

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 27/02/2021.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA

LUCAS SOLLA MATHIAS

ATIVACÃO DA VIA MAPK/ERK E INTEGRINA $\alpha v \beta 3$ PELA AÇÃO
DA TRIIODOTIRONINA (T3) NA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO
GÊNICA DE ADIPOCINAS E MODIFICAÇÃO DO PERFIL
LIPÍDICO EM ADIPÓCITOS, 3T3-L1.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientadora: Dra. Miriane de Oliveira

Coorientadora: Dra. Célia Regina Nogueira

Botucatu

2019

LUCAS SOLLA MATHIAS

ATIVACÃO DA VIA MAPK/ERK E INTEGRINA $\alpha v\beta 3$ PELA AÇÃO
DA TRIIODOTIRONINA (T3) NA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO
GÊNICA DE ADIPOCINAS E MODIFICAÇÃO DO PERFIL
LIPÍDICO EM ADIPÓCITOS, 3T3-L1.

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção
do título de Mestre em Fisiopatologia
em Clínica Médica.

Orientadora: Dra. Miriane de Oliveira

Coorientadora: Dra. Célia Regina Nogueira

Botucatu

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Mathias, Lucas Solla.

Ativação da via MAPK/ERK e integrina $\alpha\beta 3$ pela ação da triiodotironina (T3) na modulação da expressão gênica de adipocinas e modificação do perfil lipídico em adipócitos, 3T3-L1 / Lucas Solla Mathias. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Miriane de Oliveira
Coorientador: Célia Regina Nogueira
Capes: 20700008

1. Triiodotironina. 2. Leptina. 3. Expressão gênica.

Palavras-chave: Adiponectina; Integrina $\alpha\beta 3$; Leptina; MAPK/ERK; Triiodotironina .

Agradecimentos

A Deus, por abençoar imensamente minha vida e estar sempre comigo. Devo tudo à Ti.

Aos meus pais, Renato e Adriana, que em grande parte foram responsáveis por quem sou hoje e por ter chegado até aqui. Obrigado por acreditarem em mim.

Aos meus irmãos, Gustavo e Leonardo, por todo apoio e paciência.

Os meus avós, Vera, Ivoni e Reinaldo, por todo carinho, vocês também são responsáveis por grande parte do que sou hoje.

Ao meu companheiro, Diego, pela paciência, companherismo e ajuda. Muito obrigado por tudo.

A minha família, que direta ou indiretamente me apoiaram durante todo o percurso.

A minha orientadora, Dra. Miriane de Oliveira, que sempre esteve ao meu lado, me impulsionando para o melhor. Obrigado pela orientação, disponibilidade e companherismo.

A minha coorientadora, Dr. Célia Regina Nogueira, por me permitir fazer parte de seu grupo de pesquisa e estar sempre disponível para ajudar.

A Bruna, amiga desde a graduação e companheira de trabalho, que me inseriu no grupo de pesquisa. Obrigado por tudo.

À Regiane, Maria Teresa, Fernanda, Helena, Bianca, companheiras de trabalho, por estarem sempre dispostas a ajudar. Obrigado meninas.

Aos doutores, Adriana Ferrasi e Jones Bernardes Graceli, pelas sugestões durante o exame geral de qualificação que contribuíram para o aprimoramento deste trabalho.

A Dra. Daniela Ponce, coordenadora do Departamento de Fisiopatologia em Clínica Médica, por toda ajuda e por confiar em meu trabalho.

Aos profissionais da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX) por todo auxílio.

Aos meus amigos, Marcia e João, por todo carinho e por todos os momentos de descontração.

Aos colaboradores do Departamento de Clínica Médica, sempre atenciosos e por prontos a me auxiliar.

Aos colaboradores da seção de Pós-graduação pela simpatia e disposição em ajudar sempre.

À Comissão de Ética em Experimentação Animal.

Ao departamento de Clínica Médica e a UNIPLEX - Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Resumo

