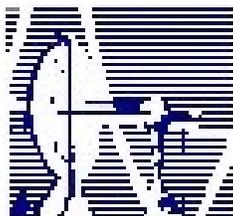


ALBA CENÉLIA MATOS DA SILVA

Efeitos do fitoestrógeno *Trifolium pratense*
sobre a função tireóidea de ratas
ovarictomizadas

MONOGRAFIA DE Mestrado submetida ao Instituto de Biofísica Carlos
Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro visando a
obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas (Fisiologia)



Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Universidade Federal do Rio de Janeiro

2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

SILVA, ALBA CENÉLIA MATOS DA

Efeitos do fitoestrógeno *Trifolium pratense* sobre a função tireóidea de ratas ovariectomizadas.

Rio de Janeiro: UFRJ, IBCCF, 2005.

XXI, 69f

Orientadora: Denise Pires de Carvalho.

Co-orientadora: Andrea Claudia Freitas Ferreira

Monografia de Mestrado visando a obtenção do Grau de mestre em Ciências Biológicas - Fisiologia.

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.

1 – Fitoestrógenos

2 – Hormônios tireóideos

3 – Tireotrofina

4 – Tireoperoxidase

5 – Iodotironina desiodase tipo I

6 – Tireóide

7 – *Trifolium pratense*

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia Endócrina do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro sob orientação da professora Denise Pires de Carvalho, com apoio financeiro concedido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, Programa de Apoio a Núcleos de Excelência e Conselho de Ensino para Graduados.

Esse trabalho é dedicado às pessoas mais importantes da minha vida:
minhas filhas, minha mãe, meu pai e minhas irmãs.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre guiar meus passos, mostrando-me sempre o melhor caminho a seguir, permitindo-me trabalhar com o que amo.

À minha família por estar sempre presente em minha vida compartilhando todos os momentos alegres e também os tristes. Apoiando-me e dando força nos momentos difíceis.

Às minhas filhas, Maria Carolina e Ana Cristina, por serem o maior incentivo às realizações, e também, pela compreensão por inúmeras vezes que deixamos de sair, pois eu tinha muito trabalho a fazer.

Não posso deixar de agradecer do fundo de meu coração à minha mãe, a pessoa que sempre me apoiou incondicionalmente e acreditou em mim dando-me todo o seu apoio.

À amiga Tânia Lemos Mouço, por ter acreditado no meu potencial profissional e a me indicar o Laboratório de Fisiologia Endócrina como o local ideal para o desenvolvimento deste potencial.

À minha amiga Rosângela de Fátima por sempre me dizer as palavras certas nas horas em que tudo parecia ficar muito difícil.

À minha orientadora, Denise Pires de Carvalho, a quem tenho grande carinho e admiração por ter me recebido em seu Laboratório e por ser uma excelente profissional capaz de enxergar o que os outros não conseguem ver.

À professora Doris Rosenthal, por sua dedicação durante todos estes anos e por tornar nossa ida ao laboratório mais emocionante.

À amiga Andréa, a quem muito admiro e respeito, pela grande paciência, carinho e por ter sido a pessoa que me iniciou no mundo da pesquisa.

Ao professor Marcelo Morales pela excelente revisão deste trabalho além de toda sua atenção.

À amiga Michelle, grande companheira e cúmplice, que sempre esteve presente às inúmeras ovariectomias e sacrifícios, demonstrando grande alegria e satisfação. Por sempre estar presente nas horas mais difíceis.

À amiga Renata Grozovsky, pelo carinho, companheirismo e pelos vários quitutes que animaram nossos dias de trabalho.

Ao amigo Rodrigo por todo o carinho, pelos momentos de descontração em nossa vida no laboratório e por ter despertado em mim a “fome” por *papers*.

Ao amigo Alexandre Lourenço, por demonstrar grande carinho e paciência em nosso contato no laboratório, o que nem sempre foi fácil, pois confesso, o meu gênio não é dos melhores.

Aos amigos de trabalho, Lívia, Flávia, Renata Lopes, Luciene, Glória, Thiago, Valmara, Márcia, Álvaro, Ricardo, Elaine, Dani, Débora, Nathércia, Camilla, Tamar Frankenfeld, Vânia Costa, Advaldo, Wagner e Norma que fazem com que ir ao laboratório seja não apenas uma tarefa, mas também um momento de descontração.

LISTA DE ABREVIATURAS

A - Absorbância

Ac - Anticorpo

AMPC- Adenosina monofosfato cíclico

BSA – Albumina bovina sérica

3,3'-T₂– 3,3'-diiodotironina

d - Dia

D1 – Iodotironina desiodase tipo I

D2 – Iodotironina desiodase tipo II

D3 – Iodotironina desiodase tipo III

DIT – Diiodotirosina

DTT – Ditiotreitól

E₂ - 17 β-estradiol

Eb – Benzoato de estradiol

ERE – Elemento de resposta ao estrogênio

FRTL-5 – Linhagem de tireócito de rato Fischer

FSH – Hormônio folículo estimulante

HT – Hormônio tireóideo

LH – Hormônio luteinizante

MIT – Monoiodotirosina

Na⁺/K⁺-ATPase – Sódio potássio adenosina trifosfatase

NADPH - Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo

NIS – Co-transportador Na⁺/I⁻

Ovx - Ovariectomizada

p.c - Peso corporal

PTU - Propiltiouracil

RE – Receptor de estrogênio

RIE – Radioimunoensaio

RNA_m – Ácido ribonucléico mensageiro

rT₃ – 3,3',5' triiodotironina reversa (T₃ reverso)

sc - Subcutâneo

SERMs – Moduladores seletivos do receptor de estrogênio

T₃ – 3,5,3'triiodotironina

T₄ – 3,5,3',5' tetraiodotironina ou tiroxina

TBG – Globulina ligadora de tiroxina

TCA – Ácido tricloroacético

Tg - Tireoglobulina

Tp – *Trifolium pratense*

TPO – Tireoperoxidase

TRE – Elemento responsivo a hormônio tireóideo

TRH – Hormônio estimulador de TSH

TSH – Hormônio estimulador da tireóide ou tireotrofina

TTR – transtiretina.

RESUMO

Efeitos do fitoestrógeno *Trifolium pratense* sobre a função tireóidea de ratas ovariectomizadas.

O uso de fitoestrógenos para a terapia de reposição hormonal tem aumentado atualmente, porém estudos sobre seus efeitos colaterais ainda são escassos. Avaliamos os efeitos do fitoestrógeno *Trifolium pratense* (Tp) sobre a função tireóidea. Ratas Wistar foram divididas em cinco grupos: Controle, ovariectomizadas (Ovx) e tratadas por 16 dias com E₂ (5,0µg/100g pc, sc), Tp (500 mg/kg pc, gavagem) ou Tp+E₂. Controle e Ovx receberam veículo. Após 7 dias da ovariectomia, os tratamentos acima foram iniciados, totalizando um período de 23 dias de ovariectomia. A dose de Tp foi escolhida por ser a utilizada para reposição hormonal em mulheres após a menopausa.

Não foram observadas alterações significativas nos níveis séricos de tiroxina (T₄), da atividade desidase tipo 1 - D1 (hipofisária, tireoideana, hepática e renal), captação de radioiodeto e atividade tireoperoxidase (TPO) nos grupos submetidos ao protocolo experimental. O peso corporal aumentou significativamente no grupo Ovx, sendo este efeito revertido nos grupos E₂, Tp e Tp+E₂. Houve diminuição do peso uterino no grupo Ovx, havendo tendência a normalização no grupo E₂ e Tp+E₂, mas não por Tp. Os grupos E₂ e Tp+E₂ tiveram aumento significativo no T₃ sérico. O grupo Tp+E₂ apresentou diminuição significativa do TSH sérico em relação ao grupo Ovx.

Concluimos que o efeito mais marcante da ovariectomia é o aumento de peso corporal, que é normalizado tanto pela administração de E₂ quanto de Tp. O aumento de T₃ pode ser resultado de um aumento na atividade D2 no tecido adiposo marrom. A diminuição do TSH produzido por Tp+E₂ não diminuiu a função tireóidea no tempo estudado.

Palavras-chave: fitoestrógenos, hormônios tireóideos, tireotrofina, tireoperoxidase, iodotironina desidase tipo 1, tireóide e *Trifolium pratense*.

ABSTRACT

Effects of phytoestrogen *Trifolium pratense* on thyroid function of ovariectomized rats

Phytoestrogens use for hormonal replacement therapy has increased actually, but studies of collateral effects are still lacking. We aimed to evaluate the effects of phytoestrogen *Trifolium pratense* (Tp) on thyroid function. Wistar rats were divided into 5 groups: control, ovariectomized and treated for 16 days with 17 β -estradiol (E₂, 5 μ g/100 g bw, sc), Tp (500 mg/Kg, bw, gavage) or Tp+E₂. Control and Ovx groups were treated with vehicle. Treatments described above were initiated after 7 days of ovariectomy up to 23 days. We choose a dose used for replacement therapy.

No changes were observed in serum total thyroxine (T₄), pituitary, thyroidal, hepatic and renal D1 activity, Sodium Iodide symporter (NIS) and thyroperoxidase (TPO) activities on groups submitted to experimental protocol. Body weight was significantly increased in Ovx rats, and this effect was reversed by E₂, Tp or Tp+E₂. Uterine weight decreased in Ovx group, and it tended to normalize in E₂ and Tp+E₂ but not in the Tp group. E₂ and Tp+E₂ groups significantly increased serum total T₃. Association of Tp and E₂ caused a significant decrease in TSH serum compared to Ovx group.

We conclude that the most marked effect of Ovx is an increase in body weight, which is normalized by E₂ and Tp. T₃ increase could be a result of higher peripheral metabolism of T₄. Decreased TSH produced by phytoestrogen plus E₂ did not lead to diminished thyroid function in the period of time studied.

Key-words: phytoestrogens, thyroid hormones, thyrotropin, thyroperoxidase, type 1 iodothyronine deiodinase, thyroid and *Trifolium pratense*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	vii
Resumo	ix
Abstract	x
Sumário	xi

INTRODUÇÃO

1 – Aspectos Anatômicos e Histológicos da Tireóide	1
2 – Biossíntese dos Hormônios Tireóideos	
2.1 – Metabolismo do iodeto	2
2.1.a – Transporte de iodeto	2
2.1.b – Oxidação do iodeto e organificação do iodo	4
3 – Ativação e/ou Inativação Local dos Hormônios Tireóideos: a Família das Desiodases	
3.1 - Iodotironina Desiodase Tipo 1 (D1)	10
3.2 - Iodotironina Desiodase Tipo 2 (D2)	11
3.3 - Iodotironina Desiodase Tipo 3 (D3)	12
4 – Regulação da Função Tireóidea	
4.1 – Eixo Hipotálamo-Hipófise-Tireóide	13

4.2 – Auto-regulação pelo iodo	
15	
5 – Os Estrógenos	16
6 – Influência dos estrógenos sobre a função tireóidea	
18	
7 – O Climatério	20
8 – Efeitos dos fitoestrógenos sobre a função tireóidea	
21	
8.1 – Metabolismo e mecanismo de ação dos fitoestrógenos	
23	
8.2 – <i>Trifolium pratense</i> (Red clover)	
25	
OBJETIVOS	28
MATERIAIS E MÉTODOS	29
RESULTADOS	38
DISCUSSÃO	49
PERSPECTIVAS FUTURAS	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

INTRODUÇÃO

1 – Aspectos Anatômicos e Histológicos da Tireóide

A tireóide, normalmente pesando 15 a 20 gramas no adulto normal, é considerada a maior glândula exclusivamente endócrina humana, estando situada imediatamente abaixo da laringe. Como característica histológica da glândula tireóide podemos identificar a presença de inúmeros folículos, revestidos por células epiteliais - os tireócitos - que encerram um material gelatinoso - o colóide - sendo a glicoproteína tireoglobulina (Tg) seu principal componente (Figura 1). A Tg contém os hormônios tireóideos (HT), a triiodotironina (T_3) e a tiroxina (T_4), em sua molécula, sendo posteriormente endocitada e hidrolisada para liberação desses hormônios (Capen, 1996; Griffin & Ojeda, 2000).

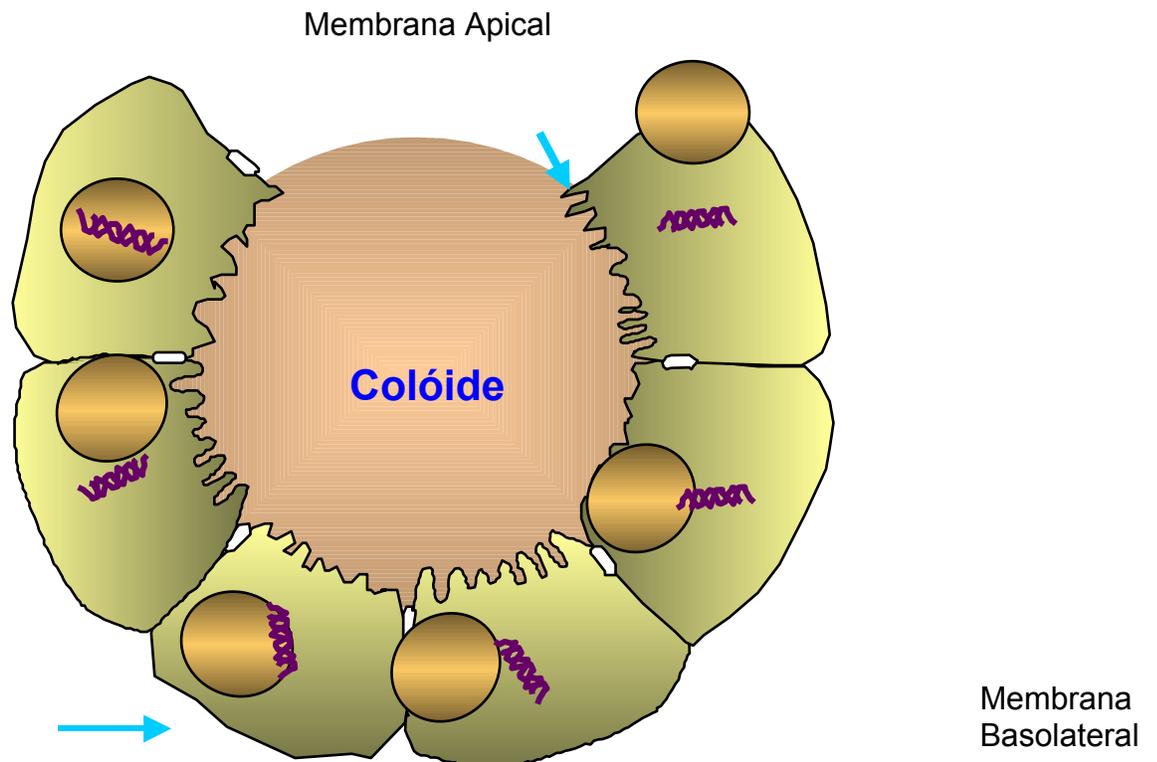


Figura 1: Representação esquemática de um folículo tireóideo.

A glândula tireóide também secreta calcitonina, um hormônio importante para o metabolismo do cálcio, sendo produzido pelas células C ou células parafoliculares. Estas células estão dispostas entre os folículos, porém sem comunicação com estes (Bianco e Kimura, 1999).

Em condições normais, os tireócitos são cubóides, porém podem apresentar a forma pavimentosa ou cilíndrica, sendo sua altura um indicativo da intensidade do estímulo recebido pela glândula, pois células mais altas são mais ativas em condições fisiológicas (Ross e cols., 1993).

2 - Biossíntese dos Hormônios Tireóideos

2.1 – Metabolismo do iodeto

Os hormônios tireoideanos são únicos pelo fato de requererem o elemento traço iodo para sua síntese, havendo necessidade de uma concentração adequada para que quantidades normais de hormônios tireóideos sejam sintetizadas. A ingestão diária de iodo é bastante variável, dependendo do conteúdo de iodo no solo e na água em diferentes regiões. Além de sua presença na água, o iodo é encontrado em certos alimentos e tem sido adicionado ao sal de cozinha a fim de evitar a sua deficiência. O iodo ingerido é absorvido a partir do trato gastrointestinal para o sangue sendo a maior parte normalmente excretada pelos rins ou captada pelas células da glândula tireóide (Larsen e cols., 2002; Vassart e Dumont, 1992).

2.1.a - Transporte de iodeto

O transporte ativo do iodeto do sangue para o interior da célula folicular constitui uma etapa importante na formação dos hormônios tireóideos (Figura 2).

Da mesma forma que diversos outros tecidos epiteliais, incluindo a glândula mamária, o córion, glândula salivar e o estômago, a tireóide é capaz de concentrar I^- contra um forte gradiente eletroquímico (Spitzweg e cols., 2002). A razão entre o iodeto da tireóide e o do soro é um reflexo deste transportador, cuja atividade é controlada principalmente por TSH (Bartalina, 1994; Vassart e Dumont, 1992).

O co-transportador Sódio/Iodeto [Na^+/I^-], NIS, realiza o transporte de iodeto para o interior das células foliculares. O NIS, uma glicoproteína integral de membrana, localiza-se na membrana baso-lateral das células foliculares tireóideas e acopla o transporte de 2 íons Na^+ a favor do seu gradiente eletroquímico ao transporte de 1 íon I^- contra o seu gradiente, ambos em direção ao interior da célula folicular (Kaminsky e cols, 1994; Smanik e cols., 1996). O gradiente de sódio necessário ao transporte realizado pelo NIS é gerado pela bomba $Na^+ - K^+$ ATPase, tratando-se portanto de transporte ativo secundário (Larsen e cols., 2002).

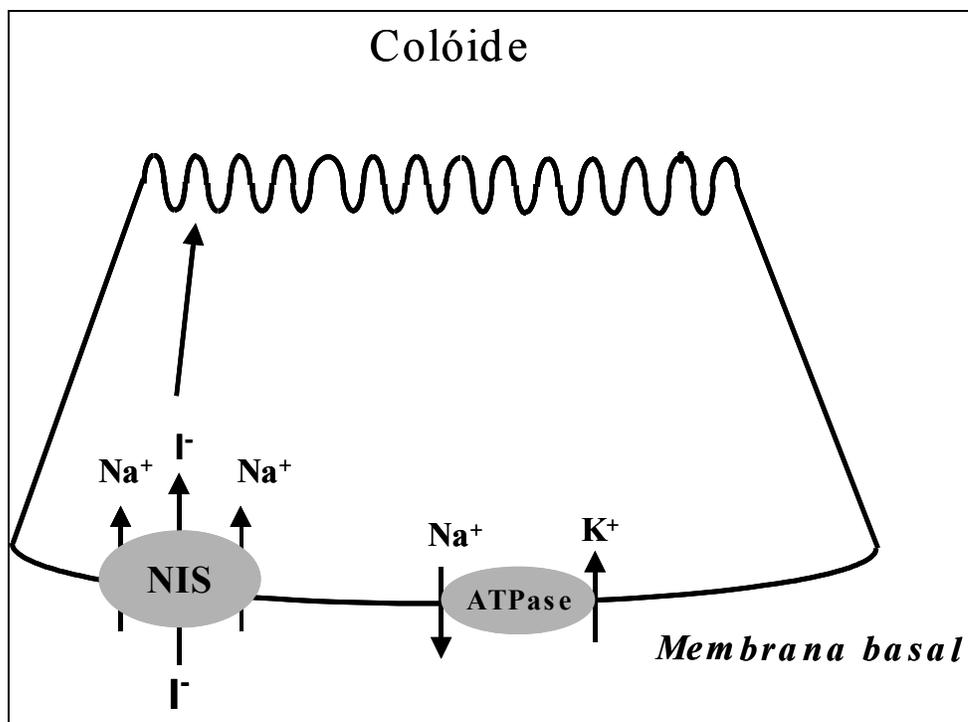


Figura 2: Transporte ativo do iodeto do sangue para o interior da célula folicular.

Uma vez dentro da célula folicular, o iodeto é transportado através da membrana apical para o colóide, pela pendrina, que é um transportador Cloreto/Iodeto, e possivelmente por outros canais iônicos ainda pouco conhecidos – Figura 2 (Scott e cols., 1999; Bidart e cols., 2000).

