



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

HELENA PAIM TILLI

PERFIL METABOLÔMICO DE CÉLULAS ADIPOSAS 3T3-L1 EM
RESPOSTA AO TRATAMENTO COM TRIIODOTIRONINA (T3)

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

Orientadora: Profa. Dra. Célia Regina Nogueira
Coorientadora: Profa. Dra. Estela de Oliveira Lima

Botucatu

2024

HELENA PAIM TILLI

**PERFIL METABOLÔMICO DE CÉLULAS ADIPOSAS 3T3-L1 EM
RESPOSTA AO TRATAMENTO COM TRIIODOTIRONINA (T3)**

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

Orientadora: Profa. Dra. Célia Regina Nogueira
Coorientadora: Profa. Dra. Estela de Oliveira Lima

Botucatu
2024

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Tilli, Helena Paim.

Perfil metabólico de células adiposas 3T3-L1 em resposta
ao tratamento com triiodotironina (T3) / Helena Paim Tilli.
- Botucatu, 2024

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Faculdade de Medicina, Botucatu

Orientador: Célia Regina Nogueira

Coorientador: Estela de Oliveira Lima

Capes: 40101061

1. Adipócitos. 2. Metabólica. 3. Obesidade. 4.
Triiodotironina.

Palavras-chave: Células adiposas; Metabólica; Obesidade;
Triiodotironina.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Helena Paim Tilli

Título do trabalho: Perfil Metabolômico de Células Adiposas 3T3-L1 em Resposta ao Tratamento com Triiodotironina (T3).

Tipo de trabalho: tese de doutorado

Objetivo: obtenção de titulação de doutora em Fisiopatologia em Clínica Médica

Instituição: Faculdade de Medicina de Botucatu/Unesp

Data da defesa: 26 de abril de 2024

Comissão Examinadora: Profa. Dra. CÉLIA REGINA NOGUEIRA DE CAMARGO (Orientador (a) – Participação Presencial) do (a) Depto. de Clínica Médica / FM/Botucatu – Unesp, Profa. Dra. ADRIANA LUCIA MENDES (Participação Presencial) do (a) Depto. de Clínica Médica / FM/Botucatu – Unesp, Profa. Dra. ADRIANA CAMARGO FERRASI (Participação Presencial) do (a) Depto. de Clínica Médica / FM/Botucatu – Unesp, Profa. Dra. FLAVIA LUISA DIAS AUDIBERT (Participação Presencial) do (a) Londrina/PR, Profa. Dra. FÁTIMA PEREIRA DE SOUZA (Participação Virtual) do (a) Depto. de Física / Ibilce/São José do Rio Preto – Unesp.

DEDICATÓRIA

A Deus por sempre estar ao meu lado.

Aos meus pais, Nilton e Marly, por sempre acreditarem em mim.

À minha irmã Joelly e minha sobrinha Amélia, pelo carinho e incentivo.

Ao meu marido Lucas, por todo amor, atenção, apoio e compreensão.

Aos meus filhos Léo e Bia, a razão de eu nunca desistir.

Nada disso teria sentido se vocês não existissem na minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar comigo em todas as horas e não me deixar desistir.

Ao meu marido Lucas, você foi meu apoio durante toda essa jornada acadêmica. Suas palavras de incentivo e compreensão infinita foram essenciais para eu me manter focada. Sua presença trouxe equilíbrio à minha vida e me deu forças para superar todos os obstáculos. Este trabalho não seria possível sem o seu amor, paciência e apoio constante. Obrigada por ser meu parceiro, meu amigo e meu maior incentivador.

Aos meus filhos Léo e Bia, vocês foram a luz constante durante esta jornada, as duas coisas mais difíceis que fiz ao longo do meu doutorado, porém “É justo que muito custe o que muito vale”. Mesmo nos momentos mais desafiadores e exaustivos vocês foram minha fonte de motivação.

Aos meus pais Nilton e Marly, vocês são os verdadeiros exemplos de dedicação, sacrifício e amor. Desde o início desta jornada, vocês estiveram ao meu lado, mesmo que à distância, oferecendo apoio. Suas palavras sábias e seus conselhos amorosos foram fundamentais para eu alcançar este marco em minha vida acadêmica. Cada conquista que alcancei nesta jornada é, em grande parte, resultado da educação e dos valores que vocês me ensinaram. Agradeço do fundo do meu coração por todo o amor e sacrifício que vocês dedicam a mim.

A minha irmã Joelly e minha sobrinha Amélia, vocês trouxeram alegria para cada etapa desta jornada. Joelly, seu carinho, apoio e encorajamento, mesmo que à distância foram um presente que me guiou ao longo deste caminho desafiador. Amélia, sua inocência, alegria contagiante foram a melhor terapia nos dias mais difíceis.

A minha segunda mãe Salete, por todo carinho e dedicação, que mesmo de longe sempre se fez presente me apoiando em tudo que precisei e cuidando da minha família com tanto amor, como se fosse dela, enquanto eu estou longe de casa.

Aos meus sogros Regina e Domingos, espero poder retribuir todo o apoio e carinho que me foram dados ao longo dos anos. Obrigada por todo o apoio como avós do Léo e da Bia. Suas contribuições para minha vida vão muito além deste doutorado, e por isso sou eternamente grata.

A minha amiga Cindy, obrigada por compartilharmos não apenas o desafio de conciliar os estudos com a maternidade, mas também a alegria e o orgulho das nossas conquistas. Obrigada por ouvir minhas preocupações, me incentivar a seguir em frente e me dar os melhores conselhos nos momentos mais desafiadores. Saiba que sua amizade é muito importante nesta jornada e que possamos continuar a apoiar e celebrar uma à outra, mesmo à distância.

À minha orientadora Célia Regina Nogueira, sou imensamente grata pela oportunidade de aprender e por sua generosidade em compartilhar sua sabedoria e experiência ao longo dessa jornada acadêmica, sua orientação, apoio e expertise foram fundamentais para o meu crescimento como pesquisadora e acadêmica. Sua dedicação, paixão pelo conhecimento, encorajamento constante e amor moldaram não apenas o desenvolvimento deste trabalho, mas quem eu me tornei como pessoa.

À minha coorientadora Estela de Oliveira Lima, sua paciência e capacidade de guiar-me através dos novos desafios da pesquisa, oferecendo insights valiosos e direcionamento especializado, foi fundamental para o sucesso deste projeto.

Aos membros da Banca de Qualificação Dra. Camila Renata Corrêa e Dra. Ana Paula Lima Leopoldo, pelas correções e sugestões proferidas no exame geral de qualificação, contribuindo para o aperfeiçoamento deste trabalho.

À Comissão Examinadora de Defesa de Tese Dra. Flávia Luísa Dias Audibert, Dra. Fátima Pereira de Souza, Dra. Adriana Lucia Mendes, Dra. Adriana Camargo Ferrasi, pela disponibilidade.

Aos amigos de laboratório de “Bio Mol”: Maria Teresa, Bianca, Igor,

Regiane, Miriane, Ester, Paula, Lucas, Vinícius, Virgínia, Adriano, Maria Beatriz, pela amizade, pelos momentos divididos, tanto as angústias quanto as alegrias, pelos trabalhos que realizamos juntos e por tudo que aprendi com vocês.

A todos os funcionários da UNIPEX pela convivência, colaboração e auxílios prestados.

Aos funcionários da Seção Técnica de Pós-Graduação em Clínica Médica, em especial a Bruna, pela paciência e eficiência.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de doutorado (Processo: 140402/2019-5).

Por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta tese, o meu sincero agradecimento.

Obrigada!

“Faça o teu melhor na condição que você tem, enquanto você não
tem condições melhores para fazer melhor ainda! ”

Mário Sergio Cortella

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cultivo celular de pré-adipócitos 3T3L1 30

Figura 2. Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA).. 31

Figura 3. VIP Score (*Variable Importance in Projection*). 32

Figura 4. Volcano Plot. 33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Soluções de Padrão Interno..... 24

Tabela 2: Soluções de Calibração (Metabólitos Primários) 26

Tabela 3: Soluções de Calibração (Lipídios, Carnitinas e Mediadores lipídicos)

27

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Obesidade	15
1.2 Tecido adiposo	16
1.3 Hormônio tireoidiano	17
1.4 Metabolômica	18
2. HIPÓTESE	20
3. JUSTIFICATIVA	21
4. OBJETIVOS	22
4.1 Geral	22
4.2 Específicos	22
5. METODOLOGIA	23
5.1 Cultura celular de pré-adipócitos 3T3-L1	23
5.2 Análise Metabolômica	24
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
7. RESULTADOS	30
7.1 Caracterização da diferenciação	30
7.2 Análises metabolômicas	30
8. DISCUSSÃO	34
9. CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	43
ANEXO – ARTIGO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO COM RESULTADOS GERADOS DURANTE O DOUTORADO	49

RESUMO

Introdução: A obesidade, prevalente globalmente, resulta do desequilíbrio entre ingestão e gasto calórico, marcado pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo (TA). Esse excesso pode estar ligado diretamente a produção desequilibrada de espécies reativas de oxigênio (EROs) em indivíduos obesos desencadeando um processo inflamatório crônico de baixo grau, o que acaba contribuindo para o desenvolvimento de comorbidades como dislipidemia, aterosclerose, diabetes mellitus (DM), hipertensão arterial (HAS) e resistência à insulina (RI). O TA, além de armazenar gordura, é um órgão endócrino complexo, capaz de regular diversas funções metabólicas e liberar substâncias. Os hormônios tireoidianos, especialmente a triiodotironina (T3), influenciam profundamente o metabolismo do TA. **Objetivo:** Identificar por meio da análise do perfil metabolômico as alterações bioquímicas causadas pelo T3 em adipócitos 3T3-L1. **Materiais e Métodos:** Foi realizada a cultura celular de pré adipócitos 3T3-L1, divididos em 2 grupos: (C) adipócitos sem tratamento e (T3) adipócitos tratados com dose fisiológica de T3 (10nM) por 24h. As análises metabolômicas foram realizadas por cromatografia líquida seguidas de análise in silico em software de biologia de sistemas (Metaboanalyst 5.0), o poder preditivo foi determinado utilizando a ferramenta estatística de análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA), com um intervalo de confiança de 95%; também foram feitas análises utilizando o método de VIP Scores. **Resultados:** A PLS-DA revelou uma separação clara entre os grupos C e T3. Foi desenvolvido um mapa de calor e identificados sete biomarcadores com expressão estatisticamente significativa, os metabólitos mais relevantes para o grupo tratado com T3 foram: glicina e lactato. Já para o grupo de adipócitos sem tratamento foram: alfa-cetoglutarato, L-carnitina, isovalerilcarnitina, butirilcarnitina e lisofosfatidilcolina. **Conclusão:** O T3 exerce influência sobre o perfil metabolômico de adipócitos 3T3-L1, principalmente no metabolismo da glicina.

ABSTRACT

Introduction: Obesity, globally prevalent, arises from the imbalance between caloric intake and expenditure, characterized by excessive accumulation of adipose tissue (AT). This excess can directly link to the imbalanced production of reactive oxygen species (ROS) in obese individuals, triggering a chronic low-grade inflammatory process, ultimately contributing to the development of comorbidities such as dyslipidemia, atherosclerosis, diabetes mellitus (DM), hypertension (HTN), and insulin resistance (IR). Besides fat storage, AT is a complex endocrine organ capable of regulating various metabolic functions and releasing substances. Thyroid hormones, especially triiodothyronine (T3), profoundly influence AT metabolism. **Objective:** To identify, through metabolomic profile analysis, the biochemical alterations caused by T3 in 3T3-L1 adipocytes. **Materials and Methods:** 3T3-L1 preadipocyte cell culture was conducted, divided into 2 groups: (C) untreated adipocytes and (T3) adipocytes treated with a physiological dose of T3 (10nM) for 24h. Metabolomic analyses were performed by liquid chromatography followed by in silico analysis in system biology software (Metaboanalyst 5.0); predictive power was determined using the statistical tool of partial least squares discriminant analysis (PLS-DA), with a 95% confidence interval; analyses were also conducted using VIP Scores method. **Results:** PLS-DA revealed clear separation between groups C and T3. A heatmap was developed, and seven biomarkers with statistically significant expression were identified; the most relevant metabolites for the T3-treated group were glycine and lactate, whereas for the untreated adipocyte group were alpha-ketoglutarate, L-carnitine, isovalerylcarnitine, butyrylcarnitine, and lysophosphatidylcholine. **Conclusion:** T3 influences the metabolomic profile of 3T3-L1 adipocytes, particularly in glycine metabolism.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade

A partir da segunda metade do século XX, testemunhamos significativas transformações no cenário da saúde e da doença, especialmente no âmbito da nutrição (BATISTA FILHO; RISSIN, 2003). Essas mudanças se caracterizam pela sobreposição de carências nutricionais globais e específicas, acompanhadas pelo surgimento pandêmico do sobrepeso e da obesidade (SCHMIDT et al., 2011).

A modernização das sociedades provocou uma reestruturação significativa no estilo de vida da população, resultando em um novo padrão de vida (BATISTA FILHO; RISSIN, 2003). Nesse novo cenário, a disponibilidade e o consumo de alimentos aumentaram consideravelmente, com uma ampla variedade de produtos tornando-se acessíveis, em grande parte devido ao avanço da tecnologia alimentar (WANDERLEY; FERREIRA, 2010).

Atualmente, a obesidade é reconhecida como a principal preocupação em termos de desequilíbrio nutricional tanto nos países desenvolvidos quanto nos em desenvolvimento, devido ao aumento de sua incidência (MELO et al., 2020). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que cerca de 10% da população desses países seja afetada por esse problema, pois esse fenômeno pandêmico transcende fronteiras geopolíticas, blocos econômicos, diferenças culturais e classes sociais (BATISTA FILHO; RISSIN, 2003; SÁ; MOURA, 2011).

Caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, a obesidade causa uma hiperplasia e hipertrofia nas células de gordura, o que pode gerar impactos negativos na saúde de um modo geral (OLIVEIRA et al., 2009). Além disso, é uma doença de origem multifatorial, resultado de uma complexa interação entre fatores ambientais, alimentares, comportamentais, sociais, metabólicos e genéticos (MELO et al., 2020).

A obesidade é considerada uma Doença Crônica não Transmissível (DCNT), assim como: diabetes mellitus, doenças cardiovasculares, certos tipos de câncer, hipertensão arterial, entre outras (OLIVEIRA et al., 2009). Este grupo de doenças representa um dos principais desafios de saúde global devido à sua

alta incidência e impacto na morbidade adulta (MELO et al., 2020). Segundo a OMS, as DCNT são responsáveis por 58,5% de todas as mortes e por 45,9% da carga global de doenças em adultos em todo o mundo.

Este cenário resulta no aumento crônico nos níveis circulantes de mediadores inflamatórios, incluindo diversas proteínas inflamatórias agudas, citocinas pró e anti-inflamatórias, moléculas de adesão e moléculas pró-trombóticas (JUHAN-VAGUE et al., 2003; WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2005). No contexto da obesidade, o tecido adiposo (TA) se torna um importante gerador de mediadores inflamatórios, contribuindo para um estado inflamatório crônico de baixo grau, devido à sua natureza prolongada e progressiva. (AMIN et al., 2019; KERN et al., 2018).

1.2 Tecido adiposo

O tecido adiposo (TA) é um componente essencial do corpo humano, desempenhando papéis importantes na regulação metabólica, armazenamento de energia e resposta imune (FONSECA-ALANIZ et al., 2007a). Existem dois principais tipos de TA: o tecido adiposo branco (TAB), responsável pelo armazenamento de energia na forma de triglicerídeos e é encontrado em locais como o abdômen, coxas e nádegas; e o tecido adiposo marrom (TAM), especializado na produção de calor por meio da termogênese e é mais predominante em recém-nascidos e em regiões como o pescoço e ombros (FRIGOLET; GUTIÉRREZ-AGUILAR, 2020).

O TA passou a ser reconhecido pelo seu papel endócrino em diversos processos essenciais (FONSECA-ALANIZ et al., 2007a). Além de sua função no armazenamento de energia, o TA também é uma importante fonte de citocinas, como o TNF- α e a interleucina-6 (IL-6) (D'ALESSANDRO et al., 2015). A descoberta da leptina evidenciou que essas moléculas desempenham papéis essenciais nas funções fisiológicas e metabólicas do corpo (ROSA et al., 2013). Atualmente, mais de 50 adipocinas são conhecidas, responsáveis por regular as funções autócrinas, endócrinas e parácrinas do TAB (CONSIDINE et al., 1996).

Essas citocinas têm um papel crucial na regulação da inflamação, no entanto, em condições de obesidade, o TA pode se tornar disfuncional, produzindo quantidades excessivas de citocinas pró-inflamatórias (KERN et al.,

2018). Isso contribui para a inflamação crônica associada à obesidade e pode levar ao desenvolvimento de complicações metabólicas, como resistência à insulina e doenças cardiovasculares (VARGAS-CASTILLO et al., 2017).

Os adipócitos são as células predominantes no TA e são responsáveis pelo armazenamento de gordura (TAYLOR et al., 2014). Os adipócitos 3T3-L1, em particular, são uma linha celular amplamente utilizada em pesquisas sobre adipogênese e metabolismo lipídico (SABATER et al., 2014). Essas células são derivadas de células pré-adiposas de camundongos e têm a capacidade de diferenciar-se em adipócitos maduros em resposta a estímulos hormonais e ambientais (SABATER et al., 2013). Sendo assim, estudos com células 3T3-L1 têm contribuído significativamente para o entendimento dos mecanismos envolvidos na regulação do metabolismo de gordura e na fisiopatologia da obesidade e de suas complicações associadas.