Introdução: O hormônio triiodotironina (T3) influencia o metabolismo e desenvolvimento do tecido adiposo (TA), modulando a proliferação e diferenciação de adipócitos, podendo agir sobre os reguladores do processo de adipogênese, como o receptor ativado por proliferador de peroxissomo (PPAR γ). O TA está envolvido na regulação da energia corporal, sintetizando e secretando substâncias denominadas adipocinas, dentre elas a adiponectina e leptina. A adiponectina está relacionada ao aumento da sensibilidade à insulina, enquanto a leptina está envolvida com o gasto energético. O T3 pode desencadear ações por ativação de vias extranucleares, dentre elas a via MAPK/ERK e integrina $\alpha\beta 3$. **Objetivo:** Verificar a ação do T3, com participação das vias extranucleares MAPK/ERK e integrina $\alpha\beta 3$, na modulação de adiponectina e leptina, além de avaliar os parâmetros relacionados ao perfil adipogênico e dano de DNA. **Métodos:** Adipócitos, 3T3-L1, foram tratados com T3 (10nM) por uma hora, na ausência ou presença dos inibidores de MAPK/ERK – PD98059 (PD, 50uM) e da integrina $\alpha\beta 3$ – ácido tetraiodotiroacético (Tetrac, 10^{-4} M). A ausência de qualquer tratamento foi considerada grupo controle (C). Após o período de tratamento foi realizado PCRq-RT para analisar a expressão de mRNA de adiponectina e leptina, e Western Blot para expressão proteica de adiponectina, leptina, PPAR γ , pAKT e pERK; a viabilidade celular foi realizada pelo ensaio de MTT; a quantificação do acúmulo lipídico pelos ensaios *Adipo Red* e *Oil Red*, avaliação da liberação de triacilglicerol (TGL) por meio do método enzimático-colorimétrico, a mensuração do produto da lipólise pelo ensaio de glicerol; dano de DNA pela quantificação da 8-Hidroxideoxiguanosina(8O-OH-dG) por ensaio ELISA. Utilizou-se ANOVA complementada com o teste de

Tukey, para dados com normalidade e teste de Friedman, complementado pelo teste de Dunn, para dados com ausência de normalidade. Resultados expressos em média \pm desvio padrão e mediana (IQ 25% - IQ 75%), respectivamente. Significância dada para $p < 0,05$. **Resultados:** O T3 elevou a expressão de mRNA e proteica de leptina com relação ao C, e com a inibição da integrina $\alpha\beta 3$ e posterior tratamento com o hormônio (Tetrac+T3), houve diminuição da expressão em ambos casos. Já a expressão de mRNA de adiponectina não foi alterada pelo T3 quando comparado ao C, contudo o hormônio aumentou a expressão proteica dessa adipocina ($1,7 \pm 0,15$, $p < 0,01$) em relação ao C ($1 \pm 0,03$, $p < 0,01$), este aumento foi abolido pelos inibidores associados ao T3, PD +T3 ($0,59 \pm 0,11$, $p < 0,01$) e Tetrac+T3 ($0,59 \pm 0,1$, $p < 0,01$). Embora o T3 não tenha alterado a expressão proteica de PPAR γ , acúmulo lipídico, dosagem de TGL, liberação de glicerol e dano de DNA em relação ao C, os grupos PD+T3 e Tetrac+T3, apresentaram redução de todos os parâmetros mencionados anteriormente, quando comparados ao T3 sozinho. **Conclusão:** O T3 age nos adipócitos por meio da via MAPK/ERK, para modular a expressão proteica de adiponectina e pela integrina $\alpha\beta 3$ para alterar a expressão gênica de leptina. Além disso, a integridade da via MAPK/ERK é necessária para que o T3 não altere o perfil lipídico, mantendo a homeostase dos adipócitos.

Palavras chaves: Adiponectina, Leptina, T3, MAPK/ERK, integrina $\alpha\beta 3$, 3T3-L1.

Abstract

Introduction: The hormone triiodothyronine (T3) influences the metabolism and development of adipose tissue (TA), modulating the proliferation and differentiation of adipocytes, and can act on regulators of the adipogenic differentiation process, such as the peroxisome proliferator activated receptor). TA is involved in the regulation of body energy, synthesizing and secreting substances called adipokines, among them adiponectin and leptin. Adiponectin is related to increased insulin synaptic, since leptin is involved in energy expenditure. T3 can trigger actions by activation of extranuclear pathways, including MAPK / ERK and integrin α V β 3. **Objective:** Given the role of T3 in TA and the importance of adipokines, the objective of this study is to verify the action of T3 with the participation of extranuclear pathways in the modulation of adiponectin and leptin and the parameters related to the adipogenic profile. **Methods:** Adipocytes, 3T3-L1, were treated with a physiological dose of T3 (10nM) for one hour, in the absence or presence of MAPK / ERK-PD98059 (PD) and integrin α V β 3 - tetraiodothyroctic (Tetrac) integrin inhibitors. The absence of any treatment was considered as a control group (C). After the treatment period PCRq-RT was performed to analyze the expression of leptin and adiponectin mRNA, and Western Blot for protein expression of adiponectin, leptin, PPAR γ , pAKT and pERK; cell viability was performed by the MTT assay; the quantification of lipid accumulation by the AdipoRed and Oil Red assays, triacylglycerol release (TGL) evaluation by the enzymatic-colorimetric method, the measurement of the lipolysis product by the glycerol test; DNA damage by quantification of 8-Hydroxydeoxyguanosine (8-OH-dG) per ELISA assay. ANOVA supplemented with the Tukey test was used for data with normality and Friedman's test, complemented by the Dunn test, for data with no