O TSH é capaz de aumentar o transporte de iodeto, efeito este que parece ocorrer via aumento da concentração intracelular de AMP cíclico (Dumont et al., 1989; Carrasco, 1993). Após a clonagem do co-transportador NIS, vários estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram que a exposição ao TSH, estimula sua atividade, bem como sua expressão gênica (Saito e cols., 1997; Kogai e cols., 2000). O TSH não somente estimula a transcrição e a síntese *de novo* do NIS, mas parece regular também sua distribuição subcelular após a transcrição, uma vez que Riedel e cols (2001) mostraram uma redistribuição da membrana plasmática para compartimentos intracelulares na ausência de TSH, o que leva à perda de função como co-transportador.

Além disso, o conteúdo de iodo no interior da glândula é capaz de influenciar o transporte de iodeto, assim, quando temos grande concentração de iodo há uma menor atividade do transportador e este se torna menos sensível à estimulação pelo TSH (Larsen e cols., 1998; Ferreira e cols., 2005).

2.1.b - Oxidação do Iodeto e Organificação do Iodo

Os processos de oxidação e organificação do iodeto iniciam a síntese dos hormônios tireóideos. Esses processos são catalisados pela tireoperoxidase (TPO), uma enzima que tem seu sítio catalítico voltado para o colóide e se localiza na superfície apical da célula folicular. Essa proteína requer peróxido de hidrogênio como um agente oxidante. O H_2O_2 é produzido pela enzima NADPH

oxidase, uma flavoproteína NADPH-dependente e que também tem sua localização na membrana apical das células foliculares, local onde a síntese hormonal ocorre (Michot e cols., 1985; Virion e cols., 1984; Taurog, 2000).

A oxidação do iodeto ocorre de maneira muito rápida e o iodeto oxidado é incorporado principalmente à Tg (processo denominado organificação do iodo) – Figura 3. A posição 3 do anel aromático da tirosina é iodada formando MIT, e a seguir, pode haver iodação na posição 5 formando DIT. Em seguida, a TPO catalisa o acoplamento entre essas moléculas formando tiroxina (ou T_4), se o acoplamento ocorrer entre duas moléculas de DIT ou triiodotironina (ou T_3), se ocorrer entre um MIT e um DIT. A formação de T_3 é favorecida na presença de quantidades maiores de MIT e de baixos níveis de iodo, enquanto a síntese preferencial de T_4 ocorrerá em situações nas quais haja mais DIT e maior disponibilidade de iodo (Taurog, 2000).

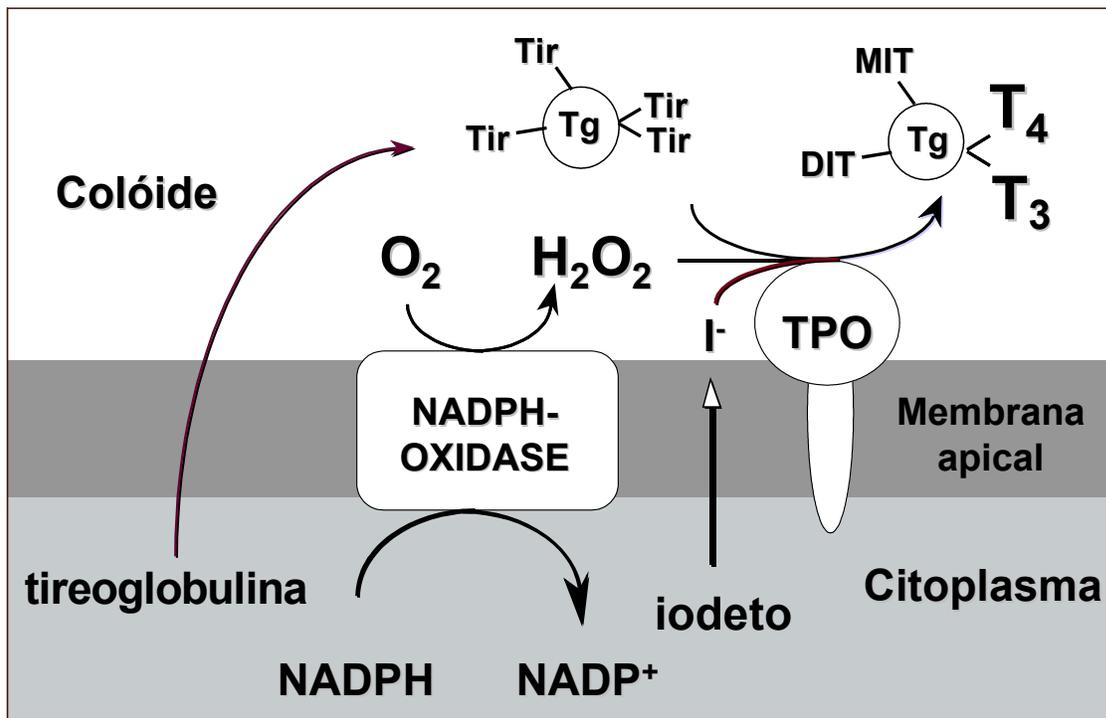


Figura 3: Oxidação e organificação do iodo.

A tireoglobulina, precursora do T_4 e T_3 , é sintetizada no interior da célula, e a seguir é direcionada para o lúmen onde é armazenada no colóide extracelular. A Tg consiste em uma forma de armazenamento de T_4 e T_3 no colóide (Bartalina, 1994; Daí e cols., 1996; Vassart e Dumont, 1992).

Quando a glândula é estimulada pelo TSH, a Tg armazenada no colóide entra na célula principalmente por um processo de pinocitose, ocorrendo então a fusão de lisossomas às vesículas; a seguir várias proteases ácidas e peptidases hidrolisam a Tg, liberando MIT, DIT, T_4 e T_3 , dentre outras iodotironinas. As moléculas de MIT, DIT, T_4 e T_3 podem sofrer desiodação no próprio tireócito e T_4 e T_3 alcançarão a corrente sanguínea pela membrana basal da célula (Figura 4).

Ao atingirem a corrente sanguínea, a maior parte do T_4 e do T_3 combinam-se imediatamente às proteínas plasmáticas: globulina ligadora de tiroxina (TBG), transtiretina (TTR) e albumina, através de forte ligação, o que torna a depuração dos HTs lenta, prolongando sua meia-vida e auxiliando na manutenção de concentrações estáveis de T_4 e T_3 livres (Yen, 2001).

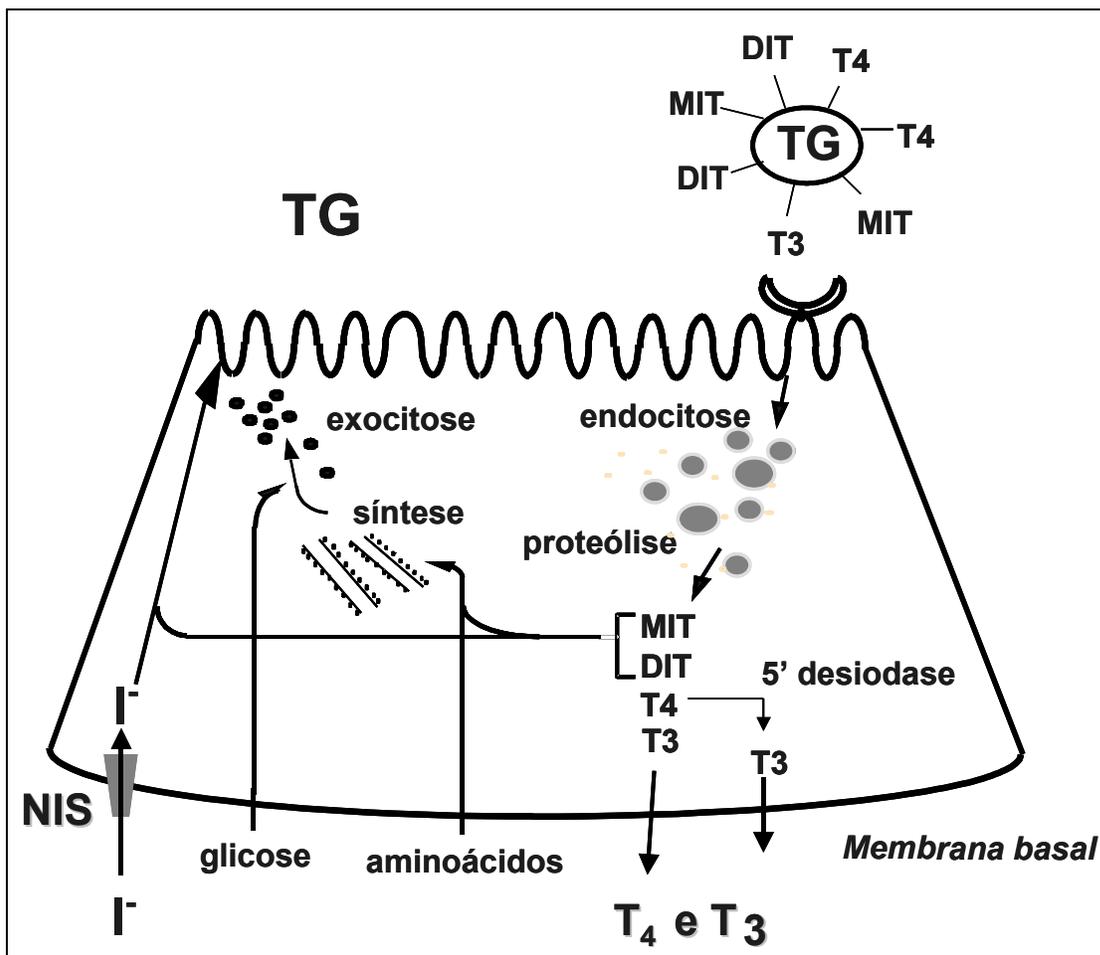


Figura 4: Biossíntese dos hormônios tireóideos.

Existem três ou quatro moléculas de T4 em cada molécula de Tg, mas apenas uma em cinco moléculas de Tg contém T3, por isso o principal HT liberado é o T4, cuja concentração no soro é quarenta vezes maior que a do T3 sérico. Apenas 0,03% do T4 total sérico está livre, estando o restante ligado a proteínas carreadoras como a globulina ligadora de tiroxina (TBG) (80%), transtiretina (15%) e albumina (5%) em humanos. Aproximadamente 0,3% do T3 sérico total está livre, o restante está ligado a TBG (38%), albumina (35%) e transtiretina (27%) em humanos. São os hormônios livres que entram nas células-alvo, gerando repostas biológicas. O T3 é considerado o HT metabolicamente ativo por ter afinidade com o receptor nuclear de 10 a 15 vezes maior que o T4 (Bianco, 1991; Yen, 2001).

Os efeitos dos HTs a nível genômico são mediados por receptores nucleares, intimamente associados com a cromatina: os HTs entram na célula, o T4 é convertido a T3 pelas desidases intracelulares, o T3 direciona-se ao núcleo e se liga aos seus receptores (TRs), regulando positivamente ou negativamente a transcrição de genes alvos e, conseqüentemente, a síntese das proteínas por eles codificadas.

Existem várias isoformas de TRs, o TR β 2 é abundante na hipófise anterior e nos núcleos arqueado, paraventricular e ventromedial do hipotálamo, já o TR α 1 é mais abundante no músculo cardíaco e esquelético, e no tecido adiposo marrom, enquanto o TR α 2 (que não liga T3) é muito expresso no cérebro, e o TR β 1 é mais homogeneamente distribuído, sendo mais elevado no cérebro adulto, fígado e rim. A regulação do RNAm dos TRs depende da isoforma e do tipo celular em que se encontra. Na hipófise murina, o T3 diminui o RNAm do TR β 2, diminui modestamente o RNAm do TR α 1, e aumenta ligeiramente o RNAm do TR β 1, apesar destes efeitos opostos, a quantidade de T3 ligado ao receptor diminui em 30% na hipófise de ratos tratados com T3 (Yen, 2001).

Existem atualmente vários estudos sobre os efeitos não-genômicos de T3 e T4, que envolvem ação rápida (segundos a minutos) e ativação de vias de sinalização intracelular (cinases ou calmodulina), mas sua importância fisiológica ainda não é bem entendida (Yen, 2001). Essas ações independentes do receptor nuclear têm sido descritas na membrana plasmática, no citoplasma, no citoesqueleto e em várias organelas (Davis & Davis, 1996).

O transporte de T3 através da membrana plasmática e nuclear tem sido assunto de grande interesse nos últimos anos. O T3 é lipofílico, e é geralmente dito que pode atravessar as membranas por difusão passiva; entretanto, existem algumas evidências de transporte, havendo sítios de alta afinidade para ligação do HT na membrana plasmática de células diferentes. Este sistema de transporte para T3 e T4 é saturável e dependente de energia (ATP), mas as duas iodotironinas não competem pela mesma “entrada”. Parecem estar envolvidos neste transporte polipeptídios co-transportadores taurocolatos de Na⁺ (NTCP) e membros da família de polipeptídios transportadores de ânion orgânico (OATP), que são capazes de transportar HT para dentro do hepatócito (Friesema e cols., 1999).

Recentemente, foi clonado um transportador para aminoácidos aromáticos, que pertence à família dos transportadores monocarboxilatos (MCT) e é muito homólogo com o MCT8. O transportador monocarboxilato 8 (MCT8) foi caracterizado como um transportador de HT muito ativo e específico, altamente expresso no fígado e cérebro, mas também amplamente distribuído em outros tecidos (Friesema e cols., 2003; Friesema e cols., 2005).

Proteínas que ligam T3 e T4 estão presentes no citosol e no núcleo da célula, parecem ser importantes para prevenir um contínuo metabolismo desiodativo e a ocupação total do receptor de T3. A concentração intracelular de T3 livre pode ser estimada pela afinidade de ligação dessas proteínas, o que sugere um gradiente de hormônio livre através da membrana plasmática (50:1),

bem mais baixo que a taxa nuclear/citosólica (250:1) no fígado, rim, coração e cérebro (Ichikawa & Hashizume, 1991; Larsen e cols., 2002).

Os processos que regulam o efluxo dos HTs das células são menos entendidos, mas parecem envolver um mecanismo sensível a verapamil, então dependente de Ca^{2+} (Larsen E COLS., 2002).

3 – Ativação ou Inativação local dos hormônios tireóideos: a família das desidases

O T_4 , principal produto secretado pela glândula tireóide, é considerado o precursor do hormônio metabolicamente ativo, T_3 , sendo este produzido em grande parte pela desidodação do anel externo do T_4 nos tecidos periféricos. Ambos, T_4 e T_3 são inativados pela desidodação do anel interno – Figura 5 (Kohrle, 1996; Visser, 1996; Bianco e cols., 2002).

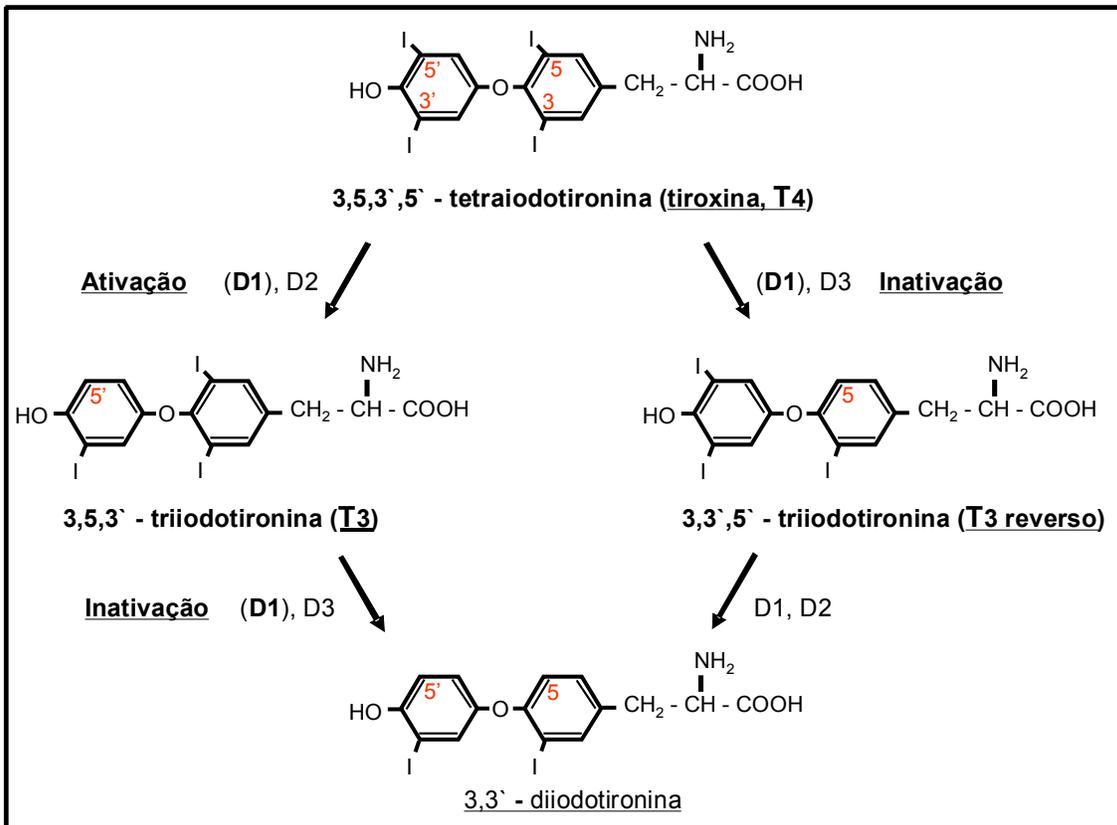


Figura 5: Estruturas e vias de ativação ou inativação das iodotironinas pelas enzimas desidases (Bianco e cols., 2002)

Sabe-se hoje que duas enzimas diferentes catalisam a conversão de T₄ a T₃, as iodotironinas desidases tipo 1 e tipo 2 (D1 e D2). Existe outra isoforma de enzima que leva à inativação de T₃ e T₄, pela desidatação do anel interno, a iodotironina desidase tipo 3 (D3). A D1 e a D2 catalisam a desidatação do anel externo das iodotironinas (desidatação 5'), sendo possível distinguí-las devido à diferença de sensibilidade ao propiltiouracil (PTU), pois a D1 é inibida por este composto, enquanto a D2 não o é (Bianco e cols., 2002). As três desidases constituem uma família de proteínas contendo selenocisteína em seu sítio catalítico, e a presença da selenocisteína parece ser crítica para a atividade enzimática, uma vez que a atividade D1 está reduzida no fígado e rins quando há deficiência severa de selênio (Beckett e cols., 1987; Kohrle, 1996).

Outras formas de metabolismo do hormônio tireóideo incluem desiodação total e inativação por desaminação ou descarboxilação. Glicuronidação e sulfatação hepáticas resultam em uma molécula mais hidrofílica que é excretada na bile, reabsorvida no intestino, desiodada no rim e excretada na urina como conjugado (Visser, 1996).

3.1 - Iodotironina Desiodase Tipo 1 (D1)

A isoenzima D1 tanto catalisa a desiodação do anel externo quanto do anel interno do T_4 , podendo gerar T_3 ou rT_3 , respectivamente. O pH exerce grande influência neste processo de desiodação, porém como demonstrado por Bianco e cols. (2002) a sulfatação das iodotironinas acarreta um aumento na rapidez da desiodação e preferência pelo anel interno, o que demonstra a importância da sulfatação na inativação desses compostos. A D1 é responsável pela geração de uma fração significativa do T_3 plasmático. A D1 está amplamente distribuída pelo corpo, sendo sua localização mais provável a membrana plasmática, o que além de facilitar o acesso do T_4 circulante à enzima, facilitaria a passagem do T_3 formado para o plasma (Bianco e cols., 2002).

Em humanos, a D1 está presente no fígado, rins, tireóide e hipófise, sendo a atividade no fígado e rins aparentemente de grande importância para a geração de T_3 sérico em humanos. Em ratos, a D1 é expressa no fígado, rins, SNC, hipófise, intestino, tireóide e placenta (Bianco e cols, 2002).

Dentre as inúmeras substâncias que estimulam a síntese de D1, os hormônios tireóideos se mostraram os mais potentes, estando bem estabelecido um aumento na atividade e/ou o RNAm para D1 em ratos, camundongos e humanos sob sua influência. A D1 tireóidea parece ter uma modulação diferente, uma vez que neste tecido é o TSH o principal estímulo para a atividade desta enzima. Os hormônios estrogênio, testosterona e os glicocorticóides se mostraram capazes de aumentar a síntese e/ou atividade da D1, enquanto fatores nutricionais

como jejum, induzem uma diminuição na expressão de mRNA para D1 (Bianco e cols., 2002).

