

RAFAEL BENJAMIN ARAÚJO DIAS

**ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA (RNAseq) DAS CÉLULAS
FOLICULARES TIREOIDIANAS REVELA UMA DIVERSIDADE
DE AÇÕES AUTÓCRINAS DO T3**

RAFAEL BENJAMIN ARAÚJO DIAS

**ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA (RNAseq) DAS CÉLULAS
FOLICULARES TIREOIDIANAS REVELA UMA DIVERSIDADE
DE AÇÕES AUTÓCRINAS DO T3**

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
2018

RAFAEL BENJAMIN ARAÚJO DIAS

**ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA (RNAseq) DAS CÉLULAS
FOLICULARES TIREOIDIANAS REVELA UMA DIVERSIDADE
DE AÇÕES AUTÓCRINAS DO T3**

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(a): ProfªDrªMaria Tereza Nunes

São Paulo
2018

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Araujo Dias, Rafael Benjamin
ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA (RNaseq) DAS CÉLULAS
FOLICULARES TIREOIDIANAS REVELA UMA DIVERSIDADE DE
AÇÕES AUTÓCRINAS DO T3 / Rafael Benjamin Araujo
Dias; orientadora Maria Tereza Nunes. -- São Paulo,
2018.
89 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Hormônio tireoideiano . 2. Sequenciamento Nova
Geração . 3. Expressão Gênica. 4. T3. 5. PTU. I.
Nunes, Maria Tereza, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato: Rafael Benjamin Araújo Dias

Título da Tese: **Análise do transcriptoma (RNAseq) das células foliculares tireoidianas revela uma diversidade de ações autócrinas do T3**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Tereza Nunes

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a _____/_____/_____, considerou o candidato:

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

Examinado(a): Assinatura: _____

Nome: _____

Instituição: _____

Examinado(a): Assinatura: _____

Nome: _____

Instituição: _____

Examinado(a): Assinatura: _____

Nome: _____

Instituição: _____

Presidente: Assinatura: _____

Nome: _____

Instituição: _____



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

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

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Papel do T3 no controle da expressão de genes em células tireoidianas de rato*", registrado sob o protocolo nº **92/2017**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **18/09/2017** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Maria Tereza Nunes**

- Departamento: *Fisiologia e Biofísica*

- Membros da Equipe: *Rafael Benjamin Araújo Dias (pós-graduando), Giovanna Aparecida Moreira (Iniciação científica)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico ww2.icb.usp.br/icb/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Role of T3 on the control of rat thyroid cells gene expression*", protocol nº **92/2017**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **9/18/2017** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Maria Tereza Nunes**

- Team members: *Rafael Benjamin Araújo Dias (Graduate Student), Giovanna Aparecida Moreira (Undergraduate Student)*

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

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Rattus norvegicus</i>	<i>Wistar</i>	<i>Macho/male</i>	<i>150 g</i>	<i>160</i>

São Paulo, 27 de setembro de 2017.

Prof. Dr. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA-ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por guiar meus passos ao longo desse caminho, me auxiliando a vencer todas as pedras, curvas e percalços dessa estrada.

Aos meus pais Pedro e Rita que sempre me encorajaram a acreditar que eu podia sonhar alto e que sempre estariam ao meu lado, que dividiram comigo as mais tristes lágrimas e riram comigo os mais emocionados sorrisos.

Às minhas irmãs Natalia e Ana Flávia mestres na arte de dizer as palavras certas nas horas certas, se mostrando sempre pacientes e encorajadoras.

Aos meus sobrinhos tão queridos, João Victor e Ana Luisa que souberam entender que a distância e a saudade seriam nossas companheiras de caminhada ao longo desses anos, mas que nunca deixaram de mostrar seu apoio e entusiasmo em cada reencontro;

Ao Victor, meu grande amor, o ser humano mais especial de minha vida. Esteve comigo durante todos, literalmente todos os momentos desse percurso. Se existisse a possibilidade de dividir esse título com alguém, ele seria, com certeza, o maior merecedor! Agradeço a paciência e o apoio em todos os momentos difíceis e alegres e por todo o aprendizado de vida que construímos juntos;

À minha orientadora Maria Tereza pela confiança e, acima de tudo, amizade, pelos conselhos não somente direcionados a minha via profissional, mas pela bondade em compartilhar, em diversos momentos difíceis, sua experiência de vida e sabedoria;

Às técnicas Leonice Poyares e Renata Siqueira, cuja competência, eficiência, carinho e amizade foram imprescindíveis para o sucesso desse processo;

À Jamile Calil Silveira minha grande parceira de trabalho e amiga, agradeço por ter me ensinado grande parte do que aprendi neste laboratório, seu jeito doce e meigo de ser nos rendeu uma cumplicidade incrível no trabalho e na vida.

Aos amigos do laboratório Adriana, AnaK, Armando, Carol, Cecília, Laura, Lucas, Luciano, Rafael Salgueiro, Paula pelo companheirismo e amizade que contribuíram muito para a realização deste trabalho.

Às instituições de fomento FAPESP, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro aos projetos desenvolvidos no laboratório.

*“Para obter conhecimento adicione coisas todos os dias,
Para ganhar sabedoria, elimine coisas todos os dias”*

Lao Tsé

RESUMO

DIAS, R.B.A **Análise do transcriptoma (RNAseq) das células foliculares tireoidianas revela uma diversidade de ações autócrinas do T3.** 2018. f.89. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2018.

Os hormônios tireoidianos (HTs) desempenham um papel importante em diversos processos, tais como o crescimento, desenvolvimento e metabolismo dos tecidos em geral. Embora estudos tenham demonstrado que os HTs agem diretamente nas células foliculares da tireoide reduzindo sua resposta ao TSH, pouco se sabe, a nível molecular, sobre essa e outras ações dos HTs na própria glândula tireoide. Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi avaliar alterações no perfil de expressão gênica nas células foliculares tireoidianas (células PCCl3) em resposta ao tratamento com triiodotironina (T3). Após atingir a confluência desejada, as células PCCl3 foram mantidas em meio depletado de HTs (grupo hipotireoideo - Hipo) por 24h. Após esse período, parte das células foi tratada com 10^{-7} M de T3 (grupo T3) por 24 h. As células foram, então, lisadas para extração de RNA total para análise do transcriptoma, por RNAseq. Foi obtido como resultado, uma lista de genes diferencialmente expressos da qual foram selecionados cinco genes para validação *in vitro* (novo lote de células PCCl3 submetidas às mesmas condições descritas acima) e *in vivo* [ratos Wistar (250g), tratados por 4 semanas com T3 (1,5 µg/100g de peso corpóreo – PC, ip; grupo hipertireoideo – T3) ou PTU (10 µg/100g PC; ip, grupo hipo): o *Slc16a1*, que codifica o MCT 8, responsável pelo transporte de T3 através da membrana, o *Snrpd1*, *9-March*, *Pfdn1* e *Fam103a1*, que codificam proteínas envolvidas no controle pós-transcricional e pós-traducional da expressão gênica. O tratamento com T3 estimulou a expressão dos genes *Snrpd1*, *Pfdn1* e *Fam103a1*, enquanto reduziu a expressão de *9-March* e *Slc16a1*. Juntos esses resultados demonstram a existência de um efeito autócrino exercido pelo T3 sobre o controle do seu próprio *turnover* proteico.

Palavras-chave: Hormônios tireoidianos. Sequenciamento de Nova Geração. Expressão Gênica. Células tireoidianas. Ratos Wistar. PTU. T3.

ABSTRACT

DIAS, R.B.A **Transcriptome analysis (RNAseq) of thyroid follicular cells reveals a diversity of autocrine actions of T3**. 2018. f.89. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2018.

Thyroid hormones (THs) play an important role in many processes, such as growth, development and metabolism of tissues in general. Although studies have shown that THs act directly on follicular thyroid cells reducing their response to TSH, little is known about this and other actions of THs at the molecular level in the thyroid gland itself. In this sense, the aim of the present study was to evaluate changes in the gene expression profile in the thyroid follicular cells (PCCl3 cells) in response to triiodothyronine (T3) treatment. After reaching 60% confluence, PCCl3 cells were maintained in TH depleted medium (Hypo group) for 24h. After this time, part of the cells was treated with 10^{-7} M T3 (T3 group) for 24 h. Cells were then lysed for total RNA extraction for transcriptome analysis by RNAseq. As a result, a list of differentially expressed genes from which five genes were selected for *in vitro* validation (PCCl3 cells under the same conditions described above) and *in vivo* [Wistar rats (250g), treated for 4 weeks with T3 (1.5 µg / 100 g BW, ip, hyperthyroid group) or PTU (10 µg / 100 g BW; ip, hypothyroid group): *Slc16a1*, which encodes MCT 8, responsible for the transport of T3 through the plasma membrane, *Snrpd1*, *9-March*, *Pfdn1* and *Fam103a1*, which encode proteins involved in post-transcriptional and post-translational control of gene expression. T3 treatment stimulated the expression of the *Snrpd1*, *Pfdn1* and *Fam103a1* genes, while reduced the expression of *9-March* and *Slc16a1*. Together these results demonstrate the existence of an autocrine effect exerted by T3 on the control of its own protein turnover.

Key-words: Thyroid hormone. New Generation Sequencing. Gene Expression. Thyroid cells. Wistar Rats. PTU. T3.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <u>Protocolo Experimental</u>	23
Figura 2 - <u>Esquema das etapas do processo de sequenciamento</u>	25
Figura 3 - <u>Esquema ilustrativo do procedimento 1</u>	32
Figura 4 - <u>Esquema ilustrativo do procedimento 2</u>	32
Figura 5 - <u>Depleção de RNA Ribossomal</u>	35
Figura 6 - <u>Eficiência de depleção de RNA Ribossomal</u>	35
Figura 7 - <u>Heatmap</u>	37
Figura 8 - <u>Genes diferencialmente expressos selecionados para validação</u>	38
Figura 9 - <u>Avaliação da expressão de <i>Rpl-19</i> como gene constitutivo</u>	39
Figura 10 - <u>Validação da expressão de <i>Slc16a1</i> por RT-qPCR e western bot</u>	40
Figura 11 - <u>Expressão de <i>Slc16a1</i> frente ao tratamento com T3</u>	41
Figura 12 - <u>Avaliação do conteúdo proteico de MCT 8 em células tratadas com T3</u>	41
Figura 13 - <u>Expressão de <i>Slc16a1</i> em células PCC13 previamente incubadas com PTU</u>	42
Figura 14 - <u>Expressão gênica e proteica de MCT 8 em ratos hipo e hipertireoideos</u>	43
Figura 15 - <u>Expressão gênica e proteica de MCT 8 em ratos submetidos previamente ao hipotireoidismo e tratados com T3</u>	43
Figura 16 - (A) <u>Validação <i>Snrpd1</i> por RT-qPCR</u>	45
Figura 17 - <u>Expressão da proteína SNRPD1 por western blot</u>	45
Figura 18 - <u>Análise da expressão do <i>Snrpd1</i> (estudo in vivo)</u>	46
Figura 19 - <u>Expressão gênica e proteica de <i>Snrpd1</i> em ratos submetidos previamente ao hipotireoidismo e tratados com T3</u>	47
Figura 20 - <u>Esquema ilustrativo do processo de Poliubiquitinação</u>	48
Figura 21 - <u>Validação <i>9-March</i> por RT-qPCR</u>	50
Figura 22 - <u>Expressão da proteína 9-MARCH por western blot</u>	51
Figura 23 - <u>Ensaio de Poliubiquitinação</u>	52
Figura 24 - <u>Análise da expressão do <i>9-March</i> (estudo in vivo)</u>	53
Figura 25 - <u>Expressão gênica e proteica de <i>9-March</i> em ratos submetidos previamente ao hipotireoidismo e tratados com T3</u>	53
Figura 26 - <u>Validação <i>Pfdn1</i> por RT-qPCR</u>	55
Figura 27 - <u>Expressão da proteína PFDN1 por western blot</u>	56
Figura 28 - <u>Análise da expressão do <i>Pfdn1</i> (estudo in vivo)</u>	57
Figura 29 - <u>Validação <i>Fam103a1</i> por RT-qPCR</u>	59

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 JUSTIFICATIVA	20
3 OBJETIVO	21
4 MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 Cultura de células	22
4.2 Extração de RNA Total.....	23
4.3 Depleção de RNA ribossomal (RiboMinus™).....	24
4.4 RT-PCR	27
4.5 Reação de RT-PCR em Tempo Real (RT-qPCR)	27
4.6 Avaliação da expressão de proteínas por Western Blotting	28
4.7 Ensaio de Poliubiquitinação	30
4.8 Experimentos <i>In vivo</i>	30
4.9 Análise dos Dados	33
5 RESULTADOS	34
5.1 Análise de eficiência de depleção de RNA ribossomal.....	34
5.2 Clusterização das amostras: <i>Heatmap</i>	36
5.3 Validação dos genes selecionados por RT-qPCR	39
5.3.1 <i>Slc16a2</i>	39
5.3.2 Gene <i>Snrpd1</i>	44
5.3.3 Gene <i>9-March</i>	47
5.3.4 Gene <i>Pfdn1</i>	53
5.3.5 Gene <i>Fam103a1</i>	57
6 DISCUSSÃO	60
7 CONCLUSÃO	71
REFERENCIAS.....	72

1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, o conceito de homeostase foi sofrendo evoluções e modificações com o avanço da ciência e das novas tecnologias desenvolvidas para o estudo da fisiologia dos seres vivos. A ideia de que uma constância no ambiente interno era necessária para o desenvolvimento e a sobrevivência das diferentes formas de vida foi dando lugar à ideia de homeostase como um equilíbrio dinâmico de variáveis fisiológicas que flutuavam de maneira dependente ou independente do tempo, possibilitando assim a integração de diferentes processos que, juntos, garantiriam o sucesso da sobrevivência (1).

Nesse contexto, o sistema endócrino emerge como uma importante ferramenta capaz de integrar o funcionamento dos diferentes sistemas, por meio da síntese e liberação de uma ampla gama de hormônios que desempenharão suas funções nos mais variados tecidos, promovendo assim, o funcionamento homeostático do organismo, como um todo.

Dentre essa grande variedade de moléculas sinalizadoras encontram-se os hormônios tireoidianos, cuja síntese e secreção ocorrem nos folículos tireoidianos, constituídos basicamente pelas células foliculares tireoidianas e o coloide intrafolicular.

As células foliculares da tireoide sofrem um complexo programa de diferenciação que as torna as únicas células capazes de produzir os hormônios tireoidianos (2). Esses hormônios derivam da degradação da tireoglobulina (Tg), que é iodada em resíduos de tirosina pela ação da enzima tireoperoxidase (TPO) encontrada exclusivamente em células tiroidianas. A Tg iodada é então estocada no coloide do lúmen do folículo tiroideano e, sob a ação do hormônio tireotrófico (TSH) é endocitada pelo tirócito e hidrolisada, gerando T3 e T4 como produtos finais, os quais são posteriormente secretados na corrente sanguínea (2). Tg, TPO e receptor de TSH (TSHR) são os marcadores de diferenciação das células foliculares da tireoide (3).

A glândula tireoide, a hipófise e o hipotálamo constituem o eixo Hipotálamo-Hipófise-Tireoide (HHT), responsável pelo fino controle de síntese, secreção e regulação das concentrações de hormônios tireoidianos (HT) circulantes. O processo que culminará com a liberação de T3/T4 na circulação sanguínea se inicia no núcleo paraventricular do hipotálamo, onde ocorre a

síntese e secreção de TRH (*Thyrotropin-Releasing Hormone*), que age sobre os tireotrofos localizados na porção anterior da hipófise, estimulando a síntese e secreção de TSH, o principal hormônio regulador da função tireoidiana (4).

Na tireoide, o TSH interage com o TSHR deflagrando vias de sinalização intracelulares, que incluem a ativação da adenilil ciclase bem como da fosfolipase C, responsáveis pela geração de respostas que influenciam diversos eventos fisiológicos no controle do metabolismo da glândula bem como da expressão e atividade de importantes proteínas envolvidas com a via de síntese dos HT, como co-transportador Na^+/I^- (NIS), TPO, Tg e Dual oxidase (DUOX) (5,6). O TSH promove também aumento do número e atividade das microvilosidades que se encontram na porção apical da célula folicular tireoideana, sendo fundamental para a endocitose, lise do coloide e, conseqüentemente, liberação dos HTs da Tg e secreção deles através do MCT 8.

A captação de iodeto da circulação sanguínea ocorre por meio da NIS, expressa na membrana basolateral das células foliculares tireoidianas e é resultado de um transporte simultâneo de dois íons Na^+ e um íon I^- que se deslocam na mesma direção, possibilitando a entrada do iodeto no tireocito. A expressão e atividade do NIS são reguladas positivamente pelo TSH e negativamente pelo excesso de iodo; este último evento está relacionado ao fenômeno conhecido como Efeito Wolff-Chaickoff, que por sua vez se caracteriza por um bloqueio na organificação de I^- concomitantemente com a interrupção da síntese e secreção de HT (7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14).

Uma vez no interior dos tireócitos o iodeto atravessa a membrana apical em direção ao coloide, onde ocorrerá o processo de organificação. Esse transporte é mediado pela anoctamina 1 (ANO1) em condições fisiológicas (15, 16) e, em condições de excesso de iodo, principalmente pela Pendrina (17).

No coloide, o iodeto é oxidado e covalentemente ligado em resíduos de tirosina da molécula de Tg, processo catalizado pela enzima TPO, que utiliza H_2O_2 como agente oxidante do I^- . A capacidade da glândula tireoide de produzir peróxido de hidrogênio se dá em função da expressão das enzimas DUOX (1 e 2), uma família de NADPH oxidases (18, 19, 20, 21, 22, 23).

O processo de iodação da Tg gera principalmente monoiodotirosinas (MIT), diiodotirosinas (DIT), que se acoplam formando T3 (MIT + DIT) e T4 (DIT

+ DIT). A Tg é então endocitada pelas microvilosidades da membrana apical das células foliculares e hidrolisada por proteases lisossomais que promovem a liberação das MITs, DITs, T3 e T4 da Tg para o citoplasma de onde, através de transportadores específicos, principalmente o MCT 8, o T3 e T4 atingem a corrente sanguínea.

Oitenta por cento dos HT são liberados na forma de T4 e 20 % na forma de T3. Na circulação estes interagem com proteínas como a TBG (*thyroxin binding globulin*), TBPA (*thyroid binding prealbumin*) ou TTR (*transthyretin*) e albumina, sendo apenas 0,03% dos HT encontrados na forma livre. Essas proteínas transportadoras têm, na verdade, função de tamponamento ligando-se aos HTs e aumentando, assim, a sua meia vida na circulação sanguínea. (24, 25, 26).

Nos tecidos periféricos grande parte do T4 sofre ação de desidases, que removem o iodo da posição 5' do seu anel externo gerando T3. Existem três isoformas de desidases, as quais são expressas de maneira tecido-específica. A desidase tipo I (D1) é altamente expressa em tecidos como fígado e rins e responsável, em sua maioria, pela conversão de T4 a T3 e geração de T3 para o plasma, principalmente em situações de aumento da concentração do T3 plasmático. Já a desidase tipo II (D2) é encontrada principalmente no cérebro, hipófise e tecido adiposo marrom, sendo responsável pela conversão intracelular de T4 a T3, gerando T3 principalmente para consumo interno. Contudo, sabe-se que ela também é expressa em vários outros tecidos e, mais recentemente, tem sido atribuído à D2 o papel de igualmente gerar T3 para a periferia na condição de eutiroidismo. A desidase tipo III (D3) é expressa na placenta, cérebro, fígado e pele e gera rT3, a partir de T4, e T2 a partir de T3, sendo considerada uma enzima inativadora dos HT (26).

Friesema e colaboradores (2003) foram os primeiros a demonstrar, através de injeção de cRNA em oócitos de *Xenopus laevis*, que alguns membros da família de transportadores de monocarboxilatos (MCTs: **MonoCarboxylate Transporters**) funcionavam como transportadores específicos de HT representando a principal porta de entrada de T3 nas células. A família de transportadores MCT é composta, originalmente, de 14 membros (MCT1-

14) e transporta, principalmente, piruvato e lactato, sendo, portanto, de extrema importância no controle do metabolismo celular (27).

Uma vez no interior das células os HT interagem com seus receptores específicos localizados no núcleo, processo que é protagonizado pelo T3. Os receptores dos HT estão associados aos seus elementos responsivos (THRE) na molécula de DNA, mesmo na ausência de seu ligante. Outros receptores da superfamília dos receptores nucleares, como RXR (Receptor de retinóide X), se associam aos TRs formando heterodímeros. Todo esse complexo interage, por sua vez, com proteínas conhecidas como co-repressoras, que atuam inibindo a maquinaria de transcrição basal. A ligação do HT gera alterações conformacionais que possibilitam a dissociação das proteínas co-repressoras e a associação de proteínas co-ativadoras, que medeiam a transcrição dos genes alvo específicos em cada tecido. O mecanismo de repressão gênica induzida pelo T3 ainda não está totalmente definido, mas parece envolver o recrutamento de proteínas co-repressoras (26, 28, 29, 30). Tais efeitos são conhecidos como clássicos, genômicos ou nucleares. Contudo, um número crescente de estudos tem apontado para uma série de efeitos desencadeados pelo T3 que não são primariamente decorrentes de alterações na expressão gênica. Esses efeitos são chamados não clássicos ou não-genômicos. Caracteristicamente, as respostas a esses estímulos são rápidas, ocorrendo de segundos a minutos, e utilizam vias de sinalização deflagradas por receptores localizados na membrana plasmática ou no citossol.

Viu-se que os HT interagem com uma família de glicoproteínas conhecidas como integrinas, especificamente com a isoforma $\alpha\beta3$. Caracteristicamente, são proteínas transmembrânicas que apresentam um domínio extracelular capaz de interagir com elementos da matriz extracelular que apresentam o domínio RGD, formado pelos aminoácidos Arg-Gly-Asp, e um domínio intracelular ligado ao citoesqueleto. Esse domínio extracelular também funciona como sítio de reconhecimento de HT. Estudos subsequentes identificaram a presença de dois sítios nos quais os HT se ligavam na integrina, o S1 e o S2. O sítio S1 é reconhecido somente pelo T3 em concentrações fisiológicas conduzindo a ativação de Src e posteriormente de PI3K. Já o sítio S2 reconhece tanto T3 quanto T4 e leva a ativação da via ERK1/2 (31, 32, 33, 34, 35, 36, 37). As ações não genômicas desencadeadas no citossol decorrem

da interação do HT com seu receptor ($TR\alpha$ ou β) acoplado a PI3K, por exemplo, mecanismo pelo qual o HT ativa essa enzima gerando efeitos como aumento de mTOR e da síntese proteica (38).

Atuando de maneira genômica ou não genômica é indiscutível que os hormônios tireoidianos asseguram o controle de uma série de processos fisiológicos que, em última instância, garantem o funcionamento homeostático do organismo.

Desde o período de desenvolvimento embrionário, se conhece o papel imprescindível que tais hormônios desempenham, especialmente na formação e maturação do Sistema Nervoso central (SNC), processo resultante da expressão de diferentes genes como os que codificam a proteína TAU, relacionada às projeções axonais dos neurônios, a MAP2, envolvida com a formação dos dendritos, além de relina, que é essencial para a correta citoarquitetura das estruturas cerebrais e BDNF, que exerce um papel essencial no desenvolvimento do Sistema Nervoso (39). Portanto, a deficiência de hormônios tireoidianos nesta fase de desenvolvimento, prejudica o crescimento neuronal comprometendo diversas funções do Sistema Nervoso Central, levando a um quadro de um acentuado grau de retardo mental conhecido como cretinismo (40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47).

As ações dos hormônios tireoidianos não se restringem apenas à fase de desenvolvimento embrionário, na fase adulta eles também exercem uma série de efeitos modulatórios responsáveis por controlar eventos metabólicos de diversas naturezas.

A literatura reporta uma importante participação dos hormônios no controle do metabolismo dos carboidratos através de diversos mecanismos. Indivíduos com hipertireoidismo apresentam intolerância à glicose, o mesmo ocorrendo nos estados de hipotireoidismo quadros de hiperglicemia, e um dos fatores que explicam essa relação é que existe, nesses indivíduos, uma redução da meia-vida da insulina concomitantemente com aumento da liberação de pró-insulina, devido a um incorreto processamento deste hormônio. Ao mesmo tempo em que essas alterações ocorrem nas células β pancreáticas, no fígado, o HT aumenta a produção hepática de glicose e a expressão de GLUT2 na membrana plasmática dos hepatócitos, o qual é responsável por transportar glicose do fígado para a circulação. Esse O

excesso de HT gera também um aumento da lipólise, resultando em aumento de ácidos graxos livres (FFA-*free fat acid*) e glicerol na circulação, sendo que este último é um precursor da gliconeogênese hepática (48, 49, 50, 51, 52). Quanto ao metabolismo das proteínas o T3 aumenta o *turnover* das mesmas, sendo que no hipertireoidismo o catabolismo protéico predomina.

No coração, o T3 também exerce importantes ações fisiológicas aumentando a atividade e expressão de uma série de proteínas envolvidas com a contração (α MHC) e relaxamento (SERCa⁺²) cardíacos. Nesse sentido, indivíduos hipotireoideos apresentam uma diminuição na expressão e atividade de SERCa⁺², o que conseqüentemente acarreta na diminuição do intervalo de relaxamento diastólico, enquanto indivíduos hipertireoideos apresentam frequentemente hipertrofia cardíaca (53, 54).

Até o presente momento, a maioria dos estudos que visam entender as ações dos HT tem focado nos efeitos do hormônio sobre os mais diferentes tecidos, já que há evidências de que todos eles apresentam receptores de HT. No entanto, a glândula tireoide também expressa receptores de HT e poucos são os estudos que intentaram elucidar um possível papel deles na regulação da sua própria função. Pelo nosso conhecimento, há apenas um trabalho em que se mostra uma ação direta dos HT sobre as células foliculares da tireoide inibindo sua resposta ao TSH. Contudo quase nada se sabe, a nível molecular, sobre seu papel nos tireócitos (55), sendo esse um desafio que buscamos enfrentar com esse estudo.

Por mecanismos genômicos e/ou não-genômicos os hormônios tireoidianos exercem sua função através do controle da expressão de genes, ou da atividade de diferentes enzimas, que, por sua vez, levam à alterações na maquinaria de funcionamento celular, gerando respostas frente a determinados estímulos. Com a conclusão do Projeto Genoma em 2003, e o acúmulo exponencial de sequências gênicas e genomas depositados em bancos de dados públicos, a demanda por metodologias que permitam a identificação funcional, confirmação de homologia, elucidação de padrões de expressão, dentre outras funções tem crescido consideravelmente. Atualmente diversas metodologias tem surgido no intuito de se avaliar o perfil de expressão gênica de um determinado tecido ou célula frente a um determinado tratamento ou desafio. Dentre essas metodologias o Sequenciamento de Nova Geração –

NGS vem ganhando muito espaço nos laboratórios e centros de pesquisa pois é capaz de gerar milhões de “short reads” por ensaio, o que torna essa metodologia útil para as mais variadas aplicações biológicas (56, 57, 58, 59).

