



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

LUCAS SOLLA MATHIAS

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

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

Orientadora: Dra. Miriane de Oliveira

Coorientadora: Dra. Célia Regina Nogueira

Botucatu

2019

LUCAS SOLLA MATHIAS

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

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

Orientadora: Dra. Miriane de Oliveira

Coorientadora: Dra. Célia Regina Nogueira

Botucatu

2019

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Mathias, Lucas Solla.

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

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

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

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

Agradecimentos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

À Comissão de Ética em Experimentação Animal.

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

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

Resumo

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

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

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

Abstract

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

normality. Results expressed in mean $\pm$ standard deviation and median (IQ 25% - IQ 75%), respectively. Significance given for $p < 0.05$. **Results:** T3 increased the expression of mRNA and leptin protein with respect to C, and with inhibition of $\alpha\beta 3$ integrin and subsequent treatment with the hormone, Tetrac + T3, there was a decrease in expression in both cases, indicating that T3 binding the integrin is important for gene modulation of leptin. However, the expression of adiponectin mRNA was not altered by T3 when compared to C, however the hormone increased the protein expression of this adipocin (1.7 ± 0.15 , $p < 0.01$) in relation to C (1 ± 0 , ($P < 0.01$), and Tetrac + T3 (0.59 ± 0.1 , $p < 0.01$) were abolished by the inhibitors associated with T3, PD + T3 (0.59 ± 0.11 , $p < p < 0.01$), indicating activation of the T3 pathways for post-transcriptional action of adiponectin. Although T3 did not alter the PPAR γ protein expression, lipid accumulation, TGL dosage, glycerol release and DNA damage in relation to C, the groups PD + T3 and Tetrac + T3 showed reduction of all parameters mentioned previously, when compared to T3. **Conclusion:** T3 acts on adipocytes via the MAPK / ERK pathway to modulate the protein expression of adiponectin and $\alpha\beta 3$ integrin to alter the gene expression of leptin. In addition, the integrity of the MAPK / ERK pathway is required for T3 to not alter the lipid profile, maintaining adipocyte homeostasis.

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

Lista de abreviaturas

AdipoR - Receptores de adiponectina

cAMP - 3',5'-monofosfato cíclico

C/EBP - Proteínas ligantes ao amplificador

DEXA - Dexametasona

ERK - quinase regulada extracelularmente

HT - Hormônios Tiroideanos

IBMX - 1-metil-3-isobutilxantina

INS - Insulina

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

MAPK - Via da proteína quinase ativada por mitógeno

POL II - Polimerase II

PPAR γ - Receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomas

pERK - quinase regulada extracelularmente fosforilada

PI3K - via fosfatidil inositol-3-quinase

pAKT - Proteína quinase B fosforilada

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

RXR - Receptores de retinóide X

T4 - Tiroxina

T3 - Triiodotironina

TR - Receptores Nucleares de hormônio tiroideanos

TRE - Elementos responsivos aos hormônios tiroideanos

TA - Tecido Adiposo

TAB - Tecido Adiposo Branco

TAM - Tecido Adiposo Marrom

TGL - Triacilglicerol

UPS - Sistema ubiquitina-proteassoma

4-HNE - 4-Hidroxinonenal

8-OH-dG - 8-hidroxideoxiguanosina

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

1. Introdução estendida

1.1. Tecido Adiposo

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

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

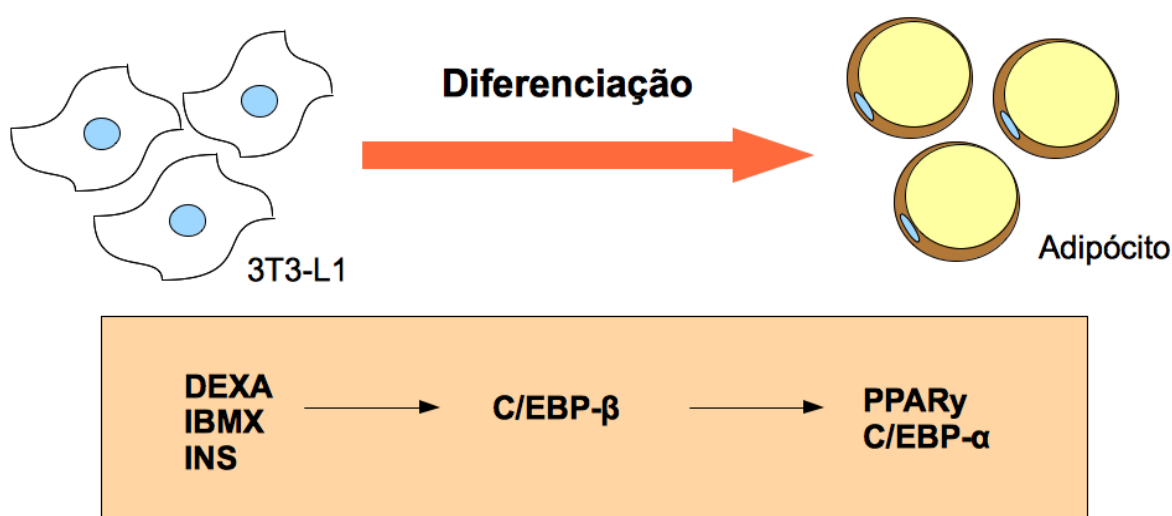


Figura 1. Modelo simplificado da adipogênese. Pré-adipócitos são induzidos para se diferenciar em adipócitos imaturos sob controle do PPAR γ principalmente, o qual também induz a expressão de C/EBP α . PPAR γ e C/EBP α atuam coordenadamente para regular a conversão de adipócitos imaturos em adipócitos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

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

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

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

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

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

1.2. Hormônios Tiroideanos

A glândula tireoide, sintetiza e secreta os hormônios tiroideanos (HT), tiroxina (T4) e triiodotironina (T3), por ação de um mecanismo de regulação do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide, conhecido como *feedback* negativo, em que o hormônio estimulador da tireoide (TSH), produzido pela adeno-hipófise, estimula a produção e secreção dos HTs, sendo regulado positivamente pelo hormônio libertador de tireotrofina (TRH) e negativamente pela somatostatina (SS), produzidos pelo hipotálamo (26).

Nos tecidos periféricos, o T4 é convertido em T3, por ação das desidases, processo denominado de desidatação, originando a maior parte do T3 circulante, que apresenta maior atividade biológica, dentre os dois hormônios (27,28,29). Desta forma, o T3 é fundamental para o funcionamento e desenvolvimento de praticamente todos os tecidos, e regulação de vias metabólicas (27,30,31).

Os HTs atuam em diferentes tecidos alvos, por meio de ações que podem ser iniciadas no núcleo, membrana plasmática, citoplasma ou mitocôndrias das células (32), controlando a expressão de genes específicos, modulando sua transcrição, alterando a síntese de proteínas relacionadas ao crescimento, desenvolvimento, controle metabólico e energético (33,34). As ações dos HT, ocorrem principalmente por meio da ligação do T3 com os receptores nucleares de HT, TRalfa (TR α) e TRbeta (TR β) (27), que apresentam sítio de ligação ao HT e outros sítios disponíveis para interação com outras proteínas (35). Os TRs são proteínas localizadas no núcleo das células alvo, pertencentes a superfamília de receptores hormonais nucleares (36), e se apresentam nas isoformas: TR α 1, TR α 2, TR β 1 e TR β 2 (37).

Embora o TR α e TR β sejam prioritariamente receptores nucleares, podem ser

encontrados no citoplasma e na membrana plasmática (38,39). Os TRs medeiam a ação do HT, quando associados a elementos responsivos aos HT (TRE), que são sequências específicas localizadas na região promotora de genes-alvo dos HT, que se ligam sob forma de homo ou heterodímeros com os membros da superfamília de receptores nucleares (40). Quando o T3 se liga ao TR/TRE, ocorre heterodimerização, principalmente com os receptores de retinóide X (RXR) (41), com isso, o hormônio modifica a conformação estrutural do receptor (42), assim os TR que geralmente estão ligados a proteínas co-repressoras da transcrição gênica, liberam essas proteínas e associam-se aos co-ativadores de transcrição, favorecendo a ativação da transcrição gênica (30,34). Desta forma, podemos denominar a ação HT/TR/TRE de ação nuclear ou clássica (Figura 2).

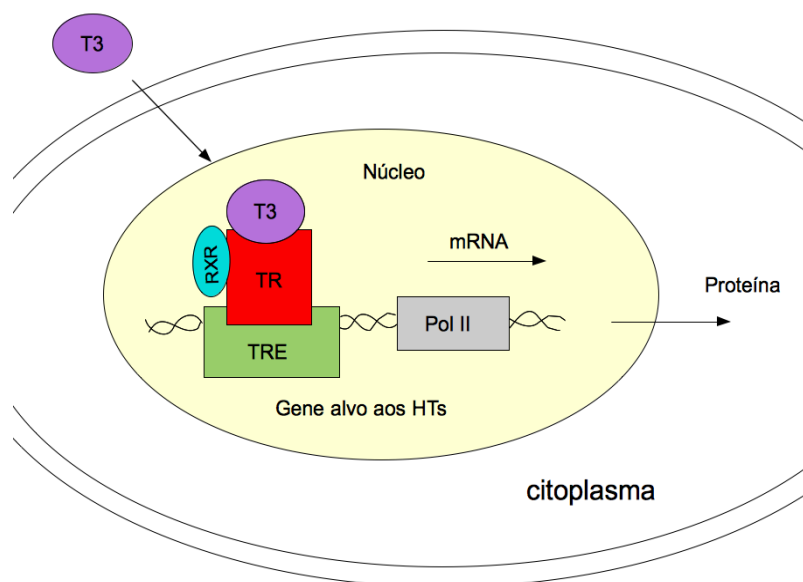


Figura 2. Ação nuclear dos HT. Ação nuclear ocorre por meio da ligação do T3 aos TRs, que irão mediar a ação dos HTs estando associados a TRE. Quando o T3 se liga ao complexo TR/TRE, ocorre heterodimerização principalmente com RXR, com isso, os HTs modificam a conformação estrutural dos TRs, eles que geralmente estão associados a proteínas co-repressoras da transcrição gênica,

liberam essas proteínas e se associam a co-ativadores da transcrição gênica. HT, hormônios tireoideanos; T3, triiodotironina; TR, receptores de HT; TRE, elemento responsivo a HT; RXR, receptor de ácido retinóico X; Pol II, polimerase II; mRNA, ácido ribonúcleico mensageiro.

Conforme mencionado anteriormente, os HTs podem exercer suas ações de forma extranucleares, não havendo necessidade da interação entre HT/TR/TRE (32, 43,44). Neste caso, ocorre um mecanismo de transdução do sinal, em que as repostas são desencadeadas por meio de sítio de iniciação na membrana plasmática (receptores de membrana) ou no citoplasma, ativando quinases citoplasmáticas em tempo curto, sem modular a expressão gênica; contudo a ação extranuclear pode culminar na transcrição gênica, promovendo a modulação da expressão de genes alvos pela translocação de fatores transcripcionais para o núcleo (43,45,46). Isso demonstra que pode haver interação entre os eventos extranucleares e nucleares na ação dos HT. Dentre as vias extranucleares que os HT desempenham suas ações estão a via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e a integrina $\alpha V\beta 3$.

1.3. via MAPK/ERK 1/2

A via MAPK é uma via citoplasmática, que participa de diversos mecanismos celulares, como a expressão de genes, diferenciação celular, metabolismo e apoptose (47). É composta pelas quinases: MAP quinase quinase quinase (MAPKKK), MAP quinase quinase (MAPKK) e a MAP quinase (MAPK), que sofrem fosforilações sequenciais gerando sinais que irão ativa-las (48). As principais MAPKs identificadas em mamíferos, são a via da quinase regulada extracelularmente (ERK),

c-Jun N-terminal quinase (JNK) e p-38 (49) e são classificadas de acordo com suas quinases de nível terminal, nas sub-famílias: MAPK/ERK 1/2, MAPK/p-38, MAPK/JNK, MAPK/ERK 5 e as MAPK/ERK 3/4. Sabe-se que os HT podem ativar a via MAPK causando fosforilações sequenciais que resultam na ativação da ERK 1/2 e seus substratos nucleares e citoplasmáticos.

A via da MAPK/ERK 1/2 é ativada preferencialmente por mitógenos e está envolvida na regulação de mitose, meiose e funções pós-mitóticas em células diferenciadas, sendo um importante regulador do ciclo e proliferação celular (47). Essa via tem como principal MAPKKK a isoforma c-Raf, e a MAPKK é constituída das isoformas MEK 1/2 (50), sendo que, c-Raf é capaz de fosforilar MEKs em uma cascata única (51). O PD98059, é um inibidor de MAPKK, portanto de MEK, e sabendo-se que as isoformas MEK1/2 fosforilam diretamente a ERK1/2, sua inibição evita a atividade da via MAPK/ERK 1/2. Com isso, o inibidor PD98059 é utilizado para verificar envolvimento da via em diferentes estudos (52). A Figura 3 representa esquematicamente a via de transdução de sinal da via MAPK/ERK 1/2 e o local de bloqueio pelo PD98059.

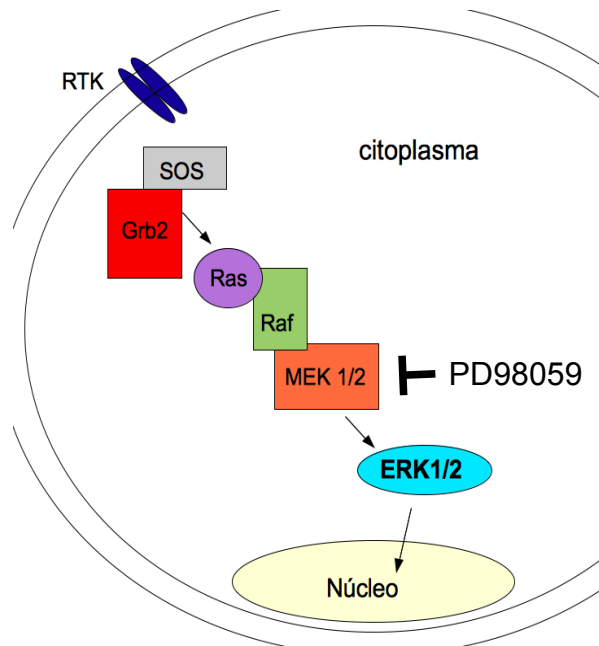


Figura 3. Via MAPK/ERK, formando um sistema regulado em que as quinases são ativadas por sinais transmitidos pela fosforilação sequencial delas. Em que, ativação de receptor de tirosina quinase (RTK) causa fosforilação de Ras, pelo recrutamento do complexo Grb2/SOS. Ras ativa Raf, que por sua vez ativa MEK, que leva a fosforilação de ERK1/2. Sendo que o inibidor PD98059 age sobre a MEK.

1.4. Via integrina $\alpha V\beta 3$

Nesta via, o local de iniciação ocorre na membrana plasmática, por meio da ativação da integrina $\alpha\beta 3$, que foi identificada por Bergh *et al.* 2005 (53) como sendo o receptor de membrana para os HT. Ela possui sítio de ligação para esses hormônios, sendo a integrina mais expressa em células de mamíferos (54). A integrina $\alpha\beta 3$ apresenta duas subunidades, aos quais os HTs podem se ligar: S1 (ou β), que se liga somente ao T3 e ativa, por meio da cinase Src, a via fosfatidil inositol-3-quinase (PI3K); e o S2 (ou α), que se liga ao T3 ou T4, como maior afinidade ao T4, e ativa a via da MAPK/ERK1/2 (39, 43,44). Essa ligação com os HT pode estimular proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e proteínas

pertencentes a esse grupo, como a ERK1/2 e resultar em eventos no citoplasma ou eventos celulares complexos.

Foi demonstrado que o ácido tetraiodotiroacético (Tetrac), que é um produto fisiológico do metabolismo do T4, derivado por desaminação oxidativa e descarboxilação de sua cadeia de alanina (55,56), impede a ligação dos HT com a integrina, bloqueando a ativação da MAPK/ERK1/2 e da PI3K. Desta forma, ele é um antagonista competitivo de HT na integrina $\alpha V\beta 3$, inibindo a ação dos HT sobre a integrina $\alpha V\beta 3$, em ambos os sítios, S1 e S2 (57,58). A Figura 4 representa esquematicamente a via da integrina $\alpha V\beta 3$ e as duas vias citoplasmática que podem ser ativadas, PI3K e MAPK/ERK. Além do local de bloqueio do inibidor Tetrac.

