

Triiodotironina modula a expressão de leptina e adiponectina em adipócitos 3T3-L1

Triiodothyronine modulates the expression of leptin and adiponectin in 3T3-L1 adipocytes

Miriane de Oliveira¹, Maria Teresa De Sábio¹, Regiane Marques Castro Olimpio¹, Fernanda Cristina Fontes Moretto¹, Renata de Azevedo Melo Luvizotto², Celia Regina Nogueira¹

RESUMO

Objetivo: Examinar o efeito de diferentes doses de triiodotironina sobre a expressão gênica das adipocinas leptina e adiponectina, em diferentes períodos de tempo, além de avaliar a diferença de expressão entre as duas adipocinas em cada grupo. **Métodos:** Adipócitos 3T3-L1 foram incubados com triiodotironina nas doses fisiológica (10nM) e supra-fisiológicas (100nM ou 1.000nM), ou na ausência de triiodotironina (controle, C) durante 0,5, 6 ou 24 horas. O mRNA das adipocinas foi analisado em tempo real, utilizando a reação em cadeia de polimerase. Para as análises dos dados, foi utilizada a análise de variância, complementada com o teste de Tukey, ou o teste *t* de Student com 5% de significância. **Resultados:** Os níveis de leptina diminuíram no grupo com dose de 1.000nM em 0,5 hora. A adiponectina também diminuiu no grupo com dose de 10nM, porém se elevou com a dose de 100nM. Após 6 horas, ambos os genes foram suprimidos em todas concentrações de hormônio. Em 24 horas, os níveis de leptina foram elevados em 10, 100 e 1.000nM, em relação ao grupo controle. No que concerne à adiponectina, observou-se aumento apenas no grupo cuja dose foi de 100nM, em comparação ao controle. **Conclusão:** Foram demonstradas ações rápidas da triiodotironina sobre a expressão da leptina e da adiponectina, iniciando em 0,5 hora na dose de 1.000nM, para a primeira, e na dose de 100nM, para a segunda. A triiodotironina estimulou ou inibiu a expressão de adipocinas em adipócitos em diferentes tempos e doses, o que pode auxiliar no tratamento da obesidade, levando em consideração que, nesta, a leptina está aumentada e adiponectina, diminuída.

Descritores: Leptina; Adiponectina; Tri-iodotironina; Adipócitos

ABSTRACT

Objective: To study the effect of different doses of triiodothyronine on gene expression of the adipokines leptin and adiponectin, at different times, and to evaluate the difference in expression

between the two adipokines in each group. **Methods:** 3T3-L1 adipocytes were incubated with triiodothyronine at physiological dose (10nM) and supra-physiological doses (100nM or 1,000nM), or without triiodothyronine (control, C) for 0.5, 6, or 24 hours. Leptin and adiponectin mRNA was detected using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). One-way analyses of variance, Tukey's test or Student's *t* test, were used to analyze data, and significance level was set at 5%. **Results:** Leptin levels decreased in the 1,000nM-dose group after 0.5 hour. Adiponectin levels dropped in the 10nM-dose group, but increased at the 100nM dose. After 6 hours, both genes were suppressed in all hormone concentrations. After 24 hours, leptin levels increased at 10, 100 and 1,000nM groups as compared to the control group; and adiponectin levels increased only in the 100nM group as compared to the control group. **Conclusion:** These results demonstrated fast actions of triiodothyronine on the leptin and adiponectin expression, starting at 0.5 hour, at a dose of 1,000nM for leptin and 100nM for adiponectin. Triiodothyronine stimulated or inhibited the expression of adipokines in adipocytes at different times and doses which may be useful to assist in the treatment of obesity, assuming that leptin is increased and adiponectin is decreased, in obesity cases.

Keywords: Leptin; Adiponectin; Triiodothyronine; Adipocytes

INTRODUÇÃO

As ações dos hormônios tireoidianos (HTs) são especialmente importantes durante o desenvolvimento, pois regulam o crescimento e a maturação de vários órgãos e tecidos durante a vida fetal e neonatal.^(1,2) Muitos tecidos são regulados pelo HTs até seu desenvolvimento completo, incluindo ações em grupos de genes envolvidos no processo de diferenciação. Assim como outros

¹ Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, SP, Brasil.

² Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil.

Autor correspondente: Miriane de Oliveira – Distrito de Rubião Jr., s/n – Distrito Rubião Jr – CEP: 18618-000 – Botucatu, SP Brasil – Tel.: (14) 3881-6213 – E-mail: miriane.deoliveira@yahoo.com.br

Data de submissão: 16/2/2014 – Data de aceite: 12/1/2015

Conflitos de interesse: não há.

