

**Luana Lopes de Souza**

**DIETAS RICAS EM ÁCIDOS GRAXOS  
POLIINSATURADOS E AÇÃO DOS  
HORMÔNIOS TIREOIDEANOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências biológicas (Fisiologia)

Orientação: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Carmen Cabanelas Pazos de Moura

**Rio de Janeiro  
2009**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Souza, Luana Lopes

Dietas ricas em ácidos graxos poliinsaturados e ação dos hormônios tireoideanos/ Luana Lopes de Souza. Rio de Janeiro, 2009.  
xiii, 99f.: il.;

Dissertação (Mestrado) – UFRJ/ IBCCF, Ciências Biológicas – Fisiologia, 2009.

Orientador: Carmen Cabanelas Pazos de Moura

1. Hormônios tireoideanos. 2. Metabolismo lipídico  
3. Ácidos graxos poliinsaturados. 4. Óleo de peixe  
I. Carmen Cabanelas Pazos de Moura II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Ciências Biológicas – Fisiologia. III. Dietas ricas em ácidos graxos poliinsaturados e ação dos hormônios tireoideanos.

LUANA LOPES DE SOUZA

## **DIETAS RICAS EM ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS E AÇÃO DOS HORMÔNIOS TIREOIDEANOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências biológicas (Fisiologia)

Rio de Janeiro, ..... de ..... de 2009

---

**Dr<sup>a</sup> Carmen Cabanelas Pazos de Moura**  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ

---

**Dr<sup>a</sup> Doris Rosenthal**  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ

---

**Dr<sup>a</sup> Magna Cottini da Fonseca Passos**  
Instituto de Nutrição - UERJ

---

**Dr<sup>a</sup> Patricia Rieken Macedo Rocco**  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ

---

**Dr<sup>a</sup> Tania Maria Ortiga Carvalho** (Revisor e suplente)  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ

---

**Dr<sup>a</sup> Patrícia Cristina Lisboa da Silva** (Suplente)  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

**Dedico este trabalho as duas pessoas  
que mais admiro nesta vida: meus  
pais, Sonia e Mauricio**

## **AGRADECIMENTOS**

---

Sou grata a Deus por me dar força, sabedoria e coragem para persistir e batalhar por meus objetivos, e por colocar pessoas tão especiais no meu caminho que me incentivam a cada vez querer ir mais longe.

Aos meus pais, essas pessoas tão especiais que eu tanto admiro. Sou grata a eles por me ensinarem a traçar e a buscar minhas metas. Agradeço pelo amor incondicional, pela preocupação eterna, pela amizade, compreensão e apoio. Saibam que todos os meus esforços são a tentativa eterna de retribuir toda contribuição em minha vida e todo o orgulho que sinto de vocês.

À minha família, mais que especial, que mesmo sem entender muito bem o que faço, se orgulham e me apóiam, viajando muitas vezes aos finais de semana ao fundão só para me dar uma carona.

À minha irmã, Eloá, por abrir mão do seu bem mais precioso durante a elaboração deste trabalho: o computador.

Ao Felipe, companheiro, amigo, cúmplice e alma gêmea. Sou grata por todo o carinho e atenção, pela compreensão e ajuda no desenvolvimento deste trabalho. Pelo apoio psicológico, ajuda braçal e pelo conforto nos momentos em que as coisas pareciam não ir bem. Por ser alguém tão essencial em minha vida, a ponto de se tornar quase um integrante do LEM.

A todos os meus amigos, por compreenderem a minha ausência e afastamento no decorrer da elaboração deste trabalho.

A Marianna, a sempre Nina, companheira de longa estrada, por compreender mesmo que aos “trancos e barrancos”, a minha ausência. Você sabe que nossa amizade sobrevive a tudo... Aguarde porque mais quatro anos estão por vir...

A Carmen pela confiança, paciência e oportunidade. Agradeço muito pelo carinho, dedicação e atenção. Por ser muito mais do que uma orientadora, por ser uma “mãe” zelosa

e companheira. Por provocar em mim essa admiração que me estimula a querer alcançar mais e mais.

À minha amada mãe científica, Karen, que me ensinou a dar os primeiros passos na bancada. Sou grata por toda contribuição, pela amizade, carinho e paciência desde o início de tudo. Não poderia escolher mãe melhor. Ela é uma das principais responsáveis por tudo isso.

A Christina, que me apresentou um pouquinho desse mundo da pesquisa.

Ao LEM por me proporcionar não apenas conquistas profissionais, mas também conquistas pessoais como as grandes amizades estabelecidas durante o desenvolvimento deste trabalho.

Às companheiras de bancada, Gabi e Aline, que no decorrer desta jornada tornaram-se muito mais que isso, transformaram-se em grandes amigas. Obrigada não apenas pela ajuda no trabalho, mas muito mais pela amizade e cumplicidade. A Gabi, companheira de desiodase e carcaça, que me fez dar muitas gargalhadas enquanto trabalhávamos muito e muito... À Aline, companheira dos momentos difíceis e marcantes, e parceira de Western blotting, seja nas vitórias ou nas derrotas de resultados. Tudo seria mais difícil sem vocês.

A Lary e Flavia, “vizinhas de bancada”, mas nem por isso menos amigas. Obrigada pela amizade e por toda ajuda e assistência, especialmente na reta final deste trabalho.

Ao Marcio, pelo companheirismo e pela grande ajuda. Agradeço pelos quilos e quilos de ração que me ajudou a fazer, pelas viagens pelo campo da física e da bioquímica.

À Adriana, Letícia, Norma, Camila, Ricardo, Zé, Érika, Rodrigo... a todos os integrantes da família LEM sem exceção. Por tornarem o convívio tão agradável e assim o trabalho mais prazeroso. Vocês fizeram tudo ficar mais divertido. Sou muito grata também pela ajuda.

À Vanessa, Izabel e Chris por aparecerem há aproximadamente 5 anos atrás com um panfleto anunciando a seleção de alunos de iniciação científica.

A todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho, seja pela ajuda braçal, pela ajuda psicológica, pela amizade, companheirismo e compreensão.

**Obrigada!**

*“De tudo, ficaram três coisas: a certeza de que ele estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar e a certeza de que seria interrompido antes de terminar. Fazer da interrupção um caminho novo. Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sono uma ponte, da procura um encontro.”*

*(Fernando Sabino)*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

---

- Figura 1** – Estrutura química dos hormônios produzidos pela glândula tireóide. .... 19
- Figura 2** – Atividade das desidases 5' (D1 e D2) e 5 (D1 e D3) sobre o metabolismo de iodotironinas. .... 21
- Figura 3** – Estrutura primária representando os receptores nucleares de hormônios tireoideanos. .... 24
- Figura 4** – Representação esquemática dos mecanismos dos hormônios tireoideanos sobre o metabolismo lipídico envolvidos nos seus efeitos hipolipemiantes. .... 30
- Figura 5** – Estrutura química dos ácidos graxos essenciais: ácido linoleico e linolênico. ... 35
- Figura 6** – Síntese de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa da série n-3 (EPA - ácido eicosapentanoico e DHA - ácido docosahexanóico) e n-6 (ácido aracdônico) a partir dos AGE linoleico e linolênico. .... 36
- Figura 7** – Estrutura química dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa da série n-3 presentes no óleo de peixe. .... 37
- Figura 8** – Representação esquemática dos mecanismos de ação dos AGPI n-3 presentes no óleo de peixe envolvidos nos seus efeitos hipolipemiantes. .... 47
- Figura 9** – Desenho experimental. .... 61
- Figura 10** – Evolução ponderal dos animais alimentados com ração contendo óleo de soja ou óleo de peixe como fonte lipídica durante o período experimental. .... 72
- Figura 11** – Consumo alimentar dos animais recebendo ração contendo óleo de soja ou óleo de peixe como fonte lipídica durante o período experimental. .... 72

- Figura 12** – Massa dos compartimentos adiposos ao final das 11 semanas de tratamento com dieta contendo óleo de soja (OS) ou óleo de peixe (OP) como fonte lipídica. .... 73
- Figura 13** – Concentração sérica de colesterol total (CT) e triglicérideo (TG) ao final das 11 semanas de tratamento com dieta contendo óleo de soja (OS) ou óleo de peixe (OP) como fonte lipídica. .... 75
- Figura 14** – Concentração sérica de  $T_3$  e  $T_4$  totais ao final das 11 semanas de tratamento com dieta contendo óleo de soja (OS) ou óleo de peixe (OP) como fonte lipídica. .... 76
- Figura 15** – Concentração sérica de TSH ao final das 11 semanas de tratamento com dieta contendo óleo de soja (OS) ou óleo de peixe (OP) como fonte lipídica. .... 77
- Figura 16** – Concentração sérica de Leptina ao final das 11 semanas de tratamento com dieta contendo óleo de soja (OS) ou óleo de peixe (OP) como fonte lipídica. .... 77
- Figura 17** – Expressão hepática do TR $\beta$ 1 ao final das 11 semanas de tratamento com dieta contendo óleo de soja (OS) ou óleo de peixe (OP) como fonte lipídica. .... 78
- Figura 18** – Correlação entre a expressão hepática do TR $\beta$ 1 e o perfil lipídico dos animais alimentados com dieta contendo óleo de soja (OS) ou óleo de peixe (OP) como fonte lipídica durante o período experimental. .... 79
- Figura 19** – Atividade da enzima alfa glicerofosfato desidrogenase mitocondrial (alfaGPD-m) hepática ao final das 11 semanas de tratamento com dieta contendo óleo de soja (OS) ou óleo de peixe (OP) como fonte lipídica. .... 80
- Figura 20** – Atividade da desidase do tipo 1 (D1) em homogenatos hepáticos ao final das 11 semanas de tratamento com dieta contendo óleo de soja (OS) ou óleo de peixe (OP) como fonte lipídica. .... 81
- Figura 21** – Atividade das desidases do tipo 1 (D1) e tipo 2 (D2) adenohipofisárias ao final das 11 semanas de tratamento com dieta contendo óleo de soja (OS) ou óleo de peixe (OP) como fonte lipídica. .... 82

## LISTA DE TABELAS

---

- Tabela 1** – Características cinéticas e fisiológicas das desidases do tipo 1 (D1), 2 (D2) e 3 (D3). ..... 22
- Tabela 2** – Composição das rações elaboradas para as ratas lactantes (AIN-93G) e para os filhotes (AIN-93M) do grupo óleo de soja e do grupo óleo de peixe. .... 62
- Tabela 3** – Composição em macronutrientes e Calorias das dietas experimentais e de suas recomendações específicas ..... 63
- Tabela 4** – Composição percentual média de ácidos graxos das dietas experimentais ..... 63
- Tabela 5** – Peso dos tecidos adiposo marrom, hepático e cardíaco ao final das 11 semanas de tratamento com dieta contendo óleo de soja ou óleo de peixe como fonte lipídica. .... 74
- Tabela 6** – Composição corporal dos animais na 11<sup>a</sup> semana de tratamento com dieta contendo óleo de soja ou óleo de peixe como fonte lipídica. .... 74
- Tabela 7** – Concentração sérica do colesterol em frações e da proteína total ao final das 11 semanas de tratamento com dieta contendo óleo de soja ou óleo de peixe como fonte lipídica. .... 76

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
AG	Ácido graxo
AGPI	Ácido graxo poliinsaturado
AGPI n-3	Ácido graxo poliinsaturado da série n-3
AGPI n-6	Ácido graxo poliinsaturado da série n-6
AIN-93G	Recomendação nutricional específica para ratas grávidas e lactantes
AIN-93M	Recomendação nutricional específica para manutenção de filhotes
aP2	Proteína de ligação ao lipídeo do adipócito
Apo	Apoproteína
ATP	Adenosina tri-fosfato
BPK	Tampão fosfato de potássio
ChREBP	<i>Carbohydrate regulatory element binding protein</i>
cpm	Contagens por minuto
CYP7A1	Colesterol 7 $\alpha$ - hidroxilase
D1	Desiodase do tipo 1
D2	Desiodase do tipo 2
D3	Desiodase do tipo 3
DBD	Domínio de ligação ao DNA
DHA	Ácido docosahexanóico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
EPA	Ácido eicosapentanóico
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FXR	<i>Farnesoid X receptor</i>
GH	Hormônio do crescimento
GPDC	Glicerofosfato desidrogenase citosólica
GPDm	Glicerofosfato desidrogenase mitocondrial
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HMG CoA	3-hidroxi-3-metil glutaril Coenzima A
HNF-4 $\alpha$	<i>Hepatocyte nuclear factor-4 alpha</i>
IDL	<i>Intermediary density lipoprotein</i>
IgG	Imunoglobulina G
ING	Tecido adiposo inguinal
INT	Iodonitrotetrazolim

$K_a$	Constante de associação
$K_m$	Constante de <i>Michaelis-Menten</i>
LBD	Domínio de ligação ao ligante
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LPL	Lípase lipoproteica
LXR	<i>Liver X receptor</i>
mA	Miliampere
mCi	Milicurie
MLX	<i>Max-like factor X</i>
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NHPP	<i>National Hormone Pituitary Program</i>
nm	Nanometro
O.D.	Densidade ótica
OP	Óleo de peixe
OS	Óleo de soja
PLP	Proteína proteolipídica da mielina humana
PMS	Fenazina metosulfato
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PTU	Propiltiouracil
PVDF	<i>Polyvinylidene difluoride</i>
RET	Tecido adiposo retroperitoneal
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucléico mensageiro
rT <sub>3</sub>	T <sub>3</sub> reverso
RXR	Receptor X de ácido retinóico
SRE	Elemento regulatório de esterol
SREBP	<i>Sterol regulatory element binding protein</i>
T <sub>3</sub>	3,5,3'-triiodotironina
T <sub>4</sub>	Tiroxina
TBG	Globulina ligadora de tiroxina
TBS	Tampão tris-salina
TBS-T	Tampão tris-salina com Tween
TCA	Ácido tricloroacético
TR	Receptor de hormônio tireoideano
TRE	Elemento responsivo a hormônio tireoideano
TRH	Hormônio estimulador de tireotrofina
TSH	Hormônio estimulador da tireóide
UCP	Proteína desacopladora
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i>

## RESUMO

---

Souza, Luana Lopes. **Dietas ricas em ácidos graxos poliinsaturados e ação dos hormônios tireoideanos.** Rio de Janeiro, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Fisiologia) - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009

**INTRODUÇÃO:** Os mecanismos de ação do óleo de peixe (OP) responsáveis por seus efeitos hipolipemiantes não são completamente elucidados, mas envolvem regulação da beta-oxidação e lipogênese, processos metabólicos alvos de hormônios tireoideanos (HT). Desta forma, investigamos se o controle da ação dos HT seria um dos mecanismos do OP para regulação do metabolismo lipídico. **METODOLOGIA:** Para este fim, ratas receberam ração normolipídica contendo óleo de soja (grupo OS, n=8) ou óleo de peixe (grupo OP, n=8) durante a lactação. A prole permaneceu no mesmo tipo de ração até o sacrifício, com 11 semanas de idade. Peso corporal e consumo alimentar foram verificados semanalmente. A composição corporal foi avaliada ao final do tratamento pelo método da carcaça. HT, tireotrofina (TSH) e leptina foram dosados por radioimunoensaio. Triglicerídeos (TG), colesterol total (CT) e frações foram quantificados por kits específicos. Avaliou-se a expressão do receptor hepático de HT (TR $\beta$ 1) por Western blotting e a atividade da enzima hepática alfa-glicerofosfato desidrogenase mitocondrial (GPDm) por ensaio colorimétrico. A atividade das desidases hepática (D1) e hipofisária (D1 e D2) foram aferidas pela liberação de  $^{125}\text{I}$  a partir de  $^{125}\text{I}$  rT<sub>3</sub>. **RESULTADOS:** A dieta contendo OP promoveu menor peso corporal a partir da 5ª semana de idade até o sacrifício (OS=313,6 $\pm$ 11,1 e OP=234,1 $\pm$ 11,5g, p<0,001), apesar do consumo alimentar não ser diferente. O menor peso corporal (35,4%) foi acompanhado por menor massa de tecido adiposo retroperitoneal (42,7%, p<0,01) e maior massa de tecido adiposo inguinal (44%, p<0,01). OP apresentou um compartimento protéico 14,4% menor do que o grupo OS (p<0,01), apesar de não serem observadas diferenças no compartimento aquoso (p= 0,27) e lipídico (p= 0,61). TG e CT apresentaram-se 60,3 (p<0,0001) e 28,6% (p<0,0001) menores, respectivamente, em relação ao OS. Não houve diferença na concentração sérica de leptina (p=0,09), T<sub>3</sub> total (p=0,65), T<sub>4</sub> total (p=0,48) ou TSH (p=0,10) desses animais, no entanto, a expressão hepática do TR $\beta$ 1 apresentou-se 28% maior (p<0,001) no OP. Não foi observada diferença significativa na atividade da D1 hepática (p=0,31). Entretanto a atividade da alfa GPDm, sensível marcador hepático da ação do HT, apresentou-se 1,92 vezes maior no grupo OP (p<0,0001). A atividade das desidases hipofisárias, D1 e D2, apresentaram-se 51 e 37,4% menores, respectivamente, no grupo OP (p<0,05). Observamos correlação negativa entre a expressão do TR $\beta$ 1 hepático e a concentração sérica de colesterol (r= -0,66; p<0,01), assim como, com a concentração sérica de triglicerídeos (r= -0,68; p<0,01). **CONCLUSÃO:** Os dados sugerem que OP, apesar de não influenciar as concentrações séricas de HT, parece facilitar sua ação no tecido hepático, através do aumento de receptores disponíveis para sinalização celular, favorecendo sua ação sobre seus alvos, como a enzima alfa GPDm. Estes mecanismos podem estar envolvidos nas alterações no metabolismo lipídico observadas na dieta OP.

## ABSTRACT

---

Souza, Luana Lopes. **Polyunsaturated fatty acid dietary and thyroid hormone action.** Rio de Janeiro, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Fisiologia) - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009

**INTRODUCTION:** n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) present in fish oil (OP) decrease serum lipids. The mechanism explaining this effect is not completely elucidated, but involves modulation of beta oxidation and lipogenesis. Both metabolic processes are also regulated by thyroid hormones (TH) and here we tested the hypothesis that fish oil diet as compared to soy oil (n-6 PUFA) diet may alter thyroid hormone action. **MATERIALS AND METHODS:** Female rats received normolipidic diets with soybean oil (OS – Commercial) or fish oil (OP - ROPUFA '75' n-3 EE Oil - DSM Nutritional Products) during lactation. The offspring received the same diet since weaning (21days-old) until the sacrifice at 11 weeks of age. Body weight (BW) and food consumption were measured weekly. Body composition was evaluated by carcass method. Serum T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, TSH and leptin were evaluated by radioimmunoassay. Serum triglycerides (TG) and cholesterol (C) were evaluated employing commercial kits. TRβ1 expression in the liver was analyzed by Western blotting. The hepatic mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase activity (GPDm) was evaluated by colorimetric assay. The deiodinase enzymatic activity in the liver (D1) and pituitary (D1 and D2) were measured by the release of <sup>125</sup>I from <sup>125</sup>I reverse T<sub>3</sub>, employed as substrate. **RESULTS:** OP diet group exhibited lower BW since 5 weeks of age until the sacrifice (OS= 313.6±11.1 and OP= 234.1±11.5g, p<0.001). OP and OS diet groups had the same food consumption. Retroperitoneal white fat mass was lower (42.7%) (p<0.01) and inguinal fat mass was elevated (44%) in OP diet group (p<0.01). Carcass of OP diet group had lower protein concentration than OS diet group (14.4%, p<0.01), while water and lipid content were similar on both groups. Serum TG and C were lower in OP diet group, 60.3 (p<0.0001) and 28.6% (p<0.0001), respectively, compared with OS diet group. Serum leptin (p= 0.09), total T<sub>3</sub> (p= 0.65), total T<sub>4</sub> (p= 0.48) and TSH (p= 0.10) were similar on both groups. However, liver TRβ1 expression was 28% higher in OP diet group (p<0.001). There was a negative correlation between TRβ1 expression and TG (r=- 0.68; p<0.01), and between TRβ1 expression and C (r=-0.66; p<0.01). GPDm activity, a target stimulated by T<sub>3</sub> via TRβ, was 93% higher in the OP diet group (p<0.0001), however, the hepatic D1 activity was similar between the groups. Pituitary deiodinases, D1 and D2, activities were lower on OP diet group, compared with OS diet group (51 and 37.4%, respectively – p<0.05). **CONCLUSION:** This work suggests that polyunsaturated fatty acids of fish oil facilitate thyroid hormone action on the liver. The elevated TRβ1 expression on liver, despite no changes on serum hormone concentration, seems to increase TH action on hepatic targets, as GPDm. This mechanism may be involved in changes of lipid metabolism observed in animals that received fish oil diet.

## SUMÁRIO

---

Dedicatória .....	IV
Agradecimentos .....	V
Lista de ilustrações .....	VIII
Lista de tabelas .....	X
Lista de abreviaturas .....	XI
Resumo .....	XIII
Abstract .....	XIV
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>1.1 Hormônios tireoideanos .....</b>	<b>18</b>
1.1.1 <i>Mecanismo de ação e efeitos gerais</i> .....	18
1.1.2 <i>Efeitos sobre o metabolismo lipídico e mecanismos de ação</i> .....	25
1.1.3 <i>Modulação por fatores dietéticos</i> .....	32
<b>1.2 Ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) .....</b>	<b>34</b>
1.2.1 <i>Classificação, síntese e efeitos gerais</i> .....	34
1.1.2 <i>Efeitos sobre o metabolismo lipídico e mecanismos de ação</i> .....	38
<b>1.3 Relação entre AGPI e hormônios tireoideanos .....</b>	<b>50</b>
<b>1.4 Interação entre receptores nucleares: TR e PPAR .....</b>	<b>55</b>
<b>1.5 Justificativa .....</b>	<b>58</b>
<b>2 OBJETIVO .....</b>	<b>59</b>
<b>2.1 Geral .....</b>	<b>59</b>
<b>2.2 Específicos .....</b>	<b>59</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>60</b>
<b>3.1 Grupos experimentais .....</b>	<b>60</b>
<b>3.2 Elaboração das rações .....</b>	<b>61</b>
<b>3.3 Avaliação da composição corporal .....</b>	<b>64</b>
<b>3.4 Dosagens hormonais .....</b>	<b>65</b>
<b>3.5 Dosagem de triglicerídeos, colesterol total e em frações e proteínas séricas .....</b>	<b>66</b>
<b>3.6 Avaliação da expressão do TR<math>\beta</math>1 hepático por Western blotting .....</b>	<b>66</b>
<b>3.7 Determinação da atividade da enzima glicerofosfato desidrogenase mitocondrial hepática .....</b>	<b>68</b>
<b>3.8 Medida de atividade das enzimas 5'-desiodases do tipo I e II .....</b>	<b>69</b>
<b>3.9 Análises Estatísticas .....</b>	<b>70</b>

<b>4 RESULTADOS</b> .....	71
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	83
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	100
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	101

## 1 INTRODUÇÃO

---

Os hormônios tireoideanos exercem importante papel sobre o metabolismo lipídico promovendo efeitos sobre síntese e oxidação (Müller & Seitz, 1984). Especialmente quando em excesso, os efeitos estimulatórios sobre a oxidação sobrepõem-se aos efeitos sobre a síntese, favorecendo sua ação hipolipemiante. Além disto, os hormônios tireoideanos são importantes para aumentar o metabolismo hepático do colesterol, reduzindo a sua concentração sérica. Tem sido demonstrado que as ações dos hormônios tireoideanos são suscetíveis a muitos fatores dietéticos, tais como os lipídeos (Danforth & Burger, 1989; Redonnet e cols., 2001).