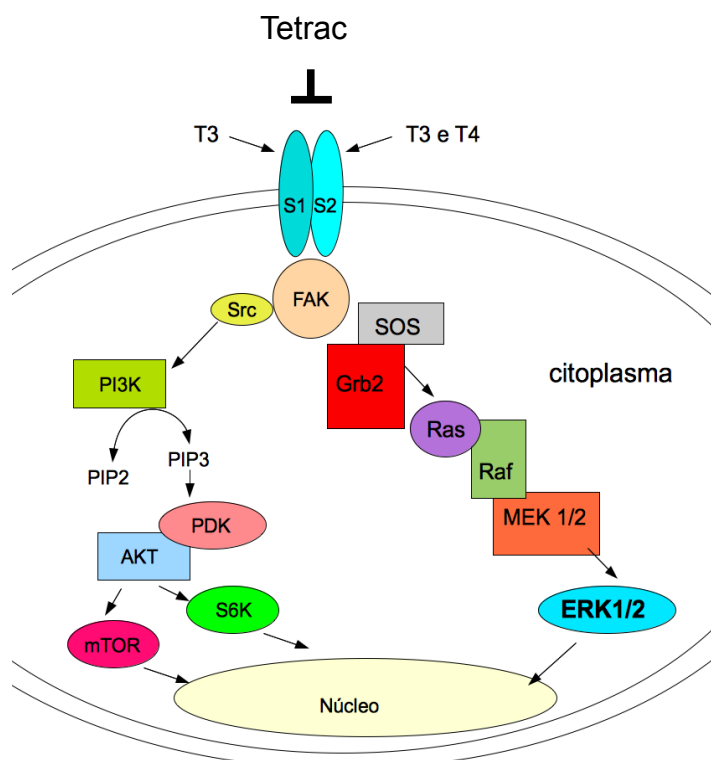


Figura 4. Via da integrina $\alpha V\beta 3$, com suas duas subunidades S1 e S2. S1 que se liga somente ao T3, ativando a via PI3K e a S2 que se liga ao T3 ou T4, ativando a via da MAPK/ERK, em que a quinase de adesão focal (FAK) ativa Ras pelo recrutamento do complexo Grb2/SOS. Ras ativa Raf, que por sua vez ativa MEK, que leva a fosforilação de ERK1/2, sendo que ambas podem ser inibidas

pela ação do ácido tetraiodotiroacético (Tetrac).

1.5. Hormônios Tireoideanos, Tecido adiposo e adipocinas

No TA os HT, sobretudo o T3, tem importante papel sobre o metabolismo lipídico, agindo sobre seu desenvolvimento e metabolismo. O hormônio modula a proliferação e diferenciação de adipócitos (56,59), podendo agir sobre os reguladores do processo de diferenciação adipogênica, como o PPAR γ , que é responsável pela modificação fenotípica e acúmulo lipídico nos adipócitos maduros. Desta forma, os HT estimulam a diferenciação e inibem a proliferação dos adipócitos (60). Tata *et al.* 1962 (61), elucidaram os mecanismos de ação dos HT a nível celular, demonstraram que o T3 está relacionado ao aumento da taxa metabólica basal, acarretando na redução de peso. (62).

Na literatura, estudos demonstram que o estado tireoidiano pode regular a produção de leptina e adiponectina, apesar de existirem divergências (63,64,65). Pinkney *et al.* 1998 (66), evidenciaram a relação entre a leptina e os HT durante a privação de alimento, em que houve redução da atividade da tireoide e consequente diminuição do gasto energético. Da mesma maneira, a leptina também reduz sua ação, sugerindo que a leptina e a tireoide podem responder de forma semelhante. De acordo com a literatura, *in vivo*, o estado de hipotireoidismo levaria a aumento da concentração de leptina, quando comparado a situação de hipertireoidismo (67). Já *in vitro*, Yoshida *et al.* (68) verificaram, a ação de T3 e T4 sobre a expressão gênica de leptina, e observaram que apenas o T3 aumentou a expressão de mRNA e a secreção desta proteína, em células 3T3-L1. E ainda, segundo Yoshida *et al.* (69), a concentração de T3, 10nM, elevou a expressão de mRNA e secreção de leptina

nestas células. Porém, estudos em humanos não mostram evidências conclusivas sobre a relação entre HT e os níveis de leptina (70,71)

Em relação à adiponectina, estudos *in vivo* demonstram que, no hipertireoidismo a concentração dela está aumentada, quando comparada ao eutiroideu e hipotireoideu (63,64,72), e em roedores e humanos, a obesidade diminui os valores plasmáticos dessa adipocina (22,73,74). Por outro lado, Kokkinos *et al.* (65) demonstraram que ratos hipotireoideos apresentaram aumento de concentração de adiponectina, enquanto os animais hipertireoideos não tiveram mudanças significativas. *In vitro*, em estudo com adipócitos 3T3-L1, observou-se que não houve alteração da expressão de mRNA de adiponectina, quando as células foram tratadas com T3, mimetizando estado de hipertireoidismo (75). Recentemente, em nosso grupo, utilizando-se adipócitos 3T3-L1, observamos que diferentes doses de T3, em diferentes tempos, modulam a expressão de mRNA de adiponectina e leptina, demonstrando rápida ação do hormônio sobre a expressão dessas adipocinas (76).

Embora o T3, muitas vezes exerça suas ações por meio de vias nucleares, diversos estudos tem constatado que ele pode ativar rapidamente vias extranucleares, modulando a expressão gênica, levando a um aumento de determinados genes (43,45,77,78). Sabendo-se que vias extranucleares são ativadas rapidamente, decidimos verificar a ação do T3 por meio dessas vias, num curto período de tempo, na modulação de adipocinas, em adipócitos 3T3-L1. Desta forma, verificamos que o T3 na dose fisiológica e suprafisiológica elevaram os níveis de mRNA e expressão protéica de leptina, e com utilização do inibidor LY294002 observamos que essa modulação ocorreu pela via PI3K, no tempo de uma hora de

tratamento (79).

Assim, o objetivo do presente estudo foi verificar a ação do T3, por meio das vias MAPK/ERK e integrina $\alpha\beta3$, para modular a expressão gênica e proteica de adiponectina e leptina, além da expressão proteica de PPAR γ e alteração de acúmulo lipídico, dano de DNA, liberação de glicerol, dosagem de triacilglicerol, em cultura de adipócitos 3T3-L1.

2. Justificativa

Visto que, vias extranucleares podem ser ativadas num curto período de tempo, para modular a expressão gênica, e de acordo com resultados anteriores do nosso grupo, o T3 modulou a expressão das adipocinas no tempo de uma hora; justifica-se verificar ação rápida do T3, por meio das vias MAPK/ERK e integrina $\alpha V\beta 3$, para modulação da expressão de adiponectina e leptina, responsáveis pela regulação metabólica do organismo.

3. Hipótese

T3 eleva a expressão gênica de adiponectina e leptina, além de alterar parâmetros relacionados ao perfil adipogênico, por meio da via MAPK/ERK e integrina $\alpha V\beta 3$, em cultura celular de adipócitos 3T3-L1.

4. Objetivo

4.1. Objetivo Geral

Avaliar a ação rápida do T3, via MAPK/ERK e integrina $\alpha V\beta 3$, na modulação expressão de mRNA e proteica de adiponectina e leptina, em cultura de adipócitos 3T3-L1.

4.2. Objetivos específicos

- Avaliar se a ação do T3 na expressão gênica de adiponectina e leptina é desencadeada com participação da via MAPK/ERK e integrina $\alpha V\beta 3$

- Avaliar se o T3 age por meio da via MAPK/ERK e integrina $\alpha V\beta 3$, para alterar os parâmetros relacionados ao perfil adipogênico, como: expressão proteica de PPAR γ , acúmulo lipídico, dosagem de triacilglicerol, liberação de glicerol e dano de DNA.

5. Resultados

5.1. Manuscrito 1

Triiodotironina (T3) ativa rapidamente vias extranucleares para modular a expressão de adiponectina

Autores:

Lucas Solla Mathias¹, Célia Regina Nogueira¹, Igor Deprá¹, Bruna Moretto Rodrigues¹, Fernanda Cristina Fontes Moretto¹, Regiane Marques Castro Olimpio¹ e Miriane de Oliveira¹.

Instituição:

1- Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, SP, Brasil, 18618-970.

Autor Correspondente:

Lucas Solla Mathias

Faculdade de Medicina de Botucatu, Univ Estadual Paulista - UNESP

Distrito de Rubião Jr s/n, Botucatu, SP, Brazil, 18618-000

Telephone: +55 11 984433311

E-mail: luu.mathias@gmail.com

Resumo

Introdução: O hormônio triiodotironina (T3), influencia o metabolismo e desenvolvimento do tecido adiposo (TA). O TA está envolvido na regulação da energia corporal, sintetizando e secretando as adipocinas, dentre elas a adiponectina, que aumenta a sensibilidade à insulina. O T3 pode desencadear ações por ativação de vias extranucleares, dentre elas a via MAPK/ERK e integrina $\alpha\beta3$.

Objetivo: Verificar a rápida ação do T3, na ativação das vias extranucleares, para modulação da adiponectina. **Métodos:** Adipócitos 3T3-L1, foram tratados com T3

(10nM) por uma hora, na ausência ou presença dos inibidores de MAPK/ERK – PD98059 (PD, 50uM) e da integrina $\alpha\beta3$ – ácido tetraiodotiroácetico (Tetrac, 10^{-4} M).

A ausência de tratamento foi considerada controle (C). Após o tratamento foi realizado PCRq-RT, para analisar expressão de mRNA de adiponectina, e Western Blot para expressão proteica de adiponectina e PPAR γ ; a quantificação do acúmulo lipídico foi realizada com os ensaios *Adipo Red* e *Oil Red*, avaliação do acúmulo de triacilglicerol (TGL) pelo método enzimático-colorimétrico, a mensuração do produto da lipólise por ensaio de glicerol; dano de DNA pela quantificação da 8-Hidroxideoxiguanosina(8O-OH-dG). Utilizou-se ANOVA complementada com o teste de *Tukey*, para dados com normalidade ($p < 0,05$). Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão.

Resultados: T3 não alterou a expressão de mRNA de adiponectina, contudo aumentou a expressão proteica ($1,7 \pm 0,15$, $p < 0,01$), em relação ao C ($1,0 \pm 0,03$, $p < 0,01$), porém este aumento foi abolido pelos inibidores, PD +T3 ($0,6 \pm 0,11$, $p < 0,01$) e Tetrac+T3 ($0,6 \pm 0,10$, $p < 0,01$). Embora o T3 não tenha alterado a expressão proteica de PPAR γ , acúmulo lipídico, dosagem de TGL, liberação de glicerol e dano de DNA, em relação ao C, os grupos PD+T3 e Tetrac+T3,

apresentaram redução de todos os parâmetros mencionados anteriormente, quando comparados ao T3. **Conclusões:** O T3 age nos adipócitos, por meio da via MAPK/ERK e integrina $\alpha\beta3$, para elevar a expressão proteica de adiponectina, e a integridade das vias é necessária para que o hormônio mantenha a homeostase dos adipócitos.

Palavras chaves: adiponectina, T3, MAPK/ERK, integrina $\alpha\beta3$, 3T3-L1.

Introdução

O tecido adiposo (TA) é um importante órgão endócrino, fundamental para regulação metabólica do organismo, por meio da produção e secreção de adipocinas (1,2). Dentre elas temos a adiponectina, que está relacionada a melhora da sensibilidade à insulina, apresentando efeitos antidiabéticos, podendo ser uma ferramenta terapêutica para diabetes, síndrome metabólica, doenças cardiovasculares (3). Além disso, o TA possui a função de armazenar energia, visto que, seu principal componente celular são os adipócitos, que possuem em seu interior gotículas lipídicas que armazenam energia na forma de triacilglicerol (TGL) (4). *In vitro*, o modelo mais bem caracterizado de adipogênese é o da linhagem de pré-adipócitos 3T3-L1, que quando tratados com coquetéis estimulantes desencadeiam o processo de adipogênese (5). Os hormônios tireoideanos (HT) tem importante papel sobre o metabolismo lipídico do TA, agindo sobre a proliferação e da diferenciação de adipócitos (6,7), podendo agir sobre o receptor ativado por proliferador de peroxisomo (PPAR γ), que é regulador central do processo de diferenciação, responsável pelas alterações fenotípicas dos adipócitos, acúmulo de TGL no citoplasma, regulação do metabolismo lipídico e secreção de adipocinas (8,9).

Na literatura, existem estudos que demonstram que o estado tireoidiano pode regular a produção de adiponectina, apesar de existirem divergências (10,11). Recentemente, nosso grupo observou, utilizando-se adipócitos 3T3-L1, que diferentes doses de triiodotironina (T3) em diferentes tempos, modulam a expressão de mRNA de leptina e adiponectina, demonstrando rápida ação do hormônio na expressão dessas adipocinas (12). Os HT atuam nos diferentes tecidos alvos, por

meio de ações que podem ser iniciadas no núcleo, membrana plasmática, citoplasma ou mitocôndrias das células (7). Diversos estudos tem constatado que o T3 pode ativar a vias extranucleares, levando a aumento da expressão de determinados genes (13,14). As ações dos HT, exercidas de forma extranucleares, são desencadeados por meio de sítio de iniciação na membrana plasmática ou no citoplasma, ativando rapidamente vias de sinalização citoplasmática, sem modular a expressão gênica; contudo essa ação extranuclear pode culminar na transcrição gênica, promovendo a modulação da expressão de genes alvos pela translocação de fatores transcricionais para o núcleo (13-15). Isso demonstra que pode haver interação entre os eventos extranucleares e nucleares na ação dos HT. Dentre as vias extranucleares estão, a via MAPK/ERK e da integrina $\alpha V\beta 3$.

A via da MAPK forma um sistema regulado em que as quinases são ativadas por sinais transmitidos por meio de sua fosforilação sequencial (16). A via MAPK/ERK apresenta isoforma Raf-1 (ou c-Raf) e isoformas MEK 1/2 (17). Raf-1 são proteínas capazes de fosforilar MEKs em uma cascata única (18). O PD98059, é um inibidor de isoformas MEK1/2 e sabe-se que elas são estimuladoras diretas de ERK1/2, com isso sua inibição evita a atividade da via MAPK/ERK 1/2, portanto, sendo utilizado para verificar envolvimento da vias em diferentes estudos (19).

A integrina $\alpha V\beta 3$ é uma proteína localizada na membrana plásmica, que foi identificada por Bergh *et al.* 2005 (20), como sendo o receptor de membrana para os HT, apresentando sítio de ligação para esses hormônios, sendo a integrina mais abundantemente expressa em células de mamíferos (21). Ela apresenta duas subunidades, aos quais os HTs podem se ligar: S1 (ou β), que se liga somente ao T3 e ativa, por meio da cinase Src, a enzima PI3K; e S2 (ou α), que se liga

preferencialmente ao T4, e ativa a via da MAPK/ERK1/2 (13,22). Foi demonstrado que o ácido tetraiodotiroacético (Tetrac), que é um produto fisiológico do metabolismo T4, derivado por desaminação oxidativa e descarboxilação de sua cadeia de alanina (6), impede a ligação dos HT com a integrina $\alpha\text{V}\beta 3$, desta forma, sendo utilizado como inibidor para que atua nas duas subunidades, S1 e S2 (23).

Portanto, visto a importância das vias extranucleares no TA, que incluem a via MAPK/ERK e da integrina $\alpha\text{V}\beta 3$, por participarem do processo de diferenciação adipogênica, e o relevante papel do T3 sobre o TA, justifica-se verificar a ação rápida do T3, por meio dessas vias, para modulação da expressão de adiponectina, além dos parâmetros relacionados ao perfil adipogênico. O objetivo do estudo foi avaliar a ação do T3, via MAPK/ERK e integrina $\alpha\text{V}\beta 3$, na modulação da expressão de mRNA e proteína de adiponectina, em cultura de adipócitos 3T3-L1.

Material e Métodos

Reagentes

Meio RPMI 1640 (RPMI), Soro Fetal Bovino (SFB) and antibiótico-antimicótico solução de 100X (Grand Island, NY, USA), 1-metil-3-isobutilxantina (IBMX), desametasona (DEXA), insulina, triiodotironina (T3), PD98059 (PD), ácido tetra-iodo-tiro-ácetico (Tetrac), sulfóxido de dimetilo (DMSO), hidróxido de sódio (NaOH), e SFB carvão foram comprados pela Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA), monoclonal de coelho anti-adiponectina 1:1000 (Cell Signaling Technology, #2789), monoclonal de rato PPAR γ 1:250 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. E-8:S7273), anticorpo monoclonal de rato anti-GAPDH 1:1000 (Abcam, Cambridge, UK, AB9749).

AB97069).