DOI: 10.1590/S1679-45082015AO3068

tecidos, o tecido adiposo (TA) é um importante alvo para os HTs.⁽³⁾ Isso porque é especializado no transporte, na síntese, no armazenamento e na mobilização de lipídios. Sua função principal é o armazenamento de energia sob forma de triglicérides, o que constitui um reservatório de energia a ser usada em tempos de privação calórica.⁽⁴⁾ O TA é o maior órgão do sistema endócrino de todo o corpo, secretando hormônios, quimiocinas e adipocinas, que são importantes reguladores parácrinos/ endócrinos.⁽⁵⁾

Os HTs, principalmente a triiodotironina (T3), modulam a proliferação e a diferenciação dos adipócitos⁽⁶⁾ e estão envolvidos nos processos celulares, como transdução de sinal, apoptose e resposta inflamatória.

A leptina e a adiponectina são adipocinas sintetizadas e secretadas pelo TA. A leptina atua principalmente no sistema nervoso central, exercendo efeito anorexígeno, estimulando o gasto energético.⁽⁷⁾ A adiponectina está envolvida em importantes efeitos metabólicos, como estimulação da oxidação de ácidos graxos, redução da gliconeogênese e aumento da termogênese.⁽⁸⁻¹¹⁾

Seres humanos obesos têm níveis de leptina séricas elevados. As concentrações de leptina são diretamente proporcionais à massa de gordura corporal, mais especificamente ao volume dos adipócitos.^(12,13) Em relação aos HTs, há indícios de que a obesidade humana está normalmente associada com o aumento do hormônio estimulante da tireoide (TSH) e os níveis de T3.^(14,15) Como em ratos, os estudos com seres humanos chegaram a resultados controversos sobre o efeito dos HTs sobre as concentrações de leptina. Em indivíduos com hipotireoidismo, a leptina foi encontrada aumentada,^(16,17) diminuída^(18,19) ou inalterada,^(20,21) quando comparada à de indivíduos eutireoideos. Os mesmos resultados controversos são encontrados em estudos com indivíduos com hipertireoidismo.⁽¹⁶⁻²²⁾

A administração de T3 em ratos com hipotireoidismo diminuiu a expressão do RNA mensageiro (mRNA) da leptina no TA e dos níveis circulantes de leptina.⁽²³⁾ No entanto, em outros estudos, os HTs aumentam a leptina em adipócitos diferenciados de células 3T3-L1.⁽²⁴⁾ Estudos em humanos não mostraram evidência conclusiva sobre a relação entre HTs e os níveis de leptina.^(25,26)

A adiponectina compartilha algumas ações fisiológicas dos HTs, como a redução de gordura corporal, pelo aumento da termogênese, e na oxidação lipídica.⁽²⁷⁾

A interação entre HTs e concentração de adiponectina ainda não está definida. Alguns estudos sugerem que a função tireoidiana exerça influência sobre seus níveis séricos. Alguns autores relataram que a concentração dessa adipocina apresentou-se mais elevada no hipertireoidismo, em relação ao hipotireoidismo em

pacientes com doença de Graves⁽²⁸⁾ e ao eutiroidismo em pacientes com doença de Basedow.⁽²⁹⁾

Estudos sobre uma possível relação entre adiponectina e desvios do metabolismo lipídico, associada à disfunção da tireoide, são escassos. Pacientes com hipertireoidismo tiveram aumento de peso corporal, índice de colesterol e massa corporal após o controle da tireotoxicose. Depois de ajustar os níveis de adiponectina para o índice de massa corporal, nenhuma mudança significativa foi observada em pacientes com hiper e hipotireoidismo, sugerindo que os HTs desempenham um pequeno papel na modulação dos níveis de adiponectina.⁽³⁰⁾

Os HTs agem aumentando a taxa metabólica e o consumo de oxigênio, regulando a produção de calor e o suprimento de energia; a leptina e a adiponectina estão envolvidas na regulação do balanço energético.⁽³¹⁾

Resultados conflitantes podem ser explicados pela existência de muitos fatores que influenciam nos níveis de leptina, adiponectina e HTs, e mais estudos são necessários para entender completamente a relação entre leptina, adiponectina e HTs.

Os papéis biológicos dos HTs, da leptina e da adiponectina se entrecruzam na regulação do gasto energético, buscando, com isso, uma maneira de estudar a resposta do TA ao T3 sem a interferência de fatores sistêmicos. Desse modo, foram avaliados os efeitos de diferentes doses de T3 em diferentes tempos sobre os níveis de expressão gênica de leptina e adiponectina *in vitro*, em células 3T3-L1 diferenciadas em adipócitos. Ambas as adipocinas são moduladas pelo T3 em curto ou longo período de tempo, aumentando ou diminuindo, conforme a dose desse hormônio.

Nosso estudo pretendeu demonstrar que doses fisiológicas de T3 agem diminuindo a expressão gênica de adiponectina e aumentando a de leptina. Por outro lado, doses supra-fisiológicas de T3 agem em tempos mais longos, aumentando a concentração de leptina e diminuindo a de adiponectina. Nossos resultados comprovaram a ação do T3 no TA em dose fisiológica e permitiram novos estudos para o uso da T3 no tratamento de pacientes obesos. Como a literatura demonstra, após a perda de 5 a 10% de peso, a perda ponderal é mais difícil,⁽³²⁾ e o paciente apresenta níveis séricos baixos de T3.⁽³³⁾ Os nossos achados, desse modo, justificariam a administração de doses fisiológicas do hormônio nesse momento de tratamento.