3.2 - Iodotironina Desiodase Tipo 2 (D2)

Essa isoforma catalisa apenas a remoção do iodo do anel externo do hormônio tireóideo, podendo converter T_4 a T_3 e rT_3 a $3,5-T_2$. Assim como a D1, a isoforma tipo 2 também é um proteína integral de membrana, sendo provável, entretanto, que se trate de uma enzima localizada no retículo endoplasmático, o que explicaria o rápido acesso ao núcleo do T_3 gerado pela D2 a partir do T_4 . Estudos comprovam a presença de D2 em hipófise, cérebro, coração e tecido adiposo marrom de ratos e na tireóide, coração, cérebro, músculo esquelético, placenta, rins e pâncreas humano (Bianco e cols., 2002).

Supõe-se que a principal contribuição fisiológica da D2 é regular os níveis intracelulares de T_3 nos tecidos onde a deficiência deste hormônio seria mais crítica. Em tecidos que expressam D2, como o sistema nervoso central, o tecido adiposo marrom e a adeno-hipófise, a atividade desta enzima está aumentada no hipotireoidismo. Isso leva ao aumento da conversão local de T_4 para T_3 , o que pode ser visto como um mecanismo adaptativo desses tecidos em resposta à queda dos níveis circulantes dos hormônios tireóideos (Bianco e cols., 2002).

3.3 - Iodotironina Desiodase Tipo 3 (D3)

Esta é a principal enzima inativadora de T_4 e T_3 , formando a partir destes, rT_3 e $5',3'-T_2$ respectivamente, e acredita-se que ambos sejam biologicamente inativos (Bianco e cols., 2002). Essa enzima contribui para a homeostase dos hormônios tireóideos, por proteger os tecidos de um excesso desses hormônios.

Sua localização subcelular ainda não está bem definida, mas parece estar associada à fração microssomal. A D3 está presente na pele, cérebro e placenta de ratos adultos enquanto pode ser encontrada no músculo esquelético, fígado e intestino de ratos neonatos (Bianco e cols., 2002).

O T_3 é fundamental para o desenvolvimento fetal normal. Entretanto, níveis elevados desse hormônio são prejudiciais para o feto, podendo levar a má-formações e morte. Assim, é necessário que durante o desenvolvimento os níveis séricos e intracelulares de T_3 sejam mantidos dentro de um limite estreito (Carvalho, 2003). Durante este período, a D2 e a D3 exercem um papel fundamental no controle do T_3 sérico, enquanto a D1 parece ser mais importante posteriormente (Bianco e cols., 2002; Croteau e cols., 1995).

4 - Regulação da Função Tireóidea

4.1 - Eixo Hipotálamo-Hipófise-Tireóide

A tireotrofina ou hormônio estimulador da tireóide (TSH) é um hormônio glicoprotéico sintetizado e secretado por células denominadas tireotrofos, localizadas na adeno-hipófise. O TSH é o principal regulador da função tireóidea. Sua estrutura consiste das subunidades α e β ligadas não covalentemente. A subunidade α é comum a outros hormônios glicoprotéicos como hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo estimulante (FSH) e gonadotrofina coriônica. A subunidade β tem uma seqüência específica de aminoácidos que está relacionada à ligação do TSH com seu receptor e a atividade hormonal, sendo as duas subunidades necessárias para a ação hormonal (Wondisford e cols., 1996).

O receptor do TSH pertence à superfamília dos receptores acoplados à proteína G: Gs e Gq (Duprez e cols., 1998). Assim, quando o TSH se liga ao seu receptor na membrana das células foliculares, uma série de modificações no

metabolismo da célula folicular levam ao estímulo da produção hormonal e também ao crescimento da glândula. Os passos da formação dos hormônios tireóideos estimulados pelo TSH incluem a estimulação do transportador de iodeto (Kaminsky e cols., 1994), da síntese de tireoperoxidase (Chazenbalk e cols., 1987), de tireoglobulina (Larsen e cols., 2002) e da geração intracelular de H_2O_2 (Carvalho e cols., 1996). A endocitose do colóide e a secreção dos hormônios tireóideos também são estimuladas pelo TSH (Larsen e cols., 2002).

O que se observa em indivíduos normais é que um eventual aumento nas concentrações séricas de hormônios tireóideos tem como consequência a inibição da produção de TSH. Na situação oposta, quando há diminuição nas concentrações circulantes de hormônios tireóideos, a inibição da produção de TSH diminui, com consequente aumento na síntese e secreção deste hormônio e estímulo à produção hormonal pela tireóide. Assim, as concentrações de T_3 e T_4 são restauradas e diminui o estímulo para a liberação de TSH (Larsen e cols., 2002).

Existem três hormônios de grande importância no controle da síntese e secreção do TSH: o T_3 , que têm ação inibitória, o TRH (hormônio estimulador de tireotrofina), que apresenta efeito estimulatório, e a somatostatina, que tem ação inibitória. O TRH é um tripeptídeo produzido no hipotálamo. Quando o TRH se liga ao seu receptor nos tireotrofos da adeno-hipófise ocorre estímulo da síntese de ambas as subunidades do TSH, assim como do seu processamento pós-traducional. Estes efeitos parecem ser mediados por cálcio e GMPc (Larsen e cols., 2002).

Os hormônios tireóideos têm efeito inibitório sobre a produção de TSH de duas maneiras: uma direta, inibindo a síntese e a secreção deste hormônio na hipófise e uma indireta em que a produção hipotalâmica do TRH é inibida, Figura 6. Comparando-se a adenohipófise com outros tecidos, há um predomínio relativo nesta glândula da ligação nuclear do T₃ gerado localmente por desiodação do T₄ (Wondisford e cols., 1996).

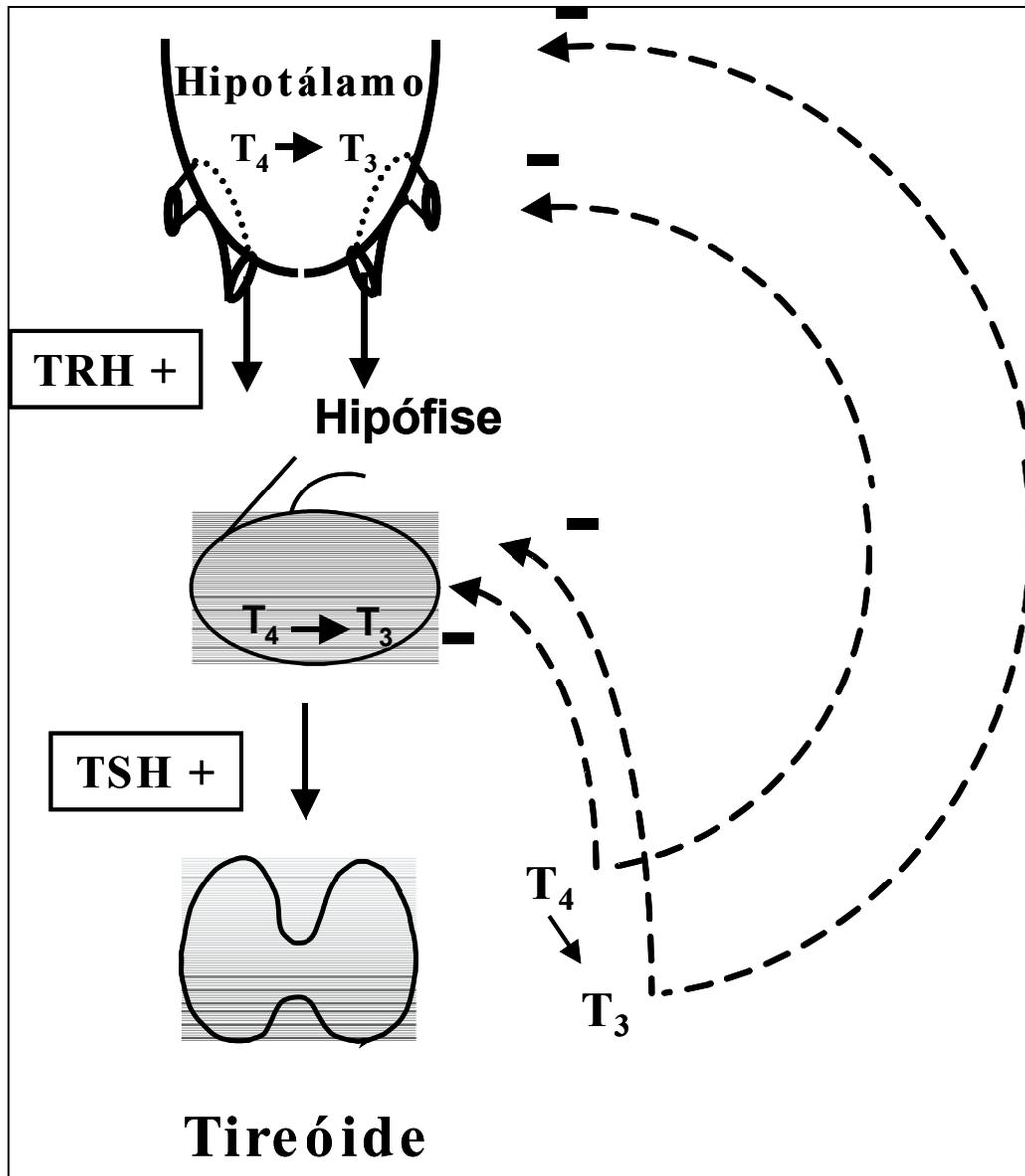


Figura 6: Eixo hipotálamo-hipófise-tireóide.

A somatostatina é um peptídeo inicialmente isolado no hipotálamo mas que também é encontrado em outros tecidos do corpo. Ela é capaz de inibir a secreção de TSH diretamente, agindo sobre os tireotrofos, e indiretamente, inibindo a liberação de TRH a nível hipotalâmico (Patel e cols, 1986). A ligação da somatostatina ao seu receptor leva à diminuição das concentrações intracelulares de AMPc e de cálcio livre. Os hormônios tireóideos aumentam a secreção de somatostatina e assim a de TSH (Wass, 1995).

4.2 - Auto-regulação pelo iodo

A função da glândula tireóide é regulada também de acordo com a concentração de iodo disponível. Esta característica adaptativa da tireóide é denominada auto-regulação (Pisarev, 1985).

Se forem administradas doses crescentes de iodeto a um indivíduo normal, inicialmente ocorrerá um aumento da formação de hormônios tireóideos. Entretanto, dando-se prosseguimento ao tratamento, poderá ser observada diminuição da síntese hormonal. Isto ocorre devido ao bloqueio relativo da organificação do iodo (efeito Wolff-Chaikoff), em consequência dos altos níveis de iodo intra-glandular (Larsen e cols., 2002).

O efeito Wolff-Chaikoff, entretanto, possui uma limitação. Uma vez que, dentre as etapas envolvidas na síntese hormonal que são inibidas, está o transporte de iodeto, a concentração intra-tireóidea de iodeto tende a diminuir, retornando aos níveis normais, insuficientes para inibir a organificação. Assim, a inibição da síntese será revertida e a glândula voltará a produzir as mesmas quantidades de hormônios tireóideos que produzia antes do tratamento. Este fenômeno é denominado escape do efeito Wolff-Chaikoff (Larsen e cols., 2002).

Parte dos efeitos do iodo sobre a glândula tireóide pode ser revertida por drogas que inibem a sua organificação. Isto sugere que o iodo precise primeiro ser

organificado para, só então, apresentar efeito inibitório. Entretanto, nem todos os efeitos são via iodo organificado. A inibição da secreção hormonal e a diminuição do bócio são exemplos de efeitos que continuam ocorrendo mesmo quando se administra bloqueadores da organificação do iodo. Estas ações podem, portanto, ser atribuídas ao próprio iodeto. Isto demonstra que o efeito inibitório do iodo provavelmente não se dá por um mecanismo único e que várias etapas da síntese e secreção hormonal são afetadas de maneira diferente pelo iodo (Pisarev, 1985).

5 – Os Estrógenos.

Os estrógenos são hormônios esteróides que exibem uma grande variedade de atividades, sendo importantes na proliferação, diferenciação e desenvolvimento de vários tecidos (Gustafsson, 1999).

Os seres humanos produzem três estrógenos, o estradiol (E_2), o estriol e a estrona (Dubey e cols., 2004). O estradiol (E_2) é a forma predominante no organismo humano, sendo importante para o desenvolvimento da glândula mamária e do útero, para a manutenção da gravidez e densidade óssea, para proteção contra doenças cardiovasculares, e no alívio dos sintomas da menopausa. O estradiol é sintetizado primariamente no ovário, porém pode também ser produzido periféricamente por ação da enzima aromatase no tecido adiposo, pele, endométrio, mucosa vaginal, mama, fígado, vasos sanguíneos e coração (Dubey and Jackson, 2001; Vaya e Tamir, 2004).

Acredita-se que o estradiol exerça seus efeitos via receptor estrogênico (RE). Dois subtipos de REs foram descritos até o momento: RE α e RE β . Esses receptores, em sua grande maioria, encontram-se no núcleo e formam dímeros quando ligados ao estrogênio. Os dímeros então interagem com o elemento de resposta ao estrogênio (ERE), e regulam a transcrição dos genes responsivos ao estrogênio. Uma pequena percentagem (2-3%) dos receptores de estrogênio

estão localizados na membrana celular e contribuem para os efeitos não-genômicos do estrogênio (Xu e cols., 2003; Chen e cols., 2004; Razandi e cols., 1999).

A presença um anel fenólico e um segundo grupamento capaz de realizar pontes de hidrogênio, são características estruturais necessárias para a ligação dos estrógenos aos receptores RE α e RE β . Deste modo, qualquer composto que induza a dimerização do receptor e subsequente ligação ao ERE, pode ser considerado um estrógeno (Setchell e Cassidy, 1999; Limer e Speirs, 2004; Cornwell e cols., 2004).

A distribuição tissular e a afinidade ao ligante é diferente entre os subtipos de receptor. Alguns tecidos como útero, tecido mamário, vagina, rins e núcleo arqueado hipotalâmico expressam predominantemente RE α , enquanto pulmão, ossos, trato urogenital, sistema cardiovascular, sistema imune, próstata, ovário, células da granulosa, e núcleo paraventricular hipotalâmico expressam predominantemente RE β . Outros tecidos como tireóide e hipófise expressam ambos RE β e RE α (Cornwell e cols., 2004; Limer e Speirs, 2004; Tanaka e cols., 2003).

Os REs são expressos tanto em tecidos com função reprodutora quanto não-reprodutora. A principal função da sinalização via RE em mulheres está relacionada ao desenvolvimento normal do trato reprodutivo, como o crescimento uterino, características sexuais secundárias e comportamento reprodutivo (Muramatsu and Inoue, 2000). Em homens, a sinalização via RE é necessária no desenvolvimento normal e fisiológico dos órgãos reprodutivos (Eddy e cols., 1996). A deficiência de estrogênio parece estar envolvida em muitos processos patológicos como aterosclerose, osteoporose, e processos de degeneração do sistema nervoso, enquanto acredita-se que elevados níveis de estrogênio estejam ligados ao desenvolvimento e promoção de tumores (Diel, 2002; Tanaka e cols., 2003).

O mecanismo de ação dos estrógenos nos diferentes tecidos ainda não está completamente elucidado. Estudos recentes têm mostrado a complexidade dos mecanismos celulares envolvidos na ação estrogênica. Dentre as importantes descobertas podemos citar as de Onate e cols. (1995) e Lavinsky e cols., (1998) que descobriram através de estudos *in vitro* os co-ativadores e co-repressores associados aos receptores de estrogênio, respectivamente, sendo estes envolvidos na iniciação e regulação da transcrição gênica pelos REs (Diel, 2002).

6 – Influência dos estrógenos sobre a função tireóidea

A prevalência de bócio é bem maior em mulheres que em homens sendo que o motivo ainda permanece obscuro. O risco aumentado de bócio pode estar relacionado à presença de concentrações maiores de estrogênio em mulheres, o que poderia ter efeitos diretos ou indiretos tanto no crescimento celular tireóideo quanto na função tireóidea. Supõe-se que o E₂ deva exercer efeitos diretos nos tireócitos uma vez que já se constatou a presença de RE α em cultura de células FRTL-5 (Furlanetto e cols., 1999).

Fukuda e cols. (1975) demonstraram que o estrogênio administrado a ratas ovariectomizadas e hipofisectomizadas estimula a captação de radioiodo pela tireóide, porém recentemente, Furlanetto e cols. (1999), demonstraram a presença de RNAm da isoforma α do receptor de estrogênio em culturas de células FRTL-5 (tireócitos murinos) e, neste modelo, a administração de 17 β -estradiol levou ao bloqueio da expressão do RNAm do co-transportador Na⁺/I⁻ (NIS), o que provavelmente levaria à redução do transporte apical de iodeto, primeira etapa da biossíntese dos HT. Neste estudo, também foi demonstrado que o estrogênio estimula a proliferação de células tireóideas em cultura tanto na presença quanto na ausência de TSH. Este resultado é consistente com achados prévios que mostram aumento da incidência de câncer da tireóide em ratas ovariectomizadas tratadas com 17 β -estradiol (Mori e cols., 1990).

A presença de RE na adeno-hipófise (Stefaneanu *et al.*, 1994) reforça a hipótese de modulação da secreção de TSH pelos estrogênios. Farbota e cols.,(1987), e Chen & Walfish (1978a e 1978b), não observaram alterações do TSH em ratas castradas por 4 e 2 semanas, respectivamente. Christianson *et al.* (1981) demonstraram que o tratamento de ratas castradas com Eb não afetou as concentrações séricas de TSH. Moreira e cols., (1997) observaram diminuição da liberação basal de TSH em hipófises isoladas *in vitro* de ratas ovariectomizadas; que não foi revertida pela reposição com Eb em doses fisiológicas, enquanto uma dose muito elevada de Eb reduziu a liberação de TSH basal e a estimulada por TRH, o que sugere um efeito inibitório de doses supra-fisiológicas de estrogênio. Um efeito bifásico do estradiol também foi visto por Fisher & D'angelo (1971). Diferentemente, Lisbôa e cols., (1997) demonstraram que a ovariectomia das ratas e a reposição com Eb em doses fisiológicas destes animais não modificaram o TSH sérico *in vivo*, mas com doses suprafisiológicas houve elevação do TSH sérico.

Christianson e cols., (1981) e Lisbôa e cols., (1997) não detectaram alterações no T₃ e T₄ séricos em ratas castradas tratadas ou não com Eb; entretanto, Lisbôa e cols., (1997) observaram, nas ovariectomizadas, uma tendência à diminuição do T₃ livre. Chen & Walfish (1978a, 1978b) não observaram diferenças nos HTs séricos frente a ovariectomia, mas a reposição com Eb aumentou o T₃ e diminuiu o T₄, totais e livres.

Miyashita e cols.,(1995) relataram que a ovariectomia ou o tratamento com β-estradiol não alteraram o RNAm e nem a atividade D1 hepática. Em contrapartida, Lisbôa e cols., (1997 e 2001) verificaram que a castração de ratas por 3 semanas diminuiu a atividade D1 hepática e hipofisária, e a reposição com Eb aumentou essas atividades para valores similares ao do controle, além de ter causado aumento da D1 na tireóide, e não ter alterado a D2 hipofisária. Observaram, ainda, que a administração de progesterona a

ratas castradas diminuiu a atividade D1 hepática, sem afetar a hipofisária, porém reduziu o efeito do estrogênio em ambos os tecidos.

Os estrógenos estão relacionados com o transporte sérico de T_4 em humanos, sendo este o efeito mais conhecido com relação à tireóide. O estrogênio aumenta as concentrações de TBG (globulina ligadora de tiroxina) devido à diminuição da depuração e também à maior produção desta proteína pelo fígado. Como consequência, há um aumento das concentrações séricas de T_4 total enquanto as concentrações de T_4 livre permanecem normais (Marqusee e cols., 2000).

Na gravidez, devido à alta concentração de estrogênio, ocorre um aumento da concentração de TBG, ocasionando elevação de T_4 ligado, o que leva ao aumento da reserva de T_4 extra-tireóideo (Burrow, 1993).