Cultura de células e diferenciação

O protocolo experimental foi aprovado pelo comitê de Ética em estudos animais da Faculdade de Medicina de Botucatu- UNESP, sob o número: 959-2012. Para o estudo *in vitro*, foi utilizada a linhagem celular de pré-adipócitos derivada de camundongos (3T3-L1), obtidas pelo banco de células da Unipex (Botucatu. SP, Brasil), que foram cultivadas em placas, com meio RPMI (Gibco®) suplementado com 2,5g D-glucose, 0,11g Piruvato, 3,7g Bicarbonato de sódio, 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco®), 1% antibiótico/antimicótico (Sigma®), sob uma atmosfera de 5% de CO₂ a temperatura de 37°C. As células foram mantidas em cultura nessas condições até atingirem a confluência de aproximadamente 100% (designado dia 0). Posteriormente foram submetidas ao processo de diferenciação, permanecendo três dias em meio RPMI, contendo 10% de SFB, 100 mM de 1-metil-3-isobutilxantina (IBMX) (Sigma®), 1mM de dexametasona (Sigma®) e 5mg/L de insulina (Sigma®). Após esse período, as células foram incubadas em meio RPMI contendo, 10% de SFB e 5 mg/ml de insulina por sete dias. Após o período de diferenciação celular, os adipócitos foram submetidos à depleção do HT por 36h com meio RPMI suplementado com soro fetal Charcoal Stripped (Sigma®). Após a depleção do HT, as células foram submetidas aos tratamentos com PD98059 (50uM) – inibidor da MAPK/ERK e Tetrac (10⁻⁴M) – inibidor da integrina α V β 3, durante 1h e posteriormente tratadas com T3 na dose de 10 nM, por mais uma hora (1h). O grupo não tratado foi usado como controle (C). Desta forma, formaram-se os seguintes grupos: C, T3, PD, TETRAC, PD+T3 e TETRAC+T3. Todas as técnicas foram realizadas em triplicata biológica.

Coloração com *Oil red* e ensaio *Adipo Red*

Após a diferenciação e tratamento, para confirmar a diferenciação e verificar os efeitos dos tratamentos, foi realizado o *Oil red O* e o *Adipo Red*. Inicialmente, as células foram lavadas com PBS e fixadas com formoldeído 37% por 30 minutos, em temperatura ambiente. Utilizou-se 300µl de corante Oil Red O (Sigma®), incubou-se por 2 horas a 37°C. As células foram observadas no microscópio, para constatar a diferenciação, pela coloração em vermelho das gotículas lipídicas. Além disso, foi utilizado o kit de ensaio de *AdipoRed* (Lonza, Walkersville, MD, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Os adipócitos foram incubados por 10 minutos na presença do reagente AdipoRed, em temperatura ambiente, com a finalidade de corar os adipócitos. As placas foram lidas em excitação de 485 nm no leitor de placas da Synergy HT (Biotek, Instruments, Winooski, VT, USA), e a fluorescência foi quantificada a 572 nm.

Ensaio de TGL e Glicerol

Após os tratamentos, foi coletado o sobrenadante da cultura celular de adipócitos, para posterior avaliação da liberação de TGL, por meio do método enzimático-colorimétrico, utilizando o aparelho BS-200 Chemistry Analyzer (Mindray®), de acordo com o protocolo do fabricante. Além disso, após os tratamentos, o meio de cultura dos adipócitos (sobrenadante) foi coletado e os níveis de glicerol avaliados pelo Kit de Ensaio Colorimétrico de Glicerol (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI), de acordo com as instruções do fabricante. A absorbância foi quantificada em 540 nm no leitor de placas HT (Biotek, Instruments, Winooski, VT, EUA).

Dosagem da 8O-OH-dG

A 8O-OH-dG, indicador de dano oxidativo ao DNA, foi avaliado usando o kit DNA/RNA Oxidative Damage EIA (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI), de acordo com as instruções do fabricante. O meio de cultura dos adipócitos (sobrenadante) foi coletado, na presença ou ausência de tratamento. A quantificação foi feita por determinação da absorbância das amostras em relação à absorbância da curva padrão, com concentrações conhecidas. Todas as análises foram feitas usando leitor de microplaca (Spectra Max 190; Molecular Devices®, Sunnyvale, CA, USA).

PCRq-RT

O RNA total foi extraído a partir de células 3T3-L1, usando o reagente TRIzol® (Invitrogen®), de acordo com as instruções do fabricante. O *kit* High Capacity cDNA de transcrição reversa, para reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR, Invitrogen®, São Paulo, Brasil), foi utilizado para a síntese de 20µL de DNA complementar (cDNA) a partir de 1.000ng de RNA total.

O níveis de adiponectina (ensaio Mm00456425_m1- Applied Biosystems) foram analisadas por PCR em tempo real (PCR-RT). As análises foram realizadas no *Applied Biosystems StepOne Plus*, que é um sistema de detecção que utiliza o *kit* TaqMan qPCR comercial (Invitrogen®), de acordo com as instruções do fabricante. As condições de amplificação foram: ativação da enzima a 50°C durante 2 minutos; desnaturação a 95°C durante 10 minutos; os produtos de cDNA foram amplificados por 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 15 segundos; e anelamento/extensão a 60°C por 1 minuto.

Após a normalização como controle endógeno, utilizou-se ciclofilina (ensaio Mm00434759_m1)(24) pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, como previamente descrito (25), a

expressão de mRNA da adiponectina foi avaliada em relação aos valores do grupo C em comparação aos grupos tratados.

Western Blotting

Após os tratamentos, as células foram lavadas duas vezes com PBS gelado e lisadas com 100ul de tampão de lise, inibidor de fosfatase e protease, contendo Tris 500mM (pH 8), 150mM de NaCl, 1% de Triton X-100, 10%, 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS), e 0,5% de desoxicolato. O homogeneizado foi centrifugado a 4°C durante 20 minutos a 12000rpm. O sobrenadante foi recolhido e o conteúdo total de proteína foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA), como padrão. As amostras contendo 50ug de proteína foram submetidas a eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida a 15% (SDS-PAGE). Após a eletroforese, as proteínas foram electro-transferidas para membrana de nitrocelulose, usando um sistema de transferência semi-seco (BioRad Biosciences; NJ, USC). A membrana foi então bloqueada com 5% de BSA, em solução salino tamponado Tris (TBS) com 0,1% de Tween-20 (T) durante 1h, a temperatura ambiente, e incubadas com anticorpos específicos overnight à 4°C. Os anticorpos primários utilizados foram monoclonal de coelho anti-adiponectina 1:1000 (Cell Signaling Technology, #2789), monoclonal de rato PPAR γ 1:250 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. E-8:S7273), monoclonal de rato anti-GAPDH 1:1000 (Abcam, Cambridge, UK, AB9749. AB97069). Após o período de incubação com os anticorpos primários, incubou-se com secundário anti-mouse ou anti-rabbit em 5% de BSA em TBS-T durante 1h em temperatura ambiente, as bandas foram marcadas utilizando o SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate kit (Pierce) e expostas a Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences). A análise quantitativa de

imagens de imunotransferência foi realizada utilizando o equipamento Gel Logic (6000 PRO) com software Carestream MI. Os resultados são apresentados como a razão entre a proteína alvo e GAPDH.

Análise Estatística

Os dados foram analisados por meio da análise de variância paramétrica ANOVA two-way, complementada com o teste de Tukey, pois todos os dados apresentaram normalidade, pelo teste de normalidade de shapiro-wilk. Neste caso, os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. A significância foi dada para $p < 0,05$.

Resultados

Tratamento com T3, após à inibição da MAPK/ERK e integrina $\alpha V\beta 3$, altera os parâmetros adipogênicos.

Em relação aos parametros adipogênicos, dentre eles expressão proteica de PPAR γ , acúmulo lipídico, dosagem de triacilglicerol e liberação de glicerol. Verificou-se que em todos os casos, os grupos PD+T3 e Tetrac+T3, apresentaram diminuição significativa em relação ao T3 (Figura 1).

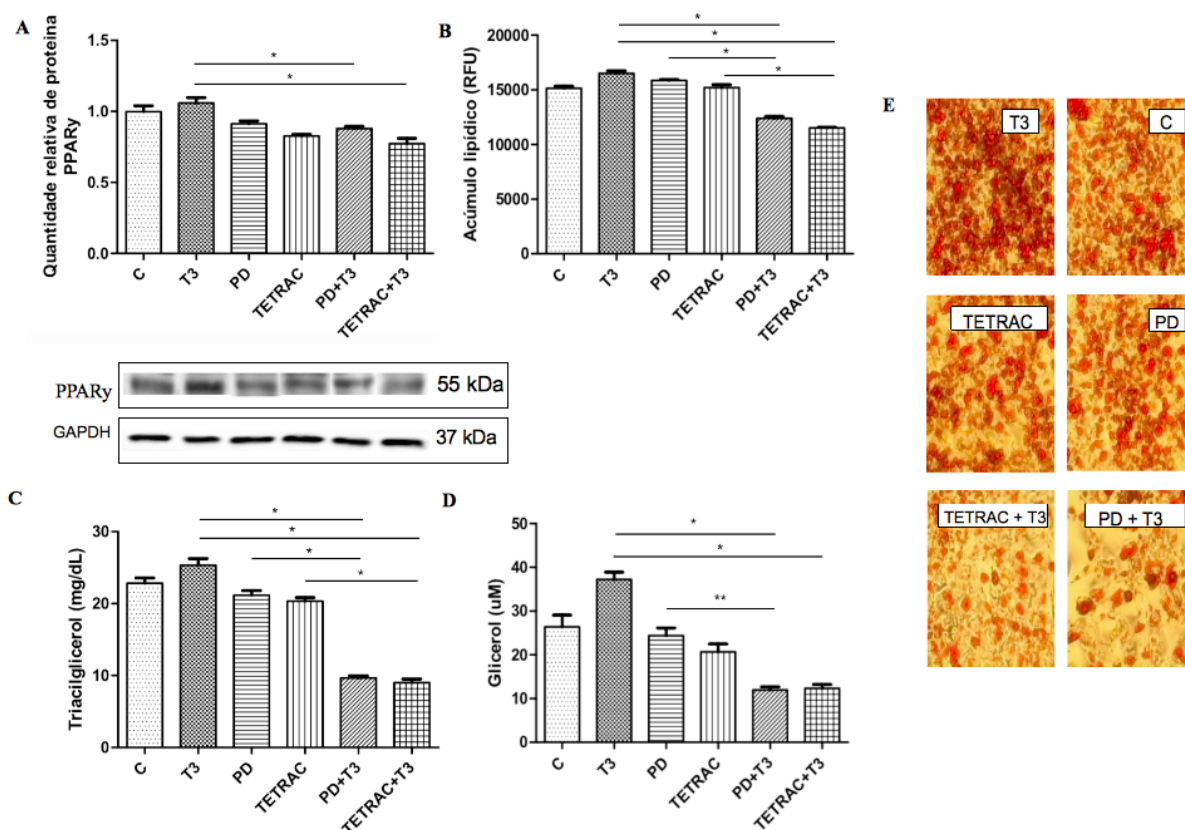


Figura 1. Parâmetros adipogênicos. A) Expressão proteica de PPAR γ por Western Blotting. B) Dosagem de acúmulo lipídico por *AdipoRed*. C) Mensuração de TGL por método enzimático-colorimétrico. D) Liberação de glicerol para mensurar produto da lipólise. E) Dosagem de acúmulo lipídico por coloração em *Oil Red*. T3= 10 nM T3, PD= 50uM PD98059, TETRAC= 10^{-4} M de ácido tetra-iodo-tiro-ácetico (TETRAC), C= ausencia de tratamento. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão (ANOVA complementado pelo teste de Tukey); n = 3 em cada tratamento. *p<0,01 e **p<0,05.

Inibição das vias MAPK/ERK e integrina $\alpha V\beta$ e posterior tratamento com T3 apresenta menor dano de DNA.

Observamos que, os grupos PD+T3 ($0,7 \pm 0,10$, p<0,01) e Tetrac+T3 ($0,66 \pm 0,10$, p<0,01), apresentaram diminuição significativa do Dano de DNA, em relação ao C ($2,3 \pm 0,26$, p<0,01) e T3 ($2,36 \pm 0,20$, p<0,01) (Figura 2).

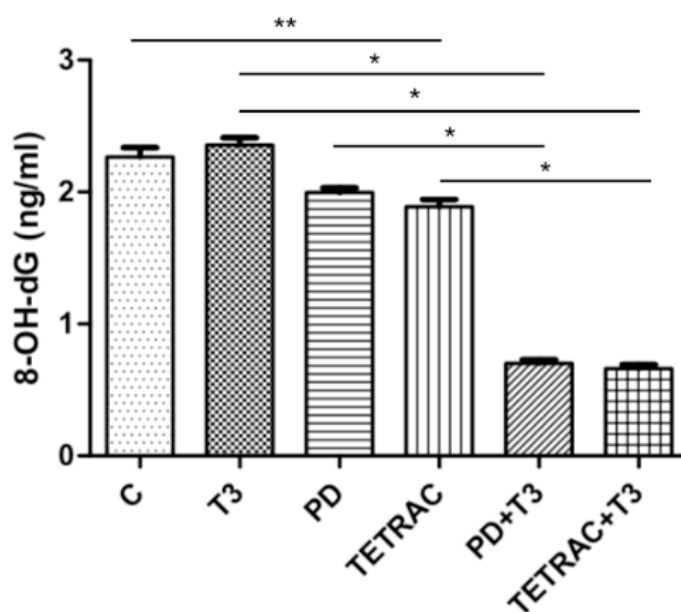


Figura 2. Efeito do T3 pelas vias MAPK/ERK e integrina sobre o dano oxidativo de DNA. Quantificação da 8-hidroxideoxiguanosina (8O-OH-dG) por ensaio Elisa. T3= 10 nM T3, PD= 50uM PD98059, TETRAC= 10^{-4} M de ácido tetra-iodo-tiro-ácetico (TETRAC), C= ausencia de tratamento. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão (ANOVA complementado pelo teste de Tukey); n = 3 em cada tratamento. *p<0,01 e **p<0,05

T3 eleva a expressão proteica de adiponectina, por ativação da via MAPK/ERK e integrina $\alpha V\beta 3$.

A expressão de mRNA de adiponectina, não é modulada pelo T3, por meio das vias MAPK/ERK e integrina $\alpha V\beta 3$, já que não houveram diferenças significativas entre os grupos (Figura 3A e 3C). Porém, em relação a expressão proteica de adiponectina, o grupo T3 apresentou aumento significativo, quando comparado ao C. Já os grupos, PD+T3 ($0,6 \pm 0,11$, p<0,01) e Tetrac+T3 ($0,6 \pm 0,1$, p<0,01) ocorreu uma diminuição na expressão dessa adipocina, quando comparado ao T3 (Figura 3B e 3D).

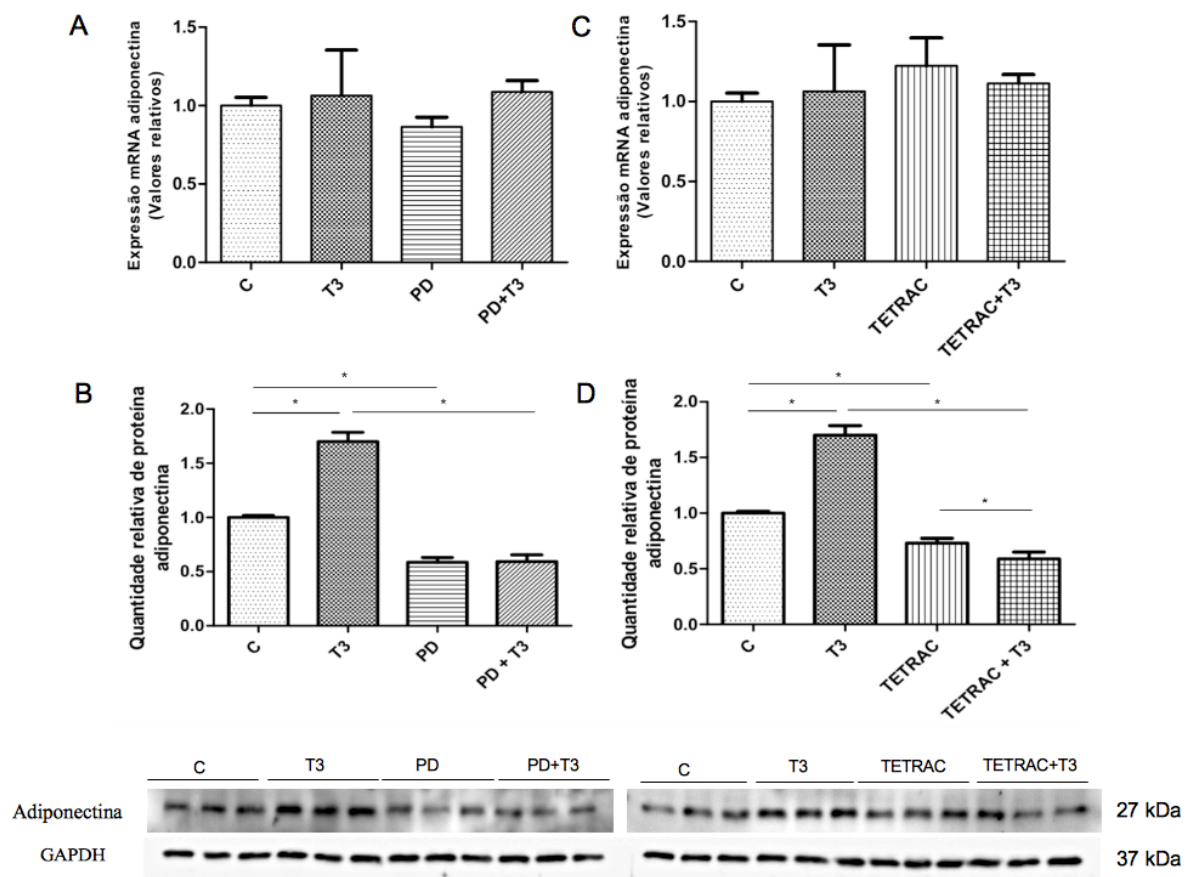


Figura 3. Figura 4. Efeitos do T3 por meio das vias MAPK/ERK e integrina $\alpha V\beta 3$ sobre a expressão de mRNA e proteica de adiponectina. A) Ação do T3 pela via MAPK/ERK na expressão de mRNA de adiponectina. B) Ação do T3 pela via MAPK/ERK na expressão proteica de adiponectina. C) Ação do T3 pela via integrina $\alpha V\beta 3$ na expressão de mRNA de adiponectina. D) Ação do T3 pela via integrina $\alpha V\beta 3$ na expressão proteica de adiponectina. T3= 10 nM T3, PD= 50uM PD98059, TETRAC= 10^{-4} M de ácido tetra-iodo-tiro-ácetico (TETRAC), C= ausencia de tratamento. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão (ANOVA complementado pelo teste de Tukey); n = 3 em cada tratamento. *p<0,01

Discussão

O T3 é fundamental para manutenção de praticamente todos os tecidos do organismo, por meio de regulação de vias metabólicas (26). Diversos estudos tem constatado que o T3 pode ativar vias extranucleares culminando na modulação da expressão gênica (13,14). Embora existam vários trabalhos sobre alterações de expressão de adipocinas moduladas pelos HT, os resultados são conflitantes e pouco é conhecido sobre os mecanismo moleculares de regulação envolvidos.

