PAULA BARGI DE SOUZA

**AÇÕES NÃO GENÔMICAS DA TRIIODOTIRONINA (T3)
SOBRE A EXPRESSÃO, POLIADENILAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO
DOS GRÂNULOS DE TSH NOS TIREOTROFOS DE RATOS
HIPOTIREOIDEOS**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2010

PAULA BARGI DE SOUZA

**AÇÕES NÃO GENÔMICAS DA TRIIODOTIRONINA (T3)
SOBRE A EXPRESSÃO, POLIADENILAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO
DOS GRÂNULOS DE TSH NOS TIREOTROFOS DE RATOS
HIPOTIREOIDEOS**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Profa. Dra. Maria Tereza Nunes

São Paulo
2010

RESUMO

SOUZA, P. B. Ações não genômicas da Triiodotironina (T3) sobre a expressão, poliadenilação e distribuição dos grânulos de TSH nos tireotrofos de ratos hipotiroideos. Dissertação (Mestrado em Fisiologia). São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

O hormônio tireotrófico (TSH) é o principal regulador da síntese e da secreção dos hormônios tireoidianos (HTs), os quais exercem um mecanismo de *feedback* negativo na hipófise reduzindo a síntese das cadeias β e α (CGA - *Glycoprotein hormones Alpha Chain*) por meio de mecanismos que envolvem modificações na transcrição de genes que codificam essas proteínas (ações genômicas). Na última década tem aumentado o número de evidências de que, em paralelo as ações genômicas clássicas, algumas ações dos HTs são desencadeadas na presença de inibidores da transcrição gênica e em curto espaço de tempo (segundos a minutos), caracterizando-se assim as ações não genômicas dos HTs. Este trabalho tem como foco avaliar a possibilidade de que os HTs regulem a expressão desses genes não genomicamente. Para tal avaliamos as alterações decorrentes do hipotireoidismo, seguido ou não do tratamento agudo com T3 em dose fisiológica ou saturante, sobre o grau de poliadenilação e a expressão do mRNA das subunidades alfa (CGA) e β TSH, bem como sua repercussão sobre a síntese e secreção de β TSH. Através da metodologia de PCR em Tempo Real observamos nos animais tireoidectomizados tratados com salina (Tx) um aumento de 10 e 4 vezes no conteúdo de mRNA do β TSH e CGA, respectivamente, e na razão β TSH/CGA quando comparado ao animal eutireoideo. A administração da dose saturante de T3 em 30 min não alterou o conteúdo do mRNA de β TSH e CGA, enquanto a dose fisiológica reduziu 52 e 34%, respectivamente, sem alterar a razão β TSH/CGA, comparando com o grupo Tx. Com o ensaio RACE-PAT, observou-se que o grupo Tx apresentou um aumento no comprimento da cauda poli-A do mRNA de β TSH, não havendo alterações semelhantes para o mRNA de CGA. A administração aguda de T3, apenas na dose saturante, provocou uma redução de 17% no comprimento da cauda poli-A do mRNA do β TSH nos animais hipotiroideos comparados com o grupo Tx. Nenhuma alteração foi observada no comprimento da cauda poli-A do mRNA de CGA, indicando um possível efeito específico do T3 sobre a poliadenilação da subunidade β . Através dos ensaios Western Blot / ECL, Imunohistoquímica e Histoquímica foi observado que as duas doses de T3 utilizadas promoveram um aumento de 30% no conteúdo protéico de TSH, uma redução na marcação de β TSH na periferia dos tireotrofos e aumento na polimerização de actina na hipófise dos animais hipotiroideos tratados, possivelmente por inibir a secreção deste hormônio. Como estes resultados foram observados em 30 min, e parte deles envolveu alterações em etapas pós-transcricionais da regulação da expressão de genes (poliadenilação), podemos inferir que o T3 esteja agindo por uma via não genômica regulando a síntese e secreção do TSH.

Palavras-chave: Hormônio tireoidiano. Tireotrofina (TSH). Secreção. Ações não genômicas. Poliadenilação. Tireotrofo.

ABSTRACT

SOUZA, P. B. Non genomic actions of Triiodothyronine (T3) on the expression, polyadenylation and distribution of the TSH granules in thyrotrophs of hypothyroid rats. Master Thesis (Human physiology). Sao Paulo: Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, 2010.

