

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 05/04/2026.



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

Lucas Solla Mathias

**Avaliação da ação da triiodotironina (T3) no
sistema purinérgico, com participação de vias
extranucleares, em adipócitos subcutâneos
humanos *in vitro***

**Tese apresentada à Faculdade
de Medicina, Universidade
Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do
título de Doutor(a) em
Fisiopatologia em Clínica
Médica.**

Orientadora: Profa. Dra. Célia Regina Nogueira

Botucatu

2024

Lucas Solla Mathias

**Avaliação da ação da triiodotironina (T3) no sistema
purinérgico, com participação de vias
extranucleares, em adipócitos subcutâneos
humanos *in vitro***

**Tese apresentada à Faculdade
de Medicina, Universidade
Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do
título de Doutor(a) em
Fisiopatologia em Clínica
Médica.**

Orientadora: Profa. Dra. Célia Regina Nogueira

Botucatu

2024

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Mathias, Lucas Solla.

Avaliação da ação da triiodotironina (T3) no sistema purinérgico, com participação de vias extranucleares, em adipócitos subcutâneos humanos *in vitro* / Lucas Solla Mathias. - Botucatu, 2024

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Célia Regina Nogueira

Capes: 40101002

1. Proteínas Quinases Ativadas por Mitógeno.
2. Fosfatidilinositol 3-Quinase. 3. Purinas - Receptores.
4. Tecido adiposo. 5. Triiodotironina.

Palavras-chave: MAPK; PI3K; Sistema purinérgico; Tecido adiposo; Triiodotironina.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE LUCAS SOLLA MATHIAS, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOPATOLOGIA EM CLÍNICA MÉDICA, DA FACULDADE DE MEDICINA - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 05 dias do mês de abril do ano de 2024, às 08:00 horas, no(a) Sala 2 de Reuniões do Prédio da Administração da FMB/Unesp, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de LUCAS SOLLA MATHIAS, intitulada **Avaliação da ação da Triiodotironina (T3) no sistema purinérgico, com participação de vias extranucleares, em tecido adiposo humano**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. CELIA REGINA NOGUEIRA DE CAMARGO (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Depto. de Clínica Médica / FM/Botucatu - Unesp, Profa. Dra. ADRIANA CAMARGO FERRASI (Participação Presencial) do(a) Depto. de Clínica Médica / FM/Botucatu - Unesp, Prof. Dr. ROBSON FRANCISCO CARVALHO (Participação Presencial) do(a) Depto. de Biologia Estrutural e Funcional / IB/Botucatu - Unesp, Profa. Dra. DENISE ENGELBRECHT ZANTUT WITTMANN (Participação Virtual) do(a) Depto. de Clínica Médica / FCM/Campinas - Unicamp, Profa. Dra. MARIA TEREZA NUNES (Participação Virtual) do(a) Depto de Fisiologia e Bioquímica / Instituto de Ciências Biomédicas - Usp. Após a exposição pelo doutorando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: aprovado. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. CELIA REGINA NOGUEIRA DE CAMARGO



Por sugestão da comissão examinadora da defesa de Doutorado, o título da pesquisa foi alterado de “Avaliação da ação da triiodotironina (T3) no sistema purinérgico, com participação de vias extranucleares, em tecido adiposo humano” para “Avaliação da ação da triiodotironina (T3) no sistema purinérgico, com participação de vias extranucleares, em adipócitos subcutâneos humanos *in vitro*”.

Registro de impacto esperado

O presente trabalho investigou a ação do hormônio triiodotironina (T3), em eventos fisiológicos não descritos em adipócitos subcutâneos humanos. Os resultados observados, promovem o entendimento do papel do hormônio no tecido adiposo, permitindo identificar possíveis causas dos efeitos observados em fisiopatologias do tecido adiposo.

Expected impact record

The present work investigated the action of the hormone triiodothyronine (T3) in undescribed physiological events in human subcutaneous adipocytes. The results observed promote the understanding of the role of the hormone in adipose tissue, allowing us to identify possible causes of the effects observed in pathophysiology of adipose tissue.

Agradecimentos

Agradeço à Deus, por me capacitar, e me conceder força e resiliência nos momentos mais difíceis. Sem Ele nada seria possível.

Obrigado, muito especial, a Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), que me acolheu desde a graduação. Todo o conhecimento adquirido ao longo do meu percurso eu devo a esta Universidade.

Gostaria de agradecer à Faculdade de Medicina de Botucatu e ao Programa de Pós-Graduação de Fisiopatologia em Clínica Médica, particularmente a coordenadora Professora Doutora Daniela Ponce e a secretária Bruna Zanella.

Obrigado a Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) e todos os colaboradores, que sempre estiveram disponíveis para auxiliar no desenvolvimento do trabalho.

Agradeço à Professora Doutora Célia Regina Nogueira, por todos os anos de orientação, paciência e parceria. Por me aceitar em seu grupo de pesquisa, por tudo que me ensinou, por incentivar todos os meus planos e meu trabalho. Agradeço ao grupo do Laboratório de Bases Genéticas das doenças endócrinas pela consideração e cooperação ao longo do meu percurso no laboratório. Sobre tudo a Doutora Miriane de Oliveira, pelo auxílio na cultura celular e obtenção de reagentes, e ao Mestre Igor Deprá, pela contribuição no processamento de amostras para quantificação de Malonaldeído e Carbonilação proteica.

Obrigado à Professora Doutora Camila Correa Camacho e seu grupo de pesquisa, em especial à Mestre Juliana Silva Siqueira, pela contribuição na realização da quantificação de malonaldeído e carbonilação proteica.

Meus agradecimentos à Universidade do Porto, ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar e ao Professor Doutor Paulo Correia de Sá, por ter acreditado no meu trabalho e pela orientação nos períodos que estive em Portugal. Agradeço também ao grupo do laboratório de Farmacologia e Neurobiologia, em especial à Professora Doutora Maria Adelina Costa e a Doutora Carina Herman-de-Sousa, pelo auxílio na cultura celular e obtenção de reagentes, bem como a Doutora Fátima Ferreira pela contribuição na microscopia confocal de imunofluorescência, aos Mestres Catarina Andrês e ao Doutor Rui Pinto-Cardoso pela participação nos ensaios de bioluminescência; agradeço também à Doutora Teresa Magalhães-Cardoso e aos Mestres Ana Luísa Afonso Lopes e Diogo Silva pelo auxílio na realização e otimização dos ensaios cromatográficos.

Obrigado a minha banca de qualificação, Doutora Caroline Serrano e Doutora Miriane de Oliveira, pela brilhante contribuição com minha tese. Agradeço também a minha banca de defesa, a Doutora Adriana Camargo Ferrasi, a Doutora Denise Engelbrecht Zantut Wittmann, a Doutora Maria Tereza Nunes, e ao Doutor Robson Francisco Carvalho, pelas sugestões irretocáveis.

Gostaria de agradecer à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo investimento em meu trabalho e pelas bolsas, de doutorado no país (2020/06763-0) e de estágio de pesquisa no exterior (2021/12247-7).

Um agradecimento especial à minha família, em particular, aos meus pais, Renato Mathias e Adriana Solla, que investiram em minha educação e acreditaram que ela poderia mudar minha realidade. Além de, terem acompanhado todas as etapas do meu doutorado, sempre me apoiando. Aos meus irmãos, Gustavo Mathias

e Leonardo Mathias, e aos meus avós Vera Solla, Ivoni Taffo e Reynaldo Mathias, por todo carinho e amor. E meu sobrinho, Pietro Oliveira Mathias, sua doçura me fortaleceu em diversos momentos.

Agradeço também às pessoas especiais que estão sempre comigo, Aline Choung, João Carvalho, Marcia Matsuhara, Milena de Paula. Obrigado por todo o apoio, carinho e paciência. Sobretudo ao Diego Pettigrosso, que me acompanhou ao longo do doutorado; e à Bruna Moretto Rodrigues, amiga de longa data, que me apresentou a Doutora Célia Regina Nogueira e o grupo de pesquisa do Laboratório de Bases Genéticas das doenças endócrinas.

