tratamento crônico com T3 e GC-1, enquanto os não diabéticos (euglicêmicos) constituíram o grupo controle, conforme especificado abaixo e esquematizado na figura 1.

1. grupo euglicêmico (C);
2. grupo diabético tratado com salina (D) por 4 semanas;
3. grupo diabético tratado com T3 na dose suprafisiológica – 1,5 µg/100 g de peso corporal (DT₃) por 4 semanas;
4. grupo diabético tratado com GC-1 em dose equimolar à 5 X a dose fisiológica de T3/ 100 g de peso corporal (DGC-1) por 4 semanas.

Após o período de tratamento os animais foram submetidos ao jejum de 12 horas para realização do teste de tolerância à insulina (ITT) no qual uma dose de 1U de insulina regular humana foi administrada intraperitonealmente e após 5, 10, 15, 20 e 30 minutos, o sangue foi coletado por punção caudal e a glicemia foi quantificada em glicosímetro (Optium Xceed-Abbott).

Figura 1 - Desenho experimental dos grupos utilizados no estudo no modelo de Diabetes Mellitus tipo 1.

3.2 Obesidade

Para indução da obesidade parte dos animais recebeu dieta de cafeteria composta por diversos alimentos hipercalóricos como bolacha wafer de chocolate, bolacha amanteigada, salame, bacon e confete de chocolate. A escolha desse modelo experimental foi baseada no estudo de Sampey et al., (2011) no qual foi demonstrado que a eficiência da dieta de cafeteria se compara à dieta hiperlipídica na indução de obesidade, síndrome metabólica e inflamação no tecido adiposo de ratos Wistar. Após 16 semanas de dieta de cafeteria, os animais foram, então, subdivididos em grupos não tratados (C) ou tratados com T3 durante 4 semanas conforme especificado abaixo, e esquematizado na figura 2:

1. grupo não obeso (C);
2. grupo obeso tratado com salina (O) por 4 semanas;
3. grupo obeso tratado com T3 na dose suprafisiológica – 1,5 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de peso corporal (OT_3) por 4 semanas;

Figura 2 - Desenho experimental dos grupos utilizados no estudo no modelo de Obesidade.

Após o período de tratamento os animais foram submetidos ao jejum de 12 horas para realização do teste de tolerância à insulina (ITT), conforme descrito anteriormente.

Além do ITT, os animais deste estudo foram submetidos ao teste de tolerância à glicose (**GTT**), no qual a glicose foi administrada oralmente por gavagem (1 g / kg de peso corpóreo / 45% glicose), e após 30, 60, 90, 120 e 150 minutos o sangue foi coletado por punção caudal e a glicemia quantificada em glicosímetro (Optium Xceed-Abbott).

3.3 Obtenção de tecidos e soro para análise:

Para a retirada dos tecidos de interesse, os animais diabéticos, obesos e seus controles foram anestesiados com tiopental (80 mg/ Kg de peso corpóreo). O soro foi obtido do tronco, após decapitação dos animais.

3.4 Análises Bioquímicas:

3.4.1 Colesterol e Triglicérides:

A determinação da concentração sérica de colesterol total e triglicérides foi realizada por reação colorimétrica (Labtest SA, Lagoa Santa, MG, Brazil), de acordo

com as recomendações do fabricante.

3.4.2 TSH, T3, T4 e citocinas:

A concentração dos hormônios tireoidianos (T4 e T3), de hormônio tireotrófico (TSH) e das citocinas no soro foi determinada por meio de um kit específico MILLplex (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA), conforme as instruções do fabricante (ELSHAL; MCCOY, 2006; CALIL-SILVEIRA et al., 2012).

3.4.3 Insulina:

Para avaliação da concentração sérica de insulina foi utilizada a técnica de radioimunoensaio conforme descrito por Pupo et al., (1970). Amostras contendo albumina (BSA 0,25%), anticorpo anti-insulina (1:50) e de insulina marcada (¹²⁵I) (1:300), foram incubadas a 4 °C por 48 horas. Após este período foram acrescentados às amostras 100 µl de soro carreador (soro de rato) e 1 ml de PEG 15% (polietilenoglicol em tampão borato, pH 8,0). Os tubos foram agitados e centrifugados a 2000 g por 30 minutos, a 4 °C. Posteriormente, o sobrenadante foi aspirado e a atividade do precipitado, que contém os complexos Ag-Ac, foi mensurada em contador gama (γ) (Perkin Elmer, Life Sciences).

3.5 Análises Moleculares:

A avaliação da expressão de proteínas e do mRNA de interesse foi realizada por Western blotting e PCR em tempo real, respectivamente.

WESTERN BLOTTING

3.5.1 Preparo das amostras para análise da expressão de proteínas

p-Akt/Akt: o tecido adiposo branco periepídimal (TAB) e os músculos sóleo e extensor digital longo (EDL) direitos foram removidos. Em seguida, foram injetados na veia jugular 10U de insulina regular humana. Após 1 minuto e 30 segundos o TAB e músculos sóleo e EDL esquerdos foram removidos. Os tecidos foram homogeneizados

em tampão composto por cloreto de sódio 137 mM; cloreto de potássio 2,7 mM; cloreto de magnésio 1 mM; EDTA 1 mM; pirofosfato de sódio 5 mM; fluoreto de sódio 10 mM; Triton X-100 1%; glicerol 10%; Tris pH 7,8 20 mM; PMSF (fluoreto de fenil-metano-sulfonil) 0,2 mM; ortovanadato de sódio 0,5 mM e PIC 1:100 (Coquetel inibidor de protease).

TNF- α e IL-6: o TAB e os músculos (sóleo e EDL) foram homogeneizados em tampão composto por sacarose 250 mM; hepes 20 mM; azida de sódio 5 mM; EDTA 2 mM; fluoreto de sódio 10 mM; pirofosfato de sódio 100 mM; ortovanadato de sódio 10 mM; ácido okadaico 1:10000; PMSF e PIC 1:100.

NIS, TSHR e TG: A tireoide foi homogeneizada em tampão RIPA composto por 50 mM Tris (pH 8), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0,5% deoxicolato de sódio, 0,1% SDS suplementado com PIC 1:100.

Todos os componentes dos tampões utilizados foram obtidos da Synth (Synth, Diadema, SP, BRA) e Sigma.

Os homogeneizados foram transferidos para tubos eppendorf e centrifugados a 12000 rpm, por 40 min, a 4°C.

3.5.2 Dosagem das Proteínas pelo Método de Bradford

A concentração protéica dos homogeneizados foi avaliada pelo método de Bradford (Bio-Rad, Dye Reagent Concentrate).

Assim, foi preparada uma solução de albumina bovina para a confecção de uma curva (pontos: 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; 0,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; 0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), cujas amostras correspondentes foram aplicadas na placa de Elisa [6 μl da amostra e 300 μl do reagente de Bradford (Bio Rad, Hercules, CA, USA) diluído em água deionizada (1:5)]. Após incubação por 10 min na ausência de luz, realizou-se a leitura das amostras em espectrofotômetro a 595 nm.

3.5.3 Western Blotting (SDS- PAGE)

Após a dosagem protéica, 45 µg de proteínas totais foram previamente aquecidas por 5 min a 100 °C em uma mistura contendo 0,05 M Tris HCl pH 6,8, 15% glicerol, 0,05 % azul de bromofenol, SDS (dodecil sulfato de sódio) 10% e mercapto-etanol 6% (Laemmeli).

Em seguida, as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida composto por: um gel de empacotamento, **Stacking Gel (4%)** contendo acrilamida 30%, Tris 1,0 M (pH= 6,8), SDS 10%, APS (persulfato de amônia) 10%, Temed e Água Milli-Q (qsp) e por um gel de separação, **Running Gel (10 %)** constituído por acrilamida 30%, Tris 1,5 M (pH= 8,8), SDS 10%, APS 10%, Temed e Água Milli-Q (qsp). Posteriormente as amostras foram submetidas à eletroforese em tampão apropriado [25 mM de Tris – Base, 192 mM de ácido aminoacético, e SDS 0,1%]. A voltagem foi mantida em 40 V até as amostras atravessarem o *stacking gel* e em aproximadamente 90 V durante a passagem pelo gel de separação. Uma alíquota de marcador de peso molecular (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) foi aplicada em uma das colunas do gel para se estimar a localização da banda correspondente à proteína de interesse.

Após a eletroforese, realizou-se a transferência das proteínas do gel para uma membrana de PVDF que foi previamente ativada em metanol. A transferência das proteínas do gel para a membrana foi realizada em tampão 25 mM de Tris – Base, 192 mM de Glicina e Metanol 20%. Após a transferência, o sistema foi desmontado cuidadosamente e a membrana foi corada com Vermelho Ponceau, por aproximadamente 3 min, para avaliar a qualidade da transferência. Em seguida a membrana foi incubada em solução bloqueadora (0,05 M Tris HCl; Tween 20; NP-40, azida sódica e albumina) *overnight*, sob agitação constante e à temperatura de 4 °C (essa solução tem por objetivo saturar a membrana para minimizar as ligações inespecíficas que possam ocorrer ao longo das etapas seguintes).

Após o bloqueio das membranas deu-se a incubação das mesmas com os anticorpos específicos: anti-pAkt S473 [Cell Signalling, Danvers, MA, UK, (9271S), 1:1000]; anti-Akt [Cell Signalling, (9272S), 1:1000]; anti-TNF-α [Abcam, Cambridge, MA, UK, (ab9755), 1:1000]; anti-IL-6 [Abcam, (ab83339), 1:1000], anti-receptor de TSH

(TSHR) [Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA, (SAB2102588), 1:1000], anti-tiroglobulina (TG) [Abcam, (ab80783), 1:5000], anti-co-transportador sódio-iodeto (NIS) [gentilmente concedido pela Dr. Nancy Carrasco, 1:3000], de acordo com as recomendações do fabricante.

A detecção dos blots foi realizada com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA, USA) e Kit de quimiluminescência (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA).

A abundância das proteínas foi estimada por meio da análise densitométrica das bandas pelo software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Os resultados estão expressos em unidades arbitrárias (UA).

RT-PCR

3.5.4 Preparo das amostras para análise da expressão do mRNA da 5' desiodase do tipo 1 (D1)

O fígado foi homogeneizado com TRIzol (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e o RNA total foi extraído por meio do kit PureLink RNA Mini Kit (Life Technologies), de acordo com as instruções do fabricante. A integridade do RNA, a reação de transcrição reversa (RT) e a reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa em tempo real foram obtidas conforme descrito previamente (SERRANO-NASCIMENTO et al., 2010). O PCR em tempo real foi realizado com *Platinum SYBER Green quantitative PCR SuperMix UDG* e primers específicos para a 5'- desiodase do tipo I (Dio1) (*sense*: ATTTGACCAGTTCAAGAGACTCGTAG; *anti-sense*: GGCGTGAGCTTCTTCAATGTA; 82 bp) e ciclofilina, usado como controle interno (*sense*: CTGTCTCTTTTCGCCGCTTG; *anti-sense*: TCTGCAAACAGCTCGAAGCA; 108 bp). As alterações de expressão relativa da D1 foram calculadas usando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

3.6 Análise Histológica

Os fragmentos de TAB foram fixados em 4% paraformaldeído, pH 7,4, por 24 h, a 4 °C, para a fixação. A tireoide foi removida e fixada em formalina 10% por 24 h, a 4 °C.

