

**JOÃO KLEBER NEVES RAMOS**

**Análise do impacto do consumo de dieta hiperlipídica associado  
ou não ao modelo de disfunção tireoidiana sobre o epitélio  
intestinal de camundongos adultos**

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

São Paulo  
2019

**JOÃO KLEBER NEVES RAMOS**

**Análise do impacto do consumo de dieta hiperlipídica associado  
ou não ao modelo de disfunção tireoidiana sobre o epitélio  
intestinal de camundongos adultos**

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

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Francemilson Goulart da Silva

Versão Original

São Paulo  
2019

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

NEVES RAMOS , JOÃO KLEBER  
ANÁLISE DO IMPACTO DO CONSUMO DE DIETA  
HIPERLÍPIDICA ASSOCIADO OU NÃO NO MODELO DE  
DISFUNÇÃO TIREOIDIANA SOBRE O EPITÉLIO INTESTINAL DE  
CAMUNDONGOS ADULTOS / JOÃO KLEBER NEVES RAMOS ;  
orientador Francemilson Goulart da Silva . -- São  
Paulo, 2019.  
43 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) --  
Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências  
Biomédicas.

1. Dieta Hiperlipídica. 2. Intestino Delgado. 3.  
Proteínas de Junção. 4. Hormônio Tireoidianos. I.  
Goulart da Silva , Francemilson, orientador. II.  
Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato (a): João Kleber Neves Ramos

Título da Dissertação: Análise do impacto do consumo de dieta hiperlipídica associado ou não ao modelo de disfunção tireoidiana sobre o epitélio intestinal de camundongos adultos

Orientador (a): Prof. Dr. Francemilson Goulart da Silva.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada em ...../...../....., considerou o candidato:

**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

Examinador(a):      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição:.....

Presidente:            Assinatura: .....  
Nome: Dr. Francemilson Goulart da Silva  
Instituição: Universidade de São Paulo

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**ANÁLISE DO EFEITO DA INGESTÃO CRÔNICA DE DIETA HIPERLIPÍDICA E DOS HORMÔNIOS TIREOIDIANOS NA BARREIRA INTESTINAL DE CAMUNDONGOS C57BL/6**", registrado sob o protocolo nº **119/2017**, 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 **10/10/2017** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

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

- Departamento: *Fisiologia e Biofísica*

- Membros da Equipe:

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 [www2.icb.usp.br/icb/ceua](http://www2.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 "**ANALYSIS OF THE EFFECT OF HIGH FAT DIET CONSUMPTION ASSOCIATED OR NOT WITH THYROID HORMONE DISORDERS IN THE INTESTINAL BARRIER OF MICE**", protocol nº **119/2017**, 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 8<sup>th</sup>, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15<sup>th</sup>, 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 **10/10/2017** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

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

- Team members:

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>Mus musculus</i>	C57BL/6	Macho/male	30-40 g	180

São Paulo, 18 de outubro de 2017.



Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**  
Coordenadora CEUA-ICB/USP



Colégio Universitário "Armando de Sales Oliveira" - Rulandê - São Paulo, SP - Av. Professor Linus Pauling, 2015 - ICB 08 - 02608-200 -  
Comitê de Ética no Uso de Animais - Telefone: (11) 2081-7723 - e-mail: nec@fzq.usp.br

Decl. CEUA.26.2018

## DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado **119/2017/CEUA**, válido até 10/10/2021, e por solicitação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Francemilson Goulart da Silva**, do Departamento de **Fisiologia e Biofísica**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do(a) aluno(a) **João Kleber Neves Ramos** ao Projeto de Pesquisa **"ANÁLISE DO EFEITO DA INGESTÃO CRÔNICA DE DIETA HIPERLIPÍDICA E DOS HORMÔNIOS TIREOIDIANOS NA BARREIRA INTESTINAL DE CAMUNDONGOS C57BL/6"**, uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 08 de março de 2018.

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**  
Coordenadora da CEUA-ICB/USP

## **AGRADECIMENTO**

O presente trabalho é dedicado aos meus pais, Carlos Ramos e Sandra Neves, a quem eu sou eternamente grato, sem eles nada disso teria acontecido. Agradeço, também, aos meus tios Genival Oliveira e Claudete Ramos pelo acolhimento em sua casa durante o ano de 2017, enquanto eu estudava para a prova de ingresso ao mestrado.

Agradeço ao meu orientador, Fran Goulart, por tudo que me ensinou até aqui e principalmente pela notória paixão em ensinar, isto me inspira muito.

Agradeço a todos os amigos que me acompanharam de perto ou de longe e que sempre me mandaram energias positivas.

Sou muito grato a Deus por tudo que Ele tem me permitido aprender ao longo do tempo e por sempre estar presente em todos os momentos. “Porque Ele vive, eu posso crer no amanhã!”

E por fim, e não menos importante, agradeço a todos os camundongos que contribuíram para este trabalho.

Muito obrigado!

## **AGRADECIMENTO AO AUXÍLIO FINANCEIRO**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico — (CNPq) – n° 130192/2019-8, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e verba PROEX (Programa de Excelência Acadêmico).



## RESUMO

RAMOS, J. K. N. **Análise do impacto do consumo de dieta hiperlipídica associado ou não ao modelo de disfunção tireoidiana sobre o epitélio intestinal de camundongos adultos.** 2019. 43f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

**Introdução e objetivos:** O consumo crônico de dieta hiperlipídica (HFD) provoca obesidade e causa inflamação sistêmica. No intestino grosso, a HFD promove inflamação e, em paralelo, diminui o conteúdo de proteínas de junção de oclusão (claudina 1 e ocludina), tornando o epitélio intestinal mais permeável aos produtos bacterianos, o que pode contribuir com a instalação da inflamação sistêmica. No intestino delgado, local de maior absorção dos componentes da dieta, a HFD promove redução da maioria dos transportadores de nutrientes, o que indica que o excesso de gordura na dieta afeta, também, o intestino delgado. Entretanto, não sabemos se a HFD promove uma inflamação local ou se afeta a expressão das proteínas de oclusão, o que comprometeria a integridade da barreira intestinal. Adicionalmente, os hormônios tireoidianos (HTs), em especial o T3, exercem efeitos de supressão da inflamação, o que pode contribuir para a integridade da barreira. Sendo assim, o nosso interesse é avaliar a expressão das proteínas de junção no intestino delgado de animais eu, hipo e hipertireoideos alimentados com HFD. **Material e métodos:** Para este estudo, utilizamos camundongos machos adultos da linhagem C57BL-6 que, a partir dos dois meses de idade, foram distribuídos em dois grupos experimentais: alimentados com dieta padrão (LFD) ou com dieta hiperlipídica (HFD). No final de 12 semanas, momento em que os animais estavam obesos, os animais receberam salina, T3 ou PTU por via subcutânea durante 30 dias consecutivos. No final do tratamento, os animais foram submetidos à eutanásia, o intestino removido e o epitélio separado da mucosa para análise da expressão gênica (mRNA) e do conteúdo proteico das proteínas de junção, por PCR em tempo real e western blotting, respectivamente. **Resultados:** Considerando a diversidade de proteínas de junção no epitélio do intestino delgado, optamos por avaliar a expressão gênica dessas proteínas apenas nos grupos dieta padrão e HFD para, a partir daí, avaliar o conteúdo das proteínas apenas para aquelas cujo mRNA foi alterado pela HFD. Nesse caso, foram avaliados os seguintes mRNAs: ZO-1, ZO-2, ZO-3, JAM-1, JAM-2, JAM-4, claudina 3, claudina 7, claudina 12, claudina 15 e ocludina (todos expressos no intestino delgado). Observamos que na condição de ingestão de HFD houve uma redução dos mRNAs de ZO-2 ( $p = 0,06$ ) e ocludina ( $p = 0,05$ ), com valor de “p” próximo do considerado estatístico. Com base nesses achados, realizamos a análise de western blotting para ZO-2 e ocludina nos animais alimentados com dieta padrão e HFD tratados com salina, T3 e PTU. Observamos aumento do conteúdo da ocludina e da ZO-2 (apesar da redução do mRNA) nos animais alimentados com HFD. O hipotireoidismo ou hipertireoidismo não afetou o conteúdo das proteínas. O hipertireoidismo foi confirmado por redução do mRNA do *Tshb*, aumento da ingestão alimentar, hipertrofia cardíaca e redução da gordura perigonadal. Já o hipotireoidismo foi confirmado pelo aumento da expressão do gene do *Tshb*. **Conclusão:** Apesar do conteúdo reduzido do mRNA da ZO-2 e da ocludina, observamos aumento dessas duas proteínas no intestino delgado, possivelmente, por um maior recrutamento desses mRNA para a síntese proteica. Dado a importância dessas proteínas para a adesão célula – célula, os nossos resultados sugerem que há uma possível diminuição da permeabilidade intestinal frente à ingestão de HFD, tornando o epitélio do intestino delgado menos frouxo.

**Palavras-chave:** Dieta Hiperlipídica; Intestino Delgado; Proteínas de Junção; Hormônios Tireoidianos.

## ABSTRACT

RAMOS, J. K. N. **High-fat diet intake and its effects on the intestinal barrier of hypo and hyperthyroidism mice**. 2019. 43f. Dissertation (Master degree in Human Physiology) - Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2019.

**Introduction and aim:** Chronic consumption of high-fat diet (HFD) causes obesity as well as systemic inflammation. In the large intestine, HFD promotes inflammation and, in parallel, decreases the content of occlusion junction proteins (claudin 1 and occludine), making the intestinal epithelium more permeable to bacterial products, which may contribute to the onset of systemic inflammation. In the small intestine, the main site of dietary compounds absorption, HFD promotes a reduction of the most nutrient transporters, which indicates that excess dietary fat also affects the small intestine. However, we do not know whether HFD promotes inflammation or affects occlusion proteins expression, which would damage the integrity of the intestinal barrier. Additionally, thyroid hormones (HTs), especially T3, exert inflammation suppression effects, which may contribute to barrier integrity. Therefore, we were attempted to evaluate the junction proteins expression in the small intestine of HFD-fed hypo and hyperthyroid mice. **Material and methods:** For this study, we assorted 2-years-old male C57BL-6 mice into two experimental groups: standard diet (LFD) or high-fat diet (HFD). After 12 weeks of HFD feeding, mice received subcutaneous saline, T3 or PTU for more 30 days. At the end of the treatment (PTU and T3), animals were euthanized, intestines were removed and epithelium was separated from the mucosa and submitted to analysis of gene expression (mRNA) and protein content of the junction proteins by real time PCR and western blotting, respectively. **Results:** Considering several junction proteins in the small intestine epithelium, we chose to evaluate their gene expression only in the standard diet and HFD groups and, from there, evaluate the protein content for those whose mRNA was altered by HFD. The following mRNAs were evaluated: ZO-1, ZO-2, ZO-3, JAM-1, JAM-2, JAM-4, claudin 3, claudin 7, claudin 12, claudin 15 and occludine (all expressed in small intestine). We observed that HFD promoted a reduction of ZO-2 ( $p = 0.06$ ) and occludine ( $p = 0.05$ ) mRNAs, with a value of “p” near to that considered statistical. Based on these findings, we performed western blotting for ZO-2 and occludine in animals fed LFD and HFD plus saline, T3 and PTU. We observed an increase of occludine and ZO-2 content (despite a reduction of their mRNAs) in HFD-fed mice. Hypothyroidism or hyperthyroidism did not affect protein content. Hyperthyroidism was confirmed by reduction of Tshb mRNA, high food intake, cardiac hypertrophy and reduction of perigonadal fat. Hypothyroidism was confirmed by increased Tshb gene expression. **Conclusion:** Despite of reduced content of ZO-2 mRNA and occludine, we observed an increase of these two proteins in the small intestine, possibly due to a higher recruitment of these mRNAs for protein synthesis. Given the importance of these proteins for cell-to-cell adhesion, our results suggest a possible decrease of intestinal permeability after HFD intake, which lead to the epithelium less loose.