Os primeiros trabalhos utilizando sequenciamento de DNA como ferramenta de estudo de expressão gênica apareceram em 1977 em trabalhos publicados por Fred Sanger e Alan R. Coulson. Desde então, as tecnologias de sequenciamento tem avançado de maneira expressiva nas últimas décadas.

O sequenciamento de Nova Geração (*New Generation Sequencing* – NGS) tem como fundamento o sequenciamento de DNA em plataformas capazes de gerar milhares de informações sobre milhões de pares de bases em uma única etapa. As tecnologias de sequenciamento via NGS fornecem informações adicionais quando comparados com outros métodos de sequenciamento (Sanger), como estimacão de abundância de expressão, detecção de múltiplos eventos de *splicing* alternativo, edição de sequencias de DNA e RNA, identificacão de novos transcritos, dentre outros. O sequenciamento direto de RNA (RNA-seq) ainda não é possível com as plataformas comerciais de sequenciamento já existentes, contudo, é possível sequenciá-lo, de maneira indireta, pela transcriçao reversa em cDNA. Assim, o RNA-seq é capaz de determinar, de maneira absoluta, a quantidade de moléculas de mRNA em uma condiçao específica e assim comparar resultados de experimentos independentes. Há várias plataformas de sequenciamento disponíveis, as mais utilizadas são 454 FLX da Roche®, a Solexa da Illumina®, *Heliscope True Single Molecule Sequencing* (tSMS), da Helicos® e também, a *SOLiD System*, da Applied, plataforma que foi utilizada neste trabalho (60, 61, 62, 63,64,65).

De modo geral o SNG obedece a uma sequencia de passos que se iniciam com a extraçao do RNA total de amostras de células ou tecidos. Posteriormente o RNA total passa por um enriquecimento, no qual moléculas de RNAr, RNAt e outros pequenos RNAs são removidos das amostras e os fragmentos restantes são então quebrados em pequenos fragmentos (200-300 pares de base) denominados *reads*, que, em seguida são submetidos a reaçao de transcriçao reversa para a construçao das bibliotecas de cDNA. As amostras são então sequenciadas, e os dados analisados por bioinformática.

Um dos passos importantes no processo de sequenciamento é o mapeamento dos *reads*; em inglês cunhou-se o termo *mapping* para designar a tarefa de se encontrar uma única localização para um determinado *read* no genoma de referência de uma determinada espécie. Entretanto, pequenos *reads* podem, muitas vezes, alinhar em diferentes localizações no mesmo genoma conduzindo a erros de sequenciamento que precisam ser resolvidos. Existem algumas ferramentas computacionais que auxiliam na solução desse problema. Estes softwares (SplitSeek, Tophat, SOAPs) utilizam uma estratégia de correspondência heurística de primeira passagem que rapidamente encontra uma lista de possíveis locais de alinhamento para um mesmo *read*, seguida por uma avaliação completa de todos os possíveis alinhamentos. Por último, uma análise probabilística define qual o alinhamento correto, em meio a todas aquelas possibilidades, para este determinado *read* (66,67).

Finalizado o mapeamento dos *reads*, a etapa imediatamente posterior é encontrar um significado biológico para eles (éxons, transcritos ou genes) através de uma abordagem que leva em conta o número de *reads* que se sobrepõem aos éxons de um determinado gene. Contudo, uma porção significativa desses *reads* mapeia regiões genômicas fora de éxons conhecidos, isso conduz à possibilidade de se encontrar novos transcritos, ou mesmo novos genes expressos.

Para a etapa de análise de genes diferencialmente expressos (GDE) que consiste em encontrar os genes que modificaram seus níveis de expressão nas diferentes condições experimentais, é necessária inicialmente uma normalização dos dados, a qual tem como objetivo tornar os valores de expressão gênica comparáveis, uma vez que as etapas de sequenciamento geram uma variação muito grande no número de *reads* produzidos em cada rodada de sequenciamento. Assim os procedimentos de normalização tentam contabilizar essas diferenças, possibilitando maior acuidade nas comparações entre grupos de amostras. Existem diversos pacotes de normalização disponíveis nos diferentes pacotes estatísticos para análises, dentre eles o DESeq, DEGSeq, edgeR e baySeq (68,69).

Nas últimas décadas, várias metodologias têm sido propostas para a análise de genes diferencialmente expressos em um estudo de RNA-seq. Os

dados de RNA-seq obedecem a um padrão de distribuição discreta para cada gene. Duas distribuições discretas de probabilidades têm sido utilizadas para modelar dados de sequenciamento por RNA-seq: Distribuição de Poisson e Binomial Negativa. A grande desvantagem na utilização da distribuição de Poisson é que ela não leva em conta a variabilidade biológica entre as amostras, o que acarreta em altas taxas de falsos positivos em razão de desconsiderar ou subestimar o erro experimental; logo não é de se surpreender que a adição de replicatas biológicas seja de fundamental importância quando se planeja um experimento de sequenciamento. Em função disso a Binomial negativa, que leva em consideração essa variabilidade experimental, é a ferramenta mais utilizada atualmente para a análise de dados de sequenciamento. Dentre os pacotes disponíveis estão: baySeq, DESeq, DESeq2 e edgeR (70, 71, 72).

Baseados nesses antecedentes, buscamos com esse estudo avaliar a expressão diferencial de genes na tireoide em resposta ao T3, por meio de RNAseq, com a finalidade de identificarmos as ações autócrinas deste hormônio e sua possível relevância para a função tireoidiana.

2 JUSTIFICATIVA

Distúrbios da glândula tireoide representam a segunda desordem endócrina de maior prevalência na população, ficando atrás apenas do diabetes mellitus. A etiologia e o grau de severidade variam conforme a população, sexo, idade e até mesmo origem étnica. Muitos estudos evidenciam uma alta prevalência de doenças auto-imunes com produção de anticorpos específicos contra proteínas da própria glândula tireoide, fazendo com que o indivíduo se torne hipotireoideo e por consequência necessite de reposição dos hormônios tireoidianos, de maneira terapêutica. Nesse sentido, não se conhece, até o presente momento quais os possíveis efeitos decorrentes do impacto, na tireoide, do HT administrado de maneira terapêutica, sendo importante investigá-los.

3 OBJETIVO

Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a existência de uma ação autócrina exercida pelo T3 regulando processos fisiológicos na tireoide, através da obtenção de um perfil global de expressão gênica das células foliculares da tireoide, submetidas ao tratamento com excesso de hormônio tireoidiano (T3) por 24h, via sequenciamento de nova geração (NGS-RNAseq). Esse estudo permitiu identificar os genes diferencialmente expressos pelo T3, bem como os processos a eles relacionados, o que certamente trará maior conhecimento sobre a fisiologia tireoidiana, além de permitir uma avaliação mais precisa quanto à manutenção, ou não, da glândula em situações em que sua função esteja comprometida, como na tireoidite de Hashimoto, nas quais doses de reposição de HT são indicadas sem que se tenha conhecimento das repercussões sobre a própria glândula.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para os ensaios experimentais foram utilizadas diferentes estratégias metodológicas em modelo *in vitro* e *in vivo*, como descrito a seguir:

4.1 Cultura de células

Para execução dos experimentos, foi utilizada uma linhagem de células foliculares tireoidianas de rato (células PCCI3 – gentilmente doada pela Profa. Edna Kimura-ICB/USP), as quais mantêm as principais características de uma célula tireoidianas diferenciada, como a dependência de TSH para crescimento e função, expressão dos genes que codificam a Tg, TPO e NIS, responsável pela captação do iodeto (73). Essas células foram cultivadas em meio HAM-F12 (5% SFB - soro fetal bovino), 1 μ M/ml de TSH, 10 μ g/ml de Insulina, 5 μ g/ml de Apotransferrina e os antibióticos: penicilina (100 U/ml) e ampiciclina (10 μ g/ml), à 37°C e 5% CO₂, em placas de 6 (seis) poços até atingirem a confluência de aproximadamente 60%, quando então o tratamento foi efetuado. Os experimentos foram realizados sempre em células entre as passagens P₈ a e P₂₀, uma vez que alguns trabalhos mostraram que células acima da passagem P₂₀ começam a perder as características de diferenciação de uma célula tireoidiana.

Inicialmente, parte das células PCCI3 recebeu meio no qual o SFB havia sido depletado de HT (grupo Hipo), procedimento realizado por meio da passagem do soro em uma resina específica (AG® 501-X8-Resin), permanecendo nesse meio por 24h. Em paralelo, parte das células foi mantida no meio sem depleção de HT (grupo Controle). Após 24h as células mantidas no meio hipo foram subdivididas em dois grupos: um deles foi submetido ao tratamento com 3, 3', 5-triiodotironina (T3) na concentração 10⁻⁷ M por 24h (grupo T3), enquanto o outro foi mantido no meio com soro depletado de HT (grupo Hipo) até o fim do experimento. Apesar de os experimentos para o sequenciamento terem sido feitos somente com o T3 na concentração de 10⁻⁷M (supra-fisiológica), para o processo de validação dos genes diferencialmente expressos, utilizou-se também T3 na concentração de 10⁻⁹M pelo mesmo período de tempo do protocolo experimental descrito anteriormente (24h). Após

o tempo de tratamento, as células foram lisadas para extração de RNA total, prosseguindo-se com os demais passos, conforme ilustrado na Figura 1.

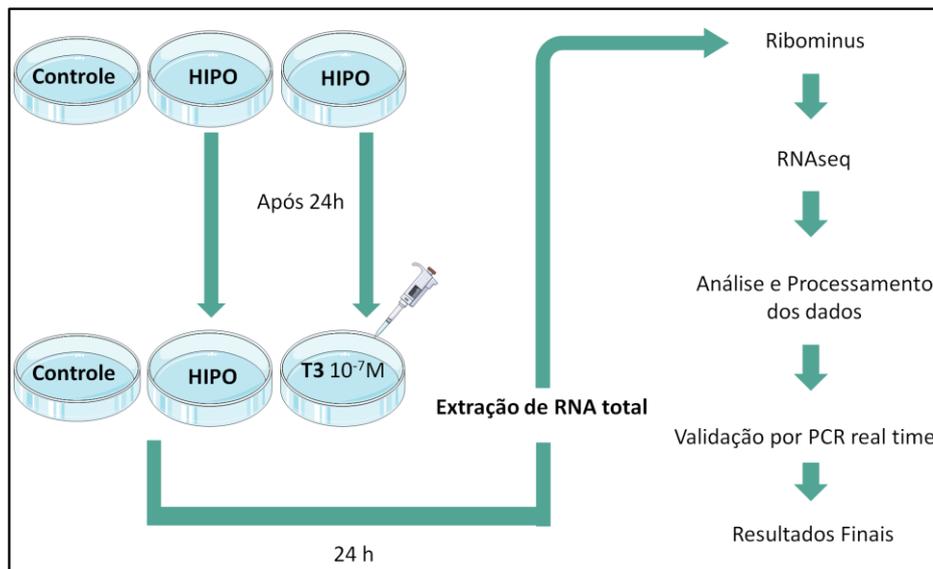


Figura 1 - Protocolo Experimental: Células PCCI3 foram subdivididas em 3 grupos: Controle (C₁, C₂, C₃), HIPO (H₁, H₂, H₃) e T3 10⁻⁷M (T₃₁, T₃₂, T₃₃). Após 24h de tratamento, o RNA total foi extraído e depletado de RNA ribossomal, em seguida enviado para sequenciamento.

4.2 Extração de RNA Total

Esse procedimento foi realizado por meio da utilização do PureLink® RNA Mini Kit. A opção pela utilização do Kit em detrimento da utilização do usual reagente Trizol® se justifica na necessidade de obtenção de um RNA de alto rendimento, em termos de concentração, e de alta qualidade e pureza.

Após o fim do tratamento, as células foram transferidas para um novo tubo e centrifugadas a 2.000 g por 5 min a 4 °C, o que resultou na formação de um *pellet*. O sobrenadante (meio de cultura) foi descartado e, então, foi adicionado o tampão de lise. As amostras foram agitadas sob alta velocidade em vortex, até que o *pellet* entrasse novamente em suspensão. Em seguida transferiu-se o homogeneizado para um tubo coletor que foi centrifugado a 12.000 g por 2 min. Foi adicionado um volume de 70% de etanol em cada amostra, seguindo-se agitação em vortex. Transferimos 700 µl de cada amostra para as colunas associadas ao tubo coletor e centrifugamos a 12.000 g por 15s à temperatura ambiente. Adicionamos, posteriormente, 700 µl de tampão de lavagem e nova centrifugação foi feita a 12.000 g por 15s.

Adicionamos 500 µl do tampão de lavagem II (componente do kit) com etanol, e procedemos com nova centrifugação a 12.000 g por 15s. Adicionamos, por fim, 30 µl de água livre de RNase no centro da coluna, seguindo-se incubação por 1 min à temperatura ambiente. Centrifugamos a coluna a 12.000 g por 2 min para eluir o RNA, o qual foi estocado a -20 °C. Seguiu-se a quantificação do RNA em espectrofotômetro. A razão entre as absorvâncias 260/280 foi utilizada como medida de qualidade do RNA das amostras.

Após a extração de RNA total, as amostras foram submetidas ao tratamento com o Kit de purificação *RiboMinus*TM, que assegura o enriquecimento das amostras pela retirada do RNA ribossomal.

4.3 Depleção de RNA ribossomal (*RiboMinus*TM)

Inicialmente ressuspendemos o *RiboMinus*TM *Magnetic Beads*, por meio de agitação em vortex. Para cada amostra de RNA prepara-se 200 µl do tampão de hibridização (1x) e 500 µl de *beads* previamente ressuspendidas em um tubo livre de RNase. Para o preparo das *beads*, cada tubo contendo o tampão juntamente com as *beads* foi colocado em uma estante magnética por 1 min ou até que a solução ganhasse aspecto claro. Foi aspirado o sobrenadante com cuidado para não perturbar as *beads*. Removeu-se o tubo da estante magnética e lavaram-se as *beads* com 500 µl de água livre de nucleases e cada tubo foi colocado novamente na estante magnética por 1 min ou até que a solução ficasse clara. As *beads* foram ressuspendidas em 200 µl do tampão de hibridização. Colocaram-se as *beads* preparadas numa estufa a 37 °C por pelo menos 5 min. O RNA total extraído foi, então, transferido para as *beads* previamente preparadas pipetando-se suavemente (*up/down*) para homogeneizar. O tubo foi mantido a 37 °C por 5 min e, então, colocado na estante magnética por 1 min ou até que a solução se tornasse clara. Transferiu-se o sobrenadante contendo o RNA já depletado de RNAs ribossomais, para um novo tubo.

Uma vez enriquecidas de mRNA, as amostras foram enviadas ao CEFAP (Centro de Facilidades de Apoio a Pesquisa do ICB-USP) para o sequenciamento de nova geração (RNAseq).

De uma maneira geral, os experimentos de RNAseq se iniciam com a extração e purificação de uma amostra de RNA, obtida de um tecido ou linhagem celular submetido a um determinado tratamento, sendo posteriormente convertido em uma biblioteca de cDNA. Esse processo gera milhões de pequenos fragmentos (25-300 bp) chamados de *reads*. Esses *reads* são então alinhados com o genoma ou transcriptoma da espécie (Genome: rn6) com a qual se está trabalhando, utilizando o programa *TopHat2*, para a geração de uma listagem de genes possivelmente afetados pelo tratamento. Esses dados são, então, submetidos a um conjunto de testes estatísticos executados pelo programa *HT-Seq count*, com o objetivo de ranquear essa listagem inicial de genes de acordo com valores de *p* e *FoldChange* resultantes das análises estatísticas. Após esse processo obtém-se então uma lista de genes diferencialmente expressos que foram regulados positivamente (*upregulated*) ou negativamente (*downregulated*) pelo tratamento (74,75,76, 77). A figura 2 traz esquema das etapas do processo de sequenciamento, desde a extração das amostras até a análise estatística dos dados.

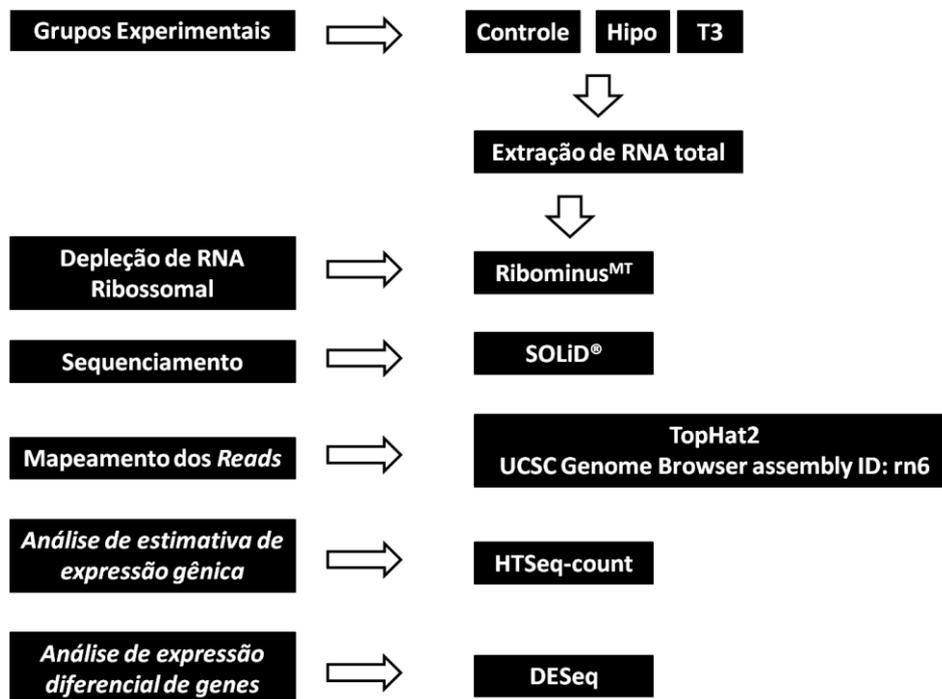


Figura 2 - Esquema das etapas do processo de sequenciamento: Ao fim dos tratamentos, o RNA total das amostras foi extraído, seguindo-se a depleção de RNA ribossomal e envio das mesmas para o sequenciamento. Posteriormente, as amostras foram mapeadas com o genoma de referência e então estimadas quanto ao número de genes regulados pelo tratamento. Análises estatísticas adicionais determinaram a listagem de genes diferencialmente expressos.

A etapa do sequenciamento, propriamente dita, ocorre em plataformas comerciais disponíveis no mercado capazes de sequenciar milhares de pares de base em uma única corrida, gerando volume muito maior de informações quando comparado com o antigo método Sanger de sequenciamento. Dentre as plataformas comerciais existentes foi utilizada a SOLiD (*Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection*) System da Helicos®, para a obtenção dos dados de sequenciamento apresentados neste trabalho (78,79).

Diferentemente das outras plataformas, o sistema SOLiD utiliza uma DNA ligase e não uma polimerase para o sequenciamento. O DNA é fragmentado por um sonicador em *reads* de 60-90 bp. Esses fragmentos são ligados a adaptadores (P1 e P2), e em seguida devem ser amplificados para a construção de uma biblioteca de cDNA. No SOLiD, esse mecanismo de amplificação ocorre em *beads* magnéticas que, em solução, se organizam em micelas, as quais interagem com os *reads* através de hibridização entre os adaptadores ligados aos fragmentos P1 e P2, com elementos complementares situados nessas esferas metálicas. Essa amplificação é chamada PCR em emulsão. Posteriormente as esferas são ligadas covalentemente a uma lâmina com capacidade para cerca de 100 mil microesferas. No analisador SOLiD a lâmina contendo as esferas é combinada com os *primers* universais de sequenciamento, com a enzima ligase e as sondas que propiciam as condições ideais para a ocorrência do sequenciamento (80, 81, 82, 83, 84).

Uma vez encerrada a etapa do analisador SOLiD, as amostras são então enviadas para o profissional de bioinformática para que haja o alinhamento das sequências de *reads* gerados na etapa anterior de sequenciamento, com o genoma da espécie em estudo. Após isso, as amostras são tratadas por uma análise estatística de alto rigor, para obtenção da lista de genes diferencialmente expressos.

Após a conclusão da etapa de sequenciamento, as amostras foram enviadas ao professor Pedro Galante, do laboratório de bioinformática do Hospital Sírio Libanês, o qual colaborou com este projeto na execução do alinhamento genômico, análise estatística e elaboração da lista de genes diferencialmente expressos.

4.4 RT-PCR

Dentre a lista de genes diferencialmente expressos, foi selecionado um grupo de genes para ser validado por RT-PCR: o *Slc16a1*, *Snrpd1*, *9-March*, *Pdfn1* e *Fam103a1*, cujas funções celulares serão explicitadas ao longo da seção de resultados. A RT-PCR das amostras de células PCCI3 tratadas com T3 foi feita a partir de uma amostra de RNA reversamente transcrito, utilizando 1 µl de M-MLV (200 U/µl), segundo instruções do fabricante (Promega, Maddison, WI USA). Inicialmente, 1 µg de RNA em solução aquosa foi misturado a 1 µl de iniciador oligo(dT), e incubado a 65 °C por 10 min no termociclador (modelo ProFlex, PCRSystem, Applied Biosystem). Nessa primeira etapa, o oligo(dT) interage com a cadeia poli(A) na porção 3' dos mRNAs. Adiciona-se, a seguir, o tampão da enzima, dNTP, 200 U da enzima M-MLV e água (DEPC), completando-se um volume final de 20 µL, sendo a reação incubada no termociclador a 42 °C por 60 min para realização da transcrição reversa, e por 15 min, à 72 °C, para a inativação da enzima. O produto do RT-PCR gerado foi armazenado a -20° C.

4.5 Reação de RT-PCR em Tempo Real (RT-qPCR)

A reação de qPCR em tempo real foi realizada utilizando o sistema SYBR Green I (Applied Biosystems, Life Technologies, EUA) seguindo instruções do fabricante. Para isso, foi utilizado 1 µl de cada produto de RT-PCR e, a estes, foram adicionados Sybr Green PCR (Life Technologies, EUA) e 200 nM de cada oligonucleotídeo direcionado ao gene de interesse, em um volume final de 12 µL. Para cada amostra foi amplificado o cDNA dos genes alvo além do gene constitutivo *Rpl-19*, ambos em duplicata. As reações foram incubadas no sistema de PCR em tempo real Corbett (Corbett Research, Sydney, Australia), seguindo as condições da reação: 50 °C por 2 min, 95 °C por 5 min, seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 20s e 60 °C por 1 min, 72 °C por 15 s. Todos os *primers* utilizados na reação de RT-qPCR (tabela 1) foram desenhados a partir de sequências de referência de cada gene utilizando a ferramenta *Primer-BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) disponível no site do Pubmed.

Alguns parâmetros, como tamanho do produto esperado, temperatura de anelamento, conteúdo de GC e sequências amplificadas somente em regiões de junção exon-exon, foram levados em conta no momento de construção dos primers. Uma vez desenhados, as sequências foram validadas no *BLAST*, ferramenta também oferecida pelo Pubmed, capaz de garantir que o oligo sintetizado não seja capaz de amplificar sequências semelhantes em outros genes, assegurando, portanto, sua especificidade.

Tabela 1 – Sequência de primers utilizados nos ensaios de RT-qPCR

Primer	Sequencia	Referência GenBank
<i>Rpl-19</i>	Forward: 5'-CCAATGAAACCAACGAAATCG-3' Backward: 5'-TCAGGCCATCTTTGATCAGCT-3'	NM_031103
<i>Snrpd1</i>	Forward: 5'-GAGTCCATTATTTGGGCCCT-3' Backward: 5'-AGATCTCATCCCAGTAAGAACTTT-3'	NM_001106163.1
<i>9-March</i>	Forward: 5'-CCCGGAGCAGGGGGA-3' Backward: 5'-GGATTAGGCAGGGTTGGTGT-3'	NM_001100601.1
<i>Pfdn1</i>	Forward: 5'-GTATGAAGGTGTAGGAAGAATGTTT-3' Backward: 5'-GGAAGAACTTTCCAGCAGC-3'	NM_001108427.1
<i>Fam103a1</i>	Forward: 5'-TGAAACGCCCTCCTGAATCC-3' Backward: 5'-GTTATCTTGCAGCCAGTTGCC-3'	NM_001127451.1
<i>Slc16a1</i>	Forward: 5'-AGCCTGCGCTACTTCACCTA-3' Backward: 5'-GGCCAGCTTGATTCTGTCTC-3'	NM_147216.1

4.6 Avaliação da expressão de proteínas por Western Blotting

Para as análises de Western Blotting as células PCCI3 foram lisadas e homogeneizadas em solução tampão RIPA. A constituição do tampão RIPA varia conforme o tipo de proteína a ser analisada bem como o tecido onde é expressa.

Para analisar a expressão das proteínas SNRPD1, PFDN1 e MC T8, utilizou-se a seguinte constituição de RIPA: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, com 150 mM Cloreto de Sódio, 1% NP-40, 0,5% Deoxicolato de Sódio e 0,1% Dodecil sulfato de Sódio (Sigma-Aldrich).

Para analisar a expressão da 9-MARCH, que é uma proteína de membrana plasmática, foi necessária a separação desta fração das células

PCCI3. Para tal, o tampão utilizado para a homogenização foi composto por: 250mM de Sacarose, 10mM HEPES, 1mM EDTA (Sigma- Aldrich).

Todos os tampões foram preparados no momento da extração, quando então foi acrescentado um tablet de inibidor de proteases (Roche).

Após a homogeneização, as amostras foram submetidas à sonicação por 10s em uma amplitude de 40 % (SONICS vibracell™, VCX130, USA) e então centrifugadas à 14.000 g por 35 min. A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay, Dye Reagent Concentrate). Para as proteínas SNRPD1 e PFDN1 (17 e 15 kDa, respectivamente) as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 15%, já para MCT 8 e 9-MARCH (ambas de 38 KDa) utilizou-se gel de poliacrilamida 10%, seguindo-se a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) por eletrotransferência (*semi-dry* - 15 V) por 1 h. As membranas foram bloqueadas com solução PBS-TWEEN com 3% BSA *overnight* a 4°C e, posteriormente, incubadas com o anticorpo primário contra a proteína de interesse (tabela 2), diluído em PBS-TWEEN com 3% de BSA. Finalizado o tempo de incubação, as membranas foram removidas da solução contendo o anticorpo primário e lavadas por 4x de 10min em solução de lavagem (PBS-TWEEN). Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário específico (tabela 3), por 1 h em temperatura ambiente, diluído em PBS-TWEEN e 3% de BSA. As membranas foram novamente lavadas com a solução de lavagem (4x de 10 minutos). As imagens das bandas foram obtidas em fotodocumentador (Amersham Imager 600) utilizando-se o kit de ECL.

Tabela 2: Lista de anticorpos: fabricante, concentração final utilizada e tempo de incubação.