As amostras foram então desidratadas com concentrações crescentes de álcool: 70, 95 e 100%. Após a desidratação foram clarificadas com banhos de xilol e, finalmente incrustadas em parafina Paraplast X-tra (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) e emblocados em *Tissue Cassetes* (Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA). Foram obtidos cortes de 5 µm de espessura por meio do micrótomo rotatório R Jung-Heidelberg, os quais foram colocados sobre lâminas previamente cobertas com polilisina.

Os cortes foram desparafinizados com 2 banhos sucessivos de 30 min de xilol. A seguir foram hidratados em e banhos de 5 min com concentrações decrescentes de álcool: 100, 95 e 70%, respectivamente, e, por fim, lavados em água destilada.

A coloração com HeE (Hematoxilina e Eosina) foi realizada após a desparafinização e hidratação das lâminas na seguinte sequência: i) 2 min com hematoxilina; e ii) 1 min com eosina. Após o processo de coloração, a lâmina foi fechada com permonte.

As imagens foram obtidas utilizando um microscópio óptico Leica, modelo DMLP, com câmera CCD LG, modelo GC-415N-MD. Para cada corte histológico foram capturadas 5 imagens coradas com HeE, por animal.

3.7 Análise da função cardíaca:

Os animais foram anestesiados com halotano (5% O₂ inspirado) para o acesso à veia e artéria femoral por meio da inserção de cateter (PE-10 conectado a PE-50, Clay Adams, Parsippany, NJ, USA). No dia seguinte, a pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM) bem como a frequência cardíaca (FC) foram monitoradas por meio da conexão do cateter arterial ao transdutor de pressão (MLT844,

ADInstruments, Sydney, NSW, Australia) acoplado a um pre-amplificador (ML224 Quad Bridge, ADInstruments, New South Wales, Australia) conectado ao sistema Powerlab LabChart, software. A taxa de aquisição do sinal foi de 1000Hz, posteriormente analisada no modo off-line. Após o registro da pressão arterial, os animais foram anestesiados por meio da infusão intravenosa de uretana (1,2 g/kg BW) no catéter da veia femoral. O ventrículo esquerdo foi então acessado (por meio da inserção de um catéter de polietileno -PE-50, Clay Adams, Parsippany, NJ, USA- na artéria carótida) para a mensuração da 1° derivada temporal da pressão ventricular no período de aumento ($+dp/dt_{max}$), da 1° derivada temporal da pressão ventricular no período de queda ($-dp/dt_{min}$), do índice de contratilidade cardíaca (IC), do tempo de relaxamento isovolumétrico (TAU), e da dp/dt no período de relaxamento isovolumétrico (IRP), por meio do sistema Powelab previamente descrito.

3.9 Análise Estatística

Os dados estão expressos por média $\pm$ SEM, e as diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Os resultados foram comparados utilizando-se a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de comparações múltiplas Student-Newman-Keuls (Package: Prism Graph Pad – Version: 4.0).

4 RESULTADOS

Considerando que o estudo compreende a avaliação dos efeitos do tratamento com T3 no modelo de DM1 e obesidade, os resultados obtidos serão apresentados separadamente.

Diabetes Mellitus Tipo 1

4.1 Função Tireoidiana no Diabetes Mellitus

Concentração sérica de TSH, T4 e T3: A figura 3 mostra que as concentrações séricas de TSH (Fig. 3A) apresentaram-se expressivamente elevadas nos ratos diabéticos, e foi drasticamente reduzida após tratamento com T3. A concentração sérica de T4 (Fig. 3B) mostrou-se reduzida nos ratos DM1(D) e o tratamento com T3 promoveu uma redução ainda maior (DT₃) quando comparados aos animais do grupo controle (C). Os valores séricos de T3 (Fig. 3C) permaneceram inalterados.

Figura 3 - Representação gráfica da concentração sérica de TSH, T4 e T3 de ratos controle (C), diabéticos (D) e diabéticos tratados com T3 (DT₃). **A.** TSH, **B.** T4, **C.** T3. Os dados estão expressos pela média ± SEM. * $p < 0,05$ vs C, & $p < 0,05$ vs D. (n = 6).

Conteúdo de NIS, TSHR, TG: As figuras 4A, 4B e 4C demonstram que na vigência do diabetes ocorreu redução da expressão tireoidiana de NIS (Fig. 4A) e TSHR (Fig. 4B). O tratamento com T3 reduziu ainda mais a expressão de NIS e aumentou a expressão de TSHR. Além disso, há tendência de aumento no conteúdo de TG (Fig. 4C) nos animais DM1 em comparação ao grupo controle, e o tratamento com T3 aumentou ainda mais esse parâmetro.

Figura 4 - Representação gráfica do conteúdo proteico de NIS (A), TSHR (B) e TG (C) na tireoide de ratos controle (C), diabéticos (D) e diabéticos tratados com T3 (DT₃). Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM e normalizados pela membrana corada com Ponceau (Figura 3 material suplementar). * p < 0,05 vs C, & p < 0,05 vs D. (n = 7).

Morfologia da Tireoide: Na figura 5 estão representadas as imagens de cortes histológicos da tireoide coradas com H&E de ratos controle, diabéticos e diabéticos tratados com T3 (DT₃). Vale notar que o diabetes também induziu alteração na morfologia da tireoide, na qual os folículos apresentaram-se ligeiramente maiores e ao redor dos mesmos observou-se a presença de maior quantidade de matriz extracelular, quando comparados aos animais do grupo controle. Os animais diabéticos tratados com T3 apresentaram folículos ainda maiores, tirócitos achatados e maior abundância de matriz extracelular ao redor dos folículos.

Figura 5 - Imagem representativa de cortes histológicos da tireoide de ratos controle, diabéticos e diabéticos tratados com T3 (Diabetes + T₃) corados com H&E. Aumento de 10X e 40X.

4.2 Efeitos do tratamento com T3 na expressão do mRNA de D1 no fígado de ratos diabéticos

Os dados obtidos nessa análise encontram-se representados na figura 6. Observa-se que a expressão da D1 apresentou uma redução de aproximadamente 65% nos animais DM1 (D) vs controle (C), enquanto que o tratamento com T3 promoveu aumento aproximado de 3 vezes no conteúdo desse transcrito vs ratos D. Um aumento de 40% foi observado na expressão de mRNA de D1 em ratos DM1 tratados com T3 quando comparados aos ratos controles.

Figura 6 - Representação gráfica da expressão de mRNA de Dio1 no fígado de ratos controle (C), diabéticos (D) e diabéticos tratados com T3 (DT₃), analisada por PCR em tempo real. Os dados estão expressos pela média ± SEM, normalizada pela expressão de mRNA de ciclofilina. * $p < 0,05$ vs C, & $p < 0,05$ vs D. (n = 7).

4.3 Efeitos do tratamento com T3 no peso corpóreo, glicemia e sensibilidade à insulina de ratos diabéticos

As figuras 7A, 7B e 7C apresentam os valores do peso corpóreo, glicemia e sensibilidade à insulina, respectivamente, referentes a este estudo.

O peso corpóreo dos animais diabéticos tratados ou não com T3 apresentou redução de aproximadamente 23 e 30%, respectivamente (Fig. 7A) comparado aos animais do grupo controle. O tratamento dos animais diabéticos com GC-1, um agonista de TR β , provocou uma redução ulterior do peso corporal (~42%).

A glicemia de jejum apresentou-se 4 vezes aumentada nos animais diabéticos (D) em relação ao grupo controle (C). No entanto, o tratamento dos ratos diabéticos com T3 (DT₃) promoveu redução em 50% desse parâmetro quando comparado aos animais não tratados, efeito que não foi observado no grupo de diabéticos tratados com GC-1 (DGC-1). A análise do kITT mostra que a sensibilidade à insulina apresentou-se reduzida nos grupos diabético não tratados (D) e diabético tratados com GC-1 (DGC-1). Em contrapartida, os animais diabéticos tratados com T3 apresentaram restabelecimento da sensibilidade à insulina a valores do grupo controle.

Figura 7 - Representação gráfica do peso corpóreo (A), glicemia (B) e sensibilidade à insulina (C) de ratos controle (C), diabético (D), diabético tratado com T3 (DT₃) e diabético tratado com GC-1 (DGC-1). Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ vs C, & $p < 0,05$ vs D e DGC-1, \$ $p < 0,05$ vs C e DT₃ (n=10-12).

4.4 Efeitos do tratamento com T3 na sinalização da insulina no sóleo, EDL e TAB de ratos diabéticos

As figuras 8A, 8B e 8C representam os valores do conteúdo de Akt fosforilada em serina nos estados basal (sem estímulo de insulina) e estimulado com insulina nos músculos sóleo, EDL e TAB, respectivamente.

A fosforilação da Akt em resposta à insulina não é alterada na vigência de diabetes; no entanto, o tratamento com T3 promoveu aumento do conteúdo de Akt fosforilada em resposta à insulina, em ambos os músculos estudados (Fig. 8A e 8B). O conteúdo desta proteína apresenta uma tendência à redução no TAB nos animais diabéticos não tratados e a aumento nos grupos tratados com T3 (Fig. 8C).

Figura 8 - Representação gráfica do grau de fosforilação da proteína Akt, antes e após estímulo com insulina, no músculo sóleo (**A**), músculo EDL (**B**) e TAB (**C**) de ratos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com T3 (DT₃). Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ vs C e D com estímulo de insulina. (n = 9).

4.5 Efeitos do tratamento com T3 na concentração sérica de MCP-1, TNF- α e IL-6 de ratos diabéticos

As figuras 9A, 9B e 9C representam os valores séricos de MCP-1, TNF- α e IL-6, respectivamente, nos animais dos diferentes grupos estudados. Observa-se uma tendência ao aumento de proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) e aumento expressivo de TNF- α nos animais do grupo diabético não tratado quando comparado aos animais controles. No entanto, quando os animais diabéticos foram submetidos ao tratamento crônico com doses supra-fisiológicas de T3, as concentrações séricas destas proteínas foram significativamente reduzidas. A concentração sérica de IL-6 apresentou redução, embora não significativa, nos animais deste mesmo grupo experimental.

Figura 9 - Representação gráfica do conteúdo de MCP-1 (A), TNF- α (B) e IL-6 (C) no soro de ratos dos grupos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com T3 (DT₃). Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ vs C; & $p < 0,05$ vs D. (n = 7).