**Keywords:** High-fat diet; Small intestine; Junction proteins; Thyroid hormones.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura – 1:** Ativação do fator de transcrição NFκB: O LPS se liga ao receptor do tipo Toll-like4 (TLR4) para induzir ativação do IKK que fosforila IκB, promovendo sua dissociação do complexo NF-κB. O NF-κB é liberado, migrando para o núcleo onde estimula a expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α, IL-1β, IL-6, COX-2) e da óxido nítrico sintase indutível (iNOS) .....16
- Figura – 2:** Ilustração da biossíntese dos hormônios tireoidianos: Inicia-se com a captação do iodeto mediada pela NIS, seguido pelo transporte do iodeto para o coloide via pendrina. O iodeto é convertido a iodo e incorporado a tireoglobulina para formação do T3 e T4. Segue-se com a absorção do coloide contendo T3 e T4 e secreção para a circulação .....18
- Figura – 3:** Ilustração da ação dos hormônios tireoidianos: No interior da célula, o T4 é convertido a T3 que se liga ao seu receptor nuclear, ativando ou reprimindo a expressão gênica .....19
- Figura – 4:** Controle do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide: O TRH secretado pelo hipotálamo estimula a hipófise a secretar o TSH, que por sua vez, age na tireoide estimulando a síntese dos HTs. Os HTs secretados na circulação sistêmica inibem tanto a liberação do TRH quanto do TSH. ....20
- Figura – 5:** Isolamento do epitélio intestinal: 1 – Píloro; 2 – Jejunum cortado; 3 – Fragmentos de jejunum; 4 – Fragmentos de jejunum com mucosa exposta; 5 – Lavagem com salina na placa de Petri; 6 – Solução de lavagem no tubo cônico; 7 – Solução de incubação no tubo cônico; 8 – Erlenmeyer para agitação mecânica; 9 – Solução filtrada em tubo cônico seguido de centrifugação; 10 – Pellet homogeneizado com tampão RIPA e armazenado em eppendorf ; 11 – Pellet homogeneizado com Trizol e armazenado em eppendorf livre de RNAses e DNAses .....27
- Figura – 6:** Análise temporal da ingestão calórica e do peso corporal: A ingestão calórica (A) e o peso corporal (B) dos camundongos foram registrados na 1ª, 4ª, 8ª e 12ª semanas após a introdução da LFD e HFD. O “N” amostral corresponde a 15 animais/grupo. Os dados foram submetidos à estatística: ANOVA dois fatores, seguida do pós-teste de Sidak, comparando apenas o grupo LFD com o HFD em cada semana. **A:** \* p < 0,05 (12ª semana), e **B:** \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 e \*\*\*\*p < 0,0001.....31
- Figura – 7:** Parâmetro morfofuncional: Análise da ingestão calórica, do peso corporal (PC) e da gordura perigonadal: A ingestão calórica (A) e o peso corporal (B) dos camundongos foram registrados após os 30 dias de tratamento com salina, T3 ou PTU, o que coincidiu com 16ª semana de LFD e HFD. Após eutanásia, a gordura perigonadal foi removida, pesada e normalizada pelo comprimento da tíbia (C). O “N” amostral corresponde a 10 animais/grupo. Os dados foram submetidos à estatística: ANOVA dois fatores. **A:** \*\* p < 0,01 vs salina e PTU; **B:** \*\* p < 0,01 vs T3 e PTU (apenas tratamento), e \*p < 0,0001: LFD vs HFD (apenas dieta); e **C:** \* p < 0,0001 vs salina e PTU. ....32
- Figura – 8:** Parâmetro morfofuncional: Análise da massa cardíaca: Peso seco do coração (A) e razão coração seco/tíbia (B). O coração foi removido após eutanásia dos animais e seco em estufa por 72 horas. O “N” amostral corresponde a 5 animais/grupo. Os dados foram submetidos à estatística: ANOVA dois fatores. **A:** \* p < 0,0001 vs salina e PTU; e **B:** \* p < 0,0001 vs salina e PTU.....33

**Figura – 9:** PCR em tempo real para os genes codificadores de proteínas de junção de oclusão: RNA total extraído da hipófise de camundongos alimentados com LFD ou HFD por 16 semanas e tratados com salina, T3 e PTU. O “N” amostral foi de 2 a 4 por grupo experimental. Os genes de interesse foram normalizados pelo gene do *Gapdh* (constitutivo). Os dados foram submetidos à análise estatística: ANOVA dois fatores, seguido de pós-teste de Tukey. \*  $p < 0,001$ . .....34

**Figura – 10:** PCR em tempo real para os genes codificadores de proteínas de junção de oclusão: RNA total extraído do intestino de camundongos alimentados com LFD ou HFD por 12 semanas e submetido ao PCR em tempo real. O “N” amostral consta acima de cada gráfico assim como o nome da proteína cujo gene foi avaliado. Os genes de interesse foram normalizados pela 18s (constitutivo). Os dados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP). Com exceção da 18s, todos os dados foram submetidos ao teste não paramétrico (Mann-Witney test). .....35

**Figura – 11:** Western blotting para proteínas de junção de oclusão: Conteúdo de ZO-2 (A) e ocludina (B) no epitélio intestinal de camundongos alimentados com LFD ou HFD e tratados com salina, T3 e PTU. Conteúdo de proteínas corrigidas pelo arraste do Ponceau S e expressos em unidades arbitrárias (U.A.). O “N” amostral de 10 a 13 animais por grupo. Os blots correspondentes estão posicionados acima dos gráficos. Os dados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP), submetidos à ANOVA duas vias. O valor de “p” consta acima do gráfico.....36

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela - 1:</b> Composição das dietas LFD e HFD.....	25
<b>Tabela - 2:</b> relação dos <i>primers</i> utilizados para o PCR em tempo real.....	30

## LISTA SIGLAS E ABREVIATURAS

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação animal  
COX – cicloxigenase  
DEPC dicarbonato de dietila  
DIT – diiodotirosina  
DTT - Ditiotreitól  
EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid*  
ERN - espécies reativas de nitrogênio  
ERO - espécies reativas de oxigênio  
FABPpm - *Plasma membrane fatty acid binding protein*  
FAT - *Fatty Acid Translocase*  
FATP - *fatty acid transport protein*  
GH - Growth Hormone  
GLUT - transportador de glicose  
HFD – *high fat diet*  
HTs - hormônios tireoidianos  
IL – Interleucinas  
IMC - índice de massa corporal  
iNOS - óxido nítrico sintetase induzível  
LFD – *low fat diet*  
LPS- lipopolissacarídeo  
MIT – monoiodotirosina  
NF-kB - fator nuclear kappa B  
OMS - organização mundial de saúde  
PEPT – *peptide transporter*  
PTU – propiltiouracil  
SGLT - *sodium-glucose cotransporter*  
SN - sistema nervoso  
T3 – tri-iodo-tironina  
T4 – tetra-iodo-tironina/tiroxina  
TA - temperatura ambiente  
Tg – tireoglobulina  
TGI – Trato gastrointestinal.  
TNF-a - *Alpha Tumor Necrosis Factors*  
TPO – tireoperoxidase  
TRH – tireotrofina  
TRL - *toll like receptor*  
TSH – hormônio tireoestimulante  
UCPs -proteínas desacopladoras

## SUMÁRIO

### 1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos funcionais do trato gastrointestinal: ênfase no intestino delgado.....	13
1.2 Aspectos gerais da obesidade.....	13
1.3 Obesidade, intestino e inflamação.....	15
1.4 Fisiologia dos hormônios tireoidianos.....	17
1.5 Os hormônios tireoidianos e o processo inflamatório.....	20

### 2. JUSTIFICATIVA.....22

### 3. OBJETIVO.....23

### 4. MATERIAL E MÉTODOS.....24

4.1 Animais e tratamentos.....	24
4.2 Isolamento do epitélio intestinal.....	25
4.3 Extração do RNA total.....	26
4.4 Quantificação e integridade do RNA.....	27
4.5 Transcrição reversa.....	28
4.6 PCR em tempo real – amplificação.....	28
4.7 Extração e quantificação de proteína.....	28
4.8 Western Blotting.....	29
4.9 Análise estatística.....	29

### 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....31

5.1 Parâmetros morfofuncionais: avaliação da efetividade da HFD na indução da obesidade e dos tratamentos com PTU e T3 no estabelecimento do hipo e hipertireodismo, respectivamente.....	31
5.2 Conteúdo dos mRNAs e das proteínas das junções de oclusão no epitélio do intestino delgado.....	34

### 6 CONCLUSÕES.....37

### REFERÊNCIAS\*.....38

## 1 INTRODUÇÃO

### *1.1 Aspectos funcionais do trato gastrointestinal: ênfase no intestino delgado*

O trato gastrointestinal (TGI) é formado por várias estruturas: boca, faringe, esôfago, estômago, intestino delgado e intestino grosso. O intestino delgado, principal local de absorção dos nutrientes, possui uma área de superfície aumentada por vilos e microvilos e é constituído por um epitélio simples, com células justapostas, conectadas umas às outras por proteínas de junção de oclusão. Os tipos celulares localizados no epitélio intestinal são os enterócitos (células absorptivas), células-tronco, Paneth, caliciformes, enteroendócrinas, entre outras (SNOECK et al., 2005).

O processo de absorção ocorre por via paracelular e transcelular. O transporte paracelular é limitado por proteínas de oclusão, por ex. claudinas e ocludina, que formam uma verdadeira barreira que impede a passagem de macromoléculas da luz do TGI para o interstício-vascular. Na ausência das proteínas de oclusão (claudinas e ocludina), ocorrem três defeitos significativos: 1) diminuição da absorção por via transcelular; 2) aumento da secreção de solutos e água, provocando diarreia; 3) aumento da absorção de macromoléculas com potencial inflamatório (BARMAYER et al., 2015; PFANNKUCHE & GABEL, 2008; HWANG et al., 2013).

Já o transporte transcelular é altamente seletivo e depende de várias proteínas transportadoras localizadas na membrana apical dos enterócitos. Por exemplo, o transporte dos carboidratos é feito pelo SGLT1, GLUT2, GLUT5, o transporte dos peptídeos é feito pelo PEPT1, cuja atividade depende do trocador sódio/hidrogênio (NHE), enquanto o transporte de lipídios envolve diversas proteínas, tais como FAT/CD36, FABPpm, FATP4 e NPC1L1 (LOSACCO et al., 2018). Convém ressaltar que não está claro como essas proteínas medeiam à entrada de lipídios digeridos, mas pode ser que haja uma integração entre difusão simples e difusão facilitada.

### *1.2 Aspectos gerais da obesidade*

A organização mundial de saúde (OMS) reconhece a obesidade como um problema de saúde pública, pois está associada com a instalação de várias doenças crônicas não transmissíveis, tais como as doenças cardiovasculares (infarto e acidente vascular encefálico) e doença metabólica (Diabetes mellitus) que, no seu conjunto, comprometem a qualidade de vida e aumentam os custos médicos (VECCHIÉ et al., 2018; BOLES et al., 2017). Portanto, são necessárias políticas de saúde pública direcionadas ao controle da obesidade, o que exige



estudos/pesquisas, principalmente porque, para intervir, precisamos entender primeiro quais são as alterações fisiológicas induzidas pelo consumo crônico de uma dieta hipercalórica.

Entende-se por obesidade o excesso de gordura corporal ou aumento da adiposidade, determinada pelo cálculo matemático do índice de massa corporal (IMC) que pode ser calculado a divisão do peso do indivíduo pela sua altura ao quadrado e indica se o indivíduo está ou não com peso ideal (APOVIAN, 2016). Entretanto, essa equação não é muito adequada porque os valores obtidos podem ser superestimados, uma vez que o IMC não faz distinção entre massa adiposa e massa muscular (GÜNGÖR, 2014).

A obesidade é uma condição multifatorial (ROGERO & CALDER, 2018) e, até o presente momento, não foi possível isolar os efeitos de um único fator devido à correlação entre eles (GÜNGÖR, 2014). Aproximadamente 30% da população mundial apresenta sobrepeso ( $IMC \geq 25 \text{ kg} / \text{m}^2$ ) e, nas condições do cenário atual, esses números tendem a aumentar ainda mais (ROGERO & CALDER, 2018), o que exige atenção das autoridades públicas para a elaboração e implementação de políticas de combate à obesidade.

As interações de diferentes fatores como genéticos, comportamentais, metabólicos e ambientais podem ser favoráveis à instalação da obesidade em um indivíduo (ROGERO & CALDER, 2018; HEIANZA & QI, 2017). Poucas são as mutações de um único gene que tem a obesidade como causa específica. Um exemplo é a mutação de proteínas que pertencem à via de sinalização da leptina ou especificamente à mutação do receptor de leptina (WASIM et al., 2016). Cabe aqui ressaltar que a leptina é um hormônio liberado no período pós-prandial e que age em populações distintas de neurônios do núcleo arqueado, promovendo a saciedade e inibindo a fome (XU & XIE, 2016). Portanto, a inibição da ação desse hormônio pode levar ao quadro de hiperfagia e aumento da adiposidade (DI SPIEZIO et al., 2018).