1.3 Hormônio tireoidiano

Os hormônios tireoidianos (HT), principalmente a triiodotironina (T3) atuam de forma importante no TA, por isso o estado funcional da tireoide tem uma profunda influência sobre o metabolismo do corpo humano (OBREGON, 2008).

O T3 desempenha um papel crucial na regulação da termogênese, do apetite e metabolismo de gordura (SILVA, 1995, 2006). Níveis adequados de T3 são essenciais para manter um metabolismo saudável e controlar o acúmulo de gordura corporal (YAU; YEN, 2020). Por outro lado, a obesidade pode afetar negativamente a função tireoidiana, resultando em níveis reduzidos de T3 e contribuindo para um metabolismo mais lento (MANCINI et al., 2016).

Além do papel do T3 na regulação do metabolismo e do peso corporal, é importante destacar sua influência na função do TA (CHEN et al., 2022). A presença de receptores de HT no TA indica a sensibilidade desse tecido aos efeitos da T3, que pode afetar diretamente a expressão de genes envolvidos na diferenciação de adipócitos, na lipólise e na secreção de adipocinas, como a adiponectina e a leptina, que têm papéis importantes na regulação do metabolismo energético e do apetite (OLIVEIRA et al., 2013b).

É fundamental compreender o impacto dos HT no TA e vice-versa, dada

a sua importância metabólica (YAU; YEN, 2020). Essa interação é complexa e abrange uma variedade de processos bioquímicos e moleculares, incluindo a regulação da expressão gênica, atividade enzimática e secreção de hormônios e citocinas (FONSECA-ALANIZ et al., 2007a). Portanto, a compreensão dessas inter-relações é de suma importância para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e preventivas voltadas para a promoção da saúde, principalmente de condições relacionadas com a obesidade (REINEHR, 2010).

1.4 Metabolômica

A Metabolômica é o estudo sistemático e completo da série de intermediários de baixo peso molecular, não proteicos, sintetizados endogenamente (o metaboloma) e que esteja contido em uma célula representando o fenótipo após a expressão gênica (FIEHN, 2002). Os metabólitos que compõem este metaboloma, são substratos químicos de baixo peso molecular, intermediários ou produtos finais de reações mediadas por enzimas (AU, 2018) que possuem várias propriedades físico-químicas, mas geralmente são classificados como moléculas polares hidrofílicas (aminoácidos, carboidratos, ácidos orgânicos e compostos fosforilados) ou moléculas apolares hidrofóbicas (ácidos graxos e lipídios de membrana) (AU, 2018; DUNN et al., 2011; FIEHN, 2002; OLIVER et al., 1998).

Existem duas maneiras de se fazer estudos em metabolômica: com alvo (Target Lipidomic) e sem alvo (Untarget Lipidomic). Na metabolômica com alvo, os metabólitos caracterizados e quantificados já são conhecidos antes do início da análise e são utilizados protocolos de análise específicos para cada uma destas classes. E, na metabolômica sem alvo, se faz um levantamento exploratório e qualitativo do conjunto de metabólitos da amostra, o que é útil para descoberta de novos metabólitos e criação de bibliotecas (AU, 2018; DUNN et al., 2011).

A crescente aplicação dessas tecnologias baseadas em ômicas, representa um caminho promissor para continuar melhorando nossa compreensão da complexidade e interconexão das reações metabólicas reguladas pelo exercício dentro dos sistemas biológicos, que anteriormente eram limitadas pela aplicação de abordagens tradicionais apenas estudando o

metabólito alvo de forma isolada (DUNN et al., 2011).

A partir de estudos de metabolômica é possível aprimorar o conhecimento molecular em relação a diferentes tipos de doenças, dentre elas disfunções metabólicas, nas quais as alterações, sejam hormonais ou não, levem à expressão diferencial de moléculas proteicas e não-proteicas em relação ao indivíduo saudável (AU, 2018; DUNN et al., 2011; OLIVER et al., 1998)

Visto que a obesidade é o distúrbio metabólico mais comum no mundo, estudos que apontem as vias bioquímicas envolvidas com o aumento do gasto de energia das células adiposas são importantes para prevenir essa doença. Portanto, estudos de metabolômica serão de grande importância para ampliar as perspectivas de tratamento da obesidade, uma vez que traz à tona vias bioquímicas que podem se tornar alvos para diferentes abordagens terapêuticas.

Portanto, com intuito de ampliar a compreensão das diferentes respostas celulares ao T3, este estudo propõe realizar análises do perfil metabolômico de adipócitos 3T3-L1 tratados ou não com o hormônio.

2. HIPÓTESE

O T3 modula as vias bioquímicas relacionadas ao metabolismo do TA.

3. JUSTIFICATIVA

Visto que a obesidade é o distúrbio metabólico mais comum e de maior incidência no mundo, estudos que demonstrem metabólitos que estejam envolvidos com o aumento do gasto de energia em células adiposas são importantes, pois permitem identificar potenciais alvos para intervenção farmacêutica e posteriormente viabilizar a prevenção dessa doença.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

Identificar por meio da análise do perfil metabolômico as alterações bioquímicas causadas pelo T3 em adipócitos 3T3-L1.

4.2 Específicos

- Analisar o perfil de metabólitos em cultura celular de adipócitos 3T3-L1 tratados ou não com T3.
- Selecionar e identificar os principais metabólitos diferenciais entre os grupos.

5. METODOLOGIA

5.1 Cultura celular de pré-adipócitos 3T3-L1

Foi realizado um estudo *in vitro*, com a linhagem celular de pré-adipócitos 3T3-L1, os quais foram cultivados em meio Dulbecco's Modificado DMEM (Gibco™ 41966052) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco™ 10270106), 1% antibiótico/antimicótico (A5955-100ML, Sigma™), sob uma atmosfera de 5% de 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 a um processo de diferenciação durante 10 dias. Nos três primeiros dias as células foram mantidas em meio DMEM, 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 ficaram sete dias em meio DMEM contendo 10% de SFB e 5 mg/ml de insulina. Após a diferenciação, os adipócitos maduros foram submetidos à depleção do HT, com meio DMEN suplementado com Soro Fetal Charcoal Stripped (Sigma, F6765), por 24 horas.

Após a diferenciação, para documentar a diferenciação dos adipócitos e determinar o acúmulo lipídico, foi realizada a coloração com Oil Red (Sigma, O1391). Inicialmente, as células foram lavadas duas vezes com PBS, e fixadas com formaldeído 4% por 30 minutos, em temperatura ambiente. Posteriormente foram lavadas duas vezes com PBS. Utilizamos 200µl de corante Oil Red O diluído em água Milli-Q (3:2), que foi incubado por 2 horas a 37°C. As células coradas foram lavadas três vezes com água Milli-Q, e foram mantidas na estufa à 37°C por 30 minutos. As células foram observadas no microscópio, para constarmos a diferenciação, pela coloração em vermelho das gotículas lipídicas.

Posteriormente à constatação da diferenciação, as células foram divididas em 2 grupos: (C) adipócitos 3T3-L1 sem tratamento e (T3) adipócitos 3T3-L1 tratados com dose fisiológica de T3 (10nM) por 24h.

5.2 Análise Metabolômica

Para a análise metabolômica foram utilizados 200uL do sobrenadante da cultura dos adipócitos 3T3-L1, que foram submetidos à extração de metabólitos de acordo com o protocolo descrito a seguir: as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas para retirar de suspensão qualquer material insolúvel. Depois disso, os 200uL de sobrenadante foram transferidos para outro microtubo onde foi adicionado 200uL de solução gelada Acetonitrila (ACN) grau HPLC + 1% de ácido fórmico, que foi agitado em vórtex por 60 segundos, antes de ser deixado em repouso no gelo por 20 minutos. Após esse período os tubos foram centrifugados a uma velocidade acima de 10.000 RPM com refrigeração abaixo de 15°C por 15 minutos para precipitar as proteínas. Após a centrifugação, 350uL foram transferidos para outro microtubo e colocados no speedvac para que ficassem totalmente secos. Os extratos secos foram mantidos sob refrigeração durante o transporte para a empresa de análise metabolômica (IonMedicine).

As amostras secas foram ressolubilizadas em 100 µL de solução padrão (40 µL de soluções de padrão interno marcado e 60 µL de solvente - sendo este composto por 30% de acetonitrila e 70% de água ultrapura), seguido de sonicação por 1 hora. Por fim, as amostras foram transferidas para uma placa rasa e injetadas por Electrospray (ESI) no equipamento de cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas LCMS-8600 NX, UHPLC série 40D X3 (Shimadzu) utilizando um painel de metabólitos pré-definidos (painel IonMedicine).

Para análise exploratória semi-direcionada de metabólitos, realizou-se a calibração com soluções padrão. Para tal, as soluções de padrão interno (tabela 1) marcado foram diluídas em acetonitrila grau HPLC, isopropanol e ácido fórmico, na proporção 69:30:1 em metanol.

Tabela 1. Soluções de Padrão Interno

Metabólito	Concentração (µM)
Timina-D4	1.25
Ornitina-13C5	6.25
Asparagina	2.5
Cistina	1.25
Ácido Aspártico	2.5

Serina	2.5
Alanina	2.5
Glicina	2.5
Glutamina	2.5
Treonina	2.5
Prolina	2.5
Lisina	2.5
Histidina	2.5
Arginina	2.5
Valina	2.5
Metionina	2.5
Tirosina	2.5
Isoleucina	2.5
Leucina	2.5
Fenilalanina	2.5
Triptofano	2.5
L-Carnitina	0.15625
Acetil-Carnitina	0.076563
4-Hidroxiprolina-3	1.25
Citrulina-D7	12.5
TMAO-D9	1.25
Guanosina-13C10,15N5	1.25
Adenosina-13C5	1.25
Serotonina-D4	1.25
Ácido Pirúvico-D4	62.5
Glutationa Oxidada	1.25
Taurina-D4	12.5
Ácido Succínico-D6	12.5
Ácido Úrico-15N2	50
ADMA-D7	1.25
Ácido 2-Cetoglutárico-D6	6.25
Ácido láctico*	250
Glutationa-13C2-15N2-NEM	6.25
Homocisteína-D4-NEM	1.25
MES	1.25
Metionina Sulfona	1.25
Lípido 9	0.375

Também foram preparadas as duas soluções de curva de calibração: i) Metabólitos Primários (MP), e ii) Lipídios, Carnitinas e Mediadores lipídicos (LC). Os painéis moleculares utilizados como padrões e suas concentrações encontram-se nas tabelas 2 e 3 respectivamente.

Tabela 2: Soluções de Calibração (Metabólitos Primários)

Metabólito	Concentração (µM)
L-Alanine	200
L-Arginine	200
L-Aspartic acid	200
L-Cystine	200
L-Glutamic acid	200
Glycine	200
L-Histidine	200
L-Isoleucine	200
L-Leucine	200
L-Lysine	200
L-Methionine	200
L-Phenylalanine	200
L-Proline	200
L-Serine	200
L-Threonine	200
L-Tyrosine	200
L-Valine	200
Triptofano	10
O-Acetil-L-Cartinine	10
Ornitina	100
L-Carinitine	10
L-Glutamina	80
L-Asparagina	10
4-hidroxiprolina	10
Ácido succínico	160
Timina	10
Guanosina	10
TMAO	5
Ácido Láctico	800
L-Ácido Málico	40
Ácido Úrico	900
Taurina	160
Adenosina	10
Ácido Pirúvico	400
Glutationa Reduzida/ NEM	40
L-Glutationa Oxidada	10
Ácido Quinurenico	5
Citrulina	40
GABA	10
Quinurerina	10
ADMA	40
Cisteina-NEM	40
Homocisteína-NEM	10

Tabela 3: Soluções de Calibração (Lipídios, Carnitinas e Mediadores lipídicos)

Metabólito	Concentração (µM)
PC(17:1(10Z)/0:0) / LPC(17:1)	1
PC(16:0/18:2(9Z,12Z)) / PC(16:0/18:2n6)	1
PC(16:0/14:0)	1
PC(38:6) / PDPC	1
PC(22:1/22:1) / PC(22:1(13Z)/22:1(13Z))	1
PC(20:4/16:0) / PC(20:4n6/16:0)	1
Phosphatidylcholine(18:0/22:6) / PC(18:0/22:6n3)	1
LysoPC(22:0)	1
PC(18:0/18:2(9Z,12Z)) / GPCho(36:2)	1
PC(18:1(9Z)/14:0) / PC(18:1/14:0)	1
PC(38:4)	1
PC(18:0/14:0) / GPCho(18:0/14:0)	1
SM d36:2 / C18:1 Sphingomyelin	1
PC(36:1) / PC(18:1(9Z)/18:0)	1
2, 3-SPPC / C18 Sphingomyelin	10
SM(d18:1/16:0)	10
PC(13:0/13:0)	10
PC(16:1(9Z)/16:1(9Z)) / Phosphatidylcholine(32:2)	10
LysoPC(24:0) / LPC(24:0)	10
LysoPC(18:0)	10
LysoPC(18:1(9Z)) / LPC 18:1	10
Sph(d14:1) / C14-Sphingosine	10
C16-Sphingosine / Sph(d16:0)	10
SPH(d18:1/24:0)	10
SM(d18:1/24:1(15Z)) / 24:1 SM	10
Sph(d22:1)	10
SM(34:2)	10
PC(19:0/19:0)	10
PC(17:0/17:0)	10
PC(20:0/20:0)	10
LysoPC(16:0)	10
PC(16:0/18:0)	10
PC(18:1/14:0)	10
PC(21:0/21:0)	10
Dibehenoyl-PC	10
PC(18:0/22:6)	10
PC(20:1n9/20:1n9)	10
PC(18:2(9Z,12Z)/18:2(9Z,12Z))	10
Propionyl-L-carnitine	10
Stearoyl-L-carnitine	10
Octanoyl-L-carnitine	10
Hexanoyl-L-carnitine	10

Uma diluição seriada de 12 pontos de curva de calibração também foi realizada para as duas soluções de calibração descritas acima. O fator de

diluição foi de 1/2 para os primeiros 11 pontos e para o último foi de 1/5. Depois, cada ponto da curva transferido para uma placa rasa na proporção de 10 µL do ponto da curva para 40 µL de soluções de padrão interno marcando mais 50 µL de solvente (30% de acetonitrila e 70% de água ultrapura) e injetados para análise no HPLC-MS/MS.

Os resultados obtidos foram armazenados em Planilha do Microsoft Excel para maior usabilidade no tratamento dos dados, os quais foram submetidos a uma análise multivariada através de um software online gratuito, o *MetaboAnalyst 5.0*, que tem como objetivo processar, normalizar e analisar dados em estatística multivariada específica para metabólitos (PANG et al., 2021).

Com isso foi possível identificar características diferentes e/ou comuns entre dois ou mais grupos de dados que buscam prever alguma correlação existente entre elas, além de identificar caminhos ou mapas metabólicos significativos. Sendo assim, as análises foram feitas comparando o grupo C (adipócitos 3T3-L1 sem tratamento) com o grupo T3 (adipócitos 3T3-L1 tratados com dose fisiológica de 10nM de T3 por 24h).

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As amostras foram analisadas *in silico* utilizando ferramentas de biologia de sistemas, dentre elas a plataforma MetaboAnalyst 5.0 (PANG et al., 2021). O poder preditivo dos marcadores foi determinado utilizando a ferramenta estatística Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA), que visa a separação dos grupos de acordo com os marcadores diferenciais. A seleção dos marcadores foi realizada com base nos valores de $p < 0,05$ (definido para o teste T), VIP Score e de Fold Change (FC).

7. RESULTADOS

7.1 Caracterização da diferenciação

Podemos observar na Figura 1 que as células de pré-adipócitos 3T3L1 foram plaqueadas, diferenciadas e coradas com Oil Red para constatar que houve mesmo a diferenciação dos adipócitos (Figura 1). Após a diferenciação foram tratados com dose fisiológica de T3 (10nM) por 24h.

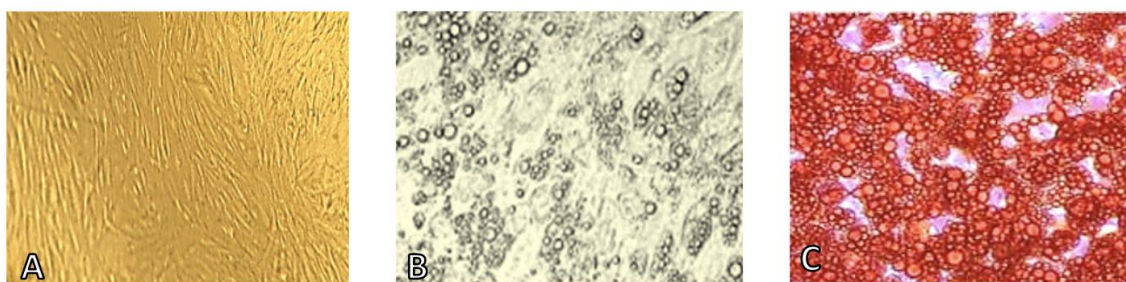


Figura 1. Cultivo celular de pré-adipócitos 3T3L1. A – Plaqueamento; B- Diferenciação; C - Coloração Oil Red.

7.2 Análises metabolômicas

Os resultados foram apresentados em Planilha do Microsoft Excel e foram submetidos à análise *in silico* no software Metaboanalyst 5.0. A partir disso, os dados foram filtrados e normalizados de acordo com as especificidades das amostras e o escalonamento automático do programa.