Características como o grau de insaturação e o tamanho da cadeia dos lipídeos são determinantes para suas ações sobre o perfil lipídico. Enquanto os ácidos graxos (AG) saturados contribuem para o acúmulo de lipídeos, os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) têm demonstrado importantes ações hipolipemiantes (Davidson, 2006). Estes efeitos, descritos especialmente para os AGPI de cadeia longa da série n-3 presentes no óleo de peixe (ácido eicosapentanoico e ácido docosahexanoico), são gerados por ações na transcrição gênica a partir da modulação da expressão e da atividade de uma série de fatores nucleares tais como, os *Peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR) (Jump e cols., 2008). No entanto, os mecanismos de ação do óleo de peixe responsáveis por seus efeitos hipolipemiantes não estão completamente elucidados, mas envolvem regulação hepática do metabolismo de triglicerídeos, AG e colesterol, atuando sobre vários alvos em comum com os hormônios tireoideanos. Neste trabalho, hipotetizamos que as ações dos hormônios tireoideanos possam ser moduladas pelos AGPI n-3 presentes no óleo de peixe, constituindo este mais um mecanismo que contribui para o efeito hipolipemiante do óleo de peixe.

## 1.1 Hormônios tireoideanos

### 1.1.1 Mecanismo de ação e efeitos gerais

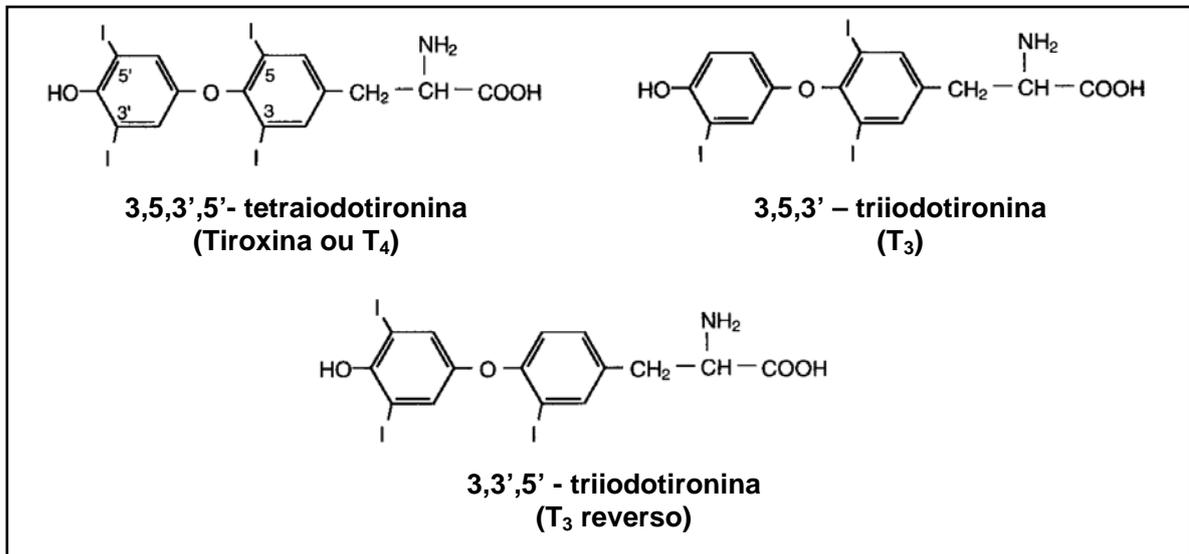
Os hormônios tireoideanos exercem papel crucial no desenvolvimento, diferenciação e metabolismo (Barra e cols., 2004). A falta deste hormônio no desenvolvimento implica em distúrbios de crescimento e retardo mental severo, demonstrando a necessidade de mecanismos de ajustes finos na sua concentração e ação para a manutenção da homeostase (Genuth, 2004).

A glândula tireóide é responsável pela produção dos hormônios tireoideanos 3,5,3',5'-tetraiodotironina (tiroxina ou  $T_4$ ) e 3,5,3'-triiodotironina ( $T_3$ ), e por sua forma inativa, 3,3',5'-triiodotironina ( $T_3$  reverso ou  $rT_3$ ) (Figura 1). Existe uma proporção na produção e secreção desses hormônios pela tireóide, tendo o  $T_4$  representando aproximadamente 90% do débito hormonal tireoideano em humanos (Genuth, 2004) e em torno de 45-50% em ratos (Bianco & Kim, 2006).

O eixo hipotálamo-hipófise-tireóide é responsável pelo controle das concentrações circulantes dos hormônios tireoideanos. A síntese e secreção destes hormônios pela tireóide são estimuladas pelo hormônio estimulador da tireóide (TSH), secretado pela hipófise, cuja síntese e secreção é estimulada pelo hormônio estimulador de tireotrofina (TRH), secretado pelo hipotálamo. *In vivo*, as concentrações dos hormônios tireoideanos são mantidas em níveis adequados pela capacidade deste hormônio de inibir sua própria produção por *feedback* negativo na secreção de TSH e TRH (Moura & Moura, 2004). Desta forma, os hormônios tireoideanos atuam no núcleo paraventricular, inibindo a secreção de TRH, e na hipófise, inibindo a secreção de TSH, constituindo um mecanismo de restabelecimento de sua concentração, frente suas oscilações séricas.

Assim, no hipotireoidismo primário, em resposta à redução de  $T_3$  e  $T_4$ , há um aumento na secreção de TRH pelo hipotálamo e de TSH pela adenohipófise, promovendo aumento do TSH sérico que, por sua vez, atua na tireóide estimulando diversas etapas da síntese dos hormônios tireoideanos, na tentativa de restaurar sua concentração. No entanto, no estado

de hipertireoidismo, o aumento das concentrações séricas de  $T_3$  e  $T_4$ , favorecem o *feedback* negativo, reduzindo as concentrações séricas de TRH e TSH (Kogai & Brent, 2005).



**Figura 1 – Estrutura química dos hormônios produzidos pela glândula tireóide: 3,5,3',5'-tetraiodotironina (tiroxina ou  $T_4$ ) e 3,5,3'-triiodotironina ( $T_3$ ), e sua forma inativa, 3,3',5'-triiodotironina ( $T_3$  reverso). Adaptado de Bianco e cols., 2002**

No entanto, as concentrações séricas dos hormônios tireoideanos não são o único determinante para sua ação. O perfil tecidual da ação desses hormônios é modulado por diversos pontos de controle (Moura & Moura, 2004).

Os hormônios tireoideanos, devido às suas características hidrofóbicas, circulam na corrente sanguínea, predominantemente ligados a proteínas séricas, como a globulina ligadora de tiroxina (TBG). Desta forma, a fração livre, que representa o hormônio metabolicamente ativo, constitui somente 0,02% da concentração total de  $T_4$  e 0,3% da concentração total de  $T_3$ , sendo determinante para a ação do hormônio (Kogai & Brent, 2005). A ligação destes hormônios às proteínas plasmáticas aumenta sua meia-vida e assegura uma distribuição regular do hormônio nos tecidos alvos (Barra e cols., 2004).

A entrada dos hormônios tireoideanos na célula, diferentemente do processo de difusão simples que se postulava há alguns anos atrás, é mediada por proteínas transportadoras presentes na membrana plasmática (Visser, 2007). Esses transportadores,

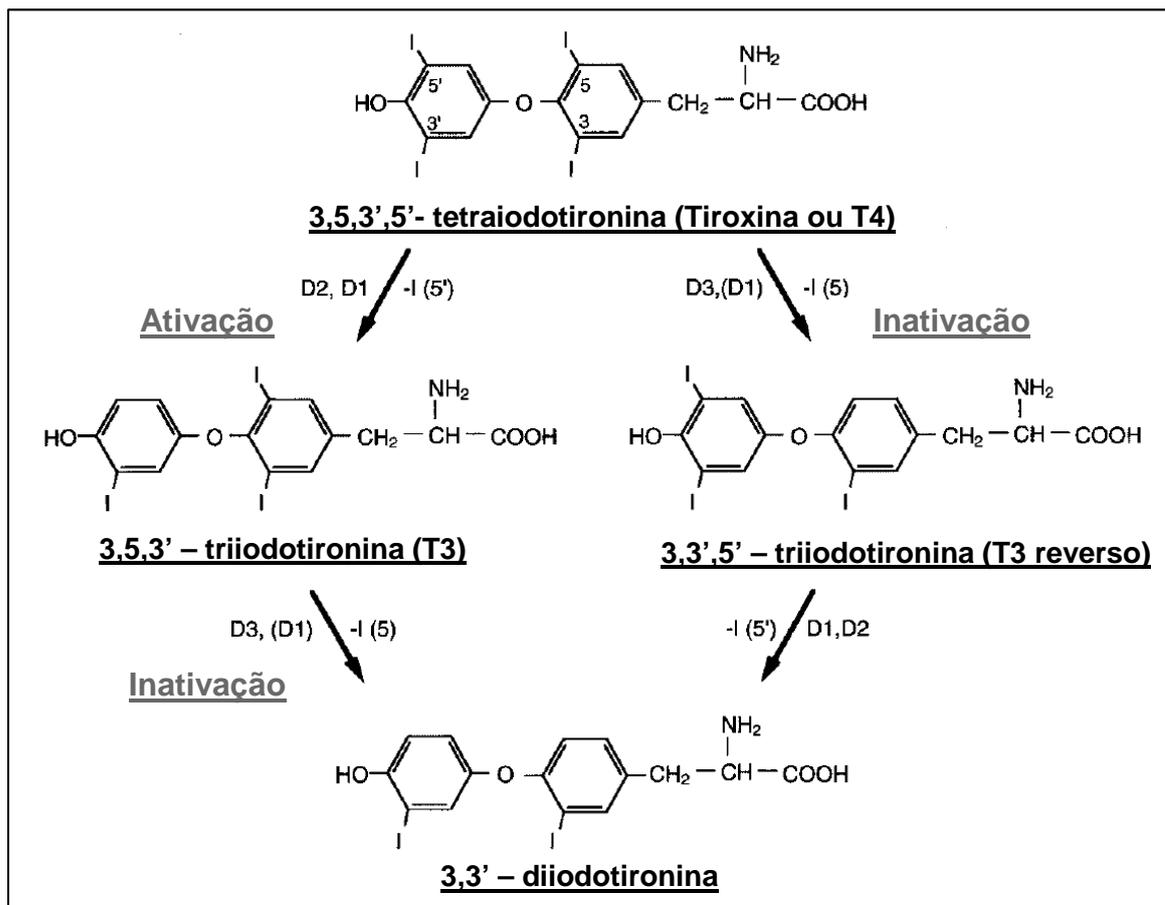
como o transportador monocarboxilato 8 (MCT8), possuem distribuição tecido-específica e são importantes para a concentração intracelular do hormônio e assim, para sua ação, constituindo um alvo potencial para modular a ação do hormônio (Dumitrescu e cols., 2006).

Devido ao baixo débito na produção de  $T_3$  pela tireóide de seres humanos (aproximadamente 10% de todo o hormônio secretado), as vias extratireoideanas de produção deste hormônio contribuem de forma importante para a produção diária de  $T_3$  representando cerca de 80% de sua produção total em humanos. Já em roedores a contribuição extratireoideana para o  $T_3$  sérico corresponde a cerca de 50% (Bianco & Kim, 2006). Estas vias extratireoideanas são constituídas pela ação de enzimas 5'-desiodases que têm a capacidade de remover um iodo da posição 5' do anel fenólico das iodotironinas, promovendo sua ativação ou metabolização. As enzimas 5-desiodases contribuem com a inativação e metabolização do hormônio (Figura 2), já que convertem  $T_4$  a  $rT_3$  e  $T_3$  a  $T_2$ . Entretanto, este termo "inativação" pode ser inadequado em vista das recentes descobertas revelando que tanto  $rT_3$  como  $T_2$  possuem atividade biológica, porém bem menos intensa e com características distintas daquelas de  $T_3$  (Moreno e cols., 2008).

Apesar das similaridades entre as três desiodases atualmente descritas, tipo 1 (D1), 2 (D2) e 3 (D3), estas possuem diferentes substratos preferenciais, propriedades cinéticas, respostas a moduladores e ações fisiológicas (Bianco & Larsen, 2005) (Tabela 1). D2 tem papel bem estabelecido na produção de  $T_3$  intracelular e D3 na metabolização e inativação de hormônios tireoideanos. Já D1 pode tanto produzir  $T_3$  extracelular quanto promover o clearance de  $rT_3$  (Bianco & Kim, 2006). Isto se deve à capacidade da D1 de realizar tanto a reação de 5 como a de 5'-desiodação, enquanto D2 apresenta apenas atividade 5' desiodase e a D3 tem ação exclusiva de 5 desiodação (Kuiper e cols., 2005). Desta forma, D2 gera preferencialmente a forma ativa do hormônio ( $T_3$ ), a partir da desiodação de  $T_4$ , enquanto a D1 ativa ou inativa  $T_4$ , sendo sua ação ativadora a predominante fisiologicamente (Bianco & Kim, 2006).

A localização celular de D1 e D2, membrana plasmática e retículo endoplasmático, respectivamente, explica parcialmente a menor contribuição da D1 para a geração de  $T_3$

intracelular (Bianco & Larsen, 2005). Além disto, D2 possui uma constante de *Michaelis-Menten* ( $K_m$ ) 1000 vezes menor para  $T_4$  do que D1 sob as mesmas condições *in vitro* (Bianco e cols., 2002). Desta forma, o  $T_4$  é o substrato preferencial de D2 enquanto o  $rT_3$  é o substrato preferencial de D1. No entanto, o  $rT_3$  também é um importante substrato para D2, devido sua ação 5' desiodase (Bianco e cols., 2002).



**Figura 2 – Atividade das desiodases 5' (D1 e D2) e 5 (D1 e D3) sobre o metabolismo de iodotironinas.** Adaptado de Bianco e cols., 2002

As concentrações séricas de hormônios tireoideanos são capazes de modular a atividade das desiodases. Enquanto D1 é regulada positivamente por hormônio tireoideano, sendo altamente sensível às alterações na concentração sérica destes hormônios, D2 é modulada negativamente, tendo como principal inibidor o  $T_4$  (Kuiper e cols., 2005). O principal inibidor da D1 é o propiltiouracil (PTU), sendo esta a única desiodase sensível a esta droga (Bianco e cols., 2002).

**Tabela 1** – Características cinéticas e fisiológicas das desidases do tipo 1 (D1), 2 (D2) e 3 (D3)

Parâmetro	D1	D2	D3
<b>Atividade</b>	5 e 5' desidase	5' desidase	5' desidase
<b>Substrato preferencial</b>	rT3 >> T4 > T3	T4 > rT3	T3 > T4
<b>Papel fisiológico</b>	Produção extracelular de T3 e inativação de todos os produtos	Produção intracelular de T3	Inativação de T4 e T3
<b>Localização celular</b>	Membrana plasmática	Retículo endoplasmático	Membrana plasmática
<b>K<sub>m</sub> (M)</b>	10 <sup>-7</sup> , 10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-9</sup>
<b>Inibição com PTU</b>	Sim	Não	Não
<b>Localização tecidual</b>	Fígado, hipófise, rim, tireóide	Hipófise, TAM, SNC	Placenta, SNC
<b>Resposta ao ↑ de T3 e T4</b>	↑↑	↓↓	↑↑
<b>Regulação fisiológica:</b>			
<b>Indução</b>	T3	Exposição ao frio, catecolaminas	Ativadores de ERK
<b>Repressão</b>	Jejum, doença	↑ T3 ou T4	GH

Adaptado de Bianco e Kim, 2006; Bianco e cols., 2002; Kogai e Brent, 2005. Legenda: TAM - tecido adiposo marrom, SNC – sistema nervoso central, GH – hormônio do crescimento

As desidases se diferenciam até mesmo por sua distribuição tecidual. D1 é encontrada principalmente no fígado, rim, hipófise e tireóide, enquanto a D2 está presente em maior atividade na hipófise, cérebro e tecido adiposo marrom (Oetting & Yen, 2007).

As desidases permitem que a sinalização do hormônio em tecidos individuais possa ser modulada sem que haja alteração nas concentrações séricas do hormônio. Assim, estas enzimas controlam a concentração local do hormônio biologicamente ativo, sendo este um mecanismo determinante para modular a ação dos hormônios tireoideanos em tecidos alvos.

A ação dos hormônios tireoideanos é mediada por receptores nucleares (TR) que podem se ligar com grande afinidade a  $T_3$ , visto que este é a forma biologicamente ativa do hormônio. TRs são membros da grande família de receptores nucleares e agem como fatores de transcrição modulados por ligante, devido sua capacidade de se ligar ao hormônio e a seqüências específicas no ácido desoxirribonucléico (DNA), denominadas elemento responsivo ao hormônio tireoideano (TRE), localizado na região promotora do gene (Oetting & Yen, 2007).

A análise estrutural e funcional do TR e de outros receptores nucleares demonstra que esta superfamília exibe uma estrutura modular com domínios funcionais distintos com funções específicas. Dentre estes se destacam, o domínio amino-terminal, o de ligação ao DNA (DBD) e o de ligação ao ligante (LBD) (Barra e cols., 2004).

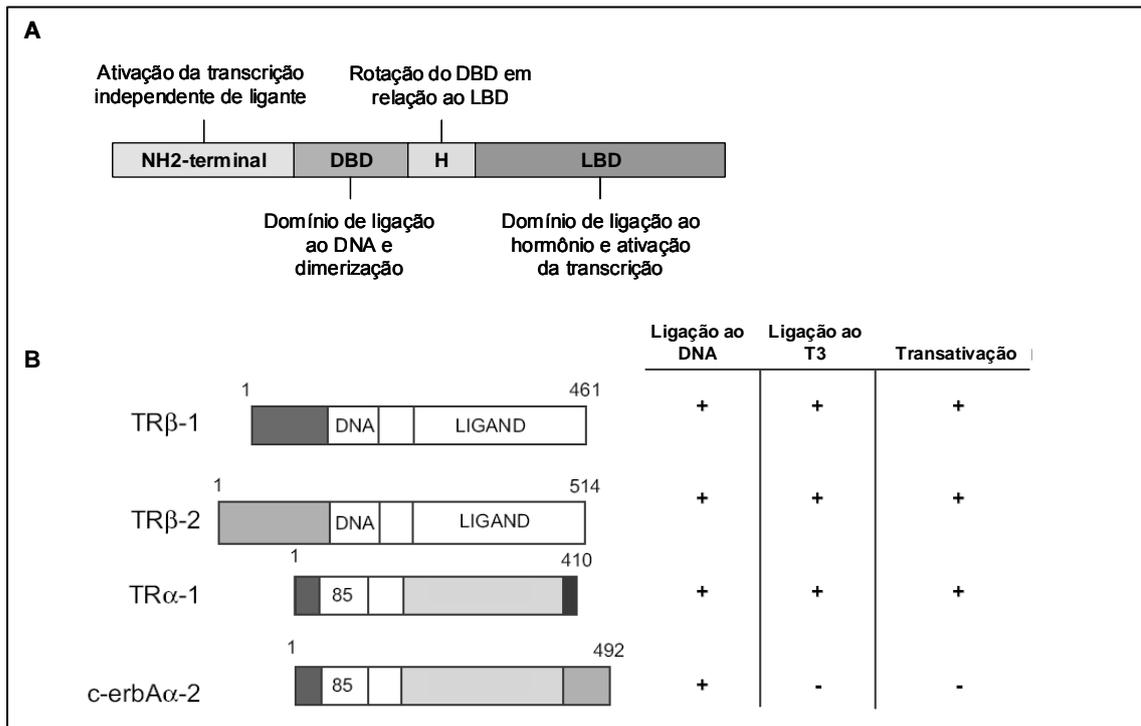
Os genes *Thra* e *Thrb* codificam as principais isoformas de TRs:  $TR\alpha_1$ ,  $TR\alpha_2$  (*c-erbA $\alpha$ -2*),  $TR\beta_1$  e  $TR\beta_2$  (Oetting & Yen, 2007). Estas isoformas possuem as regiões DBD e LBD, altamente conservadas, entretanto, a isoforma  $TR\alpha_2$  possui alterações na região LBD responsáveis por sua incapacidade de se ligar ao  $T_3$  (Barra e cols., 2004) (Figura 3).

A interação do  $T_3$  com o TR provoca mudanças conformacionais do receptor levando a troca de proteínas acessórias identificadas como co-fatores. Desta forma, os co-repressores que estariam ligados ao receptor, seriam trocados por co-ativadores após a interação com o hormônio, gerando alterações na cromatina que favorecem a transcrição do gene alvo (Basset e cols., 2003). O mecanismo de regulação negativa de genes cuja expressão é inibida por hormônio tireoideano ainda é pouco conhecido (Barra e cols., 2004).

Este constitui o mecanismo clássico de ação dos hormônios tireoideanos, entretanto, algumas ações rápidas e independentes de TR ou de atividade transcricional foram descritas e evidenciam outros mecanismos de ação desses hormônios (Oetting & Yen, 2007).

Através do mecanismo clássico, os hormônios tireoideanos são capazes de modular a expressão de diversos genes alvos, dentre os quais, genes envolvidos no metabolismo

energético, como a enzima alfa-glicerofosfato desidrogenase mitocondrial hepática, cuja ação é importante no metabolismo lipídico (Rauchová e cols., 2004). A expressão e a atividade desta enzima são bastante sensíveis à ação dos hormônios tireoideanos, comportando-se, desta forma, como um marcador do estado tireoideano.



**Figura 3 – Estrutura primária representando os receptores nucleares de hormônios tireoideanos.** (A) Domínios funcionais dos receptores nucleares (B) Diferentes isoformas de receptor de hormônio tireoideano e suas propriedades funcionais. Adaptado de Oetting e Yen, 2007; Barra e cols., 2004.

A expressão das diferentes isoformas de TR apresenta padrões distintos nos diversos tecidos. Em ratos, TR $\alpha$ 1 é bastante expresso no coração, músculo esquelético e tecido adiposo marrom, enquanto o TR $\beta$ 1 tem sua maior expressão no fígado (Harvey & Williams, 2002), representando aproximadamente 90% dos TRs hepáticos (Oetting & Yen, 2007).

Observa-se então que as ações dos hormônios tireoideanos não são refletidas apenas por sua concentração sérica, outros fatores como a sua fração livre, a concentração tecidual de T<sub>3</sub> (forma biologicamente ativa do hormônio) e a disponibilidade do receptor, constituem

importantes pontos de modulação para determinar sua ação periférica em tecidos alvos, como o fígado, no qual exerce importantes ações sobre o metabolismo lipídico.

### 1.1.2 *Efeitos dos hormônios tireoideanos sobre o metabolismo lipídico e mecanismos de ação*

Os hormônios tireoideanos influenciam todos os aspectos do metabolismo lipídico, incluindo sua síntese, mobilização e degradação. No entanto, seus efeitos sobre a degradação são mais evidentes, destacando-se em estados de hipertireoidismo. Esta capacidade de estimular vias metabólicas opostas contribui para sua ação de aumentar o gasto energético (Pucci e cols., 2000).

As ações dos hormônios tireoideanos sobre o metabolismo de lipídeos tornam-se evidentes em casos de hipotireoidismo. Indivíduos ou animais hipotireoideos apresentam hiperlipidemia, caracterizada pelo aumento do colesterol sérico, algumas vezes acompanhado do aumento do triglicérido sérico (Pucci e cols., 2000). Erem e cols. (1999) descreveram concentrações aumentadas de colesterol total e de lipoproteína de baixa densidade (*Low Density Lipoprotein Cholesterol* – LDL) em pacientes hipotireoideos e concentrações reduzidas em pacientes hipertireoideos. Mesmo em casos de hipotireoidismo subclínico, caracterizado por alteração do TSH sérico sem alteração das concentrações séricas de T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub>, pacientes podem apresentar perfil lipídico alterado (Jung e cols., 2003; Serter e cols., 2004; Al-Tonsi e cols., 2004), cuja normalidade é restabelecida após terapia hormonal com hormônios tireoideanos (Serter e cols., 2004).