normality. Results expressed in mean \pm standard deviation and median (IQ 25% - IQ 75%), respectively. Significance given for $p < 0.05$. **Results:** T3 increased the expression of mRNA and leptin protein with respect to C, and with inhibition of $\alpha\beta3$ integrin and subsequent treatment with the hormone, Tetrac + T3, there was a decrease in expression in both cases, indicating that T3 binding the integrin is important for gene modulation of leptin. However, the expression of adiponectin mRNA was not altered by T3 when compared to C, however the hormone increased the protein expression of this adipocin (1.7 ± 0.15 , $p < 0.01$) in relation to C (1 ± 0 , ($P < 0.01$), and Tetrac + T3 (0.59 ± 0.1 , $p < 0.01$) were abolished by the inhibitors associated with T3, PD + T3 (0.59 ± 0.11 , $p < p < 0.01$), indicating activation of the T3 pathways for post-transcriptional action of adiponectin. Although T3 did not alter the PPAR γ protein expression, lipid accumulation, TGL dosage, glycerol release and DNA damage in relation to C, the groups PD + T3 and Tetrac + T3 showed reduction of all parameters mentioned previously, when compared to T3. **Conclusion:** T3 acts on adipocytes via the MAPK / ERK pathway to modulate the protein expression of adiponectin and $\alpha\beta3$ integrin to alter the gene expression of leptin. In addition, the integrity of the MAPK / ERK pathway is required for T3 to not alter the lipid profile, maintaining adipocyte homeostasis.

Key words: Adiponectin, Leptin, T3, MAPK / ERK, integrin $\alpha\beta3$, 3T3-L1.

Lista de abreviaturas

AdipoR - Receptores de adiponectina

cAMP - 3',5'-monofosfato cíclico

C/EBP - Proteínas ligantes ao amplificador

DEXA - Dexametasona

ERK - quinase regulada extracelularmente

HT - Hormônios Tiroideanos

IBMX - 1-metil-3-isobutilxantina

INS - Insulina

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

MAPK - Via da proteína quinase ativada por mitógeno

POL II - Polimerase II

PPAR γ - Receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomas

pERK - quinase regulada extracelularmente fosforilada

PI3K - via fosfatidil inositol-3-quinase

pAKT - Proteína quinase B fosforilada

PPRE - Elemento responsivo ao receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomas

RXR - Receptores de retinóide X

T4 - Tiroxina

T3 - Triiodotironina

TR - Receptores Nucleares de hormônio tiroideanos

TRE - Elementos responsivos aos hormônios tiroideanos

TA - Tecido Adiposo

TAB - Tecido Adiposo Branco

TAM - Tecido Adiposo Marrom

TGL - Triacilglicerol

UPS - Sistema ubiquitina-proteassoma

4-HNE - 4-Hidroxinonenal

8-OH-dG - 8-hidroxideoxiguanosina

Sumário	Páginas
1. Introdução extendida	
1.1. Tecido adiposo	13
1.2. Hormônios Tiroideanos	16
1.3. Via MAPK/ERK 1/2	18
1.4. Via da integrina $\alpha\beta3$	20
1.5. Hormônios Tiroideanos, Tecido Adiposo e Adipocinas	22
2. Justificativa	25
3. Hipótese	25
4. Objetivo	
4.1. Objetivo Geral	26
4.2. Objetivos específicos	26
5. Resultados	
5.1. Manuscrito 1	27
5.2. Manuscrito 2	54
6. Considerações Finais	77
7. Referências	78
8. Anexos	88