Sumário

Lista de Figuras	12
Abreviaturas	14
Resumo	18
Abstract	20
1. Introdução estendida	22
1.1. Tecido Adiposo	22
1.2. Sistema Purinérgico	27
1.2.1. Receptores purinérgicos acoplados à proteína G	31
1.2.2. Canais iônicos controlados por ligante P2X	32
1.3. Hormônios Tireoideanos	33
1.4. Vias citoplasmáticas	36
1.4.1. via MAPK/ERK	36
1.4.2. via PI3K/AKT	37
1.5. Hormônios Tireoideanos, Sistema Purinérgico, Tecido adiposo, vias citoplasmáticas	40
2. Justificativa	47
3. Hipótese	48
4. Objetivos	49
4.1. Objetivo Geral	49
4.2. Objetivos específicos	50
5. Materiais e Métodos	51
5.1. Estudo in vitro	51
5.2. Ensaio MTT	52
5.4. Contagem nuclear das células	53
5.5. Coloração Oil Red O	53
5.6. Quantificação de ácidos graxos livres (FFA)	53
5.7. Quantificação de liberação de Glicerol	54
5.8. Extração proteica	54
5.9. Dosagem de Malonaldeído (MDA)	55
5.10. Carbonilação proteica	56
5.11. Quantificação do ATP extracelular	56
5.12. Microscopia confocal de Imunofluorescência	57
5.13. Ultra high performance liquid chromatography (UHPLC)	58
6. Análise Estatística	61
7. Resultados	62
7.1. Artigo expandido	62
7.2. Resultados extras	99
8. Discussão e Considerações finais	103
9. Referências	109
10. Material suplementar	126
11. Anexos	133
11.1.1. BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids	133
11.1.2. Biochemical Pharmacology	134
11.1.3. Molecular and Cellular Endocrinology	135

Lista de Figuras

1. Introdução estendida	22
Figura 1. Comparação entre as características dos diferentes tipos de tecido adiposo. Adaptada de (Lee et al., 2021) (Imagem criada em BioRender.com).	24
Figura 2. Esquema da cascata de sinalização das enzimas purinérgicas. Adaptada de (Yegutkin, 2014). (Imagem criada em BioRender.com).	29
Figura 3. Esquema da sinalização purinérgica com os subtipos de receptores purinérgicos e suas respectivas moléculas ativadoras. P2X sensíveis ao ATP (P2X1-7); P2Y sensíveis ao ATP e ADP (P2Y1,2,4,6,11,12,13,14) e P1 sensíveis à ADO (A1, A2A, A2B, A3). Adaptada de (Yegutkin, 2014). (Imagem criada em BioRender.com).	31
Figura 4. Esquema das vias celulares da MAPK/ERK 1/2 e PI3K. As quinases são ativadas por sinais transmitidos pela fosforilação sequencial delas. Na MAPK/ERK, a ativação de receptor de tirosina quinase (RTK) causa fosforilação de Ras, pelo recrutamento do complexo Grb2/SOS. Ras ativa Raf, que por sua vez ativa MEK, que leva a fosforilação de ERK1/2. Sendo que, o inibidor PD98059 age sobre a MEK. Na via da PI3K, a ativação de receptor de tirosina quinase (RTK) causa fosforilação da PI3K, que converte PIP2 em PIP3, recrutando proteínas como a AKT e PDK1. Assim que a AKT é ativada, pode regular a mTOR. Sendo que, o inibidor LY294002 age sobre a PI3K. (Imagem criada em BioRender.com)	39
5. Materiais e Métodos	51
Tabela 1. Pontos da curva padrão BSA	55
Tabela 2. Anticorpos utilizados na técnica de Imunofluorescência	58
Tabela 3. Gradiente de eluição nos diferentes tempos	59
Tabela 4. Pontos da curva padrão	60
Tabela 5. Resumo das metodologias utilizadas no trabalho	60
7. Resultados	62
Figure 1. MTT assay for PD98059 doses (10µM, 20µM, and 50µM) after 24-hour treatments. The analyzed results are presented as a percentage of control values. PD 5µM=5µM PD98059, PD 10µM=10µM PD98059, PD 20µM=20µM PD98059, PD 50µM=50µM PD98059. Data is expressed as mean±standard deviation (ANOVA-one way complemented by Tukey's test). Readings were taken at an absorbance of 570nm. * p<0.05	73
Figure 2. MTT assay for LY294008 doses (10µM, 20µM, and 50µM) after 24-hour treatments. LY 5µM=5µM LY294008, LY 10µM=10µM LY294008, LY 20µM=20µM LY294008, LY 50µM=50µM LY294008, C = no treatment. Data is expressed as mean±standard deviation (ANOVA-one way supplemented with Tukey's test). The analyzed results are presented as a percentage of control values. Absorbance reading conducted at 570nm. * p<0.05; **** p<0.0001.	74
Figure 3. MTT assay for the doses of PD98059 (5 µM), LY294008 (5 µM), and T3 (10 nM) after 24-hour treatments. T3 = 10 nM triiodothyronine, PD = 5µM PD98059, LY = 5µM LY294008, C = untreated control. Data are expressed as median and interquartile range (Kruskall-Wallis test supplemented by Dunn's test); n = 5. Readings were taken at an absorbance of 570nm.	75
Figure 4. LDH assay. T3=10 nM triiodothyronine, PD=5µM PD98059, LY=5µM LY294008, C = untreated. Data are expressed as mean±standard deviation (one-way ANOVA complemented by Tukey's test); n=2. Readings performed at an absorbance of 405 nm.	76
Figure 5. Nuclear quantification of cells after 24-hour treatments. T3=10 nM triiodothyronine, PD=5µM PD98059, LY=5µM LY294008, C=untreated. Data are expressed as mean±standard deviation (one-way ANOVA complemented by Tukey's test); n=3.	76
Figure 6. Lipid accumulation quantification by Oil Red staining after 24-hour treatments. T3=10 nM triiodothyronine, PD=5µM PD98059, LY=5µM LY294008, C=untreated. Data are expressed as mean±standard deviation (one-way ANOVA supplemented by Tukey's test); n=3. * p<0.05; *** p<0.0005.	77
Figure 7. Image of lipid accumulation by Oil Red staining after 24-hour treatments. T3=10 nM triiodothyronine, PD=5µM PD98059, LY=5µM LY294008, C=untreated control. Micrographs acquired at 10x magnification.	78
Figure 8. Glycerol and fatty acids release assay after 24-hour treatments. T3=10 nM triiodothyronine, PD=5µM PD98059, LY=5µM LY294008, C= untreated. (A) Quantification of glycerol release. (B) Quantification of free fatty acids release. Data are expressed as mean±standard deviation (one-way ANOVA followed by Tukey's test); n=3. Readings performed at 570nm absorbance.	79
Figure 9. Oxidative Stress Assays. T3 = 10 nM triiodothyronine, PD = 5µM PD98059, LY = 5µM LY294008, C = untreated. (A) Malondialdehyde Assay. Readings taken at absorbance of 532 nm and 600 nm. (B) Protein Carbonylation Assessment. Readings taken at absorbance of 450 nm. Data is presented as mean ± standard	

deviation (one-way ANOVA, followed by Tukey's test); n=3.	80
Figure 10. Extracellular ATP release assay. T3=10 nM triiodothyronine, PD=5 μ M PD98059, LY=5 μ M LY294008, C = untreated. Data is expressed as median and interquartile range (Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test); n=3. Readings were taken at an absorbance of 562 nm. * p<0.05 ; **p<0.01 ; **** p< 0.001.	81
Figure 11. Immunocytochemical detection of P2X7, NTPD1, NTPD3, CD73 in human adipocytes treated for 24 hours with T3, PD, and/or LY. T3=10 nM triiodothyronine, PD=5 μ M PD98059, LY=5 μ M LY294008, C=untreated. Nuclei are stained in blue with DAPI. Micrographs were acquired from random fields of two different wells per treatment group, and were obtained using a confocal laser scanning microscope with the same acquisition settings. Green color represents the labeling of the proteins of interest and blue color represents the nuclei (DAPI). Scale bars: 40 μ m. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation (one-way ANOVA followed by Tukey's test). For more details on the immunofluorescence labeling, please refer to the Materials and Methods section. * p<0.05 ; ** p<0.01 ; **** p< 0.001.	83
7.2. Resultados extras	99
Figura 1. Ensaio de MTT para as doses de PD98059 (50 μ M) e LY294008 (20 μ M) após tratamentos de 24 horas. Os resultados analisados são apresentados como porcentagem dos valores de controle. T3=10 nM triiodotironina, PD 50uM =50 μ M PD98059, LY 20uM=20 μ M LY294008, C = sem tratamento. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão (ANOVA-one way complementado pelo teste de Tukey). Leitura realizada em absorbância de 570nm. ** p<0,01 ; **** p< 0,0001.	99
Figura 2. Detecção imunocitoquímica de P2Y1 e P2Y11 após tratamento de 24 horas. T3=10 nM triiodotironina, PD=5 μ M PD98059, LY=5 μ M LY294008, C=sem tratamento. Os núcleos são corados em azul com DAPI. As micrografias foram adquiridas de campos aleatórios de dois poços diferentes por grupo de tratamento, e foram obtidas com um microscópio confocal de varredura a laser usando as mesmas configurações de aquisição. A cor verde representa a marcação dos receptores P2X7, P2Y1 ou P2Y11 e a cor azul representa os núcleos (DAPI). Escala de barras: 40 μ m. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão (ANOVA one-way complementado pelo teste de Tukey). Para obter mais detalhes sobre a marcação de imunofluorescência, consulte a seção Materiais e Métodos. **p<0,01 ; ****p<0,0001.	101
Figura 3. Quantificação de adenosina após tratamentos de 24 horas. T3=10 nM triiodotironina e C= sem tratamento. Dados são expressos como como média $\pm$ desvio padrão (Teste-t Student).	102
8. Discussão e Considerações finais	103
Figura 5. Esquema geral do mecanismo de ação do T3 na modulação da via ATP/P2X7 por meio das vias MAPK/ERK e PI3K em adipócitos subcutâneos humanos. O T3 ativa as vias extranucleares, estimulando a maior expressão do receptor P2X7. O hormônio reduz a expressão de NTPDase 1, NTPDase 3 e NT5E, favorecendo o acúmulo de ATP no espaço extracelular. (Imagem criada em BioRender.com)	108
10. Material suplementar	126
Figura 1. Cromatograma dos diferentes tratamentos. (A) Análise cromatográfica do grupo Controle (B) Análise cromatográfica do grupo T3.	127
Figura 2. Cromatograma dos pontos da reta padrão	130
Figura 3. Quantificação proteica das amostras de três experimentos independentes, para dosagem de MDA e Carbonilação proteica	132