Os mecanismos envolvidos neste efeito hipolipemiante envolvem a modulação direta da expressão dos genes codificantes de enzimas lipogênicas, como a enzima málica e a ácido graxo sintase, e de enzimas de oxidação de ácidos graxos, como a carnitina palmitoil transferase, e modulação indireta de outras enzimas por meio do controle de fatores transcricionais. Outra ação dos hormônios tireoideanos é dada pelo controle de etapas determinantes de algumas vias metabólicas. Um exemplo importante desta ação é o efeito

estimulatório sobre a lançadeira glicerol-3-fosfato, que constitui um cruzamento entre o metabolismo lipídico e glicídico, assim como a principal entrada de glicerol na gliconeogênese (Alfadda e cols., 2004). Esta lançadeira é composta pelas enzimas glicerol-3-fosfato desidrogenase citosólica (GPDc) e mitocondrial (GPDm). A atividade da GPDm é sensível à ação dos hormônios tireoideanos, sendo estimulada por estes, e desta forma constituindo um marcador confiável da ação dos hormônios tireoideanos em modelos agudos e crônicos de tratamento com T<sub>3</sub> (Rauchová e cols., 2004).

As ações hipolipemiantes dos hormônios tireoideanos são determinadas pela preponderância do estímulo de degradação sobre o estímulo de síntese de lipídeos, provocados concomitantemente pelos hormônios tireoideanos. Estes estimulam a síntese hepática de ácidos graxos (AG), assim como sua esterificação a triglicerídeos por ação estimulatória sobre as enzimas acetil-CoA carboxilase, ácido graxo sintase e diglicerídeo-acil-transferase, enzimas limitantes para estas ações (Müller & Seitz, 1984). Desta forma, indivíduos hipertireoideos apresentam lipogênese hepática três vezes maior do que indivíduos eutireoideos (Cachefo e cols., 2001).

Apesar desta capacidade lipogênica aumentada, a perfusão de fígado isolado de ratos hipertireoideos demonstrou reduzida produção de triglicerídeos e de lipoproteínas de muito baixa densidade (*Very low density lipoprotein* - VLDL), assim como redução no conteúdo intracelular de triglicerídeos (Laker & Mayes, 1981; Keyes e cols., 1981). Estudos utilizando o ácido oleico marcado (ácido oleico [1- <sup>14</sup>C]) revelaram maior produção de corpos cetônicos, maior oxidação de AG e maior produção de ácido biliar, revelado pela maior inserção deste carbono marcado nestas vias (Keyes e cols., 1981). Os animais hipotireoideos apresentaram menor oxidação de AG, justificando a maior secreção de VLDL durante a perfusão. Laker & Mayes (1981) demonstraram ainda menor síntese de AG nos animais hipotireoideos, através da observação de uma menor incorporação de <sup>3</sup>H (através da utilização de <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O) no tecido hepático.

Também em seres humanos, observa-se aumento na secreção de VLDL pelo fígado em hipotireoideos (Al-Tonsi e cols., 2004). Assim como em animais, as alterações na

síntese de lipídeos são acompanhadas por alterações na sua captação e metabolização. Avaliações em humanos utilizando a administração de quilomícrons demonstraram aumento na remoção de triglicérido plasmático em indivíduos hipertireoideos, enquanto indivíduos hipotireoideos apresentam retardo nesta remoção (Nikkilä & Kekki, 1972).

As ações hipotrigliceridêmicas dos hormônios tireoideanos envolvem ainda aumento na captação destes lipídeos por estímulo de lipases. O tratamento com T<sub>4</sub> em indivíduos hipotireoideos provocou aumento na atividade da lipase hepática, sem alterar a lipase lipoprotéica (LPL). Estes dados justificam a redução observada na concentração de triglicédeos nas lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e de densidade intermediária (*Intermediary density lipoprotein* – IDL), mas não na VLDL durante a terapia de reposição (Packard e cols., 1993).

Os hormônios tireoideanos limitam a saída do triglicérido recém sintetizado do hepatócito devido ao aumento da hidrólise intra-hepática deste a AG e glicerol, por estímulo da lipase lisossomal. Estes hormônios promovem ainda aumento da oxidação de AG por estimular o transporte destes para a mitocôndria, através da ação sobre a enzima carnitina acil transferase I. (Müller & Seitz, 1984). Além destes mecanismos que contrabalançarão o aumento da síntese de triglicédeos hepáticos, existem mecanismos periféricos para aumentar o *clearance* destes lipídeos (Packard e cols., 1993). Este conjunto de ações favorece a redução no conteúdo de triglicérido plasmático.

Outros mecanismos de redução do triglicérido sérico envolvem a modulação de apoproteínas (Apo). A Apo A5 é um dos principais determinantes do triglicérido sérico por inibir a produção de VLDL e estimular sua hidrólise mediada por lipases. A Apo A5 é estimulada por T<sub>3</sub> ou agonista de TR $\beta$  *in vitro* (hepatócitos humanos e de roedores) e *in vivo* (ratos) (Prieur e cols., 2005). Os autores, além de identificarem a correlação positiva entre o estado tireoideano e a expressão de Apo A5, identificaram um TRE funcional na região promotora do gene, pelo qual o hormônio tireoideano modula sua expressão.

As alterações nas concentrações séricas de triglicédeos em indivíduos e animais hipotireoideos não são tão evidentes quanto o aumento no colesterol sérico, podendo o

triglicerídeo sérico no hipotireoidismo apresentar-se semelhante (Abrams e cols., 1981), maior (Al-Tonsi e cols., 2004) ou até mesmo menor do que no estado eutireoideo (Franco e cols., 2003). Em revisão da literatura, Danese e cols. (2000) relataram que trabalhos avaliando as alterações lipídicas em pacientes com hipotireoidismo subclínico demonstram redução nas concentrações séricas de colesterol total e LDL colesterol após o tratamento com T<sub>4</sub>. No entanto, os efeitos do tratamento sobre a concentração sérica de triglicerídeos e lipoproteína de alta densidade (*High density lipoprotein* – HDL) colesterol foram variáveis, não apresentando significância estatística. Nikkilä & Kekki (1972) confirmam esta variabilidade de perfis, demonstrando que tanto pacientes hipo- quanto hipertireoideos apresentaram um leve aumento na concentração sérica de triglicerídeos, quando comparados ao indivíduo eutireoideo.

Os hormônios tireoideanos podem influenciar o metabolismo de colesterol em diversas etapas críticas envolvidas na sua síntese, captação e metabolização. Estas ações envolvem estímulo da enzima 3-hidroxi-3-metil glutaril Coenzima A (HMG CoA) redutase e da farnesil pirofosfato sintetase (Ness e cols., 1990), aumentando sua síntese; estímulo do receptor de LDL (Shin & Osborne, 2003; Lopez e cols., 2007), favorecendo sua captação da circulação; e estímulo da enzima colesterol 7 $\alpha$ - hidroxilase (CYP7A1) (Ness e cols., 1990), aumentando sua metabolização a ácidos biliares. Desta forma, apesar da reduzida síntese endógena de colesterol, o indivíduo hipotireoideo apresenta aumento na concentração sérica de LDL e colesterol devido a concomitante redução no catabolismo da LDL e excreção de colesterol pela bile.

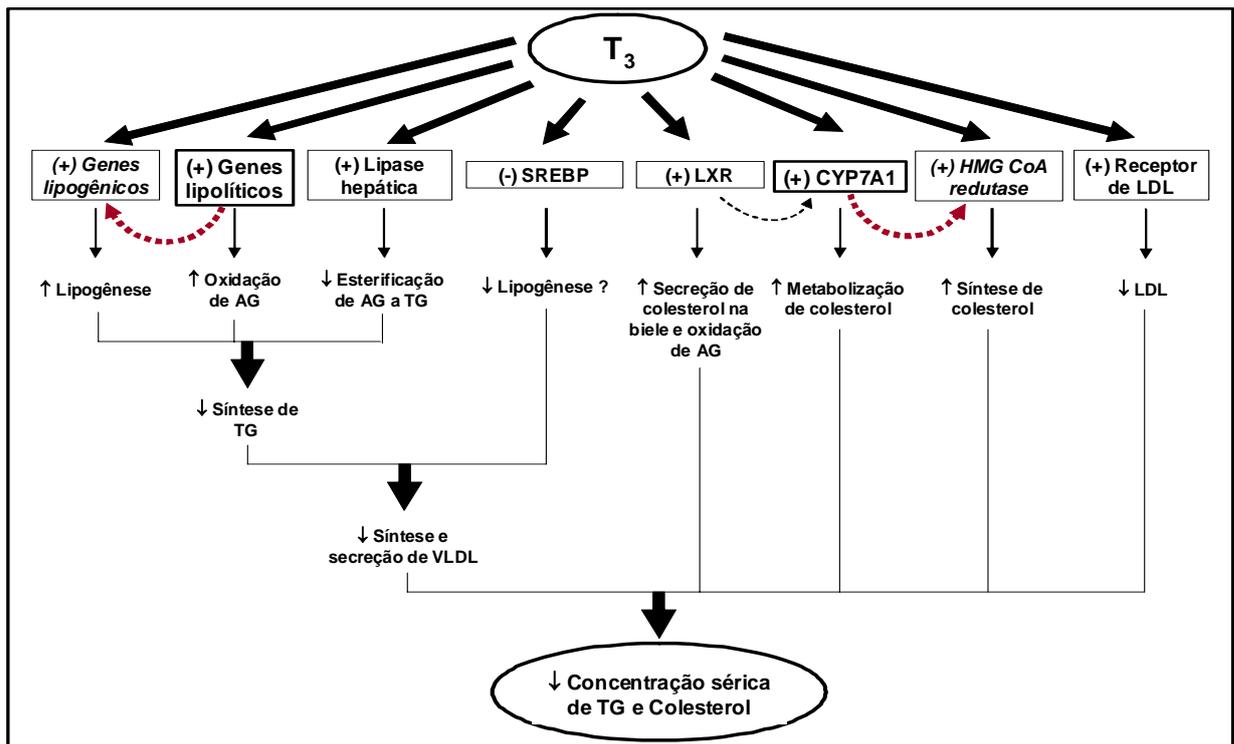
O receptor de LDL permite a captação das LDL e VLDL remanescentes, promovendo a endocitose destas lipoproteínas com conseqüente fusão com lisossomos. Desta forma, há a liberação do colesterol no hepatócito que é direcionado para a incorporação na membrana ou esterificação (Nelson & Cox, 2006). O rápido e intenso aumento (5 vezes) da atividade deste receptor, promovido pela administração de hormônio tireoideano em animais hipotireoideos (Lopez e cols., 2007), favorece a redução na concentração sérica de colesterol total e LDL. Apesar de alguns autores afirmarem que o efeito dos hormônios

tireoideanos sobre o receptor de LDL seria indireto, mediado pelo aumento do fator de transcrição *Sterol regulatory element binding protein-2* (SREBP-2) (Shin & Osborne, 2003), foi demonstrada a presença de um TRE funcional na região promotora do gene, cuja mutação abole o efeito estimulatório de  $T_3$ , evidenciando uma ação direta deste hormônio sobre este gene alvo (Lopez e cols., 2007).

Em roedores, a atividade (Gullberg e cols., 2002) e expressão do RNAm (Ness e cols., 1990) da CYP7A1 é positivamente modulada por hormônio tireoideano. Gullberg e cols. (2002) observaram uma redução na atividade desta enzima em resposta à indução do hipotireoidismo, com subsequente aumento de sua atividade após administração de  $T_3$ . Estas alterações são determinantes para a metabolização do colesterol hepático, justificando em parte o aumento e redução, respectivamente, no colesterol sérico neste modelo experimental. Entretanto, em humanos, a CYP7A1 é regulada negativamente por hormônios tireoideanos. Camundongos transgênicos expressando o gene da CYP7A1 humano apresentaram redução na expressão da CYP7A1 após indução do hipertireoidismo (Drover & Agellon, 2004).

Como já mencionado anteriormente, outros mecanismos hipolipemiantes dos hormônios tireoideanos envolvem a modulação de fatores transcricionais essenciais no controle do metabolismo lipídico. Entre estes o receptor nuclear *Liver X Receptor* (LXR) e o fator de transcrição SREBP. Os hormônios tireoideanos são capazes de modular positivamente a expressão do LXR $\alpha$  em roedores e humanos, contribuindo para suas ações sobre o metabolismo de colesterol (Hashimoto e cols., 2007). Quanto ao SREBP 1-c, fator envolvido na indução da transcrição de genes lipogênicos, tanto em camundongos como em humanos, o hormônio tireoideano demonstrou uma modulação negativa (Hashimoto e cols., 2006a). Estes trabalhos demonstram que além da modulação direta sobre enzimas importantes no metabolismo lipídico, os hormônios tireoideanos agem também por mecanismo indiretos, modulando fatores transcricionais essenciais no controle do metabolismo lipídico, contribuindo para sua ação hipolipemiante (Figura 4).

Desta forma, o indivíduo hipotireoideo apresenta clearance reduzido de LDL, menor conversão de colesterol a ácido biliar, menor excreção de colesterol na bile e, provavelmente, uma maior reabsorção de ácidos biliares. Estes mecanismos justificam as concentrações séricas aumentadas de colesterol total e LDL observadas em indivíduos e animais hipotireoideos (Müller & Seitz, 1984).



**Figura 4 – Representação esquemática dos mecanismos dos hormônios tireoideanos sobre o metabolismo lipídico envolvidos nos seus efeitos hipolipemiantes.** As setas pontilhadas em vinho representam a preponderância de um efeito (texto em negrito) sobre o outro (texto em itálico). Legenda: AG – ácido graxo; TG – triglicerídeos; LDL - *Low density lipoprotein*; VLDL – *Very low density lipoprotein*; LXR – *Liver X receptor*. SREBP – *Sterol regulatory element binding protein*; HMG CoA redutase - 3-hidroxi-3-metil glutaril Coenzima A redutase

Os efeitos dos hormônios tireoideanos sobre o metabolismo lipídico estão bastante associados aos receptores do tipo beta (TR $\beta$ ), isoforma predominante no fígado, como demonstrado por trabalhos que utilizam agonistas seletivos. O agonista beta seletivo GC-1 demonstrou capacidade de reduzir as concentrações séricas de colesterol total e de triglicerídeos em camundongos eutireoideos alimentados com dieta padrão ou dieta hipercolesterolêmica (Johansson e cols., 2005). Neste mesmo trabalho, os autores sugerem

a capacidade deste agonista em estimular passos importantes na degradação de colesterol, como a metabolização a ácido biliar por ação estimulatória da CYP7A1. Em revisão, Baxter e cols. (2004) relatam que, também em primatas, o GC-1 reduz o colesterol circulante em aproximadamente 40%. Redução na concentração sérica de triglicerídeos, lipoproteína A e peso corporal também são descritas pelos autores.

Em trabalho recente, o mesmo grupo descreveu os efeitos de outro agonista seletivo de TR $\beta$ , o KB2115, sobre o metabolismo de colesterol em indivíduos com elevação moderada de peso e de colesterol sérico. A administração diária do tiromimético durante duas semanas em ensaio randomizado duplo-cego controlado por placebo, reduziu LDL (40%), colesterol total e apoproteína B, sem alterar o triglicerídeo sérico (Berkenstam e cols., 2008).

O envolvimento do TR $\beta$ 1 no metabolismo de colesterol é evidenciado em animais transgênicos, com deleção ou alteração da funcionalidade deste receptor. Modelos de animais *knockout* para TRs não alteram a concentração sérica de colesterol no estado basal ou em resposta à privação de T<sub>3</sub> ou a dieta rica em colesterol. Além disto, apresentam resistência ao efeito hipocolesterolêmico do hormônio tireoideano. Nem mesmo a superexpressão do TR $\alpha$ 1 na ausência da isoforma beta é capaz de reduzir a concentração sérica de colesterol e aumentar a atividade da CYP7A1 sob estímulo de T<sub>3</sub> (Gullberg e cols., 2000; Gullberg e cols., 2002). Estes dados demonstram a importância do TR $\beta$  mediando as ações hipocolesterolêmicas de T<sub>3</sub>, e sugerem a incapacidade da isoforma alfa em compensar sua ausência.

Animais apresentando mutação que torna o TR $\beta$  incapaz de se ligar ao hormônio tireoideano (TR $\beta$   $\Delta$ 337), caracterizando um modelo de resistência a hormônio tireoideano, também possuem alterações no metabolismo de colesterol. Este modelo animal revelou novos aspectos da ação do TR $\beta$  no metabolismo do colesterol. Paradoxalmente, os animais mutantes tornados hipotireoideos apresentaram redução na concentração sérica de colesterol em resposta a dieta rica em colesterol (Hashimoto e cols., 2006b). Os autores

descrevem ainda que os mecanismos moleculares parecem envolver a redução da capacidade de competição do TR $\beta$  mutante com o LXR em se ligar ao elemento responsivo deste, favorecendo a ação do LXR, o que explicaria a menor concentração do colesterol sérico. Os autores demonstraram que o TR $\beta$  normal não ligado ao T<sub>3</sub>, como ocorre no hipotireoidismo, inibe a atividade transcricional estimulatória do LXR $\alpha$  no promotor da CYP7A1. Os resultados sugerem *crosstalk* entre o TR $\beta$  e LXR $\alpha$ , importante receptor nuclear envolvido na modulação do metabolismo de colesterol.

Estes dados evidenciam o envolvimento dos hormônios tireoideanos com o metabolismo lipídico, em que a disponibilidade e funcionalidade da isoforma TR $\beta$  para mediar as ações destes hormônios são determinantes para seu efeito hipolipemiante.

### 1.1.3 Modulação por fatores dietéticos

A relação dos hormônios tireoideanos com o metabolismo não se restringe apenas a um papel modulador. Esta é uma relação recíproca, onde as concentrações e ação dos hormônios tireoideanos sofrem constante influência do metabolismo energético e de fatores envolvidos neste, como fatores nutricionais.

O estado nutricional é capaz de afetar profundamente as concentrações séricas de hormônios tireoideanos e a função da hipófise, tanto em animais como em humanos. O metabolismo periférico dos hormônios tireoideanos é ajustado à quantidade e qualidade da energia ingerida, sendo desta forma, o jejum, a subnutrição e a supernutrição importantes moduladores das ações dos hormônios tireoideanos (Danforth & Burger, 1989).

No jejum ocorre declínio na concentração sérica de T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> acompanhado por redução na concentração sérica de TSH, sendo este provavelmente um mecanismo de conservação de energia nesta situação (Danforth & Burger, 1989). Desta forma, o clássico *feedback* negativo do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide é paradoxalmente revertido durante o jejum, quando a redução da concentração sérica de hormônios tireoideanos é acompanhada pela

supressão na secreção de TSH e TRH. Os mecanismos provavelmente envolvidos nesta resposta paradoxal envolvem aumento da atividade da D2 hipotalâmica, aumentando a concentração local de  $T_3$ , e desta forma, inibindo a secreção de TRH independente da redução na concentração sérica de  $T_3$  (Coppola e cols., 2005).

Alguns estudos têm demonstrado que outras manipulações na alimentação são capazes de alterar a função tireoideana. Em revisão, Forsythe (1995) relata a capacidade da proteína de soja de aumentar a concentração sérica de  $T_4$  quando comparada à caseína. Xiao e colaboradores (2004) demonstraram que dietas contendo proteína isolada de soja foram capazes de aumentar a expressão do TR $\beta$ 1 no fígado de ratos, apesar de não alterarem as concentrações séricas de  $T_3$  e  $T_4$  desses animais. Os autores acreditam que estas alterações nas ações dos hormônios tireoideanos podem estar envolvidas nos efeitos no metabolismo lipídico promovidos pela proteína de soja (Forsythe, 1995).

Outros fatores dietéticos que têm demonstrado capacidade de exercer efeitos sobre a função tireoideana são os lipídeos. Dietas hiperlipídicas, do tipo cafeteria, nas quais os lipídeos representam 60% das calorias da dieta, diminuíram a capacidade de ligação do TR $\alpha$ 1 e do TR $\beta$ 1 no fígado, e a expressão do seu RNAm no fígado e no tecido adiposo de ratos (Redonnet e cols., 2001), sugerindo menor ação dos hormônios tireoideanos nestes tecidos. Neste trabalho, o maior percentual de AG ofertados era na forma saturada.

A ampla e potente influência dos hormônios tireoideanos sobre o metabolismo energético, modulando vias de síntese e oxidação de substratos energéticos, como os lipídeos, caracterizam este hormônio como um alvo suscetível às alterações nutricionais, seja pela quantidade ou pela qualidade da energia ofertada. Estas alterações na ação dos hormônios tireoideanos seriam requeridas para promover as adaptações metabólicas necessárias para o estado ou fator nutricional em questão.

## 1.2 Ácidos graxos poliinsaturados (AGPI)

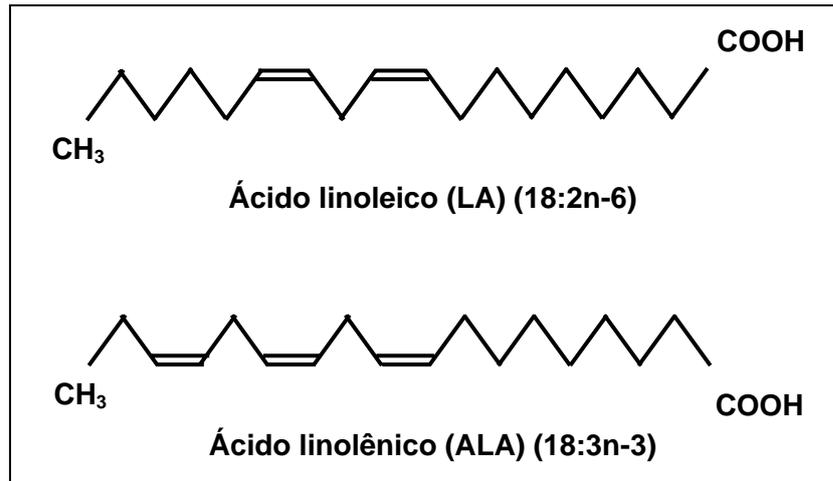
### 1.2.1 – Classificação, síntese e efeitos gerais

Os lipídeos têm demonstrado a capacidade de influenciar diversos processos biológicos, como a composição de membranas celulares, sinalização celular, metabolismo energético e expressão gênica (Jump e cols., 2008). Esta capacidade é influenciada pelas características dos AG que os compõem (El-Badry e cols., 2007), sendo a classe de AGPI a mais potente.

Os AG são classificados de acordo com o número de ligações duplas entre os carbonos (insaturações), classificando-se em saturado (ausência), monoinsaturado (apenas uma) ou poliinsaturado (mais do que uma), e de acordo com a posição da primeira insaturação, classificando-se em AG da série n-3, 6 ou 9 (Voet & Voet, 1995; Nelson & Cox, 2006).

A representação adotada para classificação de AG permite a visualização de todos estes parâmetros, na qual é citada o número de carbonos que compõem a cadeia, seguida do número de insaturações, separados por dois pontos. O número do carbono que contém a primeira insaturação, contada a partir do grupamento metila terminal, é representado em seguida, precedido pela letra n, que substituiu a grafia anterior que usava a letra grega  $\omega$  (ômega) (Ruxton e cols., 2007). Por exemplo, o ácido linolênico, AGPI n-3 contendo 18 átomos de carbono e 3 insaturações é representado como 18:3n-3.

Diferentemente das outras categorias de AG, os AGPI n-3 e 6 não podem ser sintetizados em mamíferos a partir de acetil CoA, devido à ausência de enzimas capazes de catalisar estas reações. Para isto, mamíferos precisam consumir os precursores de AGPI: o ácido linoleico (18:2n-6) e o ácido linolênico (18:3n-3) (Nakamura & Nara, 2003) (Figura 5), cuja limitação de síntese em mamíferos garante-lhes a denominação “ácidos graxos essenciais”. Sua essencialidade é demonstrada em casos de deficiência, quando se observa retardo no crescimento e alterações neurológicas (Russo, 2008).