Anticorpo Primário	Fabricante	Concentração	Tempo de Incubação
Anti-MCT 8	ABCAM	1 -1000	<i>overnight</i>
Anti-SNRPD1	ABCAM	1-100	<i>overnight</i>
Anti-PFDN1	ATLAS	1-250	<i>overnight</i>
Anti-9-MARCH	ABCAM	1 µg/ml	<i>overnight</i>
Anti-Fam103a1	ATLAS	1-100	<i>overnight</i>

Tabela 3: Lista de anticorpos secundários (Fabricante, concentração e tempo de incubação)

Anticorpo Primário	Anticorpo Secundário	Fabricante	Concentração	Tempo de Incubação
Anti-MCT 8	Anti-Rabbit	Jackson ImmunoResear. Lab.	1- 5.000	1h (TA)*
Anti-SNRPD1	Anti-Rabbit	Jackson ImmunoResear. Lab.	1- 5.000	1h (TA)
Anti-PFDN1	Anti-Rabbit	Jackson ImmunoResear. Lab.	1- 5.000	1h (TA)
Anti-9-MARCH	Anti-Rabbit	Jackson ImmunoResear. Lab.	1- 5.000	1h (TA)
Anti-FAM103a1	Anti-Rabbit	Jackson ImmunoResear. Lab.	1- 5.000	1h (TA)

*TA: Temperatura Ambiente

4.7 Ensaio de Poliubiquitinação

Após o fim do tratamento, as células foram lisadas em tampão de sacarose e ultracentrifugadas para separação da fração de membrana da fração total de proteínas, (conforme descrito no item 1.7 deste relatório); ambas as frações foram posteriormente quantificadas pelo método Bradford. Posteriormente 50 µg de proteínas – fração de membrana plasmática – foram submetidas à SDS-PAGE 10%, transferidas em sistema “semi-dry” para uma membrana de nitrocelulose, que foi bloqueada com BSA 3%, *overnight*. Posteriormente as membranas foram incubadas com anticorpo anti-Na/K/ATPase (1:1000) por 1h a 4°C, para comprovar a eficiência da separação das frações de membrana plasmática das células. Em seguida, a membrana contendo as proteínas da fração de membrana plasmática foi incubada com anticorpo anti-PoliUbiquitina (1:1000) *overnight* a 4°C para avaliação do padrão de poliubiquitinação nos diferentes grupos. O padrão de bandas foi obtido em fotodocumentador (Amersham Imager 600) utilizando-se o kit de ECL. A densidade óptica das bandas foi analisada por ImageJ (NIH – EUA).

4.8 Experimentos *In vivo*

Após a validação, *in vitro*, dos genes diferencialmente expressos selecionados, procedeu-se com a análise da expressão dos mesmos no modelo *in vivo*. Para tal, foi obtido junto à Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (CEUA-ICB/USP) aprovação (protocolo 92/2017 aprovado em 18/09/2017) para execução dos

experimentos *in vivo*. Todos os protocolos experimentais foram planejados de acordo com os princípios éticos sobre pesquisa de animais, adotado pelo Conselho Nacional para o controle de animais de experimentação.

Ratos Wistar foram obtidos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e mantidos no biotério do departamento de Fisiologia e Biofísica, em ambiente livre de patógenos, com temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e ciclo claro-escuro 12:12h. Os animais receberam ração e água *ad libitum* e foram divididos randomicamente em grupos, conforme se segue.

Procedimento 1: Grupos Controle, Hipotireoideo e hipertireoideo. Para indução do hipotireoidismo, os animais foram tratados com duas doses de 6-propil-2-tiouracil (PTU): 10 μg e 20 $\mu\text{g}/100\text{g}$ PC, ip, por 30 dias.-Vários estudos demonstram a utilização do PTU como estratégia para indução de hipotireoidismo (85,86), seu mecanismo de ação ocorre sobre o processo de organificação do iodeto através da inibição da tireoperoxidase (TPO), enzima responsável por oxidar o iodeto e sintetizar os hormônios tireoidianos (87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94). Adicionalmente, a literatura reporta que o PTU inibe a conversão de T4 a T3 por inibir a ação da desidase tipo1 e, por consequência, reduz a geração periférica de T3 (95). Para a condição de hipertireoidismo, os animais foram tratados com T3 em duas doses: 1,5 e 3,0 $\mu\text{g}/100\text{g}$ PC, ip, por 28 dias (96, 97, 98). O grupo controle recebeu injeção de salina pelo mesmo período de tempo e também po via ip. Após o fim do tratamento, os animais foram eutanaziados para remoção da tireoide para análises de expressão gênica e proteica (figura 3).

Procedimento 2: Neste procedimento o intuito de avaliar se as alterações observadas nos animais submetidos ao protocolo experimental acima descrito (procedimento 1), eram de fato em decorrência de uma ação do T3 sobre a expressão de gênica, um novo grupo de animais foi induzido à condição de hipotireoidismo, utilizando PTU na dose de 10 $\mu\text{g}/100\text{g}$ de PC, ip, por 30 dias. Após esse tempo, parte dos animais (animais hipo), recebeu tratamento com T3 na dose de 1,5 $\mu\text{g}/100\text{g}$ PC, ip. por 28 dias, enquanto outra parte seguiu na condição de hipotireoidismo até o fim do tratamento. O grupo controle recebeu injeção de salina, ip, pelo mesmo período de tempo dos tratamentos. Após o fim do tratamento, os animais foram eutanaziados para remoção da tireoide

para análises de expressão gênica e proteica (figura 4), conforme explicitado no estudo *in vitro*.

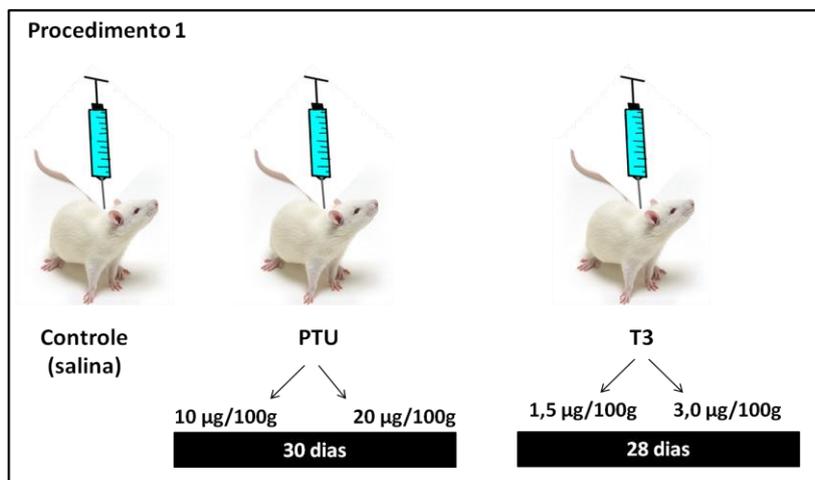


Figura 3 - Esquema ilustrativo do procedimento 1: Ratos foram induzidos ao hipotireoidismo com PTU $10 \mu\text{g}/100\text{g}$ de PC e $20 \mu\text{g}/100\text{g}$ PC por 30 dias e ao hipertireoidismo (T3: $1,5$ e $3,0 \mu\text{g}/100\text{g}$ PC por 28 dias); nos animais controle administraram-se salina.

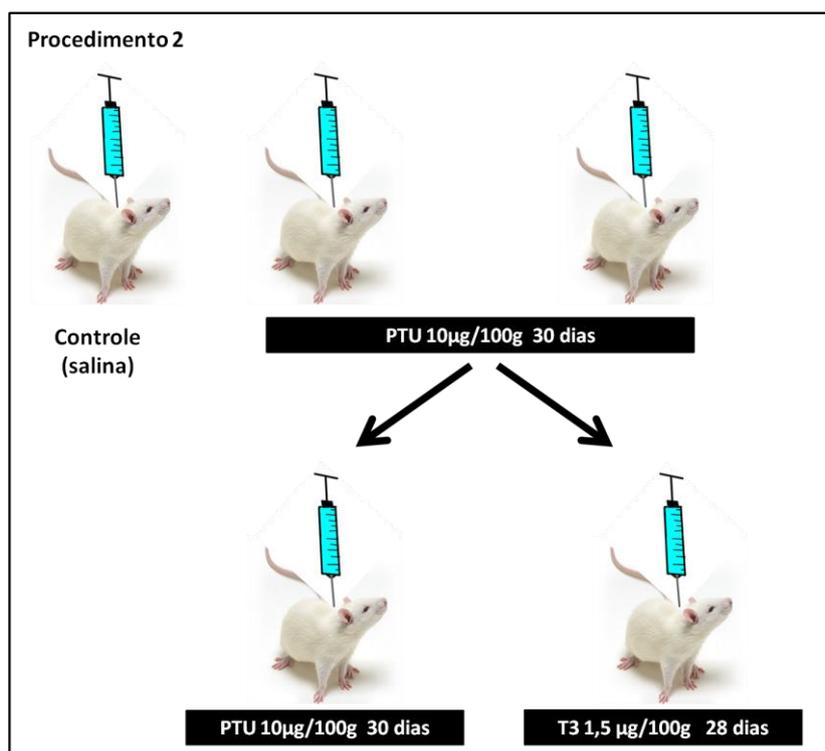


Figura 4 - Esquema ilustrativo do procedimento 2: Ratos foram inicialmente tratados com PTU $10 \mu\text{g}/100\text{g}$ PC por 30 dias com o intuito de induzir o hipotireoidismo. Parte dos ratos hipotireoideios, foi tratada com T3 $1,5 \mu\text{g}/100\text{g}$ de PC, ip, por 28 dias, enquanto parte permaneceu na condição de hipotireoidismo. Nos animais controle administraram-se salina ip.

4.9 Análise dos Dados

Análise dos dados foi feita pela comparação entre os *Cycle Thresholds* (CTs) do grupo controle, Hipo e demais grupos experimentais (T3 10⁻⁷M e T3 10⁻⁹M por 24h), obtidos através da passagem de uma reta denominada *threshold* entre as fases de crescimento logarítmico das curvas. Uma vez que cada amostra é amplificada em duplicata nos ensaios de RT-qPCR, faz-se a média entre os dois valores de Ct das duplicatas de todas as amostras dos genes de interesse, bem como para o gene constitutivo selecionado (*housekeeping*). A partir de então, é possível se estabelecer o Δ CT, que consiste na diferença entre o valor de média da duplicata dos genes de interesse subtraídos dos valores de média das duplicatas do gene constitutivo. Em seguida, as médias dos valores encontrados para o grupo Controle ou Hipo (tomado como referência para as comparações) foram subtraídos de todas as médias dos outros grupos restantes, obtendo-se assim o $\Delta\Delta$ CT. Colocando-se esse valor como exponencial negativo na base 2 ($2^{-\Delta\Delta CT}$) obteve-se o quanto o gene está expresso, após o tratamento, em relação ao grupo HIPO. Para determinar os níveis de significância das diferenças entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância one way (ANOVA), seguida por Tukey através do programa Prism versão 6 (GraphPad Software Inc., EUA).

5 RESULTADOS

Após os experimentos de sequenciamento os dados foram processados, para então selecionarmos os genes diferencialmente expressos para validação e ensaios funcionais, conforme apresentado abaixo:

5.1 Análise de eficiência de depleção de RNA ribossomal

Um dos primeiros desafios no processo de sequenciamento de nova geração é a obtenção de amostras com concentrações ideais de mRNA e com mais alto nível de qualidade e pureza. Nesse sentido, o processo de depleção de RNAs ribossomais, os mais abundantes nas células, deve ser eficiente em seu objetivo de enriquecer as amostras com mRNA para serem enviadas para sequenciamento. Para tanto, antes da etapa de sequenciamento, propriamente dito, as amostras tiveram suas concentrações e seu grau de depleção atestadas no CEFAP pelo softwer Bioanalyser. Este sistema incorpora a tecnologia de eletroforese capilar em gel dentro de um *Chip (LabChip®)*. Este equipamento utiliza um dispositivo de 3 cm² que possui microcanais para o preenchimento direto das amostras de DNA ou RNA. Assim, os ácidos nucleicos são separados e analisados por eletroforese capilar com detecção por fluorescência induzida a laser. Cada *Chip* possui 16 poços conectados por um arranjo de microcanais que são preenchidos com a mistura de gel e corante intercalador (99). O gráfico abaixo (figura 5A) mostra as subunidades 18S e 28S de RNA ribossomal, RNA transportador e pequenos RNAs de uma amostra de RNA total, analisada pelo Bioanalyser, antes de sofrer depleção de seu RNA ribossomal.

A figura 5B ilustra o perfil de uma amostra depletada de RNA ribossomal, após o tratamento com Ribominus. Nela se observa o desaparecimento dos picos que existiam previamente referentes às subunidades 18S e 28S do RNA ribossomal, comprovando a eficiência do procedimento de depleção.

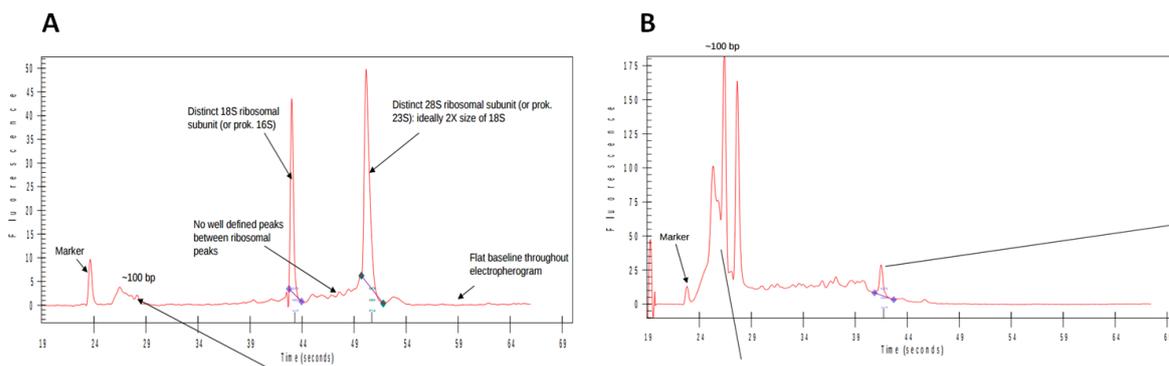


Figura 5 - Depleção de RNA Ribossomal: (A) Gráfico de uma amostra de RNA total submetida à análise de integridade pelo Bioanalyser anteriormente ao processo de depleção de RNA ribossomal pelo Kit Ribominus™. (B) amostra de RNA submetida à análise de integridade pelo Bioanalyser após efetiva depleção de RNA ribossomal pelo kit Ribominus™.

Após a extração de RNA total (de acordo com o item Material e Métodos 2.2), as amostras foram submetidas à depleção com Ribominus™, conforme descrito no item 2.3 (Material e Métodos) e posteriormente à análise no Bioanalyser. Os dados são apresentados na figura 6:

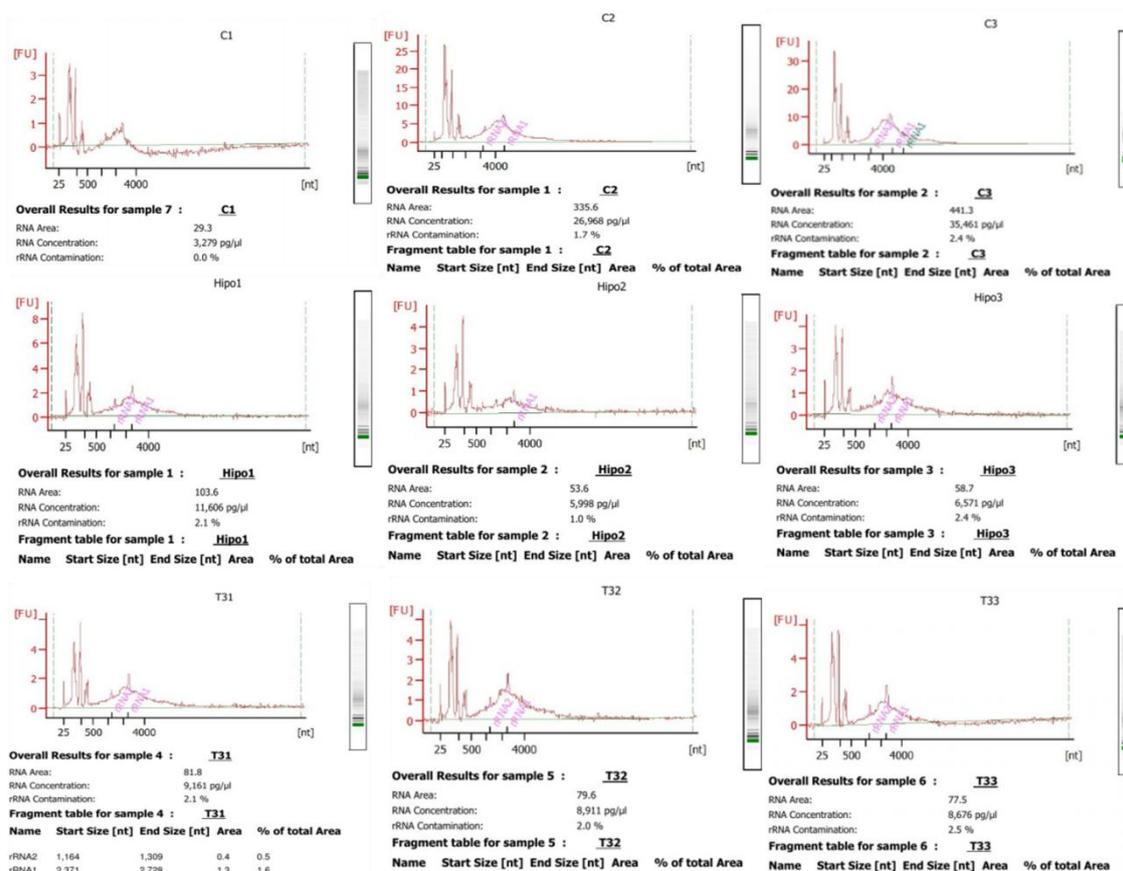


Figura 6 - Eficiência de depleção de RNA Ribossomal: Após extração de RNA total, o RNA ribossomal foi removido das amostras pelo Ribominus™. Os gráficos mostram dados de tamanho/migração versus intensidade de fluorescência. Picos menores estão, às vezes, presentes após 24-29 segundos (eixo x), os quais estão representados pelas subunidades 5S e 5,8S, RNA transportador e pequenos fragmentos de RNA de cerca de 100pb. Picos relacionados às subunidades 18S e 28S do RNA ribossomal deveriam aparecer por volta de 40-50 segundos.

Entretanto, estão ausentes em todas as amostras – C1, C2, C3 (primeira linha) Hipo1, Hipo2 e Hipo3 (segunda linha), e dos grupos T3₁, T3₂, T3₃ (terceira linha). As figuras também apresentam concentração de RNA bem como a porcentagem de contaminação por RNA ribossomal em cada grupo.

Quando se compara os gráficos acima exibidos (Figura 5) com o gráfico apresentado na figura 6, é possível observar que os picos referentes às subunidades 18S e 28S dos RNAs ribossomais, desaparecem por completo, em todos os grupos. Adicionalmente, quando se analisa a porcentagem de contaminação com RNA ribossomal em cada uma das amostras, pode-se observar que não ultrapassa o valor de 2,5%. Juntos, esses dados asseguram que o processo de depleção dos RNAs ribossomais das amostras ocorreu de maneira eficiente.

As amostras seguiram, então, para o preparo das bibliotecas de cDNA, sequenciamento e geração dos dados brutos. Os dados foram processados e analisados pela equipe do Prof. Pedro Galante do Laboratório de Bioinformática do Hospital Sírio Libanês, o qual foi responsável em identificar os genes diferencialmente expressos.

5.2 Clusterização das amostras: *Heatmap*

A análise dos dados de sequenciamento possibilitou a visualização de um panorama geral da quantidade de genes diferencialmente expressos em cada grupo, conforme mostrado na figura 7. Essa categorização, conhecida como *HeatMaps*, refere-se a matrizes de valores representados graficamente que têm o objetivo de agrupar as amostras sequenciadas de acordo com um conjunto de padrões de similaridade, que no caso do sequenciamento, leva em consideração a quantidade de genes que foram regulados positivamente (*upregulated*), negativamente (*downregulated*) e aqueles que não sofreram alteração, em cada amostra. Os dados em um *HeatMap* são apresentados na forma de “*fold-values*”: unidades arbitrárias de quantas vezes o valor é maior ou menor do que o de referência. Os tons em verde representam valores acima do valor de referência (*upregulated*), tons de vermelho indicam valores abaixo do valor de referência (*downregulated*) e as tonalidades mais escuras (preto) apontam valores próximos ao valor de referência, que não sofreram alteração pelo tratamento. Essas representações evidenciam aquelas amostras que apresentaram um comportamento mais homogêneo entre si e aquelas que

mostraram um comportamento mais heterogêneo, em termos de expressão gênica.

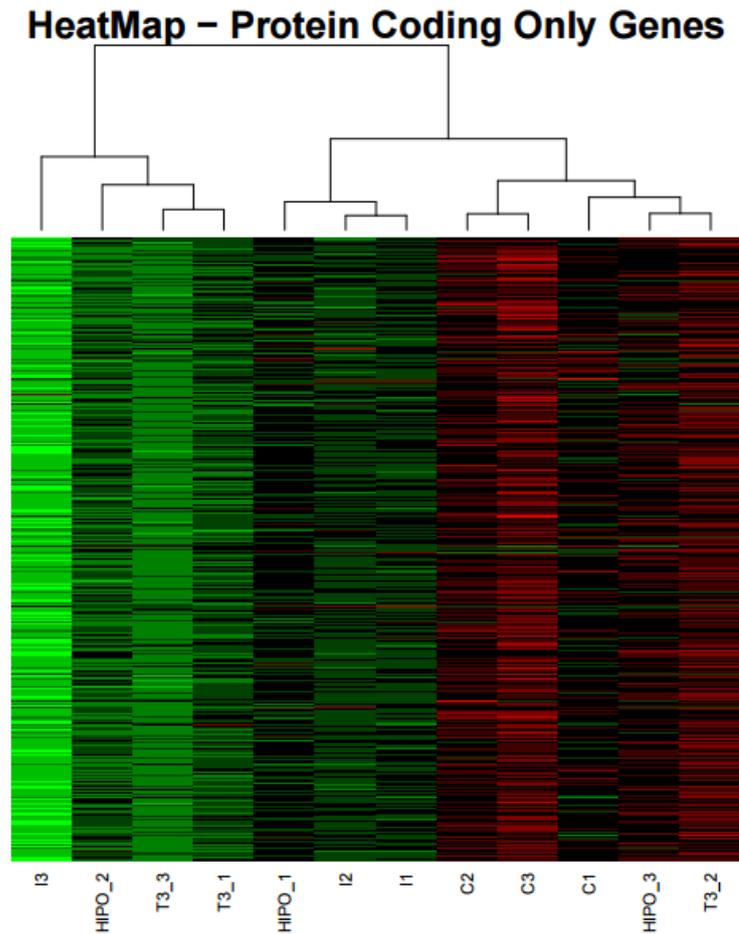


Figura 7 - Heatmap: Comportamento global dos genes diferencialmente expressos baseados nos valores de *foldchange* do grupo Controle, T3 e hipo (grupos diretamente relacionados a este projeto), bem como do grupo iodo e controle (estudo paralelo, não pertencente a esse trabalho) e seus agrupamentos. As linhas em verde indicam genes que tem sua expressão aumentada (*up-regulated*), as em vermelho os genes que tem sua expressão diminuída (*down-regulated*), e as em preto indicam genes que não sofreram alteração pelo tratamento.

A análise do comportamento global das amostras nos *Heatmaps* chama atenção para alguns grupos que não se agregam à outros. Nos heatmaps (Protein coding only genes) as amostras Hipo3 e T3₂ variaram muito. Em parceria com os bioinformatas responsáveis pela análise dos dados, decidimos, portanto, excluir os *outliers*, ou seja, as amostras que apresentavam variações muito díspares em relação às outras, para que as comparações fossem estabelecidas entre grupos homogêneos e para que essas variações não mascarassem resultados importantes.

Portanto, as comparações foram feitas da seguinte maneira:

- Média dos grupos Hipo1, Hipo2 x Média dos grupos T3₁, T3₃
- Média dos grupos Hipo1, Hipo2 x Média dos grupos C2,C3.

Com as comparações acima, duas listas de genes diferencialmente expressos foram geradas: **Controle vs Hipo** e **Hipo vs T3**.

Essas duas diferentes listas geraram juntas, em torno de 2172 genes entre *up-regulated* e *down-regulated*. Essas listas foram submetidas a uma análise capaz de agrupar todos esses genes de acordo com função, via de sinalização envolvida, processos biológicos, organelas celulares, funções moleculares e classe de proteínas. Essa análise foi executada por um software chamado Panther (<http://www.pantherdb.org/>), responsável pela organização dos dados de acordo com sua ontologia (GO – *gene ontology*).

Baseado nas listas geradas a partir da análise do sequenciamento (Controle vs Hipo e Hipo vs T3), juntamente com as análises de GO, selecionamos um conjunto de 5 genes para validação, a saber: *Slc16a1*, *Snrpd1*, *Pfdn1*, *9-March* e *Fam103a1* (figura 8). Esses genes contam cinco diferentes histórias a respeito da influência dos hormônios tireoidianos (T3) regulando, de maneira autócrina, processos envolvidos em eventos pós-transcricionais, pós- tradução e até mesmo na regulação da expressão de seu próprio transportador.

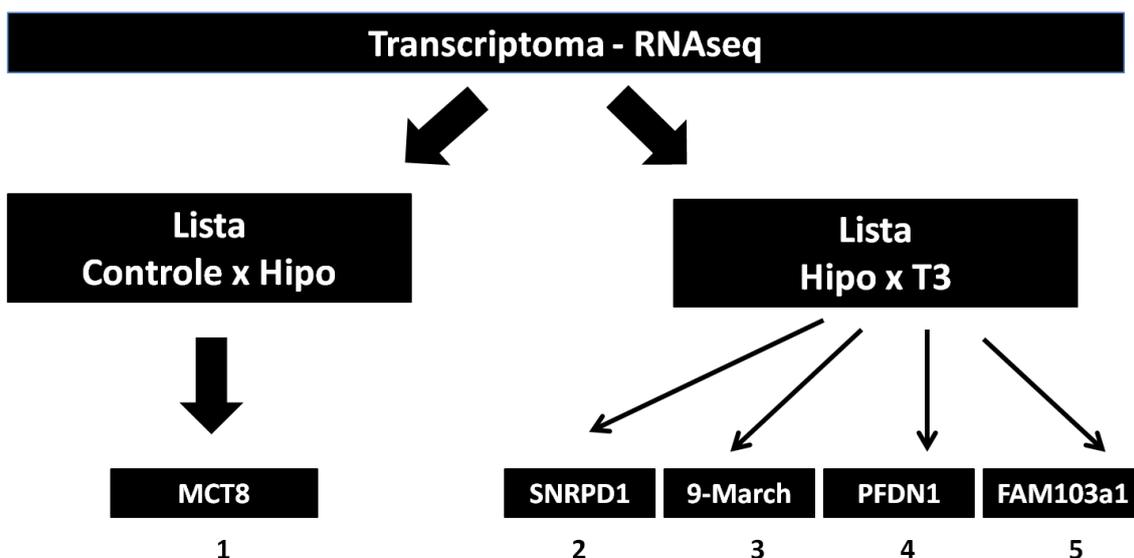


Figura 8 - Genes diferencialmente expressos selecionados para validação: Genes provenientes da listagem de genes diferencialmente expressos e selecionados para validação de acordo com as análises de GO (gene ontology). Na comparação entre a lista Controle vs Hipo, selecionamos o gene *Slc16a1* e na comparação entre a lista Hipo vs T3

selecionamos os genes: *Snrpd1*, *9-March*, *Pfdn1* e *Fam103a1*. Os números abaixo dos genes indicam a ordem em que serão descritos nas sessões posteriores.