4.6 Efeitos do tratamento com T3 na expressão tecidual de TNF- α de ratos diabéticos.

As figuras 10A, 10B e 10C ilustram o conteúdo total de TNF- α nos músculos sóleo, EDL e no TAB, respectivamente, dos animais do estudo apresentado acima. Os animais do grupo diabético apresentaram aumento do conteúdo de TNF- α no músculo sóleo (Fig. 10A) e TAB (Fig. 10C). O tratamento desses animais com T3 promoveu redução significativa no conteúdo dessa proteína nesses territórios. No músculo EDL (Fig. 10B), houve apenas tendência às mesmas alterações.

Figura 10 - Representação gráfica do conteúdo de TNF- α no músculo sóleo (A), músculo EDL (B) e TAB (C) de ratos controle (C), diabéticos (D) e diabéticos tratados com T3 (DT₃). Acima dos gráficos encontram-se os blots representativos de 1 dentre 3 experimentos realizados. Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM, normalizados pela membrana corada com Ponceau (Figura 1 material suplementar).

* $p < 0,05$ vs C, & $p < 0,05$ vs D. (n = 9).

4.7 Efeitos do tratamento com T3 na expressão tecidual de IL-6 de ratos diabéticos

As figuras 11A, 11B e 11C ilustram o conteúdo total de IL-6 no músculo sóleo, EDL e TAB, respectivamente. De forma semelhante ao que ocorreu com o TNF- α , os animais do grupo diabético apresentaram aumento do conteúdo de IL-6 no músculo sóleo (Fig. 11A) e no TAB (Fig. 11C), e o tratamento crônico com T3 promoveu redução significativa do conteúdo desta citocina. No músculo EDL (Fig. 11B) não foi observado nenhuma alteração.

Figura 11 - Representação gráfica do conteúdo de IL-6 no músculo sóleo (A), EDL (B) e TAB (C) de ratos controle (C), diabéticos (D) e diabéticos tratados com T3 (DT₃). Acima dos gráficos encontram-se os blots representativos de 1 dentre 3 experimentos realizados. Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM, normalizados pela membrana corada com Ponceau (Figura 2 material suplementar). * $p < 0,05$ vs C, & $p < 0,05$ vs D. (n = 9).

4.8 Histologia do tecido adiposo periepídídimo de ratos diabéticos tratados ou não com T3

Na figura 12 estão representados os cortes histológicos realizados no TAB. O TAB dos animais diabéticos apresenta células adiposas menores e presença de grande quantidade de células inflamatórias, quando comparado ao grupo controle. O TAB dos ratos diabéticos tratados com T3 (DT₃) apresentou células adiposas maiores e com menor quantidade de células inflamatórias, quando comparado ao grupo diabético não tratado, sendo o aspecto apresentado muito parecido ao do grupo controle.

Figura 12 - Imagem representativa de cortes histológicos do TAB de ratos controle, diabéticos e diabéticos tratados com T3 (Diabetes + T₃) corados com H&E. Aumento de 40X.

4.9 Efeitos do tratamento com T3 na concentração sérica de colesterol e triglicérides de ratos diabéticos

A figura 13A representa os valores da concentração sérica de triglicérides e a 13B, os de colesterol total dos animais dos referidos grupos experimentais. Observa-se aumento significativo da concentração de triglicérides e colesterol séricos no grupo de animais diabéticos não tratados (D) quando comparados ao grupo controle (C). No entanto, como pode se observar na figura 13A, os animais diabéticos tratados com T3 (DT₃) apresentaram redução expressiva dos níveis de triglicérides, retornando aos valores dos animais do grupo controle. Quanto ao colesterol sérico, o tratamento com T3 reduziu levemente esse parâmetro (NS).

Figura 13 - Representação gráfica da concentração sérica de triglicérides (**A**) e colesterol (**B**) de ratos controle (C), diabético (D) e diabéticos tratados com T3 na (DT₃). Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ vs C, & $p < 0,05$ vs D. (n = 12).

4.10 Efeitos do tratamento com T3 na função cardíaca de ratos diabéticos

Os parâmetros relacionados a atividade cardíaca, tais como peso do coração, pressão arterial, frequência cardíaca e força contrátil estão apresentados na tabela 1.

Observa-se que o coração dos ratos DM1 tratados com T3 apresentou aumento de 44% da relação peso seco/peso corpóreo quando comparado aos animais do grupo controle e do grupo diabético não tratado. O tratamento com T3 aumentou a frequência cardíaca em 37%, a dp/dt_{max} e dp/dt_{min} em 47% e 51%, respectivamente, e o índice de contratilidade em 56% comparado aos ratos diabéticos não tratados. Além disso, os animais diabéticos tratados com T3 apresentaram redução de 30% no tempo de relaxamento isovolumétrico (TAU) em relação aos animais do grupo controle e, aumento de 70% na dp/dt no período de relaxamento isovolumétrico (IRP) comparados aos animais diabéticos. Não foram observadas alterações significativas na pressão arterial dos ratos DM1 tratados com T3 em relação aos animais dos grupos D e C.

Tabela 1. Peso cardíaco e parâmetros hemodinâmicos

Parâmetros	C	D	DT ₃
PCS/PC	$0,85 \times 10^{-3} \pm 0,05$	$0,84 \times 10^{-3} \pm 0,03$	$1,21 \times 10^{-3} \pm 0,06^{*\&}$
FC (batimentos/min)	$331 \pm 10,7$	$252 \pm 10,9^*$	$347 \pm 15,7^{\&}$
PAS (mmHg)	$141,8 \pm 5,4$	$133,5 \pm 8,2$	$160,3 \pm 4,4$
PAD (mmHg)	$94,5 \pm 6,4$	$107,8 \pm 8,9$	$96,2 \pm 5,6$
PAM (mmHg)	$115,5 \pm 4,2$	$125,4 \pm 9,1$	$121,0 \pm 5,7$
dp/dt _{max}	11204 ± 679	11515 ± 1326	$16960 \pm 1815^{*\&}$
dp/dt _{min}	$7854 \pm 1,321$	7453 ± 1304	$11276 \pm 1407^{\&}$
IC (ml/min.g)	$149,6 \pm 8,46$	$150,0 \pm 12,88$	$234,6 \pm 12,56^{*\&}$
TAU (s)	$0,013 \pm 0,001$	$0,010 \pm 0,001$	$0,009 \pm 0,001^*$
IRP (mmHg/s)	$5442 \pm 822,5$	$3193 \pm 699,8$	$8671 \pm 960,7^{*\&}$

Peso cardíaco seco/peso corpóreo (PCS/PC), Frequência cardíaca (FC), Pressão Arterial Sistólica (PAS), Pressão Arterial Diastólica (PAD), Pressão Arterial Média (PAM), 1° derivada temporal da pressão ventricular no período de aumento (+dp/dt_{max}) 1° derivada temporal da pressão ventricular no período de queda (-dp/dt_{min}), índice de contratilidade ventricular (IC), do tempo de relaxamento isovolumétrico (TAU), e da dp/dt no período de relaxamento isovolumétrico (IRP) de ratos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com T3 (DT₃).

Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM.

* $P < 0.05$ vs C, & $P < 0.05$ vs D. (n=7).

A seguir, estão representados os dados obtidos nos estudos relacionados aos efeitos do T3 em ratos submetidos à dieta de cafeteria.

Obesidade

4.11 Eficiência da dieta de cafeteria na indução de obesidade

A figura 14 representa a evolução do peso corpóreo dos ratos do grupo controle (C), obeso (O) e obeso tratado com T3 (OT₃) ao longo de todo o período experimental. Os animais alimentados com dieta de cafeteria (O e OT₃) apresentaram aumento significativo do peso corpóreo em relação aos animais do grupo controle a partir da terceira semana de dieta. No entanto, os animais obesos que receberam tratamento com T3 começam a apresentar redução progressiva do peso corpóreo a partir da primeira semana de tratamento.

Figura 14 - Gráfico representativo do peso corpóreo de ratos controle (C), obesos (O) e obesos tratados com T3 (OT₃) a longo do período experimental. Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM. * $p < 0,01$ vs C; ** $p < 0,001$ vs C, & $p < 0,01$ vs O. (n = 12).

4.12 Efeitos do tratamento com T3 na concentração Sérica de TSH, T4 e T3 de ratos obesos

A figura 15 representa as concentrações séricas de TSH, T3 e T4 dos animais deste modelo experimental. Como pode ser observado, os animais obesos apresentaram redução de 57% da concentração sérica de TSH quando comparado aos animais do grupo controle. Os animais obesos tratados com T3, como esperado, apresentaram uma redução de 60% deste parâmetro quando comparado aos animais obesos não tratados. No entanto, a concentração sérica de T4 apresentou-se reduzida apenas no grupo obeso tratado com T3 (~33% vs O). A concentração sérica de T3 não foi alterada nos grupos experimentais analisados.

Figura 15 - Representação gráfica da concentração sérica de TSH (A), T4 (B) e T3 (C) de ratos controle (C), obesos (O) e obesos tratados com T3 (OT₃). Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ vs C, & $p < 0,05$ vs O. (n = 12).

4.13 Teste de tolerância à insulina e à glicose de ratos obesos tratados ou não com T3

Na figura 16A estão representados os valores de glicemia após um período de restrição alimentar de 6 horas; na figura 16B e 16C, as curvas de decaimento da glicose sérica e a constante de decaimento da glicose no teste de tolerância à insulina, respectivamente; na figura 16D e 16E, as curvas de decaimento da glicose sérica e a área sobre a curva obtida no teste de tolerância à glicose, respectivamente; e na figura 16F, os valores da concentração sérica de insulina.

Os animais dos grupos obesos (O e OT₃) apresentaram valores glicêmicos maiores em relação aos animais do grupo controle (C). No entanto, os animais do grupo obeso tratado com T3 (OT₃) apresentaram resposta de maior magnitude no teste de tolerância à insulina e no teste de tolerância à glicose comparada aos animais do grupo obeso não tratado (O). Além disso, foi observada maior concentração de insulina sérica nos animais obesos tratados com T3 (OT₃) vs C e O.

Figura 16 - Representação gráfica da glicemia (**A**), das curvas da glicemia durante o ITT (**B**), sensibilidade à insulina (**C**); das curvas da glicemia durante o GTT (**D**), da área sobre a curva (AUC) do GTT (**E**) e da insulinemia (**F**) de ratos controle (C), obeso (O) e obeso tratado com T3 (OT₃). Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ vs C, [&] $p < 0,05$ vs O. (n = 12).

4.14 Efeitos do tratamento com T3 na expressão de TNF- α de ratos obesos

As figuras 17A, 17B e 17C representam o conteúdo total de TNF- α nos músculos sóleo, EDL e TAB, respectivamente.

Os animais do grupo obeso apresentaram aumento do conteúdo de TNF- α no músculo sóleo (não significativo) (Fig. 17A) e EDL (Fig. 17B). No TAB (Fig. 17C), não houve alteração do conteúdo desta citocina em resposta à dieta de cafeteria. O tratamento crônico com T3 na dose suprafisiológica promoveu redução significativa desta proteína, no músculo sóleo e no TAB, enquanto que no músculo EDL, o tratamento com T3 não promoveu nenhuma alteração.