Visto a importância das vias extranucleares, como a via MAPK/ERK e da integrina $\alpha\beta3$ nos adipócitos, o objetivo do presente trabalho foi verificar a ação do T3 por meio dessas vias, num curto período de tempo (1h), na modulação da adiponectina e na alteração dos parametros adipogênicos. Nosso estudo utilizou um modelo experimental de adipogênese bem estabelecido de células 3T3-L1 (27), que foram diferenciados *in vitro* em adipócitos.

Conforme descrita a importância das vias MAPK/ERK e integrina $\alpha\beta3$ nos adipócitos, utilizou-se os inibidores, PD98059 que inibe MEK, e portanto, a atividade da ERK (19) e Tetrac, que é capaz de inibir os dois sítios de ligação de T3 à integrina $\alpha\beta3$, um que ativa a via MAPK/ERK e outro que ativa a via PI3K/AKT (28,29), porém inibiu apenas a ativação da via MAPK/ERK, pois apenas a pERK teve sua expressão diminuída, e não a pAKT (dados não mostrados). Com isso, o PD e Tetrac, suprimiram a ativação da MAPK/ERK.

Constatamos que com a inibição da via MAPK/ERK, não houve modificação na expressão proteica de PPAR γ , acúmulo lipídico, triacilglicerol e liberação de glicerol. Vários trabalhos demonstraram que a atenuação da atividade de ERK com inibidores da MEK bloqueia a adipogênese (30). Embora, alguns achados indiquem

que pré-adipócitos, 3T3-L1, tratadas com PD98059, não tem sua diferenciação afetada (31) e apresentam diminuição significativa da expressão de PPAR γ (30), sabe-se que a fosforilação de ERK1/2 leva à inibição do PPAR γ (32), desta forma, a inibição de ERK reverteria a redução do PPAR γ (33). Não há consenso na literatura quanto a relação da via MAPK/ERK e a adipogênese, a inibição ou indução da diferenciação de pré-adipócitos dependeria do momento em que a via foi ativada ou não, durante o processo de diferenciação (30).

Embora os mecanismos moleculares de regulação da diferenciação de adipócitos mediada por T3 não serem totalmente compreendidos, já é bem estabelecido na literatura que o hormônio age sobre a proliferação e diferenciação dos adipócitos, regulando a lipogênese e lipólise (34,35), sendo considerado um indutor de diferenciação (34). Sabe-se que o T3 pode elevar o acúmulo de lipídios intracelulares (35) e a dosagem de triacilglicerol (TGL) (36,37), porém, em nosso estudo o hormônio não alterou esses parâmetros, provavelmente devido a concentração utilizada que apenas mantém o acúmulo apropriado dos lipídeos e pela diferença no tempo de tratamento com T3.

Nossos resultados demonstraram que, com a inibição da via MAPK/ERK, pelo PD e Tetrac, e posterior tratamento com T3 (PD+T3 e Tetrac+T3, respectivamente), houve redução do acúmulo lipídico e liberação de TGL, demonstrando a necessidade da manutenção dessa via para que o T3 possa manter a homeostase dos adipócitos. Têm sido relatado que o excesso de lipídeos e TGL estão relacionado com o processo de estresse oxidativo no tecido adiposo (38,39), desta forma, elevando o dano de DNA, que pode ocorrer a nível das bases nitrogenadas (40), sendo que a guanina é mais suscetível à oxidação, desta forma, quando

oxidada incorpora um OH⁺ no carbono 8 da molécula, formando o 8-OH-dG (41). Com isso, a redução do acúmulo de lipídeos e de TGL, nos grupos PD+T3 e Tetrac+T3, resultou na diminuição do dano de DNA, expresso pela dosagem de 8-OH-dG.

Nas células 3T3-L1, o T3 tem importante papel na diferenciação terminal (42), podendo agir diretamente sobre o PPAR γ . Porém, de acordo com nossos resultados o hormônio não alterou a expressão proteica de PPAR γ , corroborando com Gambo *et al.* 2016 (37), entretanto nos grupos PD+T3 e Tetrac+T3, houve diminuição da expressão de PPAR γ , e consequentemente redução de acúmulo lipídico e de TGL, visto que o gene é um estimulador da adipogênese em adipócitos 3T3-L1 (43), com concomitante diminuição da liberação de glicerol, já que na lipólise o TGL é hidrolisado, gerando como produto três ácidos graxos livres e glicerol (44,45).

Nosso trabalho demonstrou que o T3 não alterou a expressão de mRNA de adiponectina, contudo o hormônio aumentou a expressão proteica dessa adipocina, como encontrado por Fasshauer *et al.* 2002 (46). A inibição de MAPK/ERK, com PD e Tetrac, apresentou diminuição da expressão proteica da adiponectina, assim como demonstrado por GU *et al.* 2013 (47), que sugeriram que houve degradação proteica de adiponectina nos adipócitos, visto que, a via de sinalização intracelular MAPK/ERK é importante no controle da produção de adiponectina via sistema ubiquitina-proteassoma (UPS), que desempenha um papel central na regulação da degradação protéica intracelular (48).

Já nos grupos PD+T3 e Tetrac+T3, a expressão de mRNA de adiponectina não foi alterada, enquanto a expressão proteica foi reduzida. Podemos sugerir que

essa redução está relacionada a menor expressão de PPAR γ , nesses grupos, já que é estabelecido na literatura, que a adiponectina é regulada pelo PPAR γ , embora vias de sinalização que modulam a atividade do PPAR γ envolvido na regulação da expressão e secreção da adiponectina não sejam conhecidos (49). Sabe-se que existe um elemento responsivo ao PPAR γ (PPRE) no promotor do gene da adiponectina, e sua ligação ao PPRE leva ao aumento da transcrição do gene da adiponectina (50).

Além disso, o menor dano de DNA nos grupos PD+T3 e Tetrac+T3, poderia justificar a redução na expressão de PPAR γ , e consequentemente da adiponectina. De acordo com Wang *et al.* 2012 (39) o estresse oxidativo induz a peroxidação lipídica e formando como produto mais abundante o 4-hidroxinonenal (4-HNE), que gera danos celulares e que pode regular a expressão gênica de PPAR γ e adiponectina. Soares *et al.* 2005 (51), observaram que células 3T3-L1, quando tratadas com 4-HNE, apresentaram diminuição da expressão gênica de adiponectina, enquanto outros achados demonstram que houve aumento da expressão do gene da adiponectina e do PPAR γ , sendo que a modulação da expressão do gene da adiponectina mediada pelo produto da peroxidação lipídica, depende da ativação do PPAR γ (39).

Com isso, de acordo com o esquema da Figura 4, a inibição da atividade da via MAPK/ERK, pelo PD ou Tetrac, associada ao tratamento com T3, apresentou diminuição da expressão proteica de PPAR γ , consequentemente menor diferenciação, desta forma, menor acúmulo lipídico e de TGL, e concomitante redução na liberação de glicerol, que é um produto da lipólise. Além disso, a redução de TGL levou a diminuição do dano de DNA, devido a menor formação de peróxidos

lipídicos, incluindo a 4-HNE. E sabendo que o 4-HNE regula a expressão de PPAR γ e adiponectina (39), a redução da formação desses peróxidos lipídicos pode estar relacionada a diminuição de expressão de PPAR γ , com concomitante diminuição da expressão de adiponectina, visto que a expressão dessa adipocina é regulada por esse marcador de diferenciação (49,50). Com isso, nossos resultados sugerem que a ativação pelo T3, da sinalização de MAPK/ERK 1/2 é necessária para a modulação da tradução de adiponectina e manter a homeostase dos lipídeos em adipocitos.

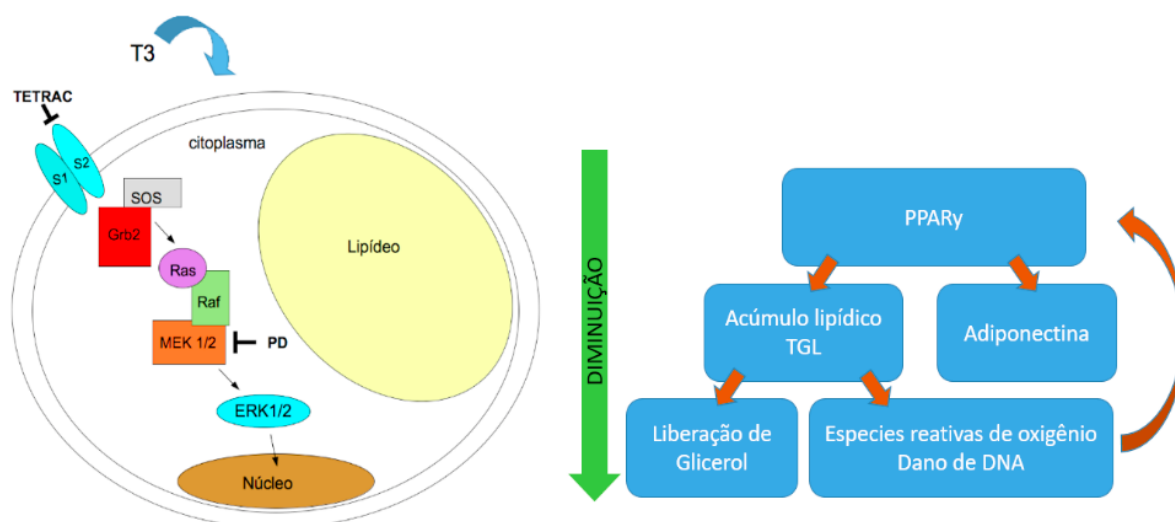


Figura 4. Esquematização da ação do T3 com inibição da via MAPK/ERK e integrina $\alpha V \beta 3$ sobre os parâmetros relacionados ao perfil lipídico. Com a inibição da via MAPK/ERK e posterior tratamento com T3 observamos modificações no perfil adipogênico. Com menor PPAR γ houve menor diferenciação, portanto apresentando menor acúmulo lipídico e de TGL, consequentemente uma menor quantidade de TGL para sofrer lipose e portanto menor liberação de glicerol, que é produto da lipólise. Com menor acúmulo lipídico e TGL houve uma diminuição do estresse oxidativo, com isso menor peroxidação lipídica e consequentemente menor liberação de espécies reativas ao oxigênio, incluindo o 4-hidroxinonenal (4-HNE), havendo redução do PPAR γ e consequentemente da adiponectina, visto que ela é modulada pelo PPAR γ .

Referências

- [1] Spiegelman, B. M., & Flier, J. S. (1996). Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell*, 87(3), 377-389. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81359-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81359-8)
- [2] Hwang, C. S., Loftus, T. M., Mandrup, S., & Lane, M. D. (1997). Adipocyte differentiation and leptin expression. *Annual review of cell and developmental biology*, 13(1), 231-259. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.13.1.231>
- [3] Kadowaki, T., Yamauchi, T., Kubota, N., Hara, K., Ueki, K., and Tobe, K. (2006). Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* 116, 1784–1792. <https://doi.org/10.1172/JCI29126>.
- [4] Brasaemle, D. L. (2007). Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *Journal of lipid research*, 48(12), 2547-2559. <https://doi.org/10.1194/jlr.R700014-JLR200>
- [5] Ntambi, J. M., & Young-Cheul, K. (2000). Adipocyte differentiation and gene expression. *The Journal of nutrition*, 130(12), 3122S-3126S. <https://doi.org/10.1093/jn/130.12.3122S>
- [6] Moreno, M., de Lange, P., Lombardi, A., Silvestri, E., Lanni, A., & Goglia, F. (2008). Metabolic effects of thyroid hormone derivatives. *Thyroid*, 18(2), 239-253. <https://doi.org/10.1089/thy.2007.0248>
- [7] 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>
- [8] Farmer, S. R. (2006). Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell metabolism*, 4(4), 263-273. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.07.001>

- [9] Koutnikova, H., Cock, T. A., Watanabe, M., Houten, S. M., Champy, M. F., Dierich, A., & Auwerx, J. (2003). Compensation by the muscle limits the metabolic consequences of lipodystrophy in PPAR γ hypomorphic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(24), 14457-14462. <https://doi.org/10.1073/pnas.2336090100>
- [10] Saito, T., Kawano, T., Saito, T., Ikoma, A., Namai, K., Tamemoto, H., ... & Ishikawa, S. E. (2005). Elevation of serum adiponectin levels in Basedow disease. *Metabolism*, 54(11), 1461-1466. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2005.05.011>
- [11] Kokkinos, A., Mourouzis, I., Kyriaki, D., Pantos, C., Katsilambros, N., & Cokkinos, D. V. (2007). Possible implications of leptin, adiponectin and ghrelin in the regulation of energy homeostasis by thyroid hormone. *Endocrine*, 32(1), 30-32. <https://doi.org/10.1007/s12020-007-9002-5>
- [12] Oliveira, M. D., SÍbio, M. T. D., Olimpio, R. M. C., Moretto, F. C. F., Luvizotto, R. D. A. M., & Nogueira, C. R. (2015). Triiodothyronine modulates the expression of leptin and adiponectin in 3T3-L1 adipocytes. *Einstein (São Paulo)*, 13(1), 72-78. <https://doi.org/10.1590/S1679-45082015AO3068>
- [13] Moeller, L. C., & Broecker-Preuss, M. (2011). Transcriptional regulation by nonclassical action of thyroid hormone. *Thyroid research*, 4(1), S6. <https://doi.org/10.1186/1756-6614-4-S1-S6>
- [14] Davis, P. J., Leonard, J. L., & Davis, F. B. (2008). Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Frontiers in neuroendocrinology*, 29(2), 211-218. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2007.09.003>
- [15] Goulart-Silva, F., Serrano-Nascimento, C., Texeira, S. S., & Nunes, M. T. (2013). Triiodothyronine (T3) induces proinsulin gene expression by activating PI3K: Possible roles for GSK-3 β and the transcriptional factor PDX-1. *Experimental and Clinical*

Endocrinology & Diabetes, 121(01), 14-19. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1327598>

[16] Whitmarsh, A. J., & Davis, R. J. (1999). Signal transduction by MAP kinases: regulation by phosphorylation-dependent switches. *Science Signaling*, 1999(1), pe1-pe1. <https://doi.org/10.1126/stke.1999.1.pe1>

[17] Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B., & Johnson, G. L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiological reviews*, 79(1), 143-180. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.1.143>

[18] Kyriakis, J. M., App, H., Zhang, X. F., Banerjee, P., Brautigan, D. L., Rapp, U. R., & Avruch, J. (1992). Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature*, 358(6385), 417. <https://doi.org/10.1038/358417a0>

[19] Alessi, D. R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D. T., & Saltiel, A. R. (1995). PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 270(46), 27489-27494. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.46.27489>

[20] Bergh, J. J., Lin, H. Y., Lansing, L., Mohamed, S. N., Davis, F. B., Mousa, S., & Davis, P. J. (2005). Integrin $\alpha V\beta 3$ contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology*, 146(7), 2864-2871. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0102>

[21] Cody, V., Davis, P. J., & Davis, F. B. (2007). Molecular modeling of the thyroid hormone interactions with $\alpha v\beta 3$ integrin. *Steroids*, 72(2), 165-170. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2006.11.008>

[22] Davis, P. J., Davis, F. B., Mousa, S. A., Luidens, M. K., & Lin, H. Y. (2011). Membrane receptor for thyroid hormone: physiologic and pharmacologic implications.