OBJETIVO

Examinar o efeito de diferentes doses de triiodotironina sobre a expressão gênica das adipocinas leptina e adiponectina, em diferentes períodos de tempo, além

de avaliar a diferença de expressão entre as duas adipocinas em cada grupo.

MÉTODOS

Cultura de células e diferenciação

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, sob número 752.

Para o estudo *in vitro*, foi utilizada a linhagem celular 3T3-L1. Essas células foram adquiridas do Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e cultivadas, conforme descrito na literatura,⁽³⁴⁾ em meio modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco®), 1% de antibiótico/antimicótico (Sigma®), sob uma atmosfera de 5% de gás carbônico (CO₂) a uma temperatura de 37°C. As células foram mantidas em cultura nessas condições até atingirem a confluência de aproximadamente 100% e, em seguida, foram transferidas para placas de seis poços, para realização dos experimentos. Após atingirem 100% de confluência nos poços, as células foram submetidas ao processo de diferenciação, permanecendo 3 dias em meio DMEM, contendo 10% de SFB, 100mM de 1-metil-3-isobutil xantina (IBMX; Sigma®), 1mM de dexametasona (Sigma®) e 5mg/L de insulina (Sigma®). Após esse período, as células ficaram 7 dias em meio DMEM, contendo 10% de SFB e 5mg/mL de insulina. Após o período de diferenciação celular, os adipócitos foram submetidos à depleção do HTs por 36 horas com meio DMEM suplementado com soro fetal Charcoal-Stripped (Sigma®). Após a depleção do HTs, as células foram submetidas aos tratamentos na dose fisiológica de T3 (10nM, denominado F) ou em doses supra-fisiológicas de T3 (100nM e 1.000nM, denominadas SI e SII, respectivamente), durante 0,5, 6 e 24 horas. O grupo não tratado com T3 foi usado como controle (C).

Coloração com Oil Red O

Após 10 dias de diferenciação, o meio de cultura das células foi retirado e elas foram lavadas duas vezes com tampão fosfato-salino (PBS – *phosphate buffered saline*). Posteriormente, acrescentou-se 1mL de formaldeído, no qual elas foram deixadas por 30 minutos em temperatura ambiente. Após esse tempo, lavaram-se as células três vezes com PBS. Em seguida, colocaram-se 300µL de corante Oil Red O (Sigma®), e elas foram incubadas por 2 horas a 37°C. Após esse período, foram novamente lavadas três vezes com água destilada e co-

locadas na estufa para secar. As células foram observadas no microscópio para constatar a diferenciação pela coloração em vermelho das células adiposas.

Expressão gênica

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) e 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 como se segue: 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 interno, ciclofilina (ensaio Mm00434759_m1)⁽³⁴⁾ pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, como previamente descrito,⁽³⁵⁾ a expressão de mRNA da leptina ou adiponectina foi avaliada em relação aos valores do Grupo C em comparação aos tratados (F, SI e SII), ou quando comparada a diferença de expressão da leptina em relação à adiponectina, dentro do mesmo grupo. A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada pelo método do Cq comparativo.⁽³⁵⁾

Análise estatística

As diferenças entre os níveis de mRNA de leptina e adiponectina dentro de cada grupo, tratado ou não, foram analisadas pelo teste *t* de Student. As diferenças de expressão do gene leptina ou adiponectina para diferentes doses de T3 em cada momento foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) seguido por teste de Tukey. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão. O nível de significância foi fixado em 5%.

RESULTADOS

Cultura de células 3T3-L1 e diferenciação

A figura 1A mostra as células 3T3-L1 antes da diferenciação. Na presença da solução de diferenciação (insu-

lina, dexametasona e IBMX), os pré-adipócitos atingiram a morfologia de adipócitos maduros (Figuras 1B e 1C), com características primárias, incluindo um grande número de gotículas lipídicas citoplasmáticas. A coloração com *Oil Red O* evidenciou as gotículas lipídicas com marcação vermelha (Figura 1C).