Na pós-menopausa, período em que ocorre diminuição significativa dos níveis de estrogênio e progesterona, é muito alta a incidência de doenças da tireóide, sendo possível também observarmos diminuição dos níveis de TSH com o envelhecimento (Urban, 1992).

Ainda há muita divergência a respeito dos efeitos do estrogênio sobre a tireóide, no entanto, os hormônios sexuais parecem exercer grande influência sobre o funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide dada a maior incidência de desordens tireoideanas em mulheres.

7 – O CLIMATÉRIO

O climatério é o período de passagem do estágio reprodutivo da vida da mulher para um estágio não reprodutivo, que compreende a pré-menopausa, a perimenopausa (menopausa) e a fase pós-

menopausa. Esse período é caracterizado por mudanças hormonais importantes. Em particular, os ovários param de produzir estrogênio e progesterona e há um aumento na produção dos hormônios gonadotróficos: o hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) (Borrelli, 2003).

Essas mudanças hormonais podem causar uma grande variedade de sinais e sintomas que diminuem a qualidade de vida, como fogachos (caracterizados por extremo rubor da pele), sensações de dispnéia, irritabilidade, fadiga, ansiedade, diminuição da força e da calcificação dos ossos em todo o corpo, bem como aumento do risco de desenvolver doença coronariana e câncer de mama (Borrelli, 2003; Kronenberg, 2002).

Recomenda-se a Terapia de Reposição Hormonal para combater os sintomas e doenças associadas à diminuição dos níveis de estrogênio e progesterona que ocorrem na menopausa. Contudo, estudos demonstraram que a Terapia de Reposição Hormonal se mostrou menos efetiva do que se pensava, na diminuição de algumas das condições associadas à menopausa e pode estar ligada ao aumento do risco de desenvolvimento de câncer e efeitos tromboembólicos. Esses efeitos têm levado as mulheres a optarem por outras formas de tratamento, como os fitoestrógenos (Nahas, 2004).

Devido às controvérsias se faz necessário encontrar substâncias que atuem seletivamente no receptor de estrogênio, exercendo efeitos estrogênio-símile no hipotálamo (a fim de prevenir as queixas do climatério), nos ossos (para prevenir a osteoporose), na vagina e na bexiga urinária (para prevenir a incontinência urinária), porém não devem apresentar os efeitos adversos do estrogênio, como a proliferação do tecido mamário e do endométrio, o que contribuiria para o desenvolvimento de tumores estrogênio-dependentes (Wuttke, 2003, Albertazzi, 2002, Nilsson, 2002).

8 – Efeitos dos fitoestrógenos sobre a função tireóidea

Mais recentemente, foi demonstrado que diversos fitoestrógenos, principalmente as isoflavonas, apresentam atividade anti-tireóidea. Os fitoestrógenos são naturalmente encontrados em alguns vegetais e são estrutural e funcionalmente similares ao estradiol - Figura 7 (Nahas, 2004). Nas plantas, os fitoestrógenos funcionam principalmente como antioxidantes, enquanto em animais e humanos acredita-se que funcionem como agonistas ou antagonistas estrogênicos (Albertazzi, 2002). Dentre as principais classes de fitoestrógenos podemos citar: *isoflavonas*, (como genisteína, daidzeína, biochanina A, glicetina), encontradas, por exemplo, nos grãos de soja e seus derivados; *lignan*s (enterolactona, enterodiol), encontradas em todos os cereais e plantas oleosas; *flavonóides* (quercetina, apigenina, luteolin), encontrados em algumas frutas e vegetais; *coumestranos* (coumestrol), encontrados em alguns brotos e na alfafa, e *stilbenes* (resveratrol), encontrados em amendoins, uva e vinho tinto (Nahas, 2004; Kirk, 2001, Limer, 2004; Dixon, 2004).

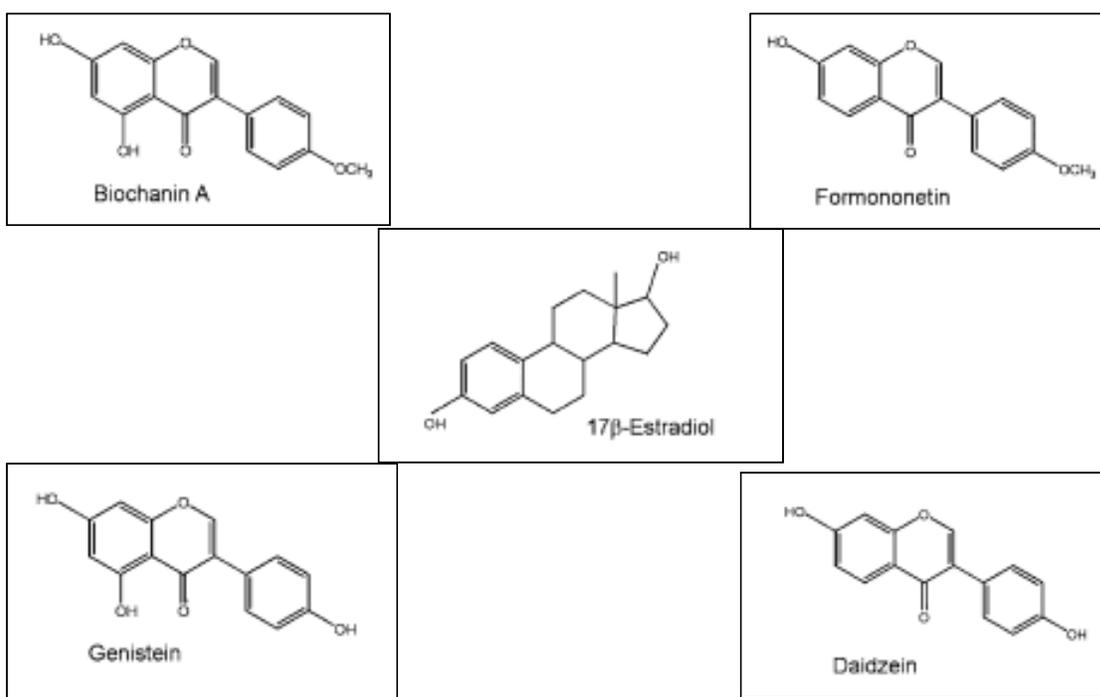


Figura 7: Estrutura química das principais isoflavonas encontradas no *Trifolium pratense*.

Os fitoestrógenos com maior ação estrogênica são genisteína, daidzeína e glicetina, que pertencem à classe das isoflavonas e que são encontradas em grandes quantidades nos grãos de soja. Esses são compostos não-estrogênicos que se ligam com baixa afinidade aos receptores de estrogênio (menos de 1% da afinidade de ligação do estradiol) e exibem ação seletiva, ou seja, podem agir como agonistas ou antagonistas dependendo do receptor estrogênico ao qual se ligam (Nahas, 2004).

Após a ingestão, as isoflavonas podem sofrer metabolizações que aumentam sua ação anti-tireóidea (Gaitan, 1996). Algumas das ações dos isoflavonóides sobre a função tireóidea incluem: inibição da atividade tireoperoxidase (Divi e Doerge., 1996), da atividade 5'-desiodase (Spanka e cols., 1990), competição com os hormônios tireóideos pela ligação a proteínas plasmáticas e ao seu receptor nuclear (Köhrle e cols., 1989). Também mostramos que diversos flavonóides isolados são capazes de inibir a atividade desiodase tipo 1 tireóidea (Ferreira e cols., 2002).

Os isoflavonóides têm outros efeitos além do anti-tireóideo, como: propriedades anti-inflamatórias, anti-alérgicas, anti-virais, anti-bacterianas e anti-oxidantes (Divi e Doerge, 1996; Tikkanen, 1998). Vários isoflavonóides são capazes de inibir a peroxidação lipídica, captar radicais livres de oxigênio *in vitro* (Sanz e cols., 1994), inibir a geração de ânion superóxido no sistema hipoxantina-xantina oxidase (Hanasaki e cols., 1994), evitar danos ao DNA causados por H₂O₂ (Duthie e cols., 1997) e também são capazes de inibir as enzimas responsáveis pela sulfatação dos estrógenos (Harris e cols, 2004).

8.1 – Metabolismo e mecanismo de ação dos fitoestrógenos.

A maioria dos fitoestrógenos são introduzidos na dieta na sua forma inativa (como conjugados β -glicosídeos), porém dados na literatura sugerem que a forma ativa destes compostos é a aglicona (Dixon, 2004; Setchell, 1998). Em humanos os glicosídeos são hidrolisados pela microflora intestinal à sua forma aglicona e acredita-se ser este um pré-requisito essencial para a biodisponibilidade das isoflavonas, uma vez que estudos sugerem que o enterócito não é capaz de absorver os fitoestrógenos como β -glicosídeos (Setchell, 2002). O metabolismo pela microflora intestinal resulta na formação de compostos com estrutura similar ao E_2 . As isoflavonas são os fitoestrógenos mais comuns e os mais utilizados atualmente (Albertazzi, 2002; Limer, 2004, Hollman, 1997). As duas principais isoflavonas são genisteína e daidzeína (Heinonen, 2004).

Dados na literatura sugerem uma resposta metabólica diferente em cada indivíduo e acredita-se que fatores tais como composição da flora intestinal e trânsito intestinal possam contribuir para a grande variação encontrada nos seres humanos. Essa grande variabilidade no metabolismo dos fitoestrógenos é muito importante clinicamente, pois pode influenciar nas diferentes respostas biológicas (Albertazzi, 2002). A baixa biodisponibilidade observada com a ingestão de altas concentrações de isoflavonas pode ser conseqüência da quantidade ingerida superar a capacidade de hidrólise do intestino ou pelo fato de haver saturação de um possível transportador em altas concentrações dos fitoestrógenos. Desta forma, é possível que o consumo de baixas concentrações de isoflavonas possam possibilitar um maior efeito biológico (Setchell, 2002).

A genisteína é a isoflavona da soja de maior interesse. Apesar de sua similaridade ao E_2 , ela se liga ao receptor com afinidade bem menor. As isoflavonas se ligam ao $RE\beta$ com maior afinidade que ao $RE\alpha$ e esta maior afinidade para $RE\beta$ torna os fitoestrógenos os candidatos preferenciais como alternativa para a Terapia de Reposição Hormonal, uma vez que o $RE\alpha$ é a forma predominante no útero e

mama, sendo possível então evitar o crescimento endometrial e o aumento do risco de desenvolvimento de câncer de mama relatada na Terapia de Reposição Hormonal convencional (Fitzpatrick, 2003; Beck, 2003; Adlercreutz, 2002).

A genisteína pode exercer efeito em muitos outros mecanismos celulares. Dados na literatura afirmam haver inibição das enzimas tirosina cinases, topoisomerase I e II; pode ainda agir como antioxidante, uma vez que parece aumentar a atividade das enzimas antioxidantes; dados também sugerem alteração no metabolismo do estrogênio, pois ela é capaz de inibir as enzimas: aromatase, 5 α -redutase, 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase e sulfotransferases (enzimas que sulfatam tanto estrogênio quanto uma grande variedade de componentes naturais). Alguns trabalhos sugerem um aumento na globulina ligadora de hormônio sexual enquanto outros negam esse aumento (Fitzpatrick, 2003; Birt, 2001; Kirk, 2001).

Neste estudo, focalizaremos as ações de *Trifolium pratense*, fitoestrógeno muito utilizado para combater os sintomas da menopausa, sobre a função tireóidea.

8.2 – *Trifolium pratense* (Red clover)

O *Trifolium pratense* (Tp) é nativo de regiões próximas ao Mediterrâneo, mas agora está distribuído pelo mundo. Tem sido tradicionalmente utilizado na Europa e América do Norte como abortivo, no tratamento anti-câncer, anti-espasmódico, entre outros. Recentemente, tem recebido mais atenção devido ao fato de ser um produto natural que pode servir como alternativa para Terapia de Reposição Hormonal e também por exercer efeitos benéficos sobre o sistema cardiovascular. *Trifolium pratense*, como a soja, é uma fonte de isoflavonas (Nahas e cols., 2004).

O *Trifolium pratense* contém um grande número de flavonóides, sendo as isoflavonas, o principal componente responsável pela atividade estrogênica da planta. Genisteína e daidzeína, as isoflavonas predominantes na soja, estão presentes em grandes quantidades na forma de seus precursores metilados, biochanina A e formononetina. Dados na literatura sugerem que genisteína e daidzeína causam aumento do peso uterino em ratas (Casanova e cols., 1999; Saloniemi, 1995). Contudo, estudos utilizando as proteínas da soja isoladas não apresentaram atividade estrogênica em ratas (Tansey e cols., 1998). Dados indicando se o extrato de *Trifolium pratense* pode induzir efeitos similares à genisteína e daidzeína em ratas ovariectomizadas são escassos.

A genisteína, a daidzeína, a biochanina A e a formononetina existem na planta na forma glicosídica ou glicosídica conjugada ao malonato, que são formas inativas. Os conjugados são rapidamente hidrolisados pelas bactérias presentes no intestino às suas formas bioativas, as agliconas, e então são absorvidos pelo intestino. Uma quantidade menor de componentes com atividade anti-estrogênica, incluem prunetin e kaempferol, que também estão presentes na planta (Piersen, 2003; Beck, 2003). Como dito anteriormente, os caminhos metabólicos dependerão de cada indivíduo bem como da raça e gênero (Beck, 2003).

As pesquisas acerca do mecanismo de ação do *Trifolium pratense* têm sido focadas nas interações de isoflavonas purificadas com os receptores de estrogênio. Collins e cols. (1997) descreveram atividades anti-estrogênicas da biochanina A em culturas de células.

Além de sua preferência pelo receptor β , as isoflavonas exibiram diferentes potências de ligação sendo genisteína > daidzeína > biochanina A > formononetina (Piersen, 2003).

Estudos realizados por Ishizuki e cols. (1991) demonstraram bócio e aumento do nível de TSH, em 37 adultos que se alimentaram com 30 gramas de grãos de soja em conserva, porém não foram observadas mudanças nos níveis séricos de T₃ e T₄. Um mês após o término do consumo da soja, os níveis de TSH retornaram aos níveis originais, e o bócio foi reduzido.

Duncan e cols. (1999a) descreveram diminuição significativa dos níveis de T₃ em 14 mulheres na pré-menopausa, mas o mesmo não foi constatado em 18 mulheres na pós-menopausa (Duncan e cols. 1999b), que ingeriram 2 mg de isoflavonas da soja por kg por dia num período de três meses.

Divi e Doerge (1996) em seu estudo concluíram que genisteína e daidzeína bloquearam a iodação dos resíduos tirosil catalisada pela enzima TPO, deste modo inibindo a síntese de T₄. Num estudo realizado por Madej e cols. (2002) utilizando ovelhas castradas alimentadas com silagem à base de Tp foi constatado estímulo à secreção dos hormônios tireóideos e mudança no aspecto histológico dos folículos tendendo ao crescimento.

Existem inúmeros trabalhos sobre os efeitos dos fitoestrógenos *in vitro*, porém estudos *in vivo* são ainda muito escassos. Tendo em vista o crescente consumo de *Trifolium pratense* por mulheres após a menopausa, apesar de existirem poucos dados a respeito dos possíveis efeitos colaterais decorrentes deste consumo, e considerando as ações *in vitro* das isoflavonas presentes neste vegetal, decidimos estudar os efeitos da administração de *Trifolium pratense* a ratas castradas sobre diversos parâmetros da função tireóidea, assim como seu possível efeito antagonista estrogênico neste tecido.

Objetivo geral

Neste estudo, objetivamos a melhor compreensão das ações do fitoestrógeno *Trifolium pratense* sobre a função tireóidea de ratas castradas, uma vez que dados da literatura sugerem que os componentes desta planta exercem ações anti-tireóideas *in vitro*.

Objetivos específicos

Em ratas Wistar castradas tratadas com E₂, Tp ou ambos, pretendemos:

- 1) Analisar as concentrações séricas de T₃, T₄ e TSH.
- 2) Analisar a captação de iodeto pelo tireócito nos grupos de animais estudados, com o objetivo de verificar se o tratamento com Tp modula a função do co-transportador Na⁺ / I⁻.
- 3) Estudar os efeitos de Tp sobre o peso dos animais e também das glândulas tireóide e hipófise, além de seu efeito sobre o peso uterino.
- 4) Verificar a ação deste fitoestrógeno sobre a atividade tireoperoxidase, enzima chave para a biossíntese dos hormônios tireóideos.
- 5) Medir a atividade hipofisária da enzima D1 para melhor entender os efeitos desse fitoestrógeno sobre o eixo hipófise-tireóide.

- 6) Avaliar a atividade D1 no fígado, rins e tireóide, pois esses tecidos são importantes sítios de produção de T₃ para a circulação em roedores.

MATERIAIS E MÉTODOS

1 - Animais

Ratas Wistar fêmeas, adultas, pesando entre 200 e 300 g foram mantidas em gaiolas coletivas, num máximo de seis animais por gaiola, sob condições controladas de temperatura ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) e luz (12h de luz, iniciando às 7:00 da manhã) e todos os experimentos foram realizados de acordo com os padrões de cuidados com os animais, definidos pelo comitê institucional (www.biof.ufrj.br/cauap.doc). Todos os animais tiveram água e ração oferecidos *ad libitum*.

1.1 – Citologia Vaginal

Realizamos a citologia vaginal dos animais a fim de selecionarmos os que apresentassem ciclo estral regular de 4 a 5 dias.

Para observar as variações cíclicas que ocorrem durante o ciclo estral, a citologia vaginal foi realizada através de esfregaço com NaCl 0,9%, por um período de 2 semanas em todos os animais. Somente foram incluídas no estudo as ratas que apresentavam ciclo estral regular de 4 a 5 dias.

1.2 – Ovariectomia

Realizamos a castração da maior parte das fêmeas, sob anestesia com Rompum (5 mg/mL) e Cetamina (50 mg/mL) intraperitoneal,

fazendo remoção bilateral dos ovários. Os animais do grupo controle sofreram estresse cirúrgico (anestesia, corte e sutura).

Os animais foram sacrificados após 23 dias de ovariectomia. O sacrifício em todos os experimentos realizados ocorreu entre 9:00 e 10:30 horas.

Os animais foram divididos em cinco grupos:

- ▶ Controle;
- ▶ Ovariectomizadas (Ovx);
- ▶ Ovx com reposição de 17- β estradiol (E_2) na dose de 5,0 $\mu\text{g}/100\text{g p.c.}$;
- ▶ Ovx com administração de *Trifolium pratense* (Tp) na dose de 500 mg/kg/pc;
- ▶ Ovx + Tp+ E_2 nas doses acima.

