

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 02/08/2023.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

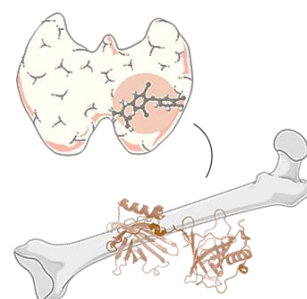
O papel do hormônio da tireoide 3,3',5 – Triiodotironina (T3) na expressão de Lipocalina 2 (LCN2) e sua possível contribuição em mecanismos fisiológicos de ingesta alimentar.

AMANDA FANTINI DE CAMARGO ANDRADE

Prof. Dr. Willian Fernando Zambuzzi

BOTUCATU – SP

2021



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

O papel do hormônio da tireoide 3,3',5 – Triiodotironina (T3) na expressão de Lipocalina 2 (LCN2) e sua possível contribuição em mecanismos fisiológicos de ingesta alimentar.

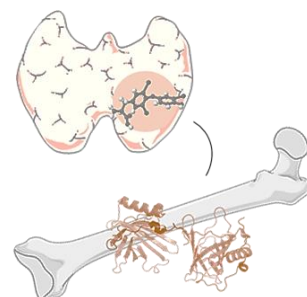
AMANDA FANTINI DE CAMARGO ANDRADE

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia de Processos e Sistemas.

Orientador: *Prof. Dr. Willian Fernando Zambuzzi*
Co-orientador: *Prof. Dr. Renato Ferretti*

BOTUCATU – SP

2021



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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Andrade, Amanda Fantini de Camargo.

O papel do hormônio da tireoide 3,3',5 - Triiodotironina (T3) na expressão de Lipocalina 2 (LCN2) e sua possível contribuição em mecanismos fisiológicos de ingesta alimentar / Amanda Fantini de Camargo Andrade. - Botucatu, 2021

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Willian Fernando Zambuzzi
Coorientador: Renato Ferretti
Capes: 20801009

1. Hormônios Tireóideos. 2. Tri-iodotironina. 3. Tecido ósseo. 3. Osteoblastos. 4. Adipócitos. 5. Lipocalina-2.

Palavras-chave: Hormônio T3; Ingesta alimentar; Lipocalina 2; Osteoblastos e adipócitos; Tecido ósseo.

*Gostaria de dedicar esse trabalho a toda minha família,
principalmente, meus pais, Márcia e Amadeu, e a minha
Tia Mara, que sempre me apoiaram e ampararam.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, por sempre ter feito parte da minha vida e me auxiliado em todos os caminhos, ter me presenteado com muitas graças ao decorrer da minha trajetória dentro da vida e da academia, as quais me fizeram chegar aqui de forma vitoriosa. Além disso, a fé e as orações realizadas me deram força para continuar nos momentos que a sensação de desistência era eminente.

Em especial, a toda minha família, que sempre me apoiou independente das dificuldades que enfrentamos, em especial aos meus pais Márcia e Amadeu, que abdicaram de muitos sonhos para que suas filhas sempre tivessem uma boa educação e caráter, me ensinaram que é através do conhecimento que podemos mudar o mundo. Sempre agradei por ter pais tão presentes e batalhadores, acredito que sem eles ao meu lado eu não teria conseguido vencer tantos desafios e conseguido chegar tão longe, hoje, a pessoa que sou reflete os ensinamentos deles, que foram baseados em luta, bondade e integridade. Obrigada pela compreensão com minha ausência durante essa longa jornada!

À minha amada irmã Barbara, que esteve comigo desde o primeiro momento que nasci e cuidou para que eu fosse feliz e realizada de todas as formas, foi e é meu escudo e minha ouvinte.

À minha querida e amada Tia Mara, uma mulher linda e guerreira a qual tive o prazer de compartilhar a vida durante todos esses anos. A pessoa que mais me incentivou a seguir minha carreira como bióloga e a realizar pós-graduação, a mulher que me ajudou de todas as formas na minha formação educacional e pessoal e que foi um pilar para toda a família e que hoje continua cuidando de mim, mas em um lugar melhor, como meu anjo protetor.

As minhas queridas amigas de Batatais e Cravinhos, que fizeram parte de momentos importantes da minha vida e sempre me apoiaram e incentivaram.

Aos meus queridos amigos de Botucatu, em especial aqueles que conheci durante minha graduação e estão ao meu lado até hoje, sempre me apoiando e incentivando. E a minha turma LI de Ciências Biológicas, por todo conhecimento e desafios compartilhados e pelo espírito colaborativo.

Agradeço ainda a minha República Shairiron, a qual foi minha família durante os anos que morei em Botucatu e sempre me ampararam, obrigada por cada risada, choro, discussão e abraço compartilhado, todos esses momentos me fizeram crescer e evoluir como pessoa.



Ao meu namorado, Lucas Piato, por sempre me apoiar, e não me deixar duvidar da minha capacidade e competência, além de ser compreensivo parceiro durante todo esse período.

Aos meus colegas dos diversos projetos de extensão que participei na UNESP, incluindo o Congresso de Biociências, o Cursinho pré-universitário Atena e ao Meninas na Ciências, esses grupos me proporcionaram vivências fundamentais para meu desenvolvimento, me tornando uma pessoa e uma profissional mais completa.

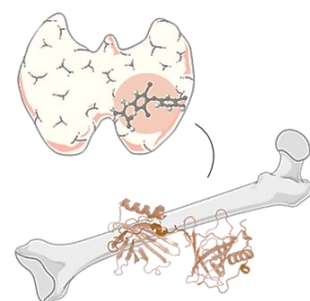
À todas as mulheres que lutaram pelos nossos direitos na sociedade, em especial as cientistas, que venceram todo o preconceito existente na academia e conseguiram realizar grandes contribuições para à ciência, influenciando e incentivando outras jovens mulheres a ocuparem locais como Universidades e Centros de Pesquisa.

Agradeço à FAPESP (2019/04495-0), pelo financiamento concedido, o qual foi imprescindível para a realização do projeto.

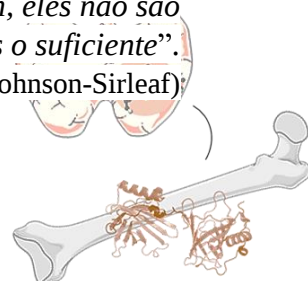
Ao meu Coorientador, Prof. Dr. Renato Ferretti, por todos os ensinamentos compartilhados e ajuda prestada durante esses dois anos de desenvolvimento do projeto.

Aos meus queridos colegas de laboratório, os quais me ajudaram durante todo esse período, não só na bancada e nas discussões científicas, mas também nos momentos difíceis nos quais os prazos pareciam impossíveis de serem cumpridos. Além das boas risadas trocadas durante o “cafézinho da tarde”, nas confraternizações e diversos outros momentos que contribuíram para formar grandes laços de amizade.

Por fim, gostaria de agradecer ao meu querido orientador, Willian Zambuzzi, que me acolheu em seu laboratório desde a iniciação científica e abraçou uma ideia totalmente diferente da sua linha de pesquisa e ainda me encorajou a segui-la durante o Mestrado. Agradeço ainda pelo voto de confiança, pela compreensão em relação aos erros cometidos, as aulas e discussões ofertadas e a contínua motivação. Obrigada por acreditar no meu potencial, sua presença como Orientador foi fundamental para o meu progresso científico e pessoal.