5.3 Validação dos genes selecionados por RT-qPCR

A validação dos genes diferencialmente expressos ocorreu por meio de PCR em tempo real. Para isso fez-se necessário a utilização de um gene normalizador (*housekeeping gene*). Após testarmos alguns genes, dentre os vários candidatos como GAPDH, 18S, β -actina, dentre outros, observou-se que o gene *Rpl-19* não apresentava variação estatística nas células PCCl3 quando mantidas em meio hipo e posteriormente tratadas com excesso de T3. Em função da ausência de variação ao longo dos tempos avaliados, bem como da concentração de hormônio escolhida para esses ensaios, o gene *Rpl-19* foi utilizado como normalizador nos ensaios de PCR em tempo real para as células PCCl3, conforme ilustra a figura 9.

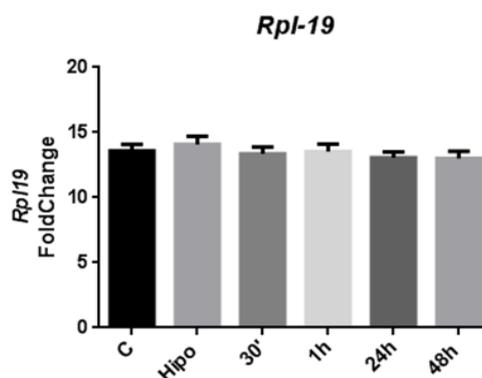


Figura 9 - Avaliação da expressão de *Rpl-19* como gene constitutivo: PCR quantitativo para análise da expressão do gene *Rpl-19* em células PCCl3 inicialmente mantidas em meio hipo e posteriormente submetidas ao tratamento com T3 (10^{-7} M) por 30min, 1h, 24h e 48h. Os valores se referem à média mais ou menos o erro padrão da média (média \pm EPM). Nenhuma diferença estatística foi observada entre os diferentes grupos após análise ANOVA one-way.

5.3.1 *Slc16a2*

Como mencionado anteriormente, o gene *Slc16a2* codifica a proteína MCT 8, que faz parte de uma família de transportadores responsáveis por mediar a translocação de substratos monocarboxilados, como piruvato e lactato, para o interior e exterior da célula, bem como de iodocompostos, como os hormônios tireoidianos.

Os dados obtidos pelo sequenciamento de nova geração (RNAseq), na comparação feita entre a lista de genes diferencialmente expressos do grupo

Controle vs Hipo, apontaram um aumento de expressão do mRNA do *Slc16a2* no grupo Hipo, com valor de *LogFoldChange* de 0,51 e valor de $p= 0,0004$. Esses dados foram confirmados na validação tanto por RT-qPCR quanto por western Blotting, conforme ilustra a figura 10:

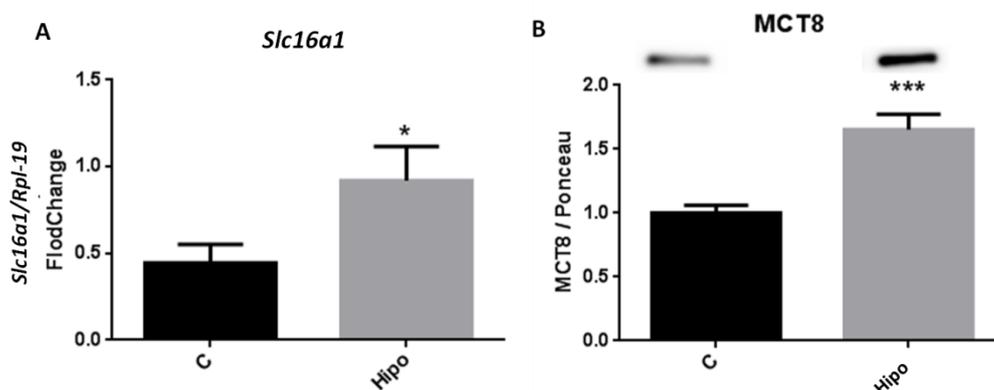


Figura 10 - Validação da expressão de *Slc16a1* por RT-qPCR e western bot: À esquerda PCR quantitativo de células PCCl3 mantidas em meio Hipo (depletado de hormônio tireoidiano) por 48h. À direita, western Blotting de células PCCl3 mantidas em meio Hipo por 48h. Os valores referem-se a média de expressão do gene *Slc16a1*, normalizada por *Rpl-19*, mais ou menos o erro padrão da média (média±EPM), expressos em relação ao grupo controle (A). Em B temos a expressão da MCT 8, sendo a normalização realizada pelo Ponceau (anexo1). (*) indica diferença estatística em relação ao grupo controle por Teste t, para $p<0,05$ (n=20).

Ao analisar a lista Hipo vs T3 de genes diferencialmente expressos, o *Slc16a2* não aparece como um gene regulado negativamente pelo T3. Contudo, mesmo não tendo indicativo dessa diminuição pelos dados de sequenciamento, optamos por avaliar a expressão gênica e proteica do MCT 8 frente ao tratamento com excesso (10^{-7} M) e em doses fisiológicas (10^{-9} M) de hormônio. Detectou-se uma reversão do aumento da expressão do mRNA de *Slc16a2* observada no grupo Hipo, em todos os tempos avaliados (30', 1h e 24h), quando as células foram tratadas com 10^{-7} M de T3. Já quando as células foram tratadas com T3 10^{-9} M, não foi possível observar o mesmo efeito de inibição na expressão do transportador, pelo menos nos tempos avaliados (figura 11).

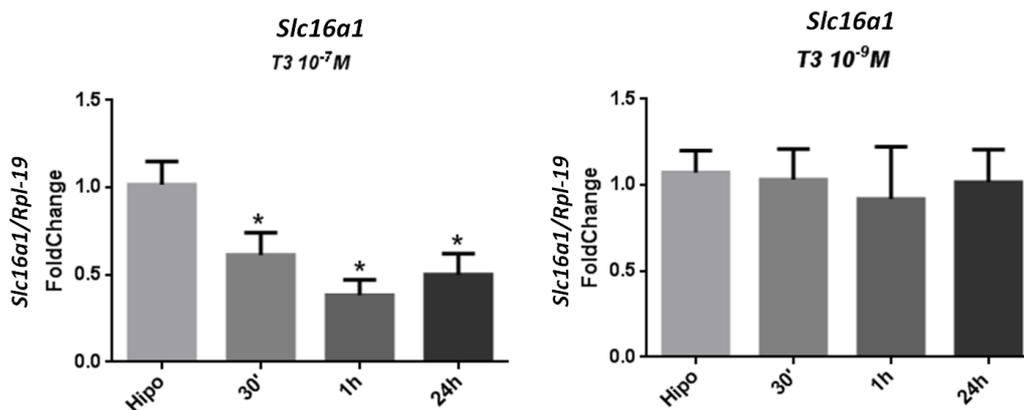


Figura 11 - Expressão de *Slc16a1* frente ao tratamento com T3: PCR quantitativo para análise da expressão do gene *Slc16a1* em células PCCL3 mantidas em meio hipo por 24h e então submetidas a tratamento com T3 na concentração 10^{-7} M (esquerda) e 10^{-9} M (direita) por 30', 1h e 24h. Valores são a média mais ou menos o erro padrão da média (média±EPM) de expressão do gene *Slc16a1*, normalizada por *Rpl-19*, expressos em relação à média ± EPM dos valores do grupo Hipo. (*) indica diferença estatística em relação ao grupo Hipo por ANOVA one-way seguido de Tukey's, para $p < 0,05$ (n=20).

Ao avaliarmos o conteúdo proteico de MCT 8 nas células PCCI3 mantidas em meio hipo e então tratadas com excesso de T3 (10^{-7} M) e com T3 na concentração fisiológica (10^{-9} M), não foi possível observar variação na expressão do transportador em nenhuma das concentrações e em nenhum dos tempos avaliados (Figura 12).

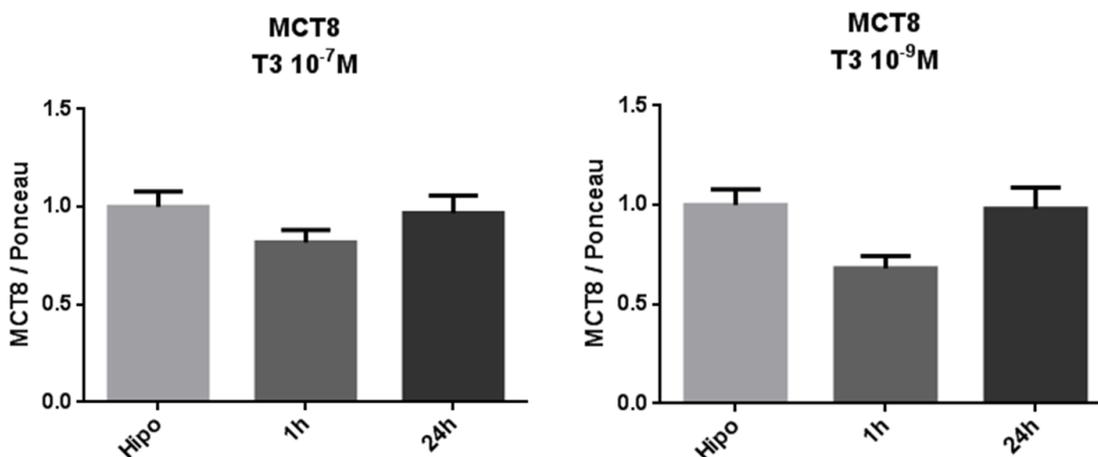


Figura 12 - Avaliação do conteúdo proteico de MCT 8 em células tratadas com T3: Western Blot para análise da expressão do conteúdo proteico de MCT 8 em células PCCL3 mantidas em meio hipo e então submetidas ao tratamento com T3 na concentração 10^{-7} M (esquerda) e 10^{-9} M (direita) por 1h e 24h. Valores são a média ± EPM da expressão de MCT 8, normalizada pelo Ponceau (anexo 2), expressos em relação à média ± EPM dos valores do grupo Hipo. (n=20).

No intuito de avaliar se as alterações observadas na expressão de *Slc16a2* eram de fato causadas pelo T3 e não, indiretamente pelo aumento na disponibilidade de iodo proveniente da desiodação de T3 a T2 pela desiodase 1, nós tratamos previamente as células PCCI3 com PTU (1mM) – um potente inibidor da enzima D1 – por 1h e então tratamos as células com T3 na

concentração de 10^{-7} M por 1h e 24h. Após o tratamento com PTU, o hormônio tireoidiano induziu uma resposta ainda mais pronunciada em reduzir a expressão de *Slc16a2* (figura 13).

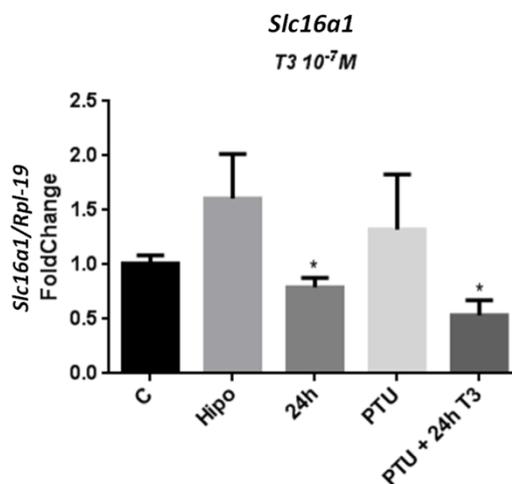


Figura 13 - Expressão de *Slc16a1* em células PCCl3 previamente incubadas com PTU: RT-qPCR para análise da expressão de *Slc16a1* de células PCCl3 pré-incubadas com PTU (1mM) e então submetidas a tratamento com T3 na concentração 10^{-7} M por 24h. Valores são a média \pm EPM da expressão de *Slc16a1* em relação ao gene *Rpl-19*. (*) indica diferença estatística por ANOVA-one-way (em relação ao grupo hipo), seguido de Tukey's para $p < 0,05$ (n=20).

Após a conclusão da etapa de validação no modelo *in vitro* e da avaliação do efeito do tratamento com PTU e da administração de T3 em doses e tempos distintos, passamos a realizar essas mesmas análises no modelo *in vivo*, por meio dos procedimentos 1 e 2, conforme explicitado em material e métodos no item 2.9.

Por meio do procedimento 1, observamos que os animais hipotireoideos, tanto os tratados com 10 ou 20 μ g/100 g PC, ip, de PTU, apresentaram aumento na expressão de mRNA e da proteína MCT 8. Por outro lado, os animais hipertireoideos tratados com 1,5 ou 3 μ g/100 g PC, ip, de T3 exibiram uma diminuição na expressão de mRNA e da proteína MCT 8. Esses dados vão ao encontro do que foi observado no modelo *in vitro* (figura 14).

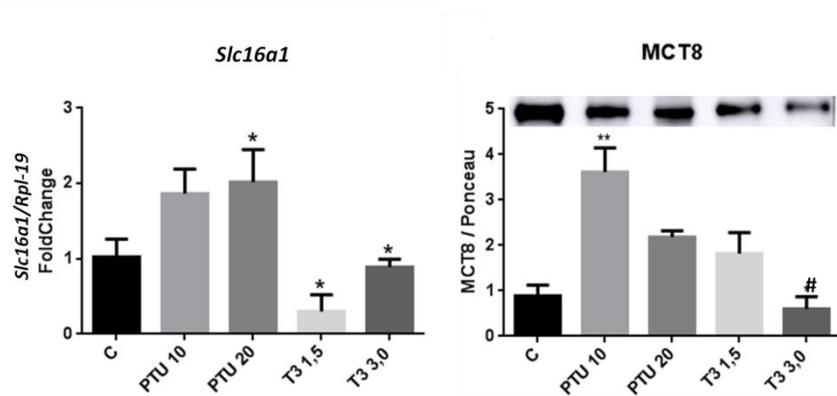


Figura 14 – Expressão gênica e proteica de MCT 8 em ratos hipo e hipertireoideos: Ratos wistar foram induzidos ao hipotireoidismo com 10 e 20µg/100g de PC de PTU, ip, por 30 dias e ao hipertireoidismo com T3 – 1,5 e 3,0 µg/100g de PC ip, por 28 dias. À esquerda temos os dados da expressão gênica de *Slc16a1*, enquanto à direita temos a da proteína MCT 8 na tireoide. Valores são a média ± EPM da expressão de *Mct8* e MCT 8 normalizadas pela expressão do gene *Rpl-19* ou Ponceau (anexo 3), respectivamente. (*) indica diferença estatística por ANOVA-one-way seguido por Tukey's para $p < 0,05$ vs controle (#)indica diferença estatística por ANOVA-one-way seguido por Tukey's para $p < 0,05$ vs Hipo (PTU 10).

No estudo que se segue, utilizamos o procedimento 2, em que avaliamos o efeito do tratamento com T3 (1,5 µg/100g PC, ip, 28 dias) nos animais previamente induzidos ao hipotireoidismo por tratamento com PTU (10 µg/100g PC, ip, 30 dias). Observamos que os animais hipo exibiram aumento na expressão de mRNA e da proteína MCT 8. Entretanto, ambas diminuíram nos animais submetidos previamente ao hipo e que foram então tratados com T3. (figura 15).

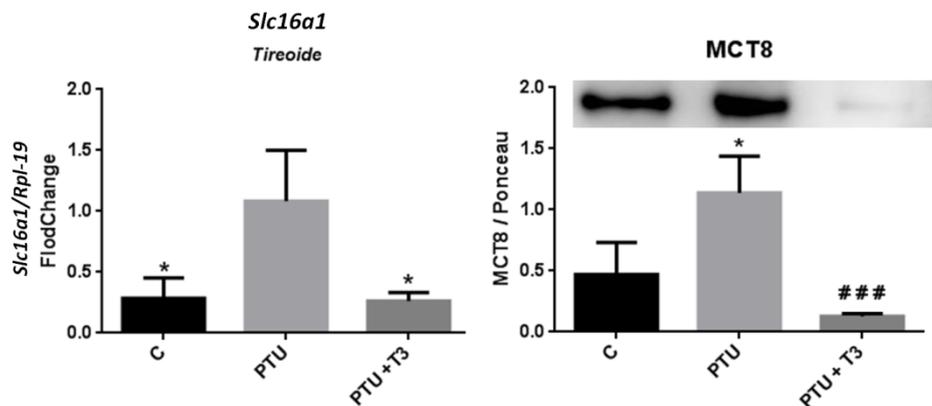


Figura 15 - Expressão gênica e proteica de MCT 8 em ratos submetidos previamente ao hipotireoidismo e tratados com T3: Ratos wistar foram induzidos ao hipotireoidismo com 10µg/100g PC de PTU por 30 dias, sendo parte deles tratada com T3 (1,5µg/100g PC, ip) por 28 dias. À esquerda temos a expressão gênica de *Slc16a1* e à direita a da proteína MCT 8 na tireoide. Os valores são a média ± EPM da expressão de *Slc16a1* e MCT 8 normalizadas pela expressão do gene *Rpl-19* ou Ponceau (anexo 4), respectivamente. À esquerda o (*) indica diferença estatística por ANOVA-one-way para $p < 0,05$, em relação ao grupo PTU (hipo). À direita, (*) indica diferença estatística em relação ao grupo controle, enquanto o (###) indica diferença estatística em relação ao grupo PTU (hipo) usando ANOVA-oneway, seguido por Tukey's para $p < 0,05$ (n=15).

5.3.2 Gene *Snrpd1*

O gene *Snrpd1* (**S**mall **n**uclear **r**ibonucleo**p**rotein **D1**) codifica uma proteína da família das ribonucleoproteínas, que são complexos proteicos compostos por pequenos RNAs nucleares (*small nuclear RNAs - snRNAs*) associados a uma família de proteínas conhecidas como proteínas Sm, nas quais estão incluídas as A, B, B', C, **D1**, D2 e D3, E, F e G. Essas ribonucleoproteínas estão envolvidas, dentre outros processos, na formação do espliceossomo nos eventos de *splicing* do pré-mRNA em células eucarióticas (100).

Dentre a listagem de genes diferencialmente expressos, resultado da comparação entre **Hipo x T3** por 24h na concentração 10^{-7} M, o gene *Snrpd1* foi regulado positivamente (*upregulated*) pelo tratamento ($\text{LogFoldChange}=0,776426793$; $p=1,10\text{E-}05$). Em outra comparação estatística feita entre o grupo **Controle vs Hipo**, os dados de sequenciamento apontaram uma diminuição na expressão (*downregulated*) de *Snrpd1* no grupo Hipo ($\text{LogFoldChange}= 0,537196603$; $p= 6,55394\text{E-}11$).

Os ensaios de RT-qPCR confirmaram o padrão de resposta observado no RNAseq, validando assim os resultados do sequenciamento (figura 16A).

Conforme descrito no protocolo experimental (Material e Métodos, item 2), avaliamos também a expressão de *Snrpd1* frente ao tratamento por 24 h com T3 na concentração 10^{-9} M, e também após 1 h de tratamento com T3 nas concentrações de 10^{-7} M e 10^{-9} M, sendo os dados obtidos apresentados nas figuras 16B e C, respectivamente. É possível observar um padrão de resposta semelhante ao apresentado na dose 10^{-7} M, tanto na diminuição de expressão do gene no grupo hipotireoideo, quanto no aumento de expressão após 24h de tratamento com T3. Embora não tenha sido significativo, chama a atenção que o T3, na menor dose, promoveu um aumento da expressão do mRNA do *Snrpd1* após 1 h do tratamento.

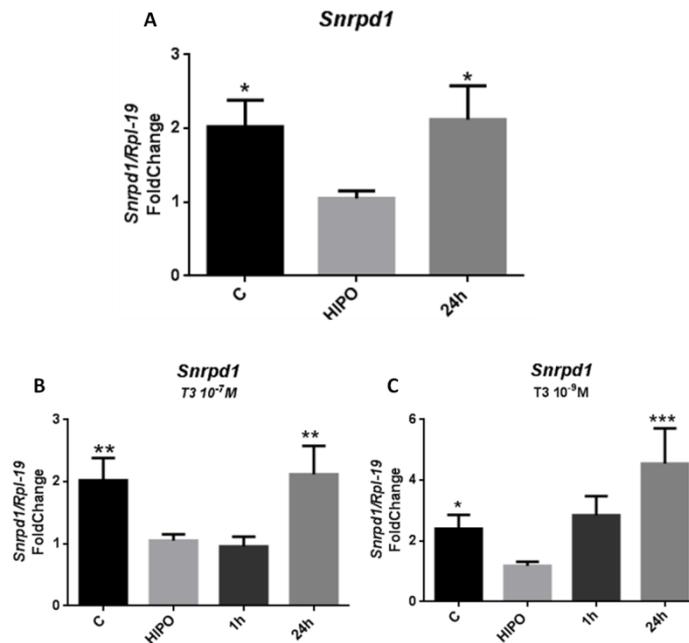


Figura 16 – (A) Validação *Snrpd1* por RT-qPCR: análise da expressão do gene *Snrpd1* em células PCC13 mantidas em meio Hipo e, então, submetidas a tratamento com T3 na concentração 10^{-7} M, por 24h. (B) Mostra o mesmo estudo com a adição de um grupo com 1 h de tratamento com T3 (10^{-7} M); (C) Expressão de *Snrpd1* em células PCC13 tratadas com T3 10^{-9} M por 1h e 24h. Os valores representam a média \pm EPM da expressão do gene *Snrpd1*, normalizada por *Rpl-19*, expressos em relação à média dos valores do grupo Hipo. (*) indica diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Hipo; (ANOVA one-way, seguido de pós-teste de Tukey's).

Avaliamos também o conteúdo proteico de SNRPD1 em células PCC13 mantidas em meio Hipo e, então, tratadas com 10^{-7} M de T3 por 24, 48 e 72h (Figura 17). Observou-se redução (não significativa) do conteúdo proteico de SNRPD1 no grupo Hipo, e aumento do mesmo já com 24h de tratamento com T3 e posteriormente com 72h. Essas alterações foram coerentes com os dados observados na expressão gênica.

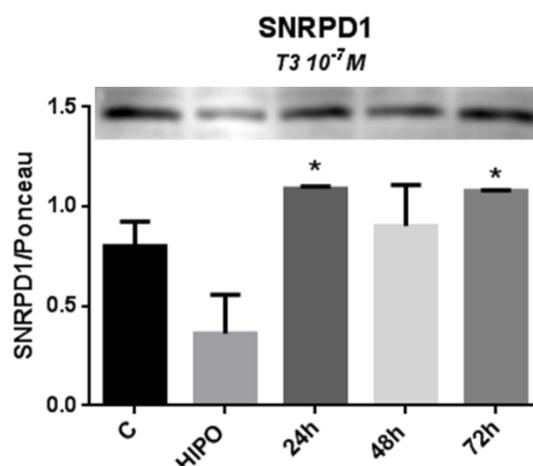


Figura 17 – Expressão da proteína SNRPD1 por western blot: Conteúdo de SNRPD1 em células PCC13 mantidas em meio Hipo e, então, submetidas a tratamento com T3 na concentração 10^{-7} M por 24, 48 e 72h. Os valores são

apresentados como média \pm EPM do conteúdo total de MCT 8 normalizados por Ponceau (anexo 6). (*) indica diferença estatística em relação ao grupo Hipo por ANOVA one-way, seguido de pós-teste de Tukey's para $p < 0,05$.

Após a validação de expressão do gene *Snrpd1* no modelo *in vitro*, seguimos com a avaliação da expressão deste gene em ratos induzidos ao hipotireoidismo (PTU:10 e 20 $\mu\text{g}/100\text{g}$ PC, ip) e ao hipertireoidismo (T3:1,5 e 3,0 $\mu\text{g}/100\text{g}$ PC, ip), conforme o procedimento 1 (Material e Métodos item 2.9). Os ensaios de expressão gênica não evidenciaram nenhuma alteração do *Snrpd1* nos grupos hipo (PTU 10 e 20 $\mu\text{g}/100\text{g}$ de PC). Contudo, a dose de T3 de 1,5 $\mu\text{g}/100\text{g}$ PC provocou aumento significativo da expressão de *Snrpd1*, semelhante ao que foi observado na validação deste gene no modelo *in vitro* (Figura 18).

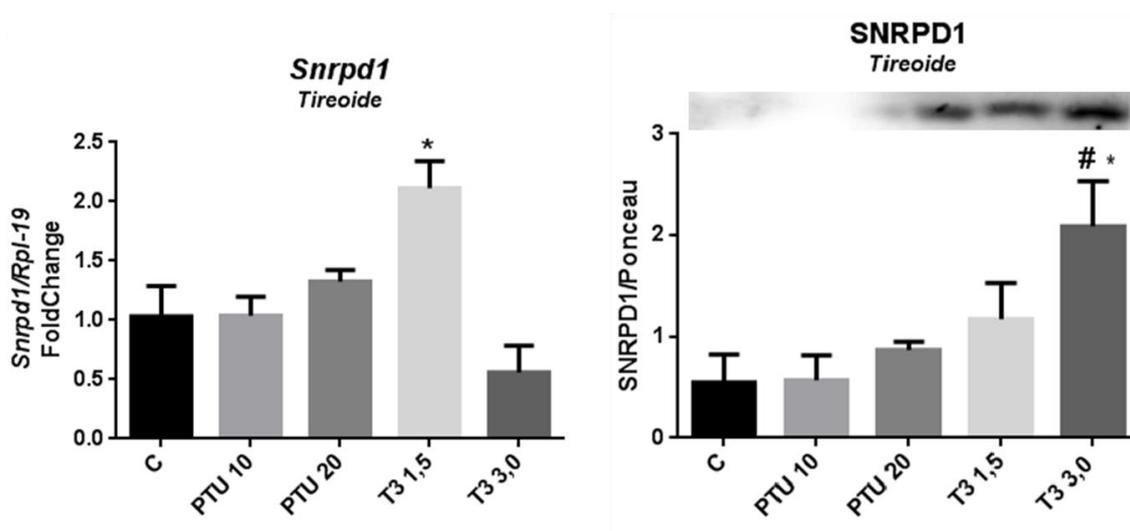


Figura 18 - Análise da expressão do *Snrpd1* (estudo in vivo): Ratos Wistar foram induzidos ao hipotireoidismo com 10 e 20 $\mu\text{g}/100\text{g}$ PC de PTU, ip, por 30 dias e ao hipertireoidismo com T3 – 1,5 e 3,0 $\mu\text{g}/100\text{g}$ de PC ip, por 28 dias. À esquerda temos a expressão gênica de *Snrpd1* e à direita a da proteína SNRPD1 na tireoide. Os valores representam a média \pm EPM da expressão de *Snrpd1* ou SNRPD1, normalizados pelo gene *Rpl-19* ou Ponceau (anexo 7), (*) indica diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle e (#) indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo PTU 10 (hipo) (ANOVA-one-way seguido de Tukey; $n=15$).