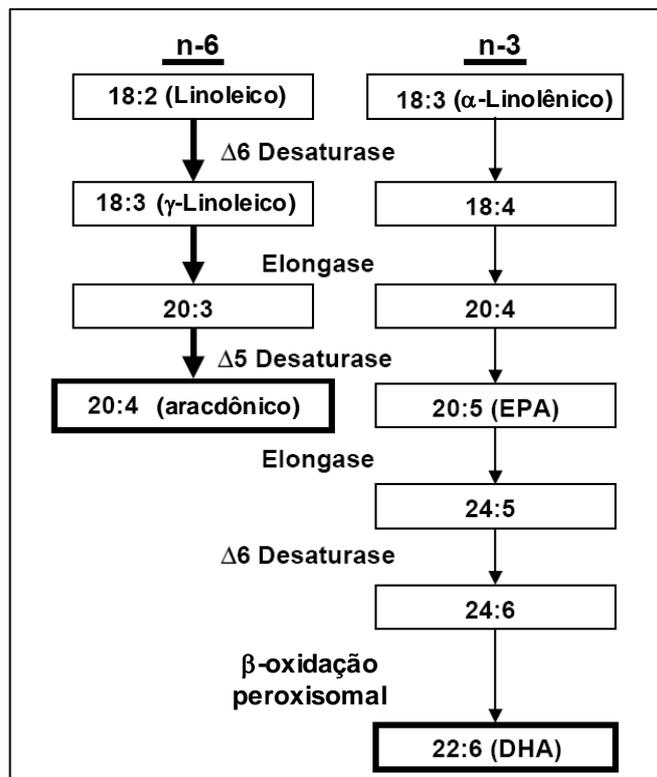
**Figura 5 – Estrutura química dos ácidos graxos essenciais: ácido linoleico e linolênico.** Observa-se a presença da primeira insaturação no carbono 6 e 3, respectivamente, contados a partir do grupamento metil.

Estes ácidos graxos essenciais podem ser desaturados e alongados dando origem a AGPI de cadeia longa, pertencentes à mesma família de seu precursor. Essas duas classes de ácidos graxos essenciais (n-3 e n-6) não podem ser interconvertidas e possuem funções e metabolismo distintos, apresentando freqüentemente importantes funções fisiológicas opostas (Simopoulos, 2002).

Os óleos vegetais de soja, milho ou girassol constituem importante fonte de AGPI n-6 (linoleico), enquanto o óleo de canola e o óleo de semente de linhaça constituem importante fonte de AGPI n-3 (linolênico) (Russo, 2008). Sob ação de enzimas desaturases e elongases, estes AG obtidos pela dieta são convertidos em AGPI de cadeia longa, como o ácido aracdônico (20:4 n-6), proveniente do ácido linoleico (18:2 n-6), e o ácido docosahexanóico (DHA) (22:6 n-3), proveniente do ácido linolênico (18:3 n-3), que parecem ter ações metabólicas mais potentes (El-Badry e cols., 2007) (Figura 6). Entretanto, como esta última conversão não parece ser tão eficiente, o consumo de alimentos marinhos é recomendado, constituindo importante fonte de DHA e ácido eicosapentanóico (EPA) (20:5 n-3) (Ruxton e cols., 2007) (Figura 7).

As enzimas desaturases e elongases que constituem a via de síntese de AGPI são comuns às famílias n-3 e n-6 (Spector, 1999). Essas enzimas possuem maior afinidade

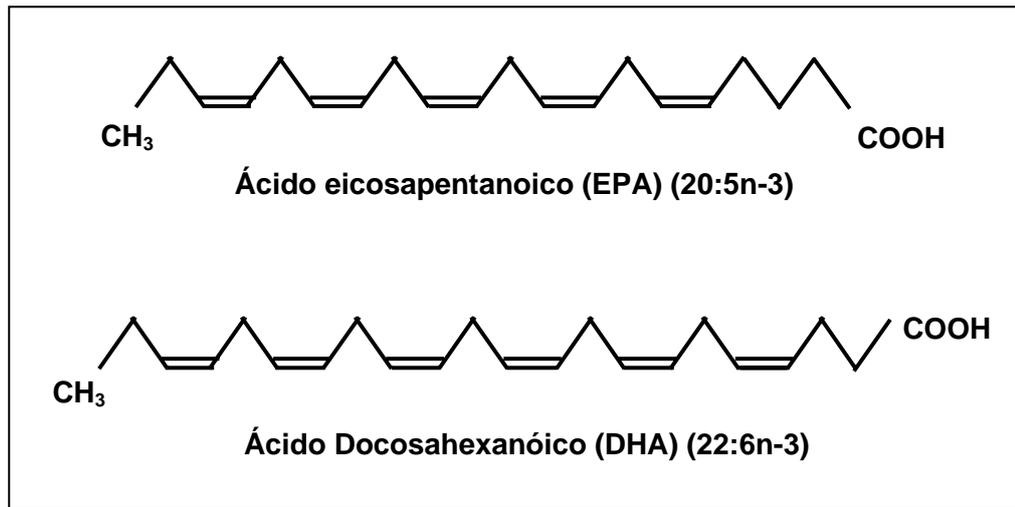
pelos AGPI n-3, entretanto, uma maior disponibilidade dos AGPI n-6 favorece sua metabolização (Ruxton e cols., 2007). A disponibilidade destes AG na razão n-3/n-6 de 1:1-4 mantém ainda o favorecimento da via de síntese da família n-3 (El-Badry e cols., 2007). Entretanto, o alto consumo de grãos e cereais proporcionado pela dieta ocidental, favorece a uma razão n-3/n-6 de 1:15-20 (Spector, 1999).



**Figura 6 – Síntese de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa da série n-3 (EPA - ácido eicosapentanoico e DHA - ácido docosahexanóico) e n-6 (ácido aracdônico) a partir dos ácidos graxos essenciais linoleico e linolênico. A síntese é mediada por ação de enzimas desaturases e enlogases comuns às duas famílias. Adaptado de Nakamura e Nara, 2003.**

A elevação nesta razão tem sido associada a danos na saúde, estando envolvida em doenças cardiovasculares, câncer e doenças inflamatórias e auto-imunes (Simopoulos, 2002; Russo, 2008). Este quadro pode ser justificado pelo aumento na síntese de eicosanóides a partir de AGPI n-6, favorecendo a síntese de prostaglandinas pró-inflamatórias, pró-trombóticas e vasoconstritoras, ao contrário da ação dos AGPI n-3 que

favorecem propriedades opostas (El-Badry e cols., 2007). Desta forma, considerando-se as ações opostas das duas famílias quanto à síntese de eicosanóides, observa-se a necessidade de um consumo proporcional destas categorias de AG, mantendo uma razão n-3/n-6 de 1:1-4.



**Figura 7 – Estrutura química dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa da série n-3 presentes no óleo de peixe: ácido eicosapentanoico (EPA) e docosahehexanóico (DHA).**

Os AGPI possuem a capacidade de alterar a composição da membrana e sua fluidez, de agir como moléculas sinalizadoras, de modular a síntese e ação de eicosanóides e de controlar a transcrição gênica. Apesar de grande parte destes efeitos ser comum aos AGPI n-6 e n-3, os AGPI n-3 têm se destacado por seu envolvimento benéfico em diversos processos fisiológicos. Estes têm demonstrado ações em funções cognitivas e acuidade visual, ações imunossupressivas, antiinflamatórias e antitrombóticas, bem como efeitos sobre o metabolismo lipídico e glicídico (Jump, 2002).

Em revisão avaliando os efeitos benéficos dos AGPI n-3, Ruxton e cols. (2007) relataram estudos epidemiológicos e ensaios clínicos que demonstram melhora de parâmetros cardiovasculares, atenuação dos sintomas de artrite reumatóide e correlação negativa com desordens neurológicas, como doenças de Alzheimer e depressão. Os efeitos

benéficos destes AG sobre o sistema cardiovascular devem-se principalmente à sua potente ação sobre o metabolismo lipídico. Entretanto, muitas dessas ações são promovidas pelos AGPI de cadeia longa derivados de ácidos graxos essenciais, como o DHA e o EPA, dos quais o óleo de peixe representa importante fonte.

### *1.2.2 Efeitos dos AGPI n-3 sobre metabolismo lipídico e mecanismos de ação*

O óleo de peixe e seus componentes ativos passaram a ser importante foco de pesquisa após a realização de estudos epidemiológicos em torno de 1970 que revelaram baixa prevalência de doenças cardiovasculares entre esquimós que viviam na Groenlândia (Bang & Dyerberg, 1972). Características do modo de vida daquela população foram investigadas, concluindo-se que seus hábitos alimentares eram determinantes para o perfil observado. A alimentação dos esquimós da Groenlândia é composta por consumo abundante de alimentos marinhos, ricos em AGPI n-3, associada a menor ingestão de AGPI n-6 e AG saturados quando comparados aos esquimós dinamarqueses (Bang e cols., 1980).

O conteúdo de AG plasmáticos dos esquimós refletiu a composição de lipídeos presentes em sua dieta, apresentando menor concentração de AGPI n-6 e concentração até sete vezes maior de AGPI n-3, quando comparados aos esquimós residentes da Dinamarca. Associado às alterações de AG plasmáticos, observou-se alteração do perfil lipídico (menor concentração sérica de triglicerídeos, colesterol total e em frações, como LDL e VLDL) com concomitante aumento do HDL, sendo este quadro associado a menor risco de doenças cardiovasculares (Bang & Dyerberg, 1972).

A partir deste momento, diversos estudos utilizando manipulações dietéticas que enriquecem a alimentação com estes AGPI n-3 passaram a ser realizados em animais e humanos. Os estudos relatam que os mecanismos envolvidos na prevenção de doenças cardiovasculares envolvem efeitos vasculares, como na agregação plaquetária e em fatores trombolíticos, assim como efeitos no metabolismo lipídico (Herold & Kinsella, 1986).

Em revisão da literatura, Herold & Kinsella (1986) relatam a utilização de diversas fontes desses AGPI n-3, como a gordura e o óleo de peixes, dentre os quais sardinha, bacalhau, tubarão e outros, ou AGPI n-3 purificados, como o EPA e DHA, na tentativa de elucidar os mecanismos responsáveis pelo efeito hipolipidêmico. Os desenhos experimentais com animais envolvem administração oral por sonda intragástrica, infusão intravenosa e manipulações dietéticas, suplementando ou substituindo, completamente ou parcialmente, os lipídeos dietéticos por fonte de AGPI n-3. Já os estudos em humanos utilizam manipulações aumentando o consumo de peixes na dieta, ou suplementação com óleos de peixe ou seus componentes purificados.

Considerando-se que o fígado é o órgão central no controle do metabolismo lipídico, este tecido é o principal alvo da ação dos AGPI.

Em ratos, os efeitos dos AGPI n-3 presentes no óleo de peixe sobre o metabolismo lipídico, reduzindo a lipídemia e percentual de gordura corporal, têm se mostrado tempo dependente (Willumsen e cols., 1993) e dose-dependente (Nakatani e cols., 2003). A administração oral de uma única dose diária de EPA, AGPI de cadeia longa presente no óleo de peixe, provocou redução de 50-60% no triglicerídeo sérico e 30-50% no colesterol total. Este efeito sobre a concentração de triglicerídeos já foi observado após o primeiro dia de tratamento, enquanto o efeito sobre colesterol total foi mais tardio, aparecendo após o quinto dia de tratamento (Willumsen e cols., 1993).

Os efeitos do óleo de peixe não são observados apenas em modelos de administração oral do composto purificado. Modelos utilizando o óleo de peixe associado à dieta de animais também têm demonstrado resultados. A oferta de dieta hiperlipídica a camundongos contendo óleo de girassol (AGPI n-6) e óleo de peixe (AGPI n-3) em concentrações crescentes (0 a 60%) durante 13 semanas promoveu redução dose-dependente no ganho de massa de tecido adiposo branco e no ganho de percentual de gordura corporal, assim como menor ganho de peso corporal, no grupo tratado com maior percentual de óleo de peixe (Nakatani e cols., 2003). Estes dados demonstram que os efeitos observados seriam

decorrentes da presença da primeira insaturação no carbono 3 (AGPI n-3) e não apenas do grau de insaturação.

Além da importância da posição da primeira insaturação, o tamanho da cadeia também parece ser determinante para a eficiência do efeito. A oferta de dieta hiperlipídica contendo óleo de girassol (AGPI n-6 contendo 18 carbonos) ou óleo de linhaça (AGPI n-3 contendo 18 carbonos) ou óleo de peixe (AGPI n-3 contendo 20 e 22 carbonos) reduziu a concentração de triglicerídeo sérico em todos os grupos quando comparados a uma dieta normolipídica. No entanto, o maior percentual de redução foi apresentado pela dieta contendo óleo de peixe, representando redução de 85% em comparação a dieta normolipídica, contra redução de aproximadamente 63% nos outros grupos (Rustan e cols., 1992). Estes dados sugerem que apesar do AGPI apresentarem a capacidade de modular o metabolismo lipídico, a maior potencialidade de modulação destes efeitos pertence aos AGPI n-3 com mais de 20 carbonos, como o EPA e DHA.

Diversos modelos de obesidade e de intolerância a glicose também têm demonstrado a eficiência dos AGPI n-3 presentes no óleo de peixe. Os efeitos gerados por dieta rica em gordura saturada sobre o índice de gordura corporal foram revertidos em camundongos que consumiram tal dieta contendo substituição parcial dos lipídeos por óleo de peixe (Wang e cols., 2002). Mesmo efeitos decorrentes de um tratamento mais prolongado, têm sido abolidos em curto período de tempo como demonstrado por Rossi e cols. (2005). Os autores induziram obesidade e aumento da concentração sérica e hepática de triglicerídeos utilizando dieta rica em sacarose durante sete meses. A substituição parcial do lipídeo dietético desta dieta por óleo de peixe durante dois meses foi capaz de reverter o aumento do triglicerídeo, normalizando-o para as concentrações do animal controle, cuja dieta continha amido de milho ao invés de sacarose. O óleo de peixe atenuou ainda o ganho de peso, a massa de tecido adiposo e o percentual de gordura desses animais, assim como aboliu a redução da concentração sérica de leptina e adiponectina, hormônios secretados pelo tecido adiposo, gerada pela dieta rica em sacarose (Rossi e cols., 2005).

Wyrwoll e cols. (2006) relataram que mesmo modelos de programação metabólica podem demonstrar os efeitos benéficos dos AGPI n-3 presentes no óleo de peixe. A administração de dieta normolipídica com substituição parcial dos lipídeos por AGPI n-3 a partir da gestação até o sacrifício foi capaz de reverter a hiperleptinemia e hipertensão na vida adulta ocasionadas pela administração de dexametasona durante a gestação.

Uma diversidade de mecanismos envolvidos nos efeitos do óleo de peixe sobre perfil lipídico e adiposidade em animais já foram descritos. Al-Hasani & Joost (2005) em revisão evidenciam que os AGPI n-3 presentes no óleo de peixe, basicamente atuam aumentando  $\beta$ -oxidação e reduzindo lipogênese, gerando desta forma o fenótipo característico da dieta. Esta ação poderia ser dada pela capacidade do lipídeo dietético em afetar a sinalização celular e a expressão de genes através da influência sobre a composição de fosfolipídeos da membrana ou através da produção de eicosanóides. No entanto, a descoberta da capacidade dos AG de interagir com alguns receptores nucleares, estabeleceu um papel direto dos AG na regulação da transcrição gênica (Sampath & Ntambi, 2005).

Os AGPI têm demonstrado a capacidade de afetar a expressão de diversos genes envolvidos no metabolismo lipídico através da interação com e/ou modulação de diferentes receptores nucleares, como *Peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR) e *Liver X receptor* (LXR), e modulação de fatores de transcrição, como *Sterol receptor element binding protein* (SREBP), *Hepatocyte nuclear factor-4 alpha* (HNF-4 $\alpha$ ) e *Carbohydrate regulatory element binding protein* (ChREBP) (Sampath & Ntambi, 2005; Jump, 2008).

A ação destes AG modulando fatores transcricionais envolve dois mecanismos gerais. No primeiro, os AGPI comportam-se como ligantes dos receptores nucleares, ativando ou inibindo genes alvos deste receptor (Jump, 2008). Um segundo mecanismo no que se refere à modulação dos fatores de transcrição, os AGPI controlam sua disponibilidade no núcleo por mecanismos menos claros, mas que parecem envolver, entre outros, mudanças no perfil de fosforilação, alterando sua atividade (Jump, 2008).

Os PPAR são receptores nucleares envolvidos na regulação transcricional do metabolismo lipídico e balanço energético. São descritas três isoformas: PPAR $\alpha$ , expressa

de forma importante no fígado tendo ação determinante na oxidação de AG; PPAR $\gamma$ , altamente expresso no tecido adiposo tendo ação importante na homeostase glicêmica e na adipogênese; e PPAR $\delta$ , expresso de forma ubíqua, o que sugere envolvimento em funções celulares básicas (Ahmed e cols., 2007). Os AGPI constituem a primeira classe de lipídeo dietético que demonstrou capacidade de ativar diretamente o PPAR $\alpha$  *in vivo*, atuando como um ligante endógeno desta isoforma bastante expressa no fígado, envolvida na regulação do metabolismo lipídico e glicídico (Al-Hasani & Joost, 2005). Esta interação desencadeia alteração da transcrição gênica, modulando a expressão de diversas enzimas envolvidas no metabolismo lipídico, como a acil-CoA sintetase e Carnitina palmitoil transferase 1 (Sampath & Ntambi, 2005).

PPARs possuem a capacidade de se ligar a AG com diferentes graus de afinidade, dependendo do tamanho da cadeia e do seu grau de insaturação, tendo maior afinidade por AG insaturados de cadeia longa (Bordoni e cols., 2006). Tanto os AGPI n-3 quanto os n-6 ativam as três isoformas de PPAR, entretanto, o EPA, AGPI n-3, comporta-se como o mais potente ativador do PPAR $\alpha$  em cultura primária de hepatócitos, quando comparado ao ácido aracdônico (AGPI n-6) (Sampath & Ntambi, 2005). Já o DHA é um fraco ativador do PPAR quando comparado ao EPA, entretanto, no meio intracelular, uma porção do DHA é convertido em EPA, intensificando sua ação como agonista de PPAR (Jump e cols., 2008). Mesmo em experimentos *in vivo*, os AGPI n-3 demonstraram ser agonistas mais potentes de PPAR do que os AGPI n-6 (Clarke, 2001), justificando, em parte, sua maior capacidade de reduzir a concentração sérica de triglicérides e colesterol (Rustan e cols., 1992; Nakatani e cols., 2003).

Os ligantes endógenos de PPAR, os AG não esterificados presentes no meio intracelular, normalmente são mantidos em baixas concentrações neste compartimento representando apenas 0,1% do conteúdo total de lipídeo celular. A adição de AG mais abundantes neste *pool*, como o ácido oleico (18:1 n-9), gera poucas alterações na concentração AG não esterificados, sendo incapaz de ativar o PPAR. Entretanto, a adição

de AG que representam menor percentual neste *pool*, como o EPA (20:5 n-3), gera alteração na concentração de AG não esterificados no meio intracelular, levando à ativação da regulação transcricional mediada por PPAR (Jump, 2008).

Através deste mecanismo de estímulo de PPAR $\alpha$ , os AGPI promovem o aumento da expressão e atividade de enzimas limitantes para a oxidação lipídica, como a Acil-CoA sintetase e a carnitina palmitoil transferase, direcionando os AG presentes no meio intracelular para a utilização como combustível energético e não para a síntese de triglicerídeos através da reesterificação.

A dependência do PPAR mediando alguns efeitos dos AGPI n-3 torna-se evidente em modelo de animais com deleção do PPAR $\alpha$ . A indução por dieta suplementada com óleo de peixe da expressão do RNAm da citocromo P450 A2, é abolida nos animais com ausência do PPAR $\alpha$  (Ren e cols., 1997; Pan e cols., 2000), assim como a indução da Acil-coA oxidase (enzima limitante para a oxidação de AG) (Ren e cols., 1997) demonstrando que o efeito do AGPI sobre estes genes é mediado por PPAR.

As ações do óleo de peixe não parecem restringir-se apenas ao PPAR $\alpha$ , contemplam também outras isoformas desse receptor. Neschen e cols. (2006) descreveram a dependência do PPAR $\gamma$  e não do PPAR $\alpha$ , no aumento da secreção de adiponectina pelo tecido adiposo desencadeado por dieta contendo óleo de peixe. Enquanto tal estímulo foi mantido em animais sem o PPAR $\alpha$ , o efeito foi abolido em modelo utilizando antagonista de PPAR $\gamma$ . Assim, as ações sobre o metabolismo lipídico são coordenadas pelo PPAR $\alpha$  no tecido hepático, no entanto, outras isoformas mais expressas em outros tecidos, como o PPAR $\gamma$  no tecido adiposo, sofrem também influência dos AGPI, participando de outros efeitos do óleo de peixe, como o aumento da sensibilidade à insulina (Rossi e cols., 2005; Lombardo & Chicco, 2006).

Enquanto os efeitos sobre estímulo de oxidação parecem ser dependentes de PPAR, os efeitos de supressão de lipogênese dos AGPI são independentes da funcionalidade deste receptor nuclear. Animais com deleção do PPAR $\alpha$  apresentaram redução semelhante a do

animal selvagem no RNAm hepático da L-piruvato quinase (Pan e cols., 2000) e da proteína S14 (Ren e cols., 1997) em resposta à administração de óleo de peixe, sugerindo que a regulação negativa dos AGPI sobre estes genes lipogênicos independem de interação com PPAR $\alpha$ .

Os AGPI n-3 têm demonstrado a capacidade de reprimir genes lipogênicos como ácido graxo sintase, proteína de ligação ao lipídeo do adipócito (aP2), acetil-CoA carboxilase e spot 14 (Al-Hasani & Joost, 2005). Estes efeitos do óleo de peixe sobre a lipogênese parecem envolver modulação de fatores transcricionais como SREBP-1 e ChREBP e, segundo alguns autores, o LXR e o *Farnesoid X receptor* (FXR).

Os SREBP são fatores transcricionais envolvidos na modulação de genes lipogênicos. A isoforma SREBP-1 controla vias de síntese de AG e VLDL, enquanto a isoforma SREBP-2 modula a síntese e captação de colesterol. A ação supressora dos AGPI é restrita à isoforma SREBP-1 e é desencadeada de forma mais potente pelo DHA (22:6 n-3), justificando suas ações sobre redução de lipogênese (Jump, 2008).

Para a execução de seus efeitos, os SREBP maduros, após o processo de clivagem no complexo de Golgi, migram para o núcleo como dímeros onde se ligam ao elemento regulatório de esterol (SRE) na região promotora do gene, recrutando co-ativadores (Jump e cols., 2008). Os AGPI atuam reduzindo sua abundância nuclear por mecanismos de redução da isoforma madura e de aumento de degradação (Kim e cols., 1999).

Kim e cols. (1999) demonstraram que a administração de dieta hiperlipídica contendo óleo de peixe durante 5 meses reduziu o precursor e a isoforma madura de SREBP-1 (90 e 57%, respectivamente), sem alterar as outras isoformas. Esta dieta desencadeou ainda redução nos genes alvos de SREBP-1 como o receptor de LDL, HMG-CoA redutase e sintase, ácido graxo sintase e acetil Co-A carboxilase.

A dependência dos SREBP para que os AGPI exerçam seus efeitos inibitórios sobre genes lipogênicos foi demonstrada em animais mutantes que superexpressam a forma madura do SREBP-1. Yahagi e cols. (1999) demonstraram que a administração de dieta rica em óleo de peixe (20%) a este modelo não surtiu o efeito inibitório, observado em animais

selvagens, sobre os genes lipogênicos acetil Co-A carboxilase, ácido graxo sintase e enzima málica.

Outro fator de transcrição mediando os efeitos dos AGPI é o ChREBP. Este fator é classicamente estimulado por glicose levando ao aumento da transcrição de enzimas glicolíticas e lipogênicas, como a L-piruvato quinase e a ácido graxo sintase (Jump e cols., 2008). Para promover seus efeitos, após estímulo por glicose, este fator é translocado para o núcleo onde forma heterodímero com o *Max-like factor X* (MLX) e interage com o elemento regulatório na região promotora do gene, aumentando a acetilação de histonas e o recrutamento da RNA polimerase (Jump, 2008).