Figure 17 - Representação gráfica do conteúdo de TNF- α no músculo sóleo (A), músculo EDL (B) e TAB (C) de ratos controle (C), obeso (O) e obeso tratado com T3 (OT₃). Os blots representativos de 1 experimento dentre 3 encontram-se acima dos gráficos. Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM, normalizados pela membrana corada com Ponceau (Figura 4 material suplementar). * $p < 0,05$ vs C, & $p < 0,05$ vs O. (n = 12).

4.15 Efeitos do tratamento com T3 na expressão de IL-6 de ratos obesos

As figuras 18A, 18B e 18C representam o conteúdo total de IL-6 no músculo sóleo, EDL e TAB, respectivamente. No músculo sóleo (Fig. 18A) não foi observada nenhuma alteração no conteúdo de IL-6 em resposta à dieta de cafeteria, no entanto, o tratamento com T3 reduziu expressivamente o conteúdo da mesma. No TAB (Fig. 18C) dos animais obesos, foi observado aumento sutil (NS) do conteúdo proteico de IL-6 e, redução significativa nos animais obesos tratados cronicamente com T3. No músculo EDL (Fig. 18B) não foi observada nenhuma alteração significativa da expressão desta proteína.

Figure 18 - Representação gráfica do conteúdo de IL-6 no músculo sóleo **(A)**, EDL **(B)** e TAB **(C)** de ratos controle (C), obesos (O) e obesos tratados com T3 (OT₃). Os blots representativos de 1 experimento dentre 3 encontram-se acima dos gráficos. Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM, normalizados pela membrana corada com Ponceau (Figura 5 material suplementar). & $p < 0,05$ vs C e O. (n = 12).

4.16 Efeitos do tratamento com T3 na concentração sérica de triglicérides e colesterol de ratos obesos

A figura 19A representa os valores da concentração sérica de triglicérides e a 19B, os de colesterol total. Observa-se aumento significativo de ambas no grupo de animais obesos (O) quando comparados ao grupo controle (C). No entanto, como pode se observar na figura 19A, os animais obesos tratados com T3 (OT₃) apresentaram redução expressiva dos níveis de triglicérides. Quanto ao colesterol sérico, o tratamento com T3 reduziu sutilmente esse parâmetro (NS).

Figura 19 - Representação gráfica da concentração sérica de triglicérides e colesterol de ratos controle (C), obeso (O) e obeso tratado com T3 (OT₃). **A.** Triglicérides. **B.** Colesterol. Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ vs C, & $p < 0,05$ vs O. (n = 12).

5 DISCUSSÃO

O tratamento com hormônio tireoidiano promoveu redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6), as quais estão envolvidas com o desenvolvimento da resistência à insulina na vigência do DM1 e DM2, no músculo sóleo e tecido adiposo periepídimal de ratos diabéticos e ratos obesos. Tal alteração foi acompanhada de redução da glicemia e melhora expressiva da sensibilidade à insulina nos ratos diabéticos.

Diversos estudos demonstraram correlação positiva entre DM e disfunção tireoidiana. A prevalência de disfunções tireoidianas em indivíduos diabéticos é maior em comparação com indivíduos normais (KADIYALA; PETER; OKOSIEME, 2010; PERROS et al., 1995). De fato, o modelo experimental de DM do presente estudo, induziu hipotireoidismo primário, como demonstrado pela redução da concentração sérica de T4 e aumento da de TSH. Estas alterações foram acompanhadas por aumento de tecido conectivo ao redor dos folículos tireoidianos, o que pode ser associado com fibrose (WEBER et al., 1997), redução da expressão de NIS, responsável pelo transporte de iodeto para a tireoide (processo limitante para a biossíntese de hormônios tireoidianos) (DAI; LEVY; CARRASCO, 1996) e, redução da expressão de TSHR, evento observado na presença de elevadas concentrações séricas de TSH.

Trabalhos desenvolvidos na década de 80 e 90 (GONZALEZ; MONTOYA; JOLIN, 1980; RONDEEL et al., 1992) e outro publicado recentemente (SANTOS et al., 2013) também apontam a presença de hipotireoidismo em ratos com indução de diabetes tipo 1 por estreptozotocina, embora essa disfunção tenha sido atribuída a uma redução da liberação de TRH pelo hipotálamo e, conseqüentemente, de TSH pela hipófise (GONZALEZ; MONTOYA; JOLIN, 1980; RONDEEL et al., 1992), e à produção de espécies reativas de Oxigênio na tireoide (SANTOS et al., 2013). Nossos estudos diferem destes: (1) pelo fato da indução ter sido feita por aloxana, que tal qual a estreptozotocina causa lesão e morte específica de células beta pancreáticas, embora por mecanismos distintos (LENZEN, 2008); (2) por termos iniciado os estudos 15 dias após a aplicação de aloxana e comprovação do DM, e não após 3 dias do tratamento

com estreptozotocina, como ocorreu com os estudos citados, e (3) por termos demonstrado integridade do eixo hipotálamo-hipofisário, já que o TSH esteve elevado com a redução do T4 e reduzido com a administração de T3. Assim, nosso estudo corrobora os achados da presença de disfunção tireoidiana, no caso, hipotireoidismo, na vigência do DM1, e mostra, pela primeira vez, que o tratamento com T3, promovendo redução na expressão de citocinas em tecidos sensíveis à insulina, traz benefícios para a homeostase glicêmica altamente comprometida neste quadro.

Observamos também que a concentração sérica de T3 dos animais diabéticos tratados com doses suprafisiológicas deste hormônio foi mantida a níveis similares a dos animais controle. Contudo, vale ressaltar que a expressão do transcrito de D1 apresentou-se aumentada no fígado dos animais deste grupo experimental, e que está bem estabelecido na literatura que o T3 aumenta a expressão gênica e protéica da D1 (BERRY; KATES; LARSEN, 1990). Portanto, podemos inferir que a desiodação hepática de T3 a T2 está aumentada nessa situação, conforme descrito (BIANCO et al., 2002) e, desta forma a concentração sérica de T3 foi mantida dentro dos valores encontrados no grupo controle (eutireoideo), mesmo sob a administração de doses suprafisiológicas de T3.

Vale comentar que em estudo preliminar, a dose de reposição fisiológica de T3 (0,3 µg/100 g de peso corporal) não foi capaz de induzir melhora na homeostasia glicêmica como a detectada com a utilização de doses 5 vezes maiores de T3.

O peso corpóreo dos animais diabéticos não tratados e tratados cronicamente com T3 apresentou redução expressiva, vs grupo controle, o que também era esperado, já que o DM, bem como o T3 em excesso, induz diversas alterações metabólicas, dentre elas, o aumento da lipólise e do catabolismo protéico, promovendo dessa forma, acentuada redução do peso corporal (HERMANSEN; DAVIES, 2007).

Os animais diabéticos apresentaram aumento da concentração sérica de TNF- α , infiltração de células inflamatórias no tecido adiposo periepídidimo e aumento da expressão de TNF- α e IL-6 no músculo sóleo e tecido adiposo periepídidimo. Estes achados poderiam justificar, ao menos em parte, a resistência à insulina detectada nos animais diabéticos (BJORNSTAD et al., 2015; PANG et al., 2008).

Conforme salientado, o tratamento com T3 promoveu redução expressiva da glicemia e melhorou o quadro de resistência à insulina observado nos animais diabéticos. A fim de investigar os possíveis mecanismos envolvidos na ação do T3 na via de sinalização da insulina, o conteúdo de Akt fosforilada foi avaliado nos tecidos adiposo periepídídimo e muscular esquelético sóleo e EDL no modelo experimental de DM1.

Para nossa surpresa, não foi observada nenhuma diferença no conteúdo de Akt fosforilada nos tecidos musculares estudados dos animais diabéticos quando comparados aos animais do grupo controle. Esse achado, contudo, corrobora o estudo de Okamoto et al., (2011) no qual não foi detectada redução desta proteína em ratos diabéticos. Este conflito encontrado na resposta reduzida à insulina no KITT e o conteúdo de Akt fosforilada não alterado em animais diabéticos comparados aos animais controle, pode ser explicado pela redução expressiva do conteúdo de GLUT4 detectado nos animais diabéticos desse estudo (Teixeira SS, em fase de preparação)*. Ou seja, apesar do conteúdo de Akt fosforilada ser semelhante à condição não diabética, o conteúdo de GLUT4, proteína essencial para o transporte de glicose estimulado por insulina, está muito reduzido, acarretando então em menor captação de glicose em resposta ao estímulo com insulina.

Por outro lado, foi observado aumento do conteúdo de Akt fosforilada em ambos os músculos após estímulo com insulina nos animais diabéticos tratados com T3 em relação aos animais diabéticos não-tratados, dado que corrobora os obtidos no KITT (Teixeira SS, em fase de preparação)*.

No diabetes mellitus observa-se aumento da expressão de citocinas inflamatórias as quais estimulam diversas vias de sinalização, ambas envolvidas na patogênese da resistência à insulina (SHOELSON, LEE e GOLDFINE, 2006). No presente estudo, os animais diabéticos apresentaram aumento da expressão de TNF- α e IL-6 no músculo sóleo e tecido adiposo periepídídimo. No entanto, os animais diabéticos submetidos ao tratamento crônico com T3 apresentaram redução significativa da concentração sérica

* Teixeira SS, Panveloski-Costa AC, Carvalho A, Schiavon FP, Marques ACR, Bazotte RB, Nunes MT. Thyroid hormone reduces blood glucose and hepatic glucose production in diabetic rats. *Metabolism: Clinical and Experimental*.

de TNF- α , e da expressão de TNF- α e IL-6 no músculo sóleo e tecido adiposo periepídimal, dados que corroboram com a melhora da sensibilidade à insulina observada neste grupo experimental.

O papel do hormônio tireoidiano na modulação da expressão de citocinas ainda não está estabelecido. No entanto, estudos *in vitro* demonstraram que o TSH estimula a secreção de IL-6 (ANTUNES et al., 2005, 2008) e de TNF- α (ZHANG et al., 2013) em células adiposas. Além disso, o TSH aumenta a expressão gênica e secreção de MCP-1 em adipócitos abdominais diferenciados de humanos (GAGNON et al., 2014). Estes estudos apontam o TSH como importante indutor da expressão de citocinas. Nesse sentido, a elevação da concentração sérica de TSH, em resposta ao hipotireoidismo primário, detectado nos ratos DM1, também poderia justificar o aumento da expressão de citocinas e resistência insulínica observadas. Do mesmo modo, a queda expressiva do TSH observada nos ratos DM1 tratados com T3 poderia explicar a redução da expressão de TNF- α e IL-6 no músculo sóleo e no tecido adiposo periepídimal e, conseqüentemente, a melhora da sensibilidade à insulina.

Diversos estudos mostram que o aumento da expressão e secreção de citocinas pelo tecido adiposo branco decorre da maior infiltração de macrófagos, que é precedida por aumento da expressão da MCP-1 (WEISBERG et al., 2003; XU et al., 2003). Tateya et al., (2010) demonstraram uma relação positiva entre os níveis plasmáticos de MCP-1 e resistência à insulina em animais submetidos à infusão crônica de altas doses de MCP-1 recombinante, a qual foi acompanhada de maior infiltração de macrófagos no tecido adiposo.