Visando a seleção de biomarcadores diferenciais, a análise dos dados de espectrometria de massas foi feita por PLS-DA, com um intervalo de confiança de 95%. A partir dessa análise o gráfico *Scores Plot*, permitiu analisar dentre as moléculas elencadas nos painéis, aqueles marcadores moleculares mais importantes para cada grupo estudado, partindo das concentrações de cada marcador (CANUTO et al., 2017). Sendo assim, foi possível estabelecer uma clara separação entre os grupos C (adipócitos 3T3-L1 sem tratamento) e T3 (adipócitos 3T3-L1 tratados com dose fisiológica de 10nM de T3 por 24h) (Figura 2).

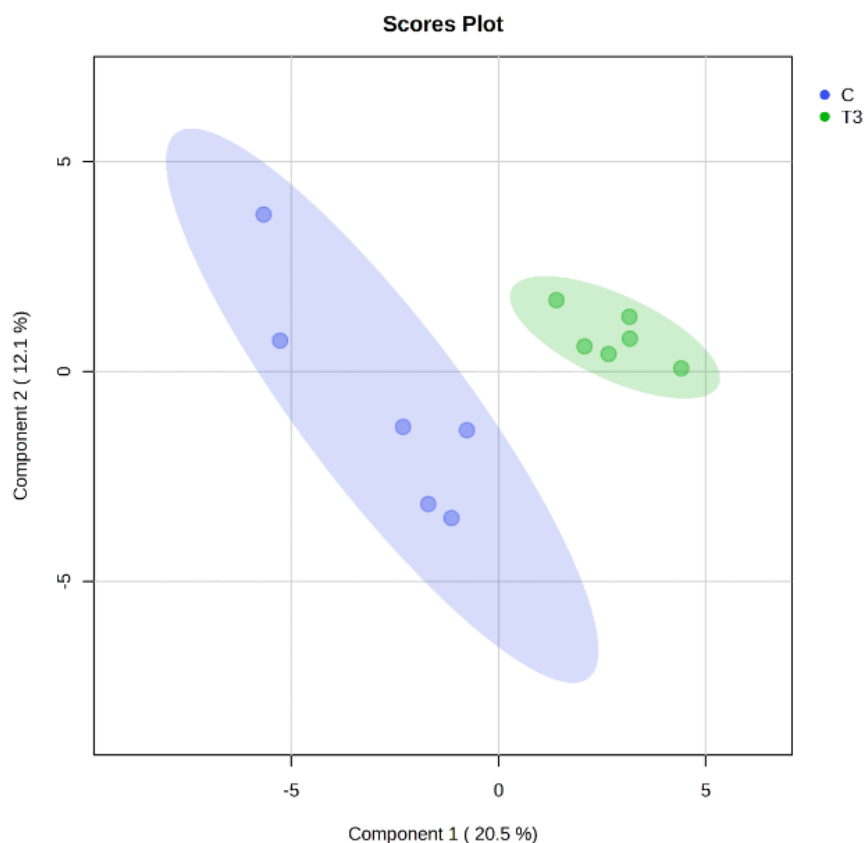


Figura 2. Análise dos marcadores por PLS-DA mostrando uma clara separação entre os grupos C (adipócitos 3T3-L1 sem tratamento) e T3 (adipócitos 3T3-L1 tratados com dose fisiológica de 10nM de T3 por 24h).

Em seguida, os marcadores selecionados pela análise de PLS-DA foram utilizados para identificar os marcadores responsáveis pela diferenciação dos grupos por meio do *VIP scores* (*Variable Importance in Projection*) (Figura 3), ou seja, aqueles marcadores que apresentaram maior importância na distinção dos grupos, entre adipócitos tratados ou não com T3, em que $VIP\ Score \geq 1,5$. De acordo com o espectro de cores lateral, os marcadores mais relevantes para cada um dos grupos estão marcados em vermelho, e aqueles menos importantes, em azul. Os metabólitos mais relevantes para o grupo T3 foram glicina e lactato. Já para o grupo controle (adipócitos sem tratamento) foram alfa-cetoglutarato, L-carnitina, isovalerilcarnitina, butirilcarnitina e lisofosfatidilcolina.

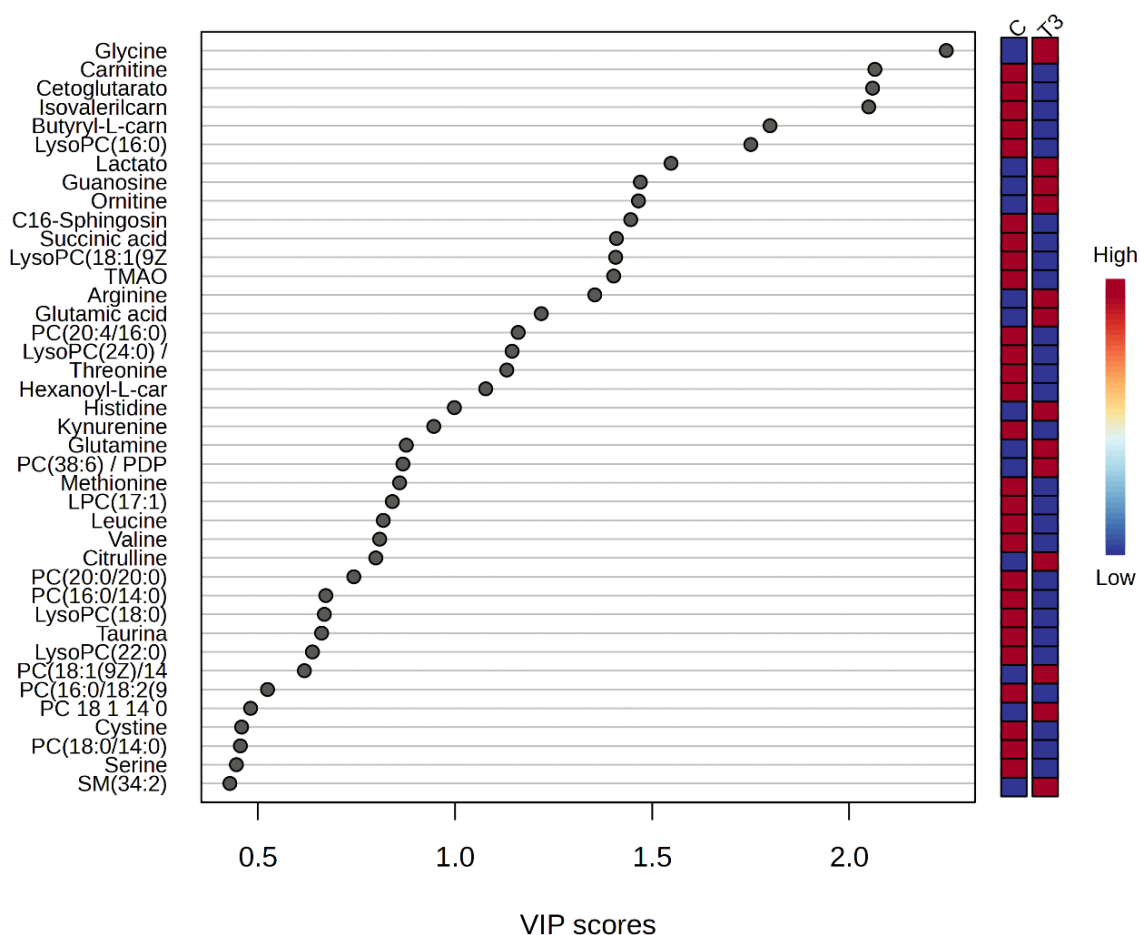


Figura 3. Marcadores selecionados pela análise de PLS-DA, de acordo com o VIP Score (*Variable Importance in Projection*). De acordo com o espectro de cores lateral, os marcadores mais relevantes para cada um dos grupos estão marcados em vermelho, e aqueles menos importantes, em azul.

Para analisar a significância estatística dos marcadores foi gerado o gráfico *Volcano Plot* (Figura 4), um gráfico de dispersão que mostra a significância estatística versus magnitude da acumulação diferencial (BENTO, 2020). Esse *plot* possibilita integrar os valores de *Fold Change* ($FC \geq 1.5$) e de significância estatística ($P \leq 0.05$), mostrando os pontos de maior interesse estatístico localizados na parte superior do gráfico e mais distantes do centro (HUR et al., 2013). Os marcadores localizados à direita representam os marcadores de maior importância para o grupo tratado com T3 (glicina e lactato), e os mais para a esquerda (alfa-cetoglutarato, L-carnitina, isovalericarnitina, butirilcarnitina e lisofosfatidilcolina) para o grupo de adipócitos sem tratamento.

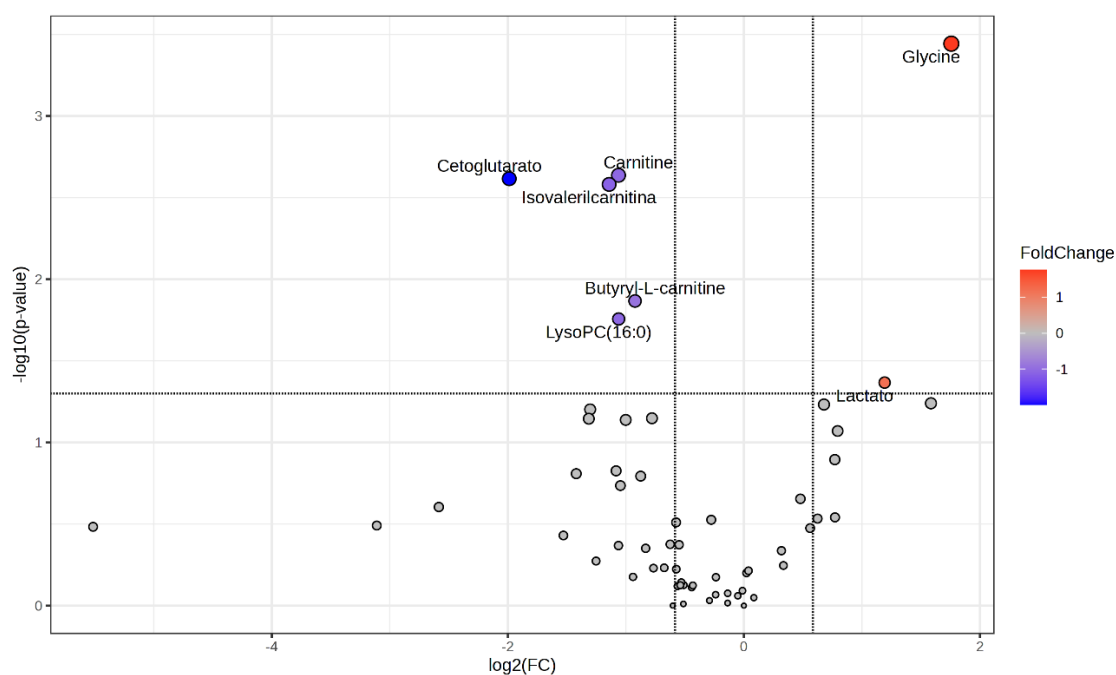


Figura 4. Gráfico Volcano Plot dos metabólitos identificados após o tratamento com T3. Foram destacados aquele em que $p < 0,05$ e $\text{FC} \geq 1,5$.

Após a identificação dos biomarcadores mais importantes para cada situação, foi realizada consulta à literatura científica e a bancos de dados de vias metabólicas, para a compreensão do papel biológico de cada um em cada tratamento.

8. DISCUSSÃO

A análise metabolômica desempenha um papel fundamental na compreensão abrangente das vias metabólicas e na identificação de biomarcadores associados a processos biológicos específicos (CANUTO et al., 2017). Os metabólitos mais relevantes para o grupo tratado com T3 foram: glicina e lactato. Já para o grupo de adipócitos sem tratamento foram: alfa-cetoglutarato, L-carnitina, isovalerilcarnitina, butirilcarnitina e lisofosfatidilcolina.

A glicina é considerada um aminoácido não essencial, por ser sintetizada endogenamente a partir de serina, colina, treonina e glioxilato (WANG et al., 2014). Desempenha diversas funções e exerce múltiplos efeitos no organismo (ZHANG et al., 2020). Ela se conecta a receptores e transportadores específicos presentes em diversas células pelo corpo, influenciando seu funcionamento (WU, 2010).

Estudos têm se concentrado nos potenciais efeitos anti-inflamatórios da glicina, que incluem a redução de citocinas pró-inflamatórias e de ácidos graxos livres, melhoria na sensibilidade à insulina entre outras modulações (AGUAYO-CERÓN et al., 2023; TAKASHINA et al., 2016). Apesar disso, o mecanismo exato pelo qual a glicina atua ainda não está completamente esclarecido (AGUAYO-CERÓN et al., 2023).

Sabe-se que níveis reduzidos de glicina no organismo estão relacionados principalmente com resistência hepática à insulina, diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e obesidade (TAKASHINA et al., 2016). Uma meta-análise recentemente mostrou que os níveis de glicina são mais baixos em pacientes com obesidade e DM2 em comparação com indivíduos saudáveis, justamente por estarem diretamente associados a esta resistência à insulina característica nestas patologias (OKEKUNLE et al., 2017).

A glicina desempenha um papel relevante no contexto do diabetes, podendo influenciar a secreção de insulina e glucagon (GAMEIRO et al., 2005). As concentrações elevadas de glucagon na obesidade e em distúrbios metabólicos podem ser correlacionadas com o aumento na degradação de glicina (AU, 2018; YAN-DO et al., 2016).

A diminuição da expressão do receptor de glicina (GlyR) em células de

pacientes com DM2 está associada à disfunção na secreção de insulina estimulada pela glicina (YAN-DO et al., 2016). Estudos sugerem que concentrações elevadas de glicina circulante podem reduzir o risco de desenvolver DM2 (GUASCH-FERRÉ et al., 2016). Sendo assim, a ingestão de glicina principalmente quando combinada com outros aminoácidos, pode facilitar a secreção de insulina e contribuir para o controle da glicose pós-prandial (GANNON; NUTTALL; NUTTALL, 2002).

Os receptores de glicina (GlyRs) estão presentes em diversas células do organismo (WHEELER; THURMAN, 1999). Nos macrófagos, linfócitos T e neutrófilos, por exemplo, a ativação dos GlyRs possui propriedades anti-inflamatórias, capazes de suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias, modulando o processo inflamatório crônico de baixo grau (ZHONG et al., 2003).

Esse processo ocorre basicamente quando a glicina chega até a célula e abre o canal iônico do GlyR, diminuindo a quantidade de cálcio e reduzindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias por meio da inibição do NF-Kb (GUASCH-FERRÉ et al., 2016). Além disso, a glicina promove a expressão de citocinas anti-inflamatórias, o que contribui diretamente para atenuar o ciclo do processo inflamatório (FROH; THURMAN; WHEELER, 2002)

A inflamação típica da obesidade, decorrente da hipertrofia do TA, está diretamente ligada à infiltração de células imunes, como macrófagos e células T, além da presença de citocinas como TNF- α , IL-6 e IL-1 β , que contribuem para desregulações no metabolismo (GUTIÉRREZ-ROJAS et al., 2022). Estudos demonstram que a glicina é capaz de regular a expressão gênica e proteica de TNF- α e IL-6 em adipócitos 3T3-L1 (ALARCON-AGUILAR et al., 2008; ALMANZA-PEREZ et al., 2010), além de inibir a ativação da via de ação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) via TNF- α (CONTRERAS-NUÑEZ et al., 2018).

Gutiérrez-Rojas et al. (2022), em seu experimento com adipócitos 3T3-L1, induziram um ambiente propício para o desenvolvimento de um processo inflamatório, onde o TNF- α aumentou a expressão gênica de TNF- α e IL-6, enquanto reduziu a expressão de adiponectina e IL-10. Após o tratamento com glicina a expressão dos genes TNF- α e IL-6 foi diminuída quando comparada ao grupo estimulado por TNF- α , sugerindo que o uso de glicina pode diminuir a expressão desses genes associados à inflamação, bem como aumentar a expressão de adiponectina e IL-10 em relação ao grupo controle, revertendo o

efeito induzido pela estimulação com TNF- α .

A partir dos estudos apresentados podemos concluir que a glicina desempenha um papel importante na regulação do metabolismo energético, na secreção de insulina e na resposta inflamatória, sugerindo propriedades protetoras contra o ambiente inflamatório, sendo capaz de atenuar tanto o estresse oxidativo quanto a inflamação.

Sabe-se que o T3 desempenha múltiplos papéis no organismo, em relação à inflamação, e que sua ação pode ser tanto pró-inflamatória quanto anti-inflamatória, pois o T3 é capaz de modular a expressão de genes relacionados à produção de citocinas pró e anti-inflamatórias (NUNES, 2003; RAZVI et al., 2022). Bem como pode atuar influenciando a expressão de genes envolvidos na defesa antioxidante, diminuindo o estresse oxidativo (MANCINI et al., 2016). Além disso, o T3 pode impactar diretamente a resistência à insulina e o metabolismo da glicose (PANVELOSKI-COSTA et al., 2018). Esses efeitos evidenciam a complexa interação da T3 com processos inflamatórios, oxidativos e metabólicos no organismo (FONTENELLE et al., 2016).

Embora ainda não existem evidências diretas de uma relação específica entre a glicina e a T3, é plausível que o T3 possa influenciar indiretamente a ação da glicina no metabolismo ou vice-versa. Sendo assim, tanto o T3 quanto a glicina podem ser potenciais alvos terapêuticos para reduzir a inflamação crônica de baixo grau causada na obesidade. Entretanto são necessários mais estudos para entender todas as vias de ação e metabólitos envolvidos nesse processo.