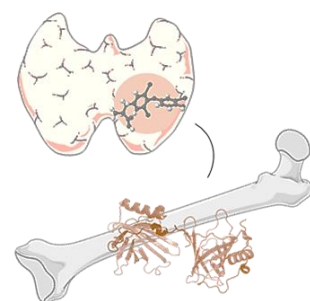


“O tamanho dos seus sonhos deve sempre exceder a sua capacidade de alcançá-los. Se os seus sonhos não te assustam, eles não são grandes o suficiente”.
(Ellen Johnson-Sirleaf)



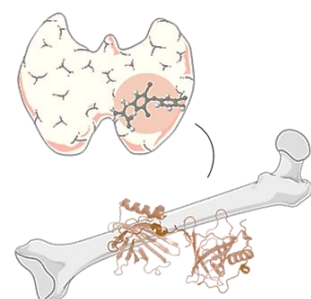
RESUMO

O hormônio tireoidiano 3,3',5 – Triiodotironina (T3) atua nas principais vias metabólicas, sendo sua ação mais representativa no aumento do metabolismo celular basal, que pode ocorrer de forma direta ou indireta através do estímulo de outras moléculas tróficas associadas em mecanismos fisiológicos. Desta forma, a compreensão da sua homeostase faz-se necessária considerando também condições de hipo e hipertireoidismo. Considerando esta perspectiva, tem sido mostrado que o tecido ósseo possui uma estreita relação que leva ao controle do metabolismo energético, sendo a molécula Lipocalina 2 considerada em aspectos centrais no controle do apetite. Neste contexto, com o intuito de melhor descrever possíveis vias metabólico-fisiológicas e seu comportamento através da exposição ao T3, o objetivo desse trabalho é avaliar o papel do hormônio T3 na expressão de Lipocalina 2 (LCN2) e sua possível contribuição em mecanismos fisiológicos de ingesta alimentar através do metabolismo de osteoblastos e adipócitos. Para isso, nossa proposta está dividida em 2 etapas, uma *in vitro* e outra *in vivo*. Nesta primeira etapa realizamos estudos *in vitro*, utilizando dois tipos celulares, pré-osteoblastos (MC3T3-E1) e pré-adipócitos (3T3-L1), submetidas a 2 tempos de tratamentos, 24h e 72h, em diferentes concentrações do hormônio T3, considerando: 1. Células sem tratamento (controle); 2. Eut: concentração fisiológica (1,5nM); 3. Hypo: concentração hipotireoidica (1nM); 4. Hyper: concentração hipertireoidica (2,0nM). As amostras foram apropriadamente coletadas e destinadas às diferentes metodologias. Nossos resultados mostraram que o T3 estimula um fenótipo de osteodiferenciação através de remodelamento de matriz extracelular (MEC) em todas as condições principalmente através da ativação dos biomarcadores clássicos desse fenótipo: genes RUNX2, OTX, BMP2-7 e metaloproteinases de matriz (MMPs)-2 e -9. Além disso, observamos que o T3 age em sinergismo a ativação dos genes *LCN2* e *OCN* nas condições Hipo e Hipertireoidicas, por fim favorecendo processo de osteoclastogênese, destacado pela investigação do complexo RANKL/OPG, o qual apresenta papel central nesse mecanismo necessário ao remodelamento da matriz óssea. Ademais, o hormônio T3 promove significativa atividade das MMPs nessas células. Em adição, estes resultados também trazem importante comportamento de adipócitos na expressão gênica de *LCN2*, *OCN* e *RANKL* nas condições Hipo e Hipertireoidicas. Soma-se aos resultados a modulação do perfil transcricional dos genes relacionados à reprogramação epigenética em osteoblastos e adipócitos, como TETs, DNMTs, e enzimas de processamento de miRNA (Dicer, Drosha e XPO5) e potenciais miRNAs (mir-143, 485, 23a/b e 335), sendo importantes para a compreender o envolvimento epigenético associado ao modelo proposto. Resultados mostram que T3 estimula a expressão de lipocalina 2 e sua liberação na matriz extracelular nos fenótipos de osteoblastos e adipócitos indicando atuação concomitante na indução de osteoclastogênese através do aumento significativo de RANKL em concentrações não fisiológicas. Além disso, após realizarmos análises de bioinformática, através da ferramenta String, a qual utilizamos enriquecimento de redes PPI, observamos que as possíveis vias de sinalização que conectam *Thra* e *Lcn2* são vinculadas, também, à processos osteoclastogênicos, além de processos angiogênicos. Na etapa “*in vivo*” (n=5) foram considerados 5 grupos: Controle, Sham, Hypo, Veh e Hyper, os quais foram monitorados durante 21 dias, após esse período as amostras foram coletadas e destinadas a diversos ensaios e análises. Observou-se que ocorreu modulação na ingesta alimentar e aumento de peso, principalmente, no grupo Hyper, bem como alterações moleculares a partir do tecido adiposo, mostrando uma regulação positiva da *LCN2* e *MC4R* no grupo Hypo. Já as análises histomorfométricas não mostraram diferenças significativas, assim, o T3 regula expressão de *LCN2* em nível molecular, principalmente, em condições fisiopatológicas como o Hipotireoidismo. Logo, temos que compreensão em torno da sinalização endócrina e integração tecidual é um grande desafio nas áreas básicas, no âmbito molecular e fisiológico, neste contexto, nossos resultados elucidaram o sinergismo entre o hormônio tireoidiano T3 e a *LCN2*, e os destacam como potenciais alvos capazes de conectar o tecido ósseo e adiposo através da regulação endócrina e também, epigenética, facilitando assim, o rastreamento de alvos bioquímicos em disfunções metabólicas.