The thyroid-stimulating hormone (TSH) is the main regulator of the synthesis and secretion of thyroid hormones (TH), which exert a negative feedback mechanism in the pituitary by reducing the synthesis of β and α (CGA - Glycoprotein hormones alpha chain) chains through mechanisms that involve changes in the transcription of genes that encode these proteins (known as genomic action). However, in the last decade, an increasing body of evidence has shown that, in parallel with the classical genomic mechanisms, some TH actions might be elicited in a short period time (seconds to minutes), and in the presence of gene transcription inhibitors, which indicates that TH can also act nongenomically. In the present study we evaluate if TH could regulate some steps of the expression of β TSH and CGA in a short period of time, which might provide evidence that they could act by non genomic mechanisms. For this, the expression and polyadenylation of alpha (CGA) and β subunits of TSH mRNA, and TSH content, were evaluated by real time PCR and western blot, respectively, in thyroidectomized (hypothyroid) rats, 30 min after they were subjected or not to physiological or saturating doses of T3. It was observed that thyroidectomized animals treated with saline (Tx) presented an increase of 10 and 4 times in the content of β TSH and CGA mRNA, respectively, and in the β TSH / CGA ratio compared with control group. The saturating dose of T3 did not alter the β TSH and CGA mRNAs content, but the physiological dose reduced them at 52 and 34% respectively, without changing the β TSH / CGA ratio, compared with Tx group. The RACE-PAT assay showed that the Tx rats presented an increase in the mRNA β TSH poly-A tail length, whereas no change was observed to the mRNA of CGA. The acute and saturating dose of T3 caused a 17% reduction in the length of mRNA β TSH poly-A tail in hypothyroid animals compared with hypothyroid group. No changes were observed in the length of the poly-A tail of mRNA CGA, suggesting a specific effect of T3 on the β subunit polyadenylation. Through the Western blot/ECL, histochemistry and immunohistochemistry methods we could observe that T3 (in both doses used) promoted a 30% increase in TSH protein content, a decrease in β TSH labeling near thyrotrophs plasma membrane and increased the actin polymerization in the pituitary of hypothyroid animals, possibly by inhibiting the secretion of this hormone. Considering that these results were observed in 30 min, and some of them involve changes in post-transcriptional regulation of gene expression (polyadenylation), we can infer that in parallel to its genomic action, T3 acts by non genomic pathways in the regulation of the TSH synthesis and secretion.

Keywords: Thyroid hormone. Thyrotropin (TSH). Secretion. Non genomic actions. Polyadenylation. Thyrotroph.

1 INTRODUÇÃO

O hormônio tireotrófico (TSH), também denominado tireotrofina, é uma glicoproteína de 28 kDa e, assim como as demais glicoproteínas hipofisárias (LH e FSH), é composta por duas diferentes subunidades, α e β , associadas por ligação não-covalente (PIERCE, PARSONS, 1981).

Os primeiros indícios de que as glicoproteínas hipofisárias eram compostas por duas subunidades surgiram a partir de estudos com as gonadotrofinas (LH e FSH), que demonstraram que com a dissociação ocorria uma redução para metade do peso molecular destes hormônios para a metade e perda total de atividade biológica (LI, STARMAN, 1964).

Estudos subsequentes utilizando-se de ferramentas que permitiam a combinação da subunidade α do LH com a subunidade β do TSH demonstraram que a troca de subunidade α não interferiu com a atividade biológica e com as características do hormônio tireotrófico (PAPKOFF et al., 1967; LIAO, PIERCE, 1971).

A partir deste resultado concluiu-se que a subunidade α é comum aos hormônios glicoprotéicos da hipófise, sendo expressa tanto nos tireotrofos quanto nos gonadotrofos, e que cabe à subunidade β a especificidade biológica do hormônio em questão, mas faz-se necessário que as duas subunidades estejam ligadas para que o hormônio apresente atividade biológica (BOUSFIELD et al., 2006).

Síntese e secreção do TSH

A síntese das cadeias α e β , a montagem e a secreção do TSH maduro ocorrem nos tireotrofos, tipo celular que compreende 5% da glândula adeno-hipófise.

Como toda proteína, a síntese das subunidades que compõem essa glicoproteína envolve a transcrição dos genes em RNA mensageiros. O gene que codifica a subunidade α , também denominada CGA (*Glycoprotein hormones Alpha Chain*) localiza-se no cromossomo 5, enquanto o gene da subunidade β está localizado no cromossomo 2, em ratos. Essa diferença na localização dos genes ocorre nas diversas espécies de vertebrados e implica numa regulação coordenada na expressão destas duas subunidades para que ocorra a síntese de TSH nos tireotrofos.

Após a transcrição, os RNAs heterogêneos das duas subunidades sofrem processamento pós-transcricional onde são incorporadas a estrutura de *cap* na região 5'UTR (*untranslated region*), e várias adeninas, na porção 3'UTR (cauda poli-A), processo denominado de poliadenilação. Estas estruturas estão relacionadas com a proteção do mRNA

frente à ação de RNAses garantindo uma maior estabilidade ao transcrito, bem como facilitam sua ancoragem aos polissomos permitindo a eficiência no processo de tradução. Desse modo, têm-se a formação dos mRNAs maduros.

Sob condições ideais, os mRNAs se associam aos polissomos e inicia-se a tradução das proteínas das subunidades α (CGA) e β que compõem o TSH. Enquanto parte da porção C-terminal está sofrendo tradução, na porção N-terminal já ocorre a clivagem do peptídeo sinal. O peptídeo sinal da proteína CGA é composto de 24 resíduos e possui elevada homologia entre as diferentes espécies, já o peptídeo sinal da subunidade β apresenta 20 resíduos e tem uma alta variabilidade entre as espécies.