A superexpressão de ChREBP em hepatócitos abole o efeito inibitório dos AGPI sobre a L-piruvato quinase e parcialmente sobre a ácido graxo sintase, sugerindo o envolvimento deste fator na ação dos AGPI sobre esta enzima. Os AGPI têm demonstrado a capacidade de reduzir a expressão e inibir a translocação de ChREBP para o núcleo, sendo este o mecanismo responsável pela redução no RNAm da L-piruvato quinase (Dentin e cols., 2005). Este efeito é comum aos AGPI n-3 e n-6, mas não aos AG saturados e AG monoinsaturados. Além disto, a disponibilidade do fator com o qual forma heterodímero, MLX, também é inibida por AGPI (Jump e cols., 2008).

O HNF-4 $\alpha$  é um fator nuclear hepático indispensável para a diferenciação e funções hepáticas, como secreção de lipoproteínas e colesterol, e metabolismo de carboidratos e lipídeos (Davidson, 2006). Em concentrações fisiológicas, os AG podem modular a atividade do HNF-4 $\alpha$ . Os efeitos dependem do comprimento da cadeia e do grau de insaturação do AG, prevalecendo efeito estimulatório por AG saturados e efeito inibitório por AGPI (Sampath & Ntambi, 2005). Sua inibição por AGPI parece favorecer o fluxo de glicose a glicogênio, devido à redução na atividade da glicose-6-fosfatase e da L-piruvato quinase, contribuindo para a inibição da lipogênese (Davidson, 2006).

O LXR é um receptor nuclear que modula genes envolvidos na síntese de ácidos biliares e lipídeos, o que o torna candidato a ser um alvo importante de AGPI. Entretanto, seu envolvimento nos efeitos hipolipemiantes do óleo de peixe é contraditório. Enquanto

alguns autores sugerem que os AGPI n-3 antagonizem os efeitos do LXR (Bordoni e cols., 2006), sendo este o mecanismo sugerido para a redução na expressão do SREBP (Nakatani e cols., 2005), outros autores afirmam que em concentrações fisiológicas os AGPI são incapazes de interferir na expressão de genes alvos de LXR (Pawar e cols., 2003; Jump, 2008). Desta forma, apesar da redução na expressão do SREBP em resposta a administração de concentrações fisiológicas de AGPI, alvos importantes do LXR, como a *CYP7A* e *ATP-binding cassette transporter G* (ABCG), permanecem inalterados em modelo *in vivo* (fígado de rato) e *in vitro* (células de hepatoma FTO-2B) (Pawar e cols., 2003). As contradições existentes quanto à importância do LXR para as ações dos AGPI poderiam ser justificadas pelo modelo experimental e pela concentração de AGPI utilizadas.

Os AGPI também têm demonstrado a capacidade de se ligar ao FXR (Zhao e cols., 2004) e ao receptor X de ácido retinóico (RXR) (Lengqvist e cols., 2004). O FXR é um receptor nuclear para ácidos biliares responsável pela modulação de genes envolvidos na homeostase de ácido biliares e colesterol. Os AGPI, diferentemente dos AG saturados, demonstraram a capacidade de se ligar e modular a ação deste receptor. No entanto, a modulação dos AGPI sobre FXR envolve efeitos estimulatórios e inibitórios, dependendo do gene alvo avaliado (Zhao e cols., 2004). Já a ação dos AGPI sobre RXR é mais clara. Os AGPI, especialmente o DHA, se ligam ao RXR ativando-o, mesmo em baixas concentrações (Lengqvist e cols., 2004). No entanto, a contribuição da interação com estes receptores para os efeitos no metabolismo lipídico ainda não são claros.

Portanto, o efeito hipotrigliceridêmico dos AGPI n-3 é dado pela supressão da lipogênese hepática através da inibição do SREBP-1c, estímulo da oxidação de AG pelo fígado e músculo esquelético através da ativação de PPAR e por redução da glicólise através de inibição do HNF-4 $\alpha$  e do ChREBP. Desta forma, com a redução da síntese de triglicerídeos e aumento da oxidação de AG no hepatócito, ocorre redução da disponibilidade de substrato para a síntese e secreção de VLDL (Figura 8).

Associado a redução do principal substrato lipídico para a síntese de VLDL, os AGPI n-3 reduzem o principal substrato protéico, a apolipoproteína B (apo B). A adição de EPA ou



hipocolesterolêmico do óleo de peixe, como a redução na atividade de enzimas limitantes para sua síntese (Al-Shurbaji e cols., 1991), o aumento da sua captação hepática (Spady, 1993) e aumento na secreção de colesterol biliar (Balasubramaniam e cols., 1985; Morgado e cols., 2005).

Animais alimentados com dieta contendo óleo de peixe durante 2 semanas apresentaram redução de 50% na concentração sérica de colesterol associado à redução na expressão (RNAm e proteína) das enzimas HMG-CoA redutase e farnesil difosfato sintase, enzimas limitantes para sua síntese (Le Jossic-Corcós e cols., 2005). No entanto, menor redução no colesterol sérico foi relatada em modelo similar, acompanhada de atividade inalterada destas enzimas (Al-Shurbaji e cols., 1991). Estes dados sugerem que a modulação enzimática contribui para a redução no colesterol plasmático, entretanto, outros mecanismos estão envolvidos neste efeito hipocolesterolêmico.

Os mecanismos envolvidos na redução do colesterol sérico em resposta à administração de AGPI n-3 parecem envolver ainda redução na taxa de formação de LDL (30%) e ativação do receptor hepático de LDL (aproximadamente 65%), aumentando seu *clearance* (Spady, 1993). Entretanto, o efeito hipocolesterolêmico do AGPI n-3 permanece em camundongos *knock-out* para o receptor de LDL, demonstrando que este efeito não depende exclusivamente da modulação deste receptor (Vasandani e cols., 2002). Estes animais apresentaram *clearance* aumentado de LDL associado a sua redução plasmática, por mecanismos que parecem envolver a apo E, responsável pela remoção de VLDL remanescente da circulação, e a redução da VLDL, precursor da LDL (Vasandani e cols., 2002).

Além desses mecanismos, o óleo de peixe tem demonstrado a capacidade de aumentar a taxa de secreção basal de colesterol na bile, sem alterar a taxa de secreção de ácidos biliares, quando administrado na dieta de ratos, sendo este um mecanismo adicional que contribui para a redução do colesterol plasmático (Balasubramaniam e cols., 1985).

A dependência do PPAR na modulação do metabolismo do colesterol por AGPI n-3 também já foi demonstrada. A administração oral de EPA durante 12 semanas gerou

redução no colesterol sérico e hepático de camundongos selvagens, mas não em camundongos com deleção do receptor PPAR $\alpha$ . Este evento foi associado à redução do RNAm de enzimas envolvidas na síntese de colesterol como a HMG-CoA sintase, HMG-CoA redutase, Farnesyl difosfato sintase e Squalene sintase. A expressão do RNAm da *ATP-binding cassette transporter A1* (ABCA1), enzima que medeia o efluxo hepático de colesterol, também foi suprimida pela administração de EPA, somente no animal normal (Sugiyama e cols., 2008). A partir destes dados, os autores sugerem que os efeitos hipocolesterolêmicos dos AGPI n-3 são dependentes de PPAR $\alpha$  e envolvem a inibição de enzimas chaves na síntese de colesterol e a redução do efluxo hepático de colesterol, sem alterar a síntese e secreção de ácidos biliares.

Desta forma, a redução no colesterol sérico parece ser determinada por um conjunto de mecanismos ativados pelos AGPI n-3, que envolvem principalmente inibição de sua síntese (Figura 8).

Outra ação importante do óleo de peixe além do seu efeito hipolipemiante é a redução da adiposidade em animais. As ações do óleo de peixe sobre o tecido adiposo, reduzindo a deposição de lipídeos não resultam de alteração da ingestão alimentar. Estas são reflexos de mudanças metabólicas em diversos tecidos, especialmente fígado e músculo como descrito anteriormente. No entanto, outros efeitos dos AGPI n-3 têm sido descritos no tecido adiposo branco, na tentativa de elucidar seus mecanismos de redução da adiposidade em animais experimentais. Além do aumento da  $\beta$ -oxidação e da biogênese mitocondrial no tecido adiposo branco observado em animais tratados com dieta contendo óleo de peixe (Flachs e cols., 2005), o DHA em cultura de adipócitos da linhagem 3T3-L1 tem demonstrado a capacidade de reduzir o acúmulo de lipídeos, inibir a diferenciação e induzir a apoptose destas células (Kim e cols., 2006). Estes efeitos ainda não são evidentes em modelos *in vivo*, mas poderiam contribuir para justificar a redução da massa de tecido adiposo.

Os efeitos dos AGPI n-3 têm sido demonstrados em diversos modelos, no entanto, a maior parte destes efeitos descritos são obtidos a partir de dieta hiperlipídica ou suplementação da dieta padrão com óleo de peixe ou seus compostos ativos, alterando o percentual lipídico da dieta. Pouco é descrito sobre os efeitos do óleo de peixe compondo uma dieta normolipídica e normocalórica.

### **1.3 Relação entre AGPI e hormônios tireoideanos**

Desde que se tornou evidente que as ações dos AG não poderiam ser mediadas apenas pela alteração da composição de fosfolípidos de membrana e produção de eicosanóides, investigações quanto aos seus efeitos sobre a transcrição gênica sugeriram ações nucleares. Os receptores nucleares já vêm sendo descritos por diversos autores como mediadores das ações dos AGPI (Pan e cols., 2000; Zhao e cols., 2004; Sampath & Ntambi, 2005; Nakatani e cols., 2005; Bordoni e cols., 2006; Davidson, 2006). Após o PPAR ser descrito como o primeiro receptor nuclear modulado por AG, vários receptores nucleares tornaram-se candidatos de tal regulação, sendo constatado que as interações dos AG não se restringiriam apenas aos PPAR. Suas ações eram mediadas também por LXR (Nakatani e cols., 2005), RXR (Lengqvist e cols., 2004) e FXR (Zhao e cols., 2004).

Todos estes receptores em conjunto com os TRs pertencem a família de receptores nucleares, caracterizada pela capacidade de interagir diretamente com o DNA na região promotora do gene, recrutando co-fatores que alteram a transcrição gênica (Bassett e cols., 2003).

Os TRs medeiam a maior parte das ações dos hormônios tireoideanos, através do estímulo (regulação positiva) ou repressão (regulação negativa) da transcrição de genes alvos. Dentre os quais, encontram-se genes envolvidos metabolismo lipídico, como carnitina palmitoil transferase, alvo comum às ações dos AGPI n-3 (Müller & Seitz, 1984).

O envolvimento dos AG com receptores nucleares, associado aos efeitos comuns de AGPI n-3 e hormônios tireoideanos sobre alguns genes do metabolismo lipídico sugerem

uma relação entre estes. Enquanto é descrito que o estado tireoideano modula a disponibilidade de AG livres e parece modular a composição de AG de membranas plasmáticas (Saha e cols., 1998; Pehowich, 1999), não existe consenso quanto à influência dos AG sobre a ação dos hormônios tireoideanos.

Estudos *in vitro* com ácido oléico (18:1 n-9) demonstraram redução da constante de associação ( $K_a$ ) do TR, caracterizando uma inibição competitiva da ligação do  $T_3$  ao seu receptor (TR) presente em núcleo hepático de rato (van der Klis e cols., 1989). Entretanto, a administração de óleo de peixe a ratos durante 3 semanas, apesar de também reduzir a constante de associação ( $K_a$ ) do  $T_3$  ao TR hepático, aumentou a capacidade máxima de ligação, sugerindo aumento do número de receptores. No entanto, este aumento da capacidade de ligação não se traduziu em efeito. A ação estimulatória de  $T_3$  sobre a enzima málica foi reduzida pela administração de óleo de peixe, sugerindo desacoplamento entre a ligação de  $T_3$  ao seu receptor e sua ação sobre a enzima málica (Knopp e cols., 1992).

Perfil semelhante de interferência sobre a ação de  $T_3$  já foi demonstrado na regulação do gene S14 por agonista de PPAR $\alpha$ . Em estudos *in vitro*, observou-se que o PPAR inibiu a transcrição de S14, possivelmente por inibir a ação estimulatória de  $T_3$  sobre este gene, através da redução de heterodímeros TR/RXR formados e da inibição da ligação deste ao TRE (Ren e cols., 1996).

Mazzachi e colaboradores. (1992), ao realizar experimentos utilizando fração nuclear purificada, o núcleo inteiro ou a célula inteira, observaram que a eficiência do ácido linolênico (AGPI n-3) em inibir a ligação do  $T_3$  ao TR foi extremamente baixa em hepatócitos isolados quando comparado aos outros modelos. As altas concentrações de AG requeridas para tal efeito no tecido íntegro sugerem a impossibilidade de ocorrência deste evento em condições fisiológicas.

Entretanto, em condições não fisiológicas, o efeito inibitório dos AG sobre a ligação de  $T_3$  ao TR já foi observado *in vivo*. Yamamoto e colaboradores (2001) utilizando camundongos que receberam noradrenalina subcutânea 45 minutos após a administração intraperitoneal de  $I^{125} T_3$ , observaram alteração na capacidade de ligação do  $T_3$  ao TR na

fração nuclear hepática. Eles demonstraram que o aumento dos AG livres plasmáticos, gerados pela administração de noradrenalina, reduziram em aproximadamente 80% a ligação do T<sub>3</sub> traçador ao TR no fígado (Yamamoto e cols., 2001). Este trabalho sugere que os mecanismos de competição observados *in vitro* parecem ocorrer *in vivo*.

Mesmo em modelos *in vivo* utilizando-se a mesma natureza de AGPI, os efeitos destes sobre os TRs não são claros. Os escassos trabalhos da literatura demonstram redução ou não alteração do RNAm das isoformas hepáticas TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1, respectivamente, utilizando diferentes modelos experimentais. (Jump e cols., 1994; Brtko e cols. 1997).

Além do envolvimento com os TRs, os AG em geral também têm demonstrado a capacidade de modular a concentração plasmática de hormônio tireoideano livre. Foi demonstrado em modelos *in vitro* e *in vivo* que os AG inibem a ligação do hormônio a proteínas plasmáticas, aumentando o percentual de T<sub>4</sub> e T<sub>3</sub> livres, sendo o ácido palmítico (16:0) e o ácido linoleico (18:2 n-6) mais potentes em exercer este efeito do que o ácido oléico (18:1 n-9) (Hollander e cols., 1967). Este mecanismo seria capaz de modular a ação dos hormônios tireoideanos, já que a sua forma livre é a sua forma ativa. Entretanto, não se tem dados acerca da influência dos AGPI n-3 componentes do óleo de peixe sobre a fração livre de hormônio tireoideano.

A influência do lipídeo dietético sobre o efeito dos hormônios tireoideanos também vem sendo sugerida por alguns autores. Deshpande e colaboradores (1995) observaram intensificação da perda de peso em camundongos hipertireoideos (2, 4 ou 8 $\mu$ g de T<sub>3</sub>/100g de peso) tratados com dieta rica em AGPI n-6 durante 21 dias, quando comparados com animais alimentados com dieta rica em AG saturado. No entanto, o efeito estimulatório de T<sub>3</sub> sobre a atividade da enzima málica foi atenuado pela dieta rica em AGPI n-6. Desta forma, torna-se evidente que a susceptibilidade da ação de T<sub>3</sub> à dieta rica em AGPI n-6 é variável de acordo com o parâmetro analisado. Enquanto o lipídeo dietético parece prejudicar a via lipogênica estimulada por hormônio tireoideano, este parece favorecer as vias estimuladas por T<sub>3</sub> que levam à perda de peso, possivelmente oxidativas. Outras enzimas lipogênicas como a ácido graxo sintase e a glicose-6-fosfato desidrogenase também tiveram a ação

estimulatória induzida por  $T_3$ , atenuada por dieta rica em AGPI n-6. No entanto, a administração de concentrações elevadas de  $T_3$  (15 $\mu$ g/100g de peso) reverteram o efeito inibitório da dieta, sugerindo mecanismos de competição entre fatores nucleares determinantes para a transcrição gênica (Clarke e Hembree, 1990).

A preponderância do efeito sobre lipogênese parece mesmo depender da quantidade de hormônio tireoideano administrado e do percentual de AGPI ofertado na dieta. Pan e Berdanier (1990) relataram a capacidade do  $T_4$  (10 $\mu$ g/100g de peso) em reverter o efeito hipolipogênico induzido por dieta rica em óleo de peixe, reforçando a hipótese de ocorrer competição entre o hormônio tireoideano e o AG dietético por fatores transcricionais.

Apesar da aparente existência de competição entre AG e hormônio tireoideano, a integridade da ação e concentração de ambos é requerida para suas ações, sugerindo não haver apenas competição entre os dois, mas também um grau de dependência para a execução adequada de suas ações.

Prigge e colaboradores (1995) relataram a necessidade de concentrações adequadas de hormônio tireoideano para que o óleo de peixe promova seu efeito sobre secreção de colesterol biliar. Ratos hipotireoideos foram tratados durante 3 semanas com dieta hiperlipídica contendo óleo de peixe (AGPI n-3) ou óleo de milho (AGPI n-6) como fonte lipídica. Dois dias antes do sacrifício, os animais receberam uma única e alta dose de  $T_3$  (200 $\mu$ g/100g de peso). Nos animais hipotireoideos não foi verificada diferença na secreção biliar de colesterol entre as dietas, no entanto, após a administração de  $T_3$  ocorreu aumento significativamente maior nesta secreção dos animais tratados com óleo de peixe, quando comparado aos outros grupos. Estes dados sugerem a dependência da função tireoideana adequada para que o óleo de peixe exerça seus efeitos.

A importância dos AG na ação dos hormônios tireoideanos torna-se evidente em trabalho recente que sugere um novo mecanismo de ação dos hormônios tireoideanos. Os autores observaram que a regulação positiva do RNAm da proteína desacopladora do tipo 3 (UCP3), gerada por  $T_3$  em ratos, é abolida quando o efeito lipolítico de  $T_3$  é bloqueado. O

aumento do RNAm volta a ser observado quando é co-administrado ao agente antilipolítico (ácido nicotínico), um agonista de PPAR $\delta$  (L165,041) (de Lange e cols., 2007). Estes dados sugerem que o aumento dos AG livres decorrentes do efeito lipolítico de T<sub>3</sub> é necessário para aumentar a expressão do RNAm da UCP3 e que esta ação depende da ativação de PPAR, sugerindo interação entre estes dois receptores nucleares. Os autores propõem que TR $\beta$ 1 e PPAR $\gamma$ , na presença de RXR, interagem de forma aditiva (formação de trimeros) com o TRE na região promotora da UCP3 de rato, e esta capacidade de interação seria determinada pela localização do elemento responsivo ao fator de transcrição MyoD.

Efeitos dos AGPI sobre tecidos determinantes das concentrações séricas de hormônios tireoideanos também têm sido descritos. Makino e colaboradores (2001) acreditam que a concentração aumentada de AG livres plasmáticos está associada à atenuação de sintomas em pacientes hipotireoideos. Em ratos, os autores observaram que a indução do hipotireoidismo com a droga metimazol, concomitante a administração oral de EPA durante 4 semanas, promoveu maior concentração sérica de T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub>, menor hipertrofia da glândula e maior homogeneidade no tamanho dos folículos tireoideanos quando comparados a animais hipotireoideos tratados com salina. Estes dados sugerem que o EPA atenua a intensidade do hipotireoidismo, provavelmente por ação na tireóide.

Além disto, Clandinin e colaboradores (1998) acreditam que a alteração na composição de AG da hipófise promovida por dieta suplementada com DHA poderia alterar sua função secretória. Estes observaram que tal dieta administrada durante seis semanas, a partir do nascimento, resultou em aumento da concentração sérica de TSH em ratos machos, sem alterações em fêmeas.

A interação entre AG e hormônios tireoideanos parecem envolver mecanismos de competição por fatores nucleares, como demonstrado por estudos *in vitro* e *in vivo*, o que sugeriria a inibição da ação dos hormônios tireoideanos. No entanto, este efeito inibitório só é observado para alguns genes alvos de T<sub>3</sub>, especialmente os lipogênicos. Outros alvos de hormônio tireoideanos, como os envolvidos na oxidação, são hiper-estimulados em resposta a co-administração de AGPI. A seletividade na modulação da ação dos hormônios

tireoideanos por AG não é clara. Contudo é evidente a interdependência entre ambos para a execução de seus efeitos, visto que em situações onde a concentração de um destes é reduzida, a ação do outro é prejudicada.

Apesar dos diversos trabalhos abordando este tema, ainda não foram descritas diferenças na modulação dos hormônios tireoideanos por diferentes classes de AGPI. Diferenças neste mecanismo de regulação geradas por AGPI n-3 e AGPI n-6, poderiam justificar as alterações metabólicas observadas entre modelos utilizando estes lipídeos. A comprovação destes dados determinaria a modulação da ação destes hormônios como mais um mecanismo de ação do óleo de peixe para promover seus efeitos sobre metabolismo lipídico.

#### **1.4 Interação entre receptores nucleares: TR e PPAR**

A capacidade de dimerização dos receptores nucleares e os mecanismos similares de ação permitem sua interação com outros receptores nucleares. Os TRs formam homodímeros e heterodímeros para interagir com a região promotora do gene. Atualmente, já é descrito que além de interagir com o RXR, receptor clássico de heterodimerização, os TRs parecem interagir com outros receptores nucleares, como o PPAR. A intervenção nesta interação é capaz de gerar prejuízos tanto nos efeitos gerados por hormônios tireoideanos (de Lange e cols., 2007), quanto nos efeitos gerados por agonistas de PPAR (Liu e cols., 2007).

Os receptores nucleares PPAR e TR, além de compartilharem da mesma família de receptores, algumas homologias estruturais e a capacidade de heterodimerização com RXR, possuem importantes ações no controle do metabolismo lipídico (Juge-Aubry e cols., 1995). Esta série de características comuns sugere envolvimento na sinalização e ação dos dois receptores. Tal envolvimento já vem sendo descrito por diversos autores demonstrando uma regulação recíproca desses receptores sobre suas ações, e a necessidade da funcionalidade de ambos para adequada sinalização (Chu e cols., 1995; Araki e cols., 2005;

Liu e cols., 2007; Buroker e cols., 2007). Os mecanismos por trás desta regulação parecem envolver competição pela ligação ao RXR (Juge-Aubry e cols., 1995), interferência na ligação ao elemento responsivo na região promotora do gene (Ren e cols., 1996; Miyamoto e cols., 1997) ou formação de heterodímeros entre os dois receptores (Bogazzi e cols., 1994).

Bogazzi e colaboradores (1994) descreveram que a potencialidade do heterodímero formado por esses dois receptores parece ser determinada pela isoforma do TR e pela seqüência do TRE. Utilizando construções contendo a região promotora da proteína proteolípídica da mielina humana (PLP), os autores observaram aumento da transcrição (intensificação do estímulo esperado por hormônio tireoideano) apenas nas células co-transfectadas com TR $\beta$  e PPAR. No entanto, em construções contendo a região promotora da enzima málica ou do TSH $\beta$ , foi observada inibição do efeito esperado por hormônio tireoideano. Estes dados sugerem que a interação do PPAR pode influenciar positivamente ou negativamente a ação do hormônio tireoideano dependendo não apenas da isoforma do receptor, mas também do TRE.

Ainda não há consenso quanto à dependência ou não dependência de ligante para os efeitos de interação. Chu e colaboradores (1995) demonstram que o TR inibe a atividade transcricional do PPAR mediada por ciprofibrato, somente na presença de T<sub>3</sub>. Entretanto, Araki e colaboradores (2005) relatam que o efeito inibitório do TR $\beta$  sobre a atividade transcricional do PPAR $\gamma$ , induzida por troglitazona, é abolida com a adição de T<sub>3</sub>. No entanto, ao utilizar um TR $\beta$  incapaz de se ligar a T<sub>3</sub> (PV), observam que a adição de T<sub>3</sub> não surte efeito. Os autores sugerem que a ação inibitória do TR sobre PPAR $\gamma$  seja decorrente do receptor não-ligado.