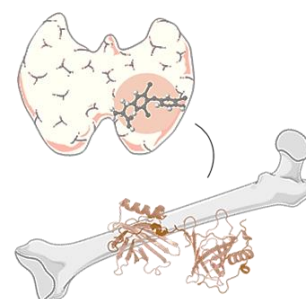
ABSTRACT

The thyroid hormone 3,3',5 - Triiodothyronine (T3) acts in the main metabolic pathways, its major action being in basal cell metabolism, which can occur directly or indirectly through the stimulation of other trophic molecules associated in physiology. Thus, the understanding of its homeostasis is necessary considering the both hypo and hyperthyroidism conditions. From this, it has been identified that the bone tissue has a close relationship that leads to the control of energy metabolism, being a molecule Lipocalin 2 considered playing a pivotal role in appetite controlling. In order to better describe the metabolic-physiological pathways and their behavior through exposure to T3, the aim of this work is to evaluate the role of the hormone T3 in the expression of Lipocalin 2 (LCN2) and its possible contribution to physiological mechanisms of food intake considering the metabolism of osteoblasts and adipocytes. To better address this issue, our proposal was divided into 2 steps, one in vitro and another in vivo. In this first stage, we carried out in vitro studies, using two cell types, pre-osteoblasts (MC3T3-E1) and pre-adipocytes (3T3-L1), submitted to 2 times of treatments, 24h and 72h, in different concentrations of the T3 hormone, as follows: 1. Untreated cells (control); 2. Eut: physiological concentration (1.5nM); 3. Hypo: hypothyroid concentration (1nM); 4. Hyper: hyperthyroid concentration (2.0nM). The samples were properly collected to allow the performing of different methodologies. Our data shows that T3 stimulates an osteodifferentiation phenotype through extracellular matrix (ECM) remodeling in all conditions, mainly through the activation of classical biomarkers of this phenotype: RUNX2, OTX, BMP2-7 and matrix metalloproteinases (MMPs) 2 and -9 genes. In addition, we observed that T3 acts in synergism with the activation of the LCN2 and OCN genes in both Hypo and Hyperthyroid conditions, ultimately favoring the osteoclastogenesis process, highlighted by the investigation of the RANKL/OPG complex, which plays a central role in this mechanism necessary for the remodeling of the bone matrix. Furthermore, the T3 hormone promotes significant activity of MMPs in these cells. In addition, these results also bring important expression of LCN2, OCN and RANKL in adipocyte behavior considering both Hypo and Hyperthyroid conditions. Additionally, we have also investigated the profile of genes related to epigenetic reprogramming in osteoblasts and adipocytes, such as TETs, DNMTs, and miRNA processing enzymes (Dicer, Drosha and XPO5) and potential miRNAs (mir-143, 485, 23a /b and 335). Our data shows that T3 stimulates the expression of lipocalin 2 and its release in the extracellular matrix in osteoblast and adipocyte phenotypes indicates a concomitant role in the induction of osteoclastogenesis through a significant increase in RANKL at non-physiological concentrations. Furthermore, after performing bioinformatics analysis, through the String tool, which uses enrichment of PPI networks, we observed that the possible signaling pathways connecting *Thra* and *Lcn2*, which are also, link to osteoclastogenic processes, beside to angiogenic processes. In the “in vivo” stage (n=5), 5 experimental groups were considered, as follows: Control, Sham, Hypo, Veh and Hyper, which were monitored up to 21 days, when the samples were properly harvested to allow further analyses. It was observed that there was modulation in food intake and weight, mainly in the Hyper group, as well as molecular changes from the adipose tissue, conversely showing an up-regulation of LCN2 and MC4R in the Hypo group. The histomorphometric analyzes did not show significant differences inter-groups. Thus, we conclude that T3 regulates LCN2 expression at the molecular level, mainly in pathophysiological conditions such as hypothyroidism. Therefore, we have to understand around endocrine signaling and tissue integration is a major challenge in the basic areas, in the molecular and physiological ambit, in this context, our results elucidated the synergism between thyroid hormone T3 and LCN2, and highlight them as potential targets capable of connecting bone and adipose tissue through endocrine and also epigenetic regulation, facilitating the tracking of biochemical targets in metabolic dysfunctions.



SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
<i>O tecido ósseo e sua importância endócrina.</i>	2
<i>A Lipocalina 2 e seu Mecanismo de Ação.</i>	4
<i>O Hormônio Triiodotironina (T3) e sua Atuação Metabólica.</i>	7
OBJETIVOS	12
MATERIAIS E MÉTODOS	13
<i>Experimentação in vitro</i>	13
<i>Cultivo celular</i>	13
<i>Avaliação da citotoxicidade do Hormônio T3.</i>	13
<i>Delineamento Experimental.</i>	14
<i>Diferenciação celular da linhagem de pré-adipócitos.</i>	14
<i>Expressão Gênica.</i>	15
<i>Eletroforese e Western Blotting.</i>	18
<i>Ensaio de Zimografia</i>	18
<i>Análise dos Dados.</i>	19
<i>Análises de Bioinformática.</i>	19
<i>Experimentação in vivo.</i>	20
<i>Tireoidectomia.</i>	20
<i>Eutanásia e Coleta das Amostras.</i>	21
<i>Dosagens séricas do T3 e da LCN2.</i>	22
<i>Expressão e Quantificação Gênica.</i>	22
<i>Análise Histológica do Fêmur.</i>	22
<i>Análise dos Resultados.</i>	23
RESULTADOS	24
DISCUSSÃO	69
CONSTATAÇÕES	79
CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81



LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Lipocalina 2, estrutura e ação inflamatória.	5
Figura 2. Atuação da Lipocalina no controle do Apetite	6
Figura 3. Atuação metabólica do hormônio T3 no tecido ósseo e no tecido adiposo.	10
Figura 4. Tireoidectomia Unilateral-Total	21
Figura 5. Histologia da região anterior do pescoço, na qual nota-se a ausência unilateral-total da glândula tireoide (região circulada). T = tireóide; Tq = traqueia; E = esôfago.	21
Figura 6. Efeito do tratamento do hormônio T3 e seu veículo NaOH sobre a viabilidade de pre-osteoblastos.	24
Figura 7. Análise de expressão gênica dos marcadores clássicos da diferenciação osteoblástica.	26
Figura 8. Análise de expressão gênica dos marcadores de remodelamento da matriz óssea.	27
Figura 9. Remodelamento da MEC em reposta ao tratamento com T3.	28
Figura 10. Análise de expressão gênica dos marcadores de proliferação celular.	30
Figura 11. Análise de expressão gênica dos genes relacionados com a resposta endócrina de osteoblastos.	32
Figura 12. Ensaio de ELISA para LCN2.	33
Figura 13. Análise de expressão gênica e quantificação dos marcadores relacionados com a via de inflamação e osteoblastos.	34
Figura 14. Análise de expressão gênica e quantificação dos genes relacionados com processos epigenéticos envolvendo DNA e histonas.	36
Figura 15. Análise de expressão gênica dos genes relacionados com o processamento de mir-RNAs.	37
Figura 16. Análise de expressão gênica dos mir-RNAs atuantes nos processos osteogênicos.	38
Figura 17. Pré-adipócitos (3T3-L1) submetidos a diferenciação adipogênica.	39
Figura 18. Viabilidade celular de adipócitos.	39
Figura 19. Expressão gênica dos marcadores de crescimento celular.	41
Figura 20. Comportamento das MMPs em reposta ao tratamento com T3 por 24h.	43
Figura 21. Comportamento das MMPs em reposta ao tratamento com T3 por 72h.	44
Figura 22. Análise de expressão gênica dos genes relacionados à resposta inflamatória.	46
Figura 23. Análise da expressão gênica dos genes relacionados com a resposta endócrina em adipócitos.	48
Figura 24. Ensaio de ELISA para LCN2.	49
Figura 25. Análise da expressão gênica dos da Leptina e seu receptor.	49
Figura 26. Análise de expressão gênica dos marcadores vinculados a metilação e desmetilação do DNA.	51
Figura 27. Análise de expressão gênica dos marcadores vinculados ao processamento dos mir-RNAs.	52
Figura 28. Análise de expressão gênica dos mir-RNAs em adipócitos.	53
Figura 29. Análise de interação entre TRα1 e LCN2 utilizando redes de interação proteína-proteína (PPI) a partir da ferramenta String (https://string-db.org/).	54
Figura 30. Rede de interação proteína-proteína (PPI) para THRα.	55
Figura 31. Rede de interação proteína-proteína (PPI) para THRα.	56
Figura 32. Rede PPI total. Em azul as proteínas exclusivas da rede PPI de Lcn2, em rosa proteínas exclusivas da rede PPI do THRα e em amarelo as proteínas comuns as redes.	57
Figura 33. Distribuição de densidades da centralidades analisadas para as proteínas da rede total (PPI). Linhas em azul representam valores da Lcn2 e as rosas do Thra1.	59
Figura 34. Cluster referente a LCN2 com pontuação MCODE acima de 10, seguido da tabela que exhibe os principais IDs DAVID. Em amarelo proteínas comuns à relação LCN2 – THRα.	61
Figura 35. Cluster referente a THRα com pontuação MCODE acima de 10, seguido da tabela que exhibe os principais IDs DAVID.	61
Figura 36. Cluster com pontuação MCODE acima de 10, seguido da tabela que exhibe os principais IDs DAVID. Em amarelo proteínas comuns à relação LCN2 – THRα.	62
Figura 37. Cluster com pontuação MCODE acima de 10, seguido da tabela que exhibe os principais IDs DAVID. Em amarelo proteínas comuns à relação LCN2 – THRα.	62
Figura 38. Cluster referente ao THRα com pontuação MCODE acima de 10, seguido da Tabela que exhibe os principais IDs DAVID.	63
Figura 39. Caminhos curtos entre LCN2 e THRα1. Em vermelho o caminho mais curto.	64