Uma vez analisado o comportamento de expressão do gene *Snrpd1* nas condições de Hipo e Hipertireoidismo, hipotetizamos se em animais previamente hipotireoideos o hormônio tireoidiano seria capaz de reverter a resposta observada no grupo hipo. Para tanto, os animais foram tratados com PTU (10 $\mu\text{g}/100\text{g}$ de PC por 30 dias), em seguida parte desses animais foi tratado com T3 na dose de 1,5 $\mu\text{g}/100\text{g}$ de PC por 28 dias (Material e Métodos item 2.9- procedimento 2). O que se pode observar é que os animais

previamente hipo e tratados com T3 houve uma redução na expressão do gene *Snrpd1* quando comparado ao grupo Hipo (figura 19).

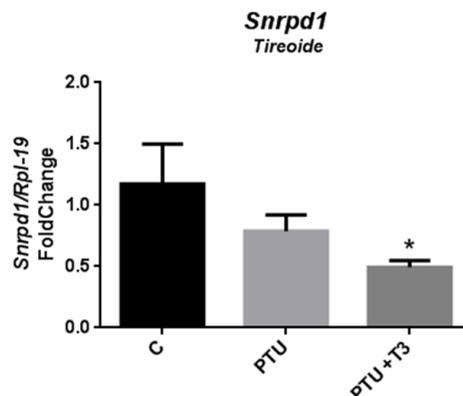


Figura 19 - Expressão gênica e proteica de *Snrpd1* em ratos submetidos previamente ao hipotireoidismo e tratados com T3: Ratos wistar foram induzidos ao hipotireoidismo com 10µg/100g PC de PTU por 30 dias, sendo parte deles tratada com T3 (1,5µg/100g PC, ip) por 28 dias. Os valores são a média ± EPM da expressão de *Snrpd1* normalizadas pela expressão do gene *Rpl-19*. (*) indica diferença estatística por ANOVA-one-way para $p < 0,05$, em relação ao grupo controle (n=15).

5.3.3 Gene 9-March

O gene *9-March* codifica uma enzima E3 ligase, responsável pela adição de múltiplas ubiquitinas em proteínas destinadas a degradação no complexo proteossomal.

Sabe-se da importância do balanço entre reações de anabolismo e catabolismo proteico (turnover) nas células para o seu eficiente funcionamento, já que as estruturas e organelas são recicladas ao longo da vida. Dentre as vias proteolíticas intracelulares, tem-se dado bastante destaque recentemente a um conjunto de vias especializadas no controle desses processos que são os complexos proteossomais. Nesta via proteolítica, que envolve o proteassoma, a proteína ubiquitina exerce um papel central, já que é capaz de marcar proteínas e macromoléculas destinadas à degradação, o que é essencial para o controle de processos biológicos responsáveis pela manutenção da vida das células. Contudo, ajustes finos nesse processo são de extrema importância para que a célula desempenhe, de maneira controlada, essa função (101).

A ubiquitina é uma proteína globular de 76 aminoácidos envolvida em diversos processos celulares como progressão do ciclo celular, biogênese de organelas, apoptose, reparo de DNA, dentre outros. Um crescente número de estudos tem sido conduzido na tentativa de se entender, eventos mediados pela ubiquitinação. Até o presente momento é sabido que, uma série de

reações catalizadas por enzimas específicas adicionam ubiquitina em uma cadeia polipeptídica, a qual atua como um sinal de endereçamento da mesma para complexos proteassomais na célula, culminando em sua degradação ou reciclagem. Contudo, já se sabe que é necessária uma cadeia de quatro ou mais ubiquitinas (poliubiquitinação) para direcionar as proteínas para a degradação.

O processo de ubiquitinação ocorre em várias etapas, as quais são dependentes uma da outra. Inicialmente a enzima E1 (*ubiquitin-activating enzyme*) faz uma ligação tiol-éster com a glicina da porção carboxi-terminal da ubiquitina. Em seguida, a enzima E2 (*ubiquitin-conjugating enzyme*) dissocia a ligação da ubiquitina com a enzima E1, assumindo sua posição através de uma reação de transtiolação. Por fim, a enzima E3 (*ubiquitin-protein ligase*) cataliza a transferência da ubiquitina ligada a E2 para um resíduo de lisina do substrato proteico a ser marcado para degradação, conforme esquema da figura 20 (102,103).

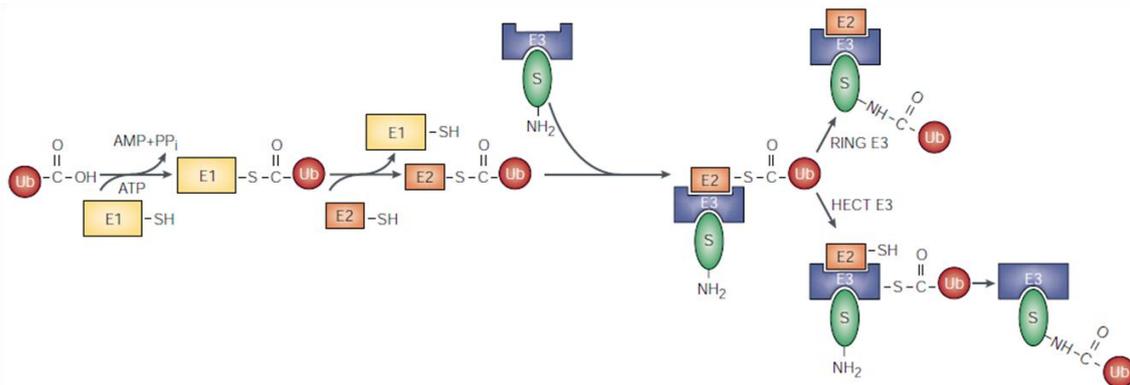


Figura 20 - Esquema ilustrativo do processo de Poliubiquitinação: Uma reação em cadeia catalizada por três diferentes enzimas (E1, E2 e E3) culmina na adição de moléculas de ubiquitina em cadeias polipeptídicas destinadas a degradação nos complexos proteassomais.

Existem duas grandes famílias de enzimas E3 ligases: (a) as que apresentam em sua estrutura um domínio HECT, responsável por catalizar uma ligação intermediária da ubiquitina primeiramente com a enzima E3 ligase e posteriormente com o substrato proteico e (b) as enzimas E3 ligases de domínio RING-finger (**R**eally **I**nteresting **N**ew **G**ene) finger, que transferem diretamente a ubiquitina da enzima E2 para o substrato polipeptídico. Esse último domínio foi descoberto bem antes de se conhecer sua participação nos processos de ubiquitinação. Estudos de estrutura cristalográfica dessas

proteínas revelaram a organização de oito resíduos de aminoácidos ligados a dois íons zinco de maneira intervalada (104).

Dentro da família das E3 ligases que possuem em sua estrutura o domínio RING-finger, existe uma subclasse especial de enzimas que concentram sua localização próxima à membrana plasmática, as chamadas MARCH (**M**embrane **A**ssociated **R**ING-**C**H). Essas proteínas compõem uma grande família composta de nove membros (I – IX), os quais apresentam variações no posicionamento do domínio RING finger na porção N ou Carboxi-terminal, na quantidade de domínios transmembrânicos bem como de seus substratos.

Os dados de sequenciamento da lista de genes diferencialmente expressos que resultaram da comparação entre os grupos **Hipo vs T3** evidenciaram que o hormônio tireoidiano regula a expressão do gene que codifica a *9-March*, um tipo específico de enzima E3-ligase pertencente à família das MARCH, como comentado anteriormente. Nas células PCCI3 mantidas em meio hipo e então tratadas com T3 na concentração 10^{-7} M por 24h há uma diminuição considerável (*downregulation*) na expressão do gene *9-March* (*LogFoldChange* = -0,742673418; *p*= 6,92E-05). Já quando se comparou a lista **Controle vs Hipo**, os dados de sequenciamento mostraram um aumento expressivo na expressão do gene *9-March* no grupo Hipo (*LogFoldChange* = 1,582301725; *p*= 0,001830843). Os ensaios de RT-qPCR validaram ambas as respostas observadas, corroborando assim os dados de sequenciamento, conforme apresentado na figura 21A. Já quando as células são tratadas com 10^{-7} M de T3 por 1h já é possível observar uma diminuição na expressão do gene (figura 21B). Contudo, quando as células são tratadas com uma concentração de 10^{-9} M de T3 a resposta é contrária à observada na concentração de 10^{-7} M, ocorrendo um aumento na expressão de *9-March* quando comparado com o grupo hipo (figura 21C).

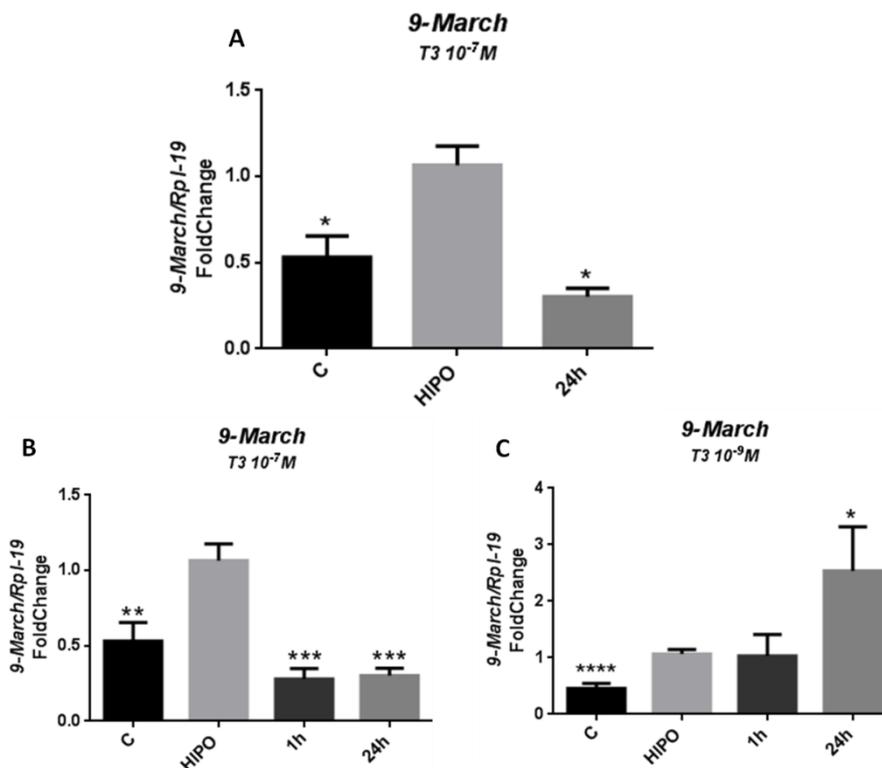


Figura 21 - Validação *9-March* por RT-qPCR: Análise da expressão do gene *9-March* em células PCCI3 mantidas em meio Hipo e então, submetidas ao tratamento com T3 na concentração $10^{-7}M$ por 24h. (B) mostra o mesmo estudo com adição de um grupo com 1h de tratamento com T3 ($10^{-7}M$, por 24h); (C) Expressão de *9-March* em células PCCI3 tratadas com T3 $10^{-9}M$ por 1h e 24h. Os valores representam a média \pm EPM da expressão do gene *9-March*, normalizada por *Rpl-19*, expressos em relação à média dos valores do grupo Hipo. (*) indica diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Hipo; (ANOVA one-way, seguido de pós-teste de Tukey's) $n=20$.

Em seguida, avaliamos o conteúdo proteico de 9-MARCH em células PCCI3 mantidas em meio hipo e tratadas com excesso de T3. Por se tratar de uma proteína expressa na membrana plasmática, as amostras foram submetidas a um fracionamento, com o intuito de enriquecê-las em proteínas de membrana plasmática. Para tal, após o fim do tratamento as células foram lisadas em tampão específico, como descrito no Material e Métodos item 2.8.

Observa-se uma tendência ao aumento da expressão do gene *9-March* ao longo tempo do tratamento com T3. Assim, com 72h de tratamento com T3 se observa uma expressão máxima quando comparado ao tratamento com 24 e 48 h, apesar de não ser estatisticamente significativa (figura 22).

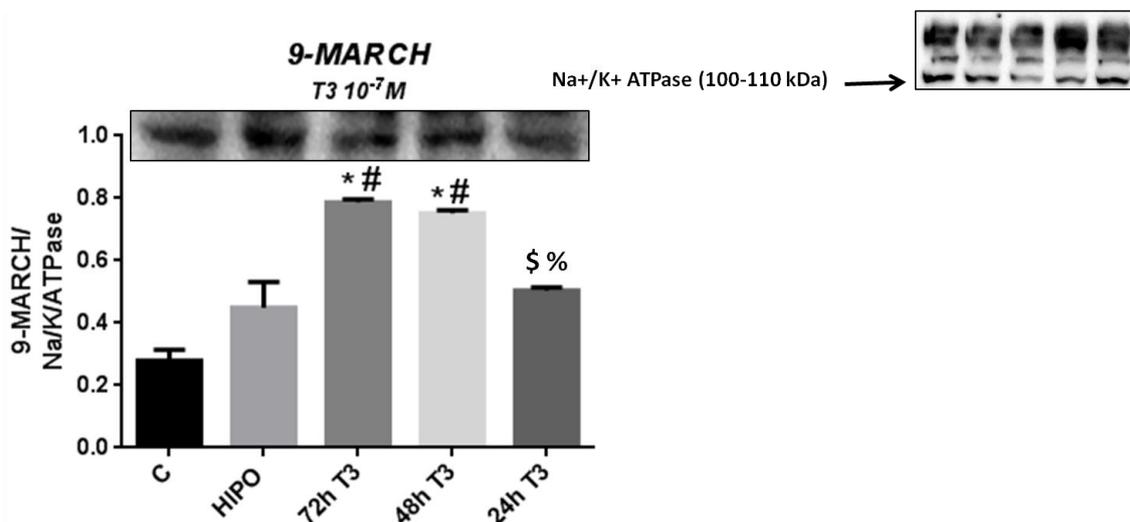


Figura 22 - Expressão da proteína 9-MARCH por western blot: Conteúdo de 9-MARCH em células PCCl3 mantidas em meio Hipo e, então, submetidas a tratamento com T3 na concentração 10^{-7} M por 72, 48 e 24h. Os valores são apresentados como média \pm EPM do conteúdo da fração de membrana de 9-MARCH normalizados por Na/K/ATPase. (*) indica diferença estatística em relação ao grupo Hipo por ANOVA one-way, seguido de pós-teste de Tukey's para $p < 0,05$, (#)indica diferença estatística em relação ao grupo controle por ANOVA one-way, seguido de pós-teste de Tukey's para $p < 0,05$, (\$)indica diferença estatística em relação ao grupo 72h por ANOVA one-way, seguido de pós-teste de Tukey's para $p < 0,05$, (%)indica diferença estatística em relação ao grupo 48h por ANOVA one-way, seguido de pós-teste de Tukey's para $p < 0,05$, $n=3$.

Como descrito anteriormente, o gene *9-March* codifica uma enzima E3 ligase, responsável por adicionar ubiquitina em cadeias polipeptídicas destinadas à degradação. Diante do perfil de expressão proteica de 9-MARCH, optamos por avaliar através de um ensaio funcional, se de fato, haveria uma diferença no perfil de poli-ubiquitinação de proteínas de membrana, frente ao tratamento com T3. Para tanto, após o fim do tratamento as células foram lisadas em tampão específico para posteriormente serem fracionadas e enriquecidas em proteínas de membrana plasmática, conforme Material e Métodos item 2.8. Obtivemos então duas frações de proteínas: (i) uma fração total e (ii) uma fração enriquecida em proteínas de membrana plasmática. A fração de proteínas de membrana foi separada por eletroforese e então incubada com anticorpo anti-poliubiquitina. A resposta de poli-ubiquitinação no ensaio funcional evidencia uma grande semelhança com o perfil de expressão de 9-MARCH, apresentado acima, já que ocorreu um aumento de proteínas poliubiquitinadas após 72h de tratamento com T3, quando comparado com 24 e 48 h de tratamento (ainda que não diferente estatisticamente), como observado na figura 23.

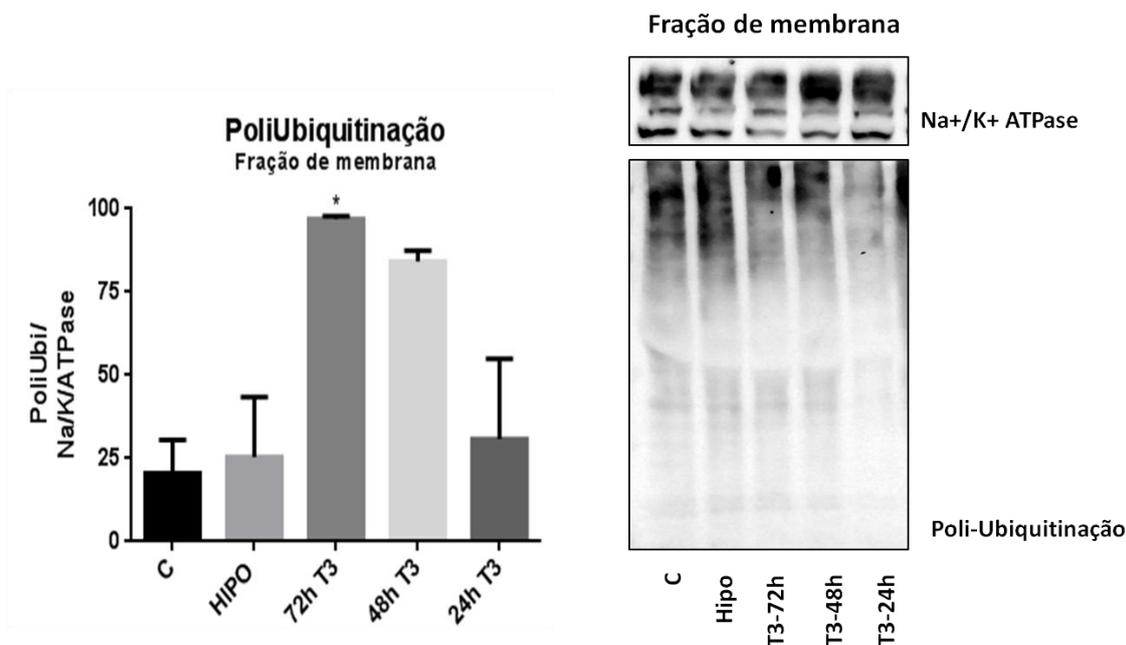


Figura 23 - Ensaio de Poliubiquitinação: Células PCCL3 mantidas em meio hipo e tratadas com T3 (10^{-7} M) por 72h, 48h e 24h. Após o fim do tratamento células foram lisadas e fracionadas no intuito de enriquecer em proteínas de membrana plasmática. Os valores são apresentados como média \pm EPM do conteúdo da fração de membrana de normalizados por Na/K/ATPase. (*) indica diferença estatística em relação ao grupo Controle; por ANOVA one-way, seguido de pós-teste de Tukey's para $p < 0,05$, $n=3$.

Posteriormente à validação *in vitro* do gene *9-March*, avaliamos a expressão do mesmo no modelo *in vivo*. Animais foram induzidos à condição de hipotireoidismo com PTU (10 e 20 $\mu\text{g}/100\text{g}$ de PC por 30 dias) e ao hipertireoidismo com T3 (1,5 e 3,0 $\mu\text{g}/100\text{g}$ PC, ip, por 28 dias), sendo a glândula tireoide removida para ensaios de RT-qPCR e western blot (Material e Métodos item 2.9- procedimento 1). Os ensaios de expressão gênica no modelo *in vivo* indicam que existe um aumento na expressão de *9-March* no grupo hipo (PTU 10), quando comparado com o grupo controle. Já quando os animais são tratados com T3 observa-se uma redução na expressão do referido gene, com ambas as doses de T3, quando comparados com grupo hipo. A validação *in vivo*, evidenciou uma regulação coerente com o que foi observado no modelo *in vitro*, o que sugere fortemente, um importante papel do hormônio tireoidiano (T3) na expressão deste gene (Figura 24).

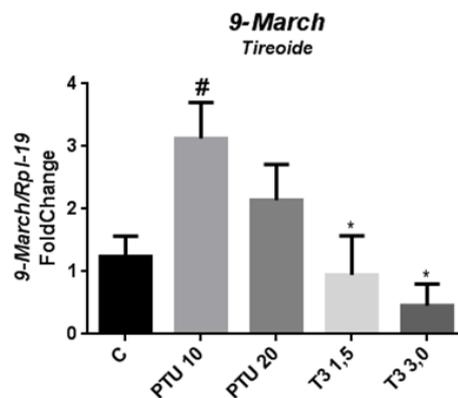


Figura 24 - Análise da expressão do 9-March (estudo in vivo): Ratos Wistar foram induzidos ao hipotireoidismo com 10 e 20 $\mu\text{g}/100\text{g}$ PC de PTU, ip, por 30 dias e ao hipertireoidismo com T3 – 1,5 e 3,0 $\mu\text{g}/100\text{g}$ de PC ip, por 28 dias. Os valores representam a média \pm EPM da expressão de 9-March normalizados pelo gene *Rpl-19*, (*) indica diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo hipo (PTU 10) e (#) indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (ANOVA-one-way seguido de Tukey; $n=15$).

Posteriormente, avaliamos se, em animais previamente hipotireoideos (PTU:10 $\mu\text{g}/100\text{g}$ PC, ip, 30 dias), o hormônio tireoideano (T3: 1,5 $\mu\text{g}/100\text{g}$ PC, ip, 28 dias; Material e Métodos item 2.9- procedimento 2) seria capaz de reverter a resposta observada no grupo hipo. Esses dados estão apresentados na figura 25, que mostra que não houve variação na expressão de 9-March nessas condições.

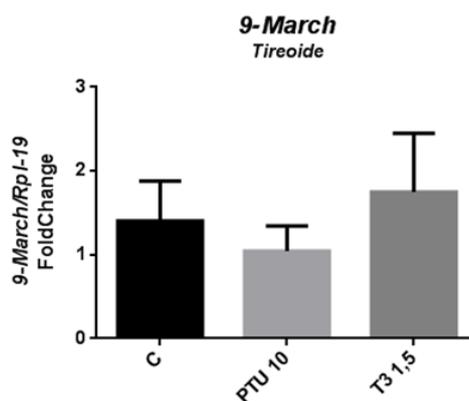


Figura 25 - Expressão gênica e proteica de 9-March em ratos submetidos previamente ao hipotireoidismo e tratados com T3: Ratos wistar foram induzidos ao hipotireoidismo com 10 $\mu\text{g}/100\text{g}$ PC de PTU por 30 dias, sendo parte deles tratada com T3 (1,5 $\mu\text{g}/100\text{g}$ PC, ip) por 28 dias. Os valores são a média \pm EPM da expressão de 9-March normalizadas pela expressão do gene *Rpl-19*.

5.3.4 Gene Pfdn1

Muitas das funções biológicas exercidas pelas proteínas dependem de um eficiente processamento pós-traducional como glicosilações e dobramentos que contribuem para a geração de uma proteína madura e biologicamente ativa.

As chaperonas são um grupo de proteínas que participam no dobramento de outras proteínas, recém-sintetizadas, em sua estrutura secundária e/ou terciária, numa reação dependente de ATP. São formadas estruturalmente por dois anéis proteicos posicionados de maneira a formar um cilindro por onde o peptídeo recém-sintetizado passa para ser dobrado. Existem dois diferentes tipos de chaperonas: (a) as do grupo 1, que são encontradas na mitocôndria e cloroplastos de eucariotos e eubactérias, as quais apresentam 14 monômeros formando dois anéis heptaméricos, sendo que cada monômero apresenta 3 domínios: o equatorial, onde se encontra o sítio de ligação ao ATP apical, que possui resíduos responsáveis pela interação com o peptídeo a ser dobrado, e o domínio intermediário que conecta os dois anteriores e (b) as do grupo 2, que são encontradas em archeobactérias e no citoplasma de células eucariotas estas formam anéis octaméricos ou nonaméricos e podem ser compostas de 1 a 3 diferentes proteínas (105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115).

As prefoldinas são codificadas pelo gene *Pfdn1* e pertencentes ao grupo 2. São proteínas ligadas ao citoesqueleto de actina, as quais exercem um importante papel em seu próprio processo de dobramento, bem como no de outros peptídeos recém-sintetizados, uma vez que fornece substratos para chaperonas localizadas no citoplasma da célula, facilitando o processo de dobramento das proteínas pelo aumento do ATP disponível para hidrólise. O complexo das prefoldinas é um hexamero no formato de uma água-viva, rodeado por 6 longos tentáculos formados por hastes espirais que partem de cada aresta do hexamero. As prefoldinas de eucariotos apresentam duas subunidades α (PFDN3 e PFDN5) e quatro subunidades β (PFDN1, PFDN2, PFDN4 e PFDN6). Muitas das subunidades de prefoldinas foram identificadas como fatores de transcrição ou mesmo como componentes de complexos com outras proteínas não-chaperonas (116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123).

A PFDN1 (PFDN subunidade 1) é uma proteína de 122 aminoácidos que se liga especificamente com proteínas alvo no citosol entregando-as ao CCT (*Chaperonin-containing t-complex polypeptide 1*), o qual é responsável, pela estabilização das interações intra e intermoleculares que resultam na estrutura terciária das proteínas. Estudos mostram que camundongos *knockout* para PFDN1 apresentam disfunções de proteínas do citoesqueleto que resultam em

prejuízos de crescimento neuronal, defeitos neuromusculares e desenvolvimento incompleto de linfócitos (124). Uma vez que o gene *Pfdn1* apareceu na lista de genes diferencialmente expressos que foram estimulados (*upregulated*) pelo tratamento com T3 ($\text{LogFoldChange} = 0.748866721$; $p = 9.20\text{E-}05$), prosseguimos então com o processo de validação dos efeitos do HT na expressão gênica e proteica do PFDN1.

Assim, observamos que as células PCCI3 mantidas em meio hipo e então tratadas com T3 (10^{-7}M , ip, 24h) apresentaram aumento do conteúdo de mRNA da *Pfdn1* validando o que foi observado no RNAseq. Esses dados estão apresentados na figura 26A. Vimos também que, o excesso de T3 (10^{-7}M), mesmo em tempos curtos (1h), já é capaz de elevar a expressão de *Pfdn1* (figura 26B). Também com doses menores de T3 (10^{-9}M) se observa um aumento na expressão de *Pfdn1* quando comparados ao grupo hipo, após 24h (figura 26C).