1.3 – Administração de 17 β -Estradiol às Ratas Ovariectomizadas

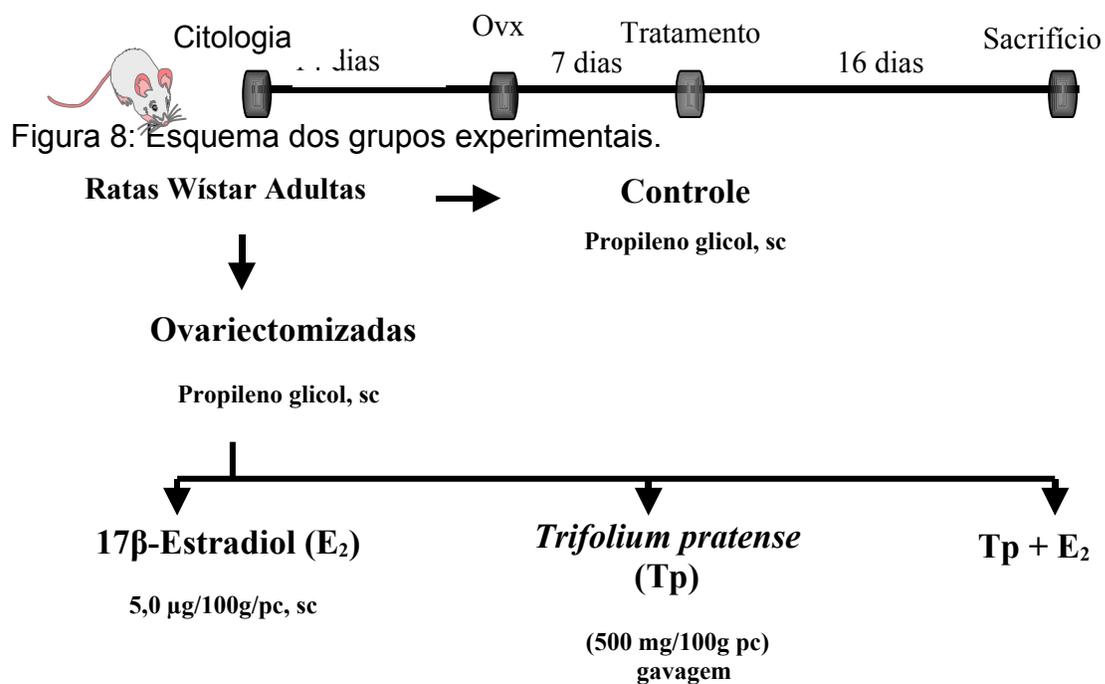
As ratas ovariectomizadas receberam 17 β -estradiol (Sigma) por via subcutânea durante 16 dias após a primeira semana de castração, na dose de 5,0 $\mu\text{g}/100\text{g p.c.}$ (grupos E_2 e Tp+ E_2). Esta dose de estradiol administrada corresponde a utilizada na reposição hormonal em mulheres na pós-menopausa. O 17 β -estradiol foi dissolvido em pequena quantidade de etanol e suspenso em propileno glicol para uma concentração de 5,0 $\mu\text{g}/100\text{g p.c.}$ Tanto os animais controle (C) quanto os animais ovariectomizados (Ovx) que não foram tratados (com E_2 e/ou Tp) receberam injeção de veículo (propileno glicol).

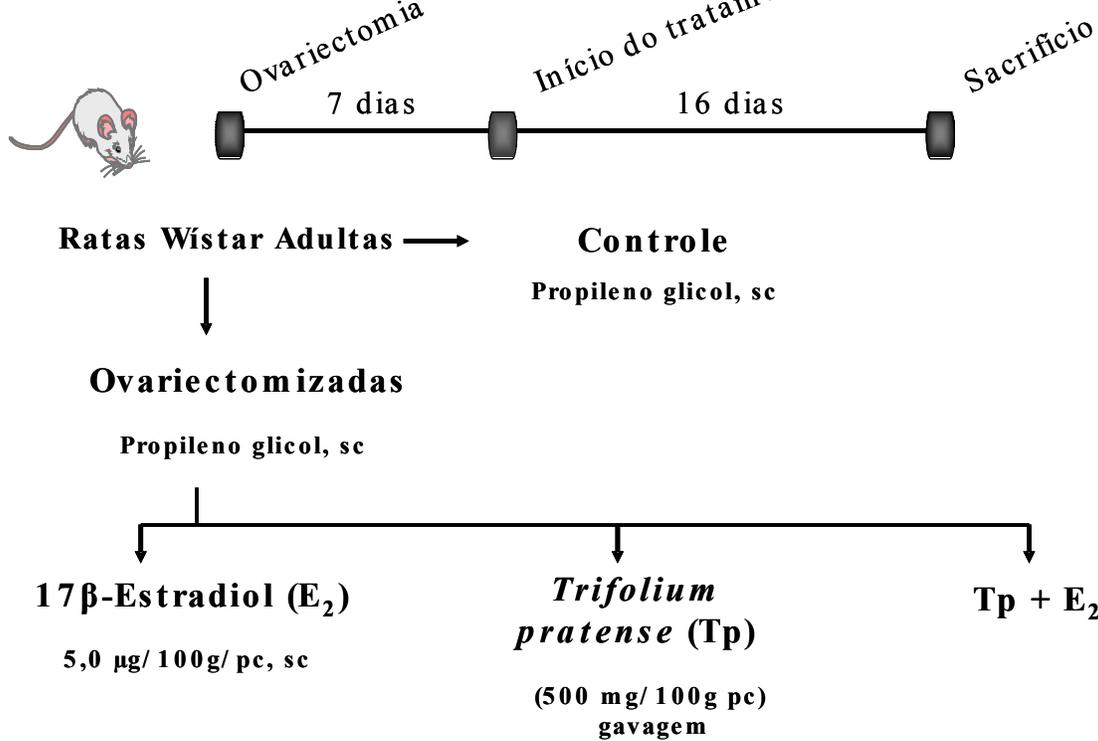
1.4 – Administração do Fitoestrógeno *Trifolium pratense*.

Os animais ovariectomizados receberam o fitoestrógeno *Trifolium pratense* na dose de 500 mg/kg/d – contendo 8% de isoflavonas – através de gavagem, por 16 dias (grupos Tp e Tp+ E_2).

Esta dose foi escolhida, por ser a clinicamente utilizada para tratar os sintomas da menopausa. O fitoestrógeno Tp foi adquirido na

empresa Galena Química e Farmacêutica Ltda a qual realizou cromatografia líquida de alta performance a fim de comprovar o conteúdo de isoflavonas no extrato.





Logo a seguir as tireóides foram armazenadas a -20°C em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,2, contendo iodeto de potássio 1 mM até o momento da homogeneização, para posterior dosagem da atividade tireoperoxidase pelo método de oxidação do iodeto.

3 – Controle do Peso Corporal

Os animais foram pesados semanalmente antes da ovariectomia e durante o experimento, utilizando uma balança digital da marca *Precision*.

4 – Sacrifício dos Animais

O sacrifício foi feito por decapitação, ao final de um período de 16 dias de tratamento pela manhã, sendo coletado sangue que foi centrifugado para obtenção do soro; este foi armazenado à -20°C até o momento da dosagem das concentrações séricas de TSH, T₃, T₄, através de radioimunoensaio (RIE) específico.

Foram excisados fígado, rim, tireóide e hipófise, que a seguir foram armazenados a -70°C para posterior dosagem da atividade da enzima desidase tipo 1. Também retiramos o útero para pesagem.

5 – Dosagem da Atividade Tireoperoxidase pelo Método de Oxidação do Iodeto

5.1 – Extração da Tireoperoxidase Murina

Cada glândula armazenada a -20°C em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,2, contendo iodeto de potássio 1 mM foi homogeneizada em 500 µl do mesmo tampão, conforme descrito por Moura e cols. (1989) e Carvalho e cols. (1994), utilizando-se homogeneizador elétrico (Ultraturrax T-25, Ika-Labortechnik). Os homogenados foram centrifugados (100.000g, 35 min, 4°C) e o precipitado foi ressuspenso em 0,5 mL de digitonina (1%) e mantido a 4°C em câmara fria por 24 horas. A seguir, foi realizada nova centrifugação nas mesmas condições. O sobrenadante contendo TPO pseudo-solubilizada foi utilizado nos ensaios de medida da atividade TPO. A concentração de proteína da amostra foi medida através do método de Bradford (1976).

5.2 – Atividade de Oxidação do Iodeto da Tireoperoxidase

A atividade da enzima tireoperoxidase foi medida através da geração de tri-iodeto *in vitro*, como descrito anteriormente (Moura e cols., 1989; Carvalho e cols., 1994). Para tal, quantidades crescentes da preparação contendo TPO foram adicionadas a uma cubeta contendo iodeto de potássio 24mM, glicose 11mM e tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4, em volume final de 2ml. A seguir, adicionou-se 10 µl de glicose oxidase 0,1% (Boehringer Grade I) para iniciar a reação. A absorbância (A) foi então medida em um espectrofotômetro Hitachi U-3300, no comprimento de onda de 353nm durante 4 minutos. O $\Delta A_{353nm}/min$ foi determinado a partir da porção linear da curva de reação e relacionado com a concentração de proteína da amostra. O resultado foi expresso em U/g de proteína.

5.3 – Atividade de Desiodase Tipo 1

Para se estudar a atividade da enzima D1 foram utilizadas as técnicas desenvolvidas por Berry *et al.* (1991), seguindo protocolo de Larsen e Bianco (comunicação pessoal), sendo as técnicas adaptadas e padronizadas no decorrer desta tese em nosso laboratório. Foram seguidas as etapas descritas abaixo:

Processamento dos tecidos

As amostras de fígado e rim foram pesadas em balança digital (*Precision advanced*) (25 mg do tecido/ml de tampão), a tireóide e o *pool* de 2 hipófises, foram homogeneizados em tampão sucrose-DTT (0,25 M sucrose e 10 mM DTT). Os tecidos foram homogeneizados, em gelo, utilizando-se o Ultra-turrax T25 (*Ika-Labortechnik*). Os homogenizados foram armazenados até o dia do ensaio a -80°C. Alíquotas de 20 µl foram guardadas separadamente a -20°C para dosagem de proteínas pelo método de Bradford (1976). As amostras foram solubilizadas com NaOH 2,5 N pelo menos 30 minutos antes da dosagem (sempre em duplicata) e a albumina bovina sérica (*BSA – Sigma, MO, EUA*) foi utilizada para a construção de uma curva padrão.

Purificação do rT3-¹²⁵I

Antes da determinação da atividade da D1, o traçador radioativo foi purificado em virtude do decaimento radioativo e das desiodações espontâneas das iodotironinas marcadas, mesmo na ausência da enzima. Esta etapa garantiu que a maior parte do iodo radioativo presente após a reação de desiodação fosse originado da ação enzimática.

Para a purificação, foi utilizada uma coluna de 2ml de Sephadex L20 (*Amersham Biosciences*) (4 ml de H₂O/g de gel seco) para purificar o rT3 radioativo, cuja atividade específica usada foi 1210 µCi/µg (44,8 MBq/µg) (*Perkinelmer Life Sciences, Inc., Boston, MA*). Uma alíquota de 70 µl do rT3 marcado foi diluída em 12 ml de H₂O destilada e aplicada à coluna, seguindo uma

lavagem com 6 ml de H₂O destilada. Desprezou-se os eluatos contendo radioiodeto e o rT3 marcado foi eluído por nove vezes de 500 µl com etanol 70%. O eluato de etanol 70% contendo a iodotironina foi colhido em nove tubos de vidro, de onde foram retirados 5 µl para contagem da radiação gama no contador Wizard (1470 Wallac WizardTM automatic gamma counter). Os tubos com mais de 5.000 cpm/5 µl foram reunidos e guardados a 4°C, ao abrigo da luz, até o dia seguinte, quando era realizado o ensaio.

Ensaio de atividade da D1

Para dosar a atividade da D1 foram adicionadas as substâncias descritas abaixo, nesta ordem:

- 1) tampão PE (fosfato de sódio 100 mM, EDTA 1 mM, pH 6,9) calculado para obter um volume total de reação de 300 µl;
- 2) ditioneitol (DTT) 10 mM (que é cofator da enzima);
- 3) rT3 frio 1 µM;
- 4) o homogenado tecidual (volume calculado para conter 30 µg de proteína por fígado, rim e tireóide; e 150 µg de proteína da hipófise).

A adição de 50 µl do rT3-¹²⁵I em todos os tubos deu início à reação. Durante 60 minutos os tubos foram incubados a 37°C. Decorrido o tempo de incubação, a reação foi interrompida colocando-se os tubos em banho de gelo. Em seguida, foram adicionados 200 µl de soro fetal bovino (*Cultilab, BR*) e 100 µl de ácido tricloro acético (TCA) 50% para a precipitação das proteínas. Os tubos foram agitados vigorosamente no *vortex* durante 2 minutos e centrifugados (8000g por 3 minutos, microcentrífuga). Finalmente, 360 µl do sobrenadante foram transferidos para tubos de contagem para medir a radioatividade no contador gama. A atividade da enzima foi expressa em pmoles de rT3/ min. mg de ptn.

6 – Dosagens Hormonais – Radioimunoensaios

6.1 – Radioimunoensaio de TSH

A determinação dos níveis séricos de TSH foi realizada através de radioimunoensaio específico, utilizando TSH murino purificado para a preparação da curva padrão (0,625 a 25 ng/mL), TSH murino purificado para ser iodado e anticorpos de coelho anti-TSH murino (1° Ac) foram fornecidos pelo “*National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney Diseases*” (NIDDK - Bethesda, USA).

A iodação da molécula do TSH com ^{125}I foi realizada em nosso laboratório, pelo método da cloramina T e a molécula marcada foi purificada em uma coluna (Biogel – P60 fino da Bio-rad, EUA). O RIE foi realizado pelo método do 2° anticorpo, com adição de 6% de polietilenoglicol (Ortiga, 1992).

6.2 – T₃ e T₄.

As concentrações séricas de T₃ e T₄ foram determinadas através de Kit comercial para RIE de T₃ (DLS – 3100 Active®, TX, EUA) e T₄ (DLS – 3200, Active®, TX EUA) totais, contendo anticorpos específicos aderidos à parede dos tubos de polipropileno e com T₃ e T₄ ligados ao radiotraçador (^{125}I) com atividade específica de 5 μCi (185 KBq). As curvas padrão foram realizadas com T₃ e T₄ diluídos em soro de rato livre de iodotironinas (soro zero) nas concentrações de 25 a 1000 ng/dl e 1 a 50 $\mu\text{g}/\text{dl}$, respectivamente. Todo o procedimento foi realizado seguindo-se as recomendações do fornecedor.

7 – Análise Estatística

Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média, tendo sido realizados, no mínimo, três experimentos diferentes,

sendo a única exceção a captação de radioiodeto (foram realizados dois experimentos). Cada grupo experimental continha pelo menos cinco animais a cada experimento.

A análise estatística utilizada na comparação dos resultados apresentados foi realizada com a utilização do programa de computador de estatística Graphpad Prism (versão 4, Graphpad Software, inc., San Diego, USA). As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

Para a análise estatística dos resultados de peso corporal, concentrações séricas de T_3 , T_4 e a atividade da enzima D1 dos grupos experimentais empregamos a análise de variância (ANOVA) univariada, seguida pelo teste de comparação múltipla de Newman-Keuls.

A atividade TPO, os níveis séricos de TSH e a captação de radioiodeto foram avaliados através da análise de variância de Kruskal-Wallis, seguida pelo teste de comparação múltipla de Dunn.

RESULTADOS

1 – Peso Corporal, Tireóideo e Uterino

1.1 – Peso Corporal

Os valores referentes ao peso corporal e ganho de peso dos animais encontram-se na tabela e gráficos demonstrados a seguir (Tabela 1 e Figura 9 e 10).

Tabela 1. Peso corporal de ratas Ovx por 23 dias tratadas ou não com E₂ e/ou Tp.

Grupos	Peso Corporal (g)		
	Inicial	Final	Ganho de peso
Controle	191 ± 6,2 (n=24)	221 ± 4,7 a,c (n=24)	28 ± 3,7 (n=24)
Ovx	170 ± 9,5 (n=23)	247 ± 8,0 b (n=23)	71 ± 7,0 (n=23)
E ₂	190 ± 6,3 (n=27)	210 ± 5,2 a (n=27)	18 ± 7,3 (n=27)
Tp	188 ± 5,8 (n=26)	230 ± 5,0 a (n=26)	42 ± 5,7 (n=26)
Tp + E ₂	196 ± 6,5 (n=29)	223 ± 4,3 a,c (n=29)	27 ± 4,4 (n=29)

Os valores são médias ± EPM; n = número de ratos.

Letras iguais correspondem a valores estatisticamente semelhantes. E₂ vs Tp, Tp vs Ovx (p<0,05); Tp+E₂ vs Ovx (p<0,01); E₂ vs Ovx (p<0,001).

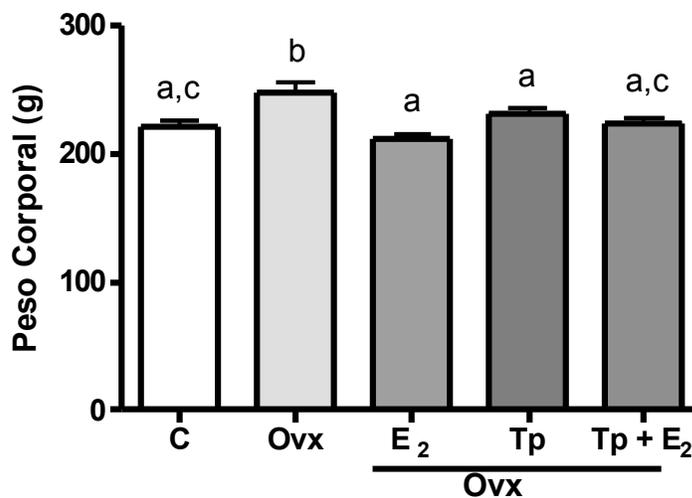


Figura 9: Efeitos da administração de E₂ (5 µg/100g/p.c./dia sc) e/ou Tp (500 mg/kg/pc) sobre o peso corporal de ratas ovariectomizadas.

[Controle (n=24), Ovx (n=23), E₂ (n=27), Tp (n=26), Tp+E₂ (n=29)]

Letras iguais correspondem a valores estatisticamente semelhantes. E₂ vs Tp, Tp vs Ovx (p<0,05); C vs Ovx, Tp+E₂ vs Ovx (p<0,01); E₂ vs Ovx (p<0,001).

Os animais ovariectomizados apresentaram maior ganho de peso, como está bem descrito na literatura.

O tratamento com 17β-estradiol e Tp foi suficiente para reverter os efeitos da ovariectomia, tanto isoladamente, quanto em associação.

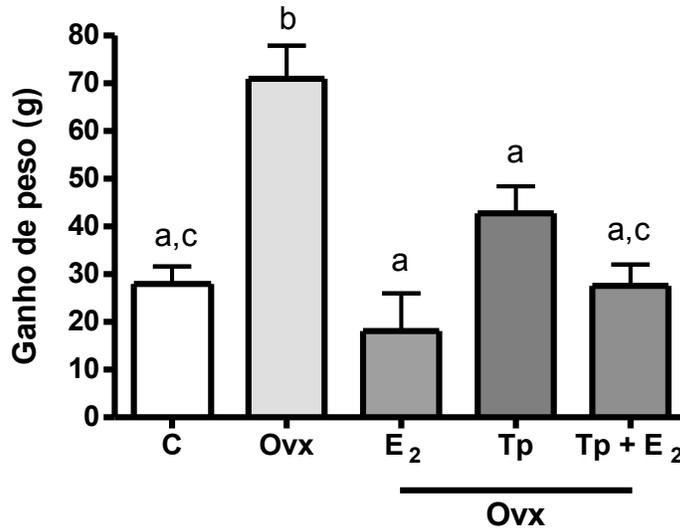


Figura 10: Efeitos da administração de E₂ (5 µg/100g/p.c./dia sc) e/ou Tp (500 mg/kg/pc) sobre o ganho de peso de ratas ovariectomizadas. [Controle (n=24), OvX (n=23), E₂ (n=27), Tp (n=26), Tp+E₂ (n=29)] Letras iguais correspondem a valores estatisticamente semelhantes. E₂ vs Tp (p<0,05); Tp vs OvX (p<0,01); C vs OvX, E₂ vs OvX, Tp+E₂ vs OvX (p<0,001)

1.2 – Peso absoluto da tireóide

Tabela 2. Peso da glândula tireóide em animais OvX que receberam E₂ e/ou Tp

Grupos	Absoluto (mg)
Controle (n = 14)	16 ± 1,2
Ovx (n = 14)	16 ± 0,8
E ₂ (n = 15)	15 ± 0,7
Tp (n = 15)	13 ± 1,0
Tp + E ₂ (n = 15)	14 ± 0,7

Os valores são médias ± EPM; n = número de ratos.

Não houve diferença significativa no peso absoluto da glândula tireóide entre os diversos grupos experimentais (Tabela 2, Figura 11).