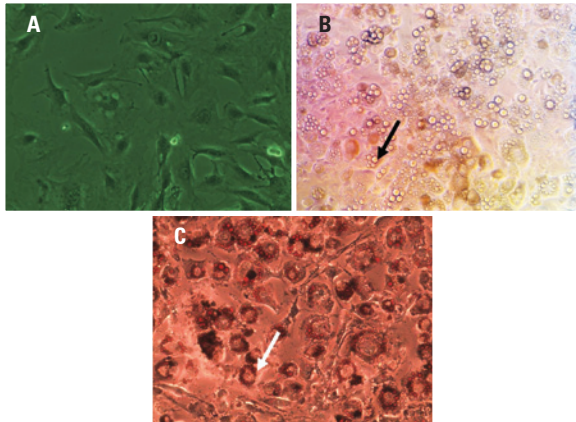


Figura 1. Células 3T3-L1 antes e após a diferenciação em adipócitos. (A) Células não diferenciadas. (B) Células após 10 dias de diferenciação. (C) Células coradas com *Oil Red O* após 10 dias de diferenciação. As setas mostram o adipócito com gotículas lipídicas citoplasmáticas

Níveis de expressão entre as adipocinas em adipócitos 3T3-L1

A tabela 1 apresenta a diferença dos níveis de expressão entre as adipocinas leptina e adiponectina para todos os grupos, nos diferentes tempos. A adiponectina, independentemente da presença ou da ausência do tratamento, apresentou níveis mais elevados de expressão que a leptina.

Tabela 1. Adiponectina x leptina nos diferentes tempos, dentro de cada grupo na ausência (controle) ou presença (doses de 10nM, 100nM e 1.000nM) de triiodotironina

	Grupos conforme períodos de tempo	Adiponectina M ± DP	Leptina M ± DP	Valor de p
0,5h	C	1,00±0,18	0,000034±0,000003	<0,001
	F	0,28±0,08	0,000032±0,000005	0,005
	SI	3,08±0,24	0,000017±0,000003	<0,001
	SII	1,35±0,10	0,000007±0,000001	<0,001
6h	C	1,00±0,15	0,000033±0,000008	<0,001
	F	0,23±0,05	0,000016±0,000003	0,002
	SI	0,27±0,03	0,000018±0,000001	<0,001
	SII	0,28±0,05	0,000004±0,000008	<0,001
24h	C	1,00±0,17	0,000029±0,000001	<0,001
	F	1,18±0,12	0,000045±0,000007	<0,001
	SI	1,75±0,45	0,000248±0,000042	0,003
	SII	0,71±0,14	0,000089±0,000001	<0,001

mRNA de adiponectina e leptina foram analisados por reação em cadeia da polimerase em tempo real. Dados expressos em média ± desvio padrão. Comparação entre os níveis de adiponectina e leptina, dentro de cada grupo, com teste *t* de Student. Todos os ensaios foram feitos em triplicata (n=3 para cada tratamento). M: média; DP: desvio padrão; C: controle; F: dose de 10nM de triiodotironina; h: hora; SI: dose de 100nM de triiodotironina; SII: dose de 1.000nM de triiodotironina.

Diferentes doses de triiodotironina suprimem os níveis de mRNA de leptina em 0,5 e 6 horas, porém dose supra-fisiológica eleva os níveis em 24 horas

A figura 2 mostra a modulação dos níveis de mRNA de leptina em adipócitos, 3T3-L1, na ausência (C) ou presença do T3 (F, SI e SII, respectivamente) em diferentes períodos de tempo (0,5, 6 e 24 horas) por RT-PCR.

A figura 2A mostra a supressão dos níveis de mRNA de leptina pelo T3 a partir de 0,5 hora em SII em relação aos Grupos C, F e SI. Em 6 horas de incubação, observou-se a diminuição de mRNA de leptina em todos os grupos tratados e essa supressão acentuou-se em SII, em relação a F e SI (Figura 2B). Para 24 horas de incubação, houve aumento de leptina em F, SI e SII em relação ao C, sendo possível observar que ocorreu aumento em SI mais evidente que em F ou SII (Figura 2C).

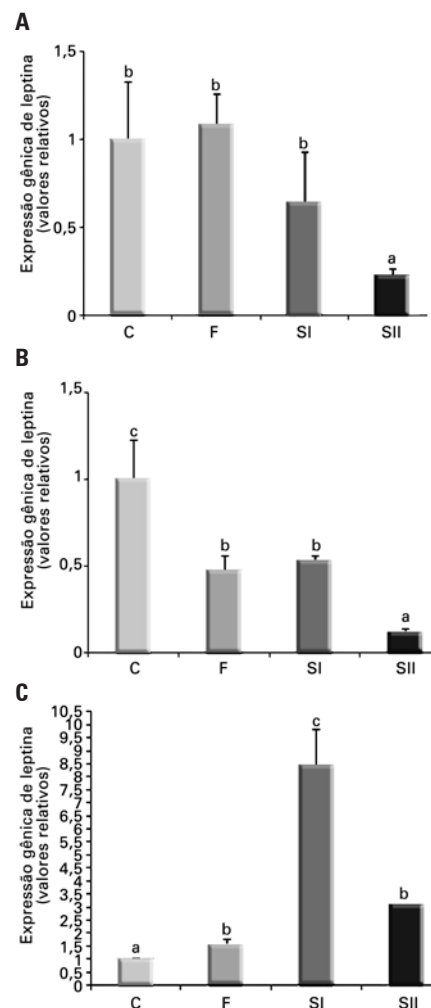


Figura 2. Influência de diferentes doses de triiodotironina na expressão gênica de leptina em 0,5 hora (A), 6 horas (B) e 24 horas (C). Dados expressos em média ± desvio padrão. Foi utilizada a análise de variância, complementada por teste de Tukey. Uso de mesmas letras representam $p > 0,05$; letras diferentes representam $p < 0,05$. Comparações dos Grupos F, SI ou SII x C, e F x SI; F x SII; SI x SII. n=3 para cada tratamento. C: Controle; F: dose de 10nM de triiodotironina; SI: dose de 100nM de triiodotironina; SII: dose de 1000nM de triiodotironina