Com a clivagem do peptídeo sinal, as proteínas CGA (120 aa; 13,4 kDa) e β TSH (138 aa; 15,5 kDa) são liberadas para o espaço das cisternas do retículo endoplasmático rugoso (RER) onde ocorre a glicosilação, formação de pontes dissulfeto e dá-se o início do acoplamento entre as subunidades.

A proteína CGA apresenta duas N-glicosilações nos resíduos 56 e 82 de asparagina (Asn), sendo a glicosilação do resíduo 56 essencial para a atividade biológica do hormônio maduro. Já a subunidade β do TSH apresenta somente uma N-glicosilação no resíduo 23 de Asn.

A maior parte das cinco e seis pontes dissulfeto presentes nas proteínas CGA e β TSH, respectivamente, são formadas no RER. Estas pontes entre resíduos de cisteína garantem a estrutura secundária das proteínas, estrutura esta que se apresenta preservada entre as diferentes espécies. Por meio das pontes dissulfeto há formação de “dobras” que permitem a ligação entre as duas subunidades e a estabilização do heterodímero, bem como o reconhecimento e a ligação com o receptor do TSH.

Após a formação do heterodímero, que ocorre cerca de 30 a 60 min após a síntese inicial das subunidades (CHIN et al., 1981), o TSH, ainda imaturo, segue para o Golgi onde irá sofrer processamento pós-traducional, completando-se a adição de resíduos de açúcares, como o ácido siálico, sulfatos, dentre outros, dando origem à molécula de TSH maduro (BOUSFIELD et al., 2006). Este permanece no interior de vesículas no citoplasma até que, sob estímulo apropriado, é liberado (exocitose) na corrente sanguínea. O TSH é então reconhecido por receptores específicos localizados na membrana plasmática das células foliculares tireoidianas, e como resultado dessa interação a tireóide é estimulada a produzir os hormônios tireoidianos (HTs).

Vale comentar que, estudos *in vitro* com tumores hipofisários tireotróficos demonstraram que as proteínas CGA e β TSH são produzidas em quantidades aproximadamente iguais (CHIN et al., 1981), porém, quase metade das subunidades beta produzidas sofrem degradação intracelular enquanto que a subunidade α permanece intacta, sendo o excesso não associado com a subunidade β liberado para o meio extracelular (CHIN et al., 1993).

Assim, ocupando uma posição central no eixo hipotálamo-hipófise-tiróide, o TSH é responsável pela manutenção apropriada da concentração dos HTs, a triiodotironina (T3) e a tiroxina (T4), na circulação (YUSTA et al., 1998), atuando em várias etapas da síntese e secreção destes, bem como no metabolismo da glândula tiróide.

Os HTs, por sua vez, exercem seus efeitos biológicos, através do controle da expressão de genes específicos, em várias etapas desse processo, o que leva ao aumento ou diminuição da síntese de proteínas envolvidas com o metabolismo, crescimento e desenvolvimento.

As ações genômicas ou transcricionais decorrem da interação do T3 com seus receptores (TRs) nucleares, os quais se apresentam associados a seqüências específicas localizadas na região promotora de seus genes-alvo, conhecidas como elementos responsivos aos HTs (TREs) (SHIBUSAWA et al., 2003). A maioria desses genes tem sua transcrição aumentada pelo T3, como é o caso dos que codificam o GH (MURPHY et al., 1992) e as subunidades α e II da cadeia pesada da miosina (α MHC e MHC-II), expressas no músculo cardíaco e esquelético, respectivamente (HADDAD et al., 1998). Outros, contudo, têm sua expressão reprimida pelo T3, como é o caso dos genes que codificam as subunidades CGA (SHUPNIK et al., 1983) e β do TSH (STATON et al., 1998) e o TRH (Hormônio Liberador da Tireotrofina) (SHIBUSAWA et al., 2003). Este mecanismo de ação requer um tempo relativamente longo, de horas ou até dias, para que a resposta hormonal seja desencadeada.

Por outro lado, algumas ações dos HTs são desencadeadas em curto espaço de tempo (segundos a minutos) e na presença de inibidores da transcrição gênica, o que indica que eles exercem também ações extranucleares (não genômicas). Estas ações foram descritas na membrana celular como alterações no fluxo de íons e de glicose, em componentes do citoesqueleto de células gliais, osteoblásticas e em somatotrofos, na atividade de quinases específicas, tais como a MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno), na estabilidade de alguns transcritos, como os da enzima málica e do GH, ou ainda aumentando a atividade e inserção de bombas na membrana plasmática, tais como a Na/K-ATPase (DAVIS et al., 1996; DAVIS et al., 2005; GOULART-SILVA et al., 2006; DAVIS et al., 2008).