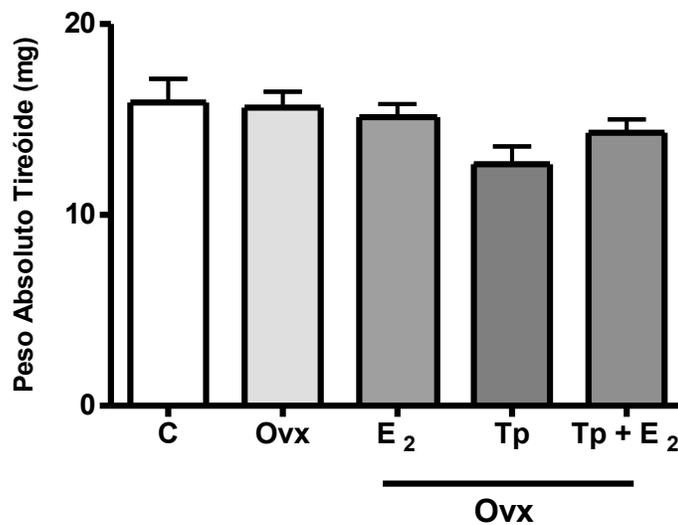


Figura 11: Peso absoluto da tireóide de ratas ovariectomizadas tratadas com E₂ (5 µg/100g/p.c./dia sc) e/ou Tp (500 mg/kg/pc). [Controle (n=14), Ovx (n=14), E₂ (n=15), Tp (n=15), Tp+E₂ (n=15)]

1.3 - Peso uterino absoluto

Houve diminuição do peso uterino nas ratas castradas. A reposição com E₂ neste tempo de tratamento não foi suficiente para reverter completamente este efeito (Figura 12). Além disso, a planta não antagonizou o efeito do estrogênio no útero, tendo em vista que o tratamento com Tp+E₂ levou ao mesmo efeito que o E₂.

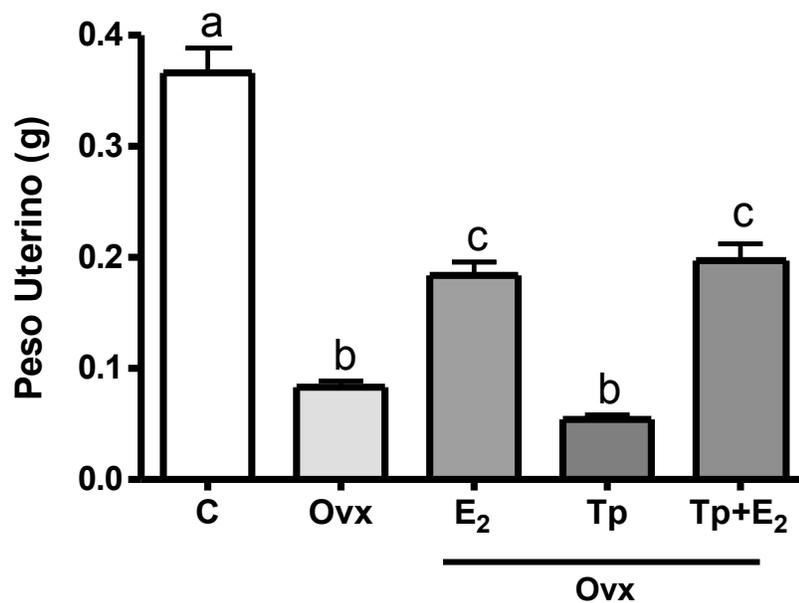


Figura 12: Efeitos da administração de E₂ (5 µg/100g/p.c./dia sc) e/ou Tp (500 mg/kg/pc) sobre o peso absoluto uterino de ratas ovariectomizadas.

[Controle (n=16), Ovx (n=15), E₂ (n=18), Tp (n=16), Tp+E₂ (n=17)]

Letras iguais correspondem a valores estatisticamente semelhantes. Tp vs C, Tp vs Tp+E₂, Ovx vs E₂, Ovx vs Tp+E₂, Ovx vs E₂, E₂ vs C, Tp+E₂ vs C (p<0,001); Tp vs Ovx (p<0,01); C vs Ovx, E₂ vs Ovx, Tp+E₂ vs Ovx (p<0,001).

2 – Concentrações Séricas de T₄, T₃, e TSH

→ Tiroxina - T₄

As concentrações séricas de tiroxina (T₄) total, representadas na Figura 13, não apresentaram diferenças significativas entre os grupos estudados.

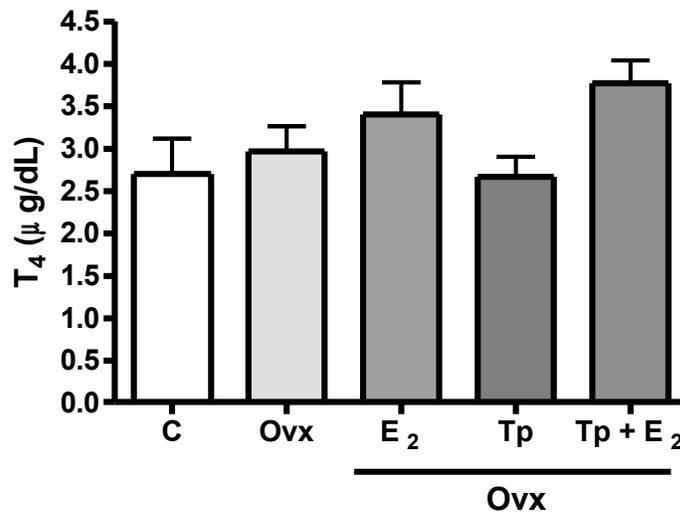


Figura 13: Níveis séricos de T₄ total em ratas ovariectomizadas tratadas com E₂ (5 µg/100g/p.c./dia sc) e/ou Tp (500 mg/kg/pc). [Controle (n=15), Ovx (n=15), E₂ (n=18), Tp (n=15), Tp+E₂ (n=19)]

→ Triiodotironina - T₃

Houve aumento das concentrações séricas de T₃ total nos grupos tratados com E₂ e com a associação Tp+E₂ em relação ao grupo controle. Houve diminuição das concentrações séricas de T₃ total no grupo tratado com Tp em relação tanto ao grupo que recebeu E₂ quanto ao grupo tratado com Tp+E₂.

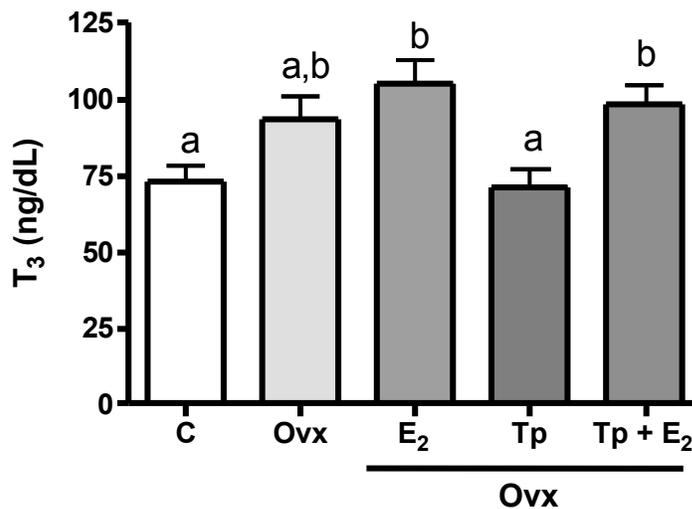


Figura 14: Níveis séricos de T₃ total em ratas castradas tratadas com E₂ (5 µg/100g/p.c./dia sc) e/ou Tp (500 mg/kg/pc). [Controle (n=13), OvX (n=14), E₂ (n=18), Tp (n=17), Tp + E₂ (n=19)]. Letras iguais correspondem a valores estatisticamente semelhantes. E₂ vs Tp, C vs E₂ (p<0,01); Tp vs Tp+ E₂, C vs Tp+E₂ (p<0,05)

→ Hormônio Tireotrófico - TSH

Nas ratas castradas, apesar de não significativa, observamos elevação dos níveis séricos de TSH quando comparados ao Controle. Quando comparamos os demais grupos ao OvX observamos diminuição significativa no TSH sérico do grupo tratado com Tp+E₂ (Figura 15).

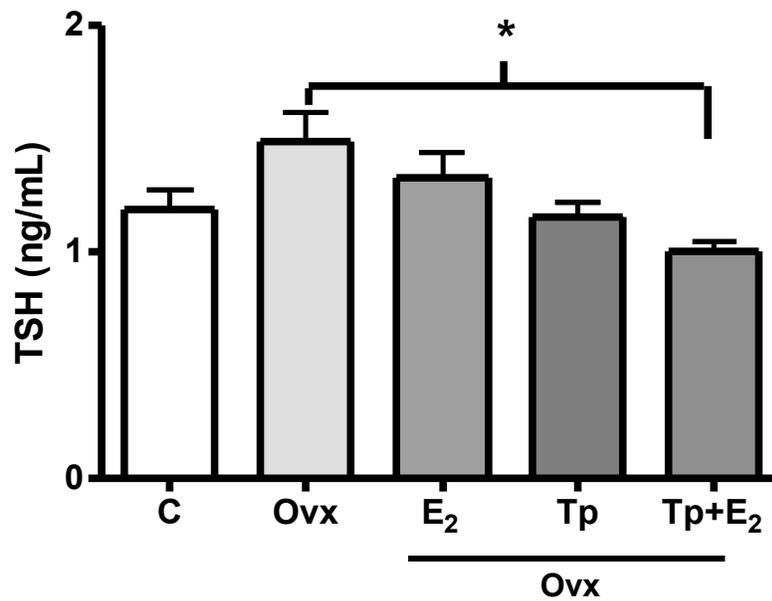


Figura 15: Efeito da administração de E₂ (5 µg/100g/p.c./dia sc) e/ou Tp (500 mg/kg/pc) sobre os níveis séricos de TSH em ratas Ovx. [Controle (n=14), Ovx (n=15); E₂ (n=17); Tp (n=17); Tp+E₂ (n=18)]. Significativamente diferente: Tp+E₂ vs Ovx (p<0,01).

3 – Avaliação da Captação de Radioiodo pela Tireóide para Estimativa da Função do Transportador de Iodeto.

O conteúdo de radioiodo na tireóide 15 minutos após sua administração diminuiu, embora não significativamente, no grupo ovariectomizado (Figura 16). O fitoestrógeno Tp parece não interferir com a captação de radioiodo, uma vez que os valores estavam próximos aos do controle e ao grupo ovariectomizado.

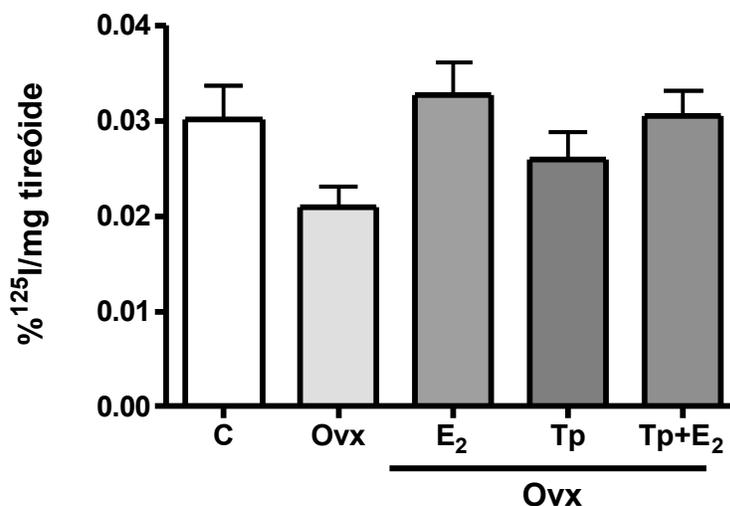


Figura 16: Conteúdo tireóideo de radioiodo 15 minutos após sua administração (3700 Bq i.p.) a ratas ovariectomizadas que receberam Tp (500 mg/kg/pc) e/ou com E₂ (5 µg/100g/p.c./dia sc). [C=8; Ovx=8; E₂=9; Tp=9; Tp+E₂=10]

3 – Atividade da Enzima Tireoperoxidase

Não foram observadas diferenças significativas da atividade tireoperoxidase nos grupos tratados, embora haja tendência à diminuição da atividade TPO nas ratas ovariectomizadas (Figura 17).

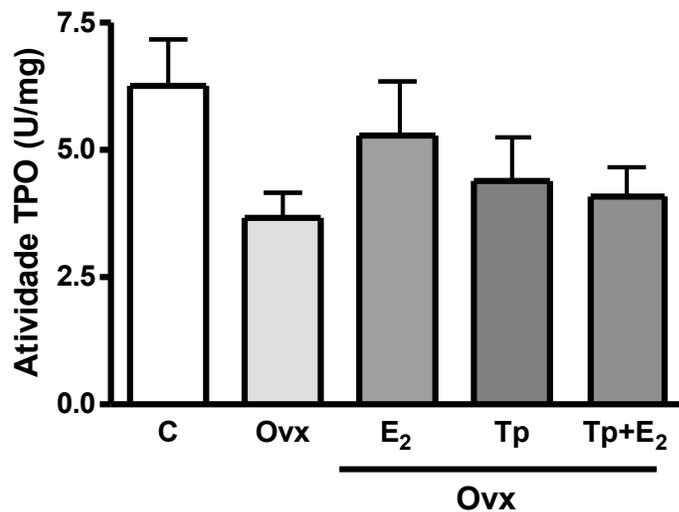


Figura 17: Atividade tireoperoxidase de oxidação do iodeto em ratas castradas tratadas com E₂ (5 µg/100g/p.c./dia sc) e/ou Tp (500 mg/kg/pc). [Controle (n=9), Ovx (n=12), E₂ (n=12), Tp (n=12), Tp + E₂ (n=14)]. Os resultados foram expressos como média ± EPM de cada grupo.

4 – Atividade da Enzima Desiodase Tipo I

Não houve alteração significativa na atividade desiodase tipo 1 na hipófise (Figura 18), tireóide (Figura 19), fígado (Figura 20) e rim (Figura 21) entre os grupos de animais estudados.

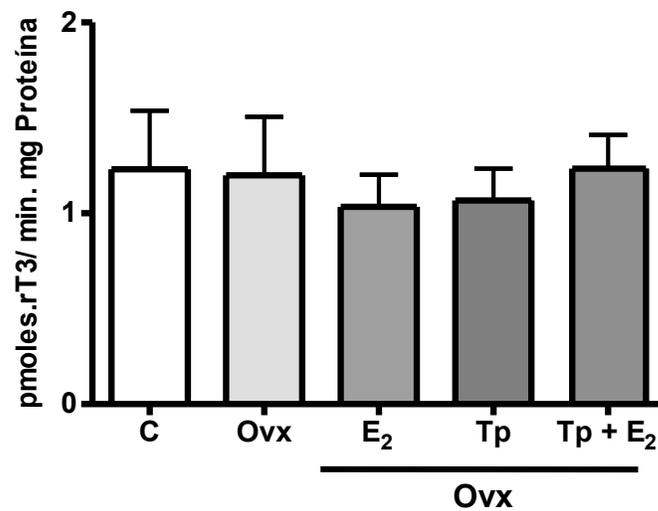


Figura 18: Atividade da desiodase tipo 1 hipofisária em animais Ovx que receberam ou não E₂ (5 µg/100g/p.c./dia sc) e/ou Tp (500 mg/kg/pc). [Controle (n=6), Ovx (n=8); E₂ (n=9); Tp (n=9); Tp+E₂ (n=10)].

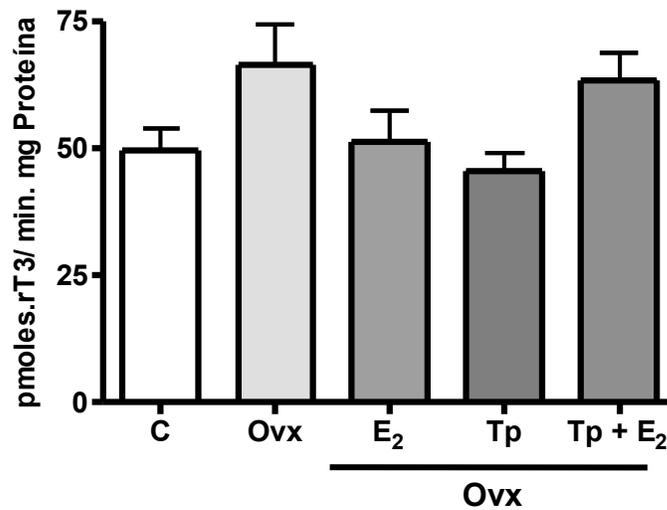


Figura 19: Atividade da desidase tipo 1 tireóidea em animais Ovx que receberam E₂ (5 µg/100g/p.c./dia sc) e/ou Tp (500 mg/kg/pc).
 [Controle (n=10), Ovx (n=10); E₂ (n=11); Tp (n=11); Tp+E₂ (n=12)]

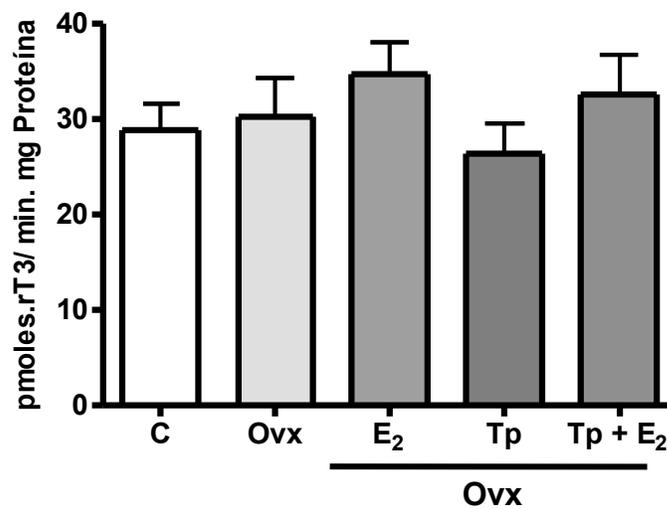


Figura 20: Atividade da desidase tipo 1 hepática em animais Ovx que receberam ou não E₂ (5 µg/100g/p.c./dia sc) e/ou Tp (500 mg/kg/pc).
 [Controle (n=13), Ovx (n=14); E₂ (n=17); Tp (n=16); Tp+E₂ (n=18)].

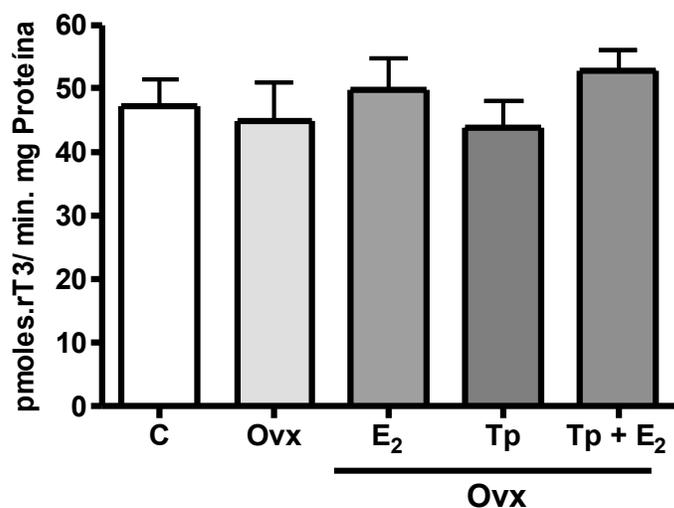


Figura 21: Atividade da desidase tipo 1 renal em animais Ovx que receberam ou não E₂ (5 µg/100g/p.c./dia sc) e/ou Tp (500 mg/kg/pc). [Controle (n=14), Ovx (n=13); E₂ (n=18); Tp (n=17); Tp+E₂ (n=18)].

DISCUSSÃO

Durante o período da menopausa e também na pós-menopausa há diminuição dos níveis de estrogênio circulante (Burdette, 2001; Wuttke e cols., 2003). Grande parte das mulheres experimentam um ou mais sintomas decorrentes da menopausa, tais como: fogachos, atrofia vaginal, depressão, insônia, dor nas articulações, dentre outros (Liu, 2001; Horn-Ross, 2002; Beck e cols., 2005). Também ocorre aumento na incidência de doenças crônicas como obesidade, doenças cardíacas, osteoporose e doença de Alzheimer (Wu e cols, 2004). A Terapia de Reposição Hormonal, seja utilizando ésteres de 17β-estradiol ou estrógenos conjugados, ambos em associação a progestágenos, têm ajudado a amenizar esses sintomas. Numerosos

estudos demonstram que as queixas do climatério, particularmente os fogachos, podem ser efetivamente prevenidos pela Terapia de Reposição Hormonal. Não há dúvida também sobre a prevenção da osteoporose, enquanto tem sido publicados estudos conflitantes sobre os efeitos positivos dos estrógenos no sistema cardiovascular e também na uretra/bexiga urinária. Recentemente, estudos demonstraram aumento no risco de desenvolvimento de câncer de mama e câncer endometrial em pacientes que fazem uso da Terapia de Reposição Hormonal (Rossouw, e cols., 2002; Beck, 2003; Goldstein, 2002; Wuttke e cols, 2003).