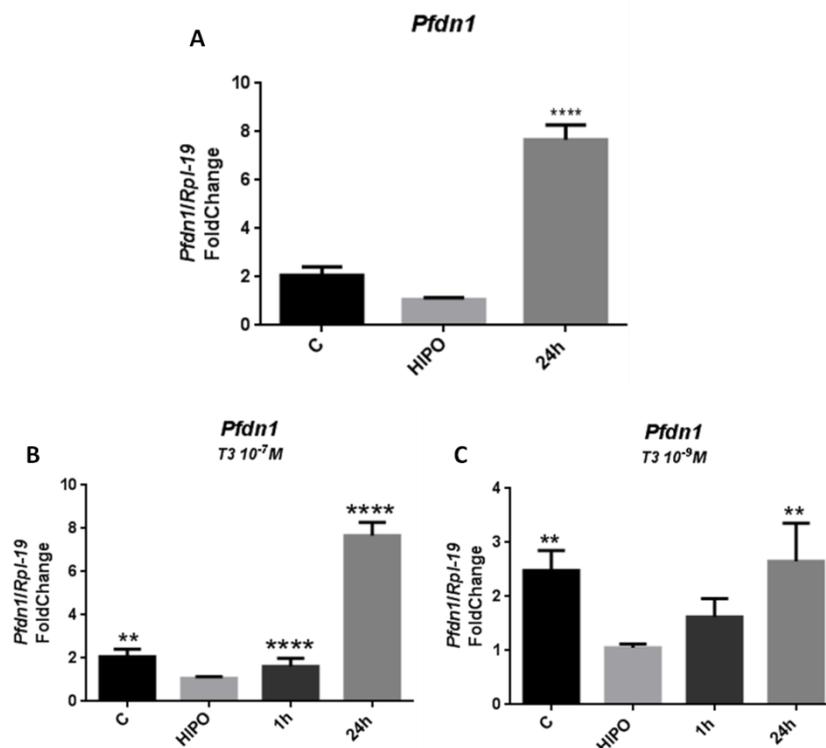


Figura 26 - Validação *Pfdn1* por RT-qPCR: Análise da expressão do gene *Pfdn1* em células PCCI3 mantidas em meio Hipo e então, submetidas ao tratamento com T3 na concentração 10^{-7}M por 24h. (B) mostra o mesmo estudo com adição de um grupo com 1h de tratamento com T3 (10^{-7}M , por 24h); (C) Expressão de *Pfdn1* em células PCCI3 tratadas com T3 10^{-9}M por 1h e 24h. Os valores representam a média \pm EPM da expressão do gene *Pfdn1*, normalizada por *Rpl-19*, expressos em relação à média dos valores do grupo Hipo. (*) indica diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Hipo; (**) indica diferença estatística ($p < 0,001$) em relação ao grupo hipo (***) indica diferença estatística ($p < 0,0001$) em relação ao grupo hipo (ANOVA one-way, seguido de pós-teste de Tukey's) $n = 20$.

Avaliamos, a seguir, o conteúdo proteico de PFDN1 em células PCCI3 mantidas em meio Hipo e então tratadas com 10^{-7} M de T3 por 24, 48 e 72h. Após 24h de tratamento não se observa um aumento no conteúdo proteico de PFDN1, como observado nos dados de mRNA apresentados na figura 29. Em tempos maiores de exposição ao T3 (48 e 72h) ocorreu ainda uma diminuição estatisticamente significativa na expressão de PFDN1, dado que também não segue o padrão da expressão do gene (figura 27).

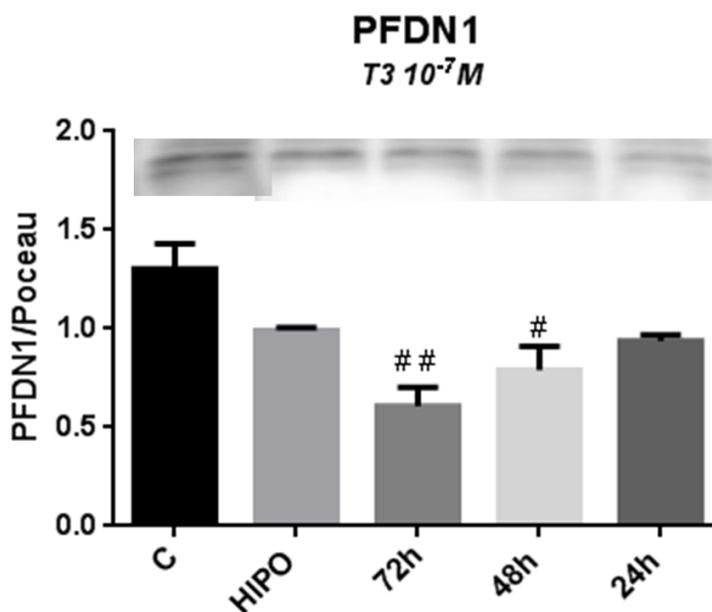


Figura 27 - Expressão da proteína PFDN1 por western blot: Conteúdo de PFDN1 em células PCCI3 mantidas em meio Hipo e, então, submetidas a tratamento com T3 na concentração 10^{-7} M por 24, 48 e 72h. Os valores são apresentados como média \pm EPM do conteúdo total de PFDN1 normalizados por Ponceau (anexo 6). (#) indica diferença estatística em relação ao grupo controle por ANOVA one-way, seguido de pós-teste de Tukey's para $p < 0,05$ ($n=15$).

Em seguida, avaliamos a expressão do mesmo gene no modelo *in vivo*, no qual ratos foram induzidos à condição de hipotireoidismo (PTU:10 e 20 μ g/100g PC, ip) e hipertireoidismo (T3:1,5 e 3,0 μ g/100g PC, ip). (Material e Métodos item 2.9- procedimento 1). Não observamos quaisquer alterações de expressão gênica de *Pfdn1* nas condições experimentais estudadas (Figura 28).

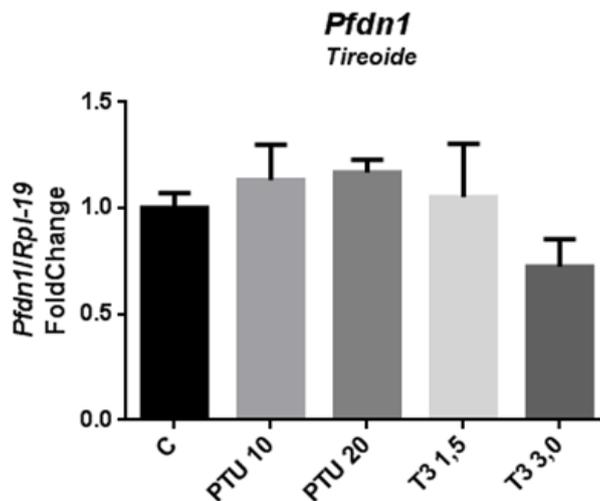


Figura 28 - Análise da expressão do *Pfdn1* (estudo in vivo): Ratos Wistar foram induzidos ao hipotireoidismo com 10 e 20 μ g/100g PC de PTU, ip, por 30 dias e ao hipertireoidismo com T3 – 1,5 e 3,0 μ g/100g de PC ip, por 28 dias. Os valores representam a média \pm EPM da expressão de *Pfdn1* normalizados pelo gene *Rpl-19*.

5.3.5 Gene *Fam103a1*

Um dos importantes mecanismos que permitem a regulação da expressão gênica em eucariotos é a geração de um mRNA maduro e efetivamente pronto para ser traduzido. Após a transcrição gênica, o RNA gerado passa por uma série de processamentos pós-transcricionais como *splicing*, adição de cauda Poli-A e outros, que permitem que o processo de tradução ocorra de maneira eficiente.

Nesse sentido, os mRNAs dos eucariotos são dotados, na sua porção 5', de uma estrutura de extrema importância no processo de tradução, que é a 7-metil-guanosina (CAP). O ancoramento das subunidades ribossomais e a ligação dos fatores de tradução ocorrem inicialmente pelo reconhecimento dessa estrutura. A 7-metil-guanosina é adicionada ao primeiro nucleotídeo transcrito, numa reação que ocorre em três etapas: inicialmente, uma molécula de trifosfato é adicionada em um grupo hidroxila na porção 5' do primeiro nucleotídeo transcrito do RNA pela enzima 5'-trifosfatase, posteriormente a enzima guanililtransferase catalisa a adição de GMP ao grupamento trifosfato adicionado anteriormente, por fim a RNMT (guanina-7-metiltransferase) catalisa a metilação da guanosina do GMP na posição N-7 produzindo por fim, a 7-metil-guanosina CAP (125, 126, 127, 128, 129).

Com o avanço dos estudos, viu-se que a adição de CAP influencia uma série de etapas da expressão gênica. O alongamento e conclusão do processo

de transcrição são auxiliados pelo CAP uma vez que é inserido no início do processo de transcrição. Estudos mostram que RNAs mensageiros sem CAP não sofrem processo de *splicing* e tampouco são traduzidos. O início da tradução depende da ligação do complexo eIF4F (*eukaryotic initiation factor 4F*) na 7-metil-guanosina CAP, portanto a inexistência de CAP na porção 5' do RNA mensageiro compromete todo o processo de tradução (130, 131, 132, 133, 134, 135). Ainda, o CAP protege o mRNA contra a ação de exoribonucleases, conferindo maior estabilidade ao transcrito.

Em 2011, Gonatopoulos-Pournatzis e colaboradores identificaram por espectrometria de massa uma proteína imprescindível para adição de CAP ao RNA nascente, mas que também participa da manutenção dos níveis de RNA, do processo de tradução e viabilidade celular, a *Fam103a1* ou também chamada de RAM (RNMT-Activating Mini-protein). Essa proteína forma um complexo juntamente com a enzima RNMT que, como mencionado anteriormente, é responsável por metilar a guanosina na última etapa de reações responsáveis pela inserção do CAP. Estudos mostraram ainda que sem a interação entre RAM e RNMT, não ocorre eficiente ativação da enzima e nem o processo de metilação (136).

Os dados obtidos em sequenciamento de nova geração das células tratadas com 10^{-7} M de T3 por 24h indicaram uma regulação positiva do gene *Fam103a1* ($\text{LogFoldChange} = 0.962738393$; $p = 1.26\text{E}-05$) por este hormônio. Os ensaios de PCR tempo real validaram os dados do RNAseq (figura 29A). Quando se avaliou tempos menores de tratamento, bem como concentrações menores (10^{-9} M), não se observou nenhuma alteração na expressão de *Fam103a1* (figura 29 B e C).

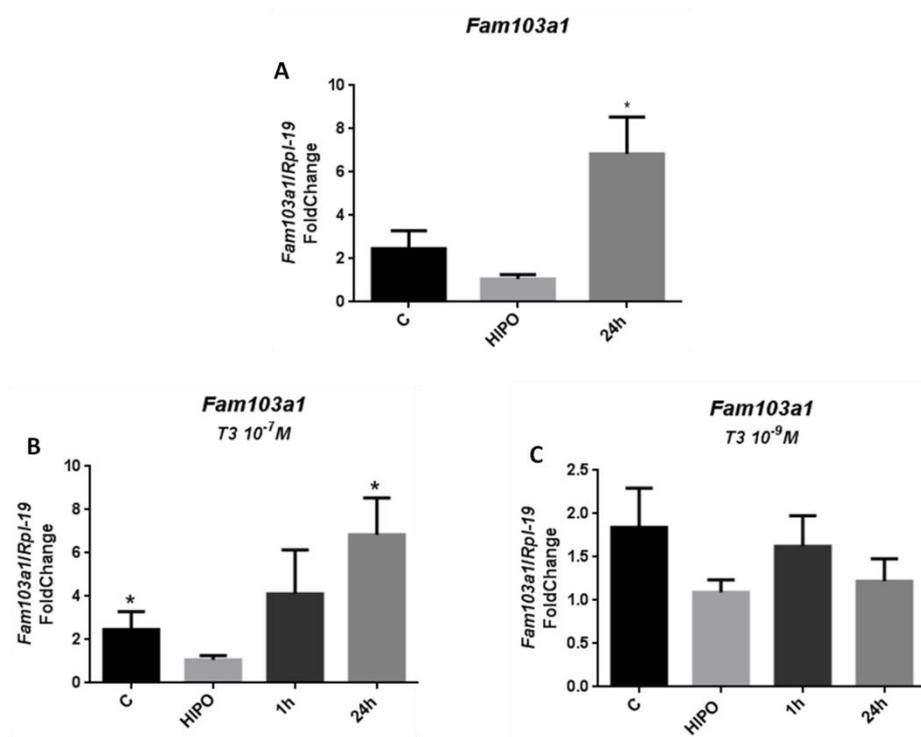


Figura 29 - Validação *Fam103a1* por RT-qPCR: Análise da expressão do gene *Fam103a1* em células PCC13 mantidas em meio Hipo e então, submetidas ao tratamento com T3 na concentração 10^{-7} M por 24h. (B) mostra o mesmo estudo com adição de um grupo com 1h de tratamento com T3 (10^{-7} M, por 24h); (C) Expressão de *Fm103a1* em células PCC13 tratadas com T3 10^{-9} M por 1h e 24h. Os valores representam a média \pm EPM da expressão do gene *Fam103a1*, normalizada por *Rpl-19*, expressos em relação à média dos valores do grupo Hipo. (*) indica diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo Hipo (ANOVA one-way, seguido de pós-teste de Tukey's) $n=20$.

6 DISCUSSÃO

Nossos dados gerados pelo RNAseq revelam de maneira clara a existência de uma ação autócrina exercida pelo T3 sobre o controle da expressão de uma série de genes envolvidos em diversos processos fisiológicos como metabolismo mitocondrial, transporte de hormônios tireoidianos, processamento de transcritos (ação pós-transcricional) e proteínas (ação pós-traducional), entre outros. Dentre esse grupo de genes elencados na lista de genes diferencialmente expressos, selecionamos 5 para validação: *Slc16a2*, *Snrpd1*, *9-March*, *Pfdn1* e *Fam103a1*. Enquanto o primeiro gene codifica o MCT 8, que permite o fluxo de HT através da membrana plasmática, os outros 4 genes estão relacionados ao controle pós-transcricional e pós-traducional da expressão gênica. A evidência que os hormônios tireoidianos (T3) participam do controle da expressão destes últimos 4 genes na glândula tireoide, levanta ainda questões acerca da possibilidade de que essa regulação também seja exercida em outros tecidos, uma vez que alterações pós-transcricionais e pós-traducionais ocorrem durante o processo de expressão de todos os genes, em quase todos os tecidos.

A primeira grande evidência da existência dessa ação autócrina do T3 pode ser observada na regulação da expressão de seu transportador, o MCT 8. A literatura apresenta uma série de trabalhos que objetivam estudar a regulação do transportador de hormônios tireoidianos nos mais diversos tecidos e os impactos dessa regulação na homeostase dos organismos, já que a maioria das ações dos hormônios tireoidianos depende de seu influxo na célula alvo. Contudo, pela primeira vez, mostramos, a nível molecular, que o hormônio tireoidiano (T3) é capaz de regular negativamente a expressão de seu transportador na própria glândula tireoide, tanto no modelo *in vitro* (células PCCl3) quanto no modelo *in vivo* (ratos wistar). Pode-se hipotetizar que um primeiro controle da taxa de secreção de T3 e T4 seja exercido na própria tireoide pelos HT, de modo a reduzir o efluxo de HT quando sua produção está incrementada e aumentá-lo quando o oposto ocorre. Assim, é possível que a importante ação do TSH sobre a hidrólise da tireoglobulina e consequente liberação de HT para o citosol tenha uma contribuição importante do próprio hormônio tireoidiano exercendo um ajuste fino sobre a secreção tireoidiana.

Estudos com o objetivo de avaliar a expressão de MCT 8 evidenciam que esses transportadores são expressos em quase todos os tecidos nos quais a ação dos hormônios tireoidianos já havia sido previamente mostrada. Adicionalmente, foi demonstrado que o MCT 8 é altamente expresso na glândula tireoide de camundongos, humanos e ratos e que nesse tecido, sua função está relacionada com a secreção de hormônios tireoidianos da glândula (137, 138). Foi observado ainda que na glândula tireoide de camundongos *Knockout* para MCT 8, são detectadas altas concentrações de T4 e T3 quando comparadas com os animais selvagens, indicando que a ausência do transportador nessas células acarreta prejuízos na liberação de hormônio para a circulação (137, 139, 140).

Alguns estudos tem se dedicado a entender quais componentes da própria glândula tireoide poderiam modular a expressão de MCT8, sendo o conteúdo intracelular de iodo um dos alvos desses estudos. Nesse sentido um importante trabalho mostrou que camundongos expostos a uma dieta com baixas concentrações de iodo (20-40 µg/kg) de maneira crônica (3-6 meses) apresentam aumento compensatório na expressão de MCT8 (mRNA e proteína). Tais estudos apontaram o iodo como um possível regulador da expressão do MCT8. Contudo, esses animais apresentam ainda baixos níveis de T4 e T3 circulantes e elevação de TSH, consistentes com um quadro clássico de hipotireoidismo, o que, pelos resultados que obtivemos no presente trabalho, levanta a possibilidade de que esse aumento na expressão do transportador possa se dever a queda do conteúdo intracelular de HT e não propriamente da redução do conteúdo intratireoidiano de iodo, já que com a diminuição do aporte de iodo para a tireoide, a produção de hormônios tireoidianos (T3 e T4) ficaria prejudicada e, por conseguinte, o aumento na expressão do transportador representaria um mecanismo fisiológico para manter uma eficiente liberação de HT para os tecidos (141).

Por outro lado, sabe-se que o excesso de T3 ativa a desidase do tipo 1, condição que propicia aumento intracelular de iodo livre, o que, segundo os estudos que acabaram de ser descritos, poderia reduzir a expressão de MCT 8. Nos nossos estudos, quando as células PCCI3 foram incubadas com T3, houve redução do conteúdo de MCT 8, e essa redução poderia ser atribuída ao excesso de iodo livre gerado da desidase. Contudo, quando incubamos as

células previamente com PTU, droga que também inibe a atividade da D1 na tireoide, condição que provoca redução do teor de iodo livre intracelular, e adicionamos T3, este hormônio foi capaz de reduzir a expressão gênica e proteica de MCT8. Esse dado fortalece nossa hipótese de um papel central do HT e não do iodo na regulação da expressão gênica e proteica de MCT 8.

A literatura tem reportado ainda, uma série de estudos em que se observa que altas concentrações de T3 geram uma resposta inibitória sobre um tecido, quando comparado com doses mais baixas ou mesmo fisiológicas, o que poderia ser justificado por uma regulação negativa da expressão do MCT 8 pelo próprio HT, caso esse efeito que demonstramos na tireoide possa ser também observado em outros tecidos. Nesse sentido, um estudo conduzido em linhagem de células eritropoiéticas (*Human erythroleukemia K562*), em que se avaliou o efeito de diferentes concentrações de T3 (0,1 – 100 nM) no processo de eritropoiese, demonstrou que concentrações mais baixas de T3 (0,1-10 nM) levaram a um aumento do conteúdo de hemoglobina, da expressão de CD71 e de α -globina, parâmetros que indicam um aumento da eritropoiese. Por outro lado, concentrações mais altas de T3 (100 nM) aboliram as respostas observadas com doses menores, sugerindo que altas concentrações de T3 sejam capazes de atenuar o efeito estimulatório clássico do processo de eritropoiese exercido por concentrações mais baixas (142).

Um estudo do nosso grupo avaliou se o tratamento com hormônio tireoidiano (T3) poderia melhorar a glicemia e a sensibilidade à insulina em ratos diabéticos, os quais apresentaram hipofunção tireoidiana bem como um aumento de citocinas inflamatórias. Contudo, após o tratamento com T3, foi observado uma melhora significativa da homeostase glicêmica associado com aumento de sensibilidade a insulina além de uma diminuição do estado inflamatório anteriormente instalado nos animais diabéticos. A dose de T3 ofertada aos animais é considerada supra-fisiológica e poderia acarretar em prejuízos na função cardíaca dos animais, já que esse órgão é um importante alvo do T3. Contudo, ao se avaliar diversos parâmetros cardíacos (batimento cardíaco, pressão sanguínea, contratilidade,...), não foi possível observar alteração significativa na função cardíaca desses animais (143). É possível que a ausência de prejuízo na função cardíaca possa se dever a uma diminuição da expressão de MCT8 nesse tecido, frente ao tratamento com T3

suprafisiológico, de maneira semelhante ao observado no tecido tireoidiano, limitando assim a entrada de T3 nesse tecido, o que novamente representaria um mecanismo de proteção contra altas concentrações séricas de T3, o que deverá ser investigado.

Uma das grandes preocupações quanto à utilização do T3 como uma ferramenta terapêutica no tratamento de distúrbios metabólicos/endócrinos, como obesidade e diabetes, se baseia em potenciais prejuízos aos quais os organismos estariam susceptíveis quando tratados com T3. Contudo, se os demais tecidos, ou ao menos os principais órgãos alvo do T3 exibirem esse mecanismo que demonstramos na tireoide, eles estariam, até certo ponto, mais protegidos contra altas doses de T3, já que apresentariam redução na expressão do seu transportador, o MCT8, o que limitaria a entrada do hormônio nos tecidos, evitando assim prejuízos.

Nossos dados ilustram um cenário semelhante e coerente com os dados mostrados nos trabalhos acima citados. Na condição de hipotireoidismo, um aumento na expressão de mRNA e proteína do transportador MCT8 poderia permitir maior liberação de T3 e T4 da glândula, o que poderia, pelo menos por certo espaço de tempo, garantir que suas concentrações séricas se mantenham dentro dos limites homeostáticos. Já quando as células estão submetidas a um meio com altas concentrações de hormônio tireoidiano, observa-se uma redução da expressão de MCT8, e, portanto da sua secreção para a corrente sanguínea. A ausência de variação na expressão do transportador frente a concentrações consideradas fisiológicas (10^{-9} M) de T3, novamente é coerente com um quadro de funcionamento homeostático da glândula.

Em resumo, muitos trabalhos evidenciam ações exercidas pelos hormônios tireoidianos em sua dose fisiológica, contudo, quando o hormônio é ofertado em doses supra-fisiológicas, as respostas anteriormente observadas em doses mais baixas são abolidas ou atenuadas. Os mecanismos moleculares por detrás desse evento ainda permanecem desconhecidos, contudo, baseados nos nossos dados de expressão do MCT 8 na tireoide apresentados neste trabalho não se descarta a possibilidade de que esse padrão de inibição ou atenuação de respostas observado em altas concentrações de T3 ocorra devido à regulação negativa que o hormônio

exerce na expressão do seu transportador a um menor transporte de T3 para o interior da célula-alvo e, em decorrência disso, uma interrupção da resposta observada anteriormente. Contudo, outros tecidos alvo do HT devem ser investigados para que essa possibilidade seja ou não comprovada.

Outro gene apresentado na lista de genes diferencialmente expressos e validado pelos ensaios de PCR em tempo real foi o *Snrpd1*. Esse gene codifica uma ribonucleoproteína responsável pela montagem do spliceossomo, um complexo de proteínas que guiam os eventos de *splicing* do pré-mRNA. Nossos dados mostraram que o hormônio tireoidiano (T3), em doses supra-fisiológicas, estimula a expressão tanto do mRNA quanto da proteína SNRPD1, em ambos os modelos (*in vitro* e *in vivo*).

O processo de *splicing* é um evento intracelular complexo que ocorre como resultado de uma série de reações nas quais, a ocorrência de um próximo evento, depende obrigatoriamente da ocorrência de um evento anterior. Esse conjunto de reações que culminarão na entrega de um mRNA maduro e pronto pra ser traduzido no citoplasma é coordenado por um conjunto de ribonucleoproteínas que se organizam em complexos formando o chamado spliceossomo (144, 145, 146, 147, 148).

As ribonucleoproteínas U1, U2, U4/U6 e U5 são os principais complexos responsáveis pela remoção dos íntrons no pré-mRNA. Cada complexo é formado por um pequeno RNA nuclear (ou 2 no caso do U4/U6) e um número variável de proteínas, as quais são constantemente adicionadas e removidas do complexo ao longo do curso das reações de *splicing*. A porção proteica dos complexos do spliceossomo é formada pelas proteínas Sm, genericamente identificadas como A, B/B', D1, D2, D3, E, F, and G. A montagem do spliceossomo começa com a interação entre o snRNA (small nuclear RNA) componente do complexo U1 com a porção 5' do sítio de *splicing* (5'SS) do íntron no pré-mRNA. Essa interação entre duas moléculas de RNA é quimicamente pouco estável e fraca sendo necessário portanto, a participação de proteínas para manter a ligação estável até que a reação catalítica ocorra, quando então se dissociam do complexo. Ao longo do transcorrer do processamento do mRNA, diferentes partículas de snRNA, bem como diferentes conjuntos de proteínas Sm interagem entre si e com a molécula de

pré-mRNA em processamento, formando os diferentes complexos (149, 150, 151, 152, 153, 154).

Alguns trabalhos recentes tem tentado elucidar, de maneira mais clara, a interação RNA-proteína na formação das ribonucleoproteínas. A purificação das snRNP (*Small Nuclear Ribonucleoproteins*) por HPLC em coluna de fase reversa detectou duas proteínas com peso molecular muito semelhante às da proteína D. Eletroforese em gel de poliacrilamida permitiu a separação de três proteínas Sm distintas: D1, D2 e D3. Estudos posteriores a essa identificação e caracterização química mostraram que os quatro principais complexos de ribonucleoproteínas que participam do spliceossomo (U1, U2, U4/U6 e U5) apresentam no conjunto de proteínas que os formam, a proteína D1. Por tanto, em todas as fases do processo de *splicing* é imprescindível a presença da proteína D1, para que os complexos de ribonucleoproteínas sejam montados de forma eficiente e por consequência resultem em um correto processamento do pré-mRNA (155, 156).

Trabalhos de Sun e colaboradores revelaram uma multifamília de genes *Snrpd1* composta por pelo menos três membros: SNRPD1P1, SNRPD1P2 e SNRPD1. Os dois primeiros membros não possuem íntrons e apresentam mutações na região codificante do gene, sugerindo que possam, eventualmente, ser pseudogenes (157). A análise de sequenciamento do membro SNRPD1P2 mostra ausência dos primeiros 30 códons da sequência codificante e uma deleção de base que acarreta alterações em sua leitura. A localização da região 5'-terminal está posicionada entre o segundo íntron e o terceiro éxon no SNRPD1. Já o SNRPD1P1 é capaz de codificar um polipeptídeo com o mesmo tamanho de cDNA do SNRPD1. Este é um importante indicativo de que esta isoforma possa ser o gene funcional.

Na última década, tem-se intensificado a diversidade de trabalhos devotados ao estudo dos mecanismos envolvidos na montagem do spliceossomo e nas implicações decorrentes de uma ineficiência nesse processo, para os tecidos e para o organismo. Um desses estudos avaliou a expressão de proteínas SNRPA1, SNRPD1 e PNN em células-tronco embrionárias e células-tronco induzidas (iPS) e evidenciou um aumento significativo na expressão dessas proteínas, quando comparados com células não-pluripotentes. Este estudo mostrou ainda que o aumento na expressão

dessas proteínas ocorre nos primeiros estágios de reprogramação das células pluripotentes e ainda que a presença dessas proteínas estaria associada com uma alta atividade transcricional nessas células. A redução na expressão dessas proteínas (*Knockdown*) levou a uma consequente perda da capacidade de pluripotência dessas células (158).

Os resultados que obtivemos em nosso modelo mostrou que o excesso de T3 aumenta consideravelmente a expressão de *Snrpd1*. Uma das ações mais clássicas dos hormônios tireoidianos é o aumento da taxa metabólica basal, estimulando a síntese e catabolismo de proteínas, carboidratos e lipídios (ciclos fúteis) bem como na regulação de processos de termogênese e consumo metabólico. Se adotarmos uma visão a nível molecular, um aumento da taxa metabólica basal é acompanhada por um aumento nas taxas de transcrição e tradução para o processo de síntese de novas proteínas e enzimas envolvidas no metabolismo energético. Para que a síntese dessas proteínas aconteça de maneira eficiente faz-se necessário um correto processamento de *splicing* do pré-mRNA. A observação de uma alta expressão de *Snrpd1* tanto nas células PCCI3, quanto nos animais submetidos ao tratamento com excesso de T3, sugerem fortemente um aumento da atividade transcricional, como proposto no modelo das células-tronco. Esse dado poderia contribuir para garantir (à nível molecular) a eficiência dos mecanismos pelos quais os hormônios tireoidianos aumentam a taxa metabólica, bem como de suas ações gerais, que sempre envolvem síntese de proteínas.