Em concordância com a literatura, no nosso modelo experimental, os animais diabéticos apresentaram aumento de MCP-1 sérico e, ao mesmo tempo, infiltração de macrófagos no TAB. Adicionalmente, verificamos que os animais diabéticos tratados cronicamente com T3 apresentaram redução desses parâmetros. Dessa maneira, nossos dados apontam para um mecanismo adicional na melhora da sensibilidade à insulina promovida pelo tratamento com T3, o qual envolve a redução da infiltração de macrófagos no tecido adiposo periepídimal.

Adicionalmente, foi observado redução da concentração sérica de triglicérides nos ratos diabéticos tratados com T3, o que pode estar relacionado com a redução das

concentrações séricas de TNF- α , uma vez que foi demonstrado que o TNF- α promove aumento da síntese hepática de triglicérides (FEINGOLD; GRUNFELD, 1987).

Embora o tratamento com T3 (BAXTER; WEBB, 2009), bem como a glicose (LI et al., 2012) induzam aumento da expressão gênica de CYP7A1, o qual supostamente reduz a colesterolemia, os níveis séricos de colesterol continuaram elevados nos animais diabéticos tratados ou não com T3 quando comparados aos animais controle. Este dado pode estar relacionado ao aumento da absorção de colesterol, decorrente do aumento do *pool* de ácido cólico detectado em animais diabéticos, conforme demonstrado em outros estudos (UCHIDA et al., 1979, 1985).

O principal efeito colateral do tratamento com T3 é a taquicardia e a hipertrofia cardíaca (KAHALY; DILLMANN, 2005; MINTZ; PIZZARELLO; KLEIN, 1991; PANTOS et al., 2008). Pensando nisto, os animais diabéticos foram tratados com GC-1, um agonista do HT que interage preferencialmente com a isoforma TR- β e poderia ser uma interessante estratégia para promoção dos efeitos benéficos do HT apontados acima, sem exercer os efeitos indesejáveis do mesmo sobre o coração, que são na sua maioria mediados pelo TR- α .

No entanto, a redução da glicemia e aumento da sensibilidade à insulina observados nos animais diabéticos tratados com T3, não foram mimetizados pelo tratamento dos animais diabéticos com GC-1, o que exclui a participação do TR β no efeito benéfico do T3 sobre a homeostase glicêmica dos animais diabéticos.

No presente estudo, foi detectada hipertrofia cardíaca nos ratos diabéticos tratados com T3, como indicado pelo aumento da razão peso seco do coração/peso corpóreo, aumento da dp/dt e do índice de contratilidade e, redução do tempo de relaxamento isovolumétrico. No entanto, essas alterações não influenciaram a pressão sistólica e diastólica, já que elas permaneceram similares a dos animais do grupo euglicêmico. Em conjunto, esses dados sugerem que a hipertrofia cardíaca é compensatória nessas condições experimentais, uma vez que o tratamento com T3, ao menos nas doses empregadas, não foi capaz de promover alterações que possam caracterizar uma disfunção no sistema cardiovascular dos ratos diabéticos.

O modelo experimental de DM usado no presente estudo, que foi a destruição das células beta pancreáticas por aloxana, não mimetiza o mecanismo autoimune de

desenvolvimento natural do DM1 em humanos, o qual está associado às doenças tireoidianas auto-imunes presentes em pacientes com esta patologia. Por outro lado, a ausência desta condição auto-imune em modelos experimentais de DM1 pode ser uma vantagem, uma vez que a disfunção tireoidiana também se apresenta neste modelo, assim como em pacientes com DM2, cuja etiologia é multifatorial. Em outras palavras o hipotireoidismo surge como uma outra co-morbidade do DM1, que se desenvolve com a doença havendo ou não o componente auto-imune associado, o que indica que a avaliação da função tireoidiana deva ser uma conduta rotineira em pacientes DM1 e DM2.

Ainda, consideramos este estudo de extrema relevância para o entendimento dos efeitos positivos do tratamento com hormônio tireoidiano na sensibilidade à insulina no DM, uma vez que a terapia com insulina é o único tratamento eficiente para pacientes com DM1, o qual a longo prazo leva à resistência à insulina.

No entanto, uma limitação deste estudo é que muitos órgãos são alvo do hormônio tireoidiano, uma vez a distribuição de seus receptores é bastante ampla nos mamíferos. Desta forma, é necessário evidenciar possíveis efeitos colaterais do tratamento com T3 nesta condição, em outros tecidos, além do coração.

Disfunção tireoidiana também tem sido observada em indivíduos obesos (GIANDALIA et al., 2014; RUHLA et al., 2010). Em crianças obesas é bastante frequente a elevação do TSH sérico, com T4 sérico dentro da normalidade, e uma correlação entre aumento de TSH e circunferência da cintura com elevação dos triglicerídeos séricos (o que é um fator de risco para doenças cardiovasculares), o que coloca em questão a necessidade de se tratar esses elevados níveis de TSH (SHALITIN; YACKOBOVITCH-GAVAN; PHILLIP, 2009).

A dieta de cafeteria é um modelo de dieta para roedores que reflete com precisão a dieta predominante na sociedade ocidental composta por alimentos palatáveis e com alto teor de ácidos graxos saturados, e está associada à pandemia de obesidade (ROTHWELL; STOCK, 1979; SCLAFANI; SPRINGER, 1976).

Os ácidos graxos saturados apresentam alto potencial obesogênico, pois reduzem a termogênese e a oxidação lipídica. Além disso, alguns ácidos graxos favorecem a atividade lipogênica no tecido adiposo (De LANY et al., 2000; KIEN;

BUNN; UGRASBUL, 2005). O ácido palmítico, por exemplo, induz a expressão da enzima lipase lipoprotéica em adipócitos de ratos, o que sugere aumento da captação tecidual de ácidos graxos e glicerol e, conseqüentemente, aumento da adiposidade.

No modelo experimental de obesidade induzida por dieta de cafeteria, pôde-se observar que o peso corpóreo dos animais apresentou aumento progressivo e significativo a partir da terceira semana de dieta. No entanto, após uma semana de tratamento crônico com T₃, os animais obesos (OT₃) apresentaram redução significativa e progressiva do peso corpóreo quando comparados aos animais obesos não tratados (O).

Ruhla (2010) e Giandalia (2014) detectaram aumento do TSH sérico simultaneamente ao aumento do peso corpóreo em indivíduos obesos. No entanto, no nosso modelo experimental, o TSH sérico apresentou-se significativamente reduzido nos animais obesos. Estudos mostraram correlação positiva entre porcentagem de gordura corpórea e a concentração de leptina (CONSIDINE et al., 1996; HASSINK et al., 1996), a qual desencadeia efeito inibitório na secreção de TSH pela hipófise (ORTIGA-CARVALHO et al., 2002). Neste sentido, uma possível explicação para a redução do TSH nos ratos obesos seria alteração da concentração de leptina, muito embora, a leptina seja um hormônio que tem sua produção aumentada após a ingestão alimentar, quando, no hipotálamo, inibe o neuropeptídeo Y (NPY), levando a ativação do eixo-hipotálamo-hipófise-tireóide. Contudo sabe-se também que o aumento sustentado de leptina na circulação promove resistência à leptina, o que poderia explicar a queda do TSH detectada no nosso modelo.

Por outro lado, a concentração sérica de TSH e de T₄ apresentou-se significativamente reduzida no grupo de animais obesos tratados cronicamente com T₃, o que era esperado, considerando os efeitos de retroalimentação negativa do T₃ no eixo hipotálamo-hipófise-tireoide.

A obesidade está associada a um quadro de inflamação sub-clínica, decorrente do aumento expressivo do tecido adiposo, com infiltração de macrófagos e aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias as quais, por sua vez, estão relacionadas às alterações metabólicas presentes em indivíduos obesos (GERNER et al., 2013; GREGOR; HOTAMILISGIL, 2011).

No modelo experimental de obesidade utilizado não foi observado aumento expressivo dos marcadores inflamatórios estudados (TNF- α e IL-6) os quais, como já descrito anteriormente, estão envolvidos na redução da sensibilidade à insulina na vigência de diabetes ou obesidade. De fato, não foi observada redução significativa da sensibilidade à insulina, como a detectada no modelo experimental de DM1. No entanto, o tratamento com T3 reduziu significativamente a expressão de TNF- α e IL-6 (músculo sóleo e TAB) nos animais mantidos sob dieta de cafeteria, o que poderia explicar o aumento da taxa de decaimento da glicose no ITT e a redução da AUC no GTT, resultados que, embora não significativos, mostram tendência a serem, o que poderia ocorrer com a manutenção dessa dieta por períodos mais prolongados.

Os níveis glicêmicos dos animais do grupo obeso apresentaram aumento significativo, mas diferentemente dos animais do grupo diabético, não foi encontrada nenhuma alteração deste parâmetro após tratamento crônico com T3.

Esta diferença de resposta ao tratamento crônico com T3 na vigência de DM ou de obesidade pode ser explicada pelo fato de que o hormônio tireoidiano induz a transcrição dos genes que codificam as proteínas envolvidas no processo de gliconeogênese, tal como a PEPCK, as quais apresentam atividade muito elevada na vigência do diabetes, no entanto, estudos realizados no nosso laboratório (Teixeira SS, em fase de preparação)* demonstraram que animais diabéticos tratados cronicamente com T3 apresentam menor conteúdo de PEPCK e menor produção hepática de glicose, conforme mostram os estudos de perfusão hepática in vivo.

A concentração sérica de insulina apresentou-se aumentada no grupo de animais obesos tratados cronicamente com T3, portanto, uma das possibilidades aventadas foi a de que o T3 esteja promovendo redução da sensibilidade à insulina, já que aumenta a produção hepática de glicose e de AGL na circulação. No entanto o GTT e ITT não apontam nesse sentido. Além disso, um estudo realizado em nosso laboratório (GOULART-SILVA et al., 2012), demonstrou que o T3 estimula a expressão de insulina em células INS-1E, e que nessa condição ocorre aumento do conteúdo de

* Teixeira SS, Panveloski-Costa AC, Carvalho A, Schiavon FP, Marques ACR, Bazotte RB, Nunes MT. Thyroid hormone reduces blood glucose and hepatic glucose production in diabetic rats. *Metabolism: Clinical and Experimental*.

proteínas envolvidas na tradução de mRNAs como a p70S6k, eIF2, eIF5A. Dessa forma é possível que no nosso modelo esse processo esteja também ocorrendo, o que precisa ser mais bem investigado.

Os níveis séricos de triglicérides apresentaram-se aumentados nos animais obesos não tratados, como esperado, uma vez que os efeitos anti-lipolíticos da insulina estão reduzidos em condições de resistência à insulina, promovendo desta forma, maior síntese hepática de triglicérides (CHEN et al., 2015). O tratamento com T3 reduziu este parâmetro, assim como observado nos animais DM1 tratados com T3.