Abreviaturas

TAB - tecido adiposo branco

TAG - triacilglicerol

FFA - ácidos graxos livres

ROS - espécies reativas de oxigênio

ATP - adenosina 5´trifosfato

PI3K - fosfatidil inositol 3 quinase

MAPK - proteína quinase ativada por mitógeno

ADO - adenosina

TA - tecido adiposo

TAM - tecido adiposo marrom

UCP1 - desacoplamento da proteína 1

PPAR - receptor ativado por proliferador de peroxissoma

C/EBP- proteína de ligação ao potenciador CCAAT

ATGL - lipase de triacilglicerol do adipócito

HSL - lipase sensível ao hormônio

MGL - lipase de monoglicerídeos

DAG - diacilglicerol

MAG - monoacilglicerol

Bif-1 - fator 1 de interação Bax

LepRb - receptor de leptina

JAK2 - janus quinase 2

AdipoR - receptor de adiponectina

ADP - adenosina difosfato

AMP - adenosina monofosfato

E-NTPDase - ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases

NPP - ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase

ALP - fosfatases alcalinas

CD73 - ecto-5'-nucleotidase

ADA - adenosina desaminase

ADK - adenosina quinase

UTP - trifosfato de uridina

UDP - difosfato de uridina

GPCR - receptor acoplado à proteína G

PKC - proteína quinase C

HT - hormônios tireoidianos

T4 - tiroxina

T3 - triiodotironina

rT3 - triiodotironina reversa

TRH - hormônio liberador de tireotrofina

TSH - hormônio estimulador da tireoide

TBG - globulina de ligação à tiroxina

TTR - transtirretina

MCT - transportador monocarboxilato

OATP - polipeptídeo transportador de ânion orgânico

DIO - desidase

T2 - 3,5-diiodotironina

T1AM - 3-iodotirononamina

TA4 - ácido 3,5,3',5'-tiroacético

TA3 - ácido 3,5,3'-tiroacético

TA1 - ácido 3-tiróacético

TR - receptor de hormônios tireoidianos

TRE - receptores com elementos responsivos aos hormônios tireoidianos

RXR - receptores de retinóide X

ERK - quinase regulada extracelularmente

JNK - quinase N-terminal c-Jun

RTK - receptor de tirosina quinase

GRB2 - fator de crescimento-receptor bound-2

SOS - Shc/son de sevenless

MEK - proteínas mitógenas extracelulares

PD98059 - 2-(2-Amino-3-metoxifenil)-4H-1-benzopiran-4-ona

LY294002 - 2-(4-morfolinil)-8-fenil-4H-1-benzopiran-4-ona

PIP2 - fosfatidilinositol-4,5-bifosfato

PIP3 - fosfatidilinositol-3, 4,5-bifosfato

PDK1 - proteína quinase 1 dependente de fosfoinosítide-3

PTEN - fosfatase e homólogo de tensina

PP2A - proteína fosfatase 2A

MDA - malonaldeído

cAMP - AMP cíclico

PDE - fosfodiesterase

PKA - proteína quinase A

FOXO1 - forkhead Box O1

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

α 1-ARs - α 1 adrenoreceptores

Ca²⁺ - cálcio

Na⁺ - sódio

K⁺ - potássio

IL-6 - interleucina 6

TBARS - substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico

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

LDH - lactato desidrogenase

DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole

Resumo

A obesidade está associada ao desenvolvimento de inflamação crônica no tecido adiposo branco (TAB) e a uma maior produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), resultando em elevados níveis de estresse oxidativo. O TAB armazena energia na forma de triacilglicerol (TAG), que ao sofrer lipólise, é hidrolisado em ácidos graxos livres (FFA) e glicerol. O hormônio tireoidiano T3 regula a taxa metabólica basal, estimula a lipólise, aumenta a produção de adenosina 5'-trifosfato (ATP) e a produção de calor, regulando a termogênese. Sabe-se que o T3 modula a transcrição gênica e tradução proteica por meio das vias citoplasmáticas da fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) e/ou proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) no TAB. A molécula de ATP pode ou não ser hidrolisada por ação de ecto-enzimas. O ATP e seus derivados atuam no meio extracelular sinalizando por meio dos receptores purinérgicos, expressos no TAB, regulando o metabolismo lipídico. O receptor P2X7 é sensível ao ATP e, quando ativado, é capaz de modular o metabolismo lipídico, adipogênese, lipólise e inflamação. Existe uma importante relação entre o hormônio tireoidiano e a sinalização purinérgica em diferentes sistemas fisiológicos e patológicos, mas essa relação ainda é pouco elucidada na literatura, especialmente no TAB. Nosso trabalho tem como objetivo demonstrar a relação existente entre a ação do T3 na modulação da sinalização purinérgica em adipócitos subcutâneos humanos, bem como determinar se essa ação é mediada por mecanismos não nucleares, por meio das vias MAPK/ERK e PI3K. Para isso, pré-adipócitos humanos (HAd-802s-05A), após a diferenciação, foram submetidos ao tratamento com T3 (10nM) por 24 horas, na presença ou ausência de inibidores das vias MAPK/ERK (PD98059, 5 μ M) e PI3K (LY294002, 5 μ M). Os seguintes

parâmetros foram analisados: viabilidade celular (MTT, LDH e contagem nuclear), acúmulo lipídico (coloração Oil Red), lipólise basal (ensaio de ácidos graxos livres e glicerol), estresse oxidativo (dosagens de malonaldeído e carbonilação proteica), expressão proteica dos receptores purinérgicos P2 e ectonucleotidases (imunofluorescência), quantificação do ATP extracelular (ensaio de bioluminescência luciferina-luciferase HS II) e liberação/acúmulo extracelular de adenosina (ADO) (cromatografia líquida de ultra performance - UHPLC). Demonstramos que o T3 desempenha um papel importante na redução da expressão de NTPDase1, NTPDase3 e ecto-5'-nucleotidase, resultando no aumento da concentração extracelular de ATP. Evidenciamos também que o hormônio aumentou a expressão do receptor P2X7, acompanhado de uma maior liberação/acúmulo de ATP extracelular, e esses efeitos foram abolidos pelo bloqueio das vias MAPK/ERK e PI3K. Com isso, evidenciamos que o T3 modula a sinalização ATP/P2X7 por meio das vias MAPK e PI3K em adipócitos subcutâneos humanos.