O estudo das ribonucleoproteínas pertencentes ao núcleo do spliceossomo também tem sugerido uma forte relação entre sua expressão e algumas disfunções de proliferação. Análises da expressão dessas proteínas em amostras de câncer de pulmão, ovário e mama revelaram uma superexpressão de componentes do spliceossomo nessas linhagens malignas e ainda que essa superexpressão estaria mais relacionada com variantes mais agressivas de manifestação dessas neoplasias. A depleção das proteínas SNRPDE e SNRPD1 através da utilização de RNAs de interferência reduziu a viabilidade celular levando as células a entrarem em processo de morte celular por autofagia. Esses achados levantaram questões a respeito de se utilizar as proteínas do núcleo do spliceossomo, como potenciais alvos terapêuticos na área de oncologia (159).

As estratégias para driblar os processos de morte celular, bem como a intensa atividade de proliferação a qual as células neoplásicas estão sujeitas, evidenciam uma alta taxa metabólica. Esse cenário sugere, novamente, uma intensa atividade transcricional, coerente com um aumento na expressão de SNRPD1, e com os dados que apresentamos neste trabalho. Uma questão interessante a se pontuar seria a de que essas ações autócrinas estimulantes do T3 sobre o SNRPD1 possam ser deletérias no câncer de tireoide, agravando esse quadro antes do diagnóstico. Essa hipótese não é desprezível, uma vez que alguns estudos em células de câncer de mama, o T3 estimula ainda mais o crescimento das mesmas, dado indicativo de que pode piorar o quadro de câncer, o que nos remete a pensar na possibilidade de que reduzir a função tireoidiana numa condição similar possa ser estratégico, ao menos por um período curto de tempo.

Dando continuidade à análise da lista de genes diferencialmente expressos viu-se que o T3 regula negativamente a expressão do gene *9-March*, o qual é responsável pela ubiquitinação de proteínas especificamente localizadas na membrana plasmática e que serão posteriormente destinadas à degradação em complexos proteassomais. Nossos dados ilustram uma diminuição significativa na expressão de *9-March* após 24h de tratamento com T3, no modelo *in vitro*, porém quando avaliamos o conteúdo proteico de 9-MARCH vimos que existe um aumento da mesma quando as células são tratadas por 48 e 72 h. De forma semelhante aos estudos *in vitro*, os animais tratados com T3 também apresentaram diminuição na expressão do mRNA de *9-March*. O conjunto desses dados (redução na expressão do mRNA e aumento da proteína) sugere a possibilidade de que mecanismos pós-transcricionais estejam sendo acionados.

Estudos recentes tem tentado elucidar potenciais alvos de ubiquitinação de polipeptídeos pela 9-MARCH através de espectrometria de massa. Foram identificados cerca de 13 novos alvos, dentre eles: receptores tirosina/fosfatase (PTPRJ/CD148), receptor Fc gamma IIB (CD32B), HLA-DQ, molécula ativadora de sinalização de linfócitos (CD150) e receptor de polio virus (CD155), muitos desses envolvidos na ativação de componentes do sistema imune. Contudo, ainda muito pouco se sabe a respeito de como, e se essa proteína participa da

regulação de outros processos fisiológicos em diferentes tecidos, em especial na glândula tireoide (160).

O papel funcional exercido pela proteína 9-MARCH, classicamente descrito, é de proporcionar um mecanismo de poliubiquitinação de proteínas expressas na membrana plasmática. Ao realizarmos um ensaio de funcional de poliubiquitinação nas células PCCI3 tratadas com T3, observamos um perfil de expressão muito semelhante ao observado na expressão da proteína 9-MARCH, ou seja, um aumento progressivo dela até 72h de tratamento, o que sugere que, um tratamento crônico com excesso de T3 poderia aumentar o processo de poli-ubiquitinação. Contudo, animais submetidos so tratamento crônico com excesso de T3 apresentaram uma redução na expressão de *9-March*, quando comparados com grupo controle, indicando, novamente, uma redução de processos de poliubiquitinação.

Os dados apresentados mostrando redução na expressão de *9-March* poderiam sugerir que o T3 esteja reduzindo a expressão da proteína 9-MARCH, o que não foi observado nos estudos à nível molecular e tampouco funcionais, o que nos dá suporte à hipótese levantada anteriormente de que a redução do mRNA com concomitante aumento da proteína indique, de fato, que a tradução do transcrito esteja sendo estimulada, por mecanismos pós-transcricionais. É possível que, embora em menor conteúdo, o mRNA da *9-March* possa apresentar aumento da sua cauda poli(A), que, como é sabido, aumenta a estabilidade do transcrito e o seu ancoramento aos RNA ribossomais, melhorando a taxa de tradução do mesmo. Ainda há a possibilidade de que o T3 esteja promovendo aumento do endereçamento de transcritos para o polissomo, etc, o que merece ser investigado.

Existem ainda poucos dados na literatura a respeito dessa família de proteínas. Os dados apresentados neste trabalho mostram pela primeira vez, um hormônio controlando a expressão deste gene. A família das proteínas MARCH, conforme já relatado, está envolvida com o processo de ubiquitinação de alguns substratos específicos, nos quais estão incluídos os receptores tirosina kinase, receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR), receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR), receptor do fator de crescimento de hepatócitos (HGFR), dentre outros. Muitos desses alvos são ubiquitinados em múltiplos sítios acarretando em sua endocitose e posterior

condução a lisossomos para serem degradados. A ativação das vias de sinalização desses receptores está atrelada a processos de crescimento e proliferação e, portanto, o processo de ubiquitinação que marca esses receptores da membrana plasmática para degradação ou para serem reciclados representa um importante sistema de regulação de ativação dessas vias. Processos que, de alguma forma, reduzam ou eliminem por completo a expressão das proteínas responsáveis pelo *turnover* desses receptores, acabam por manter essas vias constitutivamente ativas, o que por sua vez está intimamente ligado a quadros patológicos de desequilíbrios de proliferação celular, como o câncer (161, 162, 163, 164).

Apesar de não sabermos ao certo qual o papel exercido pela 9-MARCH na tireoide, pode-se inferir que, se esta proteína está relacionada com redução da expressão de receptores de histocompatibilidade (MHC-I) e outros componentes do sistema imune em outros organismos, e o hormônio tireoidiano cronicamente, aumenta a expressão de 9-MARCH, isso sugeriria um mecanismo de aumento na degradação desses componentes envolvidos com a reposta imune.

Outro gene regulado pelo T3 foi o gene *Fam103a1*, responsável pela adição da partícula CAP ao RNA nascente. Nossos dados mostram um aumento na expressão do RNA mensageiro do gene *Fam103a1* no grupo tratado com alta concentração de T3, sugerindo que o hormônio tireoidiano possa participar na regulação deste processo, que é essencial para a estabilidade e tradução de transcritos.

No momento ainda não foi possível avaliar o conteúdo proteico de FAM103A1 por conta de termos utilizado o conteúdo proteico total para os ensaios de Western blot. Por se tratar de uma proteína de ação nuclear, seria necessário enriquecer as amostras com proteínas nucleares e então avaliar sua expressão.

Contudo, não é de se surpreender que o hormônio tireoidiano esteja relacionado com o controle do processo de adição do grupo CAP no RNA nascente. Como mencionado anteriormente, uma das ações clássicas deste hormônio é aumentar a taxa metabólica basal, o turnover proteico, processos que envolvem aumento da transcrição de diferentes genes. Assim, o aumento da taxa metabólica pode ser explicado por um aumento de reações catabólicas

e anabólicas, com aumento de síntese de proteínas, que por sua vez dependem de um RNA devidamente maduro e pronto para tradução. Por tanto, para que esse aumento de taxa de síntese de proteínas ocorra é necessário que o RNA seja devidamente metilado em sua porção 5'.

Mais estudos se fazem necessários no sentido de se elucidar, de maneira clara, qual o papel exercido pelo T3 na regulação da expressão desse gene, bem como do papel funcional exercido por sua proteína, na tireoide. Contudo, considerando que esse processo de introdução do CAP no mRNA é essencial para a síntese de qualquer proteína, esse dado aponta para um papel central do T3 para a própria manutenção da massa e função tireoidiana, papel que deve ser realizado em conjunto com o TSH.

7 CONCLUSÃO

Através de uma abordagem de avaliação de expressão gênica em larga escala (sequenciamento de nova geração), o presente trabalho ilustra, pela primeira vez, a nível molecular, a existência de uma ação autócrina exercida pelo T3 regulando a expressão de uma série de genes envolvidos em diversos eventos fisiológicos da glândula. Dentre os genes selecionados para a validação do experimento de transcriptoma verificou-se que muitos dos genes regulados pelo T3 estão envolvidos em eventos pós-transcricionais e pós-traducionais, o que indica uma crucial participação do T3 no controle da sua massa, vascularização e função, em paralelo aos efeitos do próprio TSH. Apesar de muitas das validações feitas neste trabalho, terem focado apenas no estudo de expressão na própria tireoide, os referidos genes apresentam expressão ubíqua dentre os diversos tecidos, o que levanta discussões a respeito de uma possível influência do T3 regulando a ocorrência desses eventos pós-transcricionais e pós-traducionais não somente na tireoide, mas também, e outros tecidos, o que deve ser motivo de futuras investigações.

REFERENCIAS*

- 1- Recordati, G.; Bellini TG. A definition of internal constancy and homeostasis in the context of non-equilibrium thermodynamics. **Exp Physiol.**,v.89, p.27-38, 2004.
- 2- Chen, L.; Xu, B.; Liu, L.; Luo, Y.; Zhou, H.; Chen, W.; Shen, T.; Han, X.; Kontos, C.D.; Huang, S. Cadmium induction of reactive oxygen species activates the mTOR pathway, leading to neuronal cell death. **Free Radic Biol Med.**, v.50, p.624-632, 2011.
- 3- Dumont, J.E.; Lamy, F.; Roger, P.; Maenhaut, C. Physiological and pathological regulation of thyroid cell proliferation and differentiation by thyrotropin and other factors. **Physiol Rev.**, v.72, p.667-97, 1992.
- 4-Vassart, G.; Dumont, J.E. The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth. **Endocr Rev.**, v.13, p.596 – 611,1992.
- 5-Laugwitz, K.L.; Allgeier, A.; Offermanns, S.; Spicher, K.; Van Sande, J.; Dumont, J.E.; Schultz, G. The human thyrotropin receptor: a heptahelical receptor capable of stimulating members of all four G protein families. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v.93, p.116-20, 1996.
- 6- Latif, R.; Morshed, S. A.; Zaidi, M.; Davies, T. F.TheThyroid-Stimulating Hormone Receptor: Impact of Thyroid-Stimulating Hormone and Thyroid-Stimulating Hormone Receptor Antibodies on Multimerization, Cleavage and Signaling. **Endocrinol Metab Clin N Am.**, v.38, p.319–341, 2009.
- 7- Zimmermann, M.B.; Jooste, P.L.; Pandav, C.S.Iodine-deficiency disorders. **Lancet.**, v.372, p.1251–1262, 2008.
- 8- Nicola, J.P.; Basquin, C.; Portulano, C.; Reyna-Neyra, A.; Paroder, M.; Carrasco, N. The Na⁺/I⁻ symporter mediates active iodide uptake in the intestine. **Am J Physiol Cell Physiol.**, v.296, p.654–662, 2009.
- 9- Dai, G.; Levy, O.; Carrasco, N. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. **Nature.**, v.379, p.458–460, 1996.
- 10- Bizhanova, A.; Kopp, P. The sodium-iodide symporter NIS and pendrin in iodide homeostasis of the thyroid. **Endocrino.** v.150, p.1084–1090, 2009.
- 11- Uyttensprot, N.; Pelgrims, N.; Carrasco, N.; Gervy, C.; Maenhaut, C.; Dumont, J.E.; Miot, F.Moderate doses of iodide in vivo inhibit cell proliferation

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002, 24p.

and the expression of thyroperoxidase and Na⁺/I⁻ symporter mRNAs in dog thyroid. **Mol Cell Endocrinol.**, v.131, p.195–203, 1997.

12-Eng, P.H.; Cardona, G.R.; Fang, S.L.; Previti, M.; Alex, S.; Carrasco, N.; Chin, W.W.; Braverman, L.E. Escape from the acute Wolff-Chaikoff effect is associated with a decrease in thyroid sodium/iodide symporter messenger ribonucleic acid and protein. **Endocrinology**. v.140, p.3404- 3410, 1999.

13-Eng, P.H.; Cardona, G.R.; Previti, M.C.; Chin, W.W.; Braverman, L.E. Regulation of the sodium iodide symporter by iodide in FRTL-5 cells. **Eur J Endocrinol.**, v.144, p.139–144, 2001.

14-Wolff, J.; Chaikoff, I.L. Plasma inorganic iodide as a homeostatic regulator of thyroid function. **J Biol Chem.**, v.174, p.555–564, 1948.

15- Iosco, C.; Cosentino, C.; Sirna, L.; Romano, R.; Cursano, S.; Mongia, A.; Pompeo, G.; di Bernardo, J.; Ceccarelli, C.; Tallini, G.; Rhoden, K.J. Anoctamin 1 is apically expressed on thyroid follicular cells and contributes to ATP- and calcium-activated iodide efflux. **Cell Physiol Biochem.**, v.34, p.966-80, 2014.

16- Twyffels, L.; Strickaert, A.; Virreira, M.; Massart, C.; Van Sande, J.; Wauquier, C.; Beauwens, R.; Dumont, J.E.; Galiotta, L.J.; Boom, A.; Kruys, V. Anoctamin-1/TMEM16A is the major apical iodide channel of the thyrocyte. **Am J Physiol Cell Physiol.**, v.307, p.1102-12, 2014.

17- Calil-Silveira, J.; Serrano-Nascimento, C.; Kopp, P. A.; Nunes, M.T. Iodide excess regulates its own efflux: a possible involvement of pendrin. **Am J Physiol Cell Physiol.**, v.310, p.576–582, 2016.

18- Corvilain, B.; Collyn, L.; Van Sande, J.; Dumont, J.E. Stimulation by iodide of H₂O₂ generation in thyroid slices from several species. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** v.278, p.692–699, 2000.

19-Panneels, V.; Van den Bergen, H.; Jacoby, C.; Braekman, J.C.; Van Sande, J.; Dumont, J.E.; Boeynaems, J.M. Inhibition of H₂O₂ production by iodoaldehydes in cultured dog thyroid cells. **Mol Cell Endocrinol.**, v.102, p.167–176, 1994.

20-Pisarev, M.A.; Gartner, R. Autoregulatory action of iodine. **The thyroid.**, v. 9, p.85–90, 2000.

21-Panneels, V.; Juvenal, G.; Boeynaems, J.M.; Dumont, J.E.; Van Sande, J. Iodide effects on the thyroid. Comprehensive handbook of iodine: nutritional, endocrine, and pathological aspects. **Academic Press.**, p. 99305–99316, 2009.

22-Nunez ,J.; Pommier, J. Formation of thyroid hormones. **Vitam Horm.**, v. 39, p.175–229, 1982.

- 23-Corvilain, B.; Van Sande, J.; Laurent, E.; Dumont, J.E. The H₂O₂-generating system modulates protein iodination and the activity of the pentose phosphate pathway in dog thyroid. **Endocrinology**, v.128, p.779–785, 1991.
- 24- Vijlder, J.J.; Ris-stalpers, C.; Vulsma, T. Inborn errors of thyroid hormone biosynthesis. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v.4, p.32–37, 1997.
- 25-Kopp, P. Pendred's syndrome and genetic defects in thyroid hormone synthesis. **Rev Endocr Metabolic Disorders**, v.1, p.109–121, 2000.
- 26- Yen, P. Physiological and Molecular Basis of Thyroid Hormone Action **Physiological Reviews**, v. 81, p. 234-260, 2001.
- 27- Friesema, E.C.; Ganguly, S.; Abdalla, A. Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p.40128–40135, 2003.
- 28-Horlein, A.J.; Naar, A.M.; Heinzl, T.; Torchia, J.; Gloss, B.; Kurokawa, R.; Ryan, A.; Kamel, Y.; Soderstrom, M.; Glass, C.K.; Rosenfield, M.G. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. **Nature**, v.377, p. 397-404, 1995.
- 29-Glass, C.K.; Rosenfield, M.G. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. **Genes Dev**, v.14, p.121-41, 2000.
- 30-Privalsky, M.L. The role of corepressor in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. **Annu. Rev. Physiol**, v.66, p.315-360, 2004.
- 31- Plow, E.F.; Haas, T.A.; Zhang, L.; Loftus, J.; Smith, J.W. Ligand binding to integrins. **J Biol Chem**, v. 275, p.21785–21788, 2000.
- 32- Calderwood, D.A.; Shattil, S.J.; Ginsberg, M.H. Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. **J Biol Chem**, v. 275, p.22607–22610, 2000.
- 33- Farwell, A.P.; Tranter, M.P.; Leonard, J.L. Thyroxine-dependent regulation of integrin-laminin interactions in astrocytes. **Endocrinology**, v.136, p.3909 – 3915, 1995.
- 34- Hood, J.D.; Frausto, R.; Kiosses, W.B.; Schwartz, M.A.; Cheresh, D.A. Differential v integrin-mediated Ras-ERK signaling during two pathways of angiogenesis. **J Cell Biol**, v.162, p.933–943, 2003.
- 35- Pereira, J.J.; Meyer, T.; Docherty, S.E.; Reid, H.H.; Marshall, J.; Thompson, E.W.; Rossjohn, J.; Price, J.T. Bimolecular interaction of insulin-like growth

factor (IGF) binding protein-2 with v3 negatively modulates IGF-I-mediated migration and tumor growth. **Cancer Res.**, v.64, p.977–984, 2004.

36- Hoffman, S.J.; Vasko-Moser, J.; Miller, W.H.; Lark, M.W.; Gowen, M.; Stroup, G. Rapid inhibition of thyroxine-induced bone resorption in the rat by an orally active vitronectin receptor antagonist. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 302, p.205–211, 2002.

37-Moeller, L.C.; Broecker-Preuss, M. Transcriptional regulation by nonclassical action of thyroid hormone. **Thyroid Res.**, v.4, p.1-6, 2011.

38-Cao, X.; Moeller, L.C.; Dumitrescu, A.M.; Seo, H.; Refetoff, S. Thyroid hormone mediated changes in gene expression can be initiated by Cytosolic action of the thyroid hormone receptor beta through the Phosphatidylinositol 3-kinase pathway. **Nucl Recept Signal.** v.4, 2006.

39- Thomas, G.; Jacobs, K.B.; Kraft, P.; Yeager, M.; Wacholder, S.; Cox, D.G.; Hankinson, S.E.; Hutchinson, A.; Wang, Z.; Yu, K.; Chatterjee, N.; Garcia-Closas, M.; Gonzalez-Bosquet, J.; Prokunina-Olsson, L.; Orr, N.; Willett, W.C.; Colditz, G.A.; Ziegler, R.G.; Berg, C.D.; Buys, S.S.; McCarty, C.A.; Feigelson, H.S.; Calle, E.E.; Thun, M.J.; Diver, R.; Prentice, R.; Jackson, R.; Kooperberg, C.; Chlebowski, R.; Lissowska, J.; Peplonska, B.; Brinton, L.A.; Sigurdson, A.; Doody, M.; Bhatti, P.; Alexander, B.H.; Buring, J.; Lee, I.M.; Vatten, L.J.; Hveem, K.; Kumle, M.; Hayes, R.B.; Tucker, M.; Gerhard, D.S.; Fraumeni, J.F. Jr.; Hoover, R.N.; Chanock, S.J.; Hunter, D.J. A multistage genome-wide association study in breast cancer identifies two new risk alleles at 1p11.2 and 14q24.1 (RAD51L1). **Nat Genet.**,v.41, p.579-84, 2009.

40- Eayrs, J.T. Thyroid and developing brain: anatomical and behavioural effects. In: Hamburgh M, Barrington EJW, editors. **Hormones and development.**, p.345-55, 1971.

41- Legrand J. Variations en fonction de l'âge de la réponse du cervelet à l'action morphogénétique de la thyroïde chez le rat. **Arch Anat Microsc Morphol Exp.**, v.56, p.291-307, 1967.

42-Graves, C.; Hawkes, R. Maturation of the corpus callosum of the rat.I. Influence of thyroid hormones on the topography of callosal projections. **I Comp Neurol.** v.291, p.128-46, 1990.

43-Berbel, P.; Guadaño-Ferraz, A.; Martinez, M.; Quiles, J.A.; Balboa, R.; Innocenti, G.M. Organization of auditory callosal connections in hypothyroid adult rats. **Eur J Neurosci.**, v.5, p.1465-78, 1993.

- 44- Aniello, F.; Couchie, D.; Bridoux, A.M.; Gripois, D.; Nunez J. The splicing of juvenile and adult Tau mRNA variants is regulated by thyroid hormone. **Proc Nati Acad Sci USA.**, v.88, p.4035-4039, 1991.
- 45-Mareck, A.; Fellous, A.; Francon, J.; Nunez, J. Changes in composition and activity of microtubule-associated proteins during brain development. **Nature.**,v.284, p.353-5, 1980.
- 46-Lee, G.; Cowan, N.; Kirschner, M. The primary structure and heterogeneity of tau protein from mouse brain. **Science.**, v.239, p.285-8, 1988.
- 47-Kosik, K.S.; Orecchio, L.D.; Bakalis, S.; Neve, R.L. Developmentally regulated expression of specific tau sequences. **Neuron.**, v.2, p.1389-97, 1989.
- 48-Maxon, H.R.; Kreines, K. W.; Goldsmith, R. E.; Knowles. H. C. Long-term observations of glucose tolerance in thyrotoxic patients. **Archives of InternalMedicine.**, v.135, p.1477–1480, 1975.
- 48- O’Meara, N.M.; Blackman, J. D.; Sturis, J.; Polonsky. K. S. Alterations in the kinetics of C-peptide and insulin secretion in hyperthyroidism. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.**, v.76, p.79–84, 1993.
- 50-Dimitriadis,G.; Baker, B.; Marsh H. Effect of thyroid hormone excess on action, secretion, and metabolism of insulin in humans.**The American journal of physiology.**, v.248, p. 593–601,1985.
- 51-Levin, R.J.; Smyth, D. H. The effect of the thyroid gland on intestinal absorpion of hexoses. **The Journal of physiology.**, v.169, p.755–769, 1963.
- 52- Matty, A.J.; Seshadri, B. Effect of thyroxine on the isolated rat intestine. **Gut.**, v.6, p.200–202, 1965.
- 53- Vargas-Uricoecheaa, H.; Bonelo-Perdomob, A.; Hernán Sierra-Torresc, C. Effects of thyroid hormones on the heart. **Clin Invest Arterioscl.**, v.26, p.296-309. 2016.
- 54-Grais, I. M.; Sowers, J.R. Thyroid and the Heart. **The American Journal of Medicine.**, v.127, p. 691-698, 2014.
- 55- Cortell, R.; Rawson, R.W. The effect of thyroxin on the response of the thyroid gland to thyrotropic hormone. **Endocrinology.**, v.35, p.488-498, 1994.
- 56- Neves, C.E. Experimentos de microawways e teoria da resposta ao item. Universidade de São Paulo. 10.11606/D.45.2010.tde-24052010-140944. 2011.
- 57- Davies, K.E. The Application of DNA Recombinant Technology to the Analysis of the Human Genome and Genetic Disease. **Hum Genet.**, v.58, p.351-357,1981.

58-Kvam, V.M.; Liu, P.; Si, Y. A comparison of statistical methods for detecting differentially expressed genes from RNA-seq data. **Am J Bot.**, v.99, p.248-56, 2012.

59- Silva, D. C. G.; Carvalho, M. C. C. G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciencia Rural.**, v.40, p.735-744, 2010.

60- Marioni, J.C.; Mason, C.E.; Mane, S.M.; Stephens, M.; Gilad, Y. RNA-seq: An assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. **Genome research.**, v.18, p.1509-1517, 2008.

61-Morozova, O.; Hirst, M.; Marra, M.A. Applications of new sequencing technologies for transcriptome analysis. **Annu Rev Genomics Hum Genet.**, v.10, p.135-51, 2009.

62-Wang, Z.; Gerstein, M.; Snyder, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nat Rev Genet.**, v.10, p.57-63, 2009.

63-Auer, P.L.; Doerge, R.W. Statistical design and analysis of RNA sequencing data. **Genetics.**, v. 185, p. 405-16, 2010.

64- Carvalho, M. C. C. G.; Silva, D. C. G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciencia Rural.**, v.40, p.735-744, 2010.

65- Neves, C.E. Experimentos de microarrays e teoria da resposta ao item. Universidade de São Paulo. 10.11606/D.45.2010.tde-24052010-140944. 2011.

66- Bao, H.; Guo, H.; Wang, J.; Zhou, R.; Lu, X.; Shi, S. MapView: visualization of short reads alignment on a desktop computer. **Bioinformatics.**, v.25., p. 1554-5, 2009.

67- Oshlack, A.; Robinson, M.D.; Young, M.D. From RNA-seq reads to differential expression results. **Genome Biol.**, v.11, p.220-230, 2010.

68- Bullard, J.H., Purdom, E.; Hansen, K.D.; Dudoit, S. Evaluation of statistical methods for normalization and differential expression in mRNA-Seq experiments. **BMC Bioinformatics.**, v.11, p.94-120, 2010.

69-Robinson, M.D., McCarthy, D.J.; Smyth, G.K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics.**, v.26, p.139-40, 2010.

70- Kvam, V.M.; Liu, P.; Si, Y. A comparison of statistical methods for detecting differentially expressed genes from RNA-seq data. **Am J Bot.**, v.99, p.248-256, 2012.

71-Langmead, B. Aligning short sequencing reads with Bowtie. **Curr Protoc Bioinformatics.**, v.11, p.32-45, 2010.

72-Anders, S.; Huber, W. Differential expression analysis for sequence count data. **Genome Biol.**, v.11, p.106-116, 2010.

73-Fusco, A.; Grieco, M.; Santoro, M.; Berlingieri, M.T.; Pilotti, S.; Pierotti, M.A.; Della Porta, G.; Vecchio G. A new oncogene in human thyroid papillary carcinomas and their lymph-nodal metastases. **Nature.**, v.328, p.170-172, 1987.

74- Pan, Q.; Shai, O.; Lee, L.J.; Frey, B.J.; Blencowe, B.J. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. **Nat Genet.**, v. 40, p.1413-1415, 2008.

75-Sultan, M.; Schulz, M.H.; Richard, H.; Magen, A.; Klingenhoff, A.; Scherf, M.; Seifert, M.; Borodina, T.; Soldatov, A.; Parkhomchuk, D.; Schmidt, D.; O'Keefe, S.; Haas, S.; Vingron, M.; Lehrach, H.; Yaspo, M.L. A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome. **Science.**, v.321, p.956-960, 2008.