A obesidade é resultado de um desequilíbrio no balanço energético entre a ingestão alimentar e o gasto energético, e é potencializada pela inatividade física (NARCISO et al., 2019) e pelas doenças endócrinas (KOKKORIS & PI-SUNYER, 2003). No que diz respeito às doenças endócrinas, podemos citar o hipotireoidismo, condição caracterizada pela redução dos hormônios tireoidianos e que afeta negativamente o metabolismo energético de maneira direta e indiretamente, levando ao aumento do peso corporal por aumento da adiposidade (AICELES & DA FONTE RAMOS, 2016; XIA et al., 2016; SANYAL & RAYCHAUDHURI 2016). Em relação à regulação indireta, a diminuição dos HTs leva à diminuição da expressão do mRNA do GH (VOLPATO & NUNES, 1994), que por sua vez, leva à diminuição da síntese e secreção do GH que é um hormônio que exerce ações catabólicas no tecido adiposo. Portanto, a carência do GH pode provocar o aumento da massa adiposa (MOLLER et al., 2003).

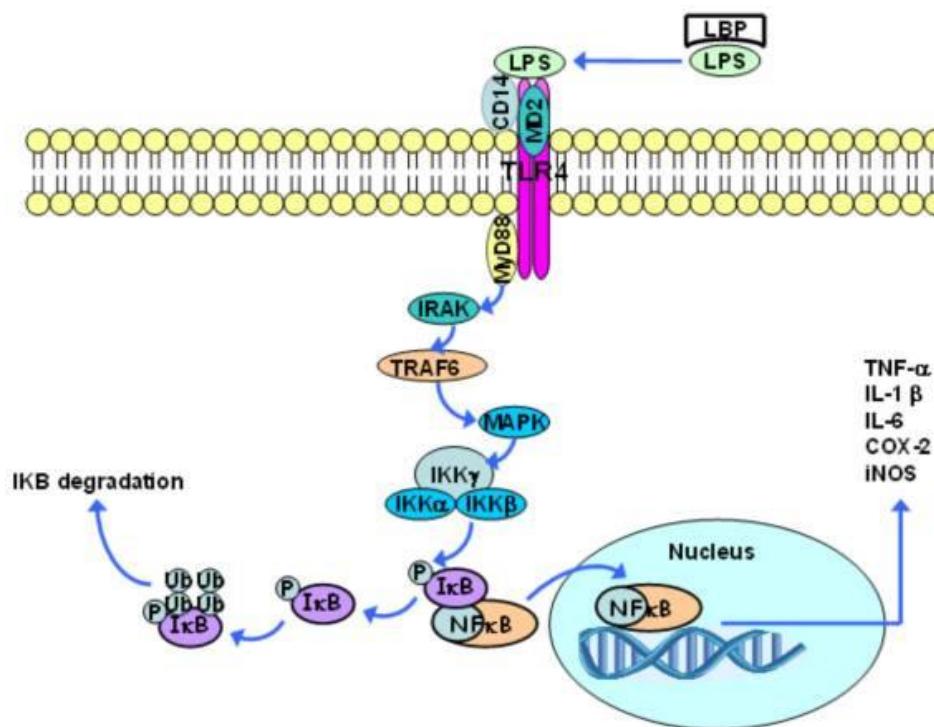
Em relação ao sedentarismo, em geral, a área urbana das grandes metrópoles prioriza e facilita a mobilidade por meio de veículos motorizados, de modo que, a mobilidade ativa, que envolve gasto energético, como caminhar ou pedalar, perderam espaço nessas áreas, o que, também, contribui com o aumento da obesidade (CASTRO et al., 2017). Dessa forma, comportamentos sociais voluntários como a compulsão alimentar e o sedentarismo são condições favoráveis ao aumento da obesidade e suas comorbidades (HUANG et al., 2016).

Vale a pena mencionar que, além de problemas físicos, cursa com a obesidade doenças mentais tais como a depressão, que é um motivo de muita preocupação na sociedade contemporânea devido a sua alta associação com o suicídio (JANTARATNOTAI et al., 2017; SCHACHTER et al., 2018). Essa relação entre a obesidade e a depressão pode se tornar mais intensa e perigosa devido ao preconceito e desinformação que relacionam o indivíduo obeso como alguém que sofre de gula e de preguiça, excluindo os diversos fatores supramencionados responsáveis pela gênese da obesidade.

### *1.3 Obesidade, intestino e inflamação*

O aumento da adiposidade está associado com o aumento sérico de citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucina -6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), secretadas pelos adipócitos e pelos macrófagos e que são transportadas por todo o organismo através da circulação (DENG et al., 2016). Portanto, outra característica da obesidade é o desenvolvimento da inflamação, caracterizada pelo aumento sérico de citocinas, chamada de inflamação sistêmica de baixo grau (CÂNDIDO et al., 2018), e que está diretamente envolvida com a etiologia de doenças crônicas não transmissíveis.

Outra questão relevante é que o desequilíbrio da microbiota intestinal (disbiose) devido ao alto consumo de dieta hiperlipídica pode aumentar a permeabilidade do epitélio do intestino grosso por redução de proteínas de junção, tais como claudina -1 e ocludina (KIM et al., 2012), de modo a permitir que substâncias presentes na luz do intestino passem livremente para o interstício e plasma, contribuindo com a inflamação sistêmica de baixo grau. Uma dessas substâncias é o lipopolissacarídeo (LPS), constituinte da parede bacteriana e que aumenta frente ao consumo de uma dieta hiperlipídica (ARAÚJO et al., 2017). Quanto mais LPS, maior a probabilidade de sua ligação com os receptores TLR-4 e indução da inflamação (Figura 1). De fato, o consumo de dieta hiperlipídica promove aumento da cicloxigenase tipo 2 (COX-2), óxido nítrico sintetase induzível (iNOS), do conteúdo fosforilado de I $\kappa$ B-quinase beta (IKK $\beta$ ) e ativação do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), efeitos que sinalizam para um processo inflamatório no intestino grosso/cólon (KIM et al., 2012).



**Figura 1. Ativação do fator de transcrição NF-κB.** O LPS se liga ao receptor do tipo Toll-like 4 (TLR4) para induzir ativação do IKK que fosforila IκB, promovendo sua dissociação do complexo NF-κB. O NF-κB é liberado, migrando para o núcleo onde estimula a expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α, IL-1β, IL-6, COX-2) e da óxido nítrico sintase indutível (iNOS). FONTE: (ROGERO, 2018).

No que diz respeito ao intestino delgado, local onde a presença de bactérias, vírus e fungos é bem limitada (EL AIDY et al., 2015), o LPS não deve ser um fator importante na indução de uma possível condição inflamatória, contudo, não se pode descartar a ação de outras moléculas com potencial ou capacidade comprovada de se ligar aos receptores que ativam vias de inflamação, principalmente porque o TLR-4 está presente nos enterócitos (MANTANI et al., 2011). Nesse sentido, sabe-se que os ácidos graxos saturados, um dos principais produtos gerados a partir da hidrólise da gordura da dieta, interage com receptores localizados em células de defesa ou em células que não fazem parte do sistema imune, acionando vias intracelulares, cujo resultado é o aumento de citocinas pró-inflamatórias (NORDE et al., 2017).

Cabe salientar que a ativação do receptor do tipo Toll-like 4 (TLR-4) aumenta a expressão de citocinas pró-inflamatórias e que os ácidos graxos saturados, por exemplo, o ácido palmítico, é um ligante desse receptor, portanto com potencial inflamatório (HWANG et al., 2016). Entretanto, não se sabe se o consumo de dieta hiperlipídica induz ou não inflamação no intestino delgado, o que precisa ser investigado, principalmente porque, em caso afirmativo, a inflamação pode afetar a expressão de proteínas de junção dos enterócitos, aumentando a permeabilidade do epitélio intestinal na sua porção proximal (jejuno). A ação inflamatória pode alterar a regulação da expressão/conteúdo dos transportadores dos produtos de hidrólise dos

macronutrientes (BARRENETXE et al., 2013; VAVRICKA et al., 2006) o que pode nos ajudar a entender parte dos nossos resultados, obtidos com animais alimentados com dieta hiperlipídica e que, de uma maneira geral, são caracterizados pela diminuição da maioria dos transportadores de nutrientes orgânicos (macronutrientes): carboidratos, lipídios e peptídeos no epitélio intestinal desses animais (LOSACCO et al., 2018).

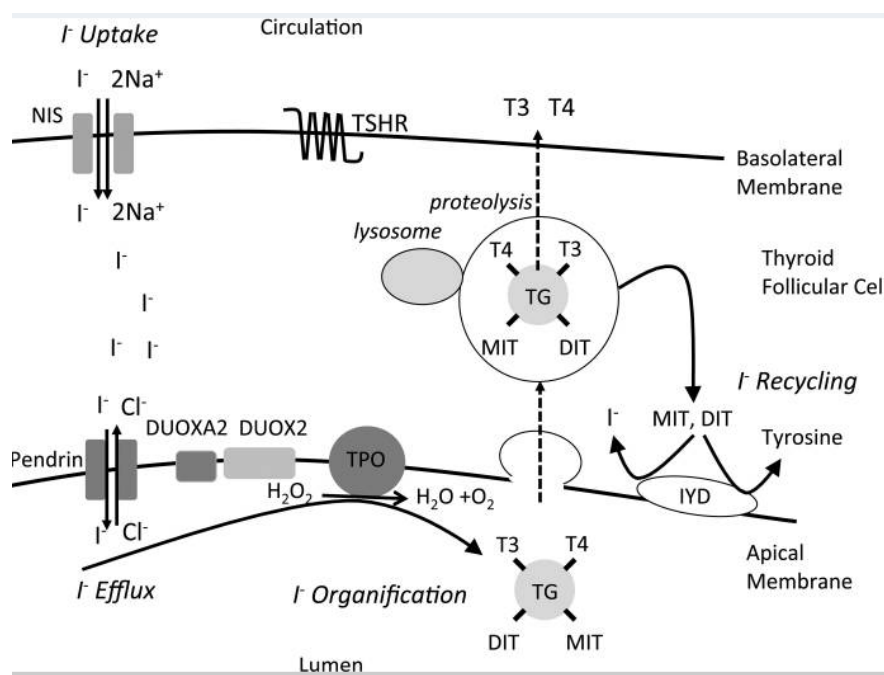
#### *1.4 Fisiologia dos hormônios tireoidianos*

Os hormônios tireoidianos (HTs) são essências para o crescimento e desenvolvimento de diversas estruturas orgânicas, por ex., sistema nervoso (SN), músculo esquelético e os intestinos, sendo assim essenciais no período intrauterino (PRÉAU et al., 2014; CASSAR-MALEK et al., 2007; LAURENT & YUN-BO, 2000). No período pós-natal, os HTs exercem ações metabólicas, regulando o metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas, além de ações regulatórias nos sistemas cardiovascular, respiratório, muscular esquelético, ósseo e digestório (MONDAL et al., 2016).

A biossíntese dos hormônios tireoidianos depende, essencialmente, de iodo proveniente da dieta, cuja ausência está associada com o hipotireoidismo. Na natureza, o iodo é encontrado principalmente em alimentos de origem marinha, mas para combater o bócio endêmico, que é uma condição que se estabelece por carência desse mineral, o iodo também é adicionado ao sal de cozinha (PEARCE et al., 2016). No trato gastrointestinal (TGI), por ação de bactérias, o iodo é reduzido a iodeto e é nesta forma que ele é absorvido no intestino delgado, principalmente, na porção do duodeno (YEAGER et al., 2017). Uma vez absorvido, o iodeto circula pelo corpo e, na tireoide, é captado pela proteína NIS (cotransportador  $\text{Na}^+/\text{I}^-$ ) e utilizado na biossíntese dos HTs.

Resumidamente, podemos dizer que a biossíntese dos HTs se processa da seguinte maneira, também ilustrado na figura 2: captação de iodeto pela NIS que utiliza o gradiente de sódio gerado pela  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase; transporte do iodeto para o coloide (substância amorfa que ocupa a luz dos folículos tireoidianos); oxidação do iodeto, incorporação do iodo à molécula de tireoglobulina (Tg) formando monoiodotirosina (MIT) e diiodotirosina (DIT); acoplamento dos MITs com DITs ou DITs com DITs, formando triiodotironina (T3) e tetraidotironina/tiroxina (T4), respectivamente; absorção do coloide e secreção dos HTs pelas células foliculares. Os processos de oxidação do iodeto, incorporação à Tg e acoplamento para formação do T3 e do T4 são catalisados pela tireoperoxidase (TPO), localizada na membrana apical das células foliculares. Convém salientar que a TPO é alvo de agentes farmacológicos, tais como o

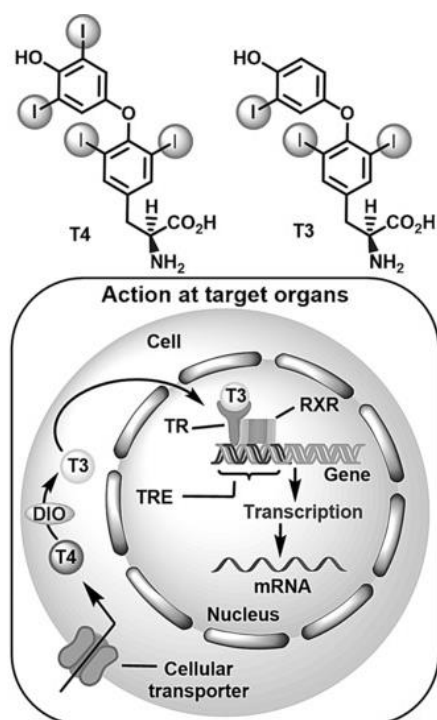
metimazol e propioliouracil/PTU. A síntese e a secreção dos HTs são reguladas pelo hormônio tireoestimulante (TSH) e pelo iodo (CARVALHO & DUPUY, 2017).