Abstract

Obesity is associated with the development of chronic inflammation in white adipose tissue (WAT) and increased production of reactive oxygen species (ROS), resulting in high levels of oxidative stress. TAB stores energy in the form of triacylglycerol (TAG), which, upon undergoing lipolysis, is hydrolyzed into free fatty acids (FFA) and glycerol. The thyroid hormone T3 regulates the basal metabolic rate, stimulates lipolysis, increases the production of adenosine 5'-triphosphate (ATP) and heat production, regulating thermogenesis. It is known that T3 modulates gene transcription and protein translation through the cytoplasmic phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) and/or mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways in WAT. The ATP molecule may or may not be hydrolyzed by the action of ecto-enzymes. ATP and its derivatives act in the extracellular environment, signaling through purinergic receptors, expressed in the WAT, regulating lipid metabolism. The P2X7 receptor is sensitive to ATP and, when activated, is capable of modulating lipid metabolism, adipogenesis, lipolysis and inflammation. There is an important relationship between thyroid hormone and purinergic signaling in different physiological and pathological systems, but this relationship is still poorly understood in the literature, especially in WAT. Our work aims to demonstrate the relationship between the action of T3 in modulating purinergic signaling in human subcutaneous adipocytes, as well as determining whether this action is mediated by non-nuclear mechanisms, through the MAPK/ERK and PI3K pathways. For this, human pre-adipocytes (HPAd-802s-05A), after differentiation, were subjected to treatment with T3 (10nM) for 24 hours, in the presence or absence of MAPK/ERK pathway inhibitors (PD98059, 5 μ M) and PI3K (LY294002, 5 μ M). The following parameters were analyzed: cell viability (MTT, LDH

e number of nuclei), lipid accumulation (Oil Red staining), basal lipolysis (free fatty acid and glycerol assay), oxidative stress (measurements of malonaldehyde and protein carbonylation), protein expression of purinergic receptors P2 and ectonucleotidases (immunofluorescence), quantification of extracellular ATP (luciferin-luciferase HS II bioluminescence assay) and extracellular release/accumulation of adenosine (ADO) (ultraperformance liquid chromatography - UHPLC). We demonstrate that T3 plays an important role in reducing the expression of NTPDase1, NTPDase3 and ecto-5'-nucleotidase, resulting in increased extracellular ATP concentration. We also showed that the hormone increased the expression of the P2X7 receptor, accompanied by a greater release/accumulation of extracellular ATP, and these effects were abolished by blocking the MAPK/ERK and PI3K pathways. With this, we demonstrated that T3 modulates ATP/P2X7 signaling through the MAPK and PI3K pathways in human subcutaneous adipocytes.

1. Introdução estendida

O tecido adiposo (TA) é regulado pela triiodotironina (T3), que modula a diferenciação, proliferação, termogênese, lipólise e produção de ATP intracelular do TA. Recentemente, o sistema purinérgico também tem se destacado como importante regulador das funções do TA, por meio dos receptores purinérgicos, que têm ganhado interesse como potenciais alvos terapêuticos em diferentes condições patológicas. Porém, é necessário maior avaliação da expressão funcional dos receptores purinérgicos, e das funções fisiológicas e patológicas do ATP extracelular e seus metabólitos nos adipócitos. Com isso, muitos trabalhos sustentam a relevante participação do T3 e sistema purinérgico no TA. Porém, há falta de dados na literatura que demonstrem a ação do T3, com envolvimento do sistema purinérgico, no funcionamento do tecido adiposo. Assim, nossos resultados contribuem para promover o entendimento de eventos fisiológicos não descritos em adipócitos subcutâneos humanos.

8. Discussão e Considerações finais

Diversos estudos demonstram a ação dos hormônios tireoideanos no TA (Giammanco et al., 2020; Walczak & Sieminska, 2021). Porém, é recente o crescente interesse na investigação da cascata de sinalização purinérgica na função dos adipócitos humanos, obesidade e outros distúrbios metabólicos (M. de Oliveira, Mathias, de Sibio, et al., 2020). A presença de receptores purinérgicos funcionais em adipócitos humanos foram identificados (Rossato et al., 2022; Mathias et al., 2023). E, sabe-se que existe importante relação entre hormônios tireoideanos e a sinalização purinérgica em diferentes sistemas fisiológicos e patológicos (Silveira et al., 2013). Sendo que, o T3 pode modular a expressão dos componentes do sistema purinérgico (Mathias et al., 2023).

Avaliamos a ação da T3, bem como a participação das vias citoplasmáticas PI3K e MAPK/ERK, na expressão diferencial dos componentes do sistema purinérgico, bem como na lipólise basal e estresse oxidativo. Demostramos que os adipócitos expressam receptores purinérgicos P2Y1, P2Y11, P2X7, além da NTPDase1, NTPDase3 e ecto-5'-nucleotidase. O tratamento com T3 não alterou a expressão dos receptores P2Y1 e P2Y11, e aumentou a expressão do receptor P2X7, acompanhado pela maior liberação/acúmulo de ATP extracelular, que foram abolidos pelo bloqueio das vias MAPK/ERK e PI3K, demonstrando importante participação das vias citoplasmáticas na ação do hormônio tireoidiano sobre a sinalização ATP/P2X7. O tratamento com T3 e com os inibidores das vias MAPK/ERK e PI3K, diminuíram o acúmulo lipídico, sem afetar a lipólise basal e as dosagens de malonaldeído e carbonilação proteica, demonstrando que os

tratamentos não geraram estresse oxidativo nas células.

Os tratamentos não alteraram a lipólise basal, avaliada pela quantificação de ácidos graxos livres e glicerol. Embora, o tratamento com T3 (10 nM), mas também com os inibidores das vias de sinalização MAPK/ERK (PD98059) e PI3K (LY294002), reduziram significativamente o acúmulo lipídico. (M. de Oliveira, Mathias, Rodrigues, et al., 2020), observaram que o tratamento hormonal reduz os lipídios no interior dos adipócitos, mantém os triglicerídeos inalterados e diminui os níveis de glicerol. Além disso, estudos anteriores do grupo demonstram que o T3 direciona os adipócitos ao amarronamento, pelo aumento da expressão de UCP-1 (M. de Oliveira, Mathias, Rodrigues, et al., 2020; Mathias et al., 2023) e favoreceu a transcrição gênica de marcadores seletivos de adipócitos beges. Além disso, o tratamento com o hormônio aumentou a expressão gênica do receptor P2X5 (Mathias et al., 2023), que tem sido considerado como um possível novo marcador de *browning* (Tozzi & Novak, 2017). Isto justificaria a redução de acúmulo lipídico, sem alteração da lipólise basal.

O tratamento com T3 aumentou a expressão proteica do receptor P2X7, corroborando com relatos anteriores do nosso grupo, que demonstraram que o tratamento com T3 elevou a expressão de mRNA do P2X7, utilizando os mesmos subconjuntos celulares submetidos a condições experimentais equivalentes (Mathias et al., 2023). O aumento da expressão dos receptor P2X7 causada pelo T3 foi prevenida pelo bloqueio das vias MAPK/ERK e PI3K pelo PD 98,059 e LY-294,002, respectivamente. Desta forma, acreditamos que as vias citoplasmáticas apresentam importante papel na modulação da expressão do P2X7 pela T3 nos adipócitos subcutâneos humanos.

Existem pesquisas que demonstram que o hormônio afeta o ATP extracelular em outras células e tecidos. Evidenciando que o status do hormônio tireoidiano pode influenciar as enzimas envolvidas no metabolismo do ATP (recentemente revisto por (Le et al., 2023)). Nossos resultados indicam que o tratamento com T3 aumenta a liberação/acúmulo de ATP extracelular, porém não altera os níveis de ADO. Recentemente, nosso grupo demonstrou por RNA-Seq que os adipócitos subcutâneos humanos não expressam NTPDase2 e apresentam baixa expressão de NTPDase1, NTPDase3 e 5'-nucleotidase (NT5E), uma cascata enzimática crítica para o catabolismo extracelular de ATP em ADO (Mathias et al., 2023). Além disso, apresentamos, na respectiva tese, que o tratamento com T3 reduz a expressão proteica destas enzimas, NTPDase1, NTPDase3 e 5'-nucleotidase (NT5E). Estes resultados justificam o acúmulo de ATP no meio extracelular nestas culturas. Embora, o tratamento com T3 tenha aumentado a transcrição de genes que codificam para os recetores ADORA2A e ADORA2B, sensíveis a ADO, e também das enzimas responsáveis pelo metabolismo da ADO (ADA e ADK), nas mesmas células (Mathias et al., 2023).

Com isso, neste trabalho evidenciamos que o T3 diminui significativamente a expressão proteica das enzimas, NTPDase1, NTPDase3 e ecto-5'-nucleotidase, resultando no acúmulo extracelular de ATP, que pode sustentar a ativação de receptores sensíveis ao ATP, como o P2X7 que foi superexpresso após tratamento com o hormônio. Sabe-se que existe importante participação dos componentes do sistema purinérgico no estado redox, sendo que o ATP está associado ao aumento dos níveis de citocinas, inflamação e estresse oxidativo. A sinalização ATP/P2X7 está relacionada com o estresse oxidativo (Arslan et al., 2019). Sabe-se que o ATP

pode ativar o receptor P2X7, regulando a expressão de genes inflamatórios, induzindo a geração de ROS em uma variedade de tipos de células (Munoz et al., 2017). Esta ação pode envolver as vias MAPK (Kim et al., 2015) e PI3K (Zhao et al., 2021).