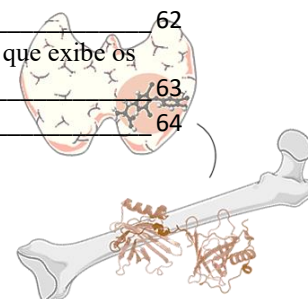
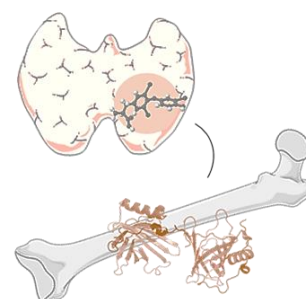
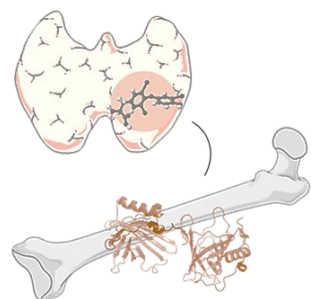


Figura 40. Análise da ingesta alimentar (a), água (b), peso corporal (c) e índice de adiposidade (d) de cinco camundongos machos após 3 semanas (21 dias) de dieta ad libitum. _____	65
Figura 41. Concentração sérica de T3 (a) e LCN2 (b), após 0, 7 e 21 dias. _____	66
Figura 42. Análise de expressão gênica dos marcadores endócrinos vinculados a modulação da ingesta alimentar presentes na gordura abdominal. _____	66
Figura 43. Análise de expressão gênica dos marcadores endócrinos vinculados a modulação da ingesta alimentar presentes no hipotálamo. _____	67
Figura 44. Coloração H&E das lâminas do fêmur dos camundongos. _____	68
Figura 45. Análises histomorfométricas dos cortes histológicos. _____	69
Figura 46. Mapa fisiológico e molecular da integração osteoblasto-adipócito. _____	80



LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência de Primers dos genes utilizados durante o desenvolvimento do projeto.	15
Tabela 2. Análise de centralidades da rede total. Das primeiras 20 proteínas (22 devido a empate) baseado no grau de conectividade.	57
Tabela 3. Clusters obtidos para a rede total.	59
Tabela 4. Caminhos curtos avaliados.	63



LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

BMP: Proteína morfogênica óssea.

BSP: Sialo proteína óssea

ALP: Fosfatase alcalina

COL1A1: Colágeno alpha 1 tipo 1

RUNX2: Fator de Transcrição 2 relacionado À Runt

OTX: Osterix

FGFs: Fatores de crescimento de fibroblastos

OPG: Osteoprotegerina

RANKL: Ligante fator nuclear kappa-B

NF-κB: Fator nuclear kappa B

ATP: Adenosida trifosfato

RXR: Receptor retinóide X

[nM]: Nanomolar.

18S: RNA Ribossomal

ANOVA: Análise de variância

BSA: Proteína albumina bovina

DTT: Ditiotreitól

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

RPS18: Proteína ribossômica 40S S18

HIF1α: Fator indutor de Hipóxia

kDa: KiloDalton

MEC: Matriz Extracelular

SNC: Sistema nervoso central

EUA: Estados Unidos da América.

mirRNA: micro RNAs.

BAT: Tecido adiposo marrom.

MCS-F: Fator estimulador de colônia de macrófagos.

IMC: Índice de massa corpórea.

INFγ: Interferon gamma.

TNFα: Fator de necrose tumoral.

FAK: Cinase de adesão focal.

α-MEM: Meio Mínimo Essencial α.

DMEM: Meio Dulbecco MEM.

NaOH: Hidróxido de sódio.

SyBR: SyBR green (corante de cianina)

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) -2, 5-difenil-2H-tetrazólio.

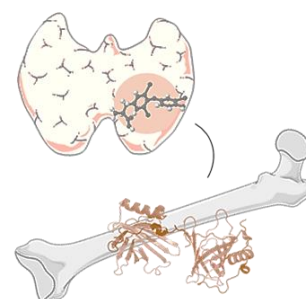
TETs: Translocação de dez-onze, metilcitosina dioxigenase.

DNMTs: DNA-metiltransferase.

DICER: Endoribonuclease Dicer.

DROSHA: Ribonuclease (RNase) III.

XPO5: Exportin-5.

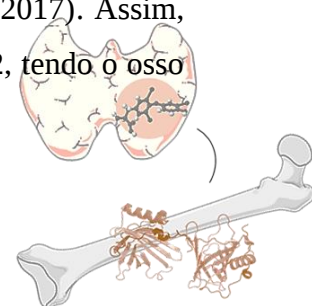


INTRODUÇÃO

Os eventos biológicos que ocorrem nos vertebrados são bastante complexos e envolvem diferentes células, tecidos e órgãos, os quais se comunicam constantemente através de sinalizações autócrina, parácrina e endócrina para manter sua homeostase. Fisiologicamente, o osso tem sido colocado em posição de destaque, uma vez que elegantes trabalhos têm demonstrado sua participação em mecanismos sistêmicos, com destaque àqueles descrevendo seu envolvimento no metabolismo energético. Especificamente, o osso é um tecido dinâmico de alta plasticidade, sendo constituído por 4 tipos celulares peculiares, os osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e as células de revestimento, que juntos sintetizam, absorvem e modulam o tecido diariamente (FLORENCIO-SILVA et al., 2015), proporcionando ao osso a capacidade de desempenhar importantes funções como, suporte mecânico, locomoção, estoque de cálcio e fosfato, proteção física para órgãos e local para produção e manutenção dos elementos medulares, como as células hematopoiéticas (GRABOWSKI, 2015). Entretanto, as informações sobre as funções endócrinas vinculadas ao tecido ósseo têm ganhado destaque nos últimos anos e estudos são necessários nesta compreensão fisiológica do organismo.

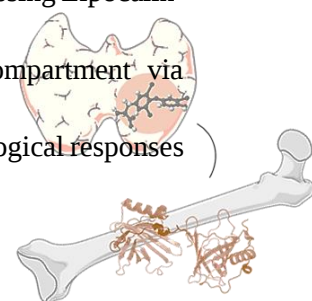
Neste contexto, a homeostase do tecido ósseo é regulada por diversas moléculas como enzimas, interleucinas e hormônios, dos quais o hormônio tireoidiano, 3,3',5-triiodo-L-thironina (T3), parece atuar de modo direto em seu metabolismo além de modular diversos mecanismos celulares como, adesão, proliferação, mineralização e diferenciação (DUNCAN BASSETT; WILLIAMS, 2016). Dessa forma, alterações na concentração fisiológica de hormônio T3 provocam doenças sistêmicas relacionadas ao Hipotireoidismo e Hipertireoidismo e, conseqüentemente, acarretam disfunções no desenvolvimento ósseo, frequência cardíaca e respiratória, absorção de glicose e síntese do hormônio de crescimento (GH) (JABBAR et al., 2016; KOPCHICK., 2020). Outro importante fator a ser considerado além da regulação do tecido ósseo por moléculas endócrinas é a sua capacidade de sintetiza-las, assim, é conhecido na literatura que o osso é capaz de sintetizar e liberar 3 hormônios já descritos, a osteocalcina, o FGF23 e a LCN2 (DIRCKX et al., 2019).