**Figura 2: Ilustração da biossíntese dos hormônios tireoidianos.** Inicia-se com a captação do iodeto mediada pela NIS, seguido pelo transporte do iodeto para o coloide via pendrina. O iodeto é convertido a iodo e incorporado a tireoglobulina para formação do T3 e T4. Segue-se com a absorção do coloide contendo T3 e T4 e secreção para a circulação. FONTE: (CANGU et al., 2018).

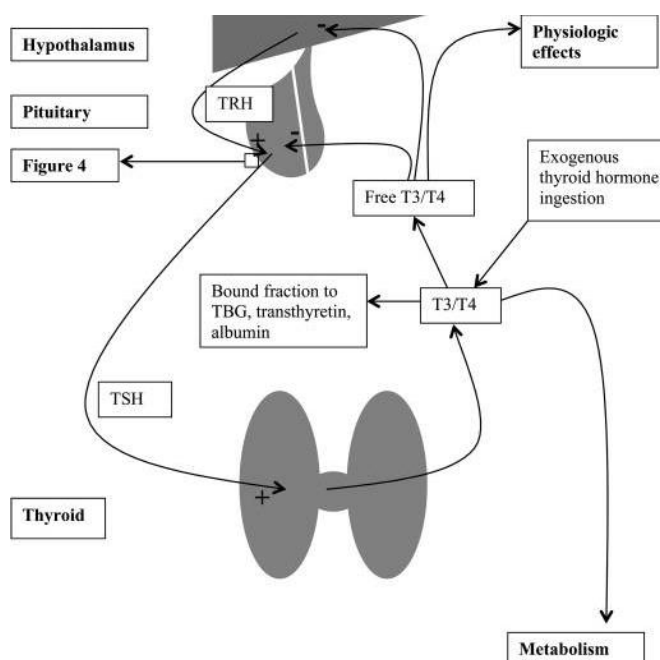
O T4 é o principal hormônio produzido pela tireoide, corresponde à cerca de 3/4, mas considerando que a afinidade do receptor nuclear dos HTs é maior para o T3 do que ao T4 e que as ações mais conhecidas dos HTs são mediadas pelo receptor nuclear, faz-se necessário à conversão do T4 à T3. Essa conversão é feita principalmente nos tecidos extra-tireoidianos por ação das enzimas desidases do tipo 1, 2 e 3 (CHO et al., 2017). A desidase1 (D1) é alvo farmacológico do PTU (TAUROG et al., 1995).

O mecanismo de ação dos HTs depende de receptores nucleares e extranucleares; contudo os efeitos mais discutidos na literatura são os dependentes da interação dos HTs com os receptores nucleares ilustrados na figura 3 (MONDAL et al., 2016). A partir da interação com os seus receptores, os HTs desencadeiam seus efeitos biológicos, tais como o controle do metabolismo energético, controle da temperatura corporal, crescimento e regulação de vários processos biológicos (ZHANG et al., 2017).



**Figura 3. Ilustração da ação dos hormônios tireoidianos.** No interior da célula, o T4 é convertido a T3 que se liga ao seu receptor nuclear, ativando ou reprimindo a expressão gênica. FONTE: adaptada de MONDAL et al, 2016.

Outra ação dos HTs é o controle do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide para manutenção da concentração sérica dos HTs. Esse controle é feito por retroalimentação negativa (*feedback negativo*) e depende da inibição da secreção do hormônio liberador de tireotrofina (TRH) de origem hipotalâmica e da inibição da secreção do TSH de origem hipofisária (figura 4). Dessa forma, numa condição de diminuição dos HTs (hipotireoidismo) se observa ativação desse eixo, caracterizado pela elevação do RNAm que codifica o TSH, aumento da síntese do TSH e da sua secreção para a circulação, enquanto que o oposto ocorre na condição de excesso dos HTs (hipertireoidismo). Existem outros hormônios que regulam o eixo hipotálamo-hipófise-tireoide, tais como a somatostatina, leptina, cortisol, entre outros (ORTIGA-CARVALHO et al., 2016).



**Figura 4. Controle do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide.** O TRH secretado pelo hipotálamo estimula a hipófise a secretar o TSH, que por sua vez, age na tireoide estimulando a síntese dos HTs. Os HTs secretados na circulação sistêmica inibem tanto a liberação do TRH quanto do TSH. FONTE: (HAMNVIK et al, 2011).

### 1.5 Os hormônios tireoidianos e o processo inflamatório

Os HTs, em especial o T3, exercem efeitos de supressão do processo inflamatório, mas os mecanismos responsáveis por essa supressão são pouco explorados. Sabe-se que proteínas desacopladoras (UCPs), tais como UCP-2 e UCP-3 atuam como antioxidantes, inibindo espécies reativas de oxigênio e que o T3 regula positivamente a expressão dos genes codificadores das UCPs, o que aumenta o conteúdo dessas proteínas nos tecidos alvos dos HTs, contribuindo para os seus efeitos de supressão da inflamação (KOWALTOWSKI et al., 1998; HOANG et al., 2015). Por outro lado, os estrogênios promovem inflamação por suprimir a expressão das UCPs (HIMA & SREEJA, 2015) o que reforça a importância dessas proteínas na regulação do processo inflamatório.

As espécies reativas de oxigênio (ERO) e as espécies reativas de nitrogênio (ERN) são os mais importantes pró-oxidantes e seu aumento está associado com dano ao DNA e a membrana plasmática. Por outro lado, enzimas como a superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase estão envolvidas com o bloqueio da produção e inativação das espécies reativas (MANCINI et al., 2016). O aumento de espécies reativas por desequilíbrio entre sua produção e inativação é denominado de estresse oxidativo (LANCASTER, 1992). Essa condição é observada tanto no hipotireoidismo quanto no hipertireoidismo, mas por mecanismos distintos, pois no hipotireoidismo se observa uma baixa disponibilidade de

antioxidantes, enquanto que no hipertireoidismo se observa aumento das espécies reativas de oxigênio (RESCH et al., 2002).

Outro achado que fortalece a ação do T3 na modulação é o aumento de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-6) no soro, músculo e tecido adiposo de ratos obesos, diabéticos e com função tireoidiana reduzida, que, quando tratados com T3, apresentaram melhora da sensibilidade insulínica e redução das citocinas pró-inflamatórias (PANVELOSKI-COSTA et al., 2016). Portanto, os HTs participam da regulação do processo inflamatório, especificamente, diminuindo esse processo, o que é muito relevante haja vista existe uma relação entre obesidade e diminuição da função tireoidiana (KIM et al., 2013; SANTINI et al., 2014).



## **2. JUSTIFICATIVA**

O processo inflamatório depende da interação de diversos fatores com células que pertencem ou não ao sistema imune. Na atualidade, cresce a relação entre obesidade e doenças não transmissíveis que podem ter sua origem num quadro inflamatório. Considerando que os constituintes da dieta, por ex. ácidos graxos saturados, interagem com receptores localizados em células intestinais, como os TLR-4, e que os ácidos graxos saturados são abundantes numa dieta hiperlipídica, é possível que essa interação possa causar uma inflamação com repercussão negativa sobre a expressão das proteínas de junção dos enterócitos, aumentando a permeabilidade intestinal. Adicionalmente, os HTs podem regular a expressão das proteínas de junção devido ao seu mecanismo de supressão da inflamação, o que pode impactar a integridade da barreira intestinal. Portanto, para se avançar na compreensão desses mecanismos, propomos este estudo.

### 3. OBJETIVO

Geral:

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a expressão de proteínas de junção de oclusão na porção proximal do intestino delgado (jejuno) de camundongos alimentados com dieta padrão (LFD) ou hiperlipídica (HFD) associado ou não aos distúrbios da tireoide.

Específicos:

- 1- Expressão gênica das proteínas de junção de oclusão: ZO-1, ZO-2, ZO-3, JAM-1, JAM-2, JAM-4, claudina 3, claudina 7, claudina 12, claudina 15 e ocludina (todos expressos no intestino delgado) apenas nos grupos LFD e HFD;
- 2- Conteúdo proteico dos genes alterados pelo consumo de HFD. Estudo conduzido com os seis grupos experimentais.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais e tratamento

As abordagens experimentais deste protocolo estão de acordo com os Princípios Éticos no Uso de Animais em Experimentação elaborados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação animal (CONCEA), e os procedimentos com os animais descritos no projeto foram aprovados pela CEUA-ICB (protocolo nº 119/2017).

Para este estudo, utilizamos camundongos da linhagem C57BL/6, machos e adultos, adquiridos do Centro de Bioterismo (FM, Rede USP de Biotérios). Os animais foram alojados no Biotério de experimentação do Departamento de Fisiologia e Biofísica, em gaiolas coletivas (5 animais/gaiola), mantidos em condições padronizadas de ciclo claro/escuro (12h claro, 12h escuro) e temperatura ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ), com água e ração *ad libitum*.

A partir dos dois meses de idade, os animais foram distribuídos em dois grupos experimentais: alimentados com dieta padrão (LFD) ou com dieta hiperlipídica (HFD), [composição das dietas na tabela 1], ambas obtidas da PRAGSOLUÇÕES Biociências (Jaú, SP). A quantidade de calorias ingerida e o peso corporal dos animais foram acompanhados semanalmente. No final de 12 semanas com as dietas específicas, os animais foram redistribuídos nos seguintes grupos experimentais:

- 1) LFD + Salina
- 2) LFD + T3 (0,25  $\mu\text{g/g}$ )
- 3) LFD + PTU (12,5 mg/Kg)
- 4) HFD + Salina
- 5) HFD + T3 (0,25  $\mu\text{g/g}$ )
- 6) HFD + PTU (12,5 mg/Kg)

O veículo (salina), T3 (triiodotironina) e PTU (propiltiouracil) foram injetados por via subcutânea (região do dorso), num volume de  $\pm 0,1 \text{ mL} / 10 \text{ g}$  de peso corporal, uma vez ao dia por 30 dias consecutivos após a 12ª semana. O T3 e o PTU foram utilizados para indução do hiper e hipotireoidismo, respectivamente, e a concentração desses fármacos, necessários para a indução desses estados, foram determinadas a partir da literatura vigente (LOSACCO et al., 2018). Durante o tratamento com veículo, T3 e PTU, os animais foram alimentados com LFD ou HFD e acompanhados semanalmente quanto à ingestão calórica e ao peso corporal.

**Tabela 1.** Composição das dietas LFD e HFD

Ingredientes	LFD	HFD
	(g/Kg)	
Caseína	189.6	258.4
L-Cisteína	2.8	3.9
Amido de milho	413.1	-
Amido de milho dextrinizado	161.5	161.5
Sacarose	88.9	88.9
Celulose	54.6	71.4
Óleo de soja	23.7	32.3
Banha	18.9	316.6
Mineral mix AIN93M	35	47.9
Vitamina mix AIN93M	10	13.7
Bitartarato de colina	1.9	2.6
	Kcal (%)	
Proteína	20	20
Carboidrato	70	20
Lipídios	10	60

**Fonte:** Belchior et al, 2015.

No final do tratamento com salina, T3 e PTU, os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação, sob efeito anestésico (inalação de ar saturado com isoflurano), e os seguintes órgãos e tecidos foram removidos: hipófise, sangue (soro), coração, gordura perigonadal, tibia e intestino delgado. A hipófise foi utilizada para análise da expressão gênica do *Tshb* (confirmar estado hipo e hipertireoideo), e o coração e a gordura foram pesados e seu peso normalizado pelo comprimento da tibia (parâmetros funcionais – explicados na seção de resultados). O comprimento do intestino delgado foi mensurado, anotado, e parte dele removido para análise da expressão gênica e, posteriormente, análise proteica.