Nossos resultados demonstraram que o T3 ativa as vias MAPK e PI3K, para aumentar a liberação de ATP e a expressão do receptor P2X7, sem afetar o estresse oxidativo. Da mesma forma, (Yau et al., 2019) demonstraram que o tratamento com T3 (10 nM) no tecido adiposo marrom não induziu a formação de espécies reativas de oxigênio intracelular, apesar de ter aumentado a respiração mitocondrial. Além disso, essa dose também não alterou os níveis de TBARS no tecido adiposo subcutâneo humano (M. de Oliveira, Mathias, Rodrigues, et al., 2020). Apesar do hormônio aumentar a liberação de ATP extracelular, a quantidade foi baixa (~3nM), o que indica que as células não foram submetidas a estresse oxidativo. Visto que, sob condições fisiológicas, o ATP extracelular está presente em baixos níveis (faixa nanomolar), e células submetidas a estresse liberam altas concentrações de ATP (micromolares) no meio extracelular, que é capaz de ativar o receptor P2X7 favorecendo uma maior liberação do nucleotídeo (Savio et al., 2018). (Rossato et al., 2022) demonstram que o ATP estimulou a expressão de IL-6, a partir da concentração de 10 μ M. Com isso, apesar do T3 aumentar a liberação de ATP e a expressão do receptor P2X7, que se correlacionam com o estresse oxidativo, nossos resultados indicam que essa dose do hormônio e a concentração de ATP extracelular não afetam esse parâmetro.

Com isso, nossos resultados indicam que os adipócitos subcutâneos humanos expressam proteínas dos componentes do sistema purinérgico. O T3

modula a sinalização purinérgica com participação das vias extranucleares, MAPK/ERK e PI3K, em adipócitos subcutâneos humanos. O hormônio aumenta a expressão do receptor P2X7, acompanhado pela maior liberação/acúmulo de ATP extracelular, que foram abolidos pelo bloqueio das vias MAPK/ERK e PI3K. Com isso, o T3 modula a sinalização ATP/P2X7 por meio das vias MAPK e PI3K em adipócitos subcutâneos humanos não inflamados.

Nosso trabalho demonstrou um evento fisiológico não descrito, da ação do T3 na via ATP/P2X7, com envolvimento das vias extranucleares MAPK e PI3K, em adipócitos subcutâneos humanos não inflamados. Os resultados podem contribuir para novas perspectivas fisiopatológicas da modulação do T3 na atividade dos adipócitos, visando o sistema purinérgico, sobretudo o receptor P2X7. Com o objetivo de combater a atividade inflamatória e estresse oxidativo nos adipócitos, que ocorrem em diversas fisiopatologias do tecido adiposo. A Figura 5 representa esquematicamente o principal resultado encontrado em nosso trabalho.

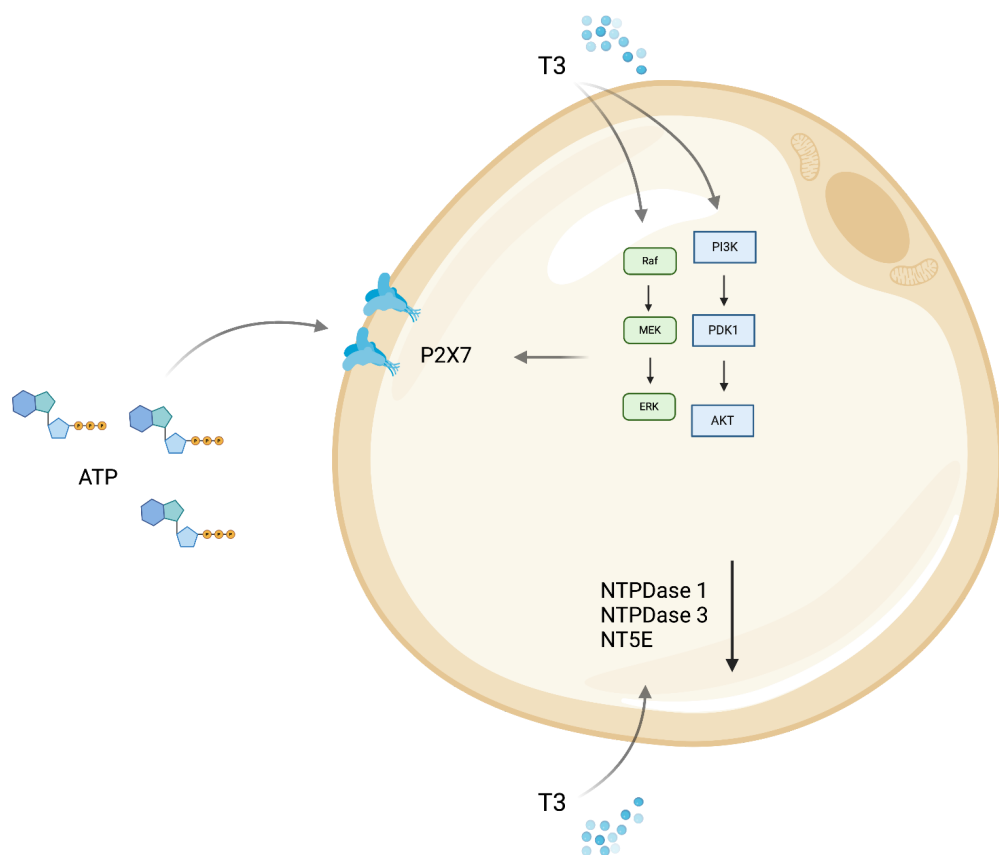


Figura 5. Esquema geral do mecanismo de ação do T3 na modulação da via ATP/P2X7 por meio das vias MAPK/ERK e PI3K em adipócitos subcutâneos humanos. O T3 ativa as vias extranucleares, estimulando a maior expressão do receptor P2X7. O hormônio reduz a expressão de NTPDase 1, NTPDase 3 e NT5E, favorecendo o acúmulo de ATP no espaço extracelular. (Imagem criada em BioRender.com)

9. Referências

- Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Verkhratsky, A., & Zimmermann, H. (2009). Purinergic signalling in the nervous system: An overview. *Trends in Neurosciences*, 32(1), 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.10.001>
- Adamson, S. E., Meher, A. K., Chiu, Y., Sandilos, J. K., Oberholtzer, N. P., Walker, N. N., Hargett, S. R., Seaman, S. A., Peirce-Cottler, S. M., Isakson, B. E., McNamara, C. A., Keller, S. R., Harris, T. E., Bayliss, D. A., & Leitingner, N. (2015). Pannexin 1 is required for full activation of insulin-stimulated glucose uptake in adipocytes. *Molecular Metabolism*, 4(9), 610–618. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2015.06.009>
- Ahmad, B., Serpell, C. J., Fong, I. L., & Wong, E. H. (2020). Molecular Mechanisms of Adipogenesis: The Anti-adipogenic Role of AMP-Activated Protein Kinase. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7, 76. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00076>
- Aksamitiene, E., Kiyatkin, A., & Kholodenko, B. N. (2012). Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: A fine balance. *Biochemical Society Transactions*, 40(1), 139–146. <https://doi.org/10.1042/BST20110609>
- Arslan, G., Avci, B., Kocacan, S. E., Rzayev, E., Ayyildiz, M., & Agar, E. (2019). The interaction between P2X7Rs and T-type calcium ion channels in penicillin-induced epileptiform activity. *Neuropharmacology*, 149, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.01.027>
- Bhattacharya, S., McElhanon, K. E., Gushchina, L. V., & Weisleder, N. (2016). Role of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase signaling in vesicular