Annual review of pharmacology and toxicology, 51, 99-115.
<https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010510-100512>

[23] Lin, H. Y., Sun, M., Tang, H. Y., Lin, C., Luidens, M. K., Mousa, S. A., ... & Davis, P. J. (2009). L-Thyroxine vs. 3, 5, 3'-triiodo-L-thyronine and cell proliferation: activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 296(5), C980-C991.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00305.2008>

[24] de Oliveira, M., Luvizotto, R. D. A. M., Olimpico, R. M. C., De Sibio, M. T., Conde, S. J., Silva, C. B. R., ... & Nogueira, C. R. (2013). Triiodothyronine increases mRNA and protein leptin levels in short time in 3T3-L1 adipocytes by PI3K pathway activation. *PLoS One*, 8(9), e74856. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074856>

[25] Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *Methods*, 25(4), 402-408.
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

[26] Barra, G. B., Velasco, L. F., Pessanha, R. P., Campos, A. M., Moura, F. N., Dias, S. M., ... & Neves, F. A. (2004). Molecular mechanism of thyroid hormone action. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 48(1), 25-39.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0004-27302004000100005>

[27] Green, H., & Meuth, M. (1974). An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell*, 3(2), 127-133. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(75\)90087-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(75)90087-2)

[28] Bharali, D. J., Yalcin, M., Davis, P. J., & Mousa, S. A. (2013). Tetraiodothyroacetic acid-conjugated PLGA nanoparticles: a nanomedicine approach to treat drug-resistant breast cancer. *Nanomedicine*, 8(12), 1943-1954.
<https://doi.org/10.2217/nnm.12.200>

- [29] Davis, P. J., Goglia, F., & Leonard, J. L. (2016). Nongenomic actions of thyroid hormone. *Nature Reviews Endocrinology*, 12(2), 111. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.205>
- [30] Prusty, D., Park, B. H., Davis, K. E., & Farmer, S. R. (2002). Activation of MEK/ERK signaling promotes adipogenesis by enhancing peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) and C/EBP α gene expression during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 277(48), 46226-46232. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207776200>
- [31] Qiu, Z., Wei, Y., Chen, N., Jiang, M., Wu, J., & Liao, K. (2001). DNA synthesis and mitotic clonal expansion is not a required step for 3T3-L1 preadipocyte differentiation into adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 276(15), 11988-11995. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011729200>
- [32] Adams, M., Reginato, M. J., Shao, D., Lazar, M. A., & Chatterjee, V. K. (1997). Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor γ is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site. *Journal of Biological Chemistry*, 272(8), 5128-5132. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.8.5128>
- [33] Tanabe, Y., Koga, M., Saito, M., Matsunaga, Y., & Nakayama, K. (2004). Inhibition of adipocyte differentiation by mechanical stretching through ERK-mediated downregulation of PPAR γ 2. *Journal of cell science*, 117(16), 3605-3614. <https://doi.org/10.1242/jcs.01207>
- [34] Klieverik, L. P., Coomans, C. P., Endert, E., Sauerwein, H. P., Havekes, L. M., Voshol, P. J., ... & Fliers, E. (2009). Thyroid hormone effects on whole-body energy homeostasis and tissue-specific fatty acid uptake in vivo. *Endocrinology*, 150(12), 5639-5648. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0297>
- [35] Obregon, M. J. (2014). Adipose tissues and thyroid hormones. *Frontiers in physiology*, 5, 479. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00479>

- [36] Jiang, W., Miyamoto, T., Kakizawa, T., Sakuma, T., Nishio, S. I., Takeda, T., ... & Hashizume, K. (2004). Expression of thyroid hormone receptor alpha in 3T3-L1 adipocytes; triiodothyronine increases the expression of lipogenic enzyme and triglyceride accumulation. *Journal of endocrinology*, 182(2), 295-302. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1820295>.
- [37] 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>
- [38] Fernández-Sánchez, A., Madrigal-Santillán, E., Bautista, M., Esquivel-Soto, J., Morales-González, Á., Esquivel-Chirino, C., ... & Morales-González, J. A. (2011). Inflammation, oxidative stress, and obesity. *International journal of molecular sciences*, 12(5), 3117-3132. <https://doi.org/10.3390/ijms12053117>
- [39] Wang, Z., Dou, X., Gu, D., Shen, C., Yao, T., Nguyen, V., ... & Song, Z. (2012). Hydroxynonenal differentially regulates adiponectin gene expression and secretion via activating PPAR γ and accelerating ubiquitin–proteasome degradation. *Molecular and cellular endocrinology*, 349(2), 222-231. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.10.027>
- [40] Bjelland, S., & Seeberg, E. (2003). Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 531(1), 37-80. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.07.002>
- [41] Dizdaroglu, M., & Jaruga, P. (2012). Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free radical research*, 46(4), 382-419. <https://doi.org/10.3109/10715762.2011.653969>

- [42] Ailhaud, G., Grimaldi, P., & Négrel, R. (1994). Hormonal regulation of adipose differentiation. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 5(3), 132-136. [https://doi.org/10.1016/1043-2760\(94\)90095-7](https://doi.org/10.1016/1043-2760(94)90095-7)
- [43] Picard, F., Kurtev, M., Chung, N., Topark-Ngarm, A., Senawong, T., De Oliveira, R. M., ... & Guarente, L. (2004). Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR- γ . *Nature*, 429(6993), 771. <https://doi.org/10.1038/nature02583>
- [44] Ahmadian, M., Wang, Y., & Sul, H. S. (2010). Lipolysis in adipocytes. The international *journal of biochemistry & cell biology*, 42(5), 555-559. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.12.009>
- [45] Kobayashi, T., & Fujimori, K. (2012). Very long-chain-fatty acids enhance adipogenesis through coregulation of Elovl3 and PPAR γ in 3T3-L1 cells. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 302(12), E1461-E1471. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00623.2011>
- [46] Fasshauer, M., Klein, J., Neumann, S., Eszlinger, M., & Paschke, R. (2002). Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 290(3), 1084-1089. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.6307>
- [47] Gu, D., Wang, Z., Dou, X., Zhang, X., Li, S., Vu, L., ... & Song, Z. (2013). Inhibition of ERK1/2 pathway suppresses adiponectin secretion via accelerating protein degradation by Ubiquitin–proteasome system: Relevance to obesity-related adiponectin decline. *Metabolism*, 62(8), 1137-1148. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2013.01.025>
- [48] Combs, T. P., Pajvani, U. B., Berg, A. H., Lin, Y., Jelicks, L. A., Laplante, M., ... & Ding, Y. Y. (2004). A transgenic mouse with a deletion in the collagenous domain of adiponectin displays elevated circulating adiponectin and improved insulin sensitivity.

Endocrinology, 145(1), 367-383. <https://doi.org/10.1210/en.2003-1068>

[49] Liu, M., & Liu, F. (2012). Up-and down-regulation of adiponectin expression and multimerization: mechanisms and therapeutic implication. *Biochimie*, 94(10), 2126-2130. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.01.008>

[50] Iwaki, M., Matsuda, M., Maeda, N., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., Makishima, M., & Shimomura, I. (2003). Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes*, 52(7), 1655-1663. <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.7.1655>

[51] Soares, A. F., Guichardant, M., Cozzzone, D., Bernoud-Hubac, N., Bouzaidi-Tiali, N., Lagarde, M., & Geloën, A. (2005). Effects of oxidative stress on adiponectin secretion and lactate production in 3T3-L1 adipocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, 38(7), 882-889. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.12.010>

5.2. Manuscrito 2

Ação aguda da triiodotironina (T3) sobre a integrina $\alpha v\beta 3$ para modular a expressão gênica de leptina

Autores:

Lucas Solla Mathias¹, Bruna Moretto Rodrigues¹, Fernanda Cristina Fontes Moretto¹, Helena Tilli Paim, Maria Teresa De Sibio¹, Regiane Marques Castro Olimpio¹ Bianca Gonçalves, Igor Depra, Célia Regina Nogueira¹ e Miriane de Oliveira¹.

Afiliação:

1- Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, SP, Brasil, 18618-970.

Autor Correspondente:

Lucas Solla Mathias

Faculdade de Medicina de Botucatu, Univ Estadual Paulista - UNESP

Distrito de Rubião Jr s/n, Botucatu, SP, Brazil, 18618-000

E-mail: luu.mathias@gmail.com

Resumo

Introdução: O hormônio triiodotironina (T3), atua sobre o tecido adiposo (TA), consequentemente afetando a síntese de leptina, proteína relacionada a regulação do apetite e do gasto energético. Sabe-se que o T3 modula a leptina por ativação da via PI3K, contudo ele pode desencadear ações por ativação de outras vias extranucleares, como a MAPK/ERK e integrina $\alpha\text{V}\beta 3$. **Objetivo:** Avaliar ação do T3 sobre a expressão gênica de leptina, por meio das vias MAPK/ERK e integrina $\alpha\text{V}\beta 3$, em cultura de adipócitos 3T3-L1. **Métodos:** Adipócitos 3T3-L1, foram tratados com dose de T3 (10nM) por uma hora, na ausência ou presença dos inibidores de MAPK/ERK– PD98059 (PD, 50uM) e da integrina $\alpha\text{V}\beta 3$ (ácido tetra-iodo-tiro-ácetico – Tetrac, 10^{-4}M). A ausência de qualquer tratamento foi considerada controle (C). Após o período de tratamento foi realizado PCRq-RT e Western Blot para analisar a expressão gênica e proteica, respectivamente, de leptina, além da quantificação do acúmulo lipídico, realizada pelo ensaio *AdipoRed*. **Resultados:** T3 elevou a expressão de mRNA de leptina ($1,36 \pm 0,06$, $p < 0,01$) com relação ao C ($1 \pm 0,05$), este aumento foi anulado pelo Tetrac, no grupo Tetrac+T3 ($0,83 \pm 0,08$, $p < 0,01$). O Western blotting confirmou estes resultados, ao nível da proteína, indicando a importância da ativação da integrina $\alpha\text{V}\beta 3$ pelo T3. A presença de PD98059 não afetou a ação do T3, indicando que a via da MAPK/ERK não é ativada por ele, para modulação da leptina. Embora o hormônio não tenha alterado o acúmulo lipídico, em relação ao C, os grupos PD+T3 e Tetrac+T3, apresentaram menor quantidade de lipídeos, quando comparados ao T3. **Conclusão:** T3 age nos adipócitos por meio da integrina $\alpha\text{V}\beta 3$, ativando a via PI3K, para alterar a expressão gênica de leptina. Além disso, a integridade da via MAPK/ERK é necessária para que o T3 não altere o perfil

lipídico, mantendo a homeostase dos adipócitos.

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

1. Introdução

O tecido adiposo (TA) é constituído, sobretudo por adipócitos, que apresentam em seu interior gotículas lipídicas, que armazenam energia na forma de triacilglicerol (TGL), constituído por três moléculas de ácidos graxos e uma molécula de glicerol, além de inúmeras proteínas (1). O TA, principalmente o TA branco (TAB), possui intensa atividade metabólica, sendo considerado um importante órgão endócrino, que regula o metabolismo do organismo, por meio de produção e secreção de adipocinas (2,3), dentre elas a leptina, que é uma proteína relacionada à regulação do apetite e do gasto energético pelo organismo via sistema nervoso central, e sua disponibilidade está relacionada diretamente a quantidade e tamanho dos adipócitos no TA (4).

O TA está sujeito ação da triiodotironina (T3), hormônio tiroideano (HT) que age sobre seu desenvolvimento e metabolismo, modulando a proliferação e diferenciação de adipócitos (5,6). E, de acordo literatura, o estado tireoidiano pode regular a produção de leptina, apesar de existirem divergências (7-9). Estudos anteriores de nosso grupo, demonstraram que diferentes doses de T3, em diferentes tempos, modulam a expressão de mRNA de adipocinas, demonstrando rápida ação do hormônio (10). Além disso, diversos estudos tem constatado que o T3, pode ativar vias extranucleares modulando a expressão gênica (2, 5, 11), neste caso, as repostas são desencadeadas por meio de sítio de iniciação na membrana plasmática ou no citoplasma, ativando vias de sinalização citoplasmática em tempo curto, promovendo a modulação da expressão gênica (12-15). Dentre as vias extranucleares estão, a via MAPK/ERK e a integrina $\alpha V\beta 3$.

Na via citoplasmática da MAPK, ocorrem fosforilação de quinases gerando

sinais que irão ativar outras quinases (16). Dentre as principais MAPKs identificadas em mamíferos temos a via da quinase regulada extracelularmente (ERK) (17), sendo sub-dividida em: MAPK/ERK 1/2, MAPK/ERK 5 e as MAPK/ERK 3/4. A via da MAPK/ERK 1/2 atua regulando o ciclo e a proliferação celular (18). A via ERK apresenta a isoforma Raf-1 e isoformas MEK 1/2 (19). Sendo que, as MEKs são fosforiladas pelas proteínas Raf-1 (20). Sabe-se que as isoformas MEK1/2 são estimuladores de ERK1/2 e são inibidas pelo PD98059, portanto sua inibição evita a atividade da via MAPK/ERK 1/2 (21). A integrina $\alpha\text{V}\beta 3$ foi identificada por Bergh *et al.* 2005 (22), como sendo o receptor de membrana para os HT, que apresenta duas subunidades de ligação ao hormônio, a S1 (ou β), que se liga somente ao T3 e ativa, por meio da cinase Src, a enzima PI3K. E a S2 (ou α), que se liga preferencialmente ao T4 e ativa a via da MAPK/ERK1/2 (23,24). De acordo com a literatura, existe um produto fisiológico do metabolismo T4, denominado ácido tetraiodotiroacético (Tetrac) (5), que impede a ligação dos HT com a integrina $\alpha\text{V}\beta 3$, inibindo ambos os sítios, S1 e S2 (25).

Em estudo anterior, nosso grupo demonstrou que a via citoplasmática fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), está envolvida na modulação da leptina pelo T3 (26), sabendo-se que o hormônio pode agir por outras vias, num curto período de tempo, para desencadear seus efeitos, e seu importante papel sobre o TA e adipocinas, justifica-se verificar se há a participação de outras vias extranucleares, sendo ativadas rapidamente pelo T3, para modular a expressão de leptina, tão importante para regulação metabólica do organismo. Desta forma, o objetivo do trabalho foi avaliar a ação aguda do T3, por meio das vias MAPK/ERK e integrina $\alpha\text{V}\beta 3$, na modulação da expressão de mRNA e proteica de leptina, em cultura de

adipócitos 3T3-L1.

2. Material e Métodos

2.1. Reagentes

Meio RPMI 1640 (RPMI), Soro Fetal Bovino (SFB) and antibiótico-antimicótico solução de 100X comprados pela Gibco BRL (Grand Island, NY, USA), 1-metil-3-isobutilxantina (IBMX), dexametasona (DEXA), insulina, triiodotironina (T3), PD98059 (PD), ácido tetra-iodo-tiro-ácetico (TETRAC), sulfóxido de dimetilo (DMSO), hidróxido de sódio (NaOH), e SFB carvão foram comprados pela Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA), policlonal de rato anti-leptina 1:5000 (Abcam, Cambridge, UK, AB9749), anticorpo monoclonal de rato anti-GAPDH 1:1000 (Abcam, Cambridge, UK, AB9749. AB97069)

2.2. Cultura de células e diferenciação

O protocolo experimental foi aprovado pelo comitê de Ética em estudos animais da Faculdade de Medicina de Botucatu- UNESP, sob o número: 959-2012. Para o estudo *in vitro* foi utilizada a linhagem celular de pré-adipócitos derivados de camundongos (3T3-L1), obtidos pelo banco de células da Unipex (Botucatu, SP, Brasil) foram cultivadas em placas, a uma temperatura de 37°C com meio RPMI (Gibco®) suplementado com 2,5g D-glucose, 0,11g Piruvato, 3,7g Bicarbonato de sódio, 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco®), 1% antibiótico/antimicótico (Sigma®), sob uma atmosfera de 5% de CO₂. As células foram mantidas em cultura nessas condições até atingirem a confluência de aproximadamente 100% (designado dia 0). As células foram submetidas ao processo de diferenciação,

permanecendo três dias em meio RPMI, contendo 10% de SFB, 100 mM de 1-metil-3-isobutilxantina (IBMX) (Sigma®), 1mM de dexametasona (Sigma®) e 5mg/L de insulina (Sigma®). Após esse período, as células foram incubadas em meio RPMI contendo, 10% de SFB e 5 mg/ml de insulina por sete dias. Após o período de diferenciação celular os adipócitos foram submetidos à depleção do HT por 36h com meio RPMI suplementado com soro fetal Charcoal Stripped (Sigma®). Após a depleção do HT as células foram submetidas aos tratamentos com PD98059 (50uM) – inibidor da MAPK/ERK (27) e Tetrac (10^{-4} M e 10^{-5} M) – inibidor da integrina $\alpha V\beta 3$, durante 1h e posteriormente tratadas com T3 (10 nM) por mais uma hora (1h) (26, 28). O grupo não tratado com T3 foi usado como controle (C). Desta forma, formaram-se os seguintes grupos: C, T3, PD+T3 and TETRAC+T3.