#### 4.2 Isolamento do epitélio intestinal

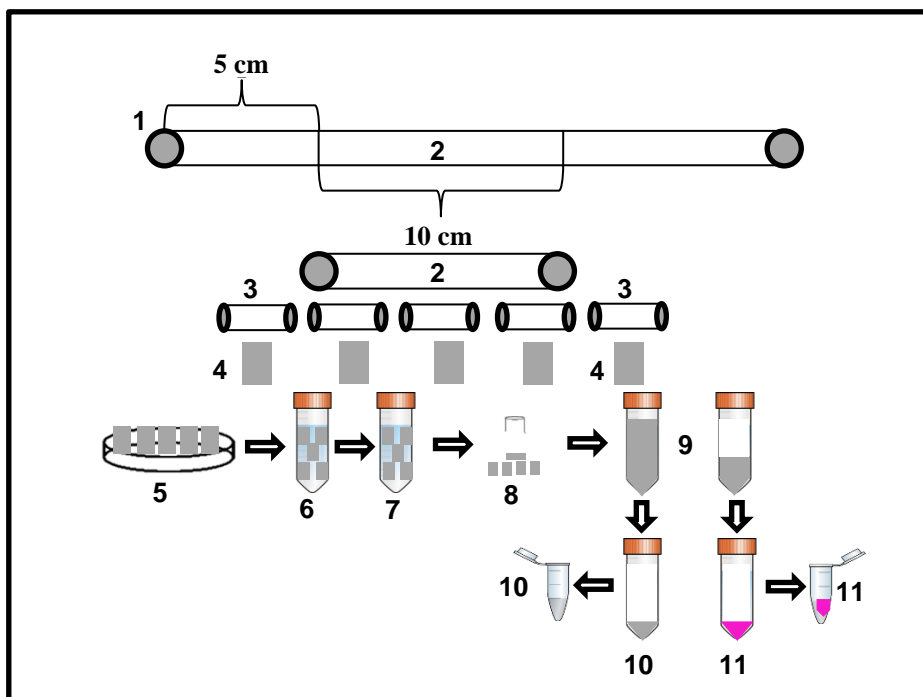
O intestino, porção do jejuno, foi removido, aberto para expor a mucosa intestinal e limpo com salina para remoção do conteúdo luminal. Nós descartamos os cinco centímetros (cm) iniciais do intestino proximal a partir do piloro e coletamos os 10 centímetros seguintes (DESESSO; JACOBSON, 2001).

O protocolo para separar o epitélio absorptivo da mucosa intestinal foi adaptado de Santos, Curi e Fava-de-Morais (1992) e está ilustrado na figura 5. Resumidamente, os pedaços de intestino foram colocados em solução de lavagem (3.2 mM de DTT e 3 mM de azida sódica diluídos em salina) por cinco minutos em temperatura ambiente (TA), seguido por tampão fosfato-salina (PBS) por 20 minutos à 4 °C e, na sequência, agitação (200 rpm) em solução contendo: 0,5 mM de DTT e 1.5 mM de EDTA, sem cálcio e magnésio, diluído- em PBS à 37 °C por 1 h (*Orbital Shaker, ThermoScientific, Modelo 420*).

No final da agitação, os fragmentos de intestino foram descartados e o líquido, contendo o epitélio, foi transferido para um tubo cônico de 50 mL e centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos à 4 °C (*Centrifuga Eppendorf, Modelo 5804 R*). O precipitado/pellet que corresponde ao epitélio intestinal foi dissolvido em 500 µL Trizol® para extração do RNA total e 500 µL de tampão RIPA para extração de proteína. A eficiência de isolamento do epitélio intestinal dos camundongos foi confirmada pela técnica de coloração por HE (LOSACCO et al., 2018).

#### *4.3 Extração do RNA total*

A extração do RNA das hipófises e do intestino foi realizada como se segue: As hipófises foram retiradas dos animais e homogeneizadas em 300 µL de Trizol® e o epitélio do intestino homogeneizado em 500 µL de Trizol®. Em cada amostra foi adicionado 60 µL de clorofórmio, seguido por agitação por 15 segundos, incubação em TA por 3 minutos e centrifugação (12,000 g/ 15 min/ 4 °C). A fase transparente do sobrenadante foi transferida para um novo microtubo, onde foram adicionados 150 µL de álcool isopropílico, agitado em vórtex e incubado por 10 min em TA. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12,000 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e, no precipitado, foram adicionados 300 µL de etanol 75%, agitado em vórtex até o precipitado se desprender do tubo, e centrifugado a 7,500 g por 5 min a 4 °C. No final, o sobrenadante foi descartado e o microtubo foi levado à secadora à vácuo por 5 min para remover o excesso de líquido na parede do tubo e liofilizar o produto do tubo.



**Figura 5. Isolamento do epitélio intestinal.** 1 – Píloro; 2 – Jejuno cortado; 3 – Fragmentos de jejuno; 4 – Fragmentos de jejuno com mucosa exposta; 5 – Lavagem com salina na placa de Petri; 6 – Solução de lavagem no tubo cônico; 7 – Solução de incubação no tubo cônico; 8 – Erlenmeyer para agitação mecânica; 9 – Solução filtrada em tubo cônico seguido de centrifugação; 10 – Pellet homogeneizado com tampão RIPA e armazenado em eppendorf ; 11 – Pellet homogeneizado com Trizol e armazenado em eppendorf livre de RNases e DNases.

#### 4.4 Quantificação e integridade do RNA

Os tubos com as amostras liofilizadas foram colocados no gelo e 20  $\mu\text{L}$  de água tratada com dicarbonato de dietila (água DEPC) foram adicionados a cada tubo. Os tubos foram agitados em vórtex, colocados no Banho Maria a 65  $^{\circ}\text{C}$  por 10 min, agitados novamente e colocados rapidamente em microcentrífuga para decantar o líquido espalhado na parede do tubo. Para quantificação, um (1)  $\mu\text{L}$  da amostra foi aplicado em cada pocinho da placa de leitura e levada ao espectrofotômetro EpochBiotek para determinação da concentração ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) e da pureza (razão 260/280) do RNA das amostras por meio do programa Gen 5.10. Antes da leitura das amostras, o aparelho foi calibrado e zerado com água DEPC. Consideramos como razão adequada (indicador do grau de pureza do RNA), os valores das amostras entre 1,8 a 2,0. Para checar a integridade dos RNAs, aplicamos 1  $\mu\text{g}$  de RNA total em cada poço do gel de agarose 1% e submetidas à eletroforese. Somente foram consideradas aptas para a transcrição reversa, as amostras cujos RNAs ribossomais 28S e 18S estavam visíveis no final da eletroforese. As bandas dos RNAs foram visualizadas no fotodocumentador.

#### 4.5 Transcrição reversa

Para a transcrição reversa, 1 µg do RNA total, previamente tratado com DNase, foi acrescido de 0,5 µg de Randon Primer. Esta mistura foi mantida a 65 °C por 10 min, seguido de 4 °C por 5 min. Em seguida, foi adicionado 10 nM de dNPTs (Desoxirribonucleotídeos Fosfatados), 4 µL do tampão da enzima (50 mM de Tris-HCl pH 8,3, 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT) e 1 µL da enzima M-MLV Transcriptase Reversa. Essa mistura de RNA e reagentes foi incubada a 37 °C por 1 hora. Para inativação da enzima, essa mistura foi aquecida a 72 °C por 15 min. O produto de RT foi então estocado a -20 °C.

#### 4.6 PCR em tempo real – amplificação

Para a amplificação do produto de RT, foram adicionados 5 µL SYBR Green e 10 nM dos *primers sense* e *anti-sense* (Tabela 2). O processo de amplificação envolve três etapas: desnaturação da fita dupla (95 °C / 15 s), anelamento dos *primers* (60 °C / 15 s) e extensão do fragmento de DNA (72 °C / 30 s), formando uma nova dupla fita. As três etapas correspondem a um ciclo e, para adequada amplificação do nosso fragmento, foram realizados 40 ciclos no termociclador (*CorbettRotorGene*).

A velocidade de amplificação, em tempo real, foi detectada por meio do *Software Rotor-Gene Q*. O cálculo para análise da expressão relativa dos genes foi realizado de acordo com o método descrito por Livak e Schmittgen (2001). Os *primers* utilizados no PCR foram desenhados e checados com o auxílio dos seguintes websites: *Rat Genome Database* (rgd.mcw.edu); *Blast* (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) e *Primer-blast* (ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast).

#### 4.7 Extração e quantificação de proteína

O precipitado resultante do isolamento do epitélio intestinal foi homogeneizado em 500 uL de tampão RIPA [NaCl 150 mM, desoxicolato de sódio a 0,5%, Tris · HCl 50 mM, pH 8, SDS 0,1%, Nonidet P-40 a 0,1% P-40, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 2 mM, NaF 10 mM suplementado com inibidores de protease (*Roche Diagnostics*)] e centrifugado a 13000 rpm por 20 minutos a 4° C (centrífuga 5804 R, Eppendorf, Alemanha). O sobrenadante foi coletado, distribuído em várias alíquotas e armazenado a -80° C para posterior análise. Para quantificação das proteínas, utilizamos o método de Bradford.

**Tabela -2: relação dos *primers* utilizados para o PCR em tempo real.**

Gene	Proteína	Sense (5'>3')	Antisense (5'>3')
<i>Tjp1</i>	ZO-1	GCCTGCTAAGCCAGTCCATT	CAGTTTCGGGTTTTCCCTTTGA
<i>Tjp2</i>	ZO -2	GAGACCGCGGGTTCCCA	TTGGAATCCTTCTGCAGGGTC
<i>Tjp3</i>	ZO -3	CCCCTTGTGATGAAAGCTGG	GGGGGTCCTTGTACAGTGTG
<i>F11r</i>	JAM -1	AACTGTAATGGGCACCGAGG	AGTGTACACCGAACCCCTTGC
<i>Jam 2</i>	JAM -2	TTCATCTCTTGTTCCTTGTTCAGTT	ACCAACCAATGATAGTTCCACCA
<i>Igsf5</i>	JAM -4	GGATGCTGAGAGGTCCAAGG	AAGGTTAAGCACCACAGGCT
<i>Cldn3</i>	Claudina 3	ACAGACGACACACAGTCTGC	CAGTTCCTAGGCCCGGTAGT
<i>Cldn7</i>	Claudina 7	CAGGTCTTGCTGCCTTGTA	CTCGTACTTAACGTTTCATGGGC
<i>Cldn12</i>	Claudina12	AATCCTCAGTGGGTGTGCTG	AGCTGAGAAAAGGACAGAGACA
<i>Cldn15</i>	Claudina15	AACGTGGGCAACATGGATCT	CCACAGGCTCCAGCAAGTAT
<i>Ocln</i>	Ocludina	CGGAGCAACCGGCTAGG	CGGACATGGCTGATGTCACT

#### 4.8 WesternBlotting

Após quantificação proteica, 50 ug de proteínas totais foram aquecidas e submetidas à eletroforese em SDS-PAGE a 8% e 12%. Aplicamos o marcador molecular na primeira faixa do gel para identificarmos as proteínas de interesse (Sinapse Biotecnologia, Inc., Brasil). Após eletroforese, as proteínas do gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose (*Bio-Rad Laboratories, Inc., EUA*). Em seguida, as membranas foram coradas com Ponceau S digitalizado e bloqueado com 5% de leite desnatado dissolvido em PBS mais Tween 20 a 0,1% (PBST) sob agitação constante e em temperatura ambiente por 1 h. Após bloqueio, as membranas foram incubadas *overnight* com anticorpo primário.

As membranas foram lavadas quatro vezes com PBST, incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (Jackson Laboratórios de pesquisa, Inc., EUA) por 75 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram lavadas quatro vezes com PBST e submetidas à quimioluminescência (ECL). Os blots foram capturados por meio do sistema de documentação fotográfica (*Healthcare Amershan 600, GE Healthcare Company, Reino Unido*) e quantificados usando o programa Image J (*National Institute of Health, EUA*). A normalização foi feita com as membranas coradas com Ponceau.