A interação entre os dois receptores nucleares também já é descrita em modelos *in vivo*. A associação de dieta rica em ciprofibrato (agonista de PPAR) com a administração de T<sub>3</sub> por 4 dias atenuou o efeito estimulatório do ciprofibrato sobre a expressão do RNAm da acetil-CoA oxidase em camundongos (Chu e cols., 1995).

As interações *in vivo* entre TR $\alpha$  e PPAR $\alpha$  são capazes de influenciar o metabolismo lipídico hepático. Liu e colaboradores (2007), utilizando camundongos com mutação no TR $\alpha$  capaz de reduzir em 50% a ligação ao hormônio tireoideano, demonstraram prejuízo na atividade de enzimas oxidativas estimuladas por PPAR $\alpha$ . Desta forma, os animais exibiram acúmulo anormal de lipídeos no tecido hepático, característico de animais com deleção do PPAR $\alpha$ . Os autores demonstraram que o TR $\alpha$ , tanto o normal como o mutante, interfere na ligação do PPAR $\alpha$  ao PPRE, e que este mecanismo não é dependente da disponibilidade de RXR. Ao contrário do TR $\alpha$  mutante, a interferência do TR $\alpha$  normal sobre a ação do PPAR $\alpha$  é abolida na presença de ligante. Estes dados apontam a interação entre estes dois receptores nucleares para a manutenção de seus efeitos no metabolismo lipídico hepático, especialmente os referentes à oxidação de AG.

Os efeitos *in vivo* de agonistas de PPAR parecem não se restringir apenas à atividade transcricional dos hormônios tireoideanos, mas também as suas concentrações séricas e fatores determinantes para sua ação. Em ratos, a administração de rosiglitazona (agonista de PPAR $\gamma$ ) durante 7 dias reduz as concentrações séricas de T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub>, o RNAm das desidases hepática e do tecido adiposo marrom, e o RNAm do TR $\alpha$  e do TR $\beta$  no tecido adiposo marrom (Festuccia e cols., 2008). No entanto, em modelo de diabetes induzida por dexametasona, a administração de rosiglitazona durante 21 dias aumentou a concentração sérica de T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub>, normalizando-a (Jatwa e cols., 2007).

Considerando-se o envolvimento dos AG sobre a ação dos hormônios tireoideanos e a capacidade de interação entre seus receptores nucleares, é possível sugerir a ação conjunta destes dois ligantes na modulação do metabolismo lipídico, um alvo comum de suas ações.

## 1.5 Justificativa

As ações hepáticas hipolipemiantes dos AGPI n-3 envolvem o controle de diversos mecanismos que levam à inibição da lipogênese e a ativação da oxidação de lipídeos. Estas ações são decorrentes do controle da atividade transcricional através da modulação de receptores nucleares e fatores de transcrição hepáticos. Enquanto diversos mecanismos são descritos para a inibição da lipogênese, apenas a estimulação do PPAR $\alpha$  constitui o mecanismo proposto para a estimulação das vias oxidativas. A possibilidade de existência de outras alças regulatórias dos AGPI n-3 sobre oxidação, evidenciam os hormônios tireoideanos como um potencial candidato, devido sua ampla ação sobre o metabolismo lipídico. Algumas das ações hipolipemiantes deste hormônio mediadas por seus receptores nucleares são comuns às ações dos AGPI n-3, principalmente no que concerne a oxidação lipídica. Adicionalmente, os PPAR, receptores nucleares estimulados por estes AG para promover os efeitos oxidativos, têm demonstrado estreita relação de interdependência com os receptores de hormônios tireoideanos, o que nos leva supor um possível envolvimento destes receptores com as ações dos AGPI n-3. Além disto, mesmo que por mecanismos distintos, ambos AGPI e hormônios tireoideanos reduzem o colesterol sérico. Desta forma, um ponto de controle dos AGPI n-3 na promoção de seus efeitos hipolipemiantes poderia ser a modulação da ação dos hormônios tireoideanos no tecido hepático, quer seja por alterar a sua disponibilidade na circulação ou alterar sua ação tecidual. Portanto, nos propusemos investigar em modelo crônico de dieta normolipídica, rica em AGPI n-3, a produção dos hormônios do eixo hipofisário-tireoideano e parâmetros de ação tecidual de hormônio tireoideano, como as desidases, seu receptor e alvos em tecido hepático.

## 2 OBJETIVOS

---

### 2.1 Geral

Avaliar a influência da ração isocalórica e normolipídica contendo óleo de peixe como fonte lipídica (rico em AGPI n-3) sobre a função tireoideana de ratos

### 2.2 Específicos

- Observar as alterações na massa corporal e massa de tecidos produzidas pela dieta experimental
- Verificar as concentrações séricas de TSH, T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> totais, de triglicerídeos e colesterol total e em frações
- Avaliar a influência da ração contendo óleo de peixe como fonte lipídica sobre a expressão do receptor TRβ1 no fígado dos animais tratados
- Observar a atividade das enzimas 5' -desiodases hepática e hipofisária
- Avaliar a atividade da enzima alfa-glicerofosfato desidrogenase mitocondrial hepática

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

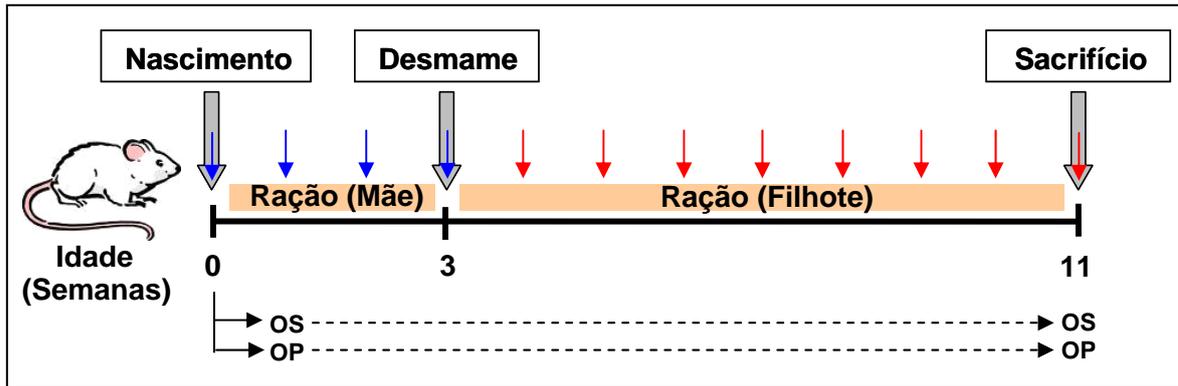
---

#### 3.1 Grupos experimentais

Os animais foram mantidos em ciclo controlado de claro-escuro (12h/12h) e temperatura em torno de 24°C com livre acesso a água e comida. O protocolo experimental utilizado foi previamente aprovado pela Comissão de avaliação do uso de animais em pesquisa (CAUAP). Para o experimento foram utilizados inicialmente 4 ratos Wistar fêmeas grávidas. No dia do nascimento, a prole foi selecionada, deixando apenas 6 filhotes com a mãe, preferencialmente machos. Neste mesmo momento a mãe teve sua ração comercial trocada por ração elaborada no laboratório a base de óleo de soja ou de óleo de peixe. As ratas lactantes permaneceram com esta ração durante todo o período de lactação. No momento do desmame, as proles permaneceram com a ração elaborada para filhotes contendo a mesma fonte lipídica que sua mãe consumia: óleo de soja (grupo OS) ou óleo de peixe (grupo OP). Os animais foram mantidos com esta alimentação até o sacrifício na 11ª semana de vida (Figura 9).

O peso corporal da prole foi acompanhado semanalmente desde o dia do nascimento, assim como o consumo alimentar desde o desmame. A ingestão alimentar foi avaliada pela diferença na quantidade de ração ofertada e a restante na gaiola. Esta quantidade foi corrigida pelo número de animais da gaiola e número de dias da oferta, e normalizada para 100g de peso do animal.

Os animais foram sacrificados por decapitação, ao completarem 11 semanas de idade. O sangue foi processado para obtenção do soro e armazenado a -20°C, para posterior análise bioquímica e hormonal. Coração, fígado, tecido adiposo branco retroperitoneal e inguinal e tecido adiposo marrom foram pesados. Fígado e adeno-hipófise foram armazenados em freezer -80°C para posteriores análises enzimáticas e da expressão do receptor beta de hormônio tireoideano. A carcaça eviscerada foi armazenada a -20°C para análise da composição corporal.



**Figura 9 – Desenho experimental.** Ratas receberam dieta normolipídica e normocalórica a base de óleo de soja (OS) ou óleo de peixe (OP) durante a lactação. Após o desmame, a prole recebeu ração para filhotes contendo a mesma fonte lipídica daquela de suas mães. As setas verticais azuis indicam as pesagens semanais e as setas verticais vermelhas indicam as pesagens semanais acompanhadas da avaliação da ingestão. A seta pontilhada horizontal indica a permanência da dieta contendo a mesma fonte lipídica.

### 3.2 Elaboração das rações

Para elaboração das rações foram utilizadas as recomendações do *American Institute of Nutrition* para ratas grávidas e lactantes (AIN-93G) e para manutenção dos filhotes destas (AIN-93M) (Reeves e cols., 1993), com pequenas modificações. O protocolo de elaboração das rações foi previamente estabelecido no laboratório de Bioquímica Nutricional (UFRJ), como descrito por Guimarães (2006), e com a colaboração da professora Maria das Graças Tavares do Carmo, utilizado neste trabalho. Foram elaborados dois tipos de ração para cada um desses grupos (Tabela 2). Esses dois tipos de rações são normolipídicas e normocalóricas (Rao, 1996), sendo diferenciadas apenas pela fonte lipídica utilizada para sua elaboração: óleo de soja (OS) ou óleo de peixe (OP). O óleo de soja (Liza®) utilizado para a elaboração das rações foi obtido comercialmente, enquanto o óleo de peixe *ROPUFA-75 n-3 EE* foi obtido da DSM Nutritional products Ltd (Aargau, Suíça), tendo em sua composição 42% de ácido eicosapentanóico (EPA) e 23% de ácido docosahexanóico (DHA).

As dietas contendo óleo de peixe como fonte lipídica foram complementadas com óleo de milho para adequação às necessidades nutricionais do ácido graxo linoleico, garantindo o

aporte de todos os ácidos graxos essenciais, e desta forma, que as observações obtidas sejam decorrentes do maior aporte de um AG e não da deficiência de um outro.

**Tabela 2 – Composição das rações elaboradas para as ratas lactantes (AIN-93G) e para os filhotes (AIN-93M) do grupo óleo de soja e do grupo óleo de peixe**

Ingredientes	Mãe		Filhote	
	Óleo de Soja	Óleo de Peixe	Óleo de Soja	Óleo de Peixe
Amido (g)	599,5	599,5	680,7	680,7
Caseína (g)	210	210	150	150
Celulose (g)	50	50	50	50
Bitartarato Colina (g)	2,5	2,5	2,5	2,5
L-cystina (g)	3	3	1,8	1,8
Mistura de Minerais <sup>1</sup> (g)	35	35	35	35
Mistura de Vitaminas <sup>2</sup> (g)	10	10	10	10
BHT (g)	0,014	0,014	0,014	0,014
Óleo de Soja (mL)	90	----	70	----
Óleo de Peixe (mL)	----	80	----	60
Óleo de Milho (mL)	----	10	----	10

<sup>1</sup> **Mistura de Vitaminas** (g/Kg dieta) incluem: Tiamina HCl 0,060; Riboflavina 0,60; Pirioxina HCl 0,70; Niacina 3,0; Pantotenato de cálcio 1,60; Ácido Fólico 0,20; Biotina 0,02; Vitamina B<sub>12</sub> 2,50; Vitamina A-palmitato (500UI/g) 0,80; Vitamina E-Acetato (500UI/g) 2,5; Vitamina D3 (400 UI/g) 0,25; Vitamina K1 0,75 (AIN-93M vitamin mix DYETS #310025, Dyets Inc., Bethlehem, Pensilvânia, Estados Unidos).

<sup>2</sup> **Mistura de Minerais** (g/Kg dieta) incluem: Carbonato de cálcio 357,0; Fosfato de potássio monobásico 250,0; Citrato de potássio H<sub>2</sub>O 28,0; Cloreto de sódio 74,0; Sulfato de potássio 46,6; Óxido de magnésio 24,0; Sulfato ferrosos7H<sub>2</sub>O 5,21; Carbonato de zinco 1,65; Carbonato de manganês 0,63; Carbonato cúprico 0,30; Iodato de potássio 0,01; Selenato de sódio 0,01025; Amônio paramolibdato 4H<sub>2</sub>O 0,007; Sódio metasilicado 9H<sub>2</sub>O 1,45; Sulfato de cromo potásio 12H<sub>2</sub>O 0,27; Cloreto de lítio 0,01; Ácido bórico 0,08; Carbonato de níquel 0,03; Vanádio amônio 0,007 (AIN – 93M – mineral mix DYETS #210052, Dyets Inc., Bethlehem, Pensilvânia, Estados Unidos).

As dietas ofertadas às mães e aos filhotes possuíam composição semelhante às recomendações do *American Institute of Nutrition* (Reeves e cols., 1993), como representado na Tabela 3.

As dietas refletiram em sua composição a composição de ácidos graxos da fonte lipídica utilizada (Tabela 4) (Guimarães, 2006).

**Tabela 3 – Composição em macronutrientes e Calorias das dietas experimentais e de suas recomendações específicas.**

Composição	Mãe		Filhote	
	AIN- 93G*	Experimental	AIN-93M*	Experimental
Carboidrato (%)	64	60	76	69
Proteína (%)	19	21	14	16
Lipídeo (%)	17	19	10	15
Calorias/ grama	3,8	4,07	3,6	3,98

\* Recomendações do AIN para roedores de acordo com sua fase de desenvolvimento (Reeves e cols., 1993)

**Tabela 4 – Composição percentual média de ácidos graxos das dietas experimentais**

Ácidos graxos (%)	Óleo de soja	Óleo de peixe
C14 : 0	1.34	1.44
C16 : 0	14.45	6.90
C18 : 0	3.71	3.07
C18 : 1 n-9 <i>trans</i>	ND	ND
C18 : 1 n-9 <i>cis</i>	19.03	9.51
C18 : 1 e outros <i>cis</i> -isômeros *	ND	0,38
C20 : 1	0.52	1.70
C24 : 1	ND	0.60
C18 : 2 n-6 <i>trans</i>	ND	ND
C18 : 2 n-6 (Linoleico)	55.87	10.85
C18 : 3 n-3 (Linolênico)	3.59	1.13
C20 : 5 n-3 (EPA)	ND	35.04
C22 : 6 n-3 (DHA)	ND	17.24
<b>Total AGS<sup>#</sup></b>	<b>19.50</b>	<b>11.41</b>
<b>Total AGM <i>cis</i><sup>#</sup></b>	<b>19.55</b>	<b>12.19</b>
<b>Total AGPI <i>cis</i><sup>#</sup></b>	<b>59.46</b>	<b>64.26</b>
<b>Total AG <i>trans</i><sup>#</sup></b>	<b>ND</b>	<b>ND</b>
AGPI:AGS	3.04	5.63

# Indica o somatório e inclui ácidos graxos que não estão descritos na tabela. \*Inclui todos os isômeros *cis* de posição 18:1 exceto o 18:1 (n-9).  
 Legenda: AGM – ácido graxo monoinsaturado; AGPI – ácido graxo poliinsaturado; AGS – ácido graxo saturado; ND – não detectado.  
 Adaptado de Guimarães, 2006.

### 3.3 Avaliação da composição corporal

A análise da composição corporal dos animais foi realizada pelo método de extração da porção lipídica, protéica e aquosa da carcaça (Toste e cols., 2006). Após o sacrifício os animais tiveram suas vísceras retiradas, sendo armazenada apenas a carcaça, contendo o tecido muscular e adiposo subcutâneo, com o tecido adiposo visceral, retroperitoneal e epididimal. A carcaça foi autoclavada (120°C por 1 hora) e após o resfriamento, processada com volume de água destilada em uma proporção de 1:1 para o peso da carcaça. As amostras deste homogenato foram utilizadas para avaliação do conteúdo lipídico (3g de amostra em duplicata), protéico (1g de amostra em uniplicata) e aquoso (1g de amostra em duplicata).

O conteúdo lipídico das amostras foi obtido por saponificação destas por incubação com solução de KOH a 30% (Vetec – Rio de Janeiro, Brasil), na temperatura de 70°C por 15min, seguido da adição de etanol a 95% (Vetec) e permanência na mesma temperatura por mais 2 horas. Após a acidificação do meio com solução 9M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Vetec), os lipídeos foram extraídos por três lavagens consecutivas de 10 minutos com éter de petróleo (Vetec) (Stansbie e cols., 1976). A porção lipídica associada ao éter de petróleo foi lavada com água destilada e em seguida evaporada à temperatura ambiente até estabilização do peso.

A fração protéica foi extraída com solução 0,6N de KOH a 37°C durante 1hora. Após agitação de 15 minutos, as amostras foram centrifugadas a 800xg/10min. No sobrenadante obtido, a concentração de proteína foi quantificada pelo método de dosagem de proteína utilizando reagente de Bradford (Bradford, 1976).

Para avaliação do conteúdo de água, um grama do homogenato da carcaça foi colocado em estufa a 90°C. As amostras foram mantidas a esta temperatura até que alcançassem um peso estável. A diferença entre o peso inicial e o peso final correspondeu à massa de água presente na amostra.

### 3.4 Dosagens hormonais

As concentrações séricas do TSH, T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> totais, foram avaliadas por Radioimunoensaio. A técnica consiste em um ensaio de competição pela ligação ao anticorpo entre a amostra (fria) e a molécula marcada radioativamente (traçador), seguido de contagem da radioatividade em contador gama do complexo formado.

A dosagem de T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> totais foi realizada pelo método de fase sólida, utilizando-se kits comerciais (MP Biomedicals™ – Califórnia, Estados Unidos), segundo as recomendações do fabricante. A dosagem de leptina foi realizada pelo método de duplo anticorpo, utilizando kit da Linco Research Inc. (Missouri, Estados Unidos).

Para dosagem do TSH foi utilizado o método de duplo anticorpo por ensaio baseado em protocolo padronizado previamente em nosso laboratório (Ortiga-Carvalho e cols., 1996). Foram utilizados reagentes fornecidos pelo *National Hormone Pituitary Program* (NHPP - Bethesda, Estados Unidos): TSH de rato para a curva padrão e para produção do TSH marcado, e anticorpo produzido em coelho contra TSH de rato (primeiro anticorpo).

A marcação do TSH com <sup>125</sup>Iodo (<sup>125</sup>I) foi realizada pela técnica de cloramina T (Sigma – Missouri, Estados Unidos) (Chard, 1987). A purificação do TSH marcado foi feita por cromatografia em gel de poliacrilamida (Biogel - P60 fino da Bio Rad – Califórnia, Estados Unidos).

O ensaio de dosagem do TSH foi realizado por incubação de 100µl do soro do animal e do TSH marcado com o anticorpo anti TSH de rato (diluição 1:1.500.000), com posterior incubação com anti imunoglobulina G (IgG) de coelho (diluição 1:100). Após 24 horas de incubação, os complexos formados foram precipitados por centrifugação a 1700xg/30min. O sobrenadante foi descartado e a radioatividade do precipitado foi quantificada em contagens por minuto (cpm) em contador gama.

### 3.5 Dosagem de triglicerídeos, colesterol total e em frações e proteínas séricas

Outros parâmetros séricos como lipídeos e proteínas foram dosados no Laboratório de Lipídeos da Universidade Estadual do Rio de Janeiro. Estas dosagens foram realizadas utilizando-se kits comerciais da BioSystems (Paraná, Brasil). Para dosagem do colesterol total foi utilizado o método Colesterol Oxidase/Peroxidase e para a do triglicerídeo foi utilizado o método glicerol fosfato oxidase/Peroxidase. A concentração sérica da lipoproteína de baixa densidade (LDL) foi obtida por cálculo matemático utilizando a equação de Friedewald (Friedewald e cols., 1972), abaixo descrita:

$$\text{Colesterol LDL (mg/dL)} = \text{Colesterol Total} - \frac{\text{Triglicerídeos}}{5} - \text{Colesterol HDL}$$

A concentração sérica da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) foi obtida por cálculo matemático utilizando a equação de Friedewald (Friedewald e cols., 1972), abaixo descrita:

$$\text{Colesterol VLDL (mg/dL)} = \frac{\text{Triglicerídeos}}{5}$$

Realizamos ainda dosagem de proteína total utilizando o método Biureto.

### 3.6 Avaliação da expressão do TRβ1 hepático por Western blotting

Para análise da expressão protéica por Western blotting, foi realizada extração de proteína de 50mg de tecido hepático através de sua homogeneização em tampão de lise pH 6,4 (Hepes 50mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, EDTA 10nM, Triton X 1%) contendo coquetel de inibidores de proteases *Complete* (Roche Applied Science – Mannheim, Alemanha). A concentração protéica de cada amostra foi medida utilizando-se o protocolo de dosagem de proteína com reagente de Bradford (Bradford, 1976).

Alíquotas dos extratos hepáticos contendo 40μg de proteína foram pipetadas em gel de poliacrilamida a 10% e submetidas à eletroforese por 45 minutos a 40mA. Após o fim da

corrida eletroforética, as amostras foram transferidas para membrana PVDF (*Polyvinylidene Difluoride*) (Bio Rad – Califórnia, Estados Unidos), em sistema úmido (Bio Rad) a 300mA durante 2 horas.

As membranas, contendo as amostras protéicas, foram incubadas com tampão Tris-salina pH7,6 (TBS) com Tween a 0,05% (TBS-T) contendo leite desnatado (Molico® Nestlé – São Paulo, Brasil) a 5%, durante 1 hora à temperatura ambiente, para que ocorresse o bloqueio dos sítios inespecíficos da membrana.

Após o bloqueio, a membrana permaneceu incubando *overnight* à temperatura ambiente, na presença dos anticorpos policlonais para TR $\beta$ 1 (Upstate Biotechnology Inc. – Nova Iorque, Estados Unidos) diluído a 1:1.000 e para ciclofilina (Affinity Bioreagents™ – Colorado, Estados Unidos) diluído a 1:20.000 na solução TBS, contendo leite desnatado (Molico® Nestlé) a 2%. A ciclofilina foi utilizada como controle interno. Em seguida, a membrana foi submetida a 3 lavagens de 5 minutos com TBS-T e novamente incubada a 25°C durante 3 horas, na presença do anticorpo secundário contra IgG de coelho conjugado a peroxidase (ECL Rabbit IgG, HRP-Linked Whole Antibody – GE Healthcare UK Limited Amersham Place – Buckinghamshire, Inglaterra) com uma diluição de 1:15.000 em TBS, contendo leite desnatado (Molico) a 1%.

A membrana foi submetida a 3 lavagens de 5 minutos com TBS-T e revelada utilizando o kit *Lumigen™ PS-3 detection reagent* (GE Healthcare UK Limited Amersham Place), segundo protocolo do fabricante. Os híbridos são visualizados através de autoradiografia e a análise densitométrica realizada utilizando-se o software Kodak 1D v3.5.4.

### **3.7 Determinação da atividade da enzima glicerofosfato desidrogenase mitocondrial hepática**

A atividade da enzima foi quantificada na fração mitocondrial em reação realizada pela incubação da amostra com o substrato DL-glicerofosfato hexahidratado (Sigma Aldrich), e quantificada pela sua capacidade redutora, através da utilização dos aceptores de elétrons iodonitrotetrazolim (INT) (Sigma Aldrich), e fenazina metosulfato (PMS) (Sigma Aldrich) (Dutra e cols., 2007). O PMS atua como transportador de elétrons entre o substrato e o INT, e ao ser oxidado produz coloração amarela, detectável por espectrofotometria.