Parte das ações não genômicas dos HTs envolve sua passagem pela membrana plasmática e interação com a PI3K (fosfatidoinositol 3-quinase), mitocôndrias ou retículo endoplasmático, enquanto outra parte depende da interação destes hormônios com uma proteína de membrana, a integrina $\alpha\beta_3$, que reconhece proteínas de matriz que apresentam o domínio RGD (CODY et al., 2007), mecanismo pelo qual os HTs promovem a ativação da MAPK, entre outras proteínas.

Ações dos hormônios tireoidianos sobre a síntese e secreção de TSH - mecanismo de feedback negativo

Vários estudos desenvolvidos na década de 80 descreveram mecanismos, pelos quais os HTs atuam, principalmente através de ação não genômica, na hipófise e no hipotálamo reduzindo a síntese e secreção de TSH, tanto de CGA quanto da subunidade β , e TRH, respectivamente (O'SHEA et al., 2002; SHUPNIK et al., 1985). Estas ações são desencadeadas principalmente pelo T3 gerado na hipófise e hipotálamo, a partir do T4 circulante, e decorrem da interação do T3 com os TRs presentes na região promotora dos genes que codificam a cadeia α e β do TSH (CGA e β TSH, respectivamente) e o TRH (CHIN et al., 1985).

Enquanto os estudos relacionados ao controle da expressão do gene que codifica o β TSH pelo T3 parecem estar mais consolidados, há ainda relativamente poucos relacionados à cadeia α do TSH. Estudos com hipófises de ratos e cultura de células de tumor tireotrófico (TtT97) demonstraram que o efeito negativo exercido pelos hormônios tireoidianos sobre a expressão de mRNA de CGA é maior em cultura celular contendo apenas tireotrofos do que em hipófise total (SHUPNIK et al., 1983), e que o T3 bloqueia a estimulação provocada por TRH, mas não tem efeito sobre a estimulação por GnRH ou AMPc (PENNATHUR et al., 1993). Estes dados sugerem que os efeitos inibitórios exercidos pelos hormônios tireoidianos sobre a expressão da subunidade CGA são tireotrofo-específicos.

Deste modo, quando há uma elevação da concentração plasmática de HT, ocorre maior inibição da expressão do TSH e TRH, e quando há redução dos HTs no plasma, observa-se o oposto, condições em que a tiróide tem sua atividade reduzida ou aumentada, respectivamente, o que caracteriza a base molecular do mecanismo de *feedback* negativo desencadeado pela concentração de HTs circulantes (ROSS et al., 1986; CARR et al., 1987; SUGIMOTO et al., 2007).

Somado a ação genômica dos HTs sobre o TSH, dados presentes na literatura demonstraram um decréscimo nos níveis de mRNA de CGA e β TSH em curtos períodos de

tempo (uma hora ou trinta minutos), após administração de HTs, sugerindo a possibilidade de um efeito dos HTs sobre a estabilidade destes transcritos (DUPRÉ et al., 2004; STATON et al., 1998; CHIN et al., 1993).

Nesse sentido, Krane e colaboradores (1991) demonstraram que após 8 h do tratamento com T3 ocorre diminuição da estabilidade e da meia vida (de 24 para 9 h) do mRNA do β TSH, evento associado a uma redução no grau de poliadenilação deste transcrito, caracterizando uma regulação da expressão desta subunidade a nível pós-transcricional, desencadeada pelo T3.

Em continuidade ao trabalho sobre possíveis alterações pós-transcricionais do T3 sobre o mRNA de β TSH, Leedman e colaboradores (1995) descreveram uma proteína que se liga na porção 3'UTR (região não traduzida) deste mRNA desestabilizando-o. Observaram que esta proteína é regulada pelo T3, e que poderia estar envolvida em algum mecanismo não genômico desencadeado pelo HT na estabilidade do mRNA de β TSH.

Já com relação à subunidade α , os dados presentes na literatura limitam-se a ações genômicas inibitórias dos HTs através de interação com os receptores TR α 1 e TR β 1 (SHUPNIK et al., 1987; McCABE et al., 1998).

Ainda, sabe-se que a resposta de redução da secreção de TSH é bastante rápida: em apenas duas horas já se observa uma redução de 17 % frente à administração T3 e de 9 % para T4 (EVERTS et al., 1994).

Esses dados somados as alterações nos conteúdos de mRNA das subunidades CGA e β TSH e na estabilidade deste último, sugerem que possíveis mecanismos não genômicos estejam sendo desencadeados pelos HTs, seja sobre a síntese como também no que diz respeito à secreção de TSH.

Ações não genômicas dos HTs e resultados obtidos no nosso laboratório em recentes estudos

Enquanto vários estudos vêm sendo desenvolvidos para melhor compreensão do mecanismo de ação genômica dos HTs sobre a expressão de β TSH e da subunidade α , poucos trabalhos existem relacionados às suas possíveis ações não genômicas sobre estas subunidades, e, considerando a importância de que respostas rápidas sejam desencadeadas frente às flutuações da concentração dos HTs na circulação, torna-se importante que tal avaliação seja feita.