A Lipocalina 2 é uma importante proteína que atua de forma variada no organismo, como reguladora dos níveis séricos de ferro, importante biomarcador de doenças renais, indutora de respostas inflamatórias e também, realiza a supressão do apetite via feedback negativo (BHUSAL et al., 2019; GUMPPER et al., 2020; MOSIALOU et al., 2017). Assim, esse trabalho busca elucidar o sinergismo entre o hormônio T3 e a Lipocalina 2, tendo o osso



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANYETEI-ANUM, C. S.; ROGGERO, V. R.; ALLISON, L. A. Thyroid hormone receptor localization in target tissues. **Journal of Endocrinology**, v. 237, n. 1, p. R19–R34, 2018.
- APOSTU, D. et al. The influence of thyroid pathology on osteoporosis and fracture risk: A review. **Diagnostics**, v. 10, n. 3, 2020.
- ASIMAKOPOULOU, A.; WEISKIRCHEN, S.; WEISKIRCHEN, R. Lipocalin 2 (LCN2) expression in hepatic malfunction and therapy. **Frontiers in Physiology**, v. 7, n. SEP, p. 1–18, 2016.
- BHUSAL, A. et al. Paradoxical role of lipocalin-2 in metabolic disorders and neurological complications. **Biochemical Pharmacology**, v. 169, p. 113626, 2019.
- BIANCO, A.; CONCEIÇÃO, A. R. DA. The Deiodinase Trio and Thyroid Hormone Signaling. **Methods Mol Biol.**, v. 18, n. 01, p. 67–83, 2018.
- BONEWALD, L. F. The amazing osteocyte. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 26, n. 2, p. 229–238, 2011.
- BOONANANTANASARN, K. et al. EGF Inhibits Wnt/ β -Catenin-Induced Osteoblast Differentiation by Promoting β -Catenin Degradation. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 116, n. 12, p. 2849–2857, 2015.
- BOULOUMIÉ, A. et al. Adipocyte Produces Matrix Metalloproteinases 2 and 9 Involvement in Adipose Differentiation. **Diabetes**, v. 50, n. 9, p. 2080–2086, 2001.
- BRENT, G. A. Mechanisms of thyroid hormone action Find the latest version : Science in medicine Mechanisms of thyroid hormone action. **The journal of clinical investigation**, v. 122, n. 9, p. 3035–3043, 2012.
- BUONAFINE, M.; MARTINEZ-MARTINEZ, E.; JAISSE, F. RIC. More than a simple biomarker: The role of NGAL in cardiovascular and renal diseases. **Clinical Science**, v. 132, n. 9, p. 909–923, 2018.
- BUTTERWITH, S. C. Regulators of Adipocyte Precursor Cells. **Poultry Science**, v. 76, n. 1, p. 118–123, 1997.
- CAPPARIELLO, A. et al. The Great Beauty of the osteoclast. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 558, n. June, p. 70–78, 2014.
- CAPULLI, M. et al. A Complex Role for Lipocalin 2 in Bone Metabolism: Global Ablation in Mice Induces Osteopenia Caused by an Altered Energy Metabolism. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 33, n. 6, p. 1141–1153, 2018.
- CARVALHO, D. P.; DUPUY, C. Thyroid hormone biosynthesis and release. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 458, p. 6–15, 2017.
- CAWTHORN, W. P.; SETHI, J. K. TNF- α and adipocyte biology. **FEBS Letters**, v. 582, n. 1, p. 117–131, 2008.
- CHAKER, L. Hypothyroidism. **The Lancet**, v. 390, n. 10101, p. 1550–1562, 2017.
- CHANSON, P. Os et métabolisme Bone and metabolism. v. 79, p. 40–47, 2018.
- CHEN, X. et al. Osteoblast–osteoclast interactions. **Connective Tissue Research**, v. 59, n. 2, p. 99–107, 2018.
- CHENG, S. Y.; LEONARD, J. L.; DAVIS, P. J. Molecular aspects of thyroid hormone actions. **Endocrine Reviews**, v. 31, n. 2, p. 139–170, 2010.
- CHUNG, I. et al. Thyroid hormone-mediated regulation of lipocalin 2 through the Met / FAK pathway in liver cancer. v. 6, n. 17, 2015.
- COSTA, D. et al. Altered bone development and turnover in transgenic mice over-expressing Lipocalin-2 in bone. **Journal of Cellular Physiology**, v. 228, n. 11, p. 2210–2221, 2013.
- COSTA, D. et al. LCN2 overexpression in bone enhances the hematopoietic compartment via modulation of the bone marrow microenvironment. n. December, p. 3077–3087, 2016.
- CROSS, M. J. et al. FGF and VEGF function in angiogenesis : signalling pathways , biological responses



and therapeutic inhibition. v. 22, n. 4, p. 201–207, 2001.

CSARDI, G., & NEPUSZ, T. The igraph software package for complex network research. *InterJournal, Complex Systems*. **igraph software package**, v. 29, n. 8, p. 2191–2193, 2006.

DAVID, J. P.; SCHETT, G. TNF and bone. **Current Directions in Autoimmunity**, v. 11, p. 135–144, 2010.

DAVIS, P. J. et al. **Molecular Basis of Nongenomic Actions of Thyroid Hormone**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2018. v. 106

DEVEREAUX, D.; TEWELDE, S. Z. Hyperthyroidism and thyrotoxicosis. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v. 32, n. 2, p. 277–292, 2014.

DIRCKX, N. et al. The role of osteoblasts in energy homeostasis. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 15, n. 11, p. 651–665, 2019.

DOFARA, S. G.; CHANG, S. L.; DIORIO, C. Association between the polymorphisms in MMP-2 and MMP-9 with adiposity and mammographic features. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 182, n. 1, p. 169–179, 2020.

DUNCAN BASSETT, J. H.; WILLIAMS, G. R. Role of thyroid hormones in skeletal development and bone maintenance. **Endocrine Reviews**, v. 37, n. 2, p. 135–187, 2016.

DUNN, J. T.; DUNN, A. D. Update on intrathyroidal iodine metabolism. **Thyroid**, v. 11, n. 5, p. 407–414, 2001.

EDER, K. et al. The major inflammatory mediator interleukin-6 and obesity. **Inflammation Research**, v. 58, n. 11, p. 727–736, 2009.

EVERTS, V. et al. The bone lining cell: Its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 17, n. 1, p. 77–90, 2002.

FAKHRY, M. Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts. **World Journal of Stem Cells**, v. 5, n. 4, p. 136, 2013.

FASSHAUER, M.; BLÜHER, M. Adipokines in health and disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 36, n. 7, p. 461–470, 2015.

FLORENCIO-SILVA, R. et al. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. **BioMed research international**, v. 2015, p. 421746, 2015a.

FLORENCIO-SILVA, R. et al. Biology of Bone Tissue : Structure , Function , and Factors That Influence Bone Cells. v. 2015, 2015b.