Apesar dos efeitos deletérios do excesso de hormônio tireoidiano, tal como a hipertrofia cardíaca, serem bastante conhecidos, estudos acerca dos seus efeitos sobre alterações metabólicas decorrentes do DM, bem como da obesidade, são de extrema importância visto que a produção de análogos deste hormônio poderia ser uma alternativa promissora para o tratamento das alterações metabólicas decorrentes do DM e da obesidade. Por outro lado, as evidências recentes de associação entre diabetes tipo 1 e obesidade, com hipotireoidismo e hipotireoidismo sub-clínico, colocam em discussão o possível uso de T3 nessa(s) condição(ões).

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados podemos concluir que o tratamento crônico com hormônio tireoidiano promove melhora da homeostase glicídica na vigência de DM1 e, que tal efeito envolve a redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias. Embora as evidências não sejam tão expressivas, podemos também inferir que esse mesmo tratamento reduz a expressão de citocinas inflamatórias especialmente no sóleo e TAB dos ratos mantidos com dieta de cafeteria, sinalizando uma melhora na homeostase glicêmica.

REFERÊNCIAS*

- AHREN, B. Hyperthyroidism and glucose intolerance. **Acta Med Scand.**, v.220, p.5-15, 1986.
- ANTUNES, T.T.; GAGNON, A.; BELL, A.; SORISKY, A. Thyroid-stimulating hormone stimulates interleukin-6 release from 3T3-L1 adipocytes through a cAMP-protein kinase A pathway. **Obes Res.**, v. 13, n.12, p. 2066-2071, 2005.
- ANTUNES, T.T.; GAGNON, A.; LANGILLE, M.L.; SORISKY, A. Thyroid-stimulating hormone induces interleukin-6 release from human adipocytes through activation of the nuclear factor-kappaB pathway. **Endocrinology**., v.149, n.6, p.3062-3066, 2008.
- BALSAMO, C.; ZUCCHINI, S.; MALTONI, G.; ROLLO, A.; MARTINI, A.L.; MAZZANTI, L.; PESSION, A.; CASSIO, A. Relationships between thyroid function and autoimmunity with metabolic derangement at the onset of type 1 diabetes: a cross-sectional and longitudinal study. **J Endocrinol Invest.**, v.38, n.6, p.701-707, 2015.
- BASSETT, J.H.; HARVEY, C.B.; WILLIAMS, G.R. Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. **Mol Cell Endocrinol.**, v. 213, n.1, p.1–11, 2003.
- BAXTER, J.D.; WEBB, P. Thyroid hormone mimetics: potential applications in atherosclerosis, obesity and type 2 diabetes. **Nat Rev Drug Discov.**, v.8, n.4, p.308–20, 2009.
- BERCHTOLD, L.A.; LARSEN, C.M.; VAAG, A.; FAULENBACH, M.; WORKMAN, C.T.; KRUHOFFER, M.; DONATH, M.; MANDRUP-POULSEN, T. IL-1 receptor antagonism and muscle gene expression in patients with type 2 diabetes, **Eur Cytokine Netw.**, v.20, n.2, p.81–87, 2009.
- BERRY, M.J.; KATES, A.L.; LARSEN, P.R. Thyroid hormone regulates type I deiodinase messenger RNA in rat liver. **Mol Endocrinol.**, v.4, n.5, p.743-748, 1990.
- BIANCO, A.C.; SALVATORE, D.; GERESEN, B.; BERRY, M.J.; LARSEN, P.R. Biochemistry, cellular and molecular biology and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. **Endocr Rev.**, v.23, n.1, p.38-89, 2002.
- BJORNSTAD, P.; SNELL-BERGEON, J.K.; NADEAU, K.J.; MAAHS, D.M. Insulin sensitivity and complications in type 1 diabetes: New insights. **World J Diabetes.**, v.6, n.1, p.8-16, 2015.

De acordo com:

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

BRUNETTO, E.L.; TEIXEIRA, S.S.; GIANNOCO, G.; MACHADO, U.F.; NUNES, M.T. T3 rapidly increases SLC2A4 gene expression and GLUT4 trafficking to the plasma membrane in skeletal muscle of rat and improves glucose homeostasis. **Thyroid.**, v.22, n.1, p.70-79, 2012.

CAI, D.; YUAN, M.; FRANTZ, D.F.; MELENDEZ, P.A.; HANSEN, L.; LEE, J.; SHOELSON, S.E. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β and NF-Kb. **Nat Med.**, v.11, n.2, p.183-190, 2005.

CALIL-SILVEIRA, J.; SERRANO-NASCIMENTO, C.; NUNES, M.T. Iodide treatment acutely increases pendrin (SLC26A4) mRNA expression in the rat thyroid and the PCCl3 thyroid cell line by transcriptional mechanisms. **Mol Cell Endocrinol.**, v. 350, n.1, p.118-124, 2012.

CAO, X.; KAMBE, F.; MOELLER, L.C.; REFETTOFF, S.; SEO, H. Thyroid hormone induces rapid activation of Akt/protein kinase B-mammalian target of rapamycin-p70S6K cascade through phosphatidylinositol 3-kinase in human fibroblasts. **Mol Endocrinol.**, v.19, n.1, p.102-112, 2005.

CETTOUR-ROSE, P.; THEANDER-CARRILLO, C.; ASENSIO, C.; KLEIN, M.; VISSER, T.J.; BURGER, A.G.; MEIER, C.A.; ROHNER-JEANRENAUD, F. Hypothyroidism in rats decreases peripheral glucose utilization, a defect partially corrected by central leptin infusion. **Diabetologia.**, v.48, n.4, p.624–633, 2005.

CHEN, L.; CHEN, R.; WANG, H.; LIANG, F. Mechanisms Linking Inflammation to Insulin Resistance. **Int J Endocrinol.**, v.2015, p.1-9, 2015.

CHENG, S.Y.; LEONARD, J.L.; DAVIS, P.J.; Molecular aspects of thyroid hormone actions. **Endocr Rev.**, v.31, n.2, p.139-170, 2010.

CONSIDINE, R.V.; SINHA, M.K.; HEIMAN, M.L.; KRIAUCIUNAS, A.; STEPHENS, T.W.; NYCE, M.R.; OHANNESIAN, J.P.; MARCO, C.C.; MCKEE, L.J.; BAUER, T.L.; CARO, J.F. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. **N Engl J Med.**, v.334, n.5, p.292–295, 1996.

DACE, A.; ZHAO, I.; PARK, K.S.; FURUNO, T.; TAKAMURA, N.; NAKANISHI, M.; WEST, B.L.; HANOVER, J.A.; CHENG, S. Hormone binding induces rapid proteasome-mediated degradation of thyroid hormone receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v.97, n.16, p.8985-8990, 2000.

DAI, G.; LEVY, O.; CARRASCO, N. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. **Nature.**, v.379, n.6564, p.458-460, 1996.

DE LANY, J.P.; WINDHAUSER, M.M.; CHAMPAGNE, C.M.; BRAY, G.A. Differential oxidation of individual dietary fatty acids in humans. **Am J Clin Nutr.**, v.72, n. 4, p.905-911, 2000.

DESHPANDE, A.D.; HARRIS-HAYES, M.; SCHOOTMAN, M. Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications. **Phys Ther.**, v.88, n.11, p.1254-1264, 2008.

DE SOUZA C.T.; ARAUJO, E.P.; BORDIN, S.; ASHIMINE, R.; ZOLLNER, R.L.; BOSCHERO, A.C.; SAAD, M.J.A.; VELLOSO, L.A. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus, **Endocrinology.**, v.146, n.10, p.4192–4199, 2005.

DIMITRIADIS, G.; RAPTIS, S.A. Thyroid hormone excess and glucose intolerance. **Exp Clin Endocrinol Diabetes.**, 109(Suppl 2), p.225–239, 2001.

DIMITRIADIS, G.; MITROU, P.; LAMBADIARI, V.; BOUTATI, E.; MARATOU, E.; PANAGIOTAKOS, D.B.; KOUKKOU, E.; TZANELA, M.; THALASSINOS, N.; RAPTIS, S.A. Insulin action in adipose tissue and muscle in hypothyroidism. **J Clin Endocrinol Metab.**, v.91, n.12, p.4930-4937, 2006.

EHSES, J.A.; PERREN, A.; EPPLER, E.; RIBAU, P.; POSPISILIK, J.A.; MAOR-CAHN, R.; GUERPEL, X.; ELLINGSGAARD, H.; SCHNEIDER, M.K.J.; BIOLLAZ, G.; FONTANA, A.; REINECKE, M.; HOMO-DELARCHE, F.; DONATH, M.Y. Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. **Diabetes.**, v.56, n.9, p.2356–2370, 2007.

ELSHAL, M.F.; MCCOY, J.P. Multiplex bead array assay: performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA. **Methods.**, v.38, n.4, p.317-323, 2006.

FEINGOLD, K.R.; GRUNFELD, C. Tumor necrosis factor- α stimulates hepatic lipogenesis in the rat in vivo. **J Clin Invest.**, v.80, n.1, p.184-190, 1987.

FOSS, M.C.; PACCOLA, G.M.; SAAD, M.J.; PIMENTA, W.P.; PICCINATO, C.E.; IAZIGI, N. Peripheral glucose metabolism in human hyperthyroidism. **J Clin Endocrinol Metab.**, v.70, n. 4, p.1167-1172, 1990.

FURUKAWA, S.; YAMAMOTO, S.; TODO, Y.; MARUYAMA, K.; MIYAKE, T.; UEDA, T.; NIIYA, T.; SENBA, T.; TORISU, M.; KUMAGI, T.; MIYAUCHI, S.; SAKAI, T.; MINAMI, H.; MIYAOKA, H.; MATSUURA, B.; HIASA, Y.; ONJI, M.; TANIGAWA, T. Association between subclinical hypothyroidism and diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes mellitus. **Endocr J.**, v.61, n.10, p.1011-1018, 2014.

GAGNON, A.; LANGILLE, M.L.; CHAKER, S.; ANTUNES, T.T.; DURAND, J.; SORISKY, A. TSH signaling pathways that regulate MCP-1 in human differentiated adipocytes. **Metabolism.**, v.63, n.6, p.812-821, 2014.

GERNER, R.R.; WIESER, V.; MOSCHEN, A.R.; TILG, H. Metabolic inflammation: role of cytokines in the crosstalk between adipose tissue and liver. **Can J Physiol Pharmacol.**, v.91, n.11, p.867-872, 2013.

GIANDALIA, A.; RUSSO, G.T.; ROMEO, E.L.; ALIBRANDI, A.; VILLARI, P.; MIRTO, A.A.; ARMENTANO, G.; BENVENGA, S.; CUCINOTTA, D. Influence of high-normal serum TSH levels on major cardiovascular risk factors and Visceral Adiposity Index in euthyroid type 2 diabetic subjects. **Endocrine.**, v.152, p.152-160, 2014.

GONZALEZ, C.; MONTOYA, E.; JOLIN, T. Effect of streptozotocin diabetes on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in the rat. **Endocrinology.**, v.107, n.6, p. 2099-2103, 1980.