Outro metabólico identificado nas análises metabolômicas, relevante para o grupo tratado com T3 foi o lactato. Um metabólito produzido pelo corpo durante a atividade física anaeróbica, quando os músculos não têm oxigênio suficiente para produzir energia (BROOKS, 2009). Tradicionalmente, o lactato foi associado à fadiga muscular durante o exercício intenso, algumas pesquisas recentes sugerem que também pode desempenhar um papel na regulação metabólica e na saúde (LIMA-SILVA; ADAMI; NAKAMURA, 2006).

Em relação à obesidade, estudos indicam que indivíduos obesos podem ter níveis elevados de lactato em repouso, o que está correlacionado com uma menor capacidade de utilizar gordura como fonte de energia durante o exercício e uma menor sensibilidade à insulina (DE-CLEVA et al., 2021). A resistência à

insulina é um fator de risco para o desenvolvimento de DM2 e outras condições metabólicas relacionadas à obesidade (AMIN et al., 2019).

Além disso, altos níveis de lactato em repouso podem estar associados à inflamação crônica e ao estresse oxidativo, que são características comuns em pessoas com obesidade (DE-CLEVA et al., 2021). Sabe-se que o lactato é produzido em várias células do corpo como um subproduto da glicólise anaeróbica em diversos tecidos, incluindo o próprio adipócito (BROOKS, 2009). Cerca de 70% da glicose absorvida pelo adipócito é transformada em lactato por meio da glicólise anaeróbica (MUÑOZ et al., 2010), sendo assim, o baixo consumo de oxigênio pelo TA pode explicar por que há uma utilização significativa da glicose nessa via metabólica (HODSON et al., 2013).

O foco principal do TAB é a conversão de glicose em ácidos graxos e a liberação desses ácidos graxos através da hidrólise dos acilgliceróis (RANDLE, 1998). Este processo é associado aos efeitos da hipóxia no TAB, sendo um dos fatores para o desenvolvimento da inflamação (TAYLOR et al., 2014).

A formação de lactato *in vivo* foi identificada em várias regiões do TAB em condições basais (ROMERO et al., 2015) e também em ratos submetidos a uma dieta de cafeteria (ARRIARÁN et al., 2015). Estudos *in vivo* mostram que o TAB consome muito pouco oxigênio (HODSON et al., 2013) e que células 3T3-L1 cultivadas são praticamente anaeróbicas, o que faz com que acabem produzindo grandes quantidades de lactato às custas da glicose (SABATER et al., 2014).

A partir desses estudos apresentados é possível dizer que existem algumas evidências sugerindo que o lactato pode desempenhar um papel na fisiopatologia da obesidade e suas complicações metabólicas. Porém ainda são necessárias mais pesquisas para entender completamente se existe qualquer interação potencial entre o lactato, a obesidade e o T3. Pois indiretamente estão relacionados por meio do metabolismo energético, já que o T3 pode aumentar a taxa metabólica basal, aumentando a termogênese, promovendo a utilização de energia e o lactato é gerado como resultado da produção de energia.

Os demais metabólitos significativamente identificados nas análises metabolômicas, alfa-cetoglutarato, L-carnitina, isovalerilcarnitina, butirilcarnitina e lisofosfatidilcolina, tiveram sua expressão diminuída pelo tratamento com T3.

O alfa-cetoglutarato (AKG) é um intermediário crucial do ciclo de Krebs, que desempenha funções fundamentais no metabolismo e na fisiologia celular

(LIU; HE; YAO, 2018). Ele é sintetizado a partir de glicose ou oxaloacetato em conjunto com piruvato, no ciclo do ácido tricarboxílico, e desempenha um papel importante em diversas vias metabólicas, incluindo a produção de energia nas mitocôndrias, na oxidação de ácidos graxos e na síntese de aminoácidos e glicose (HE et al., 2015).

O AKG tem sido objeto de estudo em relação à obesidade devido ao seu papel no metabolismo celular e na regulação do peso corporal (TIAN et al., 2020). Embora não haja uma compreensão completa de todos os seus efeitos sobre a obesidade, algumas pesquisas sugerem que o AKG pode influenciar indiretamente o metabolismo dos lipídios e o controle do peso (YUAN et al., 2022).

Um estudo realizado com camundongos de meia idade mostrou que o AKG promove adipogênese e previne a obesidade, por ser capaz de estimular a função termogênica nos adipócitos por meio do fator de transcrição PRDM16 que desempenha um papel fundamental na regulação da adipogênese marrom e no escurecimento dos adipócitos brancos, processo fundamental para que ocorra a desmetilação ativa do DNA, que depende totalmente do AKG como cofator (TIAN et al., 2020).

Neste mesmo estudo foi observado uma redução gradual na concentração circulatória AKG com o avanço da idade dos camundongos, a partir disso, foi feita a suplementação de AKG nesses animais, que se mostrou capaz de reduzir os níveis de citocinas inflamatórias, como IL-2, IL-6 e TNF- α , promovendo uma vida mais longa e saudável neste modelo experimental (TIAN et al., 2020).

Corroborando aos achados de Gyanwali et al., que demonstraram que o AKG, atuando como antioxidante, tem uma contribuição significativa para prolongar a expectativa de saúde humana (GYANWALI et al., 2022). Assim como, os achados de Asadi Shahmirzadi et al., onde uma dieta suplementada com AKG aumentou a longevidade de camundongos ambos os sexos, bem como melhorou a expectativa de saúde, reduziu a morbidade, e a inflamação crônica, além de induzir a secreção de IL-10 (ASADI SHAHMIRZADI et al., 2020).

AKG é considerado uma substância antioxidante capaz de aumentar significativamente a atividade das enzimas antioxidantes (MAILLOUX et al., 2009), como a superóxido dismutase (SOD), enquanto reduz o nível de

malondialdeído (MDA), indicando uma melhora na capacidade antioxidante ajudando a eliminar espécies reativas de oxigênio (ROS) do organismo (LIU; HE; YAO, 2018). Tanto os resultados in vivo quanto in vitro indicam que o AKG pode ser promissor na redução do estresse oxidativo em estudos com animais e humanos, por ser capaz de modular a expressão de importantes alvos relacionados aos antioxidantes (HE et al., 2018).

A partir das evidências apresentadas, fica claro que o AKG desempenha múltiplos papéis no metabolismo, o que sugere sua importância no contexto da obesidade. No entanto, apesar das descobertas promissoras e seus efeitos benéficos na adipogênese, regulação do estresse oxidativo e longevidade, ainda não é possível estabelecer uma relação clara entre o AKG, obesidade e o T3. Portanto, são necessárias mais pesquisas para elucidar os mecanismos e as interações entre esses elementos, a fim de melhor compreender seu potencial terapêutico na prevenção e tratamento da obesidade e de condições metabólicas relacionadas.

Outros 3 metabólitos identificados a partir da análise metabolômica, são da mesma família, a L-carnitina, isovalerilcarnitina e butirilcarnitina, os quais, tiveram sua expressão diminuída após o tratamento com T3.

A L-carnitina é um composto sintetizado no fígado, rins e cérebro, a partir dos aminoácidos lisina e metionina (REBOUCHE; ENGEL, 1980). Ela desempenha um papel importante no metabolismo dos ácidos graxos, principalmente no transporte de ácidos graxos de cadeia longa do citoplasma para dentro das mitocôndrias, onde são oxidados para produzir energia, essa oxidação de ácidos graxos é uma das principais formas pelas quais o corpo queima gordura para obter energia (PENG et al., 2013).

Este metabólito começou ser de interesse na comunidade científica (COELHO et al., 2010), especialmente no contexto do exercício físico e da perda de peso, justamente por seu papel na oxidação lipídica e passou a ser conhecida como "fat burner", (SILVÉRIO; CAPERUTO; SEELAENDER, 2009). Um estudo com adipócitos 3T3-L1, verificou que a L-carnitina possui ação anti-obesidade, pois é capaz de modular o metabolismo dos lipídeos, estimulando tanto a lipólise quanto a β -oxidação (LEE et al., 2006).

A L-carnitina também possui papel na manutenção da taxa de acetilCoA na célula (SILVÉRIO; CAPERUTO; SEELAENDER, 2009). Esse processo

acontece quando as acilcarnitinas são formadas, pois ocorre a transferência de um grupo acil da coenzima A para uma molécula de L-carnitina, formando duas formas de carnitina, a isovalerilcarnitina e a butirilcarnitina, que estão ligadas a ácidos graxos de cadeia média, como o ácido isovalérico e o ácido butírico, respectivamente (HOBERT; BROSE; PASQUALI, 2022).

Embora não haja uma ligação direta entre os metabólitos L-carnitina, isovalerilcarnitina e butirilcarnitina e o T3, eles podem interagir de maneira complexa no contexto do metabolismo energético, onde o T3 é capaz de regular a taxa metabólica basal e a produção de energia no corpo (NUNES, 2003), e também por meio do metabolismo lipídico, aumentando a taxa de lipólise e a oxidação de ácidos graxos (NUNES, 2003).

Essas variações específicas de carnitina desempenham um papel fundamental tanto no metabolismo lipídico quanto no metabolismo energético e podem ter uma variedade de efeitos no corpo humano. Sendo assim, as acilcarnitinas são promissoras como biomarcadores, porém existem poucos estudos que exploram a relação entre acilcarnitinas e seus potenciais desfechos, o que destaca a necessidade de mais pesquisas nessa área (DAVIES et al., 2023).

A lisofosfatidilcolina também foi identificada nas análises metabolômicas e teve sua expressão diminuída pelo tratamento com T3. Por muito tempo, os lisofosfolipídios (LPLs) foram considerados apenas componentes estruturais e de armazenamento celular, pesquisas recentes demonstram que alguns LPLs atuam como moléculas sinalizadoras semelhantes a hormônios. Esses LPLs desempenham papéis cruciais na comunicação inter e intracelulares, ativando receptores específicos na membrana celular e/ou receptores nucleares que regulam diversos processos fisiológicos (DRZAZGA; SOWIŃSKA; KOZIOŁKIEWICZ, 2014).

A lisofosfatidilcolina é um componente significativo dos fosfolipídios da lipoproteína de baixa densidade oxidada (Ox-LDL) (COLE; VANCE; VANCE, 2012), é derivada da quebra da fosfatidilcolina e é metabolizada em diferentes substâncias por meio de várias vias enzimáticas (BELLOT et al., 2023). Cada vez mais, é reconhecida como um biomarcador chave em estados patológicos, especialmente na DM2, obesidade (REN et al., 2022), inflamação aguda e crônica e aterosclerose (SCHMITZ; RUEBSAAMEN, 2010).

Auguet et al., realizaram um estudo metabolômico usando amostras de soro de uma coorte bem caracterizada de mulheres com obesidade mórbida em comparação com mulheres saudáveis com peso normal, e observaram que as mulheres obesas apresentavam níveis de lisofosfatidilcolina mais baixos que as saudáveis (AUGUET et al., 2023). O que coincide com o estudo de Kim et al., onde foram investigadas as diferenças no perfil metabolômico de homens com sobrepeso/obesidade e com peso normal, mostrando baixos níveis de lisofosfatidilcolina na obesidade (KIM et al., 2010).

Uma revisão bibliográfica, avaliou se os níveis corporais de fosfatidilcolina e lisofosfatidilcolina são biomarcadores potencialmente confiáveis na obesidade, e mostrou que como esta patologia está associada a um estado de inflamação crônica de baixo grau, o perfil lipídico sofre alterações neste contexto, a fosfatidilcolina e a lisofosfatidilcolina são consideradas biomarcadores confiáveis nesta condição (BELLOT et al., 2023).

Sattler et al. realizaram uma abordagem metabolômica a fim de identificar possíveis biomarcadores de pré-diabetes, com o objetivo de prevenir, em uma fase mais precoce, o DM2 em indivíduos pré-diabéticos com tolerância diminuída à glicose, sendo que um desses metabólitos identificados foi a lisofosfatidilcolina. Os níveis mais baixos de lisofosfatidilcolina foram considerados preditores não apenas para tolerância à glicose diminuída, mas também para DM2 (WANG-SATTTLER et al., 2012).

Atualmente, não existem evidências que indiquem uma relação específica entre a lisofosfatidilcolina e o T3. No entanto, considerando que a lisofosfatidilcolina está envolvida em processos inflamatórios e aterosclerose, e que o T3 pode influenciar indiretamente esses processos, é possível que haja interações indiretas entre essas moléculas em determinados contextos fisiológicos ou patológicos, porém, seriam necessárias mais pesquisas para entender completamente qualquer interação potencial entre esses dois elementos.

Podemos concluir que o T3 exerce influência sobre o perfil metabolômico de adipócitos 3T3-L1, principalmente no metabolismo da glicina, proporcionando um possível papel protetor em ambientes inflamatórios, tornando-se um potencial alvo terapêutico para reduzir a inflamação causada na obesidade, porém são necessários mais estudos para elucidar os mecanismos envolvidos.

9. CONCLUSÃO

O T3 exerce influência sobre o perfil metabólico de adipócitos 3T3-L1, principalmente no metabolismo da glicina.

REFERÊNCIAS

- AFFOURTIT, C.; QUINLAN, C. L.; BRAND, M. D. Measurement of proton leak and electron leak in isolated mitochondria. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 810, p. 165–182, 2012.
- AGUAYO-CERÓN, K. A. et al. Glycine: The Smallest Anti-Inflammatory Micronutrient. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 14, p. 11236, 8 jul. 2023.
- ALARCON-AGUILAR, F. J. et al. Glycine regulates the production of pro-inflammatory cytokines in lean and monosodium glutamate-obese mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 599, n. 1, p. 152–158, 3 dez. 2008.
- ALMANZA-PEREZ, J. C. et al. Glycine regulates inflammatory markers modifying the energetic balance through PPAR and UCP-2. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 64, n. 8, p. 534–540, 1 out. 2010.
- AMIN, M. N. et al. How the association between obesity and inflammation may lead to insulin resistance and cancer. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 13, n. 2, p. 1213–1224, 1 mar. 2019.
- ARRIARÁN, S. et al. Evidences of Basal Lactate Production in the Main White Adipose Tissue Sites of Rats. Effects of Sex and a Cafeteria Diet. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0119572, 5 mar. 2015.
- ASADI SHAHMIRZADI, A. et al. Alpha-Ketoglutarate, an Endogenous Metabolite, Extends Lifespan and Compresses Morbidity in Aging Mice. **Cell metabolism**, v. 32, n. 3, p. 447– 456.e6, 1 set. 2020.
- AU, A. Chapter Two - Metabolomics and Lipidomics of Ischemic Stroke. Em: MAKOWSKI, G. S. (Ed.). **Advances in Clinical Chemistry**. [s.l.] Elsevier, 2018. v. 85p. 31–69.
- AUGUET, T. et al. LC/MS-Based Untargeted Metabolomics Analysis in Women with Morbid Obesity and Associated Type 2 Diabetes Mellitus. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 9, p. 7761, 24 abr. 2023.
- AYDIN, S. Three new players in energy regulation: preptin, adropin and irisin. **Peptides**, v. 56, p. 94–110, jun. 2014.
- BATISTA FILHO, M.; RISSIN, A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. suppl 1, p. S181–S191, 2003.
- BELLOT, P. E. N. R. et al. Are Phosphatidylcholine and Lysophosphatidylcholine Body Levels Potentially Reliable Biomarkers in Obesity? A Review of Human Studies. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 67, n. 7, p. e2200568, abr. 2023.
- BENTO, B. DE C. Análise estatística de dados de metabolômica: identificação dos compostos envolvidos na resposta das plantas à simbiose com fungos ectomicorrízicos. 2020.
- BOSTRÖM, P. et al. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. **Nature**, v. 481, n. 7382, p. 463–468, 11 jan. 2012.
- BROOKS, G. A. Cell–cell and intracellular lactate shuttles. **The Journal of Physiology**, v. 587, n. Pt 23, p. 5591–5600, 1 dez. 2009.
- CANUTO, G. et al. METABOLÔMICA: DEFINIÇÕES, ESTADO-DA-ARTE E APLICAÇÕES REPRESENTATIVAS. **Química Nova**, 2017.
- CASTILLO-QUAN, J. I. From white to brown fat through the PGC-1 α -dependent myokine irisin: implications for diabetes and obesity. **Disease Models & Mechanisms**, v. 5, n. 3, p. 293–295, maio 2012.
- CHEN, K. et al. Adipose-targeted triiodothyronine therapy counteracts obesity-related metabolic complications and atherosclerosis with negligible side effects. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 7838, 20 dez. 2022.
- COELHO, C. D. F. et al. A suplementação de L-carnitina não promove alterações na taxa metabólica de repouso e na utilização dos substratos energéticos em indivíduos ativos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 54, n. 1, p. 37–44, fev. 2010.
- COLE, L. K.; VANCE, J. E.; VANCE, D. E. Phosphatidylcholine biosynthesis and lipoprotein metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, Triglyceride Metabolism and Disease**. v. 1821, n. 5, p. 754–761, 1 maio 2012.
- CONSIDINE, R. V. et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. **The New England Journal of Medicine**, v. 334, n. 5, p. 292–295, 1 fev. 1996.
- CONTRERAS-NUÑEZ, E. et al. Participation of the IKK- α/β complex in the inhibition of the TNF- α /NF- κ B pathway by glycine: Possible involvement of a membrane receptor specific to adipocytes. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 102, p. 120–131, 1 jun. 2018.
- D’ALESSANDRO, M. E. et al. Time course of adipose tissue dysfunction associated with

antioxidant defense, inflammatory cytokines and oxidative stress in dyslipemic insulin resistant rats. **Food & Function**, v. 6, n. 4, p. 1299–1309, abr. 2015.