GAGNON, A. M. et al. Thyroid-stimulating hormone stimulates lipolysis in adipocytes in culture and raises serum free fatty acid levels in vivo. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 59, n. 4, p. 547–553, 2010.

GEMINI-PIPERNI, S. et al. Cellular behavior as a dynamic field for exploring bone bioengineering: A closer look at cell-biomaterial interface. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 561, p. 88–98, 2014.

GENE, T.; CONSORTIUM, O. Gene Ontology : tool for the. **Gene Expression**, v. 25, n. may, p. 25–29, 2000.

GILBERTO, S.; PETER, M. Dynamic ubiquitin signaling in cell cycle regulation. **Journal of Cell Biology**, v. 216, n. 8, p. 2259–2271, 2017.

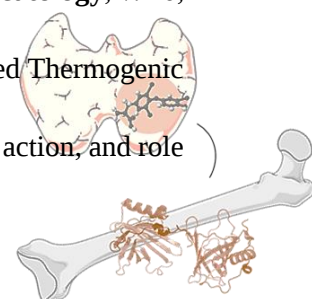
GOGAKOS, A. I.; DUNCAN BASSETT, J. H.; WILLIAMS, G. R. Thyroid and bone. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 503, n. 1, p. 129–136, 2010.

GRABOWSKI, P. Physiology of Bone. **Endocrine Development**, v. 28, p. 33–55, 2015.

GUMPPER, K. et al. Lipocalin-2 expression and function in pancreatic diseases. **Pancreatology**, v. 20, n. 3, p. 419–424, 2020.

GUO, H. et al. Lipocalin 2 , a Regulator of Retinoid Homeostasis and Retinoid-mediated Thermogenic Activation in Adipose. v. 291, n. 21, p. 11216–11229, 2016.

HERSCHEL CONAWAY, H.; HENNING, P.; LERNER, U. H. Vitamin a metabolism, action, and role



in skeletal homeostasis. **Endocrine Reviews**, v. 34, n. 6, p. 766–797, 2013.

HOGUE, G. D. B. AND C. W. An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. **BMC Bioinformatics**, v. 29, n. 1, p. 137–140, 2001.

HU, K.; OLSEN, B. R. The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration. **Bone**, v. 91, p. 30–38, 2016.

HUANG, Y. et al. Effects of MicroRNA-23a on differentiation and gene expression profiles in 3T3-L1 adipocytes. **Genes**, v. 7, n. 10, 2016.

IANNETTI, A. et al. The neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), a NF- κ B-regulated gene, is a survival factor for thyroid neoplastic cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 37, p. 14058–14063, 2008.

IKI, M. et al. Serum undercarboxylated osteocalcin levels are inversely associated with glycemic status and insulin resistance in an elderly Japanese male population: Fujiwara-kyo Osteoporosis Risk in Men (FORMEN) Study. **Osteoporosis International**, v. 23, n. 2, p. 761–770, 2012.

IOANNA, D. L.; LIU, M. J. Bone : Another potential target to treat , prevent and predict diabetes. v. 7, n. February, p. 1817–1828, 2018.

JABBAR, A. et al. Thyroid hormones and cardiovascular disease. **Nature Reviews Cardiology**, v. 14, n. 1, p. 39–55, 2016.

Ji, C. et al. IL-6 induces lipolysis and mitochondrial dysfunction, but does not affect insulin-mediated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 43, n. 4, p. 367–375, 2011.

JIANG, Z. L. et al. Lentiviral-mediated Shh reverses the adverse effects of high glucose on osteoblast function and promotes bone formation via Sonic hedgehog signaling. **Molecular Medicine Reports**, v. 20, n. 4, p. 3265–3275, 2019.

KANEHISA, M. et al. KEGG: New perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D353–D361, 2017.

KJELDSEN, L. et al. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 14, p. 10425–10432, 1993.

KONCA DEGERTEKIN, C. et al. RANKL/Osteoprotegerin System and Bone Turnover in Hashimoto Thyroiditis. **Calcified Tissue International**, v. 99, n. 4, p. 365–372, 2016.

KONDO, A. et al. AMP-activated protein kinase regulates thyroid hormone-stimulated osteocalcin synthesis in osteoblasts. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 31, n. 6, p. 1457–1462, 2013.

KOPCHICK, J. J. The effects of growth hormone on adipose tissue: old observations, new mechanisms. **Nat Rev Endocrinology**, n. 16, p. 135–146, 2020.

KOPP, P. The TSH receptor and its role in thyroid disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, n. 9, p. 1301–1322, 2001.

KRALISCH, S. et al. Proinflammatory adipocytokines induce TIMP-1 expression in 3T3-L1 adipocytes. **FEBS Letters**, v. 579, n. 28, p. 6417–6422, 2005.

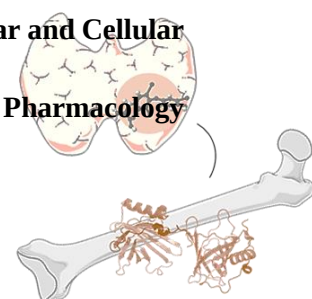
LADEMANN, F. et al. Disruption of BMP Signaling Prevents Hyperthyroidism-Induced Bone Loss in Male Mice. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 35, n. 10, p. 2058–2069, 2020.

LAURBERG, P. Mechanisms governing the relative proportions of thyroxine and 3,5,3'-triiodothyronine in thyroid secretion. **Metabolism**, v. 33, n. 4, p. 379–392, 1984.

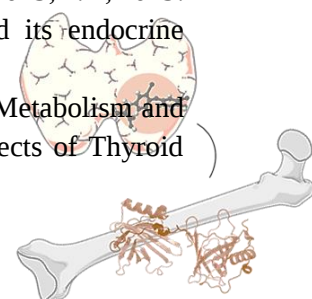
LAWRENCE, M.; DAUJAT, S.; SCHNEIDER, R. Lateral Thinking: How Histone Modifications Regulate Gene Expression. **Trends in Genetics**, v. 32, n. 1, p. 42–56, 2016.

LEE, J.-E. et al. Transcriptional and Epigenomic Regulation of Adipogenesis. **Molecular and Cellular Biology**, v. 39, n. 11, p. 1–20, 2019.

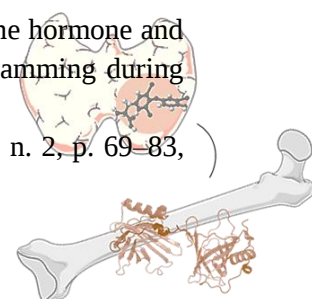
LI, D. et al. Lipocalin-2—The myth of its expression and function. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 127, n. 2, p. 142–151, 2020.