Devido ao medo de desenvolver câncer de mama ou por motivos pessoais, muitas mulheres descontinuaram a Terapia de Reposição Hormonal convencional e passaram a procurar outras alternativas para tratar os sintomas da menopausa, preferindo os chamados fitoestrógenos. Fitoestrógenos são um grupo de componentes naturais policíclicos que exercem atividades estrogênicas e estão sendo usados para o tratamento das desordens provenientes da menopausa (Beck e cols., 2003 e 2005; Wuttke e cols, 2003).

Dados epidemiológicos e estudos experimentais mostram que uma dieta rica em fitoestrógenos reduzem os fogachos e a incidência de câncer de mama em mulheres orientais (Piersen, 2003; Adlercreutz, 2002), além de reduzir o risco de desenvolver osteoporose (Nikander, 2004; Jia e cols., 2003). Dentre os benefícios da utilização de fitoestrógenos podemos citar: diminuição do colesterol sérico total (Sirtori, 1995; Carroll, 1995), da pressão arterial (Rivas e cols., 2002) e prevenção de doenças cardiovasculares (Knight e cols., 1996; Sirtori, 1995). Dentre as plantas mais utilizadas podemos citar o red clover [*Trifolium pratense* (Tp)] (Liu, 2001; Beck,2003). O Tp possui alta concentração das isoflavonas biochanina A e formononetina, além de genisteína e daidzeína, que se acredita serem os responsáveis por seus efeitos biológicos (Beck, 2003, Burdette e cols., 2001).

Apesar dos vários efeitos benéficos atribuídos aos isoflavonóides, podem ocorrer efeitos colaterais sobre a função tireoideana e metabolismo dos HTs, tais como: inibição da atividade tireoperoxidase (Divi and cols., 1997; Doerge, 2002a; Chang, 2000b) e inibição da atividade das iodotironinas desiodases (Gaitan, 1996, Ferreira, 2002) detectadas *in vitro*. Assim, o consumo crônico dos fitoestrógenos poderia levar a alterações na biossíntese hormonal e no metabolismo periférico dos hormônios tireóideos. Os isoflavonóides também afetam as proteínas ligadoras dos hormônios tireóideos e a regulação do TSH, através de interação com este, impedindo sua ação no tireócito (Gaitan, 1996).

Em nosso estudo, procuramos verificar o efeito do tratamento com o fitoestrógeno *Trifolium pratense* sobre a função tireóidea *in vivo*, uma vez que dados na literatura são ainda muito limitados.

Conforme anteriormente descrito (Wu e cols., 2004; Burdette e cols., 2001), as fêmeas ovariectomizadas apresentaram ganho de peso corporal após a castração e este efeito foi revertido tanto pela administração de E₂, quanto de Tp, o que está de acordo com dados da literatura (Wu e cols., 2004; Mohamed, 2000; Burdette e cols., 2001). Trabalhos com camundongos com deficiência na síntese de estrogênio devido à deleção da aromatase ou do gene para o receptor de FSH tiveram aumento de mais de 100% da gordura corporal, confirmando a função do estrogênio sobre o tecido adiposo (Heine e cols., 2000; Jones e cols., 2000; Danilovich, 2000). Esses resultados sugerem que o ganho de peso nos animais Ovx é principalmente causado pela diminuição dos níveis de estrógenos. Os nossos resultados sugerem envolvimento do receptor β do estrogênio na reversão do ganho de peso corporal, uma vez que o tratamento com *Trifolium pratense* evitou o ganho de peso nas ratas castradas e sabe-se que os fitoestrógenos presentes nesta planta agem principalmente via receptor β .

Houve diminuição significativa do peso uterino dos animais ovariectomizados, o que é secundário à deficiência de estrogênio. A dose de E₂ utilizada não foi suficiente para reverter completamente os efeitos da ovariectomia, o que pode ser tempo-dependente, uma vez que Burdette e cols. (2001) utilizando a mesma dose de E₂ observou a normalização do peso uterino após 21 dias de tratamento. Não foi observado efeito de Tp sobre o peso uterino, o que já era esperado, uma vez que como dito anteriormente, os fitoestrógenos agem principalmente via RE β e no útero há predominância do RE α . Esse resultado pode ser considerado de grande importância, pois esse fitoestrógeno não causaria os efeitos indesejáveis no útero atribuídos à Terapia de Reposição Hormonal convencional.

Não foi observada alteração significativa no peso absoluto da tireóide, o que corrobora os achados de Madej e cols. (2002). Houve, entretanto, ligeira diminuição no peso desta glândula nas ratas tratadas com Tp, o que pode indicar um possível efeito antagonista estrogênico neste tecido, uma vez que o estrogênio exerce efeito proliferativo (Furlanetto e cols., 1999).

Nesse estudo, demonstramos que o conteúdo tireóideo de radioiodo após 15 minutos de sua administração não foi significativamente alterado entre os grupos tratados, embora tenha havido diminuição não significativa no grupo Ovx, o que é condizente com os resultados obtidos por Lima (2000). Outros fatores parecem estar modulando a captação de iodeto pelo NIS nas ratas Ovx, pois o TSH sérico neste grupo estava normal. A administração de E₂ estimulou, embora de maneira não significativa, a captação de radioiodo pela glândula, sugerindo um efeito direto do E₂ sobre a tireóide, pois o TSH deste grupo também encontra-se dentro da faixa da normalidade.

Com relação à atividade tireoperoxidase, não observamos alteração significativa na atividade de oxidação do iodeto desta enzima

analisada *in vitro*, em animais tratados com Tp *in vivo*, embora tanto Divi e Doerge (1996) quanto Doerge e Sheehan (2002b) tenham demonstrado inibição da atividade TPO por isoflavonóides *in vitro*. Podemos então supor que ao processarmos a tireóide, os isoflavonóides poderiam se dissociar da enzima, pois estariam ligados reversivelmente a esta. O mesmo ocorre com os anti-tireóideos clássicos, que são potentes inibidores da TPO, como PTU e MMI (Ferreira e cols., 2003). Além disso, dados na literatura sugerem que o iodo exerce efeito protetor sobre a ação dos isoflavonóides (Ikeda, 2000; Son, 2001), deste modo, talvez pelo fato dos animais receberem níveis suficientes de iodo na dieta, essa inibição seja impedida *in vivo*. Um outro fator que devemos considerar é que o tempo de tratamento pode não ter sido suficiente para bloquear a biossíntese hormonal. Nossos dados sugerem que, caso as isoflavonas inibam a TPO *in vivo*, a ação é muito menos potente que a do PTU e MMI, pois esses causam inibição da biossíntese hormonal em menos de sete dias (Larsen, 2002).

As fêmeas castradas não apresentaram diferenças significativas nas concentrações séricas de T_4 , conforme já descrito por Lisbôa e cols. (1997) e Christianson e cols. (1981), o que também foi observado nos grupos tratados. Já os níveis de T_3 estão aumentados nos animais tratados tanto com E_2 quanto com Tp+ E_2 em comparação ao grupo controle, o que pode ser devido ao aumento da atividade D2 no tecido adiposo marrom e/ou músculo esquelético, pois este parece ser um importante sítio para a produção de T_3 em roedores (Bianco e cols., 2002). O grupo tratado com Tp+ E_2 apresentou diminuição dos níveis de TSH em relação ao grupo ovariectomizado, o que poderia, a longo prazo, levar ao hipotireoidismo. Quando tratadas com E_2 em dose suprafisiológica, os níveis séricos de TSH das ratas Ovx retornaram à normalidade o que está de acordo com Fisher & D'Angelo (1971).

Não encontramos alterações significativas na atividade da enzima D1, responsável pela desiodação do T_4 , tanto do anel externo quanto do anel interno, entre os diversos grupos experimentais. Miyashita e cols.. (1995) não detectaram

alterações na atividade da D1 hepática, nem no seu RNAm, em ratas castradas, o que está de acordo com os dados obtidos no presente estudo. O grupo de Harris (1979) observou aumento da atividade D1 hepática em ratas castradas tratadas com estradiol. Em contrapartida, Lisbôa e cols. (1997 e 2001) verificaram que as atividades D1 hepática e hipofisária, em ratas, diminuíram após 3 semanas de castração, e a reposição com estradiol as aumentou para valores similares aos controles, assim como aumentou a atividade D1 tireóidea. Tais resultados contraditórios podem ser explicados pelas diferenças na dose e tempo de tratamento empregados. Isso demonstra a complexa regulação da atividade desta enzima de grande relevância para a homeostase dos hormônios tireóideos.

No presente estudo, avaliamos a influência do fitoestrógeno *Trifolium pratense* sobre a função tireóidea, tendo encontrado os seguintes resultados:

- 1) Observamos elevação do peso corporal nos animais ovariectomizados, que foi revertida pelo tratamento com estrogênio e com *Trifolium pratense*, isoladamente ou em associação. Não houve diferença significativa no peso absoluto da glândula tireóide. Em relação ao peso uterino absoluto, constatamos diminuição significativa no grupo ovariectomizado, sendo este efeito revertido por E₂ e Tp+E₂, mas não por Tp.
- 2) Sobre os níveis séricos de T₃, T₄ e TSH: observamos elevação dos níveis séricos de T₃, tanto nos grupos tratados com E₂ quanto nos animais tratados com Tp+E₂ em relação ao grupo Controle. Os níveis séricos de T₄ não variaram entre os grupos tratados. O TSH sérico estava diminuído nos animais tratados com Tp+E₂ em relação ao grupo ovariectomizado.
- 3) Não observamos alterações significativas na atividade tireoperoxidase bem como na função do co-transportador NIS.

4) A atividade desidase tipo 1 não foi alterada pelo protocolo experimental utilizado.

- 1) Pretendemos avaliar os efeitos do tempo mais prolongado de tratamento (30 e 60 dias) sobre os diversos parâmetros da função tireóidea, uma vez que as mulheres pretendem tomar esses fitoestrógenos para o resto de suas vidas.
- 2) Faremos também a prova do TRH a fim de verificarmos alterações da sensibilidade do tireotrofo, uma vez que observamos diminuição significativa dos níveis séricos de TSH no grupo Tp+E₂..
- 3) Administraremos esse fitoestrógeno a ratas intactas, uma vez que os fitoestrógenos são constituintes naturais de nossa dieta, e, além disso, muitas mulheres fazem uso desses compostos como suplemento alimentar;
- 4) Avaliaremos a captação de radiodo de 2 horas para observarmos possíveis alterações na atividade TPO *in vivo*;
- 5) Para elucidarmos os possíveis efeitos do fitoestrógeno sobre o eixo hipófise-tireóide, mensuraremos a atividade hipofisária da enzima D2, já que esta é responsável pela conversão intracelular de T₄ a T₃ neste tecido e que a produção local de T₃ é muito importante para o feedback negativo;
- 6) Avaliaremos também a atividade da enzima D2 no tecido adiposo marrom uma vez que dados na literatura sugerem grande importância desse tecido nos níveis séricos de T₃ em roedores;

- 7) Pesquisaremos o mecanismo pelo qual ocorre a normalização do peso corporal com a administração de estrogênio e T_p, avaliando:
- a. a ingestão alimentar;
 - b. consumo de O₂;
 - c. as proporções corporais: massa magra x massa gorda;
 - d. resposta insulínica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adlercreutz, H (2002) Phytoestrogens and breast cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*; 83:113-118.
- Albertazzi, P.; Purdie, D.W. (2002) The nature and utility of the phytoestrogens: a review of the evidence. *Maturitas The European Menopause Journal*; 42: 173-185.
- Bartalina, L. (1994). Thyroid hormone-binding proteins: Update 1994. *Endocrine Reviews*; 13:140.
- Beck, V.; Unterrieder, E.; Krenn, L.; Kubelka, W.; Jungbauer, A. (2003) Comparison of hormonal activity (estrogen, androgen and progestin) of standardized plant extracts for large scale use in hormone replacement therapy. *The Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*; 84: 259-268.
- Beck, V.; Rohr, U., Jungbauer, A. (2005) Phytoestrogens derived from red clover: An alternative to estrogen replacement therapy? *The Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*; 94: 499-518.
- Beckett, G.J.; Beddows, S.E.; Morrice, P.C.; Nicol, F. & Arthur, J.R. (1987) Inhibition of hepatic deiodination of thyroxine is caused by selenium deficiency in rats. *The Biochemical Journal*, 248: 443-447.
- Berry, M.J.; Kieffer, J.D.; Harney, J.W.; Larsen, P.R. (1991) Selenocysteine confers the biochemical properties characteristic of the type I iodothyronine deiodinase. *The Journal of Biological Chemistry*; 266(22): 14155-14158.
- Bianco, A.C.(1991) *A glândula tireóide* In: Aires, M.M., *Fisiologia*, Guanabara-Koogan S.A., Rio de Janeiro, cap.58, pp. 696-705.
- Bianco, A.C. & Kimura, E.T. (1999) Fisiologia da glândula tireóide. In Aires, M.M. (editor) *Fisiologia*. Guanabara Koogan SA, Rio de Janeiro, cap 69 p. 812-828.

- Bianco, A.C.; Salvatore, D.; Gereben, B.; Berry, M.J. & Larsen, P.R. (2002) Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocrine Reviews*; 23(1):38-89.
- Bidart, J.M.; Mian, C.; Lazar, V.; Russo, D.; Filetti, S.; Caillou, B. et al. (2000) Expression of pendrin and the pendred syndrome (PDS) gene in human thyroid tissues. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*; 85, 2028-3492.
- Birt, D.F.; Hendrich, S.; Wang, W. (2001) Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*; 90: 157-177.
- Borrelli, F.; Izzo, A.A.; Ernst, E. (2003) Pharmacological effects of *Cimicifuga racemosa*. *Life Sciences*; 73: 1215-1229.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*; 72:248-254.
- Burdette JE, Liu J, Lantvit D, Lim E, Booth N, Bhat KP, Hedayat S, Van Breemen RB, Constantinou AI, Pezzuto JM, Farnsworth NR, Bolton JL (2002) Trifolium pratense (red clover) exhibits estrogenic effects *in vivo* in ovariectomized Sprague-Dawley rats. *The Journal of Nutrition*;132(1):27-30.
- Burrow, G.N. (1993) Thyroid function and hyperfunction during gestation. *Endocrine Reviews*; 12:194-202.
- Capen, C. (1996) Anatomy. In Braverman, L.E. & Utiger, R.D. (editores). *The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text*. (7^a ed). Lippincott-Raven, Nova Iorque, cap 3, p. 19-46.
- Carrasco, N. (1993) Iodide transport in the thyroid gland. *Biochemical et Biophysical Acta*; 1154: 65-82.
- Carroll, K.K., and Kurowska, E.M. (1995) Soy consumption and cholesterol reduction: review of animal and human studies. *The Journal of Nutrition*;125 (Suppl. 3): 594S-597S.
- Carvalho, D.P. (2003) Modulation of uterine Iodothyronine Deiodinases – A Critical Event for Fetal Development? *Endocrinology*; 144(10):4250-4252.

- Carvalho, D.P.; Dupuy, C.; Gorin, Y.; Legue, O.; Pommier, J.; Haye, B. & Virion, A. (1996) The Ca^{+2} - and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent hydrogen peroxide generating system is induced by thyrotropin in porcine thyroid cells. *Endocrinology*; 137:1007-1012.
- Carvalho, D.P., Rego, K.G.M. & Rosenthal, D. (1994) Thyroid peroxidase in dysmorphogenetic goiters with organification and thyroglobulin defects. *Thyroid*; 4:421-426.
- Casanova, M.; You, L.; Gaido, K.W.; Archibeque-Engle, S.; Janszen, D.B. & Heck, H.A. (1999) Developmental effects of dietary phytoestrogens in Sprague-Dawley rats and interactions of genistein and daidzein with rat estrogen receptors alpha and beta in vitro. *Toxicological sciences*; 51:236-244.
- Chang, H.C.; Doerge, D.R. (2000) Dietary genistein inactivates rat thyroid peroxidase *in vivo* without an apparent hypothyroid effect. *Toxicology and Applied Pharmacology*; 168:244-252.
- Chazenbalk, G.; Magnusson, R.P. & Rapoport, B. (1987) Thyrotropin stimulation of cultured thyroid cells increases steady state levels of the messenger ribonucleic acid for thyroid peroxidase. *Molecular Endocrinology*; 1:913-917.
- Chen, D.-B.; Bird, I.M.; Zheng, J.; Magness, R.R. (2004) Membrane estrogen receptor-dependent extracellular signal-regulated kinase pathway mediates acute activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen in uterine artery endothelial cells. *Endocrinology*; 145:113-125.
- Chen, H.J.; Walfish, P.G. (1978a) Effects of estradiol benzoate on thyroid-pituitary function in female rats. *The Endocrine Society*, 103(4):1023-1030.
- Chen, H.J.; Walfish, P.G. (1978b) Effects of age and ovarian function on the pituitary-thyroid system in female rats. *Journal of Endocrinology*; 78:225-232.
- Christianson, D.; Roti, E.; Vagenakis, A.G. (1981) The sex-related difference in serum thyrotropin concentration is androgen mediated. *Endocrinology*; 108: 529-535.
- Collins, B.M.; McLachlan J.A.; Arnold, S.F.(1997) The estrogenic and antiestrogenic activities of phytochemicals with the human estrogen receptor expressed in yeast. *Steroids*; 62 (4):365-372.

- Cornwell, T.; Cohick, W.; Raskin, I. (2004) Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry*; 65:995-1016.
- Croteau, W.; Whittemore, S.L.; Scheneider, M.J. & St Germain, D.L. (1995) Cloning and expression of a cDNA for a mammalian type III iodothyronine deiodinase. *The Journal of Biological Chemistry*; 270:16569-16575.
- Dai, G.; Levy, O. & Carrasco, N. (1996) Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature*; 379(1):458-460.
- Danilovich, N.; Babu, P.S.; Gerdes, M.; Krishnamurthy, H.; Sairam, M.R. (2000) Estrogen deficiency, obesity, and skeletal abnormalities in follicle-stimulating hormone receptor knockout (FORKO) female mice. *Endocrinology*; 141: 4295-4308.
- Davis, P.J.; Davis, F.B.(1996) Nongenomic action of thyroid hormones. *Thyroid* 6(5): 497-504.
- Diel, P. (2002) Tissue-specific estrogenic response and molecular mechanisms. *Toxicology*; 127:217-224.
- Divi, R.L. & Doerge, D.R. (1996) Inhibition of thyroid peroxidase by dietary flavonoids. *Chemical Research Toxicology*; 9:16-23.
- Divi, R.L.; Chang, H.C.; Doerge, D.R. (1997) Anti-thyroid isoflavones from soybean. *Biochemical Pharmacology*; 54:1087-1096.
- Dixon, R.A. (2004) Phytoestrogens. *Annual review of plant biology*; 55:225-261.
- Doerge, D.R.; Chang, H.C. (2002a) Inactivation of thyroid peroxidase by soy isoflavones, *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Chromatography B*; 777:269-279.
- Doerge, D.R.; Sheehan, D.M. (2002b) Goitrogenic and estrogenic activity of soy isoflavones. *Environmental Health Perspectives*; Vol 110, Supplement 3:349-353.
- Dubey, R.K. and Jackson E.K. (2001) Cardiovascular protective effects of 17 β -estradiol metabolites. *Journal of Applied Physiology*; 91:1868-1883.