T3 modula os níveis de mRNA de adiponectina a partir de 0,5 hora em diferentes doses

A figura 3 mostra a modulação dos níveis de mRNA de adiponectina em adipócitos, 3T3-L1, na ausência (C) e presença do T3 (F, SI e SII, respectivamente) em diferentes períodos de tempo (0,5, 6 e 24 horas) por RT-PCR. Em 0,5 hora, verificaram-se a supressão da expressão de adiponectina em F e um aumento em SI em relação ao C (Figura 3A). Em 6 horas de incubação, a expressão gênica de adiponectina foi diminuída por todas as doses administradas (F, SI e SII) em relação a ausência de tratamento (Figura 3B). A adiponectina em 24 horas retornou aos níveis do Grupo C nos Grupos F e SII, e esteve aumentada em SI (Figura 3C).

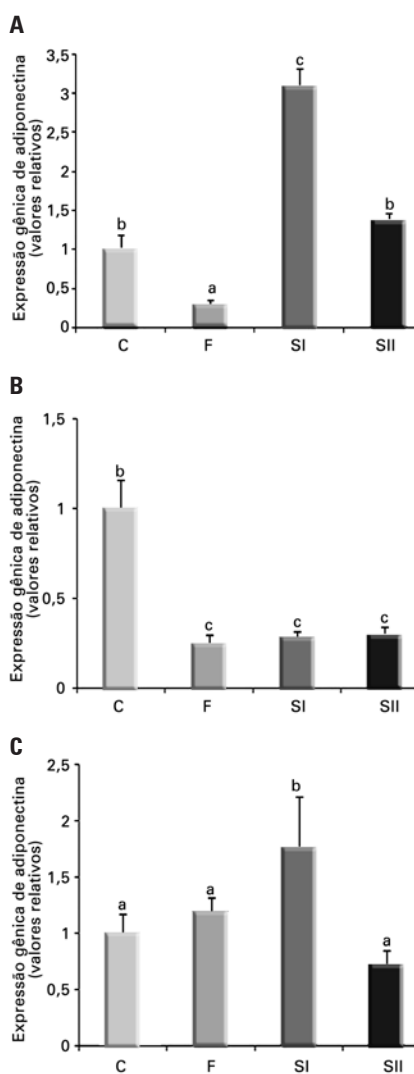


Figura 3. Influência de diferentes doses de triiodotironina na expressão gênica de adiponectina em 0,5 hora (A), 6 horas (B) e 24 horas (C). Dados expressos em média \pm desvio-padrão. Foi utilizada a análise de variância, complementada por teste de Tukey. Uso de mesmas letras representam $p > 0,05$; letras diferentes representam $p < 0,05$. Comparações dos Grupos F, SI ou SII x C e F x SI; F x SII; SI x SII. $n = 3$ para cada tratamento. C: controle; F: dose de 10nM de triiodotironina; SI: dose de 100nM de triiodotironina; SII: dose de 1000 nM de triiodotironina

DISCUSSÃO

A leptina e a adiponectina diferem de quase todas as outras adipocinas, pois são secretadas exclusivamente pelos adipócitos. Embora os detalhes de todos os fatores que regulam sua síntese, secreção e *clearance* permaneçam incompletos, os níveis de leptina no plasma aumentam proporcionalmente com a massa de gordura, enquanto que os níveis de adiponectina diminuem com o ganho de peso.⁽³⁶⁾ A leptina e a adiponectina estão envolvidas na regulação do balanço energético, assim como os HTs.⁽³¹⁾

Verificamos que a adiponectina teve expressão mais elevada que a leptina em adipócitos 3T3-L1, independentemente da presença ou da ausência do T3. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de os adipócitos 3T3-L1, neste estudo, não representarem um estado de obesidade. A obesidade tem por base um processo inflamatório iniciado com o aumento das reservas de TA, com hipertrofia e hiperplasia desse tecido, que levam à produção de várias moléculas pró-inflamatórias, tanto pelos próprios adipócitos como pela matriz extracelular que o envolve, que, por sua vez, levam ao desenvolvimento de um processo inflamatório sistêmico de baixo grau.⁽³⁷⁾ Na obesidade, também está aumentada a produção de leptina,^(38,39) havendo um decréscimo da expressão de adiponectina e, conseqüentemente, de suas propriedades anti-inflamatórias, antiaterogênicas e de promoção da sensibilidade à insulina.^(40,41)

Alguns estudos encontraram correlação negativa entre a leptina e HTs,^(42,43) enquanto outros encontram associação.⁽⁴⁴⁾ Wang et al.⁽⁴⁵⁾ relataram que, embora a leptina e o HTs possam agir pelos mesmos caminhos para regular o metabolismo de energia, os efeitos da leptina no metabolismo não dependem da presença dos HTs. No entanto, a leptina e HTs podem partilhar alguns locais de ação, podendo, assim, agir de forma aditiva.