2.3. Ensaio MTT

O ensaio MTT, tem como finalidade verificar a viabilidade celular. Desta forma, as células foram incubadas por 4 h com 0,8 mg/ml de MTT, dissolvido em meio RPMI, não suplementado. Posteriormente foram lavadas com PBS, e adicionado DMSO por 5 minutos. As placas foram lidas com absorbância de 560nm, no leitor de placas da Synergy HT (Biotek, Instruments, Winooski, VT, USA). Os resultados foram analisados e são apresentados como porcentagem do valores de controle.

2.4. Ensaio *AdipoRed*

Após a diferenciação e tratamento, para confirmar a diferenciação e verificar os efeitos dos tratamentos, foi realizado ensaio *AdipoRed*, para isso foi utilizado o kit de ensaio de *AdipoRed* (Lonza, Walkersville, MD, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Os adipócitos foram incubados por 10 minutos na

presença do reagente em temperatura ambiente, afim de corar os adipócitos. As placas foram lidas em excitação de 485 nm, no leitor de placas da Synergy HT (Biotek, Instruments, Winooski, VT, USA), e a fluorescência foi quantificada a 572 nm.

2.5. Expressão de mRNA

O RNA total foi extraído a partir de células 3T3-L1, conforme descrito anteriormente (26) usando o reagente TRIzol® (Invitrogen®), de acordo com as instruções do fabricante. O *kit* High Capacity cDNA de transcrição reversa para reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR, Invitrogen®, São Paulo, Brasil), foi utilizado para a síntese de 20µL de DNA complementar (cDNA) a partir de 1.000ng de RNA total.

O níveis de leptina (ensaio Mm00434759_ m1-Applied Biosystems foram analisadas por PCR em tempo real (RT-PCR). As análises foram realizadas no *Applied Biosystems StepOne Plus*, que é um sistema de detecção que utiliza o *kit* TaqMan qPCR comercial (Invitrogen®) de acordo com as instruções do fabricante. As condições de amplificação foram: ativação da enzima a 50°C durante 2 minutos; desnaturação a 95°C durante 10 minutos; os produtos de cDNA foram amplificados por 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 15 segundos; e anelamento/extensão a 60°C por 1 minuto.

Após a normalização com o controle endógeno, ciclofilina (ensaio Mm00434759_m1)(26) pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, como previamente descrito (29), a expressão de mRNA da leptina foi avaliada em relação aos valores do grupo C em comparação aos tratados.

2.6. Expressão Proteica

Após o tratamento descritos anteriormente, foi realizada a extração proteica conforme descrito anteriormente (26). As células foram lavadas duas vezes com PBS gelado e lisadas com 100ul de tampão de lise, inibidor de fosfatase e protease, contendo Tris 500mM (pH 8), 150mM de NaCl, 1% de Triton X-100, 10%, 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS), e 0,5% de desoxicolato. O homogeneizado foi centrifugado a 4°C durante 20 minutos a 12000rpm. O sobrenadante foi recolhido e o conteúdo total de proteína foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. As amostras contendo 25 ug de proteína foram submetidas a eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida a 15% (SDS-PAGE). Após a eletroforese, as proteínas foram electro-transferidas para membrana de nitrocelulose usando um sistema de transferência semi-seco (BioRad Biosciences; NJ, USC). A membrana foi então bloqueada com 5% de BSA em solução salino tamponado Tris (TBS) com 0,1% de Tween-20 (T) durante 1h à temperatura ambiente (TA) e incubadas com anticorpos específicos overnight à 4°C. Os anticorpos primários utilizados foram policlonal de rato anti-leptina 1:5000 (Abcam, Cambridge, UK, AB9749), monoclonal de rato anti-GAPDH 1:1000 (Abcam, Cambridge, UK, AB9749. AB97069). Após o período de incubação com os anticorpos primários incubou-se com secundário anti-mouse ou anti-rabbit em 5% de BSA em TBS-T durante 1h em TA, as bandas foram marcadas utilizando o SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate kit (Pierce) e expostas a Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences). A análise quantitativa de imagens de imunotransferência foi realizada utilizando o equipamento Gel Logic (6000 PRO) com software Carestream MI. Os resultados são apresentados como a razão entre a

proteína alvo e GAPDH.

2.7. Análise Estatística

Foi utilizado o teste de normalidade de shapiro-wilk, para verificar a normalidade dos dados. Dados com normalidade foram analisados por meio da análise de variância paramétrica ANOVA two-way, complementada com o teste de Tukey. Neste caso, os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Dados com ausência de normalidade foram analisados por meio do teste de Friedman, complementado pelo teste de Dunn. Neste caso, os resultado foram expressos como mediana (IQ 25% - 75%). A significancia foi dada para $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Avaliação da viabilidade celular na presença dos tratamentos com os inibidores PD98059 e Tetrac, associados ou não ao T3.

O tratamento, conforme mostra Figura 1, com exceção do Tetrac 10^{-5} +T3, demonstraram manter a viabilidade celular superior a 80%, permitindo classificá-la como não citotóxica. Foram testadas duas doses do inibidor Tetrac, 10^{-4} M e 10^{-5} M, e uma dose do inibidor PD, 50uM. Observamos que apenas o grupo Tetrac 10^{-5} +T3 [57,5 (55,3 – 59,7)] apresentou diminuição significativa em relação ao C [105,2 (95,8 – 106,8)] (Figura 1), desta forma, utilizamos apenas a dose de tetrac 10^{-4} M ao longo do experimento.

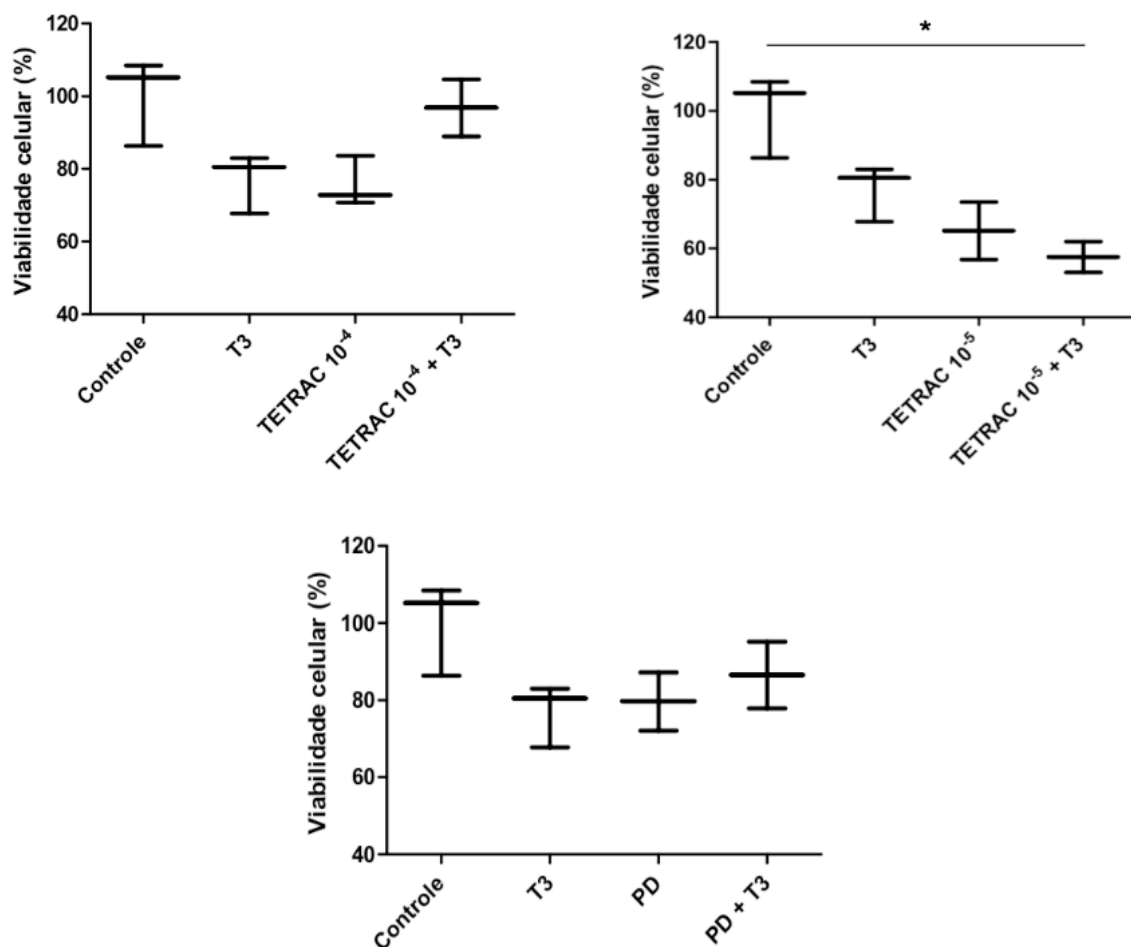


Figura 1. Viabilidade Celular. A) Teste de MTT para o inibidor PD. B) Teste de MTT para o inibidor Tetrac, na dose 10^{-4} M. C) Teste de MTT para o inibidor Tetrac, na dose 10^{-5} M. T3= 10 nM T3, PD= 50uM PD98059, TETRAC 10^{-4} = 10^{-4} M de ácido tetra-iodo-tiro-ácetico (TETRAC), TETRAC 10^{-5} = 10^{-5} M de ácido tetra-iodo-tiro-ácetico (TETRAC)C= ausencia de tratamento. Dados expressos em mediana (IQ 25%-75%) (Friedman complementado pelo teste de Dunn); n = 3 em cada tratamento. *p<0,01

3.2. PD e Tetrac atuam na inibição da fosforilação de ERK

Para confirmar a inibição das vias, verificamos a fosforilação das quinases que fazem parte a cascata de sinalização das vias extranucleares do estudo. A

pERK, da via MAPK/ERK e a pAKT, da via PI3K/AKT, vias que podem ser ativadas pela integrina $\alpha V\beta 3$. Observamos que os inibidores PD ($0,55 \pm 0,06$, $p > 0,01$) e Tetrac ($0,56 \pm 0,05$, $p < 0,01$), diminuíram a pERK, em relação ao C ($1 \pm 0,06$, $p < 0,01$), porém não apresentaram diferenças significativas na expressão de pAKT (Figura 2).

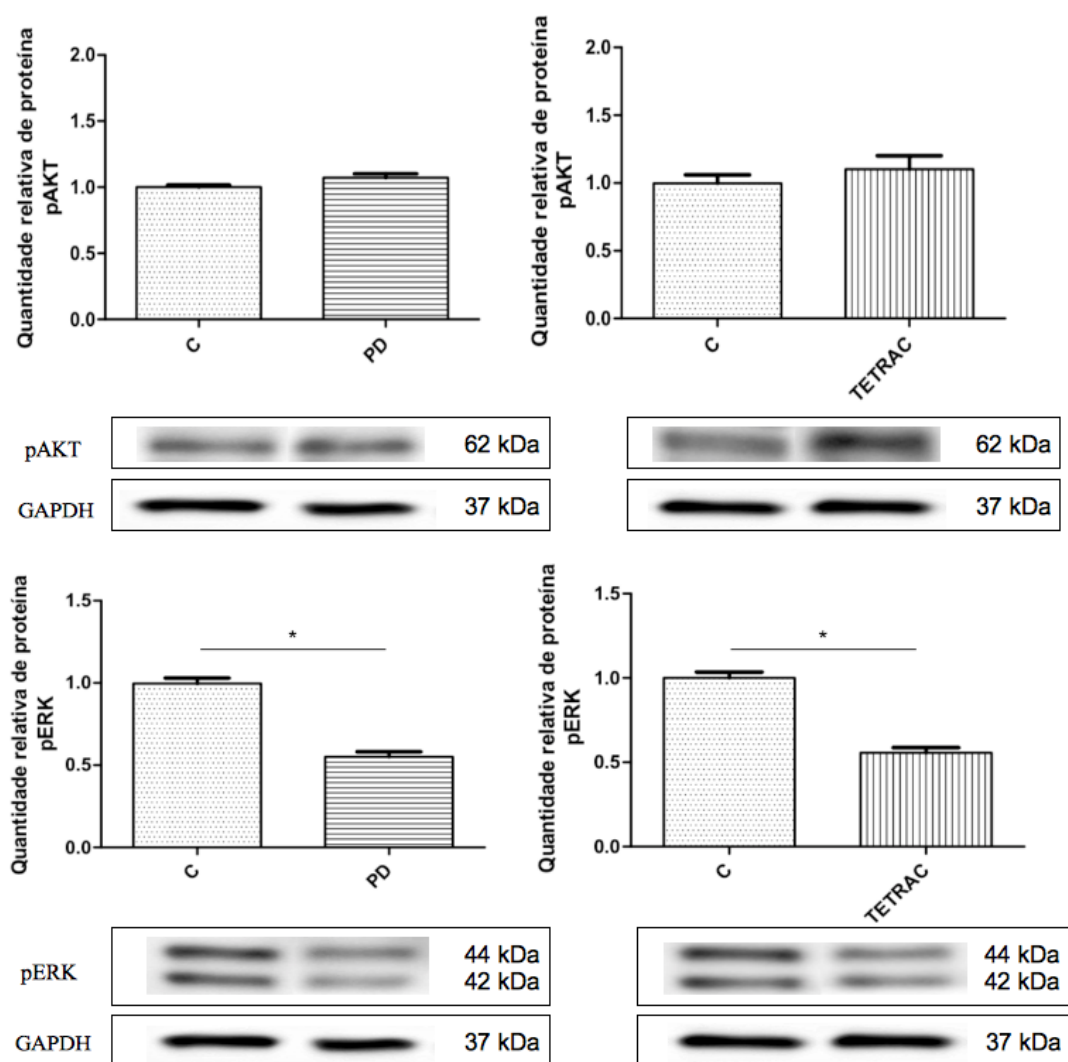


Figura 2. Expressão proteica de pERK e pAKT. A) Expressão proteica de pAKT na presença do inibidor PD. B) Expressão proteica de pAKT na presença do inibidor Tetrac C) Expressão proteica de pERK na presença do inibidor PD D) Expressão proteica de pERK na presença do inibidor Tetrac. PD= 50uM PD98059, TETRAC 10^{-4} = 10^{-4} M de ácido tetra-iodo-tiro-ácetico (TETRAC), C= ausencia

de tratamento. Dados expressos em Média $\pm$ desvio padrão (ANOVA complementada pelo teste de Tukey); n = 3 em cada tratamento. *p<0,01

3.3. Inibição das vias associada ao tratamento com T3 diminui acúmulo lipídico

A presença do T3 não alterou o acúmulo lipídico (Figura 3), contudo verificou-se que nos grupos PD+T3 (12366 ± 608 , p<0,01) e Tetrac+T3 (11507 ± 206 , p<0,01), ocorreu diminuição significativa em relação ao T3 (16485 ± 810 , p<0,01).

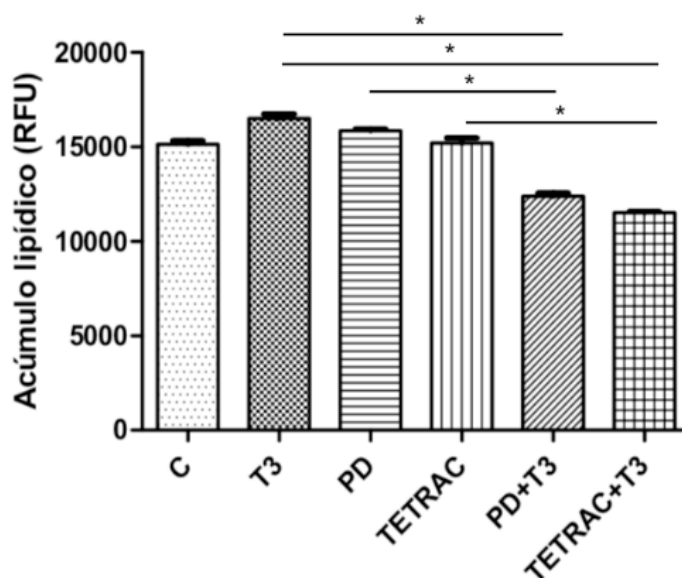


Figura 3. Ação do T3 na ativação das vias extranucleares, MAPK/ERK e integrina $\alpha V\beta 3$ sobre o acúmulo lipídico. T3= 10 nM T3, PD= 50uM PD98059, TETRAC= 10^{-4} M de ácido tetra-iodo-tiro-ácetico (TETRAC), C= ausência de tratamento. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão (ANOVA complementado pelo teste de Tukey); n = 3 em cada tratamento. *p<0,01

3.4. T3 ativa a via integrina $\alpha\text{V}\beta 3$ para elevar a expressão gênica de leptina

Observamos que, no grupo T3, houve aumento da expressão de mRNA e proteína de leptina, em relação ao C (Figura 4). Porém, no Tetrac+T3, ocorreu diminuição do mRNA e proteína de leptina ($0,83 \pm 0,08$, $p < 0,01$; $1 \pm 0,08$, $p < 0,01$, respectivamente), em relação a estimulação positiva do T3 (Figura 4C e 4D). Com relação ao PD+T3 ($2,28 \pm 0,4$, $p < 0,01$), a expressão proteica de leptina foi igual ao grupo T3 ($1,94 \pm 0,7$, $p < 0,05$) e maior que o C ($1 \pm 0,02$, $p < 0,01$) (Figura 4B).