#### 4.9 Análise estatística

Os dados obtidos a partir dos experimentos estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP). Considerando que os animais foram alimentados ou com LFD ou com HFD (uma variável) e que tanto os animais com LFD quanto os animais com HFD receberam salina, T3

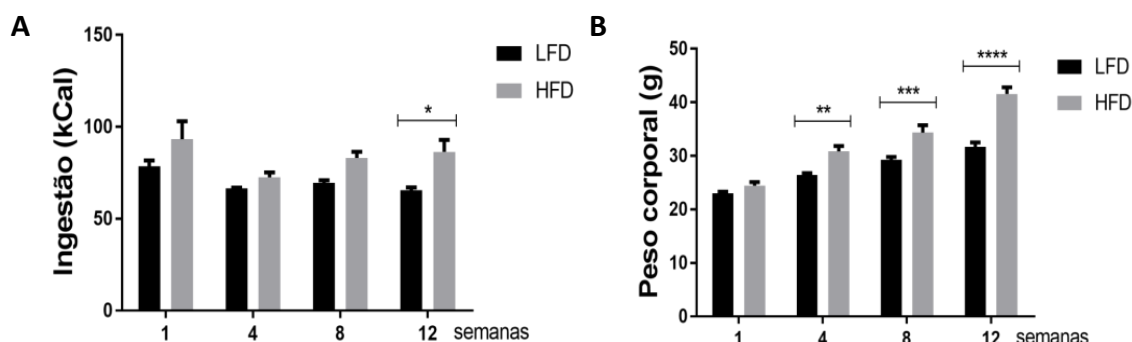


ou PTU (outra variável), optamos pelo ANOVA two-way. O pós-teste utilizado foi o de Tukey ou Sidak. Para os experimentos de PCR em tempo real, utilizamos o teste t de Student não pareado. Os detalhes dos testes estatísticos estão descritos na legenda. Os resultados foram considerados com significância estatística quando o “p” foi menor que 0,05. O programa utilizado para os testes estatísticos foi o GraphPad Prism, versão 7.0

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Parâmetros morfofuncionais: avaliação da efetividade da HFD na indução da obesidade e dos tratamentos com PTU e T3 para indução do hipo e hipertireoidismo, respectivamente.

Inicialmente, avaliamos de maneira temporal a ingestão calórica e o peso corporal dos animais nos tempos de 1, 4, 8 e 12 semanas (Fig. 6-A e 6-B). Observamos que, desde a primeira até a 12ª semana, houve um aumento do consumo de calorias pelos animais alimentados com HFD em relação aos seus controles (LFD). Entretanto, esse aumento foi estatisticamente significativo somente na 12ª semana ( $p < 0,05$ ). Em paralelo ao maior consumo de calorias, observamos um aumento gradual do peso corporal dos animais, estatisticamente significativo a partir da 4ª até a 12ª semana, indicando que quanto maior o consumo energético, maior o ganho de peso, o que era esperado nesse modelo.

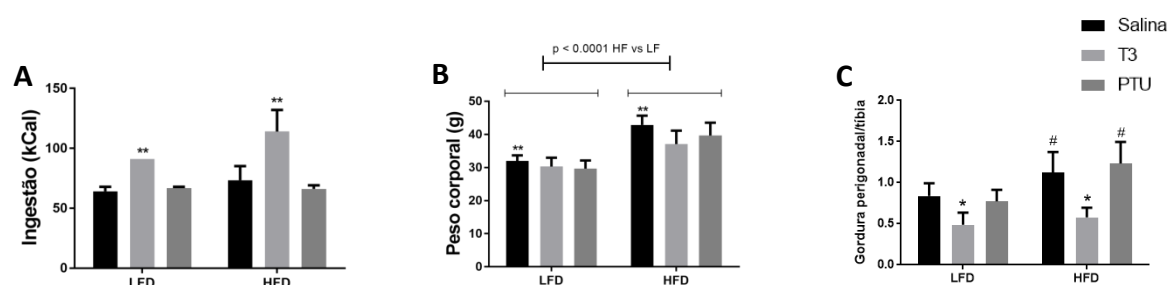


**Figura 6: Análise temporal da ingestão calórica e do peso corporal.** A ingestão calórica (A) e o peso corporal (B) dos camundongos foram registrados na 1ª, 4ª, 8ª e 12ª semanas após a introdução da LFD e HFD. O “N” amostral corresponde a 15 animais/grupo. Os dados foram submetidos à estatística: ANOVA dois fatores, seguida do pós-teste de Sidak, comparando apenas o grupo LFD com o HFD em cada semana. **A:** \*  $p < 0,05$  (12ª semana), e **B:** \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

A partir da 12ª semana, tanto os animais alimentados com LFD quanto os com HFD foram tratados com salina, T3 e PTU durante 30 dias consecutivos. Observamos ao final desse tratamento que os animais tratados com T3 apresentaram aumento do consumo calórico em relação aos animais tratados com salina ou PTU, independente da dieta (Fig. 7-A). Esse efeito do T3 era esperado, pois ele exerce uma ação central orexígena (hipotálamo) ao regular a expressão de mediadores químicos envolvidos com o controle da ingestão alimentar: fome/saciedade (ORTIGA-CARVALHO et al., 2016) e por aumentar a taxa metabólica basal, o que aumenta a demanda por substratos energéticos (MULLUR et al., 2014).

Já em relação ao peso corporal desses animais, observamos que aqueles que foram alimentados com HFD apresentaram maior peso corporal em relação aos alimentados com LFD, independente do tratamento, ação que está atrelada ao maior consumo calórico. Contudo, os animais tratados com T3 ou PTU apresentaram uma pequena redução do peso corporal em relação aos animais tratados com o veículo/salina, conforme se vê na figura (Fig. 7-B). Sabe-se que o T3 aumenta a degradação dos lipídios e proteínas nos seus sítios de estoque, ação que leva a diminuição da massa corporal (CICATIELLO et al., 2018; RIIS et al., 2005), enquanto o hipotireoidismo (induzido pelo PTU) leva à redução da expressão do hormônio do crescimento (GH) que é um importante estimulador do anabolismo no músculo esquelético (BARGI-SOUZA et al., 2017). Essas ações podem explicar o resultado obtido com o T3 e PTU em relação ao peso corporal dos animais.

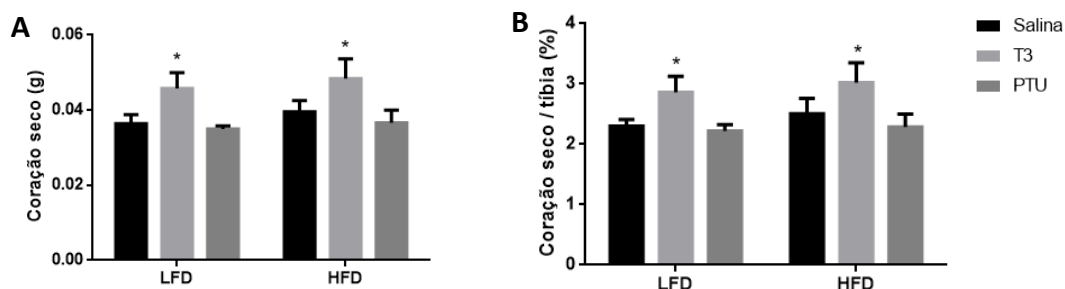
Adicionalmente, nós observamos que o tratamento com T3 levou à redução da gordura perigonadal (Fig. 7-C), o que reforça que o tratamento com T3 foi efetivo na indução do hipertireoidismo, pois está muito bem estabelecido que o T3 exerce uma potente ação lipolítica no tecido adiposo (CICATIELLO et al., 2018).



**Figura 7: Parâmetro morfofuncional: Análise da ingestão calórica, do peso corporal (PC) e da gordura perigonadal.** A ingestão calórica (A) e o peso corporal (B) dos camundongos foram registrados após os 30 dias de tratamento com salina, T3 ou PTU, o que coincidiu com 16ª semana de LFD e HFD. Após eutanásia, a gordura perigonadal foi removida, pesada e normalizada pelo comprimento da tíbia (C). O “N” amostral corresponde a 10 animais/grupo. Os dados foram submetidos à estatística: ANOVA dois fatores. **A:** \*\*  $p < 0,01$  vs salina e PTU; **B:** \*\*  $p < 0,01$  vs T3 e PTU (apenas tratamento), e \* $p < 0,0001$ : LFD vs HFD (apenas dieta); e **C:** \*  $p < 0,0001$  vs salina e PTU.

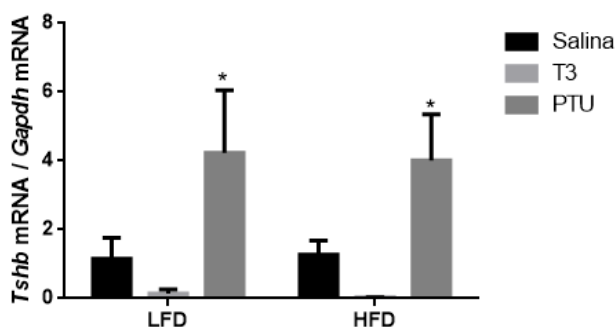
Outro parâmetro analisado foi à massa cardíaca dos animais, pois se sabe que o T3 exerce ações de extrema relevância no coração que interferem com a morfologia e com o funcionamento cardíaco. Conforme apresentado na Fig. 8, observamos que o T3 aumentou o peso seco (8-A) e a razão coração/tíbia (8-B) dos animais em relação aos grupos salina e PTU. Considerando que a HFD afeta o peso corporal dos animais, nós optamos pela correção da

massa cardíaca pelo comprimento da tíbia que não sofre interferência da dieta. Em relação ao resultado obtido, essa ação era esperada, pois se sabe que o T3 aumenta a massa cardíaca dos animais (DILLMANN, 2010) e, portanto, esse aumento indica que o tratamento com T3 foi efetivo na indução do hipertireoidismo.



**Figura 8: Parâmetro morfofuncional: Análise da massa cardíaca.** Peso seco do coração (A) e razão coração seco/tíbia (B). O coração foi removido após eutanásia dos animais e seco em estufa por 72 horas. O “N” amostral corresponde a 5 animais/grupo. Os dados foram submetidos à estatística: ANOVA dois fatores. **A:** \*  $p < 0,0001$  vs salina e PTU; e **B:** \*  $p < 0,0001$  vs salina e PTU.

Em relação à expressão gênica do *Tshb* (Fig. 9), forte indicador da função tireoidiana, observamos que o PTU promoveu aumento da sua expressão tanto nos animais alimentados com LFD quanto HFD, quando comparado com o grupo salina e T3. Já o tratamento com T3, quando comparado ao grupo salina, não apresentou diferença estatística. Contudo, se observamos os gráficos dos grupos salina e T3, identificaremos uma nítida diferença de expressão gênica do *Tshb* entre os animais salina e T3. Possivelmente, a falta de força estatística está relacionada ao baixo N amostral (novos experimentos serão conduzidos antes da publicação dos dados). De qualquer forma, os dados do *Tshb* indicam claramente uma condição de hipotireoidismo e hipertireoidismo, efeito que era esperado e que está de acordo com a literatura (ORTIGA-CARVALHO et al., 2016). Além disso, a condição de hipertireoidismo é reforçada pela presença de hipertrofia cardíaca, redução da adiposidade e hiperfagia, achados que indicam que o protocolo de indução de hipo e hipertireoidismo foi efetivo.



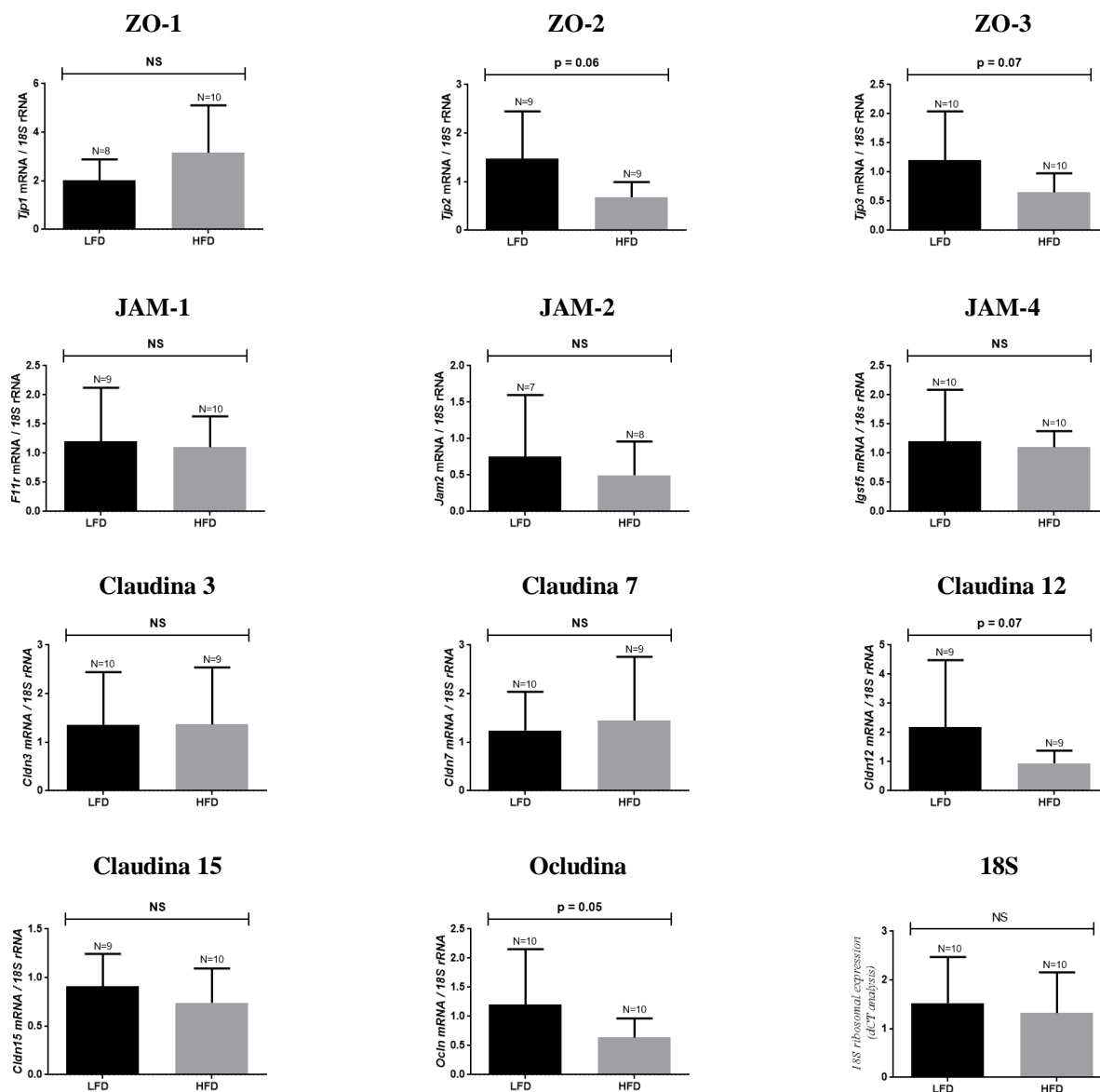
**Figura 9: PCR em tempo real para o gene do *Tshb*:** RNA total extraído da hipófise de camundongos alimentados com LFD ou HFD por 16 semanas e tratados com salina, T3 e PTU. O “N” amostral foi de 2 a 4 por grupo experimental. Os genes de interesse foram normalizados pelo gene do *Gapdh* (constitutivo). Os dados foram submetidos à análise estatística: ANOVA dois fatores, seguido de pós-teste de Tukey. \*  $p < 0,001$ .