DAVIES, A. et al. Short and medium chain acylcarnitines as markers of outcome in diabetic and non-diabetic subjects with acute coronary syndromes. **International Journal of Cardiology**, v. 389, 15 out. 2023.

DE HEREDIA, F. P.; GÓMEZ-MARTÍNEZ, S.; MARCOS, A. Obesity, inflammation and the immune system. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 71, n. 2, p. 332–338, maio 2012.

DE OLIVEIRA, M. et al. The roles of triiodothyronine and irisin in improving the lipid profile and directing the browning of human adipose subcutaneous cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 506, p. 110744, 15 abr. 2020.

DE-CLEVA, R. et al. LACTATO PODE SER MARCADOR DA SÍNDROME METABÓLICA NA OBESIDADE GRAVE? **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, v. 34, p. e1579, 11 jun. 2021.

DRZAZGA, A.; SOWIŃSKA, A.; KOZIOŁKIEWICZ, M. Lysophosphatidylcholine and lysophosphatidylinositol--novel promising signaling molecules and their possible therapeutic activity. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 71, n. 6, p. 887–899, 2014.

DUNN, W. B. et al. Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 1, p. 387–426, jan. 2011.

ENERBÄCK, S. Brown adipose tissue in humans. **International Journal of Obesity (2005)**, v. 34 Suppl 1, p. S43-46, out. 2010.

ERCAN, Z. et al. The Effect of Irisin on Thyroid Hormone Levels in Chronic Paroxetine-Treated Rats. **Biological Trace Element Research**, v. 201, n. 2, p. 810–815, 1 fev. 2023.

FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, A. et al. Inflammation, Oxidative Stress, and Obesity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 5, p. 3117–3132, maio 2011.

FIEHN, O. Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, v. 48, n. 1–2, p. 155–171, jan. 2002.

FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. O tecido adiposo como órgão endócrino: da teoria à prática. **Jornal de Pediatria**, v. 83, p. S192–S203, nov. 2007a.

FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. **Jornal de Pediatria**, v. 83, p. S192–S203, nov. 2007b.

FONTENELLE, L. C. et al. Thyroid Function in Human Obesity: Underlying Mechanisms. **Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Metabolisme**, v. 48, n. 12, p. 787–794, dez. 2016.

FRIGOLET, M. E.; GUTIÉRREZ-AGUILAR, R. The colors of adipose tissue. **Gaceta Medica De Mexico**, v. 156, n. 2, p. 142–149, 2020.

FROH, M.; THURMAN, R. G.; WHEELER, M. D. Molecular evidence for a glycine-gated chloride channel in macrophages and leukocytes. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 283, n. 4, p. G856-863, out. 2002.

GAMEIRO, A. et al. Os neurotransmissores glicina e GABA estimulam a liberação do peptídeo 1 semelhante ao glucagon da linhagem celular GLUTag - Gameiro - 2005 - The Journal of Physiology - Wiley Online Library. Disponível em: <<https://physoc.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1113/jphysiol.2005.098962>>. Acesso em: 11 abr. 2024.

GANNON, M. C.; NUTTALL, J. A.; NUTTALL, F. Q. A resposta metabólica à glicina ingerida 1 2 3. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, n. 6, p. 1302–1307, 1 dez. 2002.

GESTA, S.; TSENG, Y.-H.; KAHN, C. R. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. **Cell**, v. 131, n. 2, p. 242–256, 19 out. 2007.

GRATTAGLIANO, I. et al. Oxidative stress-induced risk factors associated with the metabolic syndrome: a unifying hypothesis. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 19, n. 8, p. 491–504, 1 ago. 2008.

GUASCH-FERRÉ, M. et al. Metabolomics in Prediabetes and Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis. **Diabetes Care**, v. 39, n. 5, p. 833–846, 1 maio 2016.

GUTIÉRREZ-ROJAS, R. A. et al. Glycine Effect on the Expression Profile of Orphan Receptors GPR21, GPR26, GPR39, GPR82 and GPR6 in a Model of Inflammation in 3T3-L1 Cells. **Life**, v. 12, n. 11, p. 1687, nov. 2022.

GYANWALI, B. et al. Alpha-Ketoglutarate dietary supplementation to improve health in humans. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 33, n. 2, p. 136–146, fev. 2022.

HE, L. et al. The Physiological Basis and Nutritional Function of Alpha-ketoglutarate. **Current Protein & Peptide Science**, v. 16, n. 7, p. 576–581, 2015.

HE, L. et al. Prevention of Oxidative Stress by α -Ketoglutarate via Activation of CAR Signaling and Modulation of the Expression of Key Antioxidant-Associated Targets in Vivo and in Vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 43, p. 11273–11283, 31 out. 2018.

HOBERT, J. A.; BROSE, S. A.; PASQUALI, M. Quantitation of Butyrylcarnitine, Isobutyrylcarnitine, and Glutarylcarnitine in Urine Using Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 2546, p. 83–94, 2022.

HODSON, L. et al. Metabolic Signatures of Human Adipose Tissue Hypoxia in Obesity. **Diabetes**, v. 62, n. 5, p. 1417–1425, maio 2013.

HUR, M. et al. A global approach to analysis and interpretation of metabolic data for plant natural product discovery. **Natural product reports**, v. 30, n. 4, p. 565, abr. 2013.

IBRAHIM, M. M. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. **Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 11, n. 1, p. 11–18, jan. 2010.

JASTROCH, M. et al. Mitochondrial proton and electron leaks. **Essays in Biochemistry**, v. 47, p. 53–67, 2010.

JUHAN-VAGUE, I. et al. Plasminogen activator inhibitor-1, inflammation, obesity, insulin resistance and vascular risk. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 1, n. 7, p. 1575–1579, 1 jul. 2003.

KERN, L. et al. Obesity-Induced TNF α and IL-6 Signaling: The Missing Link between Obesity and Inflammation—Driven Liver and Colorectal Cancers. **Cancers**, v. 11, n. 1, p. 24, 27 dez. 2018.

KIM, J. Y. et al. Metabolic profiling of plasma in overweight/obese and lean men using ultra performance liquid chromatography and Q-TOF mass spectrometry (UPLC-Q-TOF MS). **Journal of Proteome Research**, v. 9, n. 9, p. 4368–4375, 3 set. 2010.

LEE, M.-S. et al. L-carnitine stimulates lipolysis via induction of the lipolytic gene expression and suppression of the adipogenic gene expression in 3T3-L1 adipocytes. **Journal of Medicinal Food**, v. 9, n. 4, p. 468–473, 2006.

LIDELL, M. E.; ENERBÄCK, S. Brown adipose tissue—a new role in humans? **Nature Reviews. Endocrinology**, v. 6, n. 6, p. 319–325, jun. 2010.

LIMA-SILVA, A. E.; ADAMI, F.; NAKAMURA, F. Y. METABOLISMO DE GORDURA DURANTE O EXERCÍCIO FÍSICO: MECANISMOS DE REGULAÇÃO. 2006.

LIU, S.; HE, L.; YAO, K. The Antioxidative Function of Alpha-Ketoglutarate and Its Applications. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 3408467, 21 mar. 2018.

LIU, Y. et al. Global prevalence of osteosarcopenic obesity amongst middle aged and older adults: a systematic review and meta-analysis. **Archives of Osteoporosis**, v. 18, n. 1, p. 60, 2 maio 2023.

MAAK, S. et al. Progress and Challenges in the Biology of FNDC5 and Irisin. **Endocrine Reviews**, v. 42, n. 4, p. 436–456, 16 jul. 2021.

MAILLOUX, R. J. et al. α -Ketoglutarate Dehydrogenase and Glutamate Dehydrogenase Work in Tandem To Modulate the Antioxidant α -Ketoglutarate during Oxidative Stress in *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 12, p. 3804–3810, jun. 2009.

MALISZEWSKA, K.; KRETOWSKI, A. Brown Adipose Tissue and Its Role in Insulin and Glucose Homeostasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 4, p. 1530, 3 fev. 2021.

MANCINI, A. et al. Thyroid Hormones, Oxidative Stress, and Inflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, p. 6757154, 2016.

MELO, S. P. DA S. DE C. et al. Sobrepeso, obesidade e fatores associados aos adultos em uma área urbana carente do Nordeste Brasileiro. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 23, p. e200036, 18 maio 2020.

MESQUITA, C. S. et al. Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 458, p. 69–71, 1 ago. 2014.

MIHARA, M.; UCHIYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Analytical Biochemistry**, v. 86, n. 1, p. 271–278, maio 1978.

MUÑOZ, S. et al. Chronically increased glucose uptake by adipose tissue leads to lactate production and improved insulin sensitivity rather than obesity in the mouse. **Diabetologia**, v. 53, n. 11, p. 2417–2430, nov. 2010.

NUNES, M. T. Hormônios tireoideanos: mecanismo de ação e importância biológica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, p. 639–643, dez. 2003.

OBREGON, M.-J. Thyroid hormone and adipocyte differentiation. **Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association**, v. 18, n. 2, p. 185–195, fev. 2008.

O'BRIEN, P. E.; DIXON, J. B. The extent of the problem of obesity. **American Journal of Surgery**, v. 184, n. 6B, p. 4S-8S, dez. 2002.

OKEKUNLE, A. P. et al. Abnormal circulating amino acid profiles in multiple metabolic disorders. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 132, p. 45–58, 1 out. 2017.

OLIVEIRA, M. DE et al. Modulação dos receptores de hormônio tireoideano, TR α e TR β , utilizando diferentes doses de triiodotironina (T3) em diferentes tempos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 57, p. 368–374, jul. 2013a.

OLIVEIRA, M. DE et al. Triiodothyronine Increases mRNA and Protein Leptin Levels in Short Time in 3T3-L1 Adipocytes by PI3K Pathway Activation. **PLOS ONE**, v. 8, n. 9, p. e74856, 18 set. 2013b.

OLIVEIRA, L. P. M. et al. Fatores associados a excesso de peso e concentração de gordura abdominal em adultos na cidade de Salvador, Bahia, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, n. 3, p. 570–582, mar. 2009.

OLIVER, S. G. et al. Systematic functional analysis of the yeast genome. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 373–378, 1 set. 1998.

O'ROURKE, R. W. Adipose tissue and the physiologic underpinnings of metabolic disease. **Surgery for Obesity and Related Diseases: Official Journal of the American Society for Bariatric Surgery**, v. 14, n. 11, p. 1755–1763, nov. 2018.

OUCHI, N. et al. Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. **Current Opinion in Lipidology**, v. 14, n. 6, p. 561–566, dez. 2003.

PANG, Z. et al. MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. W1, p. W388–W396, 2 jul. 2021.

PANVELOSKI-COSTA, A. C. et al. Beneficial effects of thyroid hormone on adipose inflammation and insulin sensitivity of obese Wistar rats. **Physiological Reports**, v. 6, n. 3, p. e13550, 1 fev. 2018.

PARK, K. W.; HALPERIN, D. S.; TONTONZOZ, P. Before they were fat: adipocyte progenitors. **Cell Metabolism**, v. 8, n. 6, p. 454–457, dez. 2008.

PENG, M. et al. Measurement of free carnitine and acylcarnitines in plasma by HILIC-ESI-MS/MS without derivatization. **Journal of Chromatography B**, v. 932, p. 12–18, 1 ago. 2013.

RANDLE, P. J. Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. **Diabetes/Metabolism Reviews**, v. 14, n. 4, p. 263–283, dez. 1998.

RAZVI, S. et al. Triiodothyronine (T3), inflammation and mortality risk in patients with acute myocardial infarction. **European Thyroid Journal**, v. 11, n. 2, p. e210085, 9 fev. 2022.

REBOUCHE, C. J.; ENGEL, A. G. Tissue distribution of carnitine biosynthetic enzymes in man. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 630, n. 1, p. 22–29, 5 jun. 1980.

REINEHR, T. Obesity and thyroid function. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 316, n. 2, p. 165–171, 25 mar. 2010.

REN, J. et al. Lysophosphatidylcholine: Potential Target for the Treatment of Chronic Pain. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 15, p. 8274, 27 jul. 2022a.

REN, Y. et al. Adipokines, Hepatokines and Myokines: Focus on Their Role and Molecular Mechanisms in Adipose Tissue Inflammation. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, p. 873699, 2022b.

RIBEIRO, M. O. et al. Expression of Uncoupling Protein 1 in Mouse Brown Adipose Tissue Is Thyroid Hormone Receptor- β Isoform Specific and Required for Adaptive Thermogenesis. **Endocrinology**, v. 151, n. 1, p. 432–440, jan. 2010.

ROBINSON, M. D.; OSHLACK, A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. **Genome Biology**, v. 11, n. 3, p. R25, 2010.

ROMERO, M. DEL M. et al. Glycerol Production from Glucose and Fructose by 3T3-L1 Cells: A Mechanism of Adipocyte Defense from Excess Substrate. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. e0139502, 1 out. 2015.

ROSA, G. et al. Tejido adiposo, hormonas metabólicas y ejercicio físico. **Revista Andaluza de Medicina del Deporte**, v. 6, n. 2, p. 78–84, jun. 2013.

SÁ, N. N. B. D.; MOURA, E. C. D. Excesso de peso: determinantes sociodemográficos e comportamentais em adultos, Brasil, 2008. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 27, n. 7, p. 1380–1392, jul. 2011.

SABATER, D. et al. The use of Transwells™ improves the rates of differentiation and growth of cultured 3T3L1 cells. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 16, p. 5605–5610, jun. 2013.

SABATER, D. et al. Cultured 3T3L1 adipocytes dispose of excess medium glucose as lactate under abundant oxygen availability. **Scientific Reports**, v. 4, p. 3663, 13 jan. 2014.

SAMY, D. M.; ISMAIL, C. A.; NASSRA, R. A. Circulating Irisin Concentrations in Rat Models of Thyroid Dysfunction — Effect of Exercise. **Metabolism**, v. 64, n. 7, p. 804–813, 1 jul. 2015.

SCHMIDT, M. I. et al. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. **The Lancet**, v. 377, n. 9781, p. 1949–1961, jun. 2011.

SCHMITZ, G.; RUEBSAAMEN, K. Metabolism and atherogenic disease association of lysophosphatidylcholine. **Atherosclerosis**, v. 208, n. 1, p. 10–18, jan. 2010.

SILVA, J. E. Thyroid hormone control of thermogenesis and energy balance. **Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association**, v. 5, n. 6, p. 481–492, dez. 1995.

SILVA, J. E. Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. **Physiological Reviews**, v. 86, n. 2, p. 435–464, abr. 2006.

SILVÉRIO, R.; CAPERUTO, É. C.; SEELAENDER, M. C. L-Carnitina: além do metabolismo de lipídios. **Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte**, v. 8, n. 1, 25 nov. 2009.

SPEAKMAN, J. R. FTO effect on energy demand versus food intake. **Nature**, v. 464, n. 7289, p. E1; discussion E2, 1 abr. 2010.

STRĄCZKOWSKI, M. et al. Adipose Tissue and Skeletal Muscle Expression of Genes Associated with Thyroid Hormone Action in Obesity and Insulin Resistance. **Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association**, v. 32, n. 2, p. 206–214, fev. 2022.

TAKASHINA, C. et al. Associations among the plasma amino acid profile, obesity, and glucose metabolism in Japanese adults with normal glucose tolerance. **Nutrition & Metabolism**, v. 13, n. 1, p. 5, 19 jan. 2016.

TAYLOR, C. T. et al. Human adipocytes are highly sensitive to intermittent hypoxia induced NF-kappaB activity and subsequent inflammatory gene expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 447, n. 4, p. 660–665, 16 maio 2014.

TIAN, Q. et al. Dietary alpha-ketoglutarate promotes beige adipogenesis and prevents obesity in middle-aged mice. **Aging Cell**, v. 19, n. 1, p. e13059, jan. 2020.

VARGAS-CASTILLO, A. et al. Understanding the Biology of Thermogenic Fat: Is Browning A New Approach to the Treatment of Obesity? **Archives of Medical Research**, v. 48, n. 5, p. 401–413, jul. 2017.

VIGUERIE, N. et al. Regulation of human adipocyte gene expression by thyroid hormone. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 87, n. 2, p. 630–634, fev. 2002.

WANDERLEY, E. N.; FERREIRA, V. A. Obesidade: uma perspectiva plural. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, p. 185–194, jan. 2010.

WANG, W. et al. Glycine Stimulates Protein Synthesis and Inhibits Oxidative Stress in Pig Small Intestinal Epithelial Cells. **The Journal of Nutrition**, v. 144, n. 10, p. 1540–1548, 1 out. 2014.

WANG-SATTLE, R. et al. Novel biomarkers for pre-diabetes identified by metabolomics. **Molecular Systems Biology**, v. 8, p. 615, 25 set. 2012.

WELLEN, K. E.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation, stress, and diabetes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 5, p. 1111–1119, maio 2005.

WHEELER, M. D.; THURMAN, R. G. Production of superoxide and TNF-alpha from alveolar macrophages is blunted by glycine. **The American Journal of Physiology**, v. 277, n. 5, p. L952–959, nov. 1999.

WU, G. Functional Amino Acids in Growth, Reproduction, and Health. **Advances in Nutrition**, v. 1, n. 1, p. 31–37, 1 nov. 2010.

YAN-DO, R. et al. A Glycine-Insulin Autocrine Feedback Loop Enhances Insulin Secretion From Human β -Cells and Is Impaired in Type 2 Diabetes. **Diabetes**, v. 65, n. 8, p. 2311–2321, 3 maio 2016.

YAU, W. W.; YEN, P. M. Thermogenesis in Adipose Tissue Activated by Thyroid Hormone. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 8, p. 3020, 24 abr. 2020.