Para obtenção da fração mitocondrial, a amostra de fígado foi homogeneizada em tampão 0,32M de sucrose e 1mM de  $MgCl_2$  (20 vezes o volume) e centrifugada a 1.000xg/10min. O sobrenadante foi centrifugado a 8500xg/10min e em seguida o precipitado obtido foi ressuspenso em tampão fosfato de potássio (BPK) a 125mM (pH 7,5), e novamente centrifugado a 8500xg/10min. O precipitado obtido, consistindo da fração mitocondrial, foi ressuspenso em tampão BPK a 125mM (pH 7,5).

Uma amostra da fração mitocondrial foi incubada com solução 0,1M de DL-glicerofosfato hexahidratado (em tampão BPK contendo KCN a 0,003%) como substrato, a 30°C por 10 min e em seguida colocada em banho gelado. Em ambiente com luz vermelha, adiciona-se solução PMS-INT (0,12mM de PMS e 7,9mM de INT) e a reação ocorre por 15 minutos a temperatura ambiente. A reação foi parada utilizando-se solução de ácido tricloroacético (TCA) a 10% e etanol absoluto (Vetec). A medida da absorbância do sobrenadante obtido após a centrifugação a 1000xg/5min foi realizada em espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda de 500nm. A atividade enzimática foi corrigida pela massa de proteína (mg) de cada amostra. Os valores de atividade foram expressos como absorbância (O.D.)/mg de proteína mitocondrial.

### 3.8 Medida de atividade das enzimas 5'-desiodases do tipo I e II

A atividade das enzimas 5'-desiodases do tipo I e II foi dosada através de ensaio *in vitro* quantificando a radioatividade proveniente da liberação de  $^{125}\text{I}$  da reação de conversão do  $\text{rT}_3$  marcado com  $^{125}\text{I}$  na presença do agente redutor *Dithiothreitol* (DTT), conforme descrito em trabalhos anteriores do nosso grupo (Pazos-Moura e cols., 1991; Lisboa e cols., 2003).

As amostras do tecido hepático e adenohipofisário foram homogeneizadas em tampão tris-HCl pH6,8 (50mM de Tris, 10mM de DTT e 1mM de EDTA). O  $\text{T}_3$  reverso marcado com  $^{125}\text{I}$  Iodo ( $^{125}\text{I}$   $\text{rT}_3$ ) (1,07mCi/g; PerkinElmer Life Sciences – Massachusetts, Estados Unidos) foi utilizado como traçador do ensaio. Este foi purificado imediatamente antes de seu uso nos ensaios por eletroforese em papel (Whatman®, GE Healthcare UK Limited – Buckinghamshire, Inglaterra) utilizando acetato de amônio a 0,05M como tampão. Sua extração do papel foi realizada por eluição com tampão 1M de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 10mM de EDTA (pH6,9) e solução 0,04N de NaOH com consecutiva lavagem com água destilada.

Os ensaios enzimáticos foram realizados a 37°C na presença de 50 $\mu\text{l}$  de  $^{125}\text{I}$   $\text{rT}_3$  purificado e em tampão 100mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  contendo 1mM de EDTA (pH6,9) utilizando condições apropriadas para cada enzima.

A atividade da D1 hepática foi avaliada em 300-400 $\mu\text{g}$  de proteína do homogenato da amostra na presença de 25mM de DTT (Sigma Aldrich – Missouri, Estados Unidos) e 1,5 $\mu\text{M}$  de  $\text{rT}_3$  frio (Sigma Aldrich) durante 30 minutos.

Para o ensaio da D1 hipofisária, 100-200 $\mu\text{g}$  de proteína do homogenato da amostra foi incubada com  $\text{rT}_3$  frio a 2nM, DTT a 100mM e  $\text{T}_4$  frio a 100nM (Sigma Aldrich), para inibição da D2 hipofisária, durante 1h a 37°C. Para o ensaio da D2 hipofisária, as mesmas condições de ensaio foram utilizadas, com exceção da adição de  $\text{T}_4$  que foi substituído por PTU a 2,5mM (Sigma Aldrich) para inibição da D1 hipofisária.

A reação foi parada com a adição de solução 10mM de PTU contendo albumina de soro bovino (BSA) a 8% (Sigma Aldrich) e solução de ácido tricloroacético (TCA) a 20% gelado (Vetec). O sobrenadante obtido após centrifugação a 350xg/10min foi aplicado em coluna (Bio rad) com resina de troca catiônica (Dowex 50WX2 -200 – Acros organics – Geel, Bélgica). A coluna foi eluída com solução de ácido acético a 10% (Vetec) e o eluato obtido contendo o  $^{125}\text{I}$  livre foi quantificado em contador gama. A atividade enzimática foi expressa em pico ou fentomoles (fígado e hipófise, respectivamente) de  $rT_3$  desiodado por hora por miligrama de proteína.

Os ensaios foram testados quanto à linearidade da reação dentro da faixa protéica utilizada. O percentual de desiodação do tubo branco foi menor que 3%.

### **3.9 Análises Estatísticas**

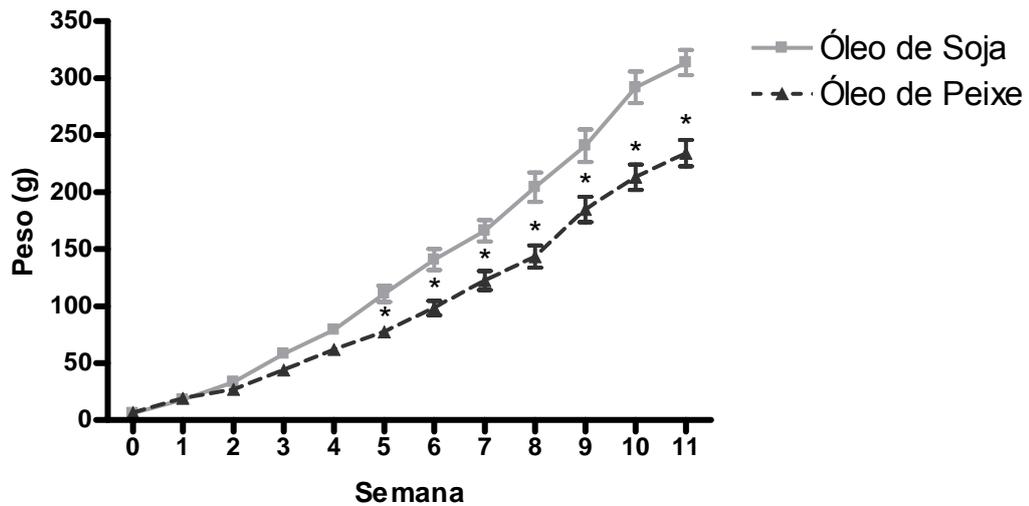
Os dados foram analisados com o programa *Graph Pad Prism*<sup>®</sup>. Os resultados são expressos em média  $\pm$  erro padrão. Para as análises foram utilizados os testes *t-Student* paramétrico e não paramétrico e *Two-way ANOVA* com o pós-teste *Bonferroni*. O teste utilizado para análise dos resultados encontra-se descrito nas legendas das figuras correspondentes. Valores com  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 4 RESULTADOS

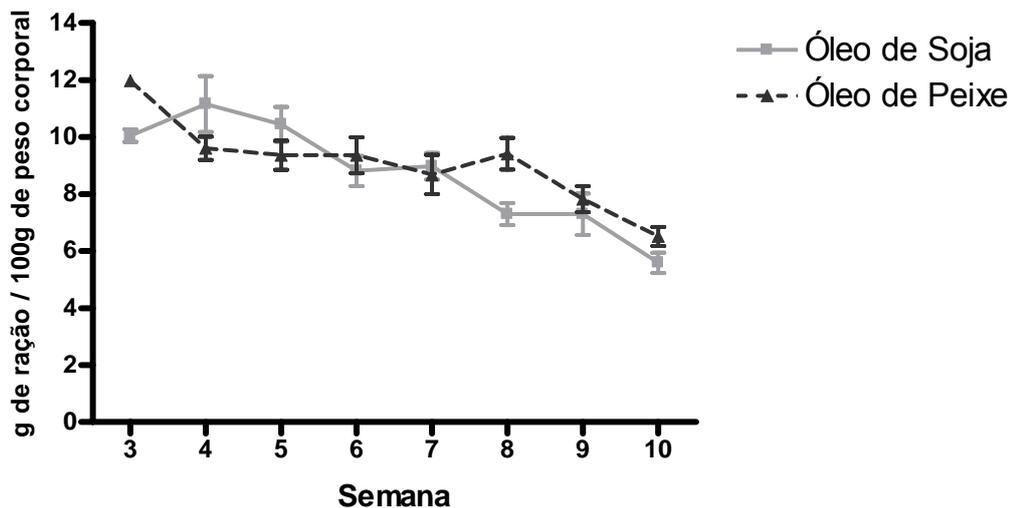
---

Utilizando quatro ratas fêmeas grávidas, obtivemos proles de aproximadamente dez filhotes, dentre as quais, três proles eram constituídas de cinco filhotes machos e uma de quatro filhotes machos. As fêmeas lactantes de duas proles contendo cinco filhotes machos receberam ração contendo óleo de peixe como fonte lipídica, perfazendo um total de dez filhotes machos no grupo óleo de peixe (OP). As outras duas fêmeas lactantes, cujas proles possuíam cinco e quatro filhotes machos, passaram a receber logo após o nascimento ração contendo óleo de soja como fonte lipídica, perfazendo um total de nove filhotes no grupo óleo de soja (OS). Os filhotes fêmeas mantidos com a prole, para totalizar os seis filhotes por rata lactante, foram sacrificados após o desmame. Durante o período experimental perdemos dois animais do grupo alimentado com óleo de peixe e um animal do grupo alimentado com óleo de soja, totalizando o número de 8 filhotes machos por grupo.

Os animais apresentaram peso corporal similar ao nascimento e durante o período de lactação, independente da dieta ofertada à mãe. O grupo alimentado com dieta contendo óleo de peixe (OP) apresentou menor peso corporal a partir da 5ª semana de vida, mantendo esta diferença até o sacrifício com 11 semanas de idade (Figura 10), quando seu peso representava apenas 74,6% daquele do grupo tratado com óleo de soja (OS). Durante o período experimental não foi observada qualquer diferença no consumo das rações (Figura 11) que pudesse justificar a diferença de peso corporal entre os grupos.

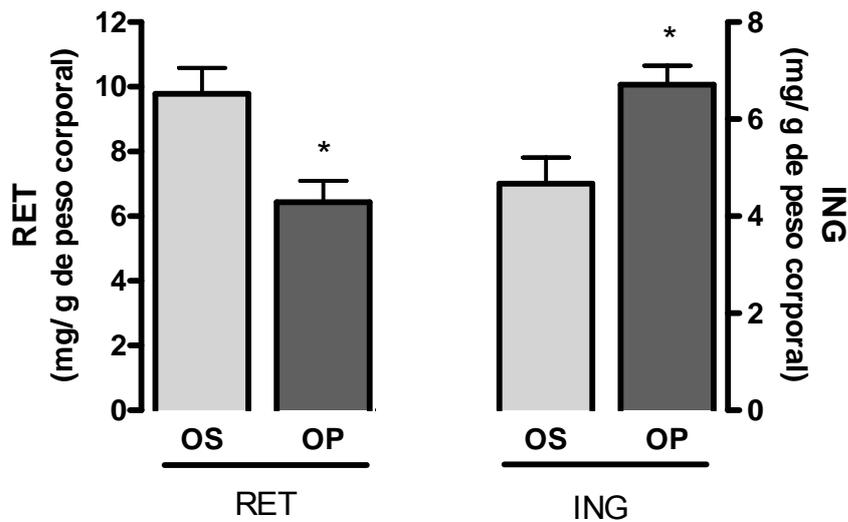


**Figura 10 - Evolução ponderal dos animais alimentados com ração contendo óleo de soja ou óleo de peixe como fonte lipídica durante o período experimental.** O peso dos animais é representado semanalmente em gramas. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão (n=8 animais por grupo). Análise estatística: Two-way ANOVA, seguida de teste de Bonferroni; \*p<0,05



**Figura 11 – Consumo alimentar dos animais recebendo ração contendo óleo de soja ou óleo de peixe como fonte lipídica durante o período experimental.** O resultado é representado em gramas de ração/100gramas de peso do animal consumido semanalmente. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão (n=8 animais por grupo). Análise estatística: Two-way ANOVA, seguida de teste de Bonferroni; \*p<0,05

Os animais apresentaram diferenças no acúmulo de tecido adiposo, quanto à quantidade e a localização deste. A dieta contendo óleo de peixe como fonte lipídica proporcionou um menor acúmulo de tecido adiposo retroperitoneal ( $p < 0,01$ ), representando o compartimento visceral, apesar de ser observado um maior acúmulo do tecido adiposo inguinal ( $p < 0,01$ ), representando o compartimento subcutâneo (Figura 12). O tecido adiposo retroperitoneal do grupo tratado com óleo de peixe representou apenas 57,3% da massa observada no grupo tratado com óleo de soja, enquanto o tecido adiposo inguinal mostrou ser 1,44 vezes maior no grupo OP. No entanto, não foi observada diferença significativa na massa de tecido adiposo marrom subescapular entre os grupos, apesar de haver uma tendência a maior massa no grupo tratado com óleo de peixe ( $p = 0,09$ ) (Tabela 5).



**Figura 12 – Massa dos compartimentos adiposos ao final das 11 semanas de tratamento com dieta contendo óleo de soja (OS) ou óleo de peixe (OP) como fonte lipídica.** Os valores de tecido adiposo retroperitoneal (RET) (compartimento visceral) e inguinal (ING) (compartimento subcutâneo) estão normalizados para o peso do animal. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão ( $n = 8$  animais por grupo). Análise estatística: Teste t-Student não pareado; \* $p < 0,05$

A massa do fígado e do coração relativa ao peso do animal apresentou-se 1,08 e 1,22 vezes maior, respectivamente, no grupo tratado com óleo de peixe, quando comparado ao grupo óleo de soja (Tabela 5).

**Tabela 5 – Peso dos tecidos adiposo marrom, hepático e cardíaco ao final das 11 semanas de tratamento com dieta contendo óleo de soja ou óleo de peixe como fonte lipídica.**

<b>Tecido</b>	<b>Óleo de Soja</b>	<b>Óleo de Peixe</b>
Tecido adiposo marrom subescapular (mg/g de peso)	0,98 ± 0,18	1,44 ± 0,17
Fígado (mg/g de peso)	35,99 ± 0,57	38,94 ± 1,20*
Coração (mg/g de peso)	3,04 ± 0,13	3,70 ± 0,22*

(n=8 por grupo; resultados representados em grama de tecido por grama de peso corporal e expressos como média ± erro padrão; Análise estatística: Teste t-Student não pareado; \*p<0,05)

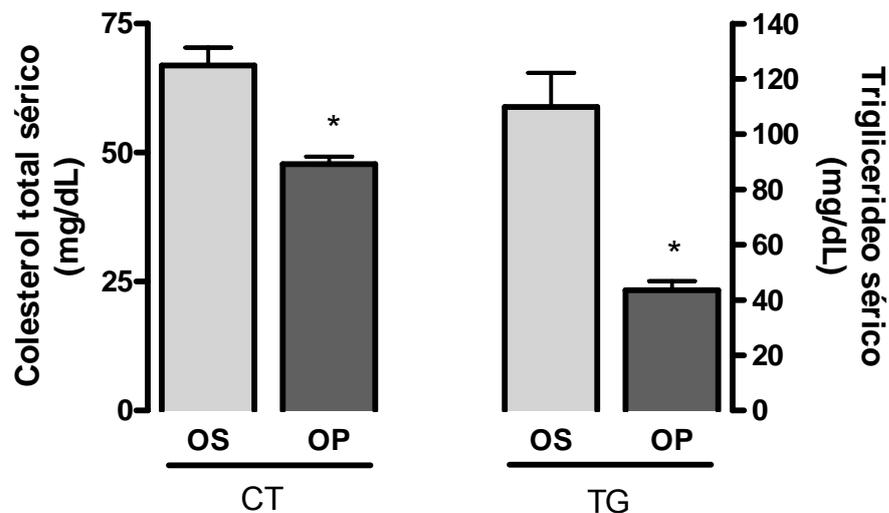
A avaliação da composição corporal dos animais revelou uma menor quantidade em gramas de água, lipídeos e proteína no grupo óleo de peixe, representando 70,7%, 67,6% e 54,6%, respectivamente, do grupo óleo de soja. Entretanto, a normalização destes parâmetros para 100 gramas de peso da carcaça aboliu as diferenças no compartimento aquoso (p=0,27) e lipídico (p=0,61), enquanto o grupo tratado com óleo de peixe manteve um compartimento protéico 14,4% menor do que o grupo alimentado com óleo de soja (p<0,01) (Tabela 6).

**Tabela 6 – Composição corporal dos animais na 11ª semana de tratamento com dieta contendo óleo de soja ou óleo de peixe como fonte lipídica.**

<b>Compartimento</b>	<b>Óleo de Soja</b>	<b>Óleo de Peixe</b>
<b>Gramas (g)</b>		
Água	100,30 ± 2,81	70,88 ± 2,46*
Lipídeo	23,52 ± 1,60	15,90 ± 1,41*
Proteína	25,51 ± 1,80	13,94 ± 0,66*
<b>Gramas (g) / 100g de carcaça</b>		
Água	41,46 ± 0,18	41,11 ± 0,25
Lipídeo	10,42 ± 0,87	9,79 ± 0,82
Proteína	27,63 ± 0,66	23,66 ± 0,94*

(n=8 por grupo; resultados representados por compartimento em gramas totais da carcaça e corrigidos por 100g de carcaça. Os valores estão expressos como média ± erro padrão; Análise estatística: Teste t-Student não pareado; \*p<0,05)

A dieta ofertada até a 11<sup>a</sup> semana de idade promoveu alterações no perfil lipídico. Os animais que receberam dieta contendo óleo de peixe apresentaram menor concentração sérica de colesterol ( $p < 0,0001$ ) e triglicerídeo sérico ( $p < 0,0001$ ) (Figura 13), representando 71,4% e 39,7% do grupo tratado com óleo de soja, respectivamente. Apesar de não se observar alteração na concentração sérica de LDL ( $p = 0,80$ ), as concentrações séricas de HDL ( $p < 0,05$ ) e VLDL ( $p < 0,05$ ) apresentaram-se reduzidas no grupo alimentado com óleo de peixe, representando apenas 73,6% e 39,4% do grupo óleo de soja. No entanto a razão colesterol total/HDL não foi alterada, assim como a concentração sérica de proteína total ( $p = 0,51$ ) (Tabela 7).



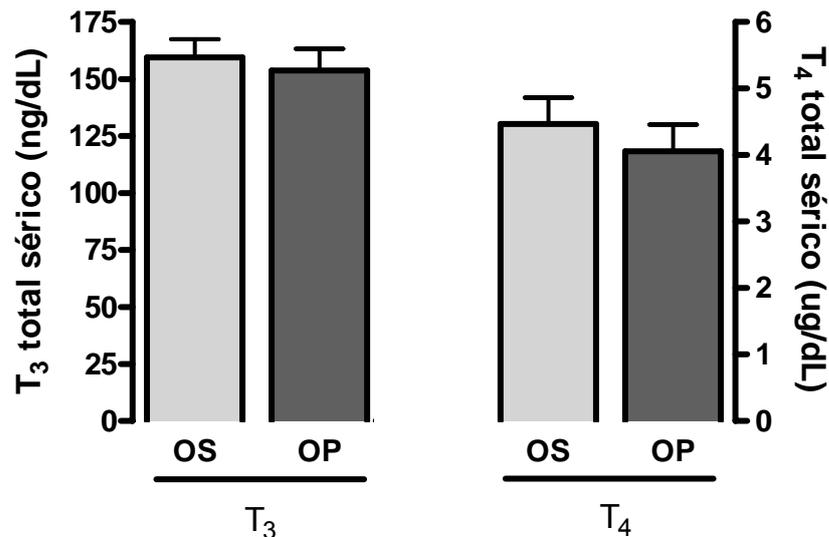
**Figura 13 – Concentração sérica de colesterol total (CT) e triglicerídeo (TG) ao final das 11 semanas de tratamento com dieta contendo óleo de soja (OS) ou óleo de peixe (OP) como fonte lipídica.** Os valores (em mg/dL) estão expressos como média  $\pm$  erro padrão ( $n = 8$  animais por grupo). Análise estatística: Teste t-Student não pareado;  $*p < 0,0001$

**Tabela 7 – Concentração sérica do colesterol em frações e da proteína total ao final das 11 semanas de tratamento com dieta contendo óleo de soja ou óleo de peixe como fonte lipídica.**

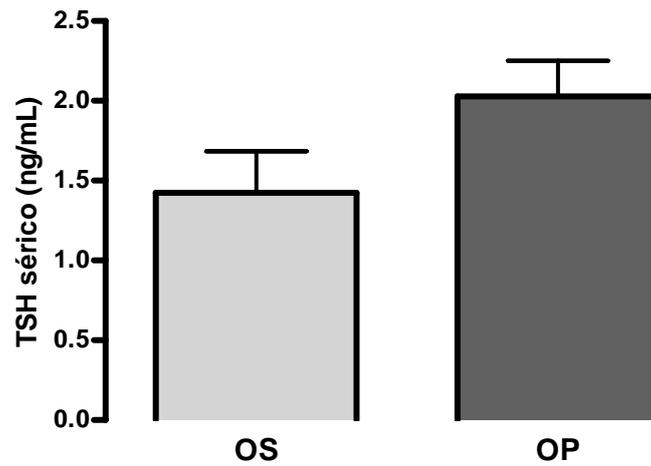
	<b>Óleo de Soja</b>	<b>Óleo de Peixe</b>
HDL (mg/dL)	25,13 ± 1,90	18,50 ± 1,04*
LDL (mg/dL)	19,88 ± 2,77	20,63 ± 0,92
VLDL (mg/dL)	21,88 ± 2,43	8,62 ± 0,62*
Razão colesterol total/HDL	2,73 ± 0,18	2,62 ± 0,11
Proteína total (g/dL)	6,19 ± 0,10	6,04 ± 0,19

(n=8 por grupo; resultados expressos como média ± erro padrão; Análise estatística: Teste t-Student não pareado; \*p<0,05)

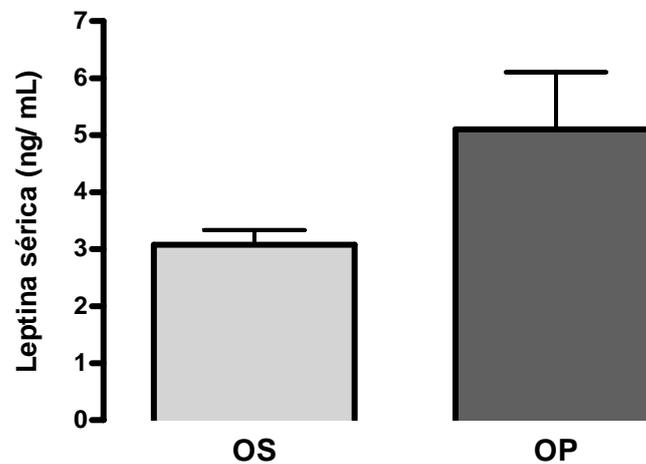
Os parâmetros hormonais analisados apresentaram-se inalterados em relação à dieta ofertada. As concentrações séricas dos hormônios tireoideanos, T<sub>3</sub> (p=0,65) e T<sub>4</sub> (p=0,48) totais, apresentaram-se similares entre os grupos (Figura 14), apesar de se observar uma tendência a aumento na concentração sérica de TSH (sem relevância estatística) (p=0,10) (Figura 15). Não foi observada diferença significativa na concentração de leptina sérica (p=0,09) (Figura 16).