- trafficking. *Life Sciences*, 167, 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.10.018>
- Bianco, A. C., Dumitrescu, A., Gereben, B., Ribeiro, M. O., Fonseca, T. L., Fernandes, G. W., & Bocco, B. M. L. C. (2019). Paradigms of Dynamic Control of Thyroid Hormone Signaling. *Endocrine Reviews*, 40(4), 1000–1047. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00275>
- Bilbao, P. S., Katz, S., & Boland, R. (2012). Interaction of purinergic receptors with GPCRs, ion channels, tyrosine kinase and steroid hormone receptors orchestrates cell function. *Purinergic Signalling*, 8(1), 91–103. <https://doi.org/10.1007/s11302-011-9260-9>
- Boison, D., & Jarvis, M. F. (2021). Adenosine kinase: A key regulator of purinergic physiology. *Biochemical Pharmacology*, 187, 114321. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114321>
- Burghoff, S., Flögel, U., Bongardt, S., Burkart, V., Sell, H., Tucci, S., Ikels, K., Eberhard, D., Kern, M., Klötting, N., Eckel, J., & Schrader, J. (2013). Deletion of CD73 promotes dyslipidemia and intramyocellular lipid accumulation in muscle of mice. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 119(2), 39–51. <https://doi.org/10.3109/13813455.2012.755547>
- Burnstock, G. (1978). Do some sympathetic neurones synthesize and release both noradrenaline and acetylcholine? *Progress in Neurobiology*, 11(3–4), 205–222. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(78\)90013-8](https://doi.org/10.1016/0301-0082(78)90013-8)
- Burnstock, G., & Gentile, D. (2018). The involvement of purinergic signalling in obesity. *Purinergic Signalling*, 14(2), 97–108. <https://doi.org/10.1007/s11302-018-9605-8>
- Cardoso, A. M., Schetinger, M. R. C., Correia-de-Sá, P., & Sévigny, J. (2015). Impact

- of ectonucleotidases in autonomic nervous functions. *Autonomic Neuroscience*, 191, 25–38. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2015.04.014>
- Carmen, G.-Y., & Víctor, S.-M. (2006). Signalling mechanisms regulating lipolysis. *Cellular Signalling*, 18(4), 401–408. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2005.08.009>
- Cheng, S.-Y., Leonard, J. L., & Davis, P. J. (2010). Molecular Aspects of Thyroid Hormone Actions. *Endocrine Reviews*, 31(2), 139–170. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0007>
- Cioffi, F., Giacco, A., Goglia, F., & Silvestri, E. (2022). Bioenergetic Aspects of Mitochondrial Actions of Thyroid Hormones. *Cells*, 11(6), 997. <https://doi.org/10.3390/cells11060997>
- Coccurello, R., & Volonté, C. (2020). P2X7 Receptor in the Management of Energy Homeostasis: Implications for Obesity, Dyslipidemia, and Insulin Resistance. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 199. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00199>
- Cohen, P., & Kajimura, S. (2021). The cellular and functional complexity of thermogenic fat. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22(6), 393–409. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00350-0>
- Corvera, S., Solivan-Rivera, J., & Yang Loureiro, Z. (2022). Angiogenesis in adipose tissue and obesity. *Angiogenesis*, 25(4), 439–453. <https://doi.org/10.1007/s10456-022-09848-3>
- de Oliveira, M., Mathias, L. S., de Sibio, M. T., Noronha-Matos, J. B., Costa, M. A., Nogueira, C. R., & Correia-de-Sá, P. (2020). Pitfalls and challenges of the purinergic signaling cascade in obesity. *Biochemical Pharmacology*, 182, 114214. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114214>

- de Oliveira, M., Mathias, L. S., Rodrigues, B. M., Mariani, B. G., Graceli, J. B., De Sibio, M. T., Castro Olimpio, R. M., Fontes Moretto, F. C., Deprá, I. C., & Nogueira, C. R. (2020). The roles of triiodothyronine and irisin in improving the lipid profile and directing the browning of human adipose subcutaneous cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 506, 110744. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110744>
- de Oliveira, P. G., Ramos, M. L. S., Amaro, A. J., Dias, R. A., & Vieira, S. I. (2019). Gi/o-Protein Coupled Receptors in the Aging Brain. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 11, 89. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00089>
- Di Virgilio, F., & Adinolfi, E. (2017). Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. *Oncogene*, 36(3), 293–303. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.206>
- Dudley, D. T., Pang, L., Decker, S. J., Bridges, A. J., & Saltiel, A. R. (1995). A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(17), 7686–7689. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.17.7686>
- Feldt-Rasmussen, U., Effraimidis, G., & Klose, M. (2021). The hypothalamus-pituitary-thyroid (HPT)-axis and its role in physiology and pathophysiology of other hypothalamus-pituitary functions. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 525, 111173. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2021.111173>
- Ferrari, D., Malavasi, F., & Antonioli, L. (2017). A Purinergic Trail for Metastases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38(3), 277–290. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.11.010>

- Ford, H., Liu, Q., Fu, X., & Strieder-Barboza, C. (2023). White Adipose Tissue Heterogeneity in the Single-Cell Era: From Mice and Humans to Cattle. *Biology*, 12(10), 1289. <https://doi.org/10.3390/biology12101289>
- Fruman, D. A., Meyers, R. E., & Cantley, L. C. (1998). PHOSPHOINOSITIDE KINASES. *Annual Review of Biochemistry*, 67(1), 481–507. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.481>
- Gambo, Y., Matsumura, M., & Fujimori, K. (2016). Triiodothyronine enhances accumulation of intracellular lipids in adipocytes through thyroid hormone receptor α via direct and indirect mechanisms. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 431, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.04.023>
- Ghaben, A. L., & Scherer, P. E. (2019). Adipogenesis and metabolic health. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(4), 242–258. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0093-z>
- Giammanco, M., Di Liegro, C. M., Schiera, G., & Di Liegro, I. (2020). Genomic and Non-Genomic Mechanisms of Action of Thyroid Hormones and Their Catabolite 3,5-Diiodo-L-Thyronine in Mammals. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), 4140. <https://doi.org/10.3390/ijms21114140>
- Giuliani, A. L., Sarti, A. C., & Di Virgilio, F. (2019). Extracellular nucleotides and nucleosides as signalling molecules. *Immunology Letters*, 205, 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.11.006>
- Gnad, T., Scheibler, S., von Kügelgen, I., Scheele, C., Kilić, A., Glöde, A., Hoffmann, L. S., Reverte-Salisa, L., Horn, P., Mutlu, S., El-Tayeb, A., Kranz, M., Deuther-Conrad, W., Brust, P., Lidell, M. E., Betz, M. J., Enerbäck, S., Schrader, J., Yegutkin, G. G., ... Pfeifer, A. (2014a). Adenosine activates

- brown adipose tissue and recruits beige adipocytes via A2A receptors. *Nature*, 516(7531), 395–399. <https://doi.org/10.1038/nature13816>
- Gnad, T., Scheibler, S., von Kügelgen, I., Scheele, C., Kilić, A., Glöde, A., Hoffmann, L. S., Reverte-Salisa, L., Horn, P., Mutlu, S., El-Tayeb, A., Kranz, M., Deuther-Conrad, W., Brust, P., Lidell, M. E., Betz, M. J., Enerbäck, S., Schrader, J., Yegutkin, G. G., ... Pfeifer, A. (2014b). Adenosine activates brown adipose tissue and recruits beige adipocytes via A2A receptors. *Nature*, 516(7531), 395–399. <https://doi.org/10.1038/nature13816>
- Gómez-Villafuertes, R., García-Huerta, P., Díaz-Hernández, J. I., & Miras-Portugal, M. T. (2015). PI3K/Akt signaling pathway triggers P2X7 receptor expression as a pro-survival factor of neuroblastoma cells under limiting growth conditions. *Scientific Reports*, 5(1), 18417. <https://doi.org/10.1038/srep18417>
- Grant, R. W., & Stephens, J. M. (2015). Fat in flames: Influence of cytokines and pattern recognition receptors on adipocyte lipolysis. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 309(3), E205–E213. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00053.2015>
- Greenberg, A. S., Shen, W.-J., Muliro, K., Patel, S., Souza, S. C., Roth, R. A., & Kraemer, F. B. (2001). Stimulation of Lipolysis and Hormone-sensitive Lipase via the Extracellular Signal-regulated Kinase Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 276(48), 45456–45461. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104436200>
- Groeneweg, S., van Geest, F. S., Peeters, R. P., Heuer, H., & Visser, W. E. (2020). Thyroid Hormone Transporters. *Endocrine Reviews*, 41(2), 146–201. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnz008>
- Guo, Y., Pan, W., Liu, S., Shen, Z., Xu, Y., & Hu, L. (2020). ERK/MAPK signalling