YUAN, Y. et al. α -Ketoglutaric acid ameliorates hyperglycemia in diabetes by inhibiting hepatic gluconeogenesis via serpin1e signaling. **Science Advances**, v. 8, n. 18, p. eabn2879, 6 maio 2022.

ZHANG, Y. et al. Irisin stimulates browning of white adipocytes through mitogen-activated protein kinase p38 MAP kinase and ERK MAP kinase signaling. **Diabetes**, v. 63, n. 2, p. 514–525, fev. 2014.

ZHANG, Y. et al. Irisin exerts dual effects on browning and adipogenesis of human white adipocytes. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v. 311, n. 2, p. E530–541, 1 ago. 2016.

ZHANG, Y. et al. Glycine Attenuates LPS-Induced Apoptosis and Inflammatory Cell Infiltration in Mouse Liver. **The Journal of Nutrition**, v. 150, n. 5, p. 1116–1125, 1 maio 2020.

ZHONG, Z. et al. L-Glycine: a novel antiinflammatory, immunomodulatory, and cytoprotective

agent. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 6, n. 2, p. 229–240, mar. 2003.

ZWICK, R. K. et al. Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue. **Cell Metabolism**, v. 27, n. 1, p. 68–83, 9 jan. 2018.

ANEXO – ARTIGO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO COM RESULTADOS GERADOS DURANTE O DOUTORADO

IRISINA DIMINUI BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NA CULTURA DE ADIPÓCITOS VISCERAIS HUMANOS

Helena Paim Tilli^a; Maria Teresa De Sibio^a; Bianca Mariani Gonçalves Meneghim^a; Ester Mariane Vieira^a; Paula Barreto Da Rocha^a; Miriane De Oliveira^a; Lucas Solla Mathias^a; Regiane Marques Castro Olimpio^a; Igor Deprá^a; Virginia Coscrato^a; Vinícius Vigliazzi Peghinelli^a; Camila Renata Corrêa^b; Célia Regina Nogueira^a.

^aDepartment of Internal Medicine, Botucatu Medical School - University of Sao Paulo State (UNESP), Botucatu, SP, Brazil

^bDepartment of Pathology, Botucatu Medical School - University of Sao Paulo State (UNESP), Botucatu, SP, Brazil.

Corresponding Author:

Helena Paim Tilli

São Paulo State University (UNESP), Botucatu Medical School,
District of Rubião Jr, s/n, 18618-000, Botucatu, São Paulo, Brazil.

Telephone: + (55)-14-3881-6213

Fax: + (55)-14-3881-6424

E-mail: hellenatilli@hotmail.com

RESUMO

Introdução: A obesidade é uma doença crônica de causas multifatoriais, que se desenvolve quando o consumo calórico excede o gasto energético e é caracterizada pelo excesso de tecido adiposo (TA). Os hormônios tireoidianos (HT), principalmente a triiodotironina (T3), são fundamentais para a diferenciação do TA. A irisina é uma proteína sintetizada e secretada no músculo esquelético, produzida após o exercício físico, elevando a liberação de temperatura diretamente no TA e com isso a diminuição da gordura. Tanto o T3 quanto a irisina desencadeiam ações que resultam na termogênese e no consumo de energia. Indivíduos com obesidade têm um processo inflamatório crônico e aumento do estresse oxidativo. Portanto, a partir da hipótese que tanto o T3 quanto a Irisina influenciam o metabolismo do TA, tornou-se necessário verificar os indicadores de oxidação em culturas de adipócitos viscerais humanos. **Objetivo:** Avaliar a influência do T3 e da Irisina sobre biomarcadores

de estresse oxidativo em cultura de adipócitos viscerais humanos. **Materiais e métodos:** Foi realizada a cultura celular de pré adipócitos viscerais humanos (AVH), composto por 4 grupos (C): adipócitos sem tratamento; (T3) adipócitos tratados com dose fisiológica de T3 a 10nM por 24h (I), adipócitos tratados com Irisina 20nM por 24h e (T3+I): adipócitos tratados com dose fisiológica de T3 a 10nM + Irisina 20nM por 24h. Foi mensurada em leitor de microplaca a concentração de Estresse Oxidativo por meio de malondialdeído (MDA) nas leituras 532nm e 600nm e para Carbonilação Proteica (CP) na leitura 450 nm , o resultado final foi expresso em nmol/mg de proteínas. **Resultados:** A concentração de MDA apresentou uma diminuição nas comparações dos grupos C vs I (26429 ± 1669 vs 19885 ± 1170 $p < 0,001$); T3 vs T3+I (24951 ± 1167 vs 19885 ± 1170 $p < 0,05$); em concordância com os níveis de CP C vs I ($365 \pm 17,4$ vs $330 \pm 10,4$ $p < 0,05$); T3 vs T3+I ($374 \pm 14,8$ vs $334 \pm 16,5$ $p < 0,05$); observamos com essas comparações tanto para MDA quanto CP que a Irisina promoveu uma melhora nos indicadores de oxidação. Quando comparados os grupos C vs T3 e I vs T3+I, não apresentaram resultados significativos tanto para análise de CP quanto para MDA. Mostrando que as diferenças nos grupos ocorreram quando as células estavam na presença da irisina e que a dose fisiológica de T3 não interferiu nos resultados. **Conclusão:** A Irisina diminuiu biomarcadores de estresse oxidativo em cultura de AVH, porém a dose fisiológica de T3 não influenciou o metabolismo do TA, sugerindo a Irisina como um potencial alvo terapêutico para o tratamento da obesidade.

ABSTRACT

Introduction: Obesity is a chronic disease of multifactorial causes, which develops when caloric consumption exceeds energy expenditure and is characterized by excess adipose tissue (AT). Thyroid hormones (TH), especially triiodothyronine (T3), are essential for the differentiation of AT. Irisin is a protein synthesized and secreted in the skeletal muscle, produced after physical exercise, increasing the release of temperature directly in the AT, and with that, the reduction of fat. Both T3 and irisin trigger actions that result in thermogenesis and energy consumption. Individuals with obesity have a chronic inflammatory process and increased oxidative stress. Therefore, based on the hypothesis that

both T3 and irisin influence AT metabolism, it became necessary to verify the oxidation indicators in human visceral adipocyte culture. **Objective:** Evaluate the influence of T3 and Irisin on oxidative stress biomarkers in human visceral adipocyte culture. **Materials and Methods:** Cell culture of human visceral preadipocytes (AVH) performed, composed of 4 groups (C): untreated adipocytes; (T3) adipocytes treated with a physiological dose of T3 at 10nM for 24h (I), adipocytes treated with Irisin 20nM for 24h and (T3+I): adipocytes treated with a physiological dose of T3 at 10nM + Irisin 20nM for 24h. The Oxidative Stress concentration was measured in a microplate reader using malondialdehyde (MDA) at 532nm and 600nm readings and Protein Carbonylation (CP) at 450nm readings. The result was expressed in nmol/mg of proteins. **Results:** The concentration of MDA showed a decrease in the comparisons of groups C vs I (26429 ± 1669 vs 19885 ± 1170 $p < 0.001$); T3 vs T3+I (24951 ± 1167 vs 19885 ± 1170 $p < 0.05$); in agreement with CP C vs I levels (365 ± 17.4 vs 330 ± 10.4 $p < 0.05$); T3 vs T3+I (374 ± 14.8 vs 334 ± 16.5 $p < 0.05$); we observed with these comparisons for both MDA and CP that irisin promoted an improvement in oxidation indicators. When comparing groups C versus T3 and I versus T3+I, they did not present significant results on PC and MDA analysis. The difference in the groups occurred when the cells were in the presence of irisin, and the physiological dosage of T3 did not interfere with the results. **Conclusion:** Irisin decreased oxidative stress biomarkers in AVH culture. However, the physiological dosage of T3 did not influence AT metabolism, suggesting irisin is a potential therapeutic target for the treatment of obesity.

INTRODUÇÃO

A obesidade é o distúrbio metabólico de maior prevalência no mundo e já é considerada um problema de saúde pública (LIU et al., 2023), sendo um fator de risco para o desenvolvimento de diversas comorbidades como dislipidemia, aterosclerose, diabetes mellitus (DM), hipertensão arterial (HAS) e resistência à insulina (O'BRIEN; DIXON, 2002; SPEAKMAN, 2010). A obesidade se desenvolve quando o consumo calórico excede o gasto energético (O'BRIEN; DIXON, 2002) e é principalmente caracterizada pelo excesso de tecido adiposo

branco (TAB) (GESTA; TSENG; KAHN, 2007; PARK; HALPERIN; TONTONNOZ, 2008).

Este excesso de TAB tem sido associado ao desenvolvimento de estresse oxidativo (EO), pois ocorre um desequilíbrio entre produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade antioxidante do organismo de indivíduos obesos (FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al., 2011). Sendo assim, o EO pode ser um dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento das comorbidades associadas à obesidade (GRATTAGLIANO et al., 2008).

Outro fator que pode estar associado ao maior nível de EO em obesos é o processo inflamatório crônico, pois o excesso de TAB faz com que os indivíduos obesos apresentem níveis mais elevados de marcadores inflamatórios na circulação quando comparados a indivíduos eutróficos (FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al., 2011; GRATTAGLIANO et al., 2008). Além disso, esse estado pró-inflamatório na obesidade pode estar diretamente ligado ao aumento dos danos oxidativos, via desordens causadas na cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria, o que aumenta a produção de EROs e reduz a defesa antioxidante.

A quantidade e o acúmulo de tecido adiposo visceral (TAV) vem sendo alvo de diversos estudos, pois esse excesso pode elevar o processo inflamatório em indivíduos obesos, ativando a via de sinalização dos neutrófilos, o que resulta na geração de mais EROs (FONSECA-ALANIZ et al., 2007b; OUCHI et al., 2003). Atualmente o tecido adiposo (TA) não é mais considerado apenas um depósito de gordura, mas sim um órgão endócrino, complexo, com ação multifatorial que está envolvido em diversos processos metabólicos, bem como na liberação de inúmeras substâncias (OBREGON, 2008; ZWICK et al., 2018).

Hormônios sintetizados em outros órgãos também são conhecidos por terem efeitos sobre o TAB (BOSTRÖM et al., 2012; ZWICK et al., 2018). A relação do hormônio irisina, descoberto por Boström et al. (BOSTRÖM et al., 2012), com a obesidade e outros hormônios tem sido tema de estudos (AYDIN, 2014; SILVA, 1995). A irisina é segregada como um produto da fibronectina de tipo III, denominada proteína com domínio de conteúdo 5 (FNDC5) no músculo esquelético de humanos e ratos. FNDC5 é estimulada pelo receptor ativado por proliferadores de peroxissoma γ (PPAR γ) e coativador 1 α (PGC1- α) após um exercício (BOSTRÖM et al., 2012), estimulando a expressão de proteína

mitocondrial desacopladora-1 (UCP-1). Quando a UCP-1 é ativada nas mitocôndrias, ela não causa a síntese de adenosina trifosfato (ATP), porque é uma proteína de desacoplamento; em vez disso, ela leva a liberação de energia na forma de temperatura (AFFOURTIT; QUINLAN; BRAND, 2012; JASTROCH et al., 2010), com isso a diminuição da gordura (CASTILLO-QUAN, 2012). Embora o tecido adiposo marrom (TAM) seja conhecido por contribuir para a regulação da temperatura corpórea de neonatos (MALISZEWSKA; KRETOWSKI, 2021), a sua função na fisiologia adulta era desconhecida até a descoberta da irisina (BOSTRÖM et al., 2012).

A irisina pode ser sintetizada em muitos outros tecidos além do músculo esquelético (ERCAN et al., 2023). Esse hormônio tem a capacidade de converter o TAB em TAM, resultando na termogênese e no consumo de energia (BOSTRÖM et al., 2012; LIDELL; ENERBÄCK, 2010). O TAM contém um número extraordinariamente mais elevado de mitocôndrias, em comparação com o TAB (CASTILLO-QUAN, 2012; ENERBÄCK, 2010; LIDELL; ENERBÄCK, 2010). A FND5, que é a precursora da irisina, se mostrou presente em muitos tecidos, incluindo o tecido da tireoide e TAB, apesar de baixos níveis (MAAK et al., 2021; REN et al., 2022b).

Os hormônios tireoidianos (HT) desempenham papéis importantes na regulação da taxa metabólica basal (TMB) e na termogênese, a qual também pode ser afetada pela irisina (ERCAN et al., 2023). Portanto, a função da tireoide pode ser direta ou indiretamente relacionada com a regulação da irisina, ou esta pode afetar a função da tireoide (SILVA, 1995; STRĄCZKOWSKI et al., 2022). Devido a inúmeras semelhanças na ação dos HT e a irisina, é interessante explorar o potencial de influência mútua dessas substâncias no TAB.

Recentemente Samy et. al. (SAMY; ISMAIL; NASSRA, 2015) avaliaram em ratos Wistar em condições de eutireoidismo, hipertireoidismo e hipotireoidismo as concentrações plasmáticas de irisina em resposta ao exercício físico. Ambos hiper e hipotireoidismo estão associados com a alta regulação de irisina no soro de ratos machos, possivelmente, como uma resposta ao dano e/ou miopatia oxidativa observada em ambas as condições (SAMY; ISMAIL; NASSRA, 2015). O exercício agudo, que também está associado com o EO, aumenta a irisina no soro (SAMY; ISMAIL; NASSRA, 2015).

Zangh et al. (ZHANG et al., 2014) verificaram em adipócitos primários subcutâneos de camundongos, 3T3-L1 diferenciada, que a irisina estimula a diferenciação de TAB em TAM, mecanismo chamado de “browning”. Observaram o aumento da expressão de marcadores de TAM, tais como UCP-1 e PGC-1 α , pela administração de irisina (ROBINSON; OSHLACK, 2010; ZHANG et al., 2014).

Em estudos anteriores, em que utilizamos adipócitos, 3T3-L1, para avaliar a ação da triiodotironina (T3) com a participação da via fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) nas adipocinas leptina e adiponectina, e receptor alfa e beta de HT (TR α e TR β) [25, 28], verificamos que o T3 em diferentes doses e em tempos curtos ou longos modula a expressão gênica dos genes citados. Em uma hora de exposição o T3 aumenta a expressão de leptina (OLIVEIRA et al., 2013b) e TR α (OLIVEIRA et al., 2013a) por meio da via PI3K. Portanto atuando em vias importantes do metabolismo adiposo.

Os resultados, previamente observados em TAB demonstram que o T3 e a irisina atuam nas mesmas vias de sinalização e promovem ações semelhantes em vias bioquímicas relacionadas ao metabolismo e que o T3 está associado ao aumento de adiponectina e leptina e desta forma melhora a sensibilidade à insulina. Paralelamente sabemos que a obesidade está relacionada a fatores inflamatórios e estresse oxidativo.

Com o objetivo de elucidar a ação do T3 e irisina no TAV, o principal marcador das doenças inflamatórias ligadas à obesidade, verificamos a ação desses hormônios na modulação do estresse oxidativo.

METODOLOGIA

Reagentes

Visceral Preadipocytes cells HPrAD-vis - Lonza (PT-5005); Preadipocyte Basal Medium-2 PBM-2 (PT-8202); Fetal bovine Serum (PT-9000C); L-glutamine (PT9001C); Penicillin-Streptomycin (PT-9002C), Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (17-512F); Trypsin/EDTA Solution (CC-3232); kit Supplements and growth factors (PT-9502) - h-Insulin (PT-9003C), Dexamethasone (PT-9004C), indometacina (PT-9005C) e isobutylmetilxantina (IBMX - 3-Isobutyl-1-

methylxanthine, PT-9006C); Triiodothyronine (T3) – Sigma (T6397); Irisin (I) - Sigma (SRP8039).

Estudo *in vitro*

Os experimentos e análises foram realizados na Unidade Experimental de Pesquisa (UNIPLEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu, por meio da utilização dos laboratórios e equipamentos multiusuários. Os Pré-adipócitos Viscerais Humanos (Catalog #: PT-5005), foram cultivados em garrafa de 75cm² em estufa úmida a 37°C na presença de 5% de CO₂. Foi utilizado o meio de crescimento de pré-adipócitos (PT-8202 PBM-2 -Preadipocyte Basal Medium-2) suplementado com 10% FBS (Fetal bovine Serum - PT-9000C), 1% de L-glutamina (L-glutamine - PT9001C) e 1% de uma associação de antibióticos (Penicillin-Streptomycin - PT-9002C). As células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato da Dulbecco PBS (# 17-512F) e realizou-se a tripsinização (CC-3232 Trypsin/EDTA Solution). Os pré-adipócitos foram semeados em placas de cultura, até a confluência de aproximadamente 90%, para que os pré-adipócitos fossem induzidos à diferenciação em adipócitos viscerais maduros. Com a utilização de meio de crescimento de pré-(PT-8202 - PBM-2 Preadipocyte Basal Medium-2) suplementado com kit de diferenciação – (PT-9502) - 2% de insulina recombinante (h-Insulin- PT-9003C), 0,2% de Dexamethasone (PT-9004C), 0,4% de indometacina (PT-9005C) e 0,2% de isobutylmetilxantina (IBMX - 3-Isobutyl-1-methylxanthine, PT-9006C). As células foram mantidas com meio de diferenciação por 10 dias. Após a diferenciação, os adipócitos maduros foram submetidos à depleção do HT, com meio de cultivo suplementado com Soro Fetal Charcoal Stripped (Sigma, F6765), por 24 horas. Posteriormente, as células foram submetidas ao tratamento com triiodotironina (T3) (10nM, Sigma, T6397); Irisina (I) (20nM, Sigma SRP8039 -10UG); Triiodotironina + Irisina (T3+I) (10nM e 20nM, respectivamente). Todos os tratamentos foram realizados por 24 horas. Adipócitos não tratados foram considerados grupo controle (C).