1. Introdução estendida

1.1. Tecido Adiposo

O Tecido adiposo (TA) é subdividido em tecido adiposo branco (TAB) e tecido adiposo marrom (TAM), e tem como principal componente celular o adipócito. O TAB apresenta no interior dos adipócitos, gotículas lipídicas que armazenam energia na forma de triacilglicerol (TGL), constituído por três moléculas de ácidos graxos e uma de glicerol, além de inúmeras proteínas (1). Já o TAM está associado ao aumento do gasto energético (2,3), sendo capaz de elevar a captação de glicose em baixas temperaturas e apresenta síntese de proteína desacopadora-1 (UCP-1), gene relacionado a termogênese (4). Os adipócitos maduros do TAB, não aumentam por divisão celular, mas pela diferenciação dos pré-adipócitos, *in vivo* e *in vitro*, processo denominado de adipogênese (5,6). A adipogênese é regulada por hormônios e citocinas, como adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP), insulina e glicocorticóides (7,8). A insulina é considerada o principal estimulador da mitose e adipogênese (9) e seus efeitos dependem da MAPK (10). *In vitro*, o modelo mais bem caracterizado de adipogênese é o da linhagem de pré-adipócitos 3T3-L1, que quando tratados com coquetéis estimulantes contendo dexametasona (Dexa), que ativa receptores de insulina; 1-metil-3-isobutilxantina (IBMX), que inibe a cAMP fosfodiesterase; insulina (Ins) e soro fetal bovino (SFB), que desencadeiam o processo de adipogênese (11), sofrem diferenciação. Após as células serem estimuladas pelo coquetel, a expressão de proteínas ligantes ao amplificador (C/EBP- β) é induzida, e posteriormente fosforilada pela ERK1/2 (12). Com isso, a forma ativa de C/EBP- β atua regulando o receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos (PPAR γ) e as proteínas ligantes ao amplificador (C/EBP- α) que

quando ativados, provocam diferenciação terminal das células. Desta forma, são responsáveis pelas alterações fenotípicas dos adipócitos, acúmulo de triglicerídeos no citoplasma e secreção de adipocinas. Portanto, são pouco expressos em pré-adipócitos, não estando envolvidos no início da diferenciação (13) (Figura 1). Além disso, sabe-se que o PPAR γ , além de regular a adipogênese, regula também o metabolismo lipídico (14).

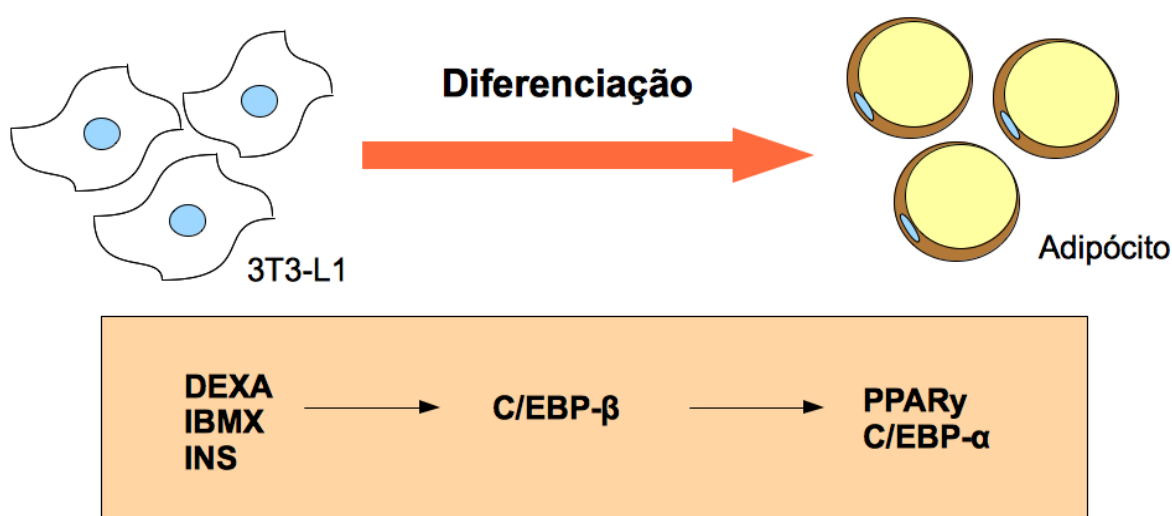


Figura 1. Modelo simplificado da adipogênese. Pré-adipócitos são induzidos para se diferenciar em adipócitos imaturos sob controle do PPAR γ principalmente, o qual também induz a expressão de C/EBP α . PPAR γ e C/EBP α atuam coordenadamente para regular a conversão de adipócitos imaturos em adipócitos maduros. C/EBP, proteínas ligantes ao amplificador; PPAR γ , receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomas; DEXA, Dexametasona; IBMX, 1-metil-3-isobutilxantina; INS, insulina. Retirada de Queiroz et al, 2009.