## 5.2 Conteúdo dos mRNAs e das proteínas das junções de oclusão no epitélio do intestino delgado.

Um dos nossos objetivos foi avaliar a expressão das proteínas de junção presentes no epitélio do intestino delgado. Essas proteínas de junção formam a barreira intestinal que, quando danificada no intestino grosso, permite a passagem de macromoléculas com potencial antigênico, tais como toxinas (LPS) para a circulação, contribuindo com a instalação da inflamação sistêmica de baixo grau. Essa inflamação sistêmica é uma condição que cursa com a obesidade (DINH et al., 2016). Portanto, avaliar a expressão das proteínas que formam a barreira intestinal nos permitirá identificar se há dano nessa estrutura na nossa condição experimental de consumo de HFD.

Primeiramente, nós fizemos um levantamento na literatura das proteínas que formam as junções oclusivas (*tight junctions*) no intestino delgado e observamos que algumas dessas proteínas são expressas apenas no intestino delgado, enquanto outras são expressas no intestino grosso (HWANG et al., 2013). As proteínas de junção expressas no intestino delgado são a ZO-1, ZO-2, ZO-3, JAM-1, JAM-2, JAM-4, claudina 3, claudina 7, claudina 12, claudina 15 e ocludina. Considerando a grande quantidade de proteínas de junção expressas nesse segmento, optamos por uma análise prévia do padrão de expressão dos genes codificantes dessas proteínas por PCR em tempo real apenas entre os animais alimentados com LFD ou HFD.

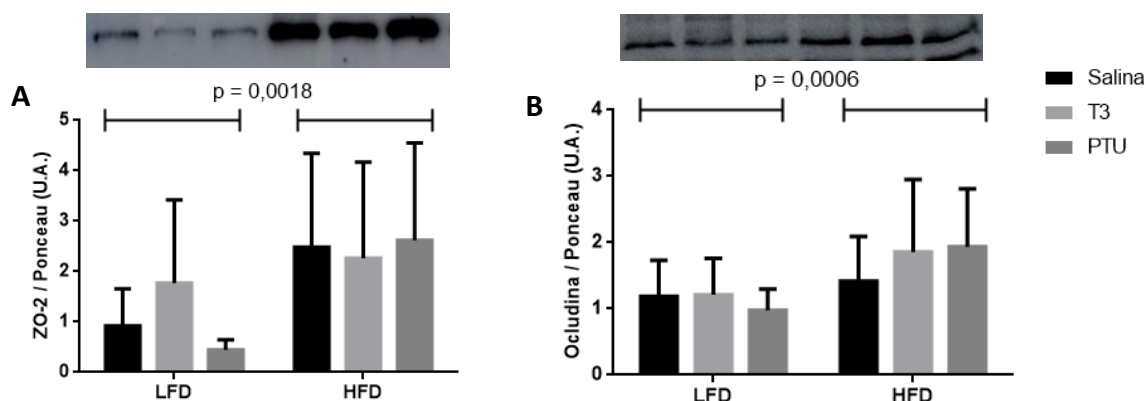
Em relação aos resultados do PCR em tempo real, não observamos qualquer alteração do conteúdo dos seguintes mRNAs: ZO-1 ( $p=0,17$ ), ZO-3 ( $p=0,07$ ), JAM-1 ( $p=0,84$ ), JAM-2 ( $p=0,95$ ), JAM-4 ( $p=0,42$ ), claudina 3 ( $p > 0,999$ ), claudina 7 ( $p > 0,999$ ), claudina 12 ( $p=0,07$ ) e claudina 15 ( $p=0,43$ ). Por outro lado, observamos que apenas os mRNAs para proteínas ZO-2 ( $p=0,06$ ) e ocludina ( $p=0,05$ ) apresentaram diminuição do seu conteúdo, com valor de “p” próximo da significância. Com base nesses achados, optamos por avaliar o conteúdo das proteínas codificadas por esses mRNAs.



**Figura 10: PCR em tempo real para os genes codificadores de proteínas da junção de oclusão:** RNA total extraído do intestino de camundongos alimentados com LFD ou HFD por 12 semanas e submetido ao PCR em tempo real. O “N” amostral consta acima de cada gráfico assim como o nome da proteína cujo gene foi avaliado. Os genes de interesse foram normalizados pela 18s (constitutivo). Os dados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP). Com exceção da 18s, todos os dados foram submetidos ao teste não paramétrico (Mann-Witney test).

Em relação ao conteúdo de proteínas de junção cujo RNA foi alterado pela HFD, observamos que o consumo da HFD promoveu aumento tanto do conteúdo da ZO-2 quanto da ocludina. O tratamento com salina, T3 ou PTU não afetou a expressão proteica da ZO-2 ou da ocludina. Os dados estão apresentados na Figura 11. Com base nos achados, percebe-se uma nítida discrepância de conteúdo entre proteína-mRNA, uma vez que o mRNA da ZO-2 e da

occludina estão reduzidos, enquanto que o conteúdo proteico de ZO-2 e da occludina está aumentado no grupo HFD. Possivelmente, o consumo da HFD favoreça um maior recrutamento dos transcritos para a maquinaria traducional, levando à redução do seu conteúdo para manter a alta síntese proteica de ZO-2 e occludina.



**Figura 11: Western blotting para proteínas de junção de oclusão:** Conteúdo de ZO-2 (A) e occludina (B) no epitélio intestinal de camundongos alimentados com LFD ou HFD e tratados com salina, T3 e PTU. Conteúdo de proteínas corrigidas pelo arraste do Ponceau S e expressos em unidades arbitrárias (U.A.). O “N” amostral de 10 a 13 animais por grupo. Os blots correspondentes estão posicionados acima dos gráficos. Os dados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP), submetidos à ANOVA duas vias. O valor de “p” consta acima do gráfico.

Diferente do observado no intestino grosso por Kim (2012), onde o conteúdo da occludina diminuiu frente à ingestão de HFD, no intestino delgado, a exposição crônica aos produtos da hidrólise lipídica aumentou o conteúdo da ZO-2 e da occludina, duas proteínas relevantes no processo de adesão célula-célula e formação da barreira intestinal. Portanto, essa alteração pode repercutir na permeabilidade intestinal, caso essa occludina esteja posicionada na membrana plasmática das células epiteliais. Cabe aqui ressaltar que num estudo conduzido com o segmento do íleo de ratos (porção mais distal do intestino delgado), observou-se aumento do conteúdo da occludina no citoplasma dos enterócitos associado com aumento da permeabilidade do íleo e da concentração do LPS circulante (de La SERRE et al., 2010). Por outro lado, num outro estudo, observou-se uma redução da proteína occludina no íleo terminal de camundongos, seguido pelo aumento da endotoxemia, sugerindo aumento da permeabilidade intestinal (GRUBERET al., 2013). Esses dois achados sinalizam que mais estudos são necessários para que possamos entender o impacto do aumento da ZO-2 e da occludina na funcionalidade da barreira intestinal

## 6 CONCLUSÕES

Com base nos dados produzidos até o momento, concluímos que a ingestão de HFD aumenta o conteúdo das proteínas de junção de oclusão (ZO-2 e ocludina) na porção proximal do jejuno, o que pode contribuir com uma menor permeabilidade e menor passagem de moléculas por via paracelular. Convém salientar que esse segmento do intestino corresponde ao principal local de digestão e absorção das macromoléculas que, caso tenham acesso direto ao interstício-vascular por via paracelular, poderiam alterar a dinâmica funcional das células de defesas desse segmento com possíveis repercussões sobre os processos de absorção.



## REFERÊNCIAS\*

- AICELES, V.; DA FONTE RAMOS, C. A link between hypothyroidism, obesity and male reproduction. *Horm Mol Biol Clin Investig.* v. 25 p. 5-13, 2016.
- APOVIAN, CM. Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden. *Am J Manag Care.* v. 22 p. 176-85, 2016.
- ARAÚJO, JR.; TOMAS, J.; BRENNER, C.; SANSONETTI, PJ. Impact of high-fat diet on the intestinal microbiota and small intestinal physiology before and after the onset of obesity. *Biochimie.* v.141 p 97-106, 2017.
- BARGI-SOUZA, P.; GOULART-SILVA F.; NUNES, MT. Novel aspects of T3 actions on GH and TSH synthesis and secretion: physiological implications. *J MolEndocrinol,* v.59, p. 167-178, 2017.
- BARMEYER, C.; SCHULZKE, JD.; FROMM, M. Claudin-related intestinal diseases. *Semin Cell DevBio.*v. 42 p. 0-8, 2015.
- BARRENETXE, J.; SÁNCHEZ, O.; BARBER, A.; GASCÓN, S.; RODRÍGUEZ-YOLDI, M. J.; LOSTAO, M. P. TNF. Regulates sugar transporters in the human intestinal epithelial cell line Caco-2. *Cytokine,* v. 64, p. 181-187, 2013.
- BELCHIOR, T; PACHOAL, VA; MAGDALON, J; CHIMIN, P. Omega-3 fatty acids protect from diet-induced obesity, glucose intolerance, and adipose tissue inflammation glucose intolerance, and adipose tissue inflammation. *Mol. Nutr. Food* v. 6 p. 1-11, 2015.
- BOLES, A.; KANDIMALLA, R.; REDDY, PH. Dynamics of diabetes and obesity: Epidemiological perspective. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.*v. 1863 p 1026-1036, 2017.
- CÂNDIDO, FG.; VALENTE, FX.; GRZEŚKOWIAK, ŁM.; MOREIRA, APB; ROCHA, DMUP.; ALFENAS, RCG. Impact of dietary fat on gut microbiota and low-grade systemic inflammation: mechanisms and clinical implications on obesity. *Int J FoodSciNutr.*v. 69 p. 125-143, 2018.
- CARVALHO, DP.; DUPUY, C. Thyroid hormone biosynthesis and release. *Mol Cell Endocrinol.* v. 15 p. 6-15, 2017.
- CASSAR-MALEK, I.; PICARD, B.; KAHL, S.; HOCQUETTE, JF. Relationships between thyroid status, tissue oxidative metabolism, and muscle differentiation in bovine fetuses. *Domest Anim Endocrinol.* v. 33 p. 91-106, 2007.
-