Nosso laboratório vem despendendo esforços para a identificação de ações não genômicas dos HTs. Trabalhos focados neste tema demonstraram que ratos hipotiroideos,

quando submetidos à administração aguda de doses supra-fisiológicas de T3 apresentaram, após 30 min, aumento no grau de poliadenilação do mRNA do GH (VOLPATO et al., 2000). Este aumento do comprimento da cauda poli-A do transcrito de GH já havia sido observado em trabalhos com tratamentos mais longos (cerca de 8 h) (MURPHY et al., 1992; LEEDMAN et al., 1995) e é um dado indicativo de uma elevação da sua estabilidade, o que poderia dar suporte ao aumento da expressão de mRNA do GH observado neste curto período de tempo (30 min) (VOLPATO, NUNES, 2001).

A maioria dos mRNAs dos eucariotos possui uma sequência repetida de bases de adenina, conhecida como cauda de poliadenilação (cauda poli-A), próximo a sua terminação 3'UTR.

A formação da cauda poli-A pode ocorrer tanto no núcleo quanto no citoplasma e difere substancialmente. No núcleo a poliadenilação envolve duas etapas imediatamente após a formação do transcrito primário (RNA heterogêneo): primeiro ocorre a clivagem do precursor e, em seguida, a adição de adeninas, cerca de 200 resíduos, uma de cada vez, processo conhecido como poliadenilação.

Já, no citoplasma, a poliadenilação não está associada à remoção do precursor, uma vez que este já foi removido no núcleo, e o número de adeninas adicionadas varia com o tempo e a fase do desenvolvimento e, certamente, pode ser regulado por fatores que ainda não são conhecidos (SHEETS, WICKENS et al., 1989; SHEETS et al., 1990; BILGER et al., 1994).

A essas adeninas encontram-se associadas proteínas ligantes da cauda poli-A, as PABPs, que, além de protegerem os mRNAs da ação de RNases, também participam do ancoramento deles ao aparelho ribossomal de tradução (GALLIE, 1998; WANG et al., 1999; SACHS, 1993). Assim, uma falha no processo de adenilação ou alterações pós-transcricionais que resultem em deadenilação muitas vezes precedem uma baixa expressão de determinada proteína, uma vez que a estabilidade e a tradução de seu mRNA encontram-se prejudicadas.

Conforme relatado, o mRNA do GH de ratos hipotiroideos submetidos à dose aguda e saturante de T3 apresenta maior número de resíduos de adenina na sua cauda poli-A (VOLPATO et al., 2000), fato indicativo de que esse procedimento aumenta a estabilidade e a taxa de tradução deste mRNA, o que parece fundamentar o aumento do conteúdo de GH na região perinuclear do somatotrofo após 30 min da administração do T3 também observado em nosso laboratório (GOULART-SILVA et al., 2006). Essa rápida resposta sugere que antes da ação

transcricional do T3 sobre o gene do GH, que é lenta, este hormônio desencadeia uma ação pós-transcricional que permite que o GH seja sintetizado de imediato.

Ainda, observa-se que, nas células da adenohipófise de ratos hipotiroídeos o citoesqueleto de actina encontra-se desorganizado e que, nos somatotrofos os poucos grânulos de GH se apresentam localizados na periferia das células. Após 30 min da administração de T3, observa-se polimerização da actina, redução da marcação de GH da periferia e aumento de GH na região perinuclear dos somatotrofos, indicando que, em paralelo à reorganização do citoesqueleto de actina, ocorre a secreção do GH e aumento da sua síntese, já que na região perinuclear se encontra o retículo endoplasmático rugoso, maquinaria sintética das células (GOULART-SILVA et al., 2006).

Em trabalho subsequente, esses achados foram confirmados por meio de análise de perfil polissomal, que mostrou que o T3 aumenta o conteúdo de mRNA de GH na fração polissomal, dado indicativo de uma ação rápida do hormônio sobre a tradução deste transcrito, bem como se observou aumento de IGF-I plasmático, refletindo um aumento da secreção de GH por esse mesmo procedimento (SILVA et al., 2010).

Apesar de este estudo ter sido direcionado ao hormônio do crescimento (somatotrofos), o desarranjo no citoesqueleto foi observado em toda a população celular da adenohipófise e desencadeou uma série de perguntas que culminaram com a idealização do presente estudo.

É possível que o oposto do que foi observado com o GH ocorra com administração aguda de T3 sobre o de mRNA de β TSH e de CGA, provocando uma redução na expressão e no grau de poliadenilação destes transcritos, assim como na taxa de tradução, levando à diminuição da síntese de TSH, antes mesmo que uma redução da atividade transcricional nestes genes se evidencie.

Esse efeito poderia representar um mecanismo adicional de controle da expressão gênica do TSH, por meio de um mecanismo de *feedback* negativo, acionado não genomicamente, ainda pouco conhecido e explorado, sendo esta possibilidade, o principal foco deste estudo.