A hipertrofia de adipócitos maduros está relacionada a necessidade de incorporação ou liberação de lipídeos, e ocorre pela ativação da lipogênese ou lipólise (15). Desta forma, a lipogênese seria o processo de síntese de TGL, e a lipólise o processo catabólico, em ele é hidrolisado liberando glicerol e ácidos

graxos, sendo um evento controlado por hormônios, como as adipocinas secretadas pelo TAB (16,17).

Além do TA ser responsável por armazenar energia, é também considerado um importante órgão endócrino, fundamental para regulação metabólica do organismo, por meio da produção e secreção de substâncias denominadas adipocinas, que agem sobre a saciedade, gasto energético, termogênese, sensibilidade à insulina e estimulação da oxidação dos ácidos graxos (5,6,18). Dentre as adipocinas temos a leptina e a adiponectina.

A leptina foi a primeira adipocina a ser descoberta, em 1994, e foi após essa descoberta que o TA passou a ser considerado um órgão endócrino, é uma adipocina pró-inflamatória, relacionada a regulação do apetite e do gasto energético pelo organismo, via sistema nervoso central, sendo que sua disponibilidade está diretamente relacionada à quantidade e tamanho dos adipócitos no TAB (19).

Em relação à adiponectina, sabe-se que é uma adipocina anti-inflamatória e foi demonstrado *in vivo* que ela atua sobre a sensibilidade à insulina, melhorando o metabolismo da glicose (20). Em humanos obesos, com resistência à insulina e diabetes mellitus tipo 2, as concentrações plasmáticas dessa adipocina são baixas (21,22). Desta forma, a adiponectina apresenta efeitos antidiabéticos, podendo ser uma ferramenta terapêutica para diabetes, síndrome metabólica, doenças cardiovasculares (23,24). Além disso, ela apresenta dois receptores AdipoR1 e AdipoR2, encontrados em humanos e roedores, aos quais ela se liga para desencadear suas ações (25).

6. Considerações finais

A partir dos dois artigos apresentados, observamos que:

- O T3 age nos adipócitos por meio da via MAPK/ERK para elevar a expressão proteica de adiponectina

- Ligação do T3 a integrina eleva a expressão de mRNA e proteica de leptina

- Inibição da MAPK/ERK associada ao tratamento com T3 apresentou menor dano de DNA.

- Integridade da MAPK/ERK é necessária para que o T3 não afete o perfil lipídico, alterando a homeostase.

7. Referências

1. Brasaemle, D. L. 2007. Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J. Lipid Res.* 48: 2547–2559.
2. Gesta, S., Tseng, Y.-H., Kahn, C. (2007). Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell*, 131 (2), 242-56.
3. van Marken Lichtenbelt WD1, Vanhommel JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, Schrauwen P, Teule GJ. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med.* 2009 Apr 9; 360(15): 1500–1508. doi: 10.1056/NEJMoa0808718
4. Virtanen KA1, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, Taittonen M, Laine J, Savisto NJ, Enerback S, Nuutila P. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med.* 2009 Apr 9;360(15):1518-25. doi: 10.1056/NEJMoa0808949.
5. Spiegelman BM, Flier JS. Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell.* 1996; 87:377-389.
6. Hwang CS, Loftus TM, Mandrup S, Lane MD. Adipocyte differentiation and leptin expression. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1997;13:231-259.
7. Sorisky A. From preadipocyte to adipocyte: differentiation-directed signals of insulin from the cell surface to the nucleus. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 1999; 36:1-34.
8. Gregoire FM, Smas CM, Sul HS: Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev.* 1997; 78:783-809.

9. Green, H.; Kehinde, O, Established pre-adipose cell line and its differentiation in culture 2 factors affecting adipose conversion. *Cell (S.I.)*, v. 5, n. 1, p. 19-27, 1975
10. Benito, M. Et al. IGF-I: A mitogen also involved in differentiation processes in mammalian cells. *International Journal of Biochemistry e Cell Biology (S.I.)* v. 28, n. 5, p. 499-510, 1996.
11. Ntambi JM, Young-Cheul K. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr.* 2000;130(12):3122-6.
12. Li, X et al. Role of cdk2 in the sequential phosphorylation of C/EBP beta during adipocyt differentiation. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* , v. 104, n. 28, p. 11597-11602, Jul 2007.
13. Brun RP, Tontonoz P, Forman BM, Ellis R, Chen J, Evans RM, Spiegelman BM. Differential activation of adipogenesis by multiple PPAR isoforms. *Genes Dev.* 1996; 10:974-984.
14. Koutnikova H, Cock TA, Watanabe M, Houten SM, Champy MF, Dierich A, et al. Compensation by the muscle limits the metabolic consequences of lipodystrophy in PPAR gamma hypomorphic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(24):14457-62.
15. Jensen MD. Health consequences of fat distribution. *Horm Res.* 1997;48 Suppl 5:88- 92.
16. ZECHNER, R et al. Adipose Triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *J Lipid Res.*, v.50, n.1, p 3-21, jan 2009.
17. Ahmadian, M., Wang, Y., Sul, H.S., 2010. Lipolysis in adipocytes. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 42, 555e559.

18. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty acid oxidation by activating AMP activated protein Kinase. *Nat Med* 2002; 8 (11):1288-95.
19. Carvalho MHC, Colaco AL, Fortes ZB. Citocinas, disfuncao endotelial e resistência a insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2006;50:304-12.
20. Wu X, Motoshima H, Mahadev K, et al. Involvement of AMP- activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes. *Diabetes* 2003;52: 1355-63.
21. Abbasi F, Chu JW, Lamendola C, et al. Discrimination between obesity and insulin resistance in the relationship with adiponectin. *Diabetes* 2004;53:585-90.
22. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, et al. Paradoxical decrease of an adipose- specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;257:79-83.
23. Kadowaki, T., and Yamauchi, T. (2005). Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr. Rev.* 26, 439–451.
24. Kadowaki, T., Yamauchi, T., Kubota, N., Hara, K., Ueki, K., and Tobe, K. (2006). Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* 116, 1784–1792.
25. Yamauchi T., Kamon J., Ito Y., Tsuchida A., Yokomizo T., Kita S., Sugiyama T., Miyagishi M., Hara K., Tsunoda M., Murakami K., Ohteki T., Uchida S., Takekawa S., Waki H., Tsuno N.H., Shibata Y., Terauchi Y., Froguel P., Tobe K., Koyasu S., Taira K., Kitamura T., Shimizu T., Nagai R. & Kadowaki T. 2003. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423:762-769.
26. Moura, E. G. D., & Moura, C. C. (2004). Regulation of thyrotropin synthesis and

secretion. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 48(1), 40-52.

27. Nunes MT. Hormônios tiroideanos: mecanismo de ação e importância biológica.

Arq Bras Endocrinol Metab. 2003; 47(6):640.

28. Bianco, A.C., Salvatore, D., Gereben, B., Berry, M.J., Larsen, P.R., 2002.

Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr. Rev.* 23, 38–89.

29. Senese, R., Cioffi, F., De Lange, P., Goglia, F., & Lanni, A. (2014). Thyroid:

biological actions of 'nonclassical' thyroid hormones. *Journal of Endocrinology*, 221(2), R1-R12.

30. Barra GB, Velasco LF, Pessanha RP, Campos AM, Moura FN, Dias SM, et al.

[Molecular mechanism of thyroid hormone action]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2004;48(1):25-39.

31. Klieverik, L.P., Coomans, C.P., Endert, E., Sauerwein, H.P., Havekes, L.M.,

Voshol, P.J., Rensen, P.C., Romijn, J.A., Kalsbeek, A., Fliers, E., 2009. Thyroid hormone effects on whole-body energy homeostasis and tissue-specific fatty acid uptake in vivo. *Endocrinology* 150, 5639e5648.

32. Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ. Molecular aspects of thyroid hormone actions.

Endocr Rev. 2010, 31(2):139-70.

33. Shibusawa N, Hollenberg AN, Wondisford FE. Thyroid Hormone Receptor DNA

Binding Is Required for Both Positive and Negative Gene Regulation. *The Journal of Biological Chemistry.* 2003 Jan 10;278(2):732-8.

34. Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol*

Rev. 2001;81(3):1097-142.