- \*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NRB 6023: Informação e documentação: referências: elaboração: Rio de Janeiro, 2002. 24p.
- CASTRO, AG; KIM, K; HAMIDI, S; EWING, R. Obesity and the built environment at different urban scales: examining the literature. *Nutrition Reviews*, v. 75, p. 51–61, 2017.
- CHO, YY.; KIM, HJ.; JANG, HW.; KIM, TH; KI, CS. KIM, SW.; CHUNG, JH. The relationship of 19 functional polymorphisms in iodothyronine deiodinase and psychological well-being in hypothyroid patients. *Endocrine*. v. 57 p. 115-124, 2017.
- CICATIELLO, AG.; DI GIROLAMO, D.; DENTICE, M. Metabolic effects of the intracellular regulation of thyroid hormone: Old players, new concepts. *Front Endocrinol (Lausanne)*, v.9, p.474, 2018.
- DENG, T.; LYON, CJ.; BERGIN, S.; CALIGIURI, MA.; HSUEH, WA. Obesity, Inflammation, and Cancer. *Annu Rev Pathol*. v. 11 p. 421-49, 2016.
- DI SPIEZIO, A.; SANDIN, ES.; DORE, R.; MÜLLER-FIELITZ, H.; STORCK, SE.; BERNAU, M.; MIER, W.; OSTER, H.; JÖHREN, O.; PIETRZIK, CU.; LEHNERT, H.; SCHWANINGER, M. The LepR-mediated leptin transport across brain barriers controls food reward. *MolMetab*. v. 8 p. 13-22, 2018.
- DILLMANN, W. Cardiac Hypertrophy and thyroid hormone signaling. *Heart Fail Rev*, v. 15, p. 125-132, 2010.
- DING, S.; CHI, M. M.; SCULL, B. P.; RIGBY, R.; SCHWERBROCK, N.M.; MAGNESS, S.; JOBIN, C.; LUND, P.K. High-Fat Diet: Bacteria interactions promote intestinal inflammation which precedes and correlates with obesity and insulin resistance in mouse. *PLoS ONE*, v. 5, p. e12191, 2010.
- EL AIDY, S.; VAN DEN BOGERT, B.; KLEEREBEZEM, M. The small intestine microbiota, nutritional modulation and relevance for health. *Curr Opin Biotechnol*. v. 32 p. 14-120, 2014.
- GRUBER, L; KISLING, S; LICHTI, P; MARTIN, FP; MAY, S; KLINGENSPOR, M; LICHTENEGGER, M; RYCHLIK, M; HALLER, D. High fat diet accelerates pathogenesis of murine Crohn's disease like ileitis independently of obesity. v. 8 p 8-16, 2013.
- GÜNGÖR, NK. Overweight and Obesity in Children and Adolescents. *Pediatr Endocrinol*, v. 6, p. 129-143, 2014.
- HEIANZA, Y; QI, L. Gene-Diet Interaction and Precision Nutrition in Obesity. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, p. 787, 2017.

- HIMA S., SREEJA S. Regulatory role of estrogen-induced reactive oxygen species in the modulatory function of UCP 2 in papillary thyroid cancer cells. *IUBMB Life*. v. 67 p. 837–846, 2015.
- HOANG, T.; KULJANIN, M.; SMITH, M.; D. JELOKHANI-NIARAKI, M. A biophysical study on molecular physiology of the uncoupling proteins of the central nervous system. *Bioscience Reports*.v.35 p. 1000-1042, 2015
- HUANG, H; YAN, Z; CHEN, Y; LIU, F.A social contagious model of the obesity epidemic. *ScientificReports*, v. 6, p. 1038, 2016.
- HWANG, DH.; KIM, JA.; LEE, JY.Mechanisms for the activation of Toll-like receptor 2/4 by saturated fatty acids and inhibition by docosahexaenoic acid. *Eur J Pharmacol*.v. 785 p. 24-35, 2016.
- JANTARATNOTAI, N.; MOSIKANON, K.; LEE, Y.; MCINTYRE, RS. The interface of depression and obesity. *Obes Res ClinPract*. v. 11 p. 1-10, 2017.
- KIM, W.G.; PARK, J.W.; WILLINGHAM, M.C.; CHENG, S.Y. Diet-induced obesity increases tumor growth and promotes anaplastic change in thyroid cancer in a mouse model. *Endocrinology*, v. 154, p. 2936-2947, 2013.
- KOKKORIS, P.; PI-SUNYER, FX. Obesity and endocrine disease. *Endocrinol MetabClin North Am*. v. 32 p. 895-914, 2003.
- KOWALTOWSKI AJ.; COSTA A.; D T., VERCESI, A. Activation of the potato plant uncoupling mitochondrial protein inhibits reactive oxygen species generation by the respiratory chain. *FEBS Letters*. v.425 p.213–216, 1998.
- LA SERRE, CB; ELLIS, CL; LEE, J; HARTMAN, AL; RUTLEDGE, JC;RAYBOULD, HE. Propensity to high-fat-diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *Gastrointest Liver Physiol*. v.2 p. 440-448, 2010.
- LANCASTER JR. Nitric oxide in cells. *American scientist*. v. 80 p. 249-259, 1992.
- LAURENTM, SACHS.; YUN-BO, SHI.Targeted chromatin binding and histone acetylation in vivo by thyroid hormone receptor during amphibian development.*ProcNatlAcadSci U S A*. v.97 p. 13138–13143, 2000.
- LOSACCO, MC.; DE ALMEIDA, CFT.; HIJO, AHT.; BARGI-SOUZA, P.; GAMA, P;. NUNES, MT.; GOULART-SILVA, F. High-fat diet affects gut nutrients transporters in hypo and hyperthyroid mice by PPAR- $\alpha$  independent mechanism. *Life Sci*.v. 202 p. 35-43, 2018.
- MANCINI, A.; SEGNI CD.; RAIMONDO, S.; OLIVIERI, G.; SILVESTRINI, A.; MEUCCI, E.; CURRÒ, D. Thyroid Hormones, Oxidative Stress, and Inflammation. *Mediators Inflamm*. v. 8 p. 1000-1155, 2016.

- MANTANI Y1, KAMEZAKI A, UDAYANGA KG, TAKAHARA EI, QI WM, KAWANO J, YOKOYAMA T, HOSHI N, KITAGAWA H. Site differences of Toll-like receptor expression in the mucous epithelium of rat small intestine. *Histol Histopathol.* v. 26 p. 1295-303, 2011
- MØLLER, N.; GJEDSTED, J.; GORMSEN, L.; FUGLSANG, J.; DJURHUUS, C. Effects of growth hormone on lipid metabolism in humans. *Growth Horm IGF Res.* v. 13 p. 18-21, 2003.
- MONDAL, S.; RAJA, K.; SCHWEIZER, U.; MUGESH, G. Chemistry and Biology in the Biosynthesis and Action of Thyroid Hormones. *Angew ChemInt Ed Engl.* v. 55 p. 7606-30, 2016.
- MULLUR, R.; LIU, YY.; BRENT, GA. Thyroid hormone reegulation of metabolismo. *PhysiolRev*, v.94, p. 355-382, 2013.
- NARCISO, J; SILVA, AJ; RODRIGUES, V; MONTEIRO, MJ; ALMEIDA, A; SAAVEDRA, R; COSTA, AM. Behavioral, contextual and biological factors associated with obesity during adolescence: A systematic review. *PLoSOne.* v. 14 p., 2019.
- NORDE, MM.; OKI, E.; CARIOCA, AAF.; CASTRO, IA.; SOUZA, JMP.; MARCHIONI, DML.; FISBERG, RM.; ROGERO, MM. Influence of toll-like receptor 4 gene variants and plasma fatty acid profile on systemic inflammation: A population-based cross-sectional study. *Nutrition.* v. 35 p. 106-111, 2017.
- ORTIGA-CARVALHO, TM.; CHIAMOLERA, MI.; PAZOS-MOURA, CC.; WONDISFORD, FE. Hypothalamus-Pituitary-Thyroid Axis. *ComprPhysiol.* v. 6 p. 1387-428, 2016.
- PANVELOSKI COSTA, AC.; SILVA TEIXEIRA, S.; RIBEIRO, IM.; SERRANO NASCIMENTO, C.; DAS NEVES, RX.; FAVARO, RR.; SEELAENDER, M.; ANTUNES, VR.; NUNES, MT. Thyroid hormone reduces inflammatory cytokines improving glycaemia control in alloxan-induced diabetic wistar rats. *ActaPhysiol (Oxf).* v. 217 p. 130-140, 2016.
- PEARCE, EN.; LAZARUS, JH; MORENO-REYES, R.; ZIMMERMANN, MB. Consequences of iodine deficiency and excess in pregnant women: an overview of current knowns and unknowns. v. 104 p. 918S-23S, 2016.
- PFANNKUCHE, H.; GABEL, G. Glucose, epithelium, and enteric nervous system: dialogue in the dark. *Journalof Animal Physiology.* v. 93 p. 277-286, 2009.
- PRÉAU, L.;FINI, JB.; MORVAN-DUBOIS, G.; DEMENEIX, B. Thyroid hormone signaling during early neurogenesis and its significance as a vulnerable window for endocrine disruption. *Biochim Biophys Acta.* v. 2, p. 112-21, 2015.

- RESCH U.; HELSEL, G.; TATZBER, F.; SINZINGER, H. Antioxidant status in thyroid dysfunction. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. v. 40 p. 1132–1134, 2002.
- RISS, AL.; JORGENSEN, JO.; GJEDDE, S.; NORRELUND, H.; JURIK, AG.; NAIR, KS.; IVARSEN, P.; WEEKE, J.; MOLLER, N. Whole body and forearm substrate metabolism in hyperthyroidism: evidence of increased basal muscle protein breakdown. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v.288, p. 1067-1073, 2005
- ROGERO, MM; CALDER PC. Obesity, Inflammation, Toll-Like Receptor 4 and Fatty Acids. *Nutrients*, v. 10, p. 432, 2018.
- SANYAL, D.; RAYCHAUDHURI, M. Hypothyroidism and obesity: An intriguing link. *Indian J Endocrinol Metab*. v. 20 p. 554-7, 2016
- SCHACHTER, J.; MARTEL, J.; LIN, CS.; CHANG, CJ.; WU, TR.; LU, CC.; KO, YF.; LAI, HC.; OJCIUS, DM.; YOUNG, JD. Effects of obesity on depression: A role for inflammation and the gut microbiota. *Brain Behav Immun*.v.69 p. 1-8, 2018.
- SNOECK, V.; GODDEERIS, B.; COX, E. The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. *Microbes and Infection*. v. 7 p. 997–1004, 2005.
- SUZUKI, T.; HARA, H. Dietary fat and bile juice, but not obesity, are responsible for the increase in small intestinal permeability induced through the suppression of tight junction protein expression in LETO and OLETF rats. *NutrMetab (Lond)*. v. 10 p. 7 – 19, 2010.
- TAUROG, A1.; DORRIS, ML.; HU, WX.; GUZIEC, FSJR. The selenium analog of 6-propylthiouracil. Measurement of its inhibitory effect on type I iodothyronine deiodinase and of its antithyroid activity. *Biochem Pharmacol*. v. 45 p. 701-9, 1995.
- VAVRICKA, S.R.; MUSCH, M. W.; FUJIYA, M.; KLES, K.; CHANG, L.; ELORANTA, J. J.; KULLAK-UBLICK, G. A.; DRABIK, K.; MERLIN, D.; CHANG, E. B. Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma increase PepT1 expression and activity in the human coloncarcinoma cell line Caco-2/bbe and in mouse intestine. *Pflugers Arch.*, v. 452, p. 71 - 80, 2006.
- VECCHIÉ, A.; DALLEGRI, F.; CARBONE, F.; BONAVENTURA, A.; LIBERALE, L.; PORTINCASA, P.; FRÜHBECK, G.; MONTECUCCO, F. Obesity phenotypes and their paradoxical association with cardiovascular diseases. *Eur J Intern Med*.v. 48 p. 6-17, 2018.
- WASIM, M.; AWAN, FR.; NAJAM, SS.; KHAN, AR.; KHAN, HN. Role of Leptin Deficiency, Inefficiency, and Leptin Receptors in Obesity. *Biochem Genet*. v. 54 p. 565-72, 2016.
- XIA, SF.; DUAN, XM.; HAO, LY.; LI, LT.; CHENG, XR.; XIE, ZX.; QIAO, Y.; LI, LR.; TANG, X.; SHI, YH.; LE, GW. Role of thyroid hormone homeostasis in obesity-prone and obesity-resistant mice fed a high-fat diet. *Metabolism*. v. 64 p. 566-79, 2015.

XU, B.; XIE, X. Neurotrophic factor control of satiety and body weight. *Nat Rev Neurosci.* v. 17 p. 282-92, 2016.

YEAGER, CM; AMACHI, S.; GRANDBOIS, R.; KAPLAN, DI.; XU, C.; SCHWEHR, KA.; SANTSCHI, PH. Microbial Transformation of Iodine: From Radioisotopes to Iodine Deficiency. *Adv Appl Microbiol.* v. 101 p. 83-136, 2017.

ZHANG, Z.; BOELEN, A.; BISSCHOP, PH.; KALSBECK, A.; FLIERS, E. Hypothalamic effects of thyroid hormone. *Mol Cell Endocrinol.* v. 458 p. 143-148, 2017.