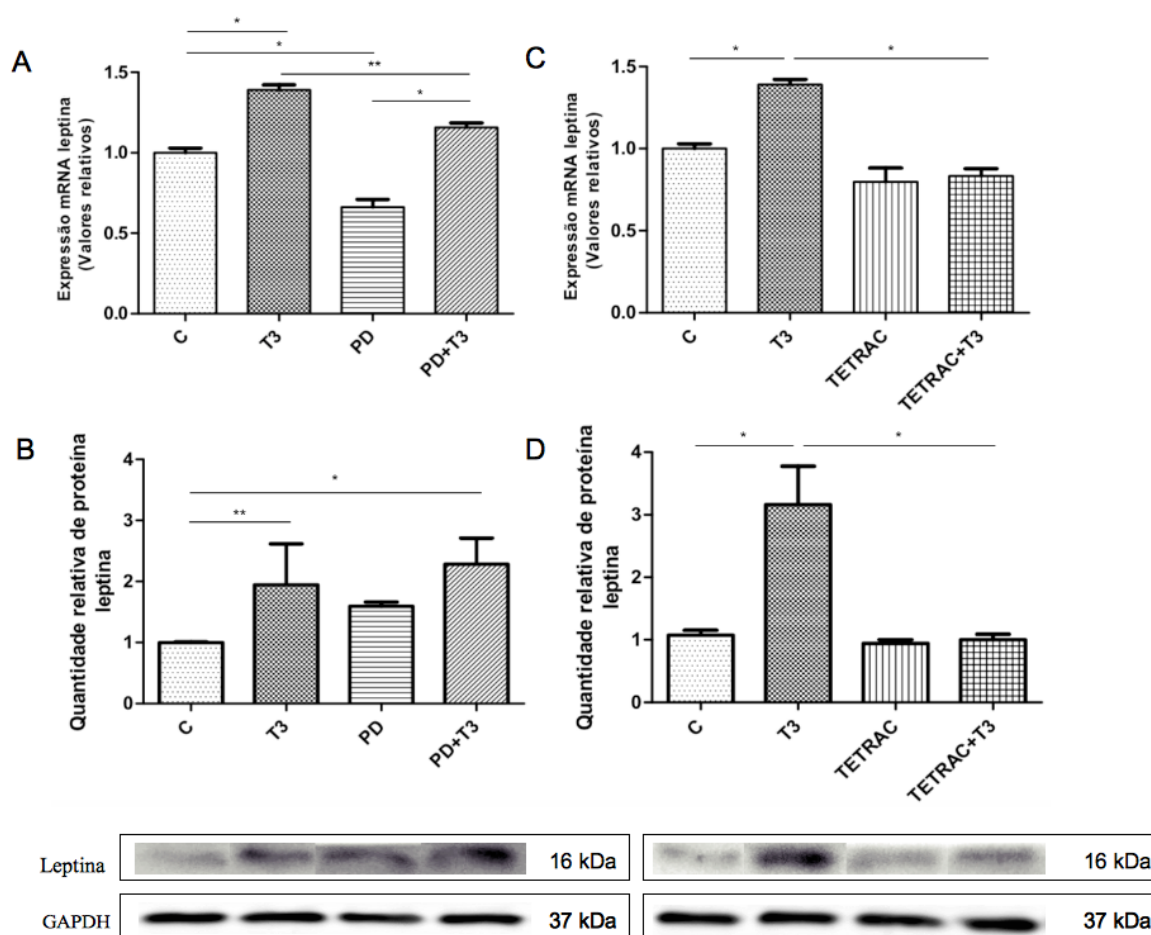


Figura 4. Efeitos do T3 por meio das vias MAPK/ERK e integrina $\alpha\text{V}\beta 3$ sobre a expressão de mRNA e proteica de leptina. A) Ação do T3 pela via MAPK/ERK na expressão de mRNA de leptina.

B) Ação do T3 pela via MAPK/ERK na expressão proteica de leptina. C) Ação do T3 pela via integrina $\alpha\text{V}\beta 3$ na expressão de mRNA de leptina. D) Ação do T3 pela via integrina $\alpha\text{V}\beta 3$ na expressão proteica de leptina. T3= 10 nM T3, PD= 50uM PD98059, TETRAC= 10^{-4} M de ácido tetra-iodo-tiro-ácetico (TETRAC), C= ausência de tratamento. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão (ANOVA complementado pelo teste de Tukey); n = 3 em cada tratamento. *p<0,01 e **p<0,05

4. Discussão

O hormônio leptina, sintetizado e secretado pelos adipócitos, é uma componente crucial que controla o peso corporal e a homeostase energética (30,31,32), assim como a leptina, o T3 também está envolvido no balanço energético (33). Em estudos anteriores do nosso grupo, bem como no presente estudo, demonstrou-se que o T3 eleva os níveis de leptina, em cultura celular de adipócitos murinos (26)

O T3 pode modular a expressão gênica por mecanismos extranucleares, com locais de iniciação na membrana plasmática, como a ativação da integrina $\alpha\text{V}\beta 3$, ou no citoplasma, onde o T3 ativa a MAPK ou a via PI3K (12). Em estudos prévios, constatamos a participação da via PI3K na modulação da leptina pelo T3, contudo, não se avaliou a participação das outras vias extranucleares. Com isso, o atual estudo objetivou determinar a participação da via integrina $\alpha\text{V}\beta 3$ e MAPK/ERK na modulação da leptina pelo T3.

De acordo com nossos resultados, apesar de a literatura demonstrar que o inibidor Tetrac atua nas duas subunidades da integrina $\alpha\text{V}\beta 3$, S1 e S2 (34,35). Em nosso trabalho, a dose de Tetrac utilizada (10^{-4} M), no tempo de uma hora, não foi suficiente para inibir a fosforilação da AKT, quinase de nível terminal da via PI3K, que é ativada pelo S1 da integrina. Desta forma, constatamos que o inibidor atuou

apenas no S2, o qual ativa a via da MAPK/ERK. Enquanto o inibidor PD, assim como a literatura demonstra (36), atuou inibindo a MEK, ativador direto da fosforilação de ERK, inibindo a via da MAPK/ERK.

Constatamos que a inibição das vias extranucleares não causou modificação no acúmulo lipídico. E, embora o T3 possa agir na proliferação e diferenciação dos adipócitos, elevando o acúmulo de lipídeos (37,38), em nosso estudo o hormônio não alterou esse parâmetro, provavelmente devido a concentração utilizada que apenas mantém o acúmulo apropriado dos lipídeos, e pelo curto tempo de tratamento. Porém, quando as vias foram inibidas e posteriormente tratadas com o T3 (PD+T3 e Tetrac+T3, respectivamente), a presença do hormônio reduziu o acúmulo lipídico. Desta forma, podemos considerar que o T3 nessa dose, deve ativar a via MAPK/ERK, no citoplasma e/ou pela integrina $\alpha V\beta 3$ para manter a homeostase lipídica.

Nosso trabalho corrobora com resultados já estabelecidos na literatura, que o T3 aumenta a expressão de mRNA e proteica de leptina (26, 28). Com a utilização do inibidor PD, inibidor da via MAPK/ERK (36), houve diminuição da expressão de mRNA, porém, a presença do T3 (PD+T3) aumentou a expressão gênica da adipocina, demonstrando que o hormônio não ativa a via MAPK/ERK para modular esse gene. Já com a inibição do sítio S2 da integrina $\alpha V\beta 3$, pelo Tetrac, ocorreu diminuição da expressão gênica de leptina, e o tratamento com T3 associado (Tetrac+T3) não foi capaz de elevar a expressão dessa adipocina. Desta forma, a ligação do T3 a integrina $\alpha V\beta 3$ se faz necessária para modulação da expressão de leptina.

Alguns trabalhos demonstram que a inibição de MEK/ERK pode levar à

ativação da PI3K (39). Pois, embora no tecido adiposo não existam estudos que demonstrem, o *cross-talk* entre as vias extranucleares, muitos estudos demonstram sua ocorrência, entre MAPK/ERK e a PI3K/AKT, e que a ativação de uma via pode influenciar o caminho da outra, através de várias rotas de interação (39,40), por exemplo, a associação FAK-Src, com a proteína adaptadora Grb2, representa um mecanismo para a ativação da ERK (41), e FAK pode ativar diretamente o PI3K (42). Desta forma, podemos considerar que a inibição do PD, no nível terminal da via MAPK/ERK, não impediu a ligação do T3 as subunidades da integrina $\alpha V\beta 3$, culminando na ativação da PI3K, pelo S1 e pelo S2, por meio do *cross-talk* existente. Porém, ao inibirmos o S2 da integrina $\alpha V\beta 3$, com Tetrac, o T3 passou a ativar a via PI3K apenas pelo S1, havendo portanto uma diminuição na expressão de mRNA e proteica de leptina.

Desta forma, de acordo com nossos resultados, podemos considerar que o hormônio atua por meio de sua ligação com as subunidades da integrina $\alpha V\beta 3$, ativando a via da PI3K, para modulação da expressão gênica de leptina. Resultado que corrobora com trabalho anterior de nosso grupo (26), em que foi utilizado inibidor da via PI3K, LY294002, e observou-se que o T3 tem ação direta, na ativação da via, para aumento da expressão gênica de leptina. Assim como, Lu *et al.* 2018 (43) demonstraram que o tratamento com SC-3036, ativador da via PI3K, aumenta a expressão proteica de Leptina. Além de diversos estudos na literatura, que demonstram a necessidade de ativação da via PI3K para ação da leptina (44,45). Desta forma, concluímos que a ligação do T3 a integrina $\alpha V\beta 3$, é importante para que ocorra expressão apropriada da leptina.

5. Referencias

1. Brasaemle, D. L. (2007). Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *Journal of lipid research*, 48(12), 2547-2559.
2. Hwang, C. S., Loftus, T. M., Mandrup, S., & Lane, M. D. (1997). Adipocyte differentiation and leptin expression. *Annual review of cell and developmental biology*, 13(1), 231-259.
3. Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y. A., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., ... & Eto, K. (2002). Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature medicine*, 8(11), 1288.
4. Carvalho, M. H. C. D., Colaço, A. L., & Fortes, Z. B. (2006). Citocinas, disfunção endotelial e resistência à insulina. *Arq. bras. endocrinol. Metab*, 50(2), 304-312.
5. Moreno, M., de Lange, P., Lombardi, A., Silvestri, E., Lanni, A., & Goglia, F. (2008). Metabolic effects of thyroid hormone derivatives. *Thyroid*, 18(2), 239-253.
6. Santini, F., Marsili, A., Mammoli, C., Valeriano, R., Scartabelli, G., Pelosini, C., ... & Pinchera, A. (2004). Serum concentrations of adiponectin and leptin in patients with thyroid dysfunctions. *Journal of endocrinological investigation*, 27(2), RC5-RC7.
7. Yaturu, S., Prado, S., & Grimes, S. R. (2004). Changes in adipocyte hormones leptin, resistin, and adiponectin in thyroid dysfunction. *Journal of cellular biochemistry*, 93(3), 491-496.
8. Saito, T., Kawano, T., Saito, T., Ikoma, A., Namai, K., Tamemoto, H., ... & Ishikawa, S. E. (2005). Elevation of serum adiponectin levels in Basedow disease. *Metabolism*, 54(11), 1461-1466.
9. Kokkinos, A., Mourouzis, I., Kyriaki, D., Pantos, C., Katsilambros, N., & Cokkinos,

D. V. (2007). Possible implications of leptin, adiponectin and ghrelin in the regulation of energy homeostasis by thyroid hormone. *Endocrine*, 32(1), 30-32.

10. Oliveira, M. D., SÍbio, M. T. D., Olimpio, R. M. C., Moretto, F. C. F., Luvizotto, R. D. A. M., & Nogueira, C. R. (2015). Triiodothyronine modulates the expression of leptin and adiponectin in 3T3-L1 adipocytes. *Einstein (Sao Paulo)*, 13(1), 72-78.

11. Mezosi, E., Szabo, J., Nagy, E. V., Borbely, A., Varga, E., Paragh, G., & Varga, Z. (2005). Nongenomic effect of thyroid hormone on free-radical production in human polymorphonuclear leukocytes. *Journal of endocrinology*, 185(1), 121-129.

12. Moeller, L. C., & Broecker-Preuss, M. (2011). Transcriptional regulation by nonclassical action of thyroid hormone. *Thyroid research*, 4(1), S6.

13. Davis, P. J., Leonard, J. L., & Davis, F. B. (2008). Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Frontiers in neuroendocrinology*, 29(2), 211-218.

14. Goulart-Silva, F., Serrano-Nascimento, C., Texeira, S. S., & Nunes, M. T. (2013). Triiodothyronine (T3) induces proinsulin gene expression by activating PI3K: Possible roles for GSK-3 β and the transcriptional factor PDX-1. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 121(01), 14-19.

15. Moeller, L. C., Cao, X., Dumitrescu, A. M., Seo, H., & Refetoff, S. (2006). Thyroid hormone mediated changes in gene expression can be initiated by cytosolic action of the thyroid hormone receptor β through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Nuclear receptor signaling*, 4(1), nrs-04020.

16. Whitmarsh, A. J., & Davis, R. J. (1999). Signal transduction by MAP kinases: regulation by phosphorylation-dependent switches. *Science Signaling*, 1999(1), pe1-pe1.

17. Yue, T. L., Wang, C., Gu, J. L., Ma, X. L., Kumar, S., Lee, J. C., ... & Ohlstein, E.

H. (2000). Inhibition of extracellular signal-regulated kinase enhances ischemia/reoxygenation-induced apoptosis in cultured cardiac myocytes and exaggerates reperfusion injury in isolated perfused heart. *Circulation research*, 86(6), 692-699.

18. Johnson, G. L., & Lapadat, R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*, 298(5600), 1911-1912.

19. Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B., & Johnson, G. L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiological reviews*, 79(1), 143-180.

20. Kyriakis, J. M., App, H., Zhang, X. F., Banerjee, P., Brautigan, D. L., Rapp, U. R., & Avruch, J. (1992). Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature*, 358(6385), 417.

21. Alessi, D. R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D. T., & Saltiel, A. R. (1995). PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 270(46), 27489-27494.

22. Bergh, J. J., Lin, H. Y., Lansing, L., Mohamed, S. N., Davis, F. B., Mousa, S., & Davis, P. J. (2005). Integrin $\alpha V\beta 3$ contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology*, 146(7), 2864-2871.

23. Davis, P. J., Goglia, F., & Leonard, J. L. (2016). Nongenomic actions of thyroid hormone. *Nature Reviews Endocrinology*, 12(2), 111.

24. Davis, P. J., Davis, F. B., Mousa, S. A., Luidens, M. K., & Lin, H. Y. (2011). Membrane receptor for thyroid hormone: physiologic and pharmacologic implications. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 51, 99-115.

25. Bharali, D. J., Yalcin, M., Davis, P. J., & Mousa, S. A. (2013). Tetraiodothyroacetic

acid-conjugated PLGA nanoparticles: a nanomedicine approach to treat drug-resistant breast cancer. *Nanomedicine*, 8(12), 1943-1954.

26. de Oliveira, M., Luvizotto, R. D. A. M., Olimpio, R. M. C., De Sibio, M. T., Conde, S. J., Silva, C. B. R., ... & Nogueira, C. R. (2013). Triiodothyronine increases mRNA and protein leptin levels in short time in 3T3-L1 adipocytes by PI3K pathway activation. *PLoS One*, 8(9), e74856

27. Moeller, L. C., Dumitrescu, A. M., & Refetoff, S. (2005). Cytosolic action of thyroid hormone leads to induction of hypoxia-inducible factor-1 α and glycolytic genes. *Molecular Endocrinology*, 19(12), 2955-2963.

28. Yoshida, T., Monkawa, T., Hayashi, M., & Saruta, T. (1997). Regulation of expression of leptin mRNA and secretion of leptin by thyroid hormone in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 232(3), 822-826.

29. Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402-408.

30. Schwartz, M. W. (2006). Central nervous system regulation of food intake. *Obesity*, 14(S2), 1S-8S.

31. Williams, K. W., Scott, M. M., & Elmquist, J. K. (2009). From observation to experimentation: leptin action in the mediobasal hypothalamus. *The American journal of clinical nutrition*, 89(3), 985S-990S.