6 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que, somado às ações genômicas inibitórias sobre a transcrição gênica das subunidades alfa (CGA) e beta (β TSH), o T3, possivelmente por intermédio de ações não genômicas, promove:

- 1) Redução no conteúdo de mRNA de β TSH (52%) em doses fisiológicas;
- 2) Redução no conteúdo de mRNA de CGA (34%) em doses fisiológicas;
- 3) Redução no comprimento da cauda poli-A do mRNA de β TSH (17%, ~37 adeninas) e provavelmente estabilidade deste transcrito, no grupo Tx tratado com dose saturante (Tx100);
- 4) Aumento de cerca de 30% no conteúdo total de β TSH hipofisário; possivelmente devido um bloqueio na secreção, tanto no tratamento com dose fisiológica como saturante;
- 5) Redução da marcação de β TSH na periferia do tireotrofo e aumento no citoplasma, corroborando os dados descritos no item 4.

Estes dados evidenciam pela primeira vez a existência de um mecanismo adicional pelo qual o T3 promove redução na síntese e secreção de TSH, em um período muito curto de tempo caracterizando uma ação não genômica, que se soma ao já reconhecido efeito de *feedback* negativo que ele desencadeia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRES, M. M. **Fisiologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008. 1232 p.
- BASSET, J. H. D.; HARVEY, C. B.; WILLIAMS, G. R. Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 213, p. 1-11, 2003.
- BILGER, A.; FOX, C. A.; WAHLE, E.; WICKENS, M. Nuclear polyadenylation factors recognize cytoplasmic polyadenylation elements. **Genes Dev.**, v. 8: p. 1106-1116, 1994.
- BOADO, R.; CHOPRA, I. L.; HUANG, T. S.; CHIN, W. W.; WETTSTEIN, F. O. A study of pituitary thyrotropin, its subunits, and messenger ribonucleic acids in nonthyroidal illness. **Metabolism**, v. 37, n. 4, p. 395-399, 1988.
- BOUSFIELD, G. R.; JIA, L.; WARD, D. N. Gonadotropins: chemistry and biosynthesis. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. (eds.) **Physiology of reproduction**, 3. ed. Amsterdam: Academic Press, 2006. p. 1581-1625.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 7 n. 72, p. 248-254, 1976.
- CARR, F. E.; NEED, L. R.; CHIN, W. W. Isolation and characterization of the rat thyrotropin β -subunit gene. **J. Biol. Chem.**, v. 262, n. 3, p. 981-987, 1987.
- CHIN, W. W.; MALOOF, F.; HABENER, J. F. Thyroid-stimulating hormone biosynthesis. cellular processing, assembly, and release of subunits. **J. Biol. Chem.**, v. 256, n. 6, p. 3049-3066, 1981.
- CHIN, W. W.; SHUPNIK, M. A.; ROSS, D. S.; HABENER, J. F.; RIDGWAY, E. C. Regulation of the alpha and thyrotropin beta-subunit messenger ribonucleic acids by thyroid hormones. **Endocrinology**, v. 116, n. 3, p. 873-878, 1985.
- CHIN, W. W.; CARR, F. E.; BURNSIDE, J.; DARLING, D. S. Thyroid hormone regulation of thyrotropin gene expression. **Recent Prog Horm Res.**, v. 48, p. 393-414, 1993.
- CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal. Biochem.**, v. 162, p. 156-159, 1987.
- CODY, V.; DAVIS, P.J.; DAVIS, F.B. Molecular modeling of the thyroid hormone interactions with alpha v beta 3 integrin. **Steroids**, v. 72, p. 165-170, 2007.
- DAVIS, P. J.; DAVIS, F. B. Nongenomic actions of thyroid hormone. **Thyroid**. v. 6, p. 497-504, 1996.
- DAVIS, P. J.; DAVIS, F. B.; CODY, V. Membrane receptors mediating thyroid hormone action. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 16, p. 429-435, 2005.
- DAVIS, P. J.; LEONARD, J. L.; DAVIS, F. B. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. **Front. Neuroendocrinol.**, v. 29, p. 211-218, 2008.

*De acordo com:

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

- d'EMDEN, M. C.; WARK, J. D. Effects of tri-iodothyronine, cortisol and transcriptional inhibitors on vitamin D3-enhanced thyrotrophin secretion by rat pituitary cells in vitro. **J. Endocrinol.**, v. 121, n. 3, p. 451-458, 1989.
- DUPRÉ, S. M.; GUISSOUMA, H.; FLAMANT, F.; SEUGNET, I.; SCANLAN, T. S.; BAXTER, J. D.; SAMARUT, J.; DEMENEIX, B. A.; BECKER, N. Both thyroid hormone receptor (TR) β 1 and TR β 2 isoforms contribute to the regulation of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone. **Endocrinology**, v. 145, n. 5, p. 2337-2345, 2004.
- DUSSAULT, A.; POULIOT, M. Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. **Biol. Proced. Online**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2006.
- ECKLAND, D. J.; LIGHTMAN, S. L. Hypothalamo-hypophysial blood flow: a novel control mechanism in pituitary function? **J. Endocrinol.**, v. 113, n. 1, p. R1-R2, 1987.
- EVERTS, M. E.; VISSER, T. J.; MOERINGS, E. P. C. M.; DOCTER, R.; TOOR, H. VAN; TEMPELAARS, A. M. P.; JONG, M. DE; KRENNING, E. P.; HENNEMANN, G. Uptake of triiodothyroacetic acid and its effect on thyrotropin secretion in cultured anterior pituitary cells. **Endocrinology**, v. 135, n. 6, p. 2700-2707, 1994.
- GALLIE, D. R. A tale of two termini: a functional interaction between the termini of an mRNA is a prerequisite for efficient translation initiation. **Gene**, v. 126, p. 1-11, 1998.
- GARD, T. G.; BERNSTEIN, B.; LARSEN, P. R. Studies on the mechanism of 3,5,3'-triiodothyronine-induced suppression of secretagogue-induced thyrotropin release in vitro. **Endocrinology**, v. 108, n. 6, p. 2046-2053, 1981.
- GOULART-SILVA, F.; GIANNOCO, G.; SANTOS, M. F.; NUNES, M. T. Thyroid hormone induction of actin polymerization in somatotrophs of hypothyroid rats: potential repercussions in growth hormone synthesis and secretion. **Endocrinology**, v. 147, p. 5777-5785, 2006.
- HADDAD, F.; QIN, A. X.; McCUE, S. A.; BALDWIN, K. M. Thyroid receptor plasticity in striated muscle types: effects of altered thyroid state. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 274, p. 1018-1026, 1998.
- KINDLER, S.; WANG, H.; RICHTER, D.; TIEDGE, H. RNA transport and local control of translation. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 21, p. 223-45, 2005.
- KRANE, I. M.; SPINDEL, E. R.; CHIN, W. W. Thyroid hormone decreases the stability and the poly(A) tract length of rat thyrotropin beta-subunit messenger RNA. **Mol. Endocrinol.**, v. 5, n. 4, p. 469-475, 1991.
- LEEDMAN, P. J.; STEIN, A. R.; CHIN, W. W. Regulated specific protein binding to a conserved region of the 3'-untranslated region of thyrotropin β -subunit mRNA. **Mol. Endocrinol.**, v. 9, n. 3, p. 375-387, 1995.
- LI, C. H.; STARMAN, B.. Molecular weight of sheep pituitary interstitial cell-stimulating hormone. **Nature**, v. 202, p. 291-292, 1964.
- LIAO, T. H.; PIERCE, J. G. The primary structure of bovine thyrotropin. The amino acid sequences of the reduced, S-carboxymethyl α and β chains. **J. Biol. Chem.**, v. 246, n. 4, p. 850-865, 1971.

- McCABE, C. J.; YARWOOD, N. J.; GURR, J. A.; GITTOES, N. J.; SHEPPARD, M. C.; FRANKLYN, J. A. Differential regulation of the human thyrotropin alpha-subunit promoter by thyroid hormone receptors alpha1 and beta1. **Thyroid**, v. 8, n. 7, p. 601-608, 1998.
- MORIARTY, G. C.; TOBIN, R. B. An immunocytochemical study of TSH β storage in rat thyroidectomy cells with and without D or L Thyroxine treatment. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 24, n. 11, p. 1140-1149, 1976.
- MOURA, E. G.; MOURA, C. C. P. Regulação da síntese e secreção de tireotrofina. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 48, n. 1, p. 40-52, 2004.
- MURPHY, D.; PARDY, K.; SEAH, V.; CARTER, D. Posttranscriptional regulation of rat growth hormone gene expression: increased message stability and nuclear polyadenylation accompany thyroid hormone depletion. **Mol. Cell. Biol.**, v. 12, n. 6, p. 2624-2632, 1992.
- NAKAMURA, H.; NAKAO, K. Mechanism of regulation of TSH-biosynthesis and secretion. **Nippon Rinsho**, v. 51, n. 10, p. 2611-2617, 1993.
- O'SHEA, P. J.; WILLIAMS, G. R. Insights into the physiological actions of thyroid hormones receptors from genetically modified mice. **J. Endocrinol.**, v. 175, p. 553-570, 2002.
- PAPKOFF, H.; SAMY, T. S. Isolation and partial characterization of the polypeptide chains of ovine interstitial cell-stimulating hormone. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 147, p. 175-177, 1967.
- PENNATHUR, S.; MADISON, L. D.; KAY, T. W.; JAMESON, J. L. Localization of promoter sequences required for thyrotropin-releasing hormone and thyroid hormone responsiveness of the glycoprotein hormone alpha-gene in primary cultures of rat pituitary cells. **Mol. Endocrinol.**, v. 7, n. 6, p. 797-805, 1993.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acid Res.**, v. 29, n. 9, p. 2002-2007, 2001.
- PIERCE, J. G.; PARSONS, T. F. Glycoprotein hormones: structure and function. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 50, p. 465, 1981.
- ROSS, D. S.; ELLIS, M. F.; RIDGWAY, E. C. Acute thyroid hormone withdrawal rapidly increases the thyrotropin beta and alpha-subunit messenger ribonucleic acids in mouse thyrotropic tumors. **Endocrinology**, v. 118, n. 3, p. 1006-1010, 1986.
- ROUSSEL, J. P.; GRAZZINI, E.; ASTIER, H. Somatostatin blocks the potentiation of TRH-induced TSH secretion from perfused pituitary fragments and the change in intracellular calcium concentrations from dispersed pituitary cells elicited by prepro-TRH (PS4) or by triiodothyronine. **J. Mol. Endocrinol.**, v. 19, n. 1, p. 87-97, 1997.
- SACHS, A. B. Messenger RNA degradation in eukaryotes. **Cell**, v. 74, p. 413-421, 1993.
- SALLÉS, F. J.; RICHARDS, W. G.; STRICKLAND, S. Assaying the polyadenylation state of mRNAs. **Methods: a companion to methods enzymol.**, v. 17, p. 38-45, 1999.
- SHEETS, M. D.; WICKENS, M. Two phases in the addition of poly(A) tail. **Genes Dev.**, v. 3, p. 1401-1412, 1989.
- SHEETS, M. D.; OGG, S. C.; WICKENS, M. P. Point mutations in AAUAAA and the poly(A) addition site: effects on the accuracy and efficiency of cleavage and polyadenylation *in vitro*. **Nucleic Acid Res.**, v. 18, n. 19, p. 5799-5805, 1990.