Nossos achados vão de encontro com os de Yoshida et al.,⁽²⁴⁾ que constataram a modulação da leptina pelo T3 dentro de 24 horas em adipócitos 3T3-L1 em todas as doses administradas; porém nossos resultados mostraram que, a partir de 0,5 hora, o T3 já exercia efeitos sobre os níveis de mRNA desse gene, sendo suprimido por dose suprafisiológica em SII. Análises anteriores do nosso grupo demonstraram o aumento de leptina, mRNA e proteína, em 1 hora de incubação.⁽³⁴⁾ Interessantemente, em 6 horas de incubação, a leptina é suprimida pelas diferentes doses de T3 administradas aos Grupos F, SI e SII, e essa diminuição se torna mais evidente na presença da dose de 1.000nM, caracterizando a diminuição da expressão de leptina com a elevação da concentração do hormônio T3, assim como resultados obtidos em estudos de Zabrocka et al.⁽⁴³⁾ e Pinkney et al.⁽¹⁶⁾

Em estudos anteriores, demonstramos, em ratos submetidos à restrição alimentar, que a dose fisiológica de T3 (0,5µg/100g) aumentou a expressão de leptina, indicando a necessidade dessa dose de T3 para a expressão adequada de leptina em animais obesos submetidos à restrição calórica.⁽⁴⁶⁾ No entanto, animais obesos, em estado de hipertireoidismo (25µg de T3 por 100g de peso), apresentaram os níveis de leptina diminuídos, assim como os animais submetidos à restrição alimentar em mesmas condições de hipertireoidismo,⁽⁴⁷⁾ resultados que vão de encontro com os abordados neste estudo para a dose SII (1.000nM de T3) no tempo de 0,5 hora, assim como para os tratamentos realizados no período de 6 horas.

No que concerne à adiponectina, alguns estudos sugerem que a função tireoidiana exerce influência em seus níveis séricos. Alguns autores relataram que a concentração dessa adipocina apresentou-se mais elevada no hipertireoidismo, em relação ao eutireoidismo e ao hipotireoidismo,^(28,29) dados que corroboram os do nosso estudo, no qual o T3 tem ação sobre os níveis de adiponectina a partir de 0,5 hora, aumentando os níveis desse gene em SI e diminuindo em F.

Assim como para a leptina, no tempo de 6 horas, ocorreu a supressão da adiponectina por todas as doses administradas e, em 24 horas, os níveis retornaram aos valores do C ou superam seus níveis, como no Grupo SI. Fasshauer et al.,⁽⁴⁸⁾ em seus estudos utilizando o mesmo modelo experimental, não observaram alteração dos níveis de adiponectina em 16 horas de incubação com a mesma dose administrada ao nosso Grupo SII, o que demonstra que, no decorrer do tempo, o T3 sofre oscilações em sua ação.

Nossos resultados corroboram os de Saito et al.⁽²⁹⁾ e Yaturu et al.⁽²⁸⁾ A adiponectina se encontrou aumentada nos grupos que receberam as doses supra fisiológicas de T3, mimetizando o hipertireoidismo. Cabanelas et al.⁽⁴⁹⁾ concluíram, em seu estudo, que os HTs regulam a expressão de mRNA de adiponectina de forma tecido-específica, sem alterar sua secreção no TA branco.

Estudos realizados anteriormente por nosso grupo demonstraram que animais obesos tinham adiponectina sérica e mRNA do TA diminuídos, e leptina aumentada, quando comparados com o controle, e que a administração de T3 supra fisiológico (25µg/100g), de maneira interessante, diminuiu a massa de gordura corporal, bem como os níveis de adiponectina e leptina sérica, e o mRNA.⁽⁵⁰⁾ No entanto, em contraste, estudo experimental de ratos com hipertireoidismo mostrou aumento importante de adiponectina no soro.⁽⁵¹⁾ Com os achados do presente estudo *in vitro*, observou-se que o aumento ou a diminuição da expressão de leptina ou adiponectina pelo T3 dependem da dose e do tempo.

Os resultados apresentados são importantes para a compreensão da dose de T3 (fisiológica ou supra fisiológica) e em que tempo a modulação das adipocinas, leptina e adiponectina é iniciada por esse hormônio em adipócitos maduros. Assim, é possível ambicionar posteriores estudos do tratamento da obesidade com análogos do HTs, visto que este modula a expressão dos genes estudados.

CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram ações rápidas do triiodotironina sobre a expressão da leptina e da adiponectina, iniciando em 0,5 hora na dose de 1.000nM, para leptina, e na dose de 100nM, para a adiponectina. A triiodotironina estimulou ou inibiu a expressão de adipocinas em adipócitos em diferentes tempos e doses, o que pode ser útil para auxiliar no tratamento da obesidade, levando em consideração que, nessa situação, a leptina está aumentada e a adiponectina, diminuída.

AGRADECIMENTOS

Este estudo teve apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), protocolo 2010/16911-4, para o desenvolvimento do projeto. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) concedeu bolsa de estudos para a aluna desenvolver o projeto. Os financiadores não tiveram nenhum papel no desenho do estudo, na coleta de dados e análise, na decisão de publicar e nem na preparação do manuscrito.

REFERÊNCIAS

1. Bernal J. Action of thyroid hormone in brain. *J Endocrinol Invest.* 2002;25(3):268-88. Review.
2. Morreale de Escobar G, Obregon MJ, Escobar del Rey F. Role of thyroid hormone during early brain development. *Eur J Endocrinol.* 2004;151 Suppl 3:U25-U37. Review.
3. Viguier 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.
4. Obregon MJ. Thyroid hormone and adipocyte differentiation. *Thyroid.* 2008;18(2):185-95. Review.
5. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:415-45. Review.
6. Darimont C, Gaillard D, Ailhaud G, Negrel R. Terminal differentiation of mouse preadipocyte cells: adipogenic and antimitogenic role of triiodothyronine. *Mol Cell Endocrinol.* 1993;98(1):67-73.
7. Flier JS. Clinical review 94: What's in a name? In Search of leptin's physiologic role. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(5):1407-13. Review.
8. Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, et al. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98(4):2005-10.