GOULART-SILVA, F.; TEIXEIRA, S.S.; LUCHESSI, A.D.; DOS SANTOS, L.R.; REBELATO, E.; CARPINELLI, A.R.; NUNES, M.T. Potential contribution of translational factors to triiodo-L-thyronine-induced insulin synthesis by pancreatic beta cells. **Thyroid.**, v.22, n.6, p.637-642, 2012.

GREGOR, M.F.; HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammatory mechanisms in obesity. **Annu Rev Immunol.**, v.29, p.415-445, 2011.

HADDAD, F.; JIANG, W.; BODELL, P.W.; QIN, A.X.; BALDWIN, K.M. Cardiac myosin heavy chain gene regulation by thyroid hormone involves altered histone modifications. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v.299, n. 6, p. 1968-1980, 2010.

HALL, K.E.; MCDONALD, M.W.; GRISÉ, K.N.; CAMPOS, O.A.; NOBLE, E.G.; MELLING, C.W. The role of resistance and aerobic exercise training on insulin sensitivity measures in STZ-induced Type 1 diabetic rodents. **Metabolism.**, v.62, n.10, p.1485– 1494, 2013.

HALUZIK, M.; NEDVIDKOVA, J.; BARTAK, V.; DOSTALOVA, I.; VLCEK, P.; RACEK, P.; TAUS, M.; SVACINA, S.; ALESCI, S.; PACAK, K. Effects of hypo- and hyperthyroidism on noradrenergic activity and glycerol concentrations in human subcutaneous abdominal adipose tissue assessed with microdialysis. **J Clin Endocrinol Metab.**, v.88, n.12, p.5605–5608, 2003.

HASSINK, S.G.; SHESLOW, D.V.; DELANCEY, E.; OPENTANOVA, I.; CONSIDINE, R.V.; CARO, J.F. Serum leptin in children with obesity: relationship to gender and development. **Pediatrics.**, v.98, n.2, p.201–203, 1996.

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, n.1, p. 422– 431, 2010.

HEINRICH, P.C.; BEHRMANN, I.; MÜLLER-NEUEN, G.; SCHAPER, F.; GRAEVE, L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. **Biochem J.**, v.334, p.297-314, 1998.

HERMANSEN, K.; DAVIES, M. Does insulin detemir have a role in reducing risk of insulin-associated weight gain? **Diabetes Obes Metab.**, v.9, n.3, p. 209-217, 2007.

HOTAMILISGIL, G.S.; PERALDI, P.; BUDAVARI, A.; ELLIS, R.; WHITE, M.F.; SPIEGELMAN, B.M. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha and obesity-induced insulin resistance. **Science.**, v.271, n.5249, p.665-668, 1996.

HOWARD, J.K.; FLIER, J.S. Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins. **Trends Endocrinol Metab.**, v.17, n.9, p.365-371, 2006.

IDF diabetes atlas sixth edition: global estimates of the prevalence of diabetes for 2013 and 2035.

KADIYALA, R.; PETER, R.; OKOSIEME, O.E. Thyroid dysfunction in patients with diabetes: clinical implications and screening strategies. **Int J Clin Pract.**, v.64, n.8, p.1130-1139, 2010.

KAHALY, G.J.; DILLMANN, W.H. Thyroid hormone action in the heart. **Endocrine Rev.**, v.26, n. 5, p. 704–728, 2005.

KATSURADA, A.; IRITANI, N.; FUKUDA, H.; NOGUCHI, T.; TANAKA, T. Transcriptional and posttranscriptional regulation of malic enzyme synthesis by insulin and triiodothyronine. **Biochim Biophys Acta.**, v.950, n. 2, p.113-117, 1988.

KATZ, D.; LAZAR, M.A. Dominant negative activity of an endogenous thyroid hormone receptor variant (alpha 2) is due to competition for binding sites on target genes. **J Biol Chem.**, v.268, n.28, p.20904–20910, 1993.

KIEN, C.L.; BUNN, J.Y.; UGRASBUL, F. Increasing dietary palmitic acid decreases fat oxidation and daily energy expenditure. **Am J Clin Nutr.**, v.82, n.2, p.320-326, 2005.

KIM, S.R.; TULL, E.S.; TALBOTT, E.O.; VOGT, M.T.; KULLER, L.H. A hypothesis of synergism: the interrelationship of T3 and insulin to disturbances in metabolic homeostasis. **Med Hypotheses.**, v.59, n.6, p.660 – 666, 2002.

LARSEN, C.M.; FAULENBACH, M.; VAAG, A.; EHSES, J.A.; DONATH, M.Y.; MANDRUP-POULSEN, T. Sustained effects of interleukin-1-receptor antagonist treatment in type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Care.**, v.32, n.9, p.1663-1668, 2009.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia.**, 2008 v.51, n.2, p.216-226, 2008.

LI, T.; FRANCL, J.M.; BOEHME, S.; OCHOA, A.; ZHANG, Y.; KLAASSEN, C.D.; et al. Glucose and insulin induction of bile acid synthesis: mechanisms and implication in diabetes and obesity. **J Biol Chem.**, v.287, n.3, p.1861-1873, 2012.

LIN, Y.; SUN, Z. Thyroid Hormone Promotes Insulin-induced Glucose Uptake by Enhancing Akt Phosphorylation and VAMP2 Translocation in 3T3-L1 Adipocytes. **J Cell Physiol.**, v.226, n.10, p.2625-2632. 2011.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. **Methods.**, v.25, n.4, p.402-408, 2001.

MARATOU, E.; HADJIDAKIS, D.J.; PEPPA, M.; ALEVIZAKI, M.; TSEGKA, K.; LAMBADIARI, V.; MITROU, P.; BOUTATI, E.; KOLLIAS, A.; ECONOMOPOULOS, T.; RAPTIS, A.S.; DIMITRIADIS, G. Studies of insulin resistance in patients with clinical and subclinical hyperthyroidism. **Eur J Endocrinol.**, v.163, n.4, p.625–630, 2010.

MINTZ, G.; PIZZARELLO, R.; KLEIN, I. Enhanced left ventricular diastolic function in hyperthyroidism: noninvasive assessment and response to treatment. **J Clin Endocrinol Metabol.**, v.73, n.1, p.146-150, 1991.

MITSUMA, T.; NOGIMORI, T. Effects of streptozotocin induced diabetes mellitus on hypothalamic-pituitary-thyroid axis in rats. **Endocrinol Jpn.**, v.29, n. 6, p.695-700, 1982.

MOELLER, L.C.; BROECKER-PREUSS, M. Transcriptional regulation by nonclassical action of thyroid hormone. **Thyroid Res.**, 4(Suppl 1) S6, 2011.

MOTOMURA, K.; BRENT, G.A. Mechanisms of thyroid hormone action. Implications for the clinical manifestation of thyrotoxicosis. **Endocrinol Metab Clin North Am.**, v.27, n.1, p.1-23, 1998.

NEDVIDKOVA, J.; HALUZIK, M.; BARTAK, V.; DOSTALOVA, I.; VLCEK, P.; RACEK, P.; TAUS, M.; BEHANOVA, M.; SVACINA, S.; ALESCI, S.; PACAK, K. Changes of noradrenergic activity and lipolysis in the subcutaneous abdominal adipose tissue of hypo- and hyperthyroid patients: an in vivo microdialysis study. **Ann NY Acad Sci.**, v.1018, p.541–549, 2004.

OFEI, F.; HUREL, S.; NEWKIRK, J.; SOPWITH, M.; TAYLOR, R. Effects of an engineered human anti-TNF-alpha antibody (CDP571) on insulin sensitivity and glycemic control in patients with NIDDM, **Diabetes.**, v.45, n.7, p. 881–885, 1996.

OKAMOTO, M.M.; ANHÊ, G.F.; SABINO-SILVA, R.; MARQUES, M.F.; FREITAS, H.S.; MORI, R.C.; MELO, K.F.; MACHADO, U.F. Intensive insulin treatment induces insulin resistance in diabetic rats by impairing glucose metabolism-related mechanisms in muscle and liver. **J Endocrinol.**, v.211, n. 1, p. 55-64, 2011.

ORTIGA-CARVALHO, T.M.; OLIVEIRA, K.J.; SOARES, B.A.; PAZOS-MOURA, C.C. The role of leptin in the regulation of TSH secretion in the fed state: in vivo and in vitro studies. **J Endocrinol.**, v.174, n.1, p.121-125, 2002.

PALMA, C.C.; PAVESI, M.; NOGUEIRA, V.G.; CLEMENTE, E.L.; VASCONCELLOS, M.D.; PEREIRA, L.C.; JÚNIOR PACHECO, F.F.; BRAGA, T.G.; BELLO, L.D.; SOARES, J.O.; DOS SANTOS, S.C.; CAMPOS, V.P.; GOMES, M.B. Prevalence of thyroid dysfunction in patients with diabetes mellitus. **Diabetol Metab Syndr.**, v.5, n.58, p.1-5, 2013.

PANG, T.T.; NARENDHAN, P. Addressing insulin resistance in type 1 diabetes. **Diabet Med.**, v.25, n.9, p.1015-1024, 2008.

PANTOS, C.; MOUROUZIS, I.; MARKAKIS, K.; TSAGOULIS, N.; PANAGIOTOU, M.; COKKINOS, D.V. Long-term thyroid hormone administration reshapes left ventricular chamber and improves cardiac function after myocardial infarction in rats. **Basic Res Cardiol.**, v.103, n.4, p.308-18, 2008.

PERROS, P.; MCCRIMMON, R.J.; SHAW, G.; FRIER, B.M. Frequency of thyroid dysfunction in diabetic patients: value of annual screening. **Diabet Med.**, v.12, n.7, p.622-627, 1995.

POTENZA, M.; VIA, M.A.; YANAGISAWA, R.T. Excess thyroid hormone and carbohydrate metabolism. **Endocr Pract.**, v.15, n.3, p.254 –262, 2009.

PUPO, A.A.; MARREIRO, D. Dosage of insulin levels using radioimmunoassay with double antibodies. **AMB Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.16, n.5, p.153-156, 1970.

RIIS, A.L.; GRAVHOLT, C.H.; DJURHUUS, C.B.; NØRRELUND, H.; JØRGENSEN, J.O.; WEEKE, J.; MØLLER, N. Elevated regional lipolysis in hyperthyroidism. **J Clin Endocrinol Metab.**, v.87, n.10, p.4747– 4753, 2002.

RIIS, A.L.; JØRGENSEN, J.O.; IVARSEN, P.; FRYSTYK, J.; WEEKE, J.; MØLLER, N. Increased protein turnover and proteolysis is an early and primary feature of short-term experimental hyperthyroidism in healthy women. **J Clin Endocrinol Metab.**, v.93, n.10, p.3999–4005, 2008.