32. Simpson, K. A., Martin, N. M., & R Bloom, S. (2009). Hypothalamic regulation of food intake and clinical therapeutic applications. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 53(2), 120-128.

33. Vendrell, J., Broch, M., Vilarrasa, N., Molina, A., Gómez, J. M., Gutiérrez, C., ... & Richart, C. (2004). Resistin, adiponectin, ghrelin, leptin, and proinflammatory

cytokines: relationships in obesity. *Obesity research*, 12(6), 962-971.

34. Lin, H. Y., Sun, M., Tang, H. Y., Lin, C., Luidens, M. K., Mousa, S. A., ... & Davis, P. J. (2009). L-Thyroxine vs. 3, 5, 3'-triiodo-L-thyronine and cell proliferation: activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 296(5), C980-C991.

35. Bharali, D. J., Yalcin, M., Davis, P. J., & Mousa, S. A. (2013). Tetraiodothyroacetic acid-conjugated PLGA nanoparticles: a nanomedicine approach to treat drug-resistant breast cancer. *Nanomedicine*, 8(12), 1943-1954.

37. Klieverik, L. P., Coomans, C. P., Endert, E., Sauerwein, H. P., Havekes, L. M., Voshol, P. J., ... & Fliers, E. (2009). Thyroid hormone effects on whole-body energy homeostasis and tissue-specific fatty acid uptake in vivo. *Endocrinology*, 150(12), 5639-5648.

38. Obregon, M. J. (2014). Adipose tissues and thyroid hormones. *Frontiers in physiology*, 5, 479.

39. Won, J. K., Yang, H. W., Shin, S. Y., Lee, J. H., Heo, W. D., & Cho, K. H. (2012). The crossregulation between ERK and PI3K signaling pathways determines the tumoricidal efficacy of MEK inhibitor. *Journal of molecular cell biology*, 4(3), 153-163.

40. Dammann, K., Khare, V., & Gasche, C. (2014). Republished: Tracing PAKs from GI inflammation to cancer. *Postgraduate medical journal*, 90(1069), 657-668.

41. Schlaepfer, D. D., Hanks, S. K., Hunter, T., & van der Geer, P. (1994). Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature*, 372(6508), 786.

42. Chen, H. C., & Guan, J. L. (1994). Association of focal adhesion kinase with its potential substrate phosphatidylinositol 3-kinase. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences, 91(21), 10148-10152.

43. Lu, Y., Chen, J., Xian, T., Zhou, Y., Yuan, W., Wang, M., ... & Yu, X. (2018). Epigallocatechin-3-gallate suppresses differentiation of adipocytes via regulating the phosphorylation of FOXO1 mediated by PI3K-AKT signaling in 3T3-L1 cells. *Oncotarget*, 9(7), 7411.

44. Niswender, K. D., Baskin, D. G., & Schwartz, M. W. (2004). Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 15(8), 362-369.

45. Xu, A. W., Kaelin, C. B., Takeda, K., Akira, S., Schwartz, M. W., & Barsh, G. S. (2005). PI3K integrates the action of insulin and leptin on hypothalamic neurons. *The Journal of clinical investigation*, 115(4), 951-958.

6. Considerações finais

A partir dos dois artigos apresentados, observamos que:

- O T3 age nos adipócitos por meio da via MAPK/ERK para elevar a expressão proteica de adiponectina
- Ligação do T3 a integrina eleva a expressão de mRNA e proteica de leptina
- Inibição da MAPK/ERK associada ao tratamento com T3 apresentou menor dano de DNA.
- Integridade da MAPK/ERK é necessária para que o T3 não afete o perfil lipídico, alterando a homeostase.

7. Referências

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

44. Davis, P. J., Davis, F. B., Mousa, S. A., Luidens, M. K. & Lin, H. Y. Membrane receptor for thyroid hormone: physiologic and pharmacologic implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 51, 99–115 (2011).
45. Davis PJ, Leonard JL, Davis FB. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Front Neuroendocrinol.* 2008;29(2):211-8.
46. Moeller LC, Cao X, Dumitrescu AM, Seo H, Refetoff S. Thyroid hormone mediated changes in gene expression can be initiated by cytosolic action of the thyroid hormone receptor beta through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Nucl Recept Signal.* 2006; 4:e020.
47. JOHNSON, G. L.; LAPADAT, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science, Stanford*, v. 298, n. 5600, p. 1911-1912, 2002.
48. WHITMARSH, A. J.; DAVIS, R. J., Signal transduction by MAP kinases: regulation by phosphorylation-dependent switches. *stke*. [online], 1999. Disponível em: http://www.stke.org/cgi/content/full/OC_sigtrans;1999/1/pe1. Acesso em: 10 jun 2004.
49. YUE, T. L.; WANG, C.; GU, J. L.; MA, X. L.; KUMAR, S.; LEE, J. C.; FEUERSTEIN, G. Z.; THOMAS, H.; MALEEFF, B.; OHLSTEIN, E. H. Inhibition of extracellular signal- regulated kinase enhances Ischemia/Reoxygenation-induced apoptosis in cultured cardiac myocytes and exaggerates reperfusion injury in isolated perfused heart. *Circ Res, New York*, v. 86, n. 6, p. 692-699, 2000.
50. WIDMANN, Christian et al. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three- kinase module from yeast to human. *Physiological reviews*, v. 79, n. 1, p. 143-

180, 1999.

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

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

53. Bergh JJ, Lin HY, Lansing L, Mohamed SN, Davis FB, Mousa S, et al. Integrin α V β 3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology*. 2005;146(7):2864-71.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

8. ANEXOS

8.1. Alteração de Orientação



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Botucatu, 05 de Fevereiro de 2018

Ao

Conselho do Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica
Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp

Prezados Senhores

Eu, Lucas Solla Mathias, aluno(a) regularmente matriculado(a) no Programa em Curso de (X)
Mestrado / () Doutorado, solicito a transferência de minha orientação do(a) Prof(a) Dr(a) Célia
Regina Nogueira para o (a) Prof(a) Dr(a) Miriane de Oliveira

Justificativa: Alteração de projeto na linha de pesquisa da orientadora proposta.

Declaro que tenho conhecimento que deverei comunicar ao CEP/CEUA a transferência de
orientação, caso a solicitação seja aprovada pelo Conselho do Programa.

Lucas Solla Mathias
Nome/Assinatura do(a) aluno(a)

DE ACORDO: Orientador(a) Atual

Célia Regina Nogueira
Nome/Assinatura do(a) Orientador(a) Atual

DE ACORDO: Orientador(a) Proposto

Miriane de Oliveira
Nome/Assinatura do(a) Orientador(a) Proposto

Obs.:

- 1) Havendo necessidade de alteração do projeto de pesquisa, a solicitação da referida alteração deverá ser requerida conforme instruções contidas no link <http://www.fmb.unesp.br/Home/Pos-Graduacao/alteracao-do-projeto-de-pesquisa.doc>;
- 2) De acordo com a Resolução Unesp 62/92, o orientador não poderá possuir com o orientado, relações familiares ou de parentesco até 3º Grau

Faculdade de Medicina de Botucatu – Seção Técnica de Pós-graduação
Av. Professor Mário Rubens Guimarães Montenegro, s/n CEP 18618-687 Botucatu São Paulo Brasil
spg@fmb.unesp.br

8.2 Alteração do Título / Projeto de Pesquisa encaminhado ao Programa

Botucatu, 10 de Junho de 2018.

Ao

Conselho do Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica da
Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp

Prezados Senhores,

Considerando o estabelecido na legislação vigente, solicito a alteração do projeto de pesquisa de meu(inha) orientado(a) Lucas Solla Mathias, regularmente matriculado no Programa, em curso de (X) Mestrado / () Doutorado.

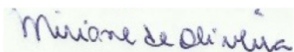
Projeto inicial: DETERMINAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES TR α e TR β NA AÇÃO DA TRIIODOTIRONINA (T3) NA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE LEPTINA EM ADIPÓCITOS, 3T3-L1.

Projeto proposto: ATIVAÇÃO DA VIA MAPK/ERK E INTEGRINA α v β 3 PELA AÇÃO DA TRIIODOTIRONINA (T3) NA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE ADIPOCINAS E MODIFICAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO EM ADIPÓCITOS, 3T3-L1.

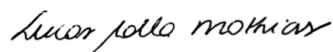
Justificativa da necessidade de alteração do projeto: Inicialmente, o projeto apresentado ao Programa de Pós-Graduação de “Fisiopatologia em Clínica Médica”, tinha como objetivo avaliar o envolvimento dos receptores TR α e TR β , que fazem parte das vias de ação nucleares de indução da expressão gênica pelos HT, na ação da triiodotironina (T3) na modulação da expressão gênica de adipocinas em cultura de adipócitos, 3T3-L1. Para isso seriam silenciados os genes TR, α e β . Porém, no decorrer da pesquisa e de leituras na literatura viu-se a necessidade de prosseguirmos dentro da linha de pesquisa do grupo e responder questões de outras publicações que tratam de vias de ação extra-nuclear do T3, desta forma, o objetivo passou a ser compreendermos o envolvimento da via MAPK/ERK e a integrina α v β 3 sobre a modulação da expressão gênica de duas adipocinas produzidas pelo tecido adiposo, a leptina e a adiponectina, que estão relacionadas ao gasto energético do organismo e melhora a sensibilidade a insulina, respectivamente. Para isso foram utilizados inibidores das vias, MAPK/ERK (PD98059) e da integrina α v β 3 (ácido tetra-iodo-tiro-ácetico – Tetrac). Manteveram-se as técnicas que o projeto inicial já possuía, como cultura celular da linhagem 3T3-L1, Oil Red, PCRq-RT e Western Blotting e foram acrescentadas outras técnicas, dentre elas, o Adipo Red, para quantificação do acúmulo lipídico; Método enzimático-colorimétrico para dosagem de triglicerídeos; Ensaio de glicerol, para

mensurar o produto da lipólise e Ensaio Elisa para verificar o dano de DNA pela dosagem da 8-Hidroxideoxiguanosina (8O-OH-dG) e dosagem de triglicerídeos (TGL).

Atenciosamente,



Nome/Assinatura* do(a) Orientador(a)



Nome/Assinatura* do(a) Aluno(a)

Obs.:

- 1) Anexar cópia do projeto inicial e cópia do projeto proposto;
- 2) Comunicar ao Comitê de Ética em Pesquisa/Comissão de Ética em Experimentação Animal a alteração do projeto;
- 3) * Tanto a assinatura do aluno(a) quanto do orientador(a) deverão ser originais

8.3 Indicação de coorientador



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Botucatu, 05 de fevereiro de 2018.

Ao

Conselho do Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica
Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp

Prezados Senhores

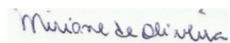
Solicito a inclusão do Prof(a).Dr(a). Celia Regina Nogueira (Cédula de Identidade – RG: nº 7904485-2 /C.P.F. nº 329629928-97), como coorientador(a) de meu(inha) orientado(a) Lucas Solla Mathias, aluno regularmente matriculado(a) no Programa, em curso de (X)Mestrado/ () Doutorado.

- Data do início oficial do(a) aluno(a) no Curso: 01/03/2017

Título do Projeto de Pesquisa: ATIVACAO DA VIA MAPK/ERK E INTEGRINA α v β 3 PELA AÇÃO DA TRIIODOTIRONINA (T3) NA MODULACAO DA EXPRESSAO GENICA DE ADIPOCINAS E MODIFICACAO DO PERFIL LIPIDICO EM ADIPOCITOS, 3T3-L1.

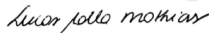
- curriculum vitae plataforma lattes atualizado do(a) coorientador(a) indicado(a):
cópia anexa (a apresentação do curriculum vitae será dispensada quando o(a) coorientador(a) indicado(a) já for credenciado(a) no Programa de Pós-graduação a que o aluno pertence)
- elenco de atividades a serem desenvolvidas pelo(a) coorientador(a) no projeto de pesquisa: Auxiliar em todas as etapas que envolvem o projeto, desde a escrita, orientação na realização das técnicas a serem realizadas, análise e interpretação dos dados e dissertação dos resultados.

Atenciosamente,



Miriane de Oliveira
Nome/Assinatura do Orientador(a)*

CIENTE E DE ACORDO



Lucas Solla Mathias
Nome/Aluno(a)*

CIENTE E DE ACORDO

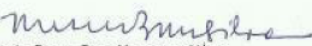


Célia Regina Nogueira
Nome/Assinatura do Coorientador(a)
indicado(a)*

Obs.: 1) De acordo com a legislação vigente, o coorientador não poderá possuir com o coorientado, relações familiares ou de parentesco até 3º Grau;

Faculdade de Medicina de Botucatu – Seção Técnica de Pós-graduação
Av. Professor Mário Rubens Guimarães Montenegro, s/n CEP 18618-687 Botucatu São Paulo Brasil
spg@fmb.unesp.br

8.4. Certificado de aprovação do CEUA

	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CAMPUS DE BOTUCATU FACULDADE DE MEDICINA		 Comissão de Ética em Experimentação Animal  Criada através da Portaria DFM nº 36 de 28/04/99
Certificado			
Certificamos que o (Protocolo CEEA 959-2012) "Determinação do mecanismo de ação da triiodotironina na modulação da expressão de mRNA e proteína da leptina e TRalfa", a ser conduzido por Miriane de Oliveira, orientada pela Prof^a Dr^a Célia Regina Nogueira, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) - Material utilizado: Células 3T3-L1			
Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEEA em 02/08/2012.			
 Prof ^a Dr ^a Maria Rosa Bet Moraes Silva Presidente da CEEA		 Alberto Santos Capelluppi Secretário da CEEA	
Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-970 Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143 e-mail secretaria: capelluppi@fmb.unesp.br			

8.5. Ofício de modificação de título / projeto de pesquisa encaminhado ao CEUA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Botucatu, 19 de Julho de 2018.

Eu, Lucas Solla Mathias, aluno de Mestrado do Programa de Fisiopatologia em Clínica Médica, gostaria de informar algumas alterações que foram realizadas em meu projeto de pesquisa, que já foram aceitas pelo programa ao qual faço parte.

Projeto de Referência: Of. 18/2017 - CEUA. Meu trabalho trata-se de um recorte de um projeto anteriormente aprovado pelo CEEA (prot. n. 959-2012 em 02/08/2012).

Orientação: Minha orientadora passou a ser a Dra. Miriane de Oliveira e a co-orientadora a Dra. Célia Regina Nogueira.

Projeto: o estudo continua sendo *in vitro*, com a mesma linha celular (3T3-L1), as mudanças foram no objetivo do trabalho e algumas técnicas foram acrescentadas, além do título.

O título inicial: "Determinação da participação dos receptores TR α e TR β na ação da triiodotironina (T3) na modulação da expressão gênica de leptina em adipócitos, 3T3-L1".

O título atual: "Ativação da via MAPK/ERK e integrina $\alpha\beta 3$ pela ação da triiodotironina (T3) na modulação da expressão gênica de adipocinas e modificação do perfil lipídico em adipócitos, 3T3-L1."

Justificativa de alteração do projeto: Inicialmente, o projeto tinha como objetivo avaliar o envolvimento dos receptores TR α e TR β , que fazem parte das vias de ação nucleares de indução da expressão gênica pelos HT, na ação da triiodotironina (T3) na modulação da expressão gênica de adipocinas em cultura de adipócitos, 3T3-L1. Para isso seriam silenciados os genes TR, α e β . Porém, no decorrer da pesquisa e de leituras na literatura viu-se a necessidade de prosseguirmos dentro da linha de pesquisa do grupo e responder questões de outras publicações que tratam de vias de ação extranucleares, desta forma, o objetivo passou a ser compreendermos o envolvimento da via MAPK/ERK e a integrina $\alpha\beta 3$ na modulação da expressão gênica de adipocinas produzidas pelo tecido adiposo, a leptina e a adiponectina, que estão relacionadas ao gasto energético do organismo e melhora a sensibilidade a insulina, respectivamente. Para isso foram utilizados inibidores das vias, MAPK/ERK (PD98059) e da integrina $\alpha\beta 3$ (ácido tetra-iodo-tiro-ácetico – Tetrac). Manteveram-se as técnicas que o projeto inicial já possuía, como cultura celular da linhagem 3T3-L1, Oil Red, PCRq-RT e Western Blotting e foram acrescentadas outras técnicas, dentre elas, o Adipo Red, para quantificação do acúmulo lipídico; Método enzimático-colorimétrico para dosagem de triglicerídeos; Ensaio de glicerol, para mensurar o produto da lipólise e Ensaio Elisa para verificar o dano de DNA pela dosagem da 8- Hidroxideoxiguanosina (8O-OH-dG) e dosagem de triglicerídeos (TGL).

Lucas Solla Mathias

Dra. Célia Regina Nogueira

Dra. Miriane de Oliveira