9. Tomas E, Tsao TS, Saha AK, Murrey HE, Zhang CC, Itani SI, et al. Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(25):16309-13.
10. 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.
11. Qi Y, Takahashi N, Hileman SM, Patel HR, Berg AH, Pajvani UB, et al. Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. *Nat Med*. 2004;10(5):524-9. Erratum in: *Nat Med*. 2004;10(6):649.
12. Couillard C, Mauriège P, Imbeault P, Prud'homme D, Nadeau A, Tremblay A, et al. Hyperleptinemia is more closely associated with adipose cell hypertrophy than with adipose tissue hyperplasia. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000;24(6):782-8.
13. Hamilton BS, Paglia D, Kwan AY, Deitel M. Increased obese mRNA expression in omental fat cells from massively obese humans. *Nat Med*. 1995;1(9):953-6.
14. Reinehr T, Isa A, de Sousa G, Dieffenbach R, Andler W. Thyroid hormones and their relation to weight status. *Horm Res*. 2008;70(1):51-7.
15. Kok P, Roelfsema F, Langendonk JG, Frölich M, Burggraaf J, Meinders AE, et al. High circulating thyrotropin levels in obese women are reduced after body weight loss induced by caloric restriction. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(8):4659-63.
16. Pinkney JH, Goodrick SJ, Katz J, Johnson AB, Lightman SL, Coppack SW, et al. Leptin and the pituitary-thyroid axis: a comparative study in lean, obese, hypothyroid and hyperthyroid subjects. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1998;49(5):583-8.
17. Chen MD, Song YM, Tsou CT, Lin WH, Sheu WH. Leptin concentration and the Zn/Cu ratio in plasma in women with thyroid disorder. *Biol Trace Elem Res*. 2000;75(1-3):99-105.
18. Valcavi R, Zini M, Peino R, Casanueva FF, Dieguez C. Influence of thyroid status on serum immunoreactive leptin levels. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(5):1632-4.
19. Diekman MJ, Romijn JA, Endert E, Sauerwein H, Wiersinga WM. Thyroid hormones modulate serum leptin levels: observations in thyrotoxic and hypothyroid women. *Thyroid*. 1998;8(12):1081-6.
20. Sreenan S, Caro JF, Refetoff S. Thyroid dysfunction is not associated with alterations in serum leptin levels. *Thyroid*. 1997;7(3):407-9.
21. Matsubara M, Yoshizawa T, Morioka T, Katayose S. Serum leptin and lipids in patients with thyroid dysfunction. *J Atheroscler Thromb*. 2000;7(1):50-4.
22. Pinkney JH, Goodrick SJ, Katz JR, Johnson AB, Lightman SL, Coppack SW, et al. Thyroid and sympathetic influences on plasma leptin in hypothyroidism and hyperthyroidism. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000;24 Suppl 2:S165-6.
23. Fain JN, Bahouth SW. Effect of tri-iodothyronine on leptin release and leptin mRNA accumulation in rat adipose tissue. *Biochem J*. 1998;332(Pt 2):361-6.
24. 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.
25. Simó R, Hernández C, Zafon C, Galofré P, Castellanos JM, Mesa J. Short-term hypothyroidism has no effect on serum leptin concentrations. *Diabetes Obes Metab*. 2000;2(5):317-21.
26. Obermayer-Pietsch BM, Frühauf GE, Lipp RW, Sendhofer G, Pieber TR. Dissociation of leptin and body weight in hyperthyroid patients after radioiodine treatment. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2001;25(1):115-20.
27. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab*. 2000;11(8):327-32. Review.
28. 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.
29. Saito T, Kawano T, Saito T, Ikoma A, Namai K, Tamemoto H, et al. Elevation of serum adiponectin levels in Basedow disease. *Metabolism*. 2005;54(11):1461-6.
30. Iglesias P, Alvarez Fidalgo P, Codoceo R, Díez JJ. Serum concentrations of adipocytokines in patients with hyperthyroidism and hypothyroidism before and after control of thyroid function. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2003;59(5):621-9.
31. Vendrell J, Broch M, Vilarrasa N, Molina A, Gómez JM, Gutiérrez C, et al. Resistin, adiponectin, ghrelin, leptin, and proinflammatory cytokines: relationships in obesity. *Obes Res*. 2004;12(6):962-71.
32. Moore R, Grant AM, Howard AN, Mills IH. Treatment of obesity with triiodothyronine and a very-low-calorie liquid formula diet. *Lancet*. 1980;1(8162):223-6.
33. Moreira-Andrés MN, Del Cañizo-Gómez FJ, Black EG, Hoffenberg R. Long-term evaluation of thyroidal response to partial calorie restriction in obesity. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1981;15(6):621-6.
34. 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.
35. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T))Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
36. Gray SL, Vidal-Puig AJ. Adipose tissue expandability in the maintenance of metabolic homeostasis. *Nutr Rev*. 2007;65(6 Pt 2):S7-12.
37. Hansen D, Dendale P, Beelen M, Jonkers RA, Mullens A, Corluy L, et al. Plasma adipokine and inflammatory marker concentrations are altered in obese, as opposed to non-obese, type 2 diabetes patients. *Eur J Appl Physiol*. 2010;109(3):397-404.
38. Ahima RS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity (Silver Spring)*. 2006;14 Suppl 5:242S-249S. Review.
39. Fain J. Release of inflammatory mediators by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily by the nonfat cells: a review. *Mediators Inflamm*. 2010;2010:513948. Review.
40. Engeli S, Feldpausch M, Gorzelniak K, Hartwig F, Heintze U, Janke J, et al. Association between adiponectin and mediators of inflammation in obese women. *Diabetes*. 2003;52(4):942-7.
41. Simpson KA, Singh MA. Effects of exercise on adiponectin: a systemic review. *Obesity (Silver Spring)*. 2008;16(2):241-56. Review.
42. Escobar-Morreale HF, Escobar del Rey F, Morreale de Escobar G. Thyroid hormones influence serum leptin concentrations in the rat. *Endocrinology*. 1997;138(10):4485-8.
43. Zabrocka L, Klimek J, Swierczynski J. Evidence that triiodothyronine decreases rat serum leptin concentration by down-regulation of leptin gene expression in white adipose tissue. *Life Sci*. 2006;79(11):1114-20.
44. Näslund E, Andersson I, Degerblad M, Kogner P, Kral JG, Rössner S, et al. Associations of leptin, insulin resistance and thyroid function with long-term weight loss in dieting obese men. *J Intern Med*. 2000;248(4):299-308.
45. Wang JL, Chinookoswong N, Yin S, Shi ZQ. Calorigenic actions of leptin are additive to, but not dependent on, those of thyroid hormones. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000;279(6):E1278-85.
46. Luvizotto RA, Conde SJ, Sibio MT, Nascimento AF, Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, et al. Administration of physiologic levels of triiodothyronine increases leptin expression in calorie-restricted obese rats, but does not influence weight loss. *Metabolism*. 2010;59(1):1-6.
47. Luvizotto RA, Sibio MT, Olímpio RM, Nascimento AF, Lima-Leopoldo AP, Leopoldo A, et al. Supraphysiological triiodothyronine doses diminish leptin and adiponectin gene expression, but do not alter resistin expression in calorie restricted obese rats. *Horm Metab Res*. 2011;43(7):452-7.
48. 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.
49. Cabanelas A, Cordeiro A, Santos Almeida NA, Monteiro de Paula GS, Coelho VM, Ortiga-Carvalho TM, et al. Effect of triiodothyronine on adiponectin expression and leptin release by white adipose tissue of normal rats. *Horm Metab Res*. 2010;42(4):254-60.
50. Luvizotto Rde A, do Nascimento AF, Sibio MT, Olímpio RM, Conde SJ, Lima-Leopoldo AP, et al. Experimental hyperthyroidism decreases gene expression and serum levels of adipokines in obesity. *Scientific World Journal*. 2012;2012:780890.
51. Aragão CN, Souza LL, Cabanelas A, Oliveira KJ, Pazos-Moura CC. Effect of experimental hypo- and hyperthyroidism on serum adiponectin. *Metabolism*. 2007;56(1):6-11.