- pathway and tumorigenesis (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8454>
- Hemmings, B. A., & Restuccia, D. F. (2015). The PI3K-PKB/Akt Pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(4), a026609. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026609>
- Herman-de-Sousa, C., Pinheiro, A. R., Paramos-de-Carvalho, D., Costa, M. A., Ferreirinha, F., Magalhães-Cardoso, T., Ribeiro, S., Pelletier, J., Sévigny, J., & Correia-de-Sá, P. (2020). Opposing Effects of Adenosine and Inosine in Human Subcutaneous Fibroblasts May Be Regulated by Third Party ADA Cell Providers. *Cells*, 9(3), 651. <https://doi.org/10.3390/cells9030651>
- Herz, C. T., & Kiefer, F. W. (2019). Adipose tissue browning in mice and humans. *Journal of Endocrinology*, 241(3), R97–R109. <https://doi.org/10.1530/JOE-18-0598>
- Hilger, D., Masureel, M., & Kobilka, B. K. (2018). Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nature Structural & Molecular Biology*, 25(1), 4–12. <https://doi.org/10.1038/s41594-017-0011-7>
- Huang, X., Liu, G., Guo, J., & Su, Z. (2018). The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. *International Journal of Biological Sciences*, 14(11), 1483–1496. <https://doi.org/10.7150/ijbs.27173>
- Huang, Z., Xie, N., Illes, P., Di Virgilio, F., Ulrich, H., Semyanov, A., Verkhatsky, A., Sperlagh, B., Yu, S.-G., Huang, C., & Tang, Y. (2021). From purines to purinergic signalling: Molecular functions and human diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 162. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00553-z>

- Idzko, M., Ferrari, D., & Eltzschig, H. K. (2014). Nucleotide signalling during inflammation. *Nature*, 509(7500), 310–317.
<https://doi.org/10.1038/nature13085>
- Ikeda, K., & Yamada, T. (2020). UCP1 Dependent and Independent Thermogenesis in Brown and Beige Adipocytes. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 498.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00498>
- Illes, P., Müller, C. E., Jacobson, K. A., Grutter, T., Nicke, A., Fountain, S. J., Kennedy, C., Schmalzing, G., Jarvis, M. F., Stojilkovic, S. S., King, B. F., & Di Virgilio, F. (2021). Update of P2X receptor properties and their pharmacology: IUPHAR Review 30. *British Journal of Pharmacology*, 178(3), 489–514.
<https://doi.org/10.1111/bph.15299>
- Incerpi, S., Gionfra, F., De Luca, R., Candelotti, E., De Vito, P., Percario, Z. A., Leone, S., Gnocchi, D., Rossi, M., Caruso, F., Scapin, S., Davis, P. J., Lin, H.-Y., Affabris, E., & Pedersen, J. Z. (2022). Extranuclear effects of thyroid hormones and analogs during development: An old mechanism with emerging roles. *Frontiers in Endocrinology*, 13, 961744.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2022.961744>
- Jain, S., & Jacobson, K. A. (2021). Purinergic signaling in diabetes and metabolism. *Biochemical Pharmacology*, 187, 114393.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114393>
- Jia, S., Chen, Z., Li, J., Chi, Y., Wang, J., Li, S., Luo, Y., Geng, B., Wang, C., Cui, Q., Guan, Y., & Yang, J. (2014). FAM3A promotes vascular smooth muscle cell proliferation and migration and exacerbates neointima formation in rat artery after balloon injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 74, 173–182.

<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.05.011>

Kasuya, G., Yamaura, T., Ma, X.-B., Nakamura, R., Takemoto, M., Nagumo, H., Tanaka, E., Dohmae, N., Nakane, T., Yu, Y., Ishitani, R., Matsuzaki, O., Hattori, M., & Nureki, O. (2017). Structural insights into the competitive inhibition of the ATP-gated P2X receptor channel. *Nature Communications*, 8(1), 876. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00887-9>

Kennedy, C. (2021). The P2Y/P2X divide: How it began. *Biochemical Pharmacology*, 187, 114408. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114408>

Kim, E.-A., Cho, C. H., Kim, J., Hahn, H.-G., Choi, S. Y., Yang, S.-J., & Cho, S.-W. (2015). The azetidine derivative, KHG26792 protects against ATP-induced activation of NFAT and MAPK pathways through P2X7 receptor in microglia. *NeuroToxicology*, 51, 198–206. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2015.10.013>

Kita, T., & Arakaki, N. (2015). Contribution of extracellular ATP on the cell-surface F₁F₀-ATP synthase-mediated intracellular triacylglycerol accumulation. *Biomedical Research*, 36(2), 115–120. <https://doi.org/10.2220/biomedres.36.115>

Lafontan, M., & Langin, D. (2009). Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Progress in Lipid Research*, 48(5), 275–297. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.05.001>

Lake, D., Corrêa, S. A. L., & Müller, J. (2016). Negative feedback regulation of the ERK1/2 MAPK pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(23), 4397–4413. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2297-8>

Lazcano, I., Hernández-Puga, G., Robles, J. P., & Orozco, A. (2019). Alternative ligands for thyroid hormone receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology*,

- 493, 110448. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.05.007>
- Le, Y., Lu, D., & Xue, M. (2023). Purinergic signaling in thyroid disease. *Purinergic Signalling*, 19(1), 221–227. <https://doi.org/10.1007/s11302-022-09858-2>
- Lee, M.-K., Lee, B., & Kim, C. Y. (2021). Natural Extracts That Stimulate Adipocyte Browning and Their Underlying Mechanisms. *Antioxidants*, 10(2), 308. <https://doi.org/10.3390/antiox10020308>
- Li, J., Gong, L., & Xu, Q. (2021). Purinergic 2X7 receptor is involved in adipogenesis and lipid degradation. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 23(1), 81. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.11004>
- Li, Y., Li, Z., Ngandiri, D. A., Llerins Perez, M., Wolf, A., & Wang, Y. (2022). The Molecular Brakes of Adipose Tissue Lipolysis. *Frontiers in Physiology*, 13, 826314. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.826314>
- Liu, Y., Takahashi, Y., Desai, N., Zhang, J., Serfass, J. M., Shi, Y.-G., Lynch, C. J., & Wang, H.-G. (2016). Bif-1 deficiency impairs lipid homeostasis and causes obesity accompanied by insulin resistance. *Scientific Reports*, 6(1), 20453. <https://doi.org/10.1038/srep20453>
- Luo, L., & Liu, M. (2016). Adipose tissue in control of metabolism. *Journal of Endocrinology*, 231(3), R77–R99. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0211>
- Machado, S. A., Pasquarelli-do-Nascimento, G., Da Silva, D. S., Farias, G. R., De Oliveira Santos, I., Baptista, L. B., & Magalhães, K. G. (2022). Browning of the white adipose tissue regulation: New insights into nutritional and metabolic relevance in health and diseases. *Nutrition & Metabolism*, 19(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s12986-022-00694-0>
- Masschelin, P. M., Cox, A. R., Chernis, N., & Hartig, S. M. (2020). The Impact of

- Oxidative Stress on Adipose Tissue Energy Balance. *Frontiers in Physiology*, 10, 1638. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01638>
- Mathias, L. S., Herman-de-Sousa, C., Cury, S. S., Nogueira, C. R., Correia-de-Sá, P., & de Oliveira, M. (2023). RNA-seq reveals that anti-obesity irisin and triiodothyronine (T3) hormones differentially affect the purinergic signaling transcriptomics in differentiated human adipocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1868(4), 159276. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2022.159276>
- Mathias, L. S., Rodrigues, B. M., Gonçalves, B. M., Moretto, F. C. F., Olimpio, R. M. C., Deprá, I., De Sibio, M. T., Tilli, H. P., Nogueira, C. R., & de Oliveira, M. (2020). Triiodothyronine activated extranuclear pathways upregulate adiponectin and leptin in murine adipocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 503, 110690. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110690>
- Mittal, B. (2019). Subcutaneous adipose tissue & visceral adipose tissue. *Indian Journal of Medical Research*, 149(5), 571. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_1910_18
- Moon, H., & Ro, S. W. (2021). MAPK/ERK Signaling Pathway in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers*, 13(12), 3026. <https://doi.org/10.3390/cancers13123026>
- Mullur, R., Liu, Y.-Y., & Brent, G. A. (2014). Thyroid Hormone Regulation of Metabolism. *Physiological Reviews*, 94(2), 355–382. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2013>
- Munoz, F. M., Gao, R., Tian, Y., Henstenburg, B. A., Barrett, J. E., & Hu, H. (2017). Neuronal P2X7 receptor-induced reactive oxygen species production contributes to nociceptive behavior in mice. *Scientific Reports*, 7(1), 3539.