- Dubey, R.K.; Tofovic, S.P., and Jackson E.K. (2004) Cardiovascular pharmacology of estradiol metabolites. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*; 308:403-409.
- Dumont, J.E.; Jauniaux, J.C. & Roger, P.P. (1989) The cyclic AMP-mediated stimulation of cell proliferation. *Trends in Biochemical Sciences*; 14:67-71.
- Duncan, A.M.; Underhill, K.E.; Xu, X.; Lavalles, J.; Phipps, W.R., and Kurzer, M.S.(1999a) Soy isoflavones exert modest hormonal effects in premenopausal women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*; 84:192-197.
- Duncan, A.M.; Underhill, K.E.; Xu, X.; Lavalles, J.; Phipps, W.R., and Kurzer, M.S.(1999b). Soy isoflavones exert modest hormonal effects in postmenopausal women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*; 84:3479-3484.
- Duthie, S.J.; Collins, A.R.; Duthie, G.G. & Dobson, V.L. (1997) Quercetin and myricetin protect against hydrogen peroxide-induced DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human lymphocytes. *Mutation Research*; 393:223-231.
- Eddy EM, Washburn TF, Bunch DO, Goulding EH, Gladen BC, Lubahn DB, Korach KS. (1996) Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology*; 137(11):4796-805.
- Farbota, L.; Hofmann, C.; Oslapas, R.; Paloyan, E.(1987) Sex hormone modulation of serum TSH levels. *Surgery*; 102(6):1081-1087.
- Ferreira, A.C.F.; Lisboa, P.C.; Oliveira, K.J.; Lima, L.P.; Barros, I.A. & Carvalho, D.P. (2002) Inhibition of thyroid type 1 deiodinase activity by flavonoids. *Food and Chemical Toxicology*; 40:913-917.
- Ferreira, A.C.F.; Lima, L.P.; Araújo, R.L.; Müller, G.; Rocha, R.P.; Rosenthal, D. and Carvalho, D.P. (2005) Rapid regulation of thyroid sodium-iodide symporter activity by thyrotrophin and iodine. *Journal of Endocrinology*; 184: 69-76.
- Ferreira, A.C.F., Cardoso, L.C., Rosenthal, D. and Carvalho, D.P. (2003) Thyroid Ca^{2+} /NADPH-dependent H_2O_2 generation is partially inhibited by propylthiouracil and methimazole. *European Journal of Biochemistry*; 270: 2363-2368.

Fisher, J.S. & D'Angelo, S.A. (1971) Stimulatory and inhibitory action of estrogen on TSH secretion. *Endocrinology*; 88:687-691.

Fitzpatrick, L.A. (2003) Soy isoflavones: hope or hype? *Maturitas The European Menopause Journal*; 44, Suppl. 1 S21-S29.

Food Standards Agency (2002) Report of the COT Working Group on Phytoestrogens; available at <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/phytoestrogenreport.pdf>.

Friesema, E.C.; Docter, R.; Moerings, E.P.; Stieger, B.; Hagenbuch, B.; Meier, P.J.; Krenning, E.P.; Hennemann, G.; Visser, T.J. (1999) Identification of thyroid hormone transporters. *Biochemical and biophysical research communications*; 254: 497-501.

Friesema, E.C.; Gaguly, S.; Abdalla, A.; Manning Fox, J.E.; Halestrap, A.P.; Visser, T.J. (2003) Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *The Journal of Biological Chemistry*; 278(41): 40128-40135.

Friesema, E.C.; Jansen, J.; Milici, C.; Visser, T.J. (2005) *Thyroid hormone transporters*. *Vitam Horm* ;70: 137-167.

Fukuda H.; Yasuda N.; Greer MA (1975) Changes in plasma thyrotrophin, thyroxine, and triiodothyronine after acute or chronic administration of iodide to iodine-deficient rats. *Endocrinology*; .97(5):1196-204.

Furlanetto, T.W.; Nguyen, L.Q. & Jameson, J.L.(1999) Estradiol increases proliferation and down-regulates the sodium/iodide symporter gene in FRTL-5. *Endocrinology*; 140:5705-5711.

Gaitan, E. (1996) Flavonoids and the thyroid. *Nutrition*; 12:127-129.

Griffin, J.E. (2000) The thyroid. In: Griffin, J.E. & Ojeda, S.R., Textbook of Endocrine Physiology, 4^a ed., Oxford University, New York, cap 13, pp. 303-327.

Gustafsson, J.A. (1999) Estrogen receptor beta – a new dimension in estrogen mechanism of action. *The Journal of Endocrinology*; 163:379-383.

Hanasaki, Y.; Ogawa, S. & Fukui, S. (1994) The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biological Medicine*; 16:845-850.

- Harris, R.M.; Wood, D.M.; Bottomley, L.; Blagg, S.; Owen, K.; Hughes, P.J.; Waring, R.H.; Kirk, C.J.(2004) Phytoestrogens are potent inhibitors of estrogen sulfation: implications for breast cancer risk and treatment. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*; 89 (4):1779-1787.
- Heine, P.A.; Taylor, J.A.; Iwamoto, G.A.; Lubahn, D.B.; Cooke, P.S. (2000) Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor- α knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 97:12729-12734.
- Heinonen, S; Wahälä, K. and Adlercreutz, H. (2004) Identification of urinary metabolites of the red clover isoflavones formononetin and biochanin A in human subjects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 52:6802-6809.
- Hollman, P.C.H.; Katan, M.B.(1997) Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomedicine & Pharmacotherapy*; 51:305-310.
- Horn-Ross, P.L.; Hoggatt, K.J.; and Lee, M.M.(2002) Phytoestrogens and thyroid cancer risk: the San Francisco Bay area thyroid cancer study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*; 11:43-49.
- Ikeda, T.; Nishikawa, A.; Imazawa, T.; Kimura, S.; Hirose, M. (2000) Dramatic synergism between excess soybean intake and iodine deficiency on the developmental of rat thyroid hyperplasia. *Carcinogenesis*; 21:707-713.
- Ichikawa, K.; Hashizume, K.(1991) Cellular binding proteins of thyroid hormones. *Life Science*; 49: 1513-1522.
- Ishizuki, Y.; Hirooka, Y.; Murata, Y., and Togashi, K. (1991) The effects on the thyroid gland of soybeans administered experimentally in healthy subjects. *Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi*; 67: 622-629.
- Jones, M.E.; Thorburn, A.W.; Britt, K.L.; Hewitt, K.N.; Wreford, N.G.; Proietto, J.; Leury, B.J.; Robertson, K.M.; Yao, S.; Simpson, E.R. (2000) Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 97: 12735-12740.

- Kaminsky, S.M.; Levy, O.; Salvador, C.; Dai, G. & Carrasco, N. (1994) Na^+/I^- symport activity is present in membrane vesicles from thyrotropin-deprived non- I^- -transporting cultured thyroid cells. *Biochemistry*; 91:3789-3793.
- Kirk, C.J.; Harris, R.M.; Wood, D.M.; Waring, R.H. and Hughes, P.J. (2001) Do dietary phytoestrogens influence susceptibility to hormone-dependent cancer by disrupting the metabolism of endogenous oestrogens? *Biochemical Society Transactions*; 29, part 2:209-216.
- Knight, D.C., and Eden, J.A. (1996) A review of the clinical effects of phytoestrogens. *Obstetrics and Gynecology*; 87:897-904.
- Kogai, T.; Curcio, F.; Hyman, S.; Cornford, E.M.; Brent, G.A. & Hershman, J.M. (2000) Induction of follicle formation in long-term cultured normal human thyroid cells treated with thyrotropin stimulates iodide uptake but not sodium/iodide symporter messenger RNA and protein expression. *Journal of Endocrinology*; 167:125-135.
- Kohrle, J. (1996). Thyroid hormone deiodinases – a selenoenzyme family acting as gate keepers to thyroid hormone actions. *Acta medica Austriaca*; 23(1-2):17-30.
- Kohrle J, Fang SL, Yang Y, Irmscher K, Hesch RD, Pino S, Alex S, Braverman LE. (1989) Rapid effects of the flavonoid EMD 21388 on serum thyroid hormone binding and thyrotropin regulation in the rat. *Endocrinology*; 125(1):532-7.
- Kronenberg, F.; Fugh-Berman, A. (2002) Complementary and alternative medicine for menopausal symptoms: a review of randomized, controlled trials. *Annals of internal medicine*; 137:805-813.
- Kruskal, W.H. & Wallis, W.A. (1952) Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal American Statistical Association*; 47:583-621.

- Larsen, P.R.; Davies, T.F.; Schlumberger, M.J. & Hay, I.D. (2002) Thyroid Physiology and Diagnostic Evaluation of Patients with Thyroid Disorders. *In* Larsen, P.R., Kronenberg, H.M., Melmed, S. e Polonsky, K.S. (editores) *Williams Textbook of Endocrinology*. (10^a ed.). W. B. Saunders Company, Philadelphia, cap. 10, p. 331-573.
- Lavinsky, R.M.; Jepsen, K.; Heinzl, T.; Torchia, J.; Mullen, T.M.; Schiff, R.; Del-Rio, A.L.; Ricote, M.; Ngo, S.; Gemsch, J.; Hilsenbeck, S.G.; Osborne, C.K.; Glass, C.K.; Rosenfeld, M.G.; Rose, D.W. (1998) Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 95:2920-2925.
- Lima, L.P. Efeito da castração e do estrogênio sobre a função tireóidea em ratos. Tese submetida ao Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, 2002.
- Limer, J.L.; Speirs, V. (2004) Phyto-oestrogens and breast cancer chemoprevention. *Breast Cancer Research*; 6:119-127
- Lisbôa, P.C.; Curty, F.H.; Moreira, R.M.; Oliveira, K.J.; Pazos-Moura, C.C. (1997) Effects of estradiol benzoate on 5'-iodothyronine deiodinase activities in female rat anterior pituitary gland, liver and thyroid gland. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30:1479-1484.
- Lisbôa, P.C.; Curty, F.H.; Moreira, R.M.; Oliveira, K.J.; Pazos-Moura, C.C. (2001) Sex steroids modulate rat anterior pituitary and liver iodothyronine deiodinase activities. *Hormone and Metabolic Research*; 33:532-535.
- Liu, J.; Burdette, J.E.; Xu, H.; Gu, C.; Breemen, R.B.V.; Bhat, K.P.L.; Booth, N.; Constantinou, A.I.; Pezzuto, J.M.; Fong, H.H.S.; Farsworth, N.R.; Bolton, J.L. (2001) Evaluation of estrogenic activity of plant extracts for the potential treatment of menopausal symptoms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 49:2472-2479.

Madej, A.; Persson, E.; Lundh, T., and Ridderstråle, Y. (2002). Thyroid gland function in ovariectomized ewes exposed to phytoestrogens. *Journal of Chromatography B*; 777:281-287.

Marqusee, E.; Braverman, L.E.; Lawrence, J.E.; Carroll, J.S.; Seely, E.W. (2000) The effect of droloxifene and estrogen on thyroid function in postmenopausal women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*; N° 11, 85:4407-4410.

Miyashita, K.; Murakami, M.; Iriuchijima, T.; Takeuchi, T.; Mori, M. (1995) Regulation of rat type I iodothyronine deiodinase mRNA levels by testosterone. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 115:161-167.

Michot, J.L.; Deme, D.; Virion, A. & Pommier, J. (1985) Relation between thyroid peroxidase, H₂O₂ generating system and NADPH-dependent reductase activities in thyroid particulate fractions. *Molecular and Cellular Endocrinology*; 41:211-221.

Mohamed, M.K.; Abdel-Rahman, A.A. (2000) Effect of long-term ovariectomy and estrogen replacement on the expression of estrogen receptor gene in female rats. *European Journal of Endocrinology*; 142:307-314.

Moreira, R.M.; Lisboa, P.C.; Curty, F.H.; Pazos-Moura, C.C. (1997) Dose-dependent effects of 17 β -estradiol on pituitary thyrotropin content and secretion in vitro. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*; 30: 1129-1134.

Mori, M.; Naito, M.; Watanabe, H.; Takeichi, N.; Dohi, K. & Ito, A. (1990) Effects of sex difference, gonadectomy, and estrogen on n-methyl-nitrosourea induced rat thyroid tumors. *Cancer Research*; 50:7662-7667.

Moura, E.G., Rosenthal, D. & Carvalho-Guimarães, D.P. (1989). Thyroid peroxidase activity in human nodular goiters. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*; 22:31-39.

Muramatsu M, Inoue S Muramatsu M, Inoue S (2000) Estrogen receptors: how do they control reproductive and nonreproductive functions? *Biochemical And Biophysical Research Communications*; 270(1):1-10.

Nahas, E.P.; Neto, J.N.; De Luca, L.; Traiman, P.; Pontes, A.; Dalben, I. (2004) Benefits of soy germ isoflavones in postmenopausal women with

contraindication for conventional hormone replacement therapy. *Maturitas The European Menopause Journal*; 48:372-380.

Onate, S.A.; Tsai, S.Y.; Tsai, M.J.; O'Malley, B.W. (1995) Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science*; 270:1354-1357.

Ortiga, T.M.R. (1992) Secreção *in vitro* de tireotrofina basal e pós-TRH de adenohipófises de ratos hipo e hipertireóideos. Monografia apresentada no Instituto de Biologia (UERJ) para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Patel, Y.C. & Srikant, C.B. (1986) Somatostatin mediation of adenohipophysial secretion. *Annual Review of Physiology*; 48:551-567.

Piersen, C.E. (2003) Phytoestrogens in botanical dietary supplements: implications for cancer. *Integrative Cancer Therapies*; 2:120-138.

Pisarev, M.A. (1985) Thyroid autoregulation. *Journal of Endocrinological Investigation*; 8:475-484.

Razandi, M.; Pedram, A.; Greene, G.L.; Levin, E.R. (1999) Cell membrane and nuclear estrogen receptor (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. *Molecular Endocrinology*; 13:307-319.

Riedel, C.; Levy, O. & Carrasco, N. (2001) Post-transcriptional regulation of the sodium/iodide symporter by thyrotropin. *The Journal of Biological Chemistry*; 276(24):21458-21463.

Ross, M.H.; Reith, E.J. e Romrell, L.J. (1993) Glândulas Endócrinas. Em: Ross, M.H. e Rowrell, L.J. (editores). *Histologia Texto e Atlas* (2^a edição). Editorial Médica Panamericana, São Paulo, cap 20, p. 573-577.

Rossouw, J.E.; Anderson, G.L.; Prentice, R.L.; LaCroix, A.Z.; Kooperberg, C.; Stefanick, M.L.; Jackson, R.D.; Beresford, B.V.; Howard, K.C.; Johnson, J.M.; Kotchen, J. (2002) Ockene, Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the women's healthy initiative randomized controlled trial. *The Journal of the American Medical Association*; 288:321-333.

- Saito, T.; Endo, T.; Kawaguchi, A.; Ikeda, M.; Nakazato, M.; Kogai, T. et al. (1997) Increased expression of the Na⁺/I symporter in cultured human thyroid cells exposed to thyrotropin and in Graves' thyroid tissue. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*; 82:3331-3336.
- Saloniemi, H.; Wahala, K.; Nykanen-Kurki, P.; Kallela, K. & Saastamoinen, I. (1995) Phytoestrogen content and estrogenic effect of legume fodder. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*; 208:13-17.
- Sanz, M.J.; Ferrandiz, M.L.; Cejudo, M.; Terencio, M.C.; Gil, B.; Bustos, G.; Ubeda, A.; Gunasegaran, R. & Alcaraz, M.J. (1994) Influence of natural flavonoids on free radical generating systems and oxidative stress. *Xenobiotica*; 24:689-699.
- Scott, D.A.; Wang, R.; Kreman, T.M.; Sheffield, V.C. & Karniski, L.P. (1999) The pendred syndrom gene encodes a chloride-iodide transport protein. *Nature Genetics*; 21:400-443.
- Setchell, K.D.R.; Zimmer-Nechemias, L.; Cai, J. & Heubi, J.E. (1998) Isoflavone content of infant formulas and the metabolic fate of those phytoestrogens in early life. *American Journal of Clinical Nutrition*; 68: 1453S-1461S.
- Setchell, K.D.R., Cassidy, A. (1999) Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *The Journal of Nutrition*; 129:758S-767S.
- Setchell, K.D.R.; Brown, N.M.; Zimmer-Nechemias, L.; Brashear, W.T.; Wolfe, B.E.; Kirschner, A.S. & Heubi, J.E. (2002) Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*; 76:447-453.
- Sirtori, C.R.; Lovati, M.R.; Manzoni, C.; Moneti, M.; Pazzucconi, F., and Gatti, E. (1995) Soy and cholesterol reduction: clinical experience. *The Journal of Nutrition*; 125 (Suppl. 3):598S-605S.
- Smanik, P.A.; Liu, Q.; Furminger, T.L.; Ryu, K.; Xing S.; Mazzaferri, E.L. & Jhiang, S.M. (1996) Cloning of the human sodium iodide symporter. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 226:339-345.
- Son, H.Y.; Nishikawa, A.; Ikeda, T.; Kimura, S.; Hirose, M. (2001). Lack of effect of soy isoflavone on thyroid hyperplasia in rats receiving an iodine-deficient diet. *Japanese Journal of Cancer Research*; 92:103-108.

- Spanka, M.; Hesch, R.D.; Irmscher, K. & Köhrle, J. (1990) 5'-deiodination in rat hepatocytes: effects of specific flavonoid inhibitors. *Endocrinology*; 126:1660-1667.
- Spitzweg, C., and Morris, J.C. (2002) The sodium iodide symporter: its pathophysiological and therapeutic implications. *Clinical Endocrinology*; 57: 559 – 574.
- Stefaneanu, L.; Kovacs, K.; Lloyd, R.V.; Buchfelder, M.; Fahibusch, R.; Smyth, H. (1994) In situ hybridization study of estrogen receptor messenger ribonucleic acid in human adenohypophysial cells and pituitary adenomas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 78:83-88.
- Tanaka, Y., Sasaki, M., Kaneuchi, M., Fujimoto, S., Dahiya, R.(2003) Estrogen receptor alpha polymorphisms and renal cell carcinoma – a possible risk. *Molecular and Cellular Endocrinology*; 202:109-116.
- Tansey, G.; Hughes, C.L., Jr; Cline, J.M.; Krummer, A.; Walmer, D.K. & Schmoltzer, S.(1998). Effects of dietary soybean estrogens on the reproductive tract in female rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*; 217:340-344.
- Taurog, A. (2000) Hormone Synthesis: Thyroid Iodine Metabolism. In Braverman, L.E. and Utiger, R.D. (editores). *The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text* (8^a ed). Lippincott Williams e Wilkins, Philadelphia, cap. 4, p. 61-85.
- Tikkanen, M.J.; Wähälä, K.; Ojala, S.; Vihma, V., and Adlercreutz (1998) Effect of soybean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 95:3106-3110.
- Urban, R.J. (1992) Neuroendocrinology of aging in the male and female. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*; 21 (4):921-31.
- Vassart, G.; Dumont, J.E. (1992) The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth. *Endocrine Reviews*; 13:596.
- Vaya, J.; Tamir, S. (2004) The relationship between the chemical structure of flavonoids and their estrogen-like activities. *Current Medicinal Chemistry*; 11(10):1333-43.
- Virion, A.; Michot, J.L.; Deme, D.; Kaniewski & Pommier, J. (1984) NADPH-dependent H₂O₂ generation and peroxidase activity in thyroid particulate fraction. *Molecular and Cellular Endocrinology*; 36:95-105.

- Visser, T.J. (1996) Pathways of thyroid hormone metabolism. *Acta Medica Austriaca*; 23 (1-2):10-6.
- Wass, J.A.H. (1995) Somatostatin. In DeGroot, L.J. (editor). *Endocrinology*. (3rd edition). W.B. Saunders Company, EUA, cap. 17, p.266-279.
- Wondisford, F.E.; Magner, J.A. & Weintraub, B.D. (1996) Thyrotropin. In Braverman, L.E. & Utiger, R.D. (editors). *The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text*. (7th ed). Lippincott-Raven, New York, cap 11, p. 19-46.
- Wu, J.; wang, X.; Chiba, H.; Higuchi, M.; Nakatani, T.; Ezaki, O.; Cui, H.; Yamada, K.; Ishimi, Y. (2004) Combined intervention of soy isoflavone and moderate exercise prevents body fat elevation and bone loss in ovariectomized mice. *Metabolism*; N° 7, 53:942-948.
- Wuttke, W.; Jarry, H.; Becker, T.; Schultens, A.; Christoffel, V.; Gorkow, C.; Seidlová-Wuttke, D. (2003) Phytoestrogens: endocrine disrupters or replacement for hormone replacement therapy? *Maturitas The European Menopause Journal*; 44 Suppl. 1:S9-S20.
- Xu, Y.J.; Traystman, R.D.; Hurn, P.; Wang, M. (2003) Neuritelocalized estrogen receptor – a mediates rapid signaling by estrogen. *Journal of neuroscience research*; 74:1-11.
- Yen, P.M. (2001) Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiological Reviews*; 81:1097-1142.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)