ROMANO, R.M.; BARGI-SOUZA, P.; BRUNETTO, E.L.; GOULART-SILVA, F.; AVELLAR, M.C.; OLIVEIRA, C.A.; NUNES, M.T. Hypothyroidism in adult male rats alters posttranscriptional mechanisms of luteinizing hormone biosynthesis. **Thyroid.**, v.23, n.4, p. 497-505, 2013.

RONDEEL, J.M.; DE GREEF, W.J.; HEIDE, R.; VISSER, T.J. Hypothalamo-hypophyseal-thyroid axis in streptozotocin-induced diabetes. **Endocrinology.**, v.130, n.1, p.216-220, 1992.

ROTHWELL, N.J.; STOCK, M.J. Combined effects of cafeteria and tube-feeding on energy balance in the rat. **Proc Nutr Soc.**, v.38, n.1, 1979.

RUHLA, S.; WEICKERT, M.O.; ARAFAT, A.M.; OSTERHOFF, M.; ISKEN, F.; SPRANGER, J.; SCHÖFL, C.; PFEIFFER, A.F.; MÖHLIG, M. A high normal TSH is associated with the metabolic syndrome. **Clin Endocrinol (Oxf)**., v.72, n.5, p.696-701, 2010.

SCLAFANI, A.; SPRINGER, D. Dietary obesity in adult rats: similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. **Physiol Behav.**, v.17, n.3, p. 461–471, 1976.

SAGHIZADEH, M.; ONG, J.M.; GARVEY, W.T.; HENRY, R.R.; KERN, P.A. The expression of TNF- α by human muscle. Relationship to insulin resistance. **J Clin Invest.**, v.97, n.4, p.1111-1116, 1996.

SALIL, G.; NEVIN, K.G.; RAJAMOHAN, T. Arginine rich coconut kernel protein modulates diabetes in alloxan treated rats. **Chem Biol Interact.**, v.189, n.1/2, p.107-111, 2011.

SAMPEY, B.P.; VANHOOSE, A.M.; WINFIELD, H.M.; FREEMERMAN, A.J.; MUEHLBAUER, M.J.; FUEGER, P.T.; NEWGARD, C.B.; MAKOWSKI, L. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. **Obesity (Silver Spring)**., v.19, n.6, p.1109-1117, 2011.

SANTOS, M.C.; LOUZADA, R.A.; SOUZA, E.C.; FORTUNATO, R.S.; VASCONCELOS, A.L.; SOUZA, K.L.; CASTRO, J.P.; CARVALHO, D.P.; FERREIRA, A.C. Diabetes mellitus increases reactive oxygen species production in the thyroid of male rats. **Endocrinology**., v.154, v.3, p.1361-1372, 2013.

SENESE, R.; CIOFFI, F.; DE LANGE, P.; GOGLIA, F.; LANNI, A. Thyroid: biological actions of 'nonclassical' thyroid hormones. **J Endocrinol.**, v.221, n. 2, p.1-12, 2014.

SERRANO-NASCIMENTO, C.; CALIL-SILVEIRA, J.; NUNES, M.T. Posttranscriptional regulation of sodium-iodide symporter mRNA expression in the rat thyroid gland by acute iodide administration. **Am J Physiol Cell Physiol.**, v.298, n.4, p.893-899, 2010.

SHALITIN, S.; YACKOBOVITCH-GAVAN, M.; PHILLIP, M. Prevalence of thyroid dysfunction in obese children and adolescents before and after weight reduction and its relation to other metabolic parameters. **Horm Res.**, v.71, n. 3, p.155-161, 2009.

SHOELSON, S.E.; LEE, J.; GOLDFINE, A.B. Inflammation and insulin resistance. **J Clin Invest.**, v.116, n.7, p.1793–1801, 2006.

SINGH, B.M.; GOSWAMI, B.; MALLIKA, V. Association between insulin resistance and hypothyroidism in females attending a tertiary care hospital. **Indian J Clin Biochem.**, v.25, n. 2, p.141–145, 2010.

SUI, L.; LI, B.M. Effects of perinatal hypothyroidism on regulation of reelin and brain-derived neurotrophic factor gene expression in rat hippocampus: Role of DNA methylation and histone acetylation. **Steroids**, v.75, n.12, p.988-997, 2010.

TANG, H.Y.; LIN, H.Y.; ZHANG, S.; DAVIS, F.B.; DAVIS, P.J. Thyroid hormone causes mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of the nuclear estrogen receptor. **Endocrinology**, v.145, n.7, p. 3265-3272, 2004.

TATEYA, S.; TAMORI, Y.; KAWAGUCHI, T.; KANDA, H.; KASUGA, M. An increase in the circulating concentration of monocyte chemoattractant protein-1 elicits systemic insulin resistance irrespective of adipose tissue inflammation in mice. **Endocrinology**, v. 151, n. 3, p.971-979, 2010.

TEIXEIRA, S.S.; TAMRAKAR, A.K.; GOULART-SILVA, F.; SERRANO-NASCIMENTO, C.; KLIP, A.; NUNES, M.T. Triiodothyronine acutely stimulates glucose transport into L6 muscle cells without increasing surface GLUT4, GLUT1, or GLUT3. **Thyroid**, v.22, n. 7, p.747-754, 2012.

UCHIDA, K.; TAKASE, H.; KADOWAKI, M.; NOMURA, Y.; MATSUBARA, T.; TAKEUCHI, N. Altered bile acid metabolism in alloxan diabetic rats. **Jpn J Pharmacol.**, v.29, n.4, p.553-62, 1979.

UCHIDA, K.; MAKINO, S.; AKIYOSHI, T. Altered bile acid metabolism in nonobese, spontaneously diabetic (NOD) mice. **Diabetes**, v.34, n.1, p.79-83, 1985.

WAHRENBERG, H.; WENNLUND, A.; ARNER, P. Adrenergic regulation of lipolysis in fat cells from hyperthyroid and hypothyroid patients. **J Clin Endocrinol Metab.**, v.78, n.4, p.898-903, 1994.

WEBER, K.T. Fibrosis, a common pathway to organ failure: angiotensin II and tissue repair. **Semin Nephrol.**, v.17, n.5, p.467–491, 1997.

WEINSTEIN, S.P.; WATTS, J.; HABER, R.S. Thyroid hormone increases muscle/fat glucose transporter gene expression in rat skeletal muscle. **Endocrinology**, v.129, n.1, p.455–464, 1991.

WEISBERG, S.P.; MCCANN, D.; DESAI, M.; ROSENBAUM, M.; LEIBEL, R.L.; FERRANTE JR, A.W. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J Clin Invest.**, v.112, n.12, p. 1796 –1808, 2003.

WELLEN, K.E.; HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammation, stress, and diabetes. **J Clin Invest.**, v.115, n.5, p.1111–1119, 2005.

WENNLUND, A.; FELIG, P.; HAGENFELDT, I.; WAHREN, J. Hepatic glucose production and splanchnic glucose exchange in hyperthyroidism. **J Clin Endocrinol Metab.**, v.62, p.174–180, 1986.

WRUTNIAK-CABELLO, C.; CASAS, F.; CABELLO, G. Thyroid hormone action in mitochondria. **J Mol Endocrinol.**, v.26, n.1, p.67–77, 2001.

YKI-JÄRVINEN, H.; KOIVISTO, V.A. Natural course of insulin resistance in type I diabetes. **N Engl J Med.**, v. 315, n.4, p.224-230, 1986.

YAZDANI-BIUKI, B.; STELZL, H.; BREZINSCHKE, H.P.; HERMANN, J.; MUELLER, T.; KRIPPL, P.; GRANINGER, W.; WASCHER, T.C. Improvement of insulin sensitivity in insulin resistant subjects during prolonged treatment with the anti-TNF-alpha antibody infliximab. **Eur J Clin Invest.**, v.34, n.9, p.641–642, 2004.

XU, H.; BARNES, G.T.; YANG, Q.; TAN, G.; YANG, D.; CHOU, C.J.; SOLE, J.; NICHOLS, A.; ROSS, J.S.; TARTAGLIA, L.A.; CHEN, H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **J Clin Invest.**, v.112, n.12, p.1821–1830, 2003.

ZHANG, Y.J.; ZHAO, W.; ZHU, M.Y.; TANG, S.S.; ZHANG, H. Thyroid-stimulating hormone induces the secretion of tumor necrosis factor-alpha from 3T3-L1 adipocytes via a protein kinase A-dependent pathway. **Exp Clin Endocrinol Diabetes.**, v.121, n.8, p.488-93, 2013.

ZHAO, Y.; SRIVASTAVA, D. A developmental view of microRNA function. **Trends Biochem Sci.**, v.32, n.4, p.189-197, 2007.

ANEXO

A - Material Suplementar

Figure 1. Membrana de nitrocelulose corada com Ponceau, utilizada como normalizador do conteúdo de TNF- α no músculo sóleo (**A**), músculo EDL (**B**) e tecido adiposo periepididimal (**C**) de ratos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com T3 (DT₃).

Figure 2. Membrana de nitrocelulose corada com Ponceau, utilizada como normalizador do conteúdo de IL-6 no músculo sóleo (**A**), músculo EDL (**B**) e tecido adiposo periepididimal (**C**) de ratos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com T3 (DT₃).

Figure 3. Membrana de nitrocelulose corada com Ponceau, utilizada como normalizador do conteúdo de NIS (**A**), TSHR (**B**) and Tg (**C**) na tireoide de ratos controle (C), diabético (D) e diabético tratado com T3 (DT₃).

Figure 4. Membrana de nitrocelulose corada com Ponceau, utilizada como normalizador do conteúdo de TNF-α no músculo sóleo (**A**), músculo EDL (**B**) e tecido adiposo periepididimal (**C**) de ratos controle (C), obeso (O) e obeso tratado com T3 (DT₃).

Figure 5. Membrana de nitrocelulose corada com Ponceau, utilizada como normalizador do conteúdo de IL-6 no músculo sóleo **(A)**, músculo EDL **(B)** e tecido adiposo periepididimal **(C)** de ratos controle (C), obeso (O) e obeso tratado com T3 (DT₃).

ANEXO

B* - Thyroid hormone reduces inflammatory cytokines improving glycemia in type 1 diabetic rats

Ana Carolina Panveloski-Costa^{*1}; Silvania da Silva Teixeira^{*1}; Izabela Martina Ramos Ribeiro¹; Caroline Serrano-Nascimento¹; Rodrigo Xavier das Neves²; Rodolfo Favaro Ribeiro²; Marília Seelaender²; Vagner Roberto Antunes¹; Maria Tereza Nunes¹

¹ Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil. phone: +55 11 3091 7465

² Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil. +55 11 3091 8039

*ACPC and SST have contributed equally to this work and should both be considered as first authors

CORRESPONDING AUTHOR

Maria Tereza Nunes, Ph.D.

Full Professor

Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences,
University of São Paulo, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil.

PHONE: (+5511) 3091-7431/ 7465. FAX: (+5511) 3091-7285

e.mail: mtnunes@icb.usp.br

AUTHOR DISCLOSURE STATEMENT: the authors have nothing to disclose.

*Manuscrito em fase de revisão no periódico: Metabolism: Clinical and Experimental