Coloração Oil Red

Após a diferenciação, para documentar a diferenciação dos adipócitos e determinar o acúmulo lipídico, foi realizada a coloração com Oil Red (Sigma, O1391). Inicialmente, as células foram lavadas duas vezes com PBS, e fixadas com formaldeído 4% por 30 minutos, em temperatura ambiente. Utilizamos 200µl de corante Oil Red O diluído em água Milli-Q (3:2), que foi incubado por 2 horas a 37°C. As células coradas foram lavadas, e foram mantidas na estufa à 37°C por 30 minutos. As células foram observadas no microscópio, para constataremos a diferenciação, pela coloração em vermelho das gotículas lipídicas.

Malondialdeído (MDA)

Para a quantificação do MDA foram utilizados 250 µL de sobrenadante da cultura celular de adipócitos e 750 µL de ácido tricloroacético 10% para precipitação de proteínas. As amostras foram centrifugadas (3000 rpm; por 5 minutos; Eppendorf® Centrifuge 5804-R, Hamburg, Germany) e o sobrenadante retirado. Foi adicionado ao sobrenadante ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% na proporção (1:1) e em seguida as amostras foram aquecidas durante 45 minutos em banho Maria a 100°C. O MDA reagiu com o TBA na proporção 1:2 MDA-TBA e após resfriamento, foi realizada a leitura a 535 nm em leitor de microplaca Spectra Max 190 (Molecular Devices®, Sunnyvale, CA, USA). A concentração de MDA foi obtida por meio do coeficiente de extinção molar ($1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e das absorbâncias das amostras e o resultado final foi expresso em nmol/g de proteína (MIHARA; UCHIYAMA, 1978).

Carbonilação Proteica (CP)

A CP foi quantificada por método adaptado de Mesquita et al. (2014) (MESQUITA et al., 2014) em 100 µL de sobrenadante cultura de adipócitos para 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (10 mM em HCl 2 M). As amostras foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente e, posteriormente, foi adicionado 50 µL de NaOH (6 M) e incubadas novamente por 10 minutos em temperatura ambiente. A leitura foi realizada a 450 nm em leitor de microplaca

Spectra Max 190 (Molecular Devices®, Sunnyvale, CA, USA) e o resultado obtido da absorbância das amostras e do coeficiente de extinção molar ($22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). O resultado final foi expresso em nmol/mg de proteínas.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Os tratamentos dentro dos grupos foram comparados por análise de variância (ANOVA) para modelos de dois fatores, complementada por teste de comparações múltiplas de Tukey. Os tratamentos entre os grupos foram comparados por ANOVA para modelos com um fator, complementada por teste de comparações múltiplas de Tukey. Valor de $p < 0,05$ será considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Caracterização da diferenciação

Podemos observar na Figura 1 que as células de pré-adipócitos viscerais humanos foram plaqueadas, diferenciadas e coradas com Oil Red para constatar que houve mesmo a diferenciação dos adipócitos (figura 1).

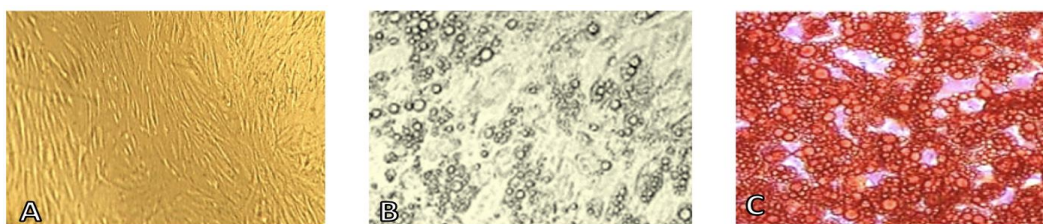


Figura 1. Cultivo celular de pré-adipócitos viscerais. A – Plaqueamento; B- Diferenciação; C - Coloração *Oil Red*.

Irisina associada ou não ao T3 reduz o estresse oxidativo

Para verificarmos se houve estresse oxidativo nas células adiposas após o tratamento com T3 (10nM) e irisina (20nM), avaliamos as dosagens de MDA e CP.

Observamos que o tratamento com irisina (19885 ± 1170) reduziu a dosagem de MDA, quando comparado ao C (26429 ± 1669). O mesmo aconteceu com o grupo T3+I (19885 ± 1170), quando comparado ao grupo T3 (24951 ± 1167) (figura 2).

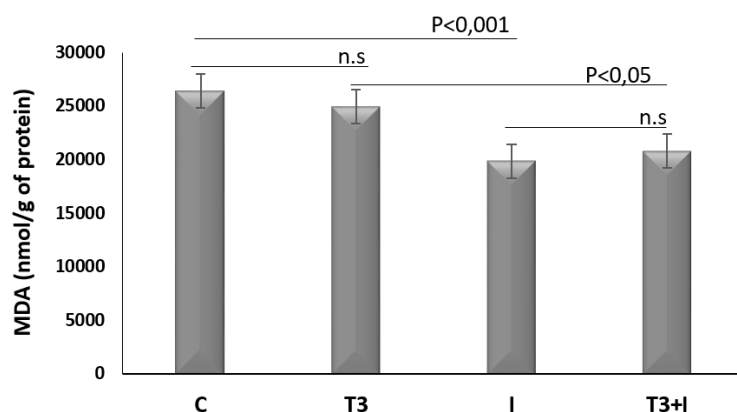


Figura 2. Malondialdeído (MDA). Avaliação do estresse oxidativo nos grupos **C**: controle; **T3**: triiodotironina (10nM); **I**: irisina (20nM); **T3+I**: triiodotironina (10nM) + irisina (20nM); Todos os tratamentos foram realizados por 24 horas. Foram analisados pelo teste ANOVA complementada por Tukey. *P <0,05.

Da mesma forma, os resultados de CP, indicam que a irisina ($330 \pm 10,4$) e T3+I ($334 \pm 16,5$) diminuíram a carbonilação, quando comparados ao grupo C ($365 \pm 17,4$) e T3 ($374 \pm 14,8$), respectivamente (figura 3).

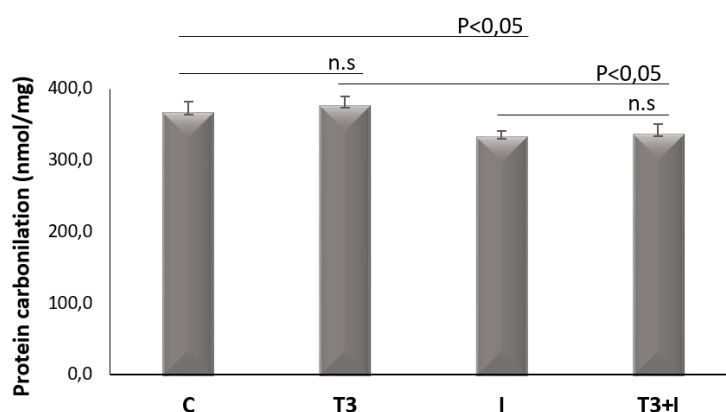


Figura 3. Carbonilação proteica. Avaliação de espécies reativas de oxigênio (EROS) nos seguintes grupos **C**: controle; **T3**: triiodotironina (10nM); **I**: irisina (20nM); **T3+I**: triiodotironina (10nM) + irisina (20nM); Todos os tratamentos foram

realizados por 24 horas. Foram analisados pelo teste ANOVA complementada por Tukey. *P <0,05.

DISCUSSÃO

Demonstramos que o tratamento com irisina na dose de 20 nM é capaz de diminuir biomarcadores de EO como o MDA e a CP, mantendo a integridade celular e mitocondrial essencial para uma termogênese adequada. Paralelamente, T3 na dose de 10 nM não produziu o mesmo efeito.

O TAB é considerado um órgão endócrino, responsável por secretar diversas substâncias fundamentais para funções biológicas específicas (FONSECA-ALANIZ et al., 2007a). Por outro lado, TAV e o EO são fatores que influenciam o aparecimento de comorbidades como risco cardiovascular e diabetes (ENERBÄCK, 2010).

Sabe-se que os HT, principalmente o T3, são fundamentais para o controle de proliferação e diferenciação do TA e que a irisina, uma proteína sintetizada e secretada no músculo esquelético, é produzida após o exercício físico e age no TAB estimulando a UCP1, assim levando a liberação de temperatura e com isso a diminuição da gordura (AYDIN, 2014; OBREGON, 2008).

O excesso de TAB está associado ao desenvolvimento de EO, levando a uma produção aumentada de EROs e consequentemente danos ao DNA (GRATTAGLIANO et al., 2008). Oliveira et al. (2020) (DE OLIVEIRA et al., 2020) ao avaliar o efeito do T3 e da irisina em células adiposas subcutâneas humanas, na mesma dose utilizada nos nossos experimentos, demonstraram uma diminuição nos níveis de MDA e de 8-hidroxidesoxiguanosina (8-OHdG), concluindo que os hormônios podem levar a uma redução do EO nas células e potencialmente fornecer benefícios na prevenção de doenças metabólicas.

Nossos resultados mostraram que a associação do T3 e I diminuíram os níveis de MDA quando comparados ao grupo que recebeu somente o tratamento com T3. Esses achados estão de acordo como relatado por Zhang et al. (2016) (ZHANG et al., 2016), que verificou que a ação desses hormônios com a dose de 10nM de T3 com 100ng/ml de irisina e a dose de 100nM de T3 e 500ng/ml de irisina foram capazes de reduzir significativamente os níveis de MDA em células

adiposas viscerais humanas, sugerindo um potencial benefício terapêutico na gestão da obesidade.

O estudo de Panveloski et al. (PANVELOSKI-COSTA et al., 2018), relatou que a ação do T3 no TAV pode ser um fator chave na redução dos biomarcadores de EO. Assim como o estudo de Ribeiro et al. (RIBEIRO et al., 2010), mostrou que a ativação dos receptores de T3 no TAV de ratos, aumentou a expressão de ácidos graxos, reduziu a inflamação e os níveis de EO. Resultado semelhante ao demonstrado no estudo de Vigueire et al. (VIGUERIE et al., 2002), que utilizou o tratamento com T3 na dose de 100nM em um período de 24 horas em células de adipócitos humanas e mostrou que o T3 inibiu a inflamação e aumentou a oxidação de ácidos graxos, esse tratamento também fez com que o T3 reduzisse os níveis de EROs, aumentando a atividade de enzimas antioxidantes.

Por outro lado, no presente trabalho, observamos que no TAV, a administração de T3 não apresentou efeito significativo sobre o EO. No entanto, o aumento da adiposidade visceral está associado a um maior risco de comorbidades do que o aumento da adiposidade subcutânea (DE HEREDIA; GÓMEZ-MARTÍNEZ; MARCOS, 2012; O'ROURKE, 2018; OUCHI et al., 2003), demonstrando que o TAV é mais inflamado (IBRAHIM, 2010), podendo exigir então uma dose de T3 suprafisiológico para obter resultados satisfatórios como a diminuição do EO e de doenças metabólicas.

Desse modo, pacientes com quadro clínico de síndrome metabólica apresentam ativação de vias bioquímicas que diminuem a proteção antioxidante e aumento da peroxidação lipídica, sustentando que o EO é o desencadeador dessa patologia (GRATTAGLIANO et al., 2008).

No entanto, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos pelos quais a irisina exerce seus efeitos benéficos sobre o EO para que futuramente possa haver a aplicabilidade clínica para uma terapia anti obesidade.

CONCLUSÃO

Irisina diminui biomarcadores de EO na cultura de adipócitos viscerais humanos, sugerindo que possa ser um potencial alvo terapêutico para o tratamento da obesidade.

REFERÊNCIAS

- AFFOURTIT, C.; QUINLAN, C. L.; BRAND, M. D. Measurement of proton leak and electron leak in isolated mitochondria. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 810, p. 165–182, 2012.
- AGUAYO-CERÓN, K. A. et al. Glycine: The Smallest Anti-Inflammatory Micronutrient. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 14, p. 11236, 8 jul. 2023.
- ALARCON-AGUILAR, F. J. et al. Glycine regulates the production of pro-inflammatory cytokines in lean and monosodium glutamate-obese mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 599, n. 1, p. 152–158, 3 dez. 2008.
- ALMANZA-PEREZ, J. C. et al. Glycine regulates inflammatory markers modifying the energetic balance through PPAR and UCP-2. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 64, n. 8, p. 534–540, 1 out. 2010.
- AMIN, M. N. et al. How the association between obesity and inflammation may lead to insulin resistance and cancer. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 13, n. 2, p. 1213–1224, 1 mar. 2019.
- ARRIARÁN, S. et al. Evidences of Basal Lactate Production in the Main White Adipose Tissue Sites of Rats. Effects of Sex and a Cafeteria Diet. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0119572, 5 mar. 2015.
- ASADI SHAHMIRZADI, A. et al. Alpha-Ketoglutarate, an Endogenous Metabolite, Extends Lifespan and Compresses Morbidity in Aging Mice. **Cell metabolism**, v. 32, n. 3, p. 447–456.e6, 1 set. 2020.
- AU, A. Chapter Two - Metabolomics and Lipidomics of Ischemic Stroke. Em: MAKOWSKI, G. S. (Ed.). **Advances in Clinical Chemistry**. [s.l.] Elsevier, 2018. v. 85p. 31–69.
- AUGUET, T. et al. LC/MS-Based Untargeted Metabolomics Analysis in Women with Morbid Obesity and Associated Type 2 Diabetes Mellitus. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 9, p. 7761, 24 abr. 2023.
- AYDIN, S. Three new players in energy regulation: preptin, adropin and irisin. **Peptides**, v. 56, p. 94–110, jun. 2014.
- BATISTA FILHO, M.; RISSIN, A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. suppl 1, p. S181–S191, 2003.
- BELLOT, P. E. N. R. et al. Are Phosphatidylcholine and Lysophosphatidylcholine Body Levels Potentially Reliable Biomarkers in Obesity? A Review of Human Studies. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 67, n. 7, p. e2200568, abr. 2023.
- BENTO, B. DE C. Análise estatística de dados de metabolômica: identificação dos compostos envolvidos na resposta das plantas à simbiose com fungos ectomicorrízicos. 2020.
- BOSTRÖM, P. et al. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. **Nature**, v. 481, n. 7382, p. 463–468, 11 jan. 2012.
- BROOKS, G. A. Cell–cell and intracellular lactate shuttles. **The Journal of Physiology**, v. 587, n. Pt 23, p. 5591–5600, 1 dez. 2009.
- CANUTO, G. et al. METABOLÔMICA: DEFINIÇÕES, ESTADO-DA-ARTE E APLICAÇÕES REPRESENTATIVAS. **Química Nova**, 2017.
- CASTILLO-QUAN, J. I. From white to brown fat through the PGC-1 α -dependent myokine irisin: implications for diabetes and obesity. **Disease Models & Mechanisms**, v. 5, n. 3, p. 293–295, maio 2012.
- CHEN, K. et al. Adipose-targeted triiodothyronine therapy counteracts obesity-related metabolic complications and atherosclerosis with negligible side effects. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 7838, 20 dez. 2022.
- COELHO, C. D. F. et al. A suplementação de L-carnitina não promove alterações na taxa

metabólica de repouso e na utilização dos substratos energéticos em indivíduos ativos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 54, n. 1, p. 37–44, fev. 2010.

COLE, L. K.; VANCE, J. E.; VANCE, D. E. Phosphatidylcholine biosynthesis and lipoprotein metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, Triglyceride Metabolism and Disease. v. 1821, n. 5, p. 754–761, 1 maio 2012.

CONSIDINE, R. V. et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. **The New England Journal of Medicine**, v. 334, n. 5, p. 292–295, 1 fev. 1996.

CONTRERAS-NUÑEZ, E. et al. Participation of the IKK- α/β complex in the inhibition of the TNF- α /NF- κ B pathway by glycine: Possible involvement of a membrane receptor specific to adipocytes. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 102, p. 120–131, 1 jun. 2018.

D’ALESSANDRO, M. E. et al. Time course of adipose tissue dysfunction associated with antioxidant defense, inflammatory cytokines and oxidative stress in dyslipemic insulin resistant rats. **Food & Function**, v. 6, n. 4, p. 1299–1309, abr. 2015.

DAVIES, A. et al. Short and medium chain acylcarnitines as markers of outcome in diabetic and non-diabetic subjects with acute coronary syndromes. **International Journal of Cardiology**, v. 389, 15 out. 2023.

DE HEREDIA, F. P.; GÓMEZ-MARTÍNEZ, S.; MARCOS, A. Obesity, inflammation and the immune system. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 71, n. 2, p. 332–338, maio 2012.

DE OLIVEIRA, M. et al. The roles of triiodothyronine and irisin in improving the lipid profile and directing the browning of human adipose subcutaneous cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 506, p. 110744, 15 abr. 2020.

DE-CLEVA, R. et al. LACTATO PODE SER MARCADOR DA SÍNDROME METABÓLICA NA OBESIDADE GRAVE? **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, v. 34, p. e1579, 11 jun. 2021.

DRZAZGA, A.; SOWIŃSKA, A.; KOZIOŁKIEWICZ, M. Lysophosphatidylcholine and lysophosphatidylinositol--novel promising signaling molecules and their possible therapeutic activity. **Acta Polonae Pharmaceutica**, v. 71, n. 6, p. 887–899, 2014.

DUNN, W. B. et al. Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 1, p. 387–426, jan. 2011.

ENERBÄCK, S. Brown adipose tissue in humans. **International Journal of Obesity (2005)**, v. 34 Suppl 1, p. S43–46, out. 2010.