35. Forrest D, Vennstrom B. Functions of thyroid hormone receptors in mice. *Thyroid*. 2000; 10(1):41-52.
36. Macchia PE, Takeuchi Y, Kawai T, Cua K, Gauthier K, Chassande O, et al. Increased sensitivity to thyroid hormone in mice with complete deficiency of thyroid hormone receptor alpha. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98(1):349-54.
37. LAZZAR, M.A. Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocr. Rev.*, 14: 184-193, 1993.
38. MENEGAZ, D.; ZAMONER, A.; ROYER, C.; LEITE, L.D.; BORTOLOTTI, Z.A. & SILVA FR. Rapid responses to thyroxine in the testis: active protein synthesis-independent pathway. *Mol. Cell. Endocrinol*. 246:128-34, 2006.
39. Davis, Paul J.; Goglia, Fernando; Leonard, Jack L. Nongenomic actions of thyroid hormone. *Nature Reviews Endocrinology*, 12, 111–121 (2016)
40. Glass C. Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers and heterodimers. *Endocr Rev*. 1994; 15(3):391-407.
41. Ribeiro RCJ, Apriletti JW, Wagner RL, West BL, Feng W, Huber R, et al. Mechanisms of Thyroid Hormone Action: Insights from X-ray Crystallographic and Functional Studies. *Recent Prog Horm Res* 1998;53:351-94.
42. Makowski A, Brzostek S, Cohen RN, Hollenberg AN. Determination of nuclear receptor co-repressor interactions with the thyroid hormone receptor. *Mol Endocrinol* 2003;17:273-86
43. Moeller LC, Broecker-Preuss M. Transcriptional regulation by nonclassical action of thyroid hormone. *Thyroid Res*. 2011;4 Suppl 1:S6.

44. Davis, P. J., Davis, F. B., Mousa, S. A., Luidens, M. K. & Lin, H. Y. Membrane receptor for thyroid hormone: physiologic and pharmacologic implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 51, 99–115 (2011).
45. Davis PJ, Leonard JL, Davis FB. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Front Neuroendocrinol.* 2008;29(2):211-8.
46. Moeller LC, Cao X, Dumitrescu AM, 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.* 2006; 4:e020.
47. JOHNSON, G. L.; LAPADAT, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science, Stanford*, v. 298, n. 5600, p. 1911-1912, 2002.
48. WHITMARSH, A. J.; DAVIS, R. J., Signal transduction by MAP kinases: regulation by phosphorylation-dependent switches. *stke.* [online], 1999. Disponível em: http://www.stke.org/cgi/content/full/OC_sigtrans;1999/1/pe1. Acesso em: 10 jun 2004.
49. YUE, T. L.; WANG, C.; GU, J. L.; MA, X. L.; KUMAR, S.; LEE, J. C.; FEUERSTEIN, G. Z.; THOMAS, H.; MALEEFF, B.; OHLSTEIN, E. H. Inhibition of extracellular signal- regulated kinase enhances Ischemia/Reoxygenation-induced apoptosis in cultured cardiac myocytes and exaggerates reperfusion injury in isolated perfused heart. *Circ Res, New York*, v. 86, n. 6, p. 692-699, 2000.
50. WIDMANN, Christian et al. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three- kinase module from yeast to human. *Physiological reviews*, v. 79, n. 1, p. 143-

180, 1999.

51. KYRIAKIS, J. M.; APP, H.; ZHANG, X. F.; BANERJEE, P.; BRAUTIGAN, D. L.; RAPP, U. R.; AVRUCH, J. Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature*, New York, v. 358, n. 6385, p. 417-421, 1992.

52. ALESSI, Dario R. et al. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen- activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, v. 270, n. 46, p. 27489-27494, 1995.

53. Bergh JJ, Lin HY, Lansing L, Mohamed SN, Davis FB, Mousa S, et al. Integrin alphaVbeta3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology*. 2005;146(7):2864-71.

54. Cody, V., Davis, P.J., Davis, F.B., 2007. Molecular modeling of the thyroid hormone interactions with alpha v beta 3 integrin. *Steroids* 72, 165–170. doi:10.1016/j.steroids.2006.11.008

55. Siegrist-Kaiser C & Burger AG 1994 Modification of the side chain of thyroid hormones. In *Thyroid Hormone Metabolism*, pp 17–198. Eds SY Wu & TJ Visser TJ. Boca Raton: CRC Press, Inc.

56. MORENO, Maria et al. Metabolic effects of thyroid hormone derivatives. *Thyroid*, v. 18, n. 2, p. 239-253, 2008.

57. Lin HY, Sun M, Tang HY, Lin C, Luidens MK, Mousa SA, et al. L-Thyroxine vs. 3,5,3'- triiodo-L-thyronine and cell proliferation: activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009;296(5):C980-91.