<https://doi.org/10.1038/s41598-017-03813-7>

Noronha-Matos, J. B., & Correia-de-Sá, P. (2016). Mesenchymal Stem Cells Ageing: Targeting the “Purinome” to Promote Osteogenic Differentiation and Bone Repair: OSTEOGENIC DIFFERENTIATION OF AGED MSCs BY PURINES. *Journal of Cellular Physiology*, 231(9), 1852–1861. <https://doi.org/10.1002/jcp.25303>

North, R. A. (2016). P2X receptors. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1700), 20150427. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0427>

Onal, G., Kutlu, O., Gozuacik, D., & Dokmeci Emre, S. (2017). Lipid Droplets in Health and Disease. *Lipids in Health and Disease*, 16(1), 128. <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0521-7>

Pinheiro, A. R., Paramos-de-Carvalho, D., Certal, M., Costa, M. A., Costa, C., Magalhães-Cardoso, M. T., Ferreirinha, F., Sévigny, J., & Correia-de-Sá, P. (2013). Histamine Induces ATP Release from Human Subcutaneous Fibroblasts, via Pannexin-1 Hemichannels, Leading to Ca²⁺ Mobilization and Cell Proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, 288(38), 27571–27583. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.460865>

Ren, Y., Zhao, H., Yin, C., Lan, X., Wu, L., Du, X., Griffiths, H. R., & Gao, D. (2022). Adipokines, Hepatokines and Myokines: Focus on Their Role and Molecular Mechanisms in Adipose Tissue Inflammation. *Frontiers in Endocrinology*, 13, 873699. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.873699>

Reyes-Farias, M., Fos-Domenech, J., Serra, D., Herrero, L., & Sánchez-Infantes, D. (2021). White adipose tissue dysfunction in obesity and aging. *Biochemical*

Pharmacology, 192, 114723. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114723>

- Ronquillo, M., Mellnyk, A., Cárdenas-Rodríguez, N., Martínez, E., Comoto, D., Carmona-Aparicio, L., Herrera, N., Lara, E., Pereyra, A., & Floriano-Sánchez, E. (2019). Different gene expression profiles in subcutaneous & visceral adipose tissues from Mexican patients with obesity. *Indian Journal of Medical Research*, 149(5), 616. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_1165_17
- Rossato, M., Favaretto, F., Granzotto, M., Crescenzi, M., Boscaro, A., Di Vincenzo, A., Capone, F., Dalla Nora, E., Zabeo, E., & Vettor, R. (2022). Molecular and Pharmacological Evidence for the Expression of Multiple Functional P2 Purinergic Receptors in Human Adipocytes. *Molecules*, 27(6), 1913. <https://doi.org/10.3390/molecules27061913>
- Savio, L. E. B., de Andrade Mello, P., da Silva, C. G., & Coutinho-Silva, R. (2018). The P2X7 Receptor in Inflammatory Diseases: Angel or Demon? *Frontiers in Pharmacology*, 9, 52. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00052>
- Savio, L. E. B., Leite-Aguiar, R., Alves, V. S., Coutinho-Silva, R., & Wyse, A. T. S. (2021). Purinergic signaling in the modulation of redox biology. *Redox Biology*, 47, 102137. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102137>
- Sharma, S., Kalra, H., & Akundi, R. S. (2021). Extracellular ATP Mediates Cancer Cell Migration and Invasion Through Increased Expression of Cyclooxygenase 2. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 617211. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.617211>
- Sidossis, L. S., Porter, C., Saraf, M. K., Børsheim, E., Radhakrishnan, R. S., Chao, T., Ali, A., Chondronikola, M., Mlcak, R., Finnerty, C. C., Hawkins, H. K., Toliver-Kinsky, T., & Herndon, D. N. (2015). Browning of Subcutaneous White

- Adipose Tissue in Humans after Severe Adrenergic Stress. *Cell Metabolism*, 22(2), 219–227. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.06.022>
- Silveira, G. F., Buffon, A., & Bruno, A. N. (2013). New Approaches to Thyroid Hormones and Purinergic Signaling. *Journal of Thyroid Research*, 2013, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/434727>
- Su, Q., Tian, Y., Liu, Z., Ci, L., & Lv, X. (2019). Purinergic P2X7 receptor blockade mitigates alcohol-induced steatohepatitis and intestinal injury by regulating MEK1/2-ERK1/2 signaling and egr-1 activity. *International Immunopharmacology*, 66, 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.11.012>
- Tang, Z., Ye, W., Chen, H., Kuang, X., Guo, J., Xiang, M., Peng, C., Chen, X., & Liu, H. (2019). Role of purines in regulation of metabolic reprogramming. *Purinergic Signalling*, 15(4), 423–438. <https://doi.org/10.1007/s11302-019-09676-z>
- Tozzi, M., & Novak, I. (2017). Purinergic Receptors in Adipose Tissue As Potential Targets in Metabolic Disorders. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 878. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00878>
- Vlahos, C. J., Matter, W. F., Hui, K. Y., & Brown, R. F. (1994). A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *The Journal of Biological Chemistry*, 269(7), 5241–5248.
- von Kügelgen, I., & Hoffmann, K. (2016). Pharmacology and structure of P2Y receptors. *Neuropharmacology*, 104, 50–61. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.10.030>
- Walczak, K., & Sieminska, L. (2021). Obesity and Thyroid Axis. *International Journal*

- of Environmental Research and Public Health*, 18(18), 9434.
<https://doi.org/10.3390/ijerph18189434>
- Wang, D., & Zhou, J. (2023). Purinergic receptor: A crucial regulator of adipose tissue functions. *Purinergic Signalling*, 19(1), 273–281.
<https://doi.org/10.1007/s11302-022-09907-w>
- Wen, X., Zhang, B., Wu, B., Xiao, H., Li, Z., Li, R., Xu, X., & Li, T. (2022). Signaling pathways in obesity: Mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 298.
<https://doi.org/10.1038/s41392-022-01149-x>
- Wu, P., Nielsen, T. E., & Clausen, M. H. (2015). FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 36(7), 422–439.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.04.005>
- Xie, Y., Shi, X., Sheng, K., Han, G., Li, W., Zhao, Q., Jiang, B., Feng, J., Li, J., & Gu, Y. (2018). PI3K/Akt signaling transduction pathway, erythropoiesis and glycolysis in hypoxia (Review). *Molecular Medicine Reports*.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9713>
- Yau, W. W., Singh, B. K., Lesmana, R., Zhou, J., Sinha, R. A., Wong, K. A., Wu, Y., Bay, B.-H., Sugii, S., Sun, L., & Yen, P. M. (2019). Thyroid hormone (T₃) stimulates brown adipose tissue activation via mitochondrial biogenesis and MTOR-mediated mitophagy. *Autophagy*, 15(1), 131–150.
<https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1511263>
- Yau, W. W., & Yen, P. M. (2020). Thermogenesis in Adipose Tissue Activated by Thyroid Hormone. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8), 3020.
<https://doi.org/10.3390/ijms21083020>

- Yegutkin, G. G. (2014). Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: Functional implications and measurement of activities. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 49(6), 473–497. <https://doi.org/10.3109/10409238.2014.953627>
- Zhang, H. H., Halbleib, M., Ahmad, F., Manganiello, V. C., & Greenberg, A. S. (2002). Tumor Necrosis Factor- Stimulates Lipolysis in Differentiated Human Adipocytes Through Activation of Extracellular Signal-Related Kinase and Elevation of Intracellular cAMP. *Diabetes*, 51(10), 2929–2935. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.10.2929>
- Zhang, W., Hu, C., Zhu, Z., & Luo, H. (2020). Effect of P2X7 receptor on tumorigenesis and its pharmacological properties. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 125, 109844. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.109844>
- Zhao, X., Gong, L., Wang, C., Liu, M., Hu, N., Dai, X., Peng, C., & Li, Y. (2021). Quercetin mitigates ethanol-induced hepatic steatosis in zebrafish via P2X7R-mediated PI3K/ Keap1/Nrf2 signaling pathway. *Journal of Ethnopharmacology*, 268, 113569. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113569>
- Zuccarini, M., Giuliani, P., Buccella, S., Di Liberto, V., Mudò, G., Belluardo, N., Carluccio, M., Rossini, M., Condorelli, D. F., Rathbone, M. P., Caciagli, F., Ciccarelli, R., & Di Iorio, P. (2017). RETRACTED ARTICLE: Modulation of the TGF- β 1-induced epithelial to mesenchymal transition (EMT) mediated by P1 and P2 purine receptors in MDCK cells. *Purinergic Signalling*, 13(4), 429–442. <https://doi.org/10.1007/s11302-017-9571-6>
- Zucchi, R., Rutigliano, G., & Saponaro, F. (2019). Novel thyroid hormones. *Endocrine*, 66(1), 95–104. <https://doi.org/10.1007/s12020-019-02018-4>

Zuriaga, M. A., Fuster, J. J., Gokce, N., & Walsh, K. (2017). Humans and Mice Display Opposing Patterns of “Browning” Gene Expression in Visceral and Subcutaneous White Adipose Tissue Depots. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 4, 27. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2017.00027>