SHIBUSAWA, N.; HOLLENBERG, A. N.; WONDISFORD, F. E. Thyroid hormone receptor DNA binding is required for both positive and negative gene regulation. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 2, p. 732-738, 2003.

SHUPNIK, M. A.; CHIN, W. W.; ROSS, D. S.; DOWNING, M. F.; HABENER, J. F.; RIDGWAY, C. Regulation by thyroxine of mRNA encoding the α subunit of mouse thyrotropin. **J. Biol. Chem.**, v. 258, n. 24, p. 15120-15124, 1983.

SHUPNIK, M. A.; CHIN, W. W.; HABENER, J. F.; RIDGWAY, E. C. Transcriptional regulation of the subunit genes by thyroid hormone. **J. Biol. Chem.**, v. 260, n. 5, p. 2900-2903, 1985.

SHUPNIK, M. J.; RIDGWAY, E. C. Thyroid hormone control of thyrotropin gene expression in rat anterior pituitary cells. **Endocrinology**, v. 121, n. 2, p. 619-624, 1987.

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

STATON, M. J.; LEEDMAN, P. J. Posttranscriptional regulation of thyrotropin β -subunit messenger ribonucleic acid by thyroid hormone in murine thyrotrope tumor cells: a conserved mechanism across species. **Endocrinology**, v. 139, n. 3, p. 1093-1100, 1998.

SUGIMOTO, K.; MORI, K.; UCHIDA, K.; KOBAYASHI, D.; ITOI, K. Quantitative analysis of thyroid-stimulating hormone messenger RNA and heterogeneous nuclear RNA in hypothyroid rats. **Brain Res. Bull.**, v. 74, p. 142-143, 2007.

TAKANO, K.; AJIMA, M.; TERAMOTO, A.; HATA, K.; YAMASHITA, N.. Mechanisms of action of somatostatin on human TSH-secreting adenoma cells. **Am. J. Physiol.**, v. 268, n. 4 Pt 1, p. E558-E564, 1995.

VOLPATO, C. B.; SHIRAISHI, E. M.; LATRONICO, A. C.; NUNES, M. T. – Thyroid hormone modulates the polyadenylation of growth hormone mRNA in rats. **Endocr. J.**, v. 47, (Supl), p. 169, 2000.

VOLPATO, C. B.; NUNES, M. T. Functional evidence for the presence of type II 5'-deiodinase in somatotropes and its adaptive role in hypothyroidism. **Neuroendocrinol.**, v. 74, p. 220-226, 2001.

WANG, Z.; DAY, N.; TRIFILLIS, P.; KILEDJIAN, M. An mRNA stability complex functions with poly(A)-binding protein to stabilize mRNA in vitro. **Mol. Cell. Biol.**, v. 19, p. 4552-4560, 1999.

YUSTA, B.; ALARID, E. T.; GORDON, D. F. The Thyrotropin β -subunit gene is repressed by thyroid hormone in a novel thyrotrope cell line, mouse T α T1 cells. **Endocrinology**, v. 139, n. 11, p. 4476-4482, 1998.

ZOELLER, R. T.; TAN, S. W.; ROCHELLE, W. T. General Background on the Hypothalamic-Pituitary-Thyroid (HPT) Axis. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 37, p. 11-53, 2007.