58. Bharali, D. J., Yalcin, M., Davis, P. J. & Mousa, S. A. Tetraiodothyroacetic acid-conjugated PLGA nanoparticles: a nanomedicine approach to treat drug-resistant breast cancer. *Nanomed. (Lond.)* 8, 1943–1954 (2013).
59. Santini F, Marsili A, Mammoli C, Valeriano R, Scartabelli G, Pelosini C, et al. Serum concentrations of adiponectin and leptin in patients with thyroid dysfunctions. *J Endocrinol Invest.* 2004; 27(2):RC5-7.
60. Viguerie N, Millet L, Avizou S, Vidal H, Larrouy D, Langin D. Regulation of human adipocyte gene expression by thyroid hormone. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(2):630-4.
61. Tata JR, Ernster L, Lindberg O 1962 Control of basal metabolic rate by thyroid hormones and cellular function. *Nature* 193:1058–1060.
62. Krotkiewski M 2002 Thyroid hormones in the pathogenesis and treatment of obesity. *Eur J Pharmacol* 440:85–98.
63. Yaturu S, Prado S, Grimes SR. Changes in adipocyte hormones leptin, resistin, and adiponectin in thyroid dysfunction. *J Cell Biochem.* 2004; 93(3):491-6.
64. Saito T, Kawano T, Saito T, Ikoma A, Namai K, Tamemoto H, Kawakami M, Ishikawa SE. Elevation of serum adiponectin levels in Basedow disease. *Metabolism.* 2005; 54(11):1461-6.
65. Kokkinos A, Mourouzis I, Kyriaki D, Pantos C, Katsilambros N, Cokkinos DV. Possible implications of leptin, adiponectin and ghrelin in the regulation of energy homeostasis by thyroid hormone. *Endocrine.* 2007; 32(1):30-2.
66. Pinkney JH, Goodrick SJ, Katz J, Johnson AB, Lightman SL, Coppack SW, Mohamed-Ali V. Leptin and the pituitary ? thyroid axis: a comparative study in lean,

obese, hypothyroid and hyperthyroid subjects. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1998;49(5):583-8.

67. Kautzky-Willer A, Ludwig C, Nowotny P, Roden A, Huemer C, Widhalm K, Vierhapper H, Waldhausl W, Roden M. Elevation of plasma leptin concentrations in obese hyperinsulinaemic hypothyroidism before and after treatment. *Eur J Clin Invest*. 1999; 29(5):395-403.

68. Yoshida T, Monkawa T, Hayashi M, Saruta T. Regulation of expression of leptin mRNA and secretion of leptin by thyroid hormone in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 232(3):822-6.

69. Yoshida T, Momotani N, Hayashi M, Monkawa T, Ito K, Saruta T. Serum leptin concentrations in patients with thyroid disorders. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1998; 48(3):299- 302.

70. Obermayer-Pietsch BM, Fruhauf GE, Lipp RW, Sendlhofer G, Pieber TR (2001) Dissociation of leptin and body weight in hyperthyroid patients after radioiodine treatment. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25: 115–120. doi:10.1038/sj.ijo.0801724. PubMed: 11244466.

71. Simo R, Hernandez C, Zafon C, Galofré P, Castellanos JM et al. (2000) Short-term hypothyroidism has no effect on serum leptin concentrations. *Diabetes Obes Metab* 2: 317-321. doi:10.1046/j. 1463-1326.2000.00086.x. PubMed: 11225748

72. Aragao CN, Souza LL, Cabanelas, A, Oliveira KJ, Pazos-Moura CC. Adiponectin serum concentration is increased in experimental hyperthyroidism. *Metabolism*. 2007; 56:6-11.

73. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, et al.

Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(5):1930-5.

74. Matsuzawa, Y. (2010). Establishment of a concept of visceral fat syndrome and discovery of adiponectin. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B, Phys. Biol. Sci.* 86, 131–141.

75. Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R. Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 290(3):1084-9.

76. Oliveira Md, de SÍbio MT, Olimpio RM, Moretto FC, Luvizotto Rde A, Nogueira CR. Triiodothyronine modulates the expression of leptin and adiponectin in 3T3-L1 adipocytes. *Einstein (Sao Paulo).* 2015;13(1):72-8.

77. MEZOSI, E.; SZABO, J.; NAGY, E. V.; BORBELY, A.; VARGA, E.; PARAGH, G.; VARGA, Z. Nongenomic effect of thyroid hormone on free-radical production in human polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Endocrinology*, v. 185, p. 121–129 2005.

78. Wrutniak-Cabello, C., Casas, F., Cabello, G., 2001. Thyroid hormone action in mitochondria. *J. Mol. Endocrinol.* 26, 67–77.

79. de Oliveira M, Luvizotto Rde A, Olimpio RM, De Sibio MT, Conde SJ, Biz Rodrigues Silva C, et al. Triiodothyronine increases mRNA and protein leptin levels in short time in 3T3-L1 adipocytes by PI3K pathway activation. *PLoS One.* 2013; 18; 8(9):e74856.