76-Wagner, J.R.; Ge, B.; Pokholok, D.; Gunderson, K.L.; Pastinen, T.; Blanchette, M. Computational analysis of whole-genome differential allelic expression data in human. **PLoS Comput Biol.**, 2010.

77-Wang, X.; Sun, Q.; McGrath, S.D.; Mardis, E.R.; Soloway, P.D.; Clark, A.G. Transcriptome-wide identification of novel imprinted genes in neonatal mouse brain. **PLoS ONE.**, 2008.

78- Carvalho, M. C. C. G.; Silva, D. C. G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciencia Rural.**, v.40, p.735-744, 2010.

79- Farias, D.R.; Woyann, L.G.; Maia, L.C.; Oliveira, A.C. Análise comparativa de ferramentas de bioinformática para montagem de genomas com tecnologia de sequenciamento de nova geração. **Vix Enpos**, 2012.

80- Mckernan, K. Reagents, methods, and libraries for bead-based sequencing. US patent application 20080003571,2006.

81- Durfee, T.; Nelson, R.; Baldwin, S.; Plunkett, G.; Burland, V.; Mau, B.; Petrosino, J.F.; Qin, X.; Muzny, D.M.; Ayele, M.; Gibbs, R.A.; Csörgo, B.; Pósfai, G.; Weinstock, G.M.; Blattner, F.R. The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. **Journal of bacteriology.**, v.190, p.2597-2606, 2008.

82-Cloonan, N.; Forrest, A.R.; Kolle, G.; Gardiner, B.B.; Faulkner, G.J.; Brown, M.K.; Taylor, D.F.; Steptoe, A.L.; Wani, S.; Bethel, G.; Robertson, A.J.; Perkins, A.C.; Bruce, S.J.; Lee, C.C.; Ranade, S.S.; Peckham, H.E.; Manning, J.M.; McKernan, K.J.; Grimmond, S.M. Stem cell transcriptome profiling via massive-scale mRNA sequencing. **Nat Methods.**, v.7, p.613-9, 2008.

83-Passalacqua, K.D.; Varadarajan, A.; Ondov, B.D.; Okou, D.T.; Zwick, M.E.; Bergman, N.H. Structure and complexity of a bacterial transcriptome. **J Bacteriol.**, v.191, p.3203-11, 2009.

84-Tang, F.; Barbacioru, C.; Wang, Y.; Nordman, E.; Lee, C.; Xu, N.; Wang, X.; Bodeau, J.; Tuch, B.B.; Siddiqui, A.; Lao, K.; Surani, M.A. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. **Nat Methods.**, v.6, p.377-82, 2009.

85-Santillo, A.; Burrone, L.; Falvo, S.; Senese, R.; Lanni, A.; Chieffi Baccari, G. Triiodothyronine induces lipid oxidation and mitochondrial biogenesis in rat Harderian gland. **J Endocrinol.**, v.219, p.69-78, 2013.

86-Eshak, M.G.; Hassan, W.A. Modulation of nitric oxide synthase and superoxide dismutase gene expression by altered thyroid levels in adult rat brain. *Int J Pharm.*, v.4, p.10-23, 2014.

87-Alexander, N. M. Iodide peroxidase in rat thyroid and salivary glands and its inhibition by antithyroid compounds. **J Biol Chem.**, v.234, p.1530, 1959.

88- Slingerland, D. W.; Graham, D. E.; Josephs, R. K.; Yamazaki, E. The effect of propylthiouracil on the conversion of monoiodotyrosine to diiodotyrosine, **Endocrinology.**, v.65, p.178, 1959.

89-Richards, J. B.; Ingbar, S.H. The effects of propylthiouracil and perchlorate on the biogenesis of thyroid hormone. **Endocrinology.**, v.65, p.198, 1959.

90-Iino, S.; Yamada, T.; Greer, M.A. Effect of graded doses of propylthiouracil on biosynthesis of thyroid hormones. **Endocrinology.**, v.68, p.582, 1961.

91-Morris, D. R.; Hager, L.P. Mechanism of the inhibition of enzymatic halogenation by antithyroid agents. **J Biol Chem.**, v.241, p.3582, 1966.

92- Coval, M. L.; Taurog, A. Purification and iodinating activity of hog thyroid peroxidase. **J Biol Chem.**, v.242, p.5510, 1967.

- 93-DeGroot, L. J.; Davis, A.M. Studies on the biosynthesis of iodotyrosines: A soluble thyroid iodideperoxidase tyrosine-iodinase system. **Endocrinology**, v.70, p.492, 1962.
- 94-Mahoney, C. P.; Igo, R.P. Studies of the biosynthesis of thyroxine. II. Solubilization and characterization of an iodide peroxidase from thyroid tissue, **Biochim Biophys Acta**, v.113, p.507, 1966.
- 95- Berry, M.N.; Gregory, R.B. On the thyroid hormone-induced increase in respiratory capacity of isolated rat hepatocytes. **Biochim Biophys Acta**, v.1098, p.61-7, 1991.
- 96- Panveloski-Costa, A.C.; Serrano-Nascimento, C.; Bargi-Souza, P.; Poyares, L.L.; Viana, G.S.; Nunes, M.T. Beneficial effects of thyroid hormone on adipose inflammation and insulin sensitivity of obese Wistar rats. **Physiol Rep**, v.6, 2018.
- 97- Prieto-Almeida, F.; Panveloski-Costa, A.C.; Crunfli, F.; da Silva Teixeira, S.; Nunes, M.T.; Torrão, A.S. Thyroid hormone improves insulin signaling and reduces the activation of neurodegenerative pathway in the hippocampus of diabetic adult male rats. **Life Sci**, v.192, p.253-258, 2018.
- 98- Peliciari-Garcia, R.A.; Bargi-Souza, P.; Young, M.E.; Nunes, M.T. Repercussions of hypo and hyperthyroidism on the heart circadian clock. **Chronobiol**, v.35, p.147-159, 2018.
- 99- Funes-Huacca, M.; Regitano, L.C.A.; Mueller, O.; Carrilho, E. Semiquantitative determination of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in orange juice by reverse transcriptase polymerase chain reaction and capillary electrophoresis – laser induced fluorescence using microchip technology. **Electrophoresis**, v. 25, p.3860-3864, 2004.
- 100- Kambach, C.; Walke, S.; Young, R.; Avis, J.M.; de la Fortelle, E.; Raker, V.A.; Luhrmann, R.; Li, J.; Nagai, K. Crystal structures of two Sm protein complexes and their implications for the assembly of the spliceosomal snRNPs, **Cell**, v.96, p.375–387, 1999.
- 99- Bianco, A.C.; Salvatore, D.; Gereben, B.; Berry, M.J.; Larsen, P.R. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. **Endocr Rev**, v.23, p.38-89, 2002.
- 100-Zavacki, A.M.; Ying, H.; Christoffolete, M.A.; Aerts, G.; So, E.; Harney, J.W.; Cheng, S.Y.; Larsen, P.R.; Bianco, A.C. Type 1 iodothyronine deiodinase is a sensitive marker of peripheral thyroid status in the mouse. **Endocrinology**, v.146, p.1568-75, 2005.

- 101-Weissman, A.M. Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, v.2, p.169-78, 2001.
- 102-Huibregtse, J. M.; Scheffner, M.; Beaudenon, S.; Howley, P. M. A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. **Proc. Natl Acad. Sci. USA.**, v.92, p.2563–2567, 1995.
- 103-Joazeiro, C. A.; Weissman, A. M. RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. **Cell.**, v.102, p.549–552, 2000.
- 104-Bienz, M. The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain. **TRENDS in Biochemical Sciences.**, v.31, p. 35-40, 2006.
- 105- Carrascosa, J.L.; Llorca, O.; Valpuesta, J.M. Structural comparison of prokaryotic and eukaryotic chaperonins. **Micron.**, v.32, p.43-50, 2001.
- 106- Valpuesta, J.M.; Martín-Benito, J.; Gómez-Puertas, P.; Carrascosa, J.L.; Willison, K.R. Structure and function of a protein folding machine: the eukaryotic cytosolic chaperonin CCT. **FEBS Lett.**, v.529, p.11-6, 2002.
- 107- Bukau, B.; Horwich, A.L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. **Cell.**, v.92, p.351-66, 1998.
- 108- Braig, K.; Otwinowski, Z.; Hegde, R.; Boisvert, D.C.; Joachimiak, A.; Horwich, A.L.; Sigler, P.B. A mutant at position 87 of the GroEL chaperonin is affected in protein binding and ATP hydrolysis. **Nature.**, v.371, p.578-586, 1995.
- 109-Xu, Z.; Horwich, A.L.; Sigler, P.B. The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)₇ chaperonin complex. **Nature.**, v.388, p.741-50, 1997.
- 110- Sigler, P.B.; Xu, Z.; Rye, H.S.; Burston, S.G.; Fenton, W.A.; Horwich, A.L. Structure and function in GroEL-mediated protein folding. **Annu Rev Biochem.**, v.67, p.581-608, 1998.
- 111- Grallert, H.; Buchner, J. Review: a structural view of the GroE chaperone cycle. **J Struct Biol.**, v.135, p.95-103, 2001.
- 112-Willison, K.R. and Horwich, A.L. The Chaperonins., **Academic Press, San Diego**, pp. 107-136, 1996.
- 113- Gutsche, I.; Essen, L.O.; Baumeister, W. Group II chaperonins: new TRiC(k)s and turns of a protein folding machine. **J Mol Biol.**, v.293, p.295-312, 1999.
- 114- Klumpp, M.; Baumeister, W.; Essen, L.O. Structure of the substrate binding domain of the thermosome, an archaeal group II chaperonin. **Cell.**, v.91, p.263-70, 1997.

- 115- Ditzel, L.; Löwe, J.; Stock, D.; Stetter, K.O.; Huber, H.; Huber, R.; Steinbacher, S. Crystal structure of the thermosome, the archaeal chaperonin and homolog of CCT. **Cell.**, v.93, p.125-38, 1998.
- 116-Vainberg, I. E.; Lewis, S. A.; Rommelaere, H.; Ampe, C.; Vandekerckhove, J.; Klein, H. L.; Cowan, N. J. Prefoldin, a chaperone that delivers unfolded proteins to cytosolic chaperonin. **Cell.**, v.93, p.863–873, 1998.
- 117-Gao, Y.; Thomas, J. O.; Chow, R. L.; Lee, G. H.; Cowan, N. J. A cytoplasmic chaperonin that catalyzes beta-actin folding. **Cell.**, v.69, p.1043–1050, 1998.
- 118-Chen, X.; Sullivan, D. S.; Huffaker, T. C. Two yeast genes with similarity to TCP-1 are required for microtubule and actin function in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.91, p. 9111–9115, 1994.
- 119-Geissler, S.; Siegers, K.; Schiebel, E. A novel protein complex promoting formation of functional alpha- and gamma-tubulin. **EMBO. J.**, v.17, p.952–966, 1998.
- 120-Siegers, K.; Waldmann, T.; Leroux, M. R.; Grein, K.; Shevchenko, A.; Schiebel, E.; Hartl, F. U. Compartmentation of protein folding in vivo: sequestration of non-native polypeptide by the chaperonin-GimC system. **EMBO. J.**, v.18, p.75–84, 1999.
- 121-Siegert, R.; Leroux, M. R.; Scheufler, C.; Hartl, F. U.; Moarefi, I. Structure of the molecular chaperone prefoldin: unique interaction of multiple coiled coil tentacles with unfolded proteins. **Cell.**, v.103, p.621–632, 2000.
- 122-Martín-Benito, J.; Boskovic, J.; Go´mez-Puertas, P.; Carrascosa, J. L.; Simons, C. T.; Lewis, S. A.; Bartolini, F.; Cowan, N. J.; Valpuesta, J. M. Structure of eukaryotic prefoldin and of its complexes with unfolded actin and the cytosolic chaperonin CCT. **EMBO. J.**, v.21, p.6377–6386, 2002.
- 123-Leroux, M. R.; Fa´ndrich, M.; Klunker, D.; Siegers, K.; Lupas, A. N.; Brown, J. R.; Schiebel, E.; Dobson, C. M.; Hartl, F. U. MtGimC, a novel archaeal chaperone related to the eukaryotic chaperonin cofactor GimC/prefoldin. **EMBO. J.**, v.18, p.6730–6743, 1999.
- 124- Cao, J.; Xu, J.; Li, W.; Liu, J. Influence of selective brain cooling on the expression of ICAM-1 mRNA and infiltration of PMNLs and monocytes/macrophages in rats suffering from global brain ischemia/reperfusion injury. **Biosci Trends.**, v.2, p.241-4, 2008.
- 125- Furuichi, Y.; Shatkin, A. J. Viral and cellular mRNA capping: past and prospects. **Adv. Virus Res.** v.55, p.135–184, 2000.
- 126-Shatkin, A. J. Capping of eucaryotic mRNAs. **Cell.**, v.9, p.645–653, 1976.

- 127-Shibagaki, Y.; Itoh, N.; Yamada, H.; Nagata, S.; Mizumoto, K. mRNA capping enzyme. Isolation and characterization of the gene encoding mRNA guanylyltransferase subunit from *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, v.267, p.9521–9528, 1992.
- 128-Tsukamoto, T.; Shibagaki, Y.; Imajoh-Ohmi, S.; Murakoshi, T.; Suzuki, M.; Nakamura, A.; Gotoh, H.; Mizumoto, K. Isolation and characterization of the yeast mRNA capping enzyme beta subunit gene encoding RNA 5-triphosphatase, which is essential for cell viability. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.239, p.116–122, 1997.
- 129-Mao, X.; Schwer, B.; Shuman, S. Yeast mRNA cap methyltransferase is a 50 kilodalton protein encoded by an essential gene. **Mol. Cell. Biol.**, v.15, p.4167–4174, 1995.
- 130-Konarska, M. M.; Padgett, R. A.; Sharp, P. A. Recognition of cap structure in splicing in vitro of mRNA precursors. **Cell.**, v.38, p.731–736, 1984.
- 131-Edery, I.; Sonenberg, N. Cap-dependent RNA splicing in a HeLa nuclear extract. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.82, p.7590–7594, 1985.
- 132-Ohno, M.; Sakamoto, H.; Shimura, Y. Preferential excision of the 5proximal intron from mRNA precursors with two introns as mediated by the cap structure. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.84, p.5187–5191, 1987.
- 133-Spriggs, K. A.; Stoneley, M.; Bushell, M.; Willis, A. E. Re-programming of translation following cell stress allows IRES-mediated translation to predominate. **Biol. Cell.**, v.100, p.27–38, 2008.
- 134-Muthukrishnan, S.; Both, G. W.; Furuichi, Y.; Shatkin, A.J. 5-Terminal 7-methylguanosine in eukaryotic mRNA is required for translation. **Nature.**, v.255, p.33–37, 1975.
- 135-Both, G. W.; Banerjee, A. K.; Shatkin, A. J. Methylation-dependent translation of viral messenger RNAs in vitro. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.72, p.1189–1193, 1975.
- 136-Gonatopoulos-Pournatzis, T.; Dunnn, S.; Bounds, R.; Cowling, V.H. RAM/Fam103a1 Is Required for mRNA Cap Methylation. **Molecular Cell.**, v.44, p.585–596, 2011.
- 137-Di Cosmo, C.; Liao, X.H.; Dumitrescu, A.M.; Philp, N.J.; Weiss, R.E.; Refetoff, S. Mice deficient in MCT 8 reveal a mechanism regulating thyroid hormone secretion. **J Clin Invest.**, v.120, p.3377-3388, 2010.
- 138-Nishimura, M.; Naito, S. Tissue-specific mRNA expression profiles of human solute carrier transporter superfamilies. **Drug Metab Pharmacokinet.**, v. 23, p.22-44, 2008.

- 139- Bianco, A.C.; Salvatore, D.; Gereben, B.; Berry, M.J.; Larsen, P.R. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. **Endocr Rev.**, v.23, p.38-89, 2002.
- 140- Zavacki, A.M.; Ying, H.; Christoffolete, M.A.; Aerts, G.; So, E.; Harney, J.W.; Cheng, S.Y.; Larsen, P.R.; Bianco, A.C. Type 1 iodothyronine deiodinase is a sensitive marker of peripheral thyroid status in the mouse. **Endocrinology.**, v.146, p.1568-75, 2005
- 141- Hu, Z.; Zhuo, X.; Shi, Y.; Liu, X.; Yuan, J.; Li, L.; Sun, Y. Iodine deficiency up-regulates monocarboxylate transporter 8 expression of mouse thyroid gland. **Chin Med J.**, v.127, p.4071-6. 2014.
- 142- Shiraishi, M.; Yamamoto, Y.; Hirooka, N.; Obuchi, Y.; Tachibana, S.; Makishima, M.; Tanaka, Y. A high concentration of triiodothyronine attenuates the stimulatory effect on hemin-induced erythroid differentiation of human erythroleukemia K562 cells. **Endocr J.**, v.62, p.431-40, 2015.
- 143- Panveloski-Costa, A.C.; Silva Teixeira, S.; Ribeiro, I.M.; Serrano-Nascimento, C.; das Neves, R.X.; Favaro, R.R.; Seelaender, M.; Antunes, V.R.; Nunes, M.T. Thyroid hormone reduces inflammatory cytokines improving glycaemia control in alloxan-induced diabetic wistar rats. *Acta Physiol.*, v.217, p.130-40, 2016.
- 144- Will, C.L.; Behrens, S.E.; Luhrmann, R. Protein composition of mammalian spliceosomal snRNPs. **Mol. Biol. Rep.**, v.18, p.121–126 ,1993.
- 145- Lerner, M.R.; Steitz, J.A. Antibodies to small nuclearRNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.76, p.5495–5499,1979.
- 146- Craft, J. Antibodies to snRNPs in systemic lupus erythemato-sus. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, v.18, p.311–335,1992.
- 147- Zieve, G.W.; Sauterer, R.A. Cell biology of the snRNP particles. **CRC Crit. Rev. Biochem. Mol.Biol.**, v.25, p.1–46,1990.
- 148- Krämer, A. The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. **Annu. Rev. Biochem.**, v.65, p.367–409,1996.
- 149- Burge, C.B.; Tuschl, T.; Sharp, P.A.. Splicing of precursors to mRNAs by the spliceosomes., pp. 525–560,1999.
- 150- Patel, A.A.; Steitz, J.A. Splicing double: Insights from the second spliceosome. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v.4, p.960–970, 2003.
- 151- Gozani, O.; Feld, R.; Reed, R. Evidence that sequence-independent binding of highly conserved U2 snRNP proteins upstream of the branch site is

required for assembly of spliceosomal complex A. **Genes Dev.**, v.10, p.233–243, 1996.

152- Valcarcel, J.; Gaur, R.K.; Singh, R.; Green, M.R. Interaction of U2AF65 RS region with pre-mRNA branch point and promotion of base pairing with U2 snRNA. **Science.**, v.273, p.1706–1709, 1996.

153- Gozani, O.; Potashkin, J.; Reed, R. A potential role for U2AF-SAP 155 interactions in recruiting U2 snRNP to the branch site. **Mol. Cell. Biol.**, v.18, p. 4752–4760, 1998.

154-Umen, J.G.; Guthrie, C. The second catalytic step of pre-mRNA splicing. **RNA.**, v.1, p.869–885, 1995.

155- Rokeach, L.A.; Haselby, J.A.; Hoch, S.O. Molecular cloning of a cDNA encoding the human Sm-D autoantigen. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v.85, p. 4832-6, 1988.

156-Lehmeier, T.; Kirani Foulaki and Reinhard LGhrmann Evidence for three distinct D proteins, which react differentially with anti-Sm autoantibodies, in the cores of the major snRNPs U1, U2, U4/U6 and U5. **Nucleic Acids Research.**, v.18,p.6475-6484, 1990.

157-Vanin, E.F. Processed pseudogenes: characteristics and evolution. **Annu Rev Genet.**, v.19, p.253-72, 1985.

158-Kim, Y.D.; Lee, J.; Kim, H.S.; Lee, M.O.; Son, M.Y.; Yoo, C.H.; Choi, J.K.; Lee, S.C.; Cho, Y.S. The unique spliceosome signature of human pluripotent stem cells is mediated by SNRPA1, SNRPD1, and PNN. **Stem Cell Res.**, v.22, p.43-53, 2017.

159-Quidville, V.; Alsafadi, S.; Goubar, A.; Commo, F.; Scott1, V.; Pioche-Durieu, C.; Girault, I.; Baconnais, S.; Cam, E.L.; Lazar, V.; Delalogue, S.; Saghatchian, M.; Pautier, P.; Morice, P.; Dessen, P.; Vagner, S.; Andre, F. Targeting the Deregulated Spliceosome Core Machinery in Cancer Cells Triggers mTOR Blockade and Autophagy. **Cancer research.**, v.73, p.2247-2258, 2013.

160- Hör, S.; Ziv, T.; Admon, A.; Lehner, P.J. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture and differential plasma membrane proteome quantitation identify new substrates for the MARCH9 transmembrane E3 ligase. **Mol Cell Proteomics.**, v.8, p.1959-71, 2009.

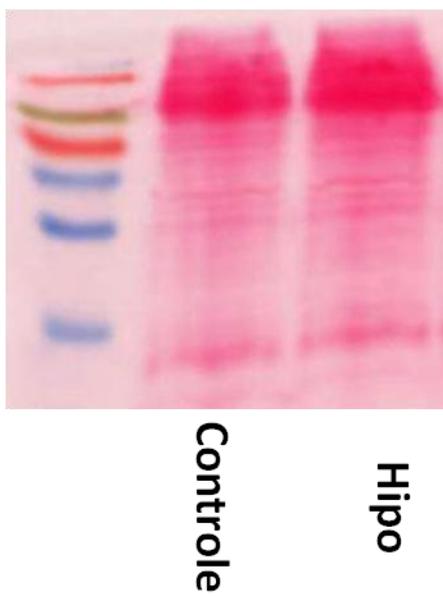
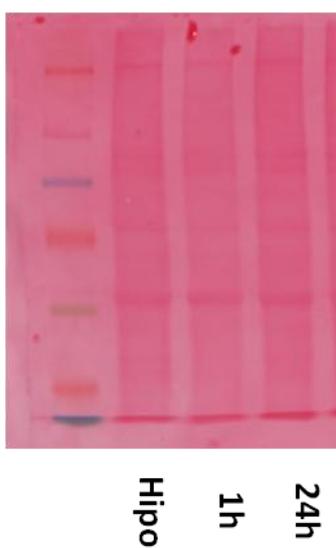
161-Thien, C.B.; Langdon, W.Y. c-Cbl and Cbl-b ubiquitin ligases: substrate diversity and the negative regulation of signalling responses. **Biochem. J.**, v.391,p.153–166, 2005.

162-Joazeiro, C.A.; Wing, S.S.; Huang, H.; Levenson, J.D.; Hunter, T.; Liu, Y.C. The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RINGtype, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. **Science.**, v.286, p.309–312, 1999.

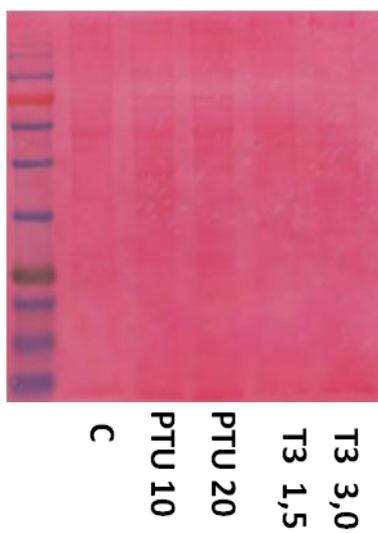
163-Levkowitz, G.; Waterman, H.; Ettenberg, S.A.; Katz, M.; Tsygankov, A.Y.; et al. Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. **Mol. Cell.**, v.4,p.1029–1040, 1999.

164-Rao, N.; Ghosh, A.K.; Ota, S.; Zhou, P.; Reddi, A.L.; et al. The non-receptor tyrosine kinase Syk is a target of Cbl-mediated ubiquitylation upon B-cell receptor stimulation. **EMBO J.**, v.20, p.7085–7095, 2001.

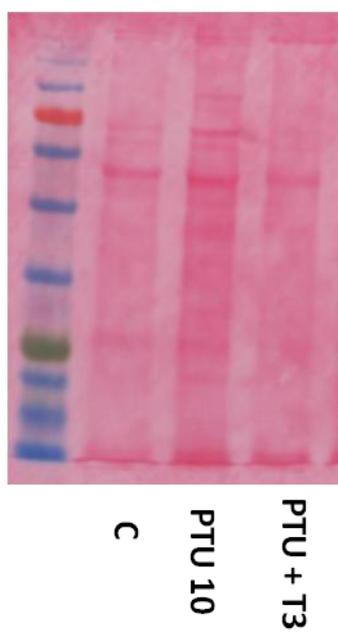
ANEXOS

Anexo 1 – Ponceau MCT 8 (Controle x Hipo)**Anexo 1 – MCT 8 10^{-7} M e 10^{-9} M (Hipo x 1h x 24h)**

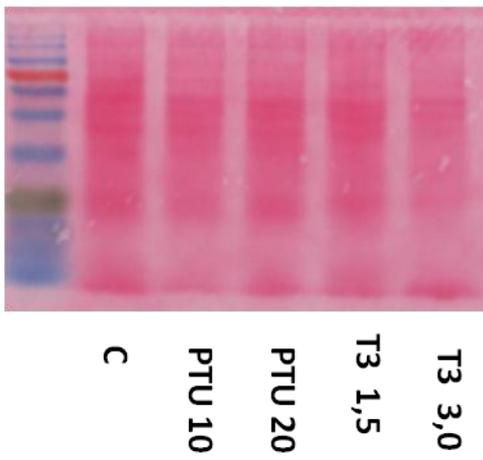
Anexo 3 – MCT 8 *in vivo* (C; PTU 10; PTU 20; T3 1,5 e T3 3,0)



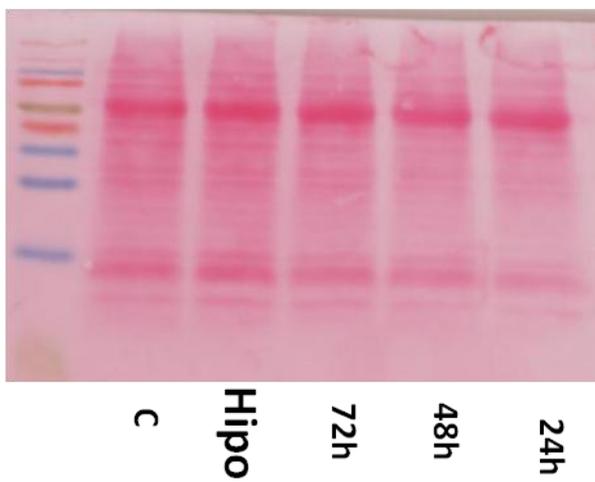
Anexo 4 – MCT 8 *in vivo* (C; PTU 10; PTU+T3)



Anexo 5 – MCT 8 Fígado (C; PTU 10; PTU 20; T3 1,5 e T3 3,0)



Anexo 6 – SNRPD1 PCCI3 (C; Hipo; 72h; 48h e 24h)



Anexo 7 – SNRPD1 (C; PTU 10; PTU 20; T3 1,5 e T3 3,0)