ERCAN, Z. et al. The Effect of Irisin on Thyroid Hormone Levels in Chronic Paroxetine-Treated Rats. **Biological Trace Element Research**, v. 201, n. 2, p. 810–815, 1 fev. 2023.

FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, A. et al. Inflammation, Oxidative Stress, and Obesity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 5, p. 3117–3132, maio 2011.

FIEHN, O. Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, v. 48, n. 1–2, p. 155–171, jan. 2002.

FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. O tecido adiposo como órgão endócrino: da teoria à prática. **Jornal de Pediatria**, v. 83, p. S192–S203, nov. 2007a.

FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. **Jornal de Pediatria**, v. 83, p. S192–S203, nov. 2007b.

FONTENELLE, L. C. et al. Thyroid Function in Human Obesity: Underlying Mechanisms. **Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Metabolisme**, v. 48, n. 12, p. 787–794, dez. 2016.

FRIGOLET, M. E.; GUTIÉRREZ-AGUILAR, R. The colors of adipose tissue. **Gaceta Medica De Mexico**, v. 156, n. 2, p. 142–149, 2020.

FROH, M.; THURMAN, R. G.; WHEELER, M. D. Molecular evidence for a glycine-gated chloride channel in macrophages and leukocytes. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 283, n. 4, p. G856–863, out. 2002.

GAMEIRO, A. et al. Os neurotransmissores glicina e GABA estimulam a liberação do peptídeo 1 semelhante ao glucagon da linhagem celular GLUTag - Gameiro - 2005 - **The Journal of Physiology - Wiley Online Library**. Disponível em: <<https://physoc.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1113/jphysiol.2005.098962>>. Acesso em: 11 abr. 2024.

GANNON, M. C.; NUTTALL, J. A.; NUTTALL, F. Q. A resposta metabólica à glicina ingerida 1 2 3. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, n. 6, p. 1302–1307, 1 dez. 2002.

GESTA, S.; TSENG, Y.-H.; KAHN, C. R. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. **Cell**, v. 131, n. 2, p. 242–256, 19 out. 2007.

GRATTAGLIANO, I. et al. Oxidative stress-induced risk factors associated with the metabolic

syndrome: a unifying hypothesis. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 19, n. 8, p. 491–504, 1 ago. 2008.

GUASCH-FERRÉ, M. et al. Metabolomics in Prediabetes and Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis. **Diabetes Care**, v. 39, n. 5, p. 833–846, 1 maio 2016.

GUTIÉRREZ-ROJAS, R. A. et al. Glycine Effect on the Expression Profile of Orphan Receptors GPR21, GPR26, GPR39, GPR82 and GPR6 in a Model of Inflammation in 3T3-L1 Cells. **Life**, v. 12, n. 11, p. 1687, nov. 2022.

GYANWALI, B. et al. Alpha-Ketoglutarate dietary supplementation to improve health in humans. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 33, n. 2, p. 136–146, fev. 2022.

HE, L. et al. The Physiological Basis and Nutritional Function of Alpha-ketoglutarate. **Current Protein & Peptide Science**, v. 16, n. 7, p. 576–581, 2015.

HE, L. et al. Prevention of Oxidative Stress by α -Ketoglutarate via Activation of CAR Signaling and Modulation of the Expression of Key Antioxidant-Associated Targets in Vivo and in Vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 43, p. 11273–11283, 31 out. 2018.

HOBERT, J. A.; BROSE, S. A.; PASQUALI, M. Quantitation of Butyrylcarnitine, Isobutyrylcarnitine, and Glutarylcarnitine in Urine Using Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 2546, p. 83–94, 2022.

HODSON, L. et al. Metabolic Signatures of Human Adipose Tissue Hypoxia in Obesity. **Diabetes**, v. 62, n. 5, p. 1417–1425, maio 2013.

HUR, M. et al. A global approach to analysis and interpretation of metabolic data for plant natural product discovery. **Natural product reports**, v. 30, n. 4, p. 565, abr. 2013.

IBRAHIM, M. M. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. **Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 11, n. 1, p. 11–18, jan. 2010.

JASTROCH, M. et al. Mitochondrial proton and electron leaks. **Essays in Biochemistry**, v. 47, p. 53–67, 2010.

JUHAN-VAGUE, I. et al. Plasminogen activator inhibitor-1, inflammation, obesity, insulin resistance and vascular risk. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 1, n. 7, p. 1575–1579, 1 jul. 2003.

KERN, L. et al. Obesity-Induced TNF α and IL-6 Signaling: The Missing Link between Obesity and Inflammation—Driven Liver and Colorectal Cancers. **Cancers**, v. 11, n. 1, p. 24, 27 dez. 2018.

KIM, J. Y. et al. Metabolic profiling of plasma in overweight/obese and lean men using ultra performance liquid chromatography and Q-TOF mass spectrometry (UPLC-Q-TOF MS). **Journal of Proteome Research**, v. 9, n. 9, p. 4368–4375, 3 set. 2010.

LEE, M.-S. et al. L-carnitine stimulates lipolysis via induction of the lipolytic gene expression and suppression of the adipogenic gene expression in 3T3-L1 adipocytes. **Journal of Medicinal Food**, v. 9, n. 4, p. 468–473, 2006.

LIDELL, M. E.; ENERBÄCK, S. Brown adipose tissue--a new role in humans? **Nature Reviews. Endocrinology**, v. 6, n. 6, p. 319–325, jun. 2010.

LIMA-SILVA, A. E.; ADAMI, F.; NAKAMURA, F. Y. METABOLISMO DE GORDURA DURANTE O EXERCÍCIO FÍSICO: MECANISMOS DE REGULAÇÃO. 2006.

LIU, S.; HE, L.; YAO, K. The Antioxidative Function of Alpha-Ketoglutarate and Its Applications. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 3408467, 21 mar. 2018.

LIU, Y. et al. Global prevalence of osteosarcopenic obesity amongst middle aged and older adults: a systematic review and meta-analysis. **Archives of Osteoporosis**, v. 18, n. 1, p. 60, 2 maio 2023.

MAAK, S. et al. Progress and Challenges in the Biology of FNDC5 and Irisin. **Endocrine Reviews**, v. 42, n. 4, p. 436–456, 16 jul. 2021.

MAILLOUX, R. J. et al. α -Ketoglutarate Dehydrogenase and Glutamate Dehydrogenase Work in Tandem To Modulate the Antioxidant α -Ketoglutarate during Oxidative Stress in *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 12, p. 3804–3810, jun. 2009.

MALISZEWSKA, K.; KRETOWSKI, A. Brown Adipose Tissue and Its Role in Insulin and Glucose Homeostasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 4, p. 1530, 3 fev. 2021.

MANCINI, A. et al. Thyroid Hormones, Oxidative Stress, and Inflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, p. 6757154, 2016.

MELO, S. P. DA S. DE C. et al. Sobrepeso, obesidade e fatores associados aos adultos em uma área urbana carente do Nordeste Brasileiro. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 23, p. e200036, 18 maio 2020.

MESQUITA, C. S. et al. Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for

quantification of carbonyls in oxidized proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 458, p. 69–71, 1 ago. 2014.

MIHARA, M.; UCHIYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Analytical Biochemistry**, v. 86, n. 1, p. 271–278, maio 1978.

MUÑOZ, S. et al. Chronically increased glucose uptake by adipose tissue leads to lactate production and improved insulin sensitivity rather than obesity in the mouse. **Diabetologia**, v. 53, n. 11, p. 2417–2430, nov. 2010.

NUNES, M. T. Hormônios tireoideanos: mecanismo de ação e importância biológica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, p. 639–643, dez. 2003.

OBREGON, M.-J. Thyroid hormone and adipocyte differentiation. **Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association**, v. 18, n. 2, p. 185–195, fev. 2008.

O'BRIEN, P. E.; DIXON, J. B. The extent of the problem of obesity. **American Journal of Surgery**, v. 184, n. 6B, p. 4S-8S, dez. 2002.

OKEKUNLE, A. P. et al. Abnormal circulating amino acid profiles in multiple metabolic disorders. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 132, p. 45–58, 1 out. 2017.

OLIVEIRA, M. DE et al. Modulação dos receptores de hormônio tireoideano, TR α e TR β , utilizando diferentes doses de triiodotironina (T3) em diferentes tempos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 57, p. 368–374, jul. 2013a.

OLIVEIRA, M. DE et al. Triiodothyronine Increases mRNA and Protein Leptin Levels in Short Time in 3T3-L1 Adipocytes by PI3K Pathway Activation. **PLOS ONE**, v. 8, n. 9, p. e74856, 18 set. 2013b.

OLIVEIRA, L. P. M. et al. Fatores associados a excesso de peso e concentração de gordura abdominal em adultos na cidade de Salvador, Bahia, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, n. 3, p. 570–582, mar. 2009.

OLIVER, S. G. et al. Systematic functional analysis of the yeast genome. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 373–378, 1 set. 1998.

O'ROURKE, R. W. Adipose tissue and the physiologic underpinnings of metabolic disease. **Surgery for Obesity and Related Diseases: Official Journal of the American Society for Bariatric Surgery**, v. 14, n. 11, p. 1755–1763, nov. 2018.

OUCHI, N. et al. Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. **Current Opinion in Lipidology**, v. 14, n. 6, p. 561–566, dez. 2003.

PANG, Z. et al. MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. W1, p. W388–W396, 2 jul. 2021.

PANVELOSKI-COSTA, A. C. et al. Beneficial effects of thyroid hormone on adipose inflammation and insulin sensitivity of obese Wistar rats. **Physiological Reports**, v. 6, n. 3, p. e13550, 1 fev. 2018.

PARK, K. W.; HALPERIN, D. S.; TONTONNOZ, P. Before they were fat: adipocyte progenitors. **Cell Metabolism**, v. 8, n. 6, p. 454–457, dez. 2008.

PENG, M. et al. Measurement of free carnitine and acylcarnitines in plasma by HILIC-ESI-MS/MS without derivatization. **Journal of Chromatography B**, v. 932, p. 12–18, 1 ago. 2013.

RANDLE, P. J. Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. **Diabetes/Metabolism Reviews**, v. 14, n. 4, p. 263–283, dez. 1998.

RAZVI, S. et al. Triiodothyronine (T3), inflammation and mortality risk in patients with acute myocardial infarction. **European Thyroid Journal**, v. 11, n. 2, p. e210085, 9 fev. 2022.

REBOUCHE, C. J.; ENGEL, A. G. Tissue distribution of carnitine biosynthetic enzymes in man. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 630, n. 1, p. 22–29, 5 jun. 1980.

REINEHR, T. Obesity and thyroid function. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 316, n. 2, p. 165–171, 25 mar. 2010.

REN, J. et al. Lysophosphatidylcholine: Potential Target for the Treatment of Chronic Pain. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 15, p. 8274, 27 jul. 2022a.

REN, Y. et al. Adipokines, Hepatokines and Myokines: Focus on Their Role and Molecular Mechanisms in Adipose Tissue Inflammation. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, p. 873699, 2022b.

RIBEIRO, M. O. et al. Expression of Uncoupling Protein 1 in Mouse Brown Adipose Tissue Is Thyroid Hormone Receptor- β Isoform Specific and Required for Adaptive Thermogenesis. **Endocrinology**, v. 151, n. 1, p. 432–440, jan. 2010.

ROBINSON, M. D.; OSHLACK, A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. **Genome Biology**, v. 11, n. 3, p. R25, 2010.

ROMERO, M. DEL M. et al. Glycerol Production from Glucose and Fructose by 3T3-L1 Cells: A Mechanism of Adipocyte Defense from Excess Substrate. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. e0139502,

1 out. 2015.

ROSA, G. et al. Tejido adiposo, hormonas metabólicas y ejercicio físico. **Revista Andaluza de Medicina del Deporte**, v. 6, n. 2, p. 78–84, jun. 2013.

SÁ, N. N. B. D.; MOURA, E. C. D. Excesso de peso: determinantes sociodemográficos e comportamentais em adultos, Brasil, 2008. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 27, n. 7, p. 1380–1392, jul. 2011.

SABATER, D. et al. The use of Transwells™ improves the rates of differentiation and growth of cultured 3T3L1 cells. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 16, p. 5605–5610, jun. 2013.

SABATER, D. et al. Cultured 3T3L1 adipocytes dispose of excess medium glucose as lactate under abundant oxygen availability. **Scientific Reports**, v. 4, p. 3663, 13 jan. 2014.

SAMY, D. M.; ISMAIL, C. A.; NASSRA, R. A. Circulating Irisin Concentrations in Rat Models of Thyroid Dysfunction — Effect of Exercise. **Metabolism**, v. 64, n. 7, p. 804–813, 1 jul. 2015.

SCHMIDT, M. I. et al. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. **The Lancet**, v. 377, n. 9781, p. 1949–1961, jun. 2011.

SCHMITZ, G.; RUEBSAAMEN, K. Metabolism and atherogenic disease association of lysophosphatidylcholine. **Atherosclerosis**, v. 208, n. 1, p. 10–18, jan. 2010.

SILVA, J. E. Thyroid hormone control of thermogenesis and energy balance. **Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association**, v. 5, n. 6, p. 481–492, dez. 1995.

SILVA, J. E. Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. **Physiological Reviews**, v. 86, n. 2, p. 435–464, abr. 2006.

SILVÉRIO, R.; CAPERUTO, É. C.; SEELAENDER, M. C. L-Carnitina: além do metabolismo de lipídios. **Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte**, v. 8, n. 1, 25 nov. 2009.

SPEAKMAN, J. R. FTO effect on energy demand versus food intake. **Nature**, v. 464, n. 7289, p. E1; discussion E2, 1 abr. 2010.

STRĄCZKOWSKI, M. et al. Adipose Tissue and Skeletal Muscle Expression of Genes Associated with Thyroid Hormone Action in Obesity and Insulin Resistance. **Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association**, v. 32, n. 2, p. 206–214, fev. 2022.

TAKASHINA, C. et al. Associations among the plasma amino acid profile, obesity, and glucose metabolism in Japanese adults with normal glucose tolerance. **Nutrition & Metabolism**, v. 13, n. 1, p. 5, 19 jan. 2016.

TAYLOR, C. T. et al. Human adipocytes are highly sensitive to intermittent hypoxia induced NF-kappaB activity and subsequent inflammatory gene expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 447, n. 4, p. 660–665, 16 maio 2014.

TIAN, Q. et al. Dietary alpha-ketoglutarate promotes beige adipogenesis and prevents obesity in middle-aged mice. **Aging Cell**, v. 19, n. 1, p. e13059, jan. 2020.

VARGAS-CASTILLO, A. et al. Understanding the Biology of Thermogenic Fat: Is Browning A New Approach to the Treatment of Obesity? **Archives of Medical Research**, v. 48, n. 5, p. 401–413, jul. 2017.

VIGUERIE, N. et al. Regulation of human adipocyte gene expression by thyroid hormone. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 87, n. 2, p. 630–634, fev. 2002.

WANDERLEY, E. N.; FERREIRA, V. A. Obesidade: uma perspectiva plural. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, p. 185–194, jan. 2010.

WANG, W. et al. Glycine Stimulates Protein Synthesis and Inhibits Oxidative Stress in Pig Small Intestinal Epithelial Cells. **The Journal of Nutrition**, v. 144, n. 10, p. 1540–1548, 1 out. 2014.

WANG-SATTTLER, R. et al. Novel biomarkers for pre-diabetes identified by metabolomics. **Molecular Systems Biology**, v. 8, p. 615, 25 set. 2012.

WELLEN, K. E.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation, stress, and diabetes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 5, p. 1111–1119, maio 2005.

WHEELER, M. D.; THURMAN, R. G. Production of superoxide and TNF-alpha from alveolar macrophages is blunted by glycine. **The American Journal of Physiology**, v. 277, n. 5, p. L952–959, nov. 1999.

WU, G. Functional Amino Acids in Growth, Reproduction, and Health. **Advances in Nutrition**, v. 1, n. 1, p. 31–37, 1 nov. 2010.

YAN-DO, R. et al. A Glycine-Insulin Autocrine Feedback Loop Enhances Insulin Secretion From Human β -Cells and Is Impaired in Type 2 Diabetes. **Diabetes**, v. 65, n. 8, p. 2311–2321, 3 maio 2016.

YAU, W. W.; YEN, P. M. Thermogenesis in Adipose Tissue Activated by Thyroid Hormone. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 8, p. 3020, 24 abr. 2020.

YUAN, Y. et al. α -Ketoglutaric acid ameliorates hyperglycemia in diabetes by inhibiting hepatic

gluconeogenesis via serpin1e signaling. **Science Advances**, v. 8, n. 18, p. eabn2879, 6 maio 2022.

ZHANG, Y. et al. Irisin stimulates browning of white adipocytes through mitogen-activated protein kinase p38 MAP kinase and ERK MAP kinase signaling. **Diabetes**, v. 63, n. 2, p. 514–525, fev. 2014.

ZHANG, Y. et al. Irisin exerts dual effects on browning and adipogenesis of human white adipocytes. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v. 311, n. 2, p. E530-541, 1 ago. 2016.

ZHANG, Y. et al. Glycine Attenuates LPS-Induced Apoptosis and Inflammatory Cell Infiltration in Mouse Liver. **The Journal of Nutrition**, v. 150, n. 5, p. 1116–1125, 1 maio 2020.

ZHONG, Z. et al. L-Glycine: a novel antiinflammatory, immunomodulatory, and cytoprotective agent. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 6, n. 2, p. 229–240, mar. 2003.

ZWICK, R. K. et al. Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue. **Cell Metabolism**, v. 27, n. 1, p. 68–83, 9 jan. 2018.