- LI, E. et al. MiR-143 suppresses osteogenic differentiation by targeting Osterix. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 390, n. 1–2, p. 69–74, 2014.
- LI, M.; SHEN, Y.; WRONSKI, T. J. Time course of femoral neck osteopenia in ovariectomized rats. **Bone**, v. 20, n. 1, p. 55–61, 1997.
- LI, W. et al. Young and old adipocytes have differential influence on the development of osteoblasts. **Obesity Research and Clinical Practice**, v. 12, n. 6, p. 520–527, 2018.
- LI YAN†, NIELS BORREGAARD§, LARS KJELDSEN§, AND M. A. M. The High Molecular Weight Urinary Matrix Metalloproteinase (MMP) Activity Is a Complex of Gelatinase B / MMP-9 and Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin (NGAL). v. 276, n. 40, p. 37258–37265, 2001.
- LIM, K. et al. Vascular klotho deficiency potentiates the development of human artery calcification and mediates resistance to fibroblast growth factor 23. **Circulation**, v. 125, n. 18, p. 2243–2255, 2012.
- LIN, C. M. et al. Wogonin inhibits IL-6-induced angiogenesis via down-regulation of VEGF and VEGFR-1, not VEGFR-2. **Planta Medica**, v. 72, n. 14, p. 1305–1310, 2006.
- LIO, C. W. J.; RAO, A. TET enzymes and 5hMC in adaptive and innate immune systems. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. FEB, p. 1–13, 2019.
- LOLMÈDE, K. et al. Effects of hypoxia on the expression of proangiogenic factors in differentiated 3T3-F442A adipocytes. **International Journal of Obesity**, v. 27, n. 10, p. 1187–1195, 2003.
- LONDONO GENTILE, T. et al. DNMT1 Is Regulated by ATP-Citrate Lyase and Maintains Methylation Patterns during Adipocyte Differentiation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 33, n. 19, p. 3864–3878, 2013.
- LÓPEZ-FONTANA, C. M. et al. Effects of hypothyroidism on the mesenteric and omental adipose tissue in rats. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 490, n. April, p. 88–99, 2019.
- LÜDER, E. Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. **E.F.Hartree**, v. 48, n. 2, p. 422–427, 1972.
- LUIDENS, M. K. et al. Thyroid hormone and angiogenesis. **Vascular Pharmacology**, v. 52, n. 3–4, p. 142–145, 2010.
- MACDOUGALD, O. A. et al. Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes (obesity/protein secretion/ob locus/CCAAT/enhancer-binding protein/preadipocyte differentiation). **Biochemistry**, v. 92, n. September, p. 9034–9037, 1995.
- MANNELLO, F. et al. Multiple roles of matrix metalloproteinases during apoptosis. **Apoptosis**, v. 10, n. 1, p. 19–24, 2005.
- MARINI, F.; CIANFEROTTI, L.; BRANDI, M. L. Epigenetic mechanisms in bone biology and osteoporosis: Can they drive therapeutic choices? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 8, 2016.
- MATSUBARA, T. et al. BMP2 regulates osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 43, p. 29119–29125, 2008.
- MATSUO, F. S. et al. RANKL induces beige adipocyte differentiation in preadipocytes. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 318, n. 6, p. E866–E877, 2020.
- MENDOZA, A.; HOLLENBERG, A. N. New insights into thyroid hormone action. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 173, p. 135–145, 2017.
- MERA, P.; FERRON, M.; MOSIALOU, I. Regulation of Energy Metabolism by Bone-Derived Hormones. p. 1–16, 2018.
- MILLAR, S. A.; ANDERSON, S. I.; O’SULLIVAN, S. E. Osteokines and the vasculature: A review of the in vitro effects of osteocalcin, fibroblast growth factor-23 and lipocalin-2. **PeerJ**, v. 2019, n. 7, 2019.
- MIZOKAMI, A.; KAWAKUBO-YASUKOCHI, T.; HIRATA, M. Osteocalcin and its endocrine functions. **Biochemical Pharmacology**, v. 132, p. 1–8, 2017.
- MORENO, M. et al. Thyroid Economy-Regulation, Cell Biology, Thyroid Hormone Metabolism and Action: The Special Edition: Metabolic Effects of Thyroid Hormones Metabolic Effects of Thyroid



- Hormone Derivatives. v. 18, n. 2, 2008.
- MOSIALOU, I. et al. MC4R-dependent suppression of appetite by bone-derived lipocalin 2. **Nature**, v. 543, n. 7645, p. 385–390, 2017.
- MULLUR, R.; LIU, Y. Y.; BRENT, G. A. Thyroid hormone regulation of metabolism. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 2, p. 355–382, 2014.
- NAUTA, T. D.; VAN HINSBERGH, V. W. M.; KOOLWIJK, P. Hypoxic signaling during tissue repair and regenerative medicine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 11, p. 19791–19815, 2014.
- OBREGON, M.-J. Thyroid Economy-Regulation, Cell Biology, Thyroid Hormone Metabolism and Action: The Special Edition: Metabolic Effects of Thyroid Hormones Thyroid Hormone and Adipocyte Differentiation. v. 18, n. 2, 2008.
- OGIER, C. Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) Regulates astrocyte motility in connection with the actin cytoskeletal and integrins. **Wiley-Liss**, v. 54, p. 272–284, 2006.
- OLIVEIRA, M. DE et al. Triiodothyronine Increases mRNA and Protein Leptin Levels in Short Time in 3T3-L1 Adipocytes by PI3K Pathway Activation. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. 1–7, 2013.
- ONO, T.; NAKASHIMA, T. Recent advances in osteoclast biology. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 149, n. 4, p. 325–341, 2018.
- PAIVA, K. B. S.; GRANJEIRO, J. M. Bone tissue remodeling and development: Focus on matrix metalloproteinase functions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 561, p. 74–87, 2014.
- PARFITT, A. M. Bone histomorphometry: Standardization of nomenclature, symbols and units. Summary of proposed system. **Bone and Mineral**, v. 4, n. 1, p. 1–5, 1988.
- PAUL SHANNON, 1 et al. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models. **Genome Research**, v. 13, n. 22, p. 426, 2003.
- PEARCE, E. N. Thyroid hormone and obesity. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity**, v. 19, n. 5, p. 408–413, 2012.
- PEREIRA, R. C.; JORGETTI, V.; CANALIS, E. Triiodothyronine induces collagenase-3 and gelatinase B expression in murine osteoblasts. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 277, n. 3 40-3, p. 496–504, 1999.
- PÉREZ-GARCÍA, S. et al. Profile of Matrix-Remodeling Proteinases in Osteoarthritis: Impact of Fibronectin. **Cells**, v. 9, n. 1, p. 1–29, 2019.
- PINKNEY, J. H. et al. Leptin and the pituitary-thyroid axis: A comparative study in lean, obese, hypothyroid and hyperthyroid subjects. **Clinical Endocrinology**, v. 49, n. 5, p. 583–588, 1998.
- POUNTOS, I. et al. The effect of bone morphogenetic protein-2, bone morphogenetic protein-7, parathyroid hormone, and platelet-derived growth factor on the proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from osteoporotic bone. **Journal of Orthopaedic Trauma**, v. 24, n. 9, p. 552–556, 2010.
- PRINCIPI, E. et al. Anthropometric and glucometabolic changes in an aged mouse model of lipocalin-2 overexpression. 2018.
- RAKOV, H. et al. Sex-specific phenotypes of hyperthyroidism and hypothyroidism in mice. **Biology of Sex Differences**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2016.
- RAMASAMY, S. K. et al. Regulation of Hematopoiesis and Osteogenesis by Blood Vessel-Derived Signals. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 32, n. 1, p. 649–675, 2016.
- RIFAI, O. AL et al. Proprotein convertase furin regulates osteocalcin and bone endocrine function. v. 127, n. 11, 2017.
- RODRIGO, A. et al. Molecular and Cellular Endocrinology The role of triiodothyronine hormone and mechanically-stressed endothelial cell paracrine signalling synergism in gene reprogramming during hBMSC-stimulated osteogenic phenotype in vitro. v. 478, n. March, p. 151–167, 2018.
- ROUSSEAUD, A. et al. Bone-brain crosstalk and potential associated diseases. v. 28, n. 2, p. 69–83,



2016.

RUPAIMOOLE, R.; SLACK, F. J. MicroRNA therapeutics: Towards a new era for the management of cancer and other diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 3, p. 203–221, 2017.

SCHMIDT-OTT, K. M. et al. Dual action of neutrophil gelatinase-associated lipocalin. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 18, n. 2, p. 407–413, 2007.

SEEMAN, E.; MARTIN, T. J. Antiresorptive and anabolic agents in the prevention and reversal of bone fragility. **Nature Reviews Rheumatology**, [s.d.].

SFIRIDAKI, K. et al. Angiogenesis-related cytokines, RANKL, and osteoprotegerin in multiple myeloma patients in relation to clinical features and response to treatment. **Mediators of Inflammation**, v. 2011, 2011.

SICHERI, R. et al. Low prevalence of hypothyroidism among black and Mulatto people in a population-based study of Brazilian women. **Clinical Endocrinology**, v. 66, n. 6, p. 803–807, 2007.

SIMS, N. A.; GOOI, J. H. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 19, n. 5, p. 444–451, 2008.

SU, P. et al. Mesenchymal stem cell migration during bone formation and bone diseases therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 8, 2018.

SZKLARCZYK, D. et al. The STRING database in 2017: Quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D362–D368, 2017.

TAYLOR, P. N. et al. Global epidemiology of hyperthyroidism and hypothyroidism. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 14, n. 5, p. 301–316, 2018.

THOMPSON*, W. R.; CLINTON T. RUBIN, AND J. R. Mechanical Regulation of Signaling Pathways in Bone. **Bone**, v. 503, p. 179–193, 2014.

TOWNSEND, K. L. et al. Bone morphogenetic protein 7 (BMP7) reverses obesity and regulates appetite through a central mTOR pathway. **The FASEB Journal**, v. 26, n. 5, p. 2187–2196, 2012.

TSAI, S. H. et al. Incidences of hypothyroidism associated with surgical procedures for thyroid disorders: A nationwide population-based study. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. December, p. 1–8, 2019.

TSEVIS, K. et al. The influence of thyroid disorders on bone density and biochemical markers of bone metabolism. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, v. 35, n. 1, p. 1–7, 2018.

TSOURDI, E. et al. Hyperthyroidism and hypothyroidism in male mice and their effects on bone mass, bone turnover, and the Wnt inhibitors sclerostin and dickkopf-1. **Endocrinology**, v. 156, n. 10, p. 3517–3527, 2015.

VARGA, F. et al. T3 affects expression of collagen I and collagen cross-linking in bone cell cultures. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 402, n. 2, p. 180–185, 2010.

VARGA, F.; SPITZER, S.; KLAUSHOFER, K. Triiodothyronine (T3) and 1,25-dihydroxyvitamin D3 (1,25D3) Inversely Regulate OPG Gene Expression in Dependence of the Osteoblastic Phenotype. **Calcified Tissue International**, v. 74, n. 4, p. 382–387, 2004.

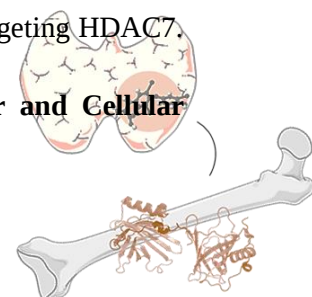
VRTAČNIK, P.; MARC, J.; OSTANEK, B. Epigenetic mechanisms in bone. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 52, n. 5, p. 589–608, 2014.

WAHRENBERG, H. et al. Adrenergic regulation of lipolysis in human adipocytes: Findings in hyper- and hypothyroidism. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 63, n. 3, p. 631–638, 1986.

WALKER, C.; MOJARES, E.; DEL RÍO HERNÁNDEZ, A. **Role of extracellular matrix in development and cancer progression**. [s.l.: s.n.]. v. 19

WANG, R. et al. miR-143 promotes angiogenesis and osteoblast differentiation by targeting HDAC7. **Cell Death and Disease**, v. 11, n. 3, 2020.

WEINER, J. et al. Thyroid hormones and browning of adipose tissue. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 458, p. 156–159, 2017.



XIAO, X.; YEOH, B. S.; VIJAY-KUMAR, M. Lipocalin 2: An Emerging Player in Iron Homeostasis and Inflammation. **Annual Review of Nutrition**, v. 37, n. June, p. 103–130, 2017.

XIAOJUN SHI AND BINGCHENG WANG. Caught in the “Akt”: Cross-talk between EphA2 and EGFR through the Akt-PIKfyve axis maintains cellular sensitivity to EGF. **SCIENCE SIGNALING**, v. 11, 2018.

XIAOYAN SUN. Src activation decouples cell division orientation from cell geometry in mammalian cells. **Biomaterials**, v. 170, p. 82–94, 2018.

YAN, Q. et al. Promotes Insulin Resistance. **October**, v. 56, n. October, p. 2533–40, 2007.

YANG, J. et al. The increase in bone resorption in early-stage type I diabetic mice is induced by RANKL secreted by increased bone marrow adipocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 525, n. 2, p. 433–439, 2020.

YAO, H. et al. Upregulation of SIRT1 inhibits H₂O₂-induced osteoblast apoptosis via FoxO1/β-catenin pathway. **Molecular Medicine Reports**, v. 17, n. 5, p. 6681–6690, 2018.

YOO, Y. et al. TET-mediated hydroxymethylcytosine at the Pparg locus is required for initiation of adipogenic differentiation. **International Journal of Obesity**, v. 41, n. 4, p. 652–659, 2017.

YOU, L. et al. The role of microRNA-23b-5p in regulating brown adipogenesis and thermogenic program. **Endocrine Connections**, v. 9, n. 5, p. 457–470, 2020.

ZAREI, M. et al. Evaluation of the expression of VEGF and VIII factor in the regeneration of non-vital teeth in dogs using propolis. **Iranian journal of basic medical sciences**, v. 20, n. 2, p. 172–177, feb. 2017.

ZHANG, B. et al. A dynamic H3K27ac signature identifies VEGFA-stimulated endothelial enhancers and requires EP300 activity. **Genome Research**, v. 23, n. 6, p. 917–927, 2013.

ZHANG, L. et al. HHS Public Access. **J Bone Miner Res.**, v. 32, n. December, p. 2466–2475, 2018a.

ZHANG, S. Y. et al. MiR-485-5p promotes osteoporosis via targeting Osterix. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 22, n. 15, p. 4792–4799, 2018b.

ZHANG, Y. et al. Associations between circulating bone-derived hormones lipocalin 2, osteocalcin, and glucose metabolism in acromegaly. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 43, n. 9, p. 1309–1316, 2020.

ZHU, L. et al. MiR-335, an Adipogenesis-Related MicroRNA, is Involved in Adipose Tissue Inflammation. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 68, n. 2, p. 283–290, 2014.

ZHU, X.; CHENG, S. Y. New insights into regulation of lipid metabolism by thyroid hormone. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity**, v. 17, n. 5, p. 408–413, 2010.

ZOFKOVA, I. Involvement of bone in systemic endocrine regulation. **Physiological Research**, v. 67, n. 5, p. 669–677, 2018.

ZULLO, A. et al. **SC. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, 2018.