**Figura 14 – Concentração sérica de T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> totais ao final das 11 semanas de tratamento com dieta contendo óleo de soja (OS) ou óleo de peixe (OP) como fonte lipídica.** Os valores estão expressos como média ± erro padrão (n=8 animais por grupo). Análise estatística: Teste t-Student não pareado.

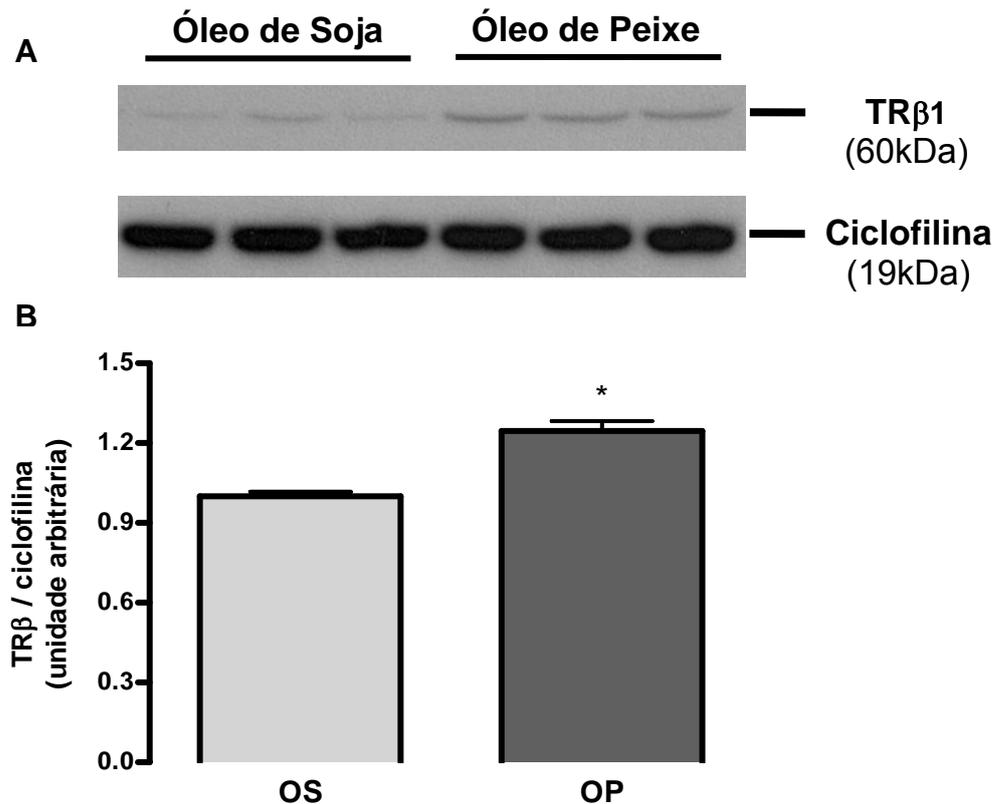


**Figura 15 – Concentração sérica de TSH ao final das 11 semanas de tratamento com dieta contendo óleo de soja (OS) ou óleo de peixe (OP) como fonte lipídica. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão (n=8 animais por grupo). Análise estatística: Teste t-Student não paramétrico (teste de Mann-Whitney)**



**Figura 16 – Concentração sérica de Leptina ao final das 11 semanas de tratamento com dieta contendo óleo de soja (OS) ou óleo de peixe (OP) como fonte lipídica. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão (n=8 animais por grupo). Análise estatística: Teste t-Student não pareado**

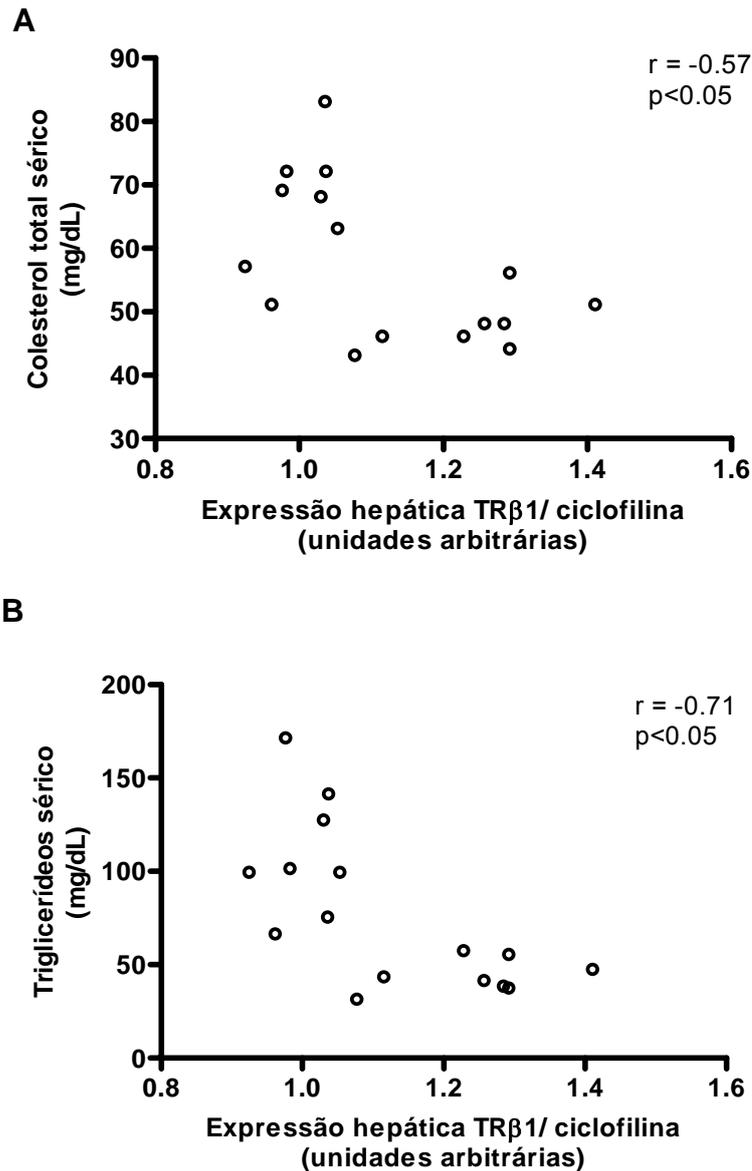
Apesar de não se observar diferenças nas concentrações séricas de hormônios tireoideanos, a expressão do receptor nuclear hepático de hormônio tireoideano (TR $\beta$ 1) mostrou-se 1,24 vezes maior no grupo tratado com óleo de peixe em comparação ao grupo tratado com óleo de soja ( $p < 0,0001$ ) (Figura 17).



**Figura 17 – Expressão hepática do TR $\beta$ 1 ao final das 11 semanas de tratamento com dieta contendo óleo de soja (OS) ou óleo de peixe (OP) como fonte lipídica.** (A) Radiografia do *western blotting* utilizando anticorpos contra TR $\beta$ 1 e ciclofilina (controle interno). (B) Razão da expressão do TR $\beta$ 1 e ciclofilina avaliada por densitometria (unidades arbitrárias). Os resultados estão normalizados para o controle de cada membrana. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão ( $n=8$  animais por grupo). Análise estatística: Teste t-Student não pareado;  $*p < 0,0001$

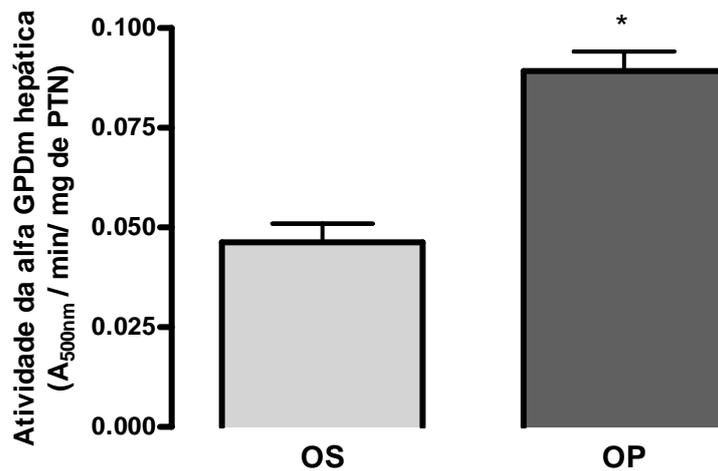
As alterações no perfil lipídico foram correlacionadas à maior expressão do TR $\beta$ 1 hepático no grupo alimentado com óleo de peixe, corroborando a sugestão do envolvimento da ação dos hormônios tireoideanos sobre o efeito hipolipemiante do óleo de peixe. Foram

observadas correlações negativas entre a expressão do TR $\beta$ 1 hepático e a concentração sérica de colesterol ( $r=-0,66$ ;  $p<0,01$ ), assim como com a concentração sérica de triglicerídeo ( $r=-0,68$ ;  $p<0,01$ ) (Figura 18).



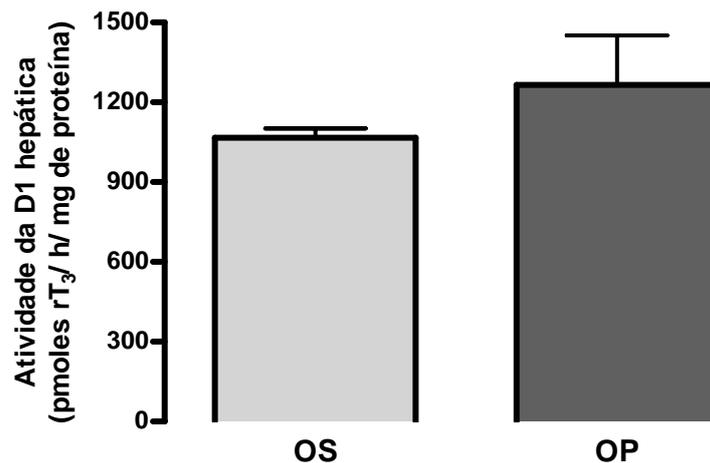
**Figura 18 – Correlação entre a expressão hepática do TR $\beta$ 1 e o perfil lipídico dos animais alimentados com dieta contendo óleo de soja (OS) ou óleo de peixe (OP) como fonte lipídica durante o período experimental. (A) Correlação negativa entre a expressão do TR $\beta$ 1 hepático (corrigido pela ciclofilina e expresso em unidades arbitrárias) e a concentração sérica de colesterol total ( $r=-0,66$ ). (B) Correlação negativa entre a expressão do TR $\beta$ 1 hepático e a concentração sérica de triglicerídeos ( $r=-0,68$ ). Análise estatística: Correlação não paramétrica – Teste de Spearman.**

A atividade da enzima alfa glicerofosfato desidrogenase mitocondrial hepática ( $\alpha$ GPDm), um marcador sensível à ação dos hormônios tireoideanos, apresentou-se maior no grupo tratado com dieta a base de óleo de peixe ( $p < 0,0001$ ) (Figura 19), representando atividade 1,93 vezes maior do que o grupo alimentado com óleo de soja.

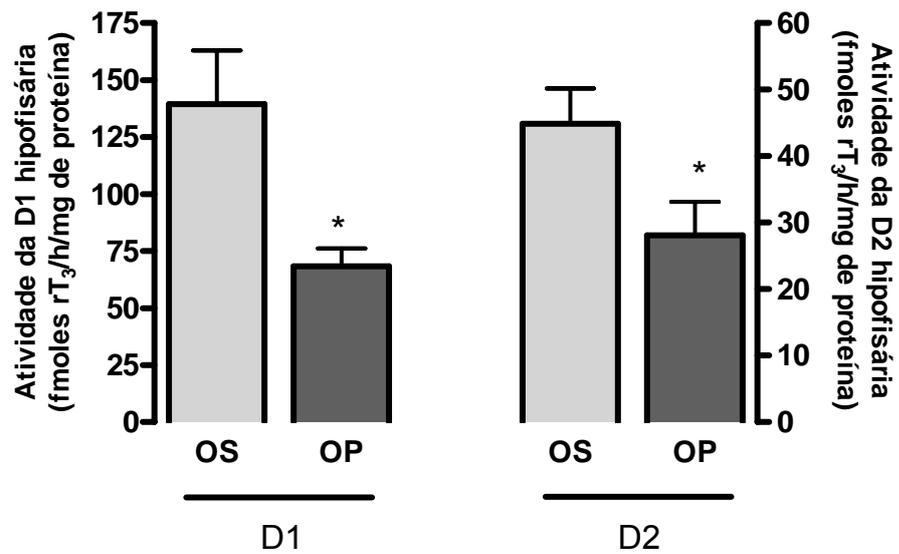


**Figura 19 – Atividade da enzima alfa glicerofosfato desidrogenase mitocondrial (alfaGPD-m) hepática ao final das 11 semanas de tratamento com dieta contendo óleo de soja (OS) ou óleo de peixe (OP) como fonte lipídica.** Os resultados são expressos como  $A_{500nm}$  (absorbância no espectrofotometro a 500nm) por minuto por miligrama de proteína. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão ( $n=8$  animais por grupo). Análise estatística: Teste t-Student não pareado; \* $p < 0,0001$

A atividade da desiodase do tipo 1 hepática (D1), um importante marcador do estado tireoideano, não apresentou diferença entre as dietas ( $p=0,31$ ) (Figura 20). No entanto, a atividade das desiodases hipofisárias do tipo 1 ( $p<0,05$ ) e 2 ( $p<0,05$ ) (D1 e D2, respectivamente) foi menor no grupo alimentado com dieta contendo óleo de peixe como fonte lipídica (Figura 21), representando 49% e 62,6% respectivamente da atividade apresentada pelo grupo tratado com óleo de soja.



**Figura 20** – Atividade da desiodase do tipo 1 (D1) em homogenatos hepáticos ao final das 11 semanas de tratamento com dieta contendo óleo de soja (OS) ou óleo de peixe (OP) como fonte lipídica. Os resultados são expressos como picomoles de rT<sub>3</sub> desiodado por hora por mg de proteína. Os valores estão expressos como média ± erro padrão (n=8 animais por grupo). Análise estatística: Teste t-Student não pareado



**Figura 21 – Atividade das desiodases do tipo 1 (D1) e tipo 2 (D2) adenohipofisárias ao final das 11 semanas de tratamento com dieta contendo óleo de soja (OS) ou óleo de peixe (OP) como fonte lipídica.** Os resultados são expressos como femtomoles de rT<sub>3</sub> desiodado por hora por mg de proteína. Os valores estão expressos como média ± erro padrão (n=8 animais por grupo). Análise estatística: Teste t-Student não pareado; \*p<0,05

## 5 DISCUSSÃO

---

Neste trabalho demonstramos que o tipo de lipídeo utilizado em dietas normolipídicas e isocalóricas, administradas por toda a vida do animal, incluindo o período de lactação, pode acarretar em distintos perfis metabólicos e modificar as vias de sinalização do hormônio tireoideano.

Pudemos atribuir as diferentes características observadas entre os grupos experimentais ao lipídeo dietético, devido ao protocolo utilizado em que o modelo de comparação (controle) era a dieta elaborada a partir dos mesmos ingredientes, entretanto, contendo óleo de soja (fonte de AGPI n-6). Optamos por este modelo dadas as dificuldades de controle da composição da ração padrão comercial durante todo o protocolo experimental, e a interferência de outros ingredientes na comparação entre os grupos. O óleo de soja foi o óleo controle escolhido por ser a principal fonte lipídica consumida na dieta ocidental (Simopoulos, 2002), e por ser a fonte lipídica recomendada pela AIN-93 (Reeves e col., 1993).

No nosso modelo experimental, apesar da oferta de lipídeos (15%) ser pouco maior do que a recomendada pela AIN-93M (10%), o percentual não constitui ainda um modelo de dieta hiperlipídica (Rao, 1996). Desta forma, nosso modelo permite que os resultados observados sejam decorrentes da qualidade do lipídeo ofertado e não do seu excesso. Esta característica da dieta é importante visto que a ação dos hormônios tireoideanos é suscetível não apenas à qualidade da energia ofertada, mas também à sua quantidade (Danforth e Burger, 1989; Redonnet e cols., 2001).

A dieta utilizando como principal fonte lipídica AGPI n-3 (óleo de peixe) promoveu menor ganho de peso corporal em relação ao grupo tratado com óleo de soja (Figura 10), rico em AGPI n-6, mesmo contendo a mesma quantidade em Calorias e em lipídeos. A diferença no peso corporal não foi promovida por alteração do consumo alimentar (Figura

11), sugerindo alteração do metabolismo energético, provavelmente decorrente da ação oxidativa descrita para os AGPI n-3 presentes no óleo de peixe (Davidson, 2006).

O efeito dos AGPI n-3 de promoção de menor ganho de peso corporal comparado a outros lipídeos dietéticos é descrito em diversos trabalhos, os quais em sua grande maioria utilizam modelos de dieta hiperlipídica (Tsuboyama-Kasaoka e cols., 1999; Kim e cols., 1999; Nakatani e cols., 2003; Flachs e cols., 2005; Neschen e cols., 2006). Mesmo administrada por curto período de tempo (07 e 15 dias), a dieta hiperlipídica contendo óleo de peixe foi capaz de promover menor ganho de peso corporal e adiposidade quando comparada a dieta contendo AGPI n-6 como fonte lipídica (Nakatani e cols., 2003; Neschen e cols., 2006).

No entanto, a maior parte dos escassos modelos com dieta normolipídica não promoveram diferença de peso nos animais (Herzberg & Rogerson, 1988; Raclot e cols., 1997; Chapman e cols., 2000; Wyrwoll e cols., 2006; Corporeau e cols., 2006; Le Foll e cols., 2007). Alguns poucos trabalhos, contraditoriamente, relatam ainda aumento do peso corporal dos animais submetidos à dieta contendo óleo de peixe (Gaíva e cols., 2001; Soriguer e cols., 2003). Os dados da literatura demonstram grande diversidade de protocolos experimentais, quanto à administração, concentração do óleo e tempo de tratamento, justificando algumas diferentes respostas observadas.

Neste trabalho, obtivemos observações semelhantes à de Guimarães (2006) quanto ao ganho de peso dos animais. Estes autores utilizaram o mesmo desenho experimental que o nosso, entretanto com oferta da dieta desde a gestação. No entanto, em estudo temporal similar ao nosso trabalho, onde a dieta normolipídica foi oferecida durante a lactação e após o desmame até o fim da vida (6 meses de idade), não foi observada diferenças no peso corporal do grupo tratado com fonte de AGPI n-3 quando comparado a outra fonte lipídica (AGPI n-9) (Wyrwoll e cols., 2006). A diferença no percentual lipídico do modelo apresentado por este autor em comparação ao nosso modelo (5 e 7 % do peso da ração representada por lipídeos, respectivamente) não parece ser o suficiente para justificar as diferentes observações quanto ao peso corporal dos animais. No entanto, as

composições dos óleos utilizados não são iguais. Os AGPI n-3 da fonte lipídica utilizada no trabalho de Wyrwoll e cols (2006) representam 34% dos AG totais, enquanto no nosso óleo (ROPUFA-75 n-3 EE) os AGPI n-3 constituem aproximadamente 75% dos AG totais. A maior oferta destes AGPI n-3 intensificaria sua ação favorecendo os seus efeitos.

Em humanos, os efeitos dos AGPI n-3 sobre peso corporal e adiposidade não são comuns, mas já foram relatados por alguns autores. A substituição diária de 6g dos lipídeos por óleo de peixe em uma dieta controle oferecida a indivíduos saudáveis, durante 2 semanas, promoveu pequena redução no percentual de gordura (Couet e cols., 1997). Já a associação do aumento do consumo de peixes à dieta de restrição calórica, intensificou a perda de peso e a melhora dos lipídeos séricos em indivíduos hipertensos com sobrepeso (Mori e cols., 1999).

No modelo utilizado neste trabalho, apesar da menor massa total de lipídeos, água e proteína observada na carcaça do grupo tratado com óleo de peixe comparado ao grupo que recebeu óleo de soja, a massa relativa ao peso total da carcaça dos animais revelou contribuição semelhante do compartimento adiposo e aquoso entre os grupos, com menor contribuição do compartimento protéico no grupo tratado com óleo de peixe (Tabela 6). Uma vez que utilizamos a carcaça eviscerada, o compartimento protéico se constituía predominantemente da musculatura esquelética. No entanto, as vísceras, como fígado e coração apresentaram massa aumentada, o que presumivelmente está associado a maior massa protéica. Portanto, nos questionamos se no organismo como um todo do animal haveria ou não alteração do compartimento protéico.

Os dados da literatura acerca da influência do óleo de peixe sobre a composição corporal, utilizando a técnica da carcaça são escassos e contraditórios. Em modelo de dieta hiperlipídica, a carcaça dos animais alimentados com óleo de peixe apresentaram percentual de lipídeos igual ou menor, assim como percentual de proteína igual ou menor ao da carcaça de animais alimentados com fonte de AGPI n-6 (Awad e cols., 1990; Gaíva e cols., 2001).

Em modelo de avaliação do ganho de peso espontâneo com administração de dieta normolipídica, o óleo de peixe promoveu menor percentual de proteína quando comparado ao grupo tratado com mistura de óleo de palma (AG saturado) e óleo de soja, entretanto, em modelo de realimentação utilizando a mesma dieta, não foi observada diferença no compartimento protéico (Soriguer e cols., 2003). Já em outro trabalho, Dulloo e cols (1995) observaram que a realimentação de ratos, previamente em restrição alimentar, utilizando dieta rica em óleo de peixe resultou em menor acúmulo de proteína na carcaça com maior acúmulo de gordura, quando comparado a dieta contendo óleo de girassol. Apesar dos resultados discrepantes a respeito do percentual de proteína, a redução observada no nosso modelo e em outros não seria um efeito esperado do óleo de peixe, dada sua ação benéfica sobre o metabolismo protéico descrita por outros autores em modelos de caquexia e queimadura (Hirschberg e cols., 1990; Smith e cols., 2004). A administração oral de EPA durante 4 dias promoveu redução de 88% na degradação protéica do músculo gastrocnêmico de camundongos com caquexia, sem alterar a síntese protéica, contribuindo para a menor perda de peso desses animais (Smith e cols., 2004). Entretanto também já foi relatada diminuição de síntese protéica associada a menor degradação protéica muscular em ratos recebendo dietas ricas em AGPI n-3, no entanto, sem alterar o peso corporal (Sohal e cols.,1992). Como as dietas diferem em composição de proteínas, tanto em percentual como em fonte protéica, poderiam promover diferentes efeitos sobre o metabolismo protéico. No entanto, o tratamento dos animais no nosso modelo experimental utilizou as fontes e os percentuais adequados para a fase de desenvolvimento do animal (Reeves e cols., 1993).

Assim, a deposição de energia nos diferentes compartimentos corporais parece ser influenciada pela fonte de AG utilizado, entretanto, as respostas observadas parecem depender das particularidades dos modelos, como o estado fisiológico ou patológico dos animais, a composição das dietas e o tempo de administração, além da variável precisão das técnicas de avaliação da composição corporal.

Muitos autores têm associado a redução do ganho de peso corporal promovido pelo óleo de peixe, à redução da adiposidade ou de um dos compartimentos adiposos (Tsuboyama-Kasaoka e cols., 1999, Nakatani e cols., 1999; Wang e cols., 2002; Flachs e cols., 2005,). No nosso modelo não observamos redução no percentual de gordura da carcaça do animal tratado com óleo de peixe, mas sim alteração no padrão de distribuição do tecido adiposo, com menor massa do tecido adiposo retroperitoneal e maior massa do tecido adiposo inguinal (Figura 12). Estes dados sugerem redistribuição na massa de tecido adiposo, caracterizada por menor acúmulo de tecido adiposo visceral e maior acúmulo de tecido adiposo subcutâneo.

A ação dos AGPI n-3 modulando a distribuição do tecido adiposo já vem sido descrita por outros autores. A maior parte dos trabalhos quantificam isoladamente a massa dos tecidos adiposos representantes do compartimento visceral, como o epididimal ou retroperitoneal, sendo observado em grande parte dos resultados menor acúmulo destes tecidos (Wang e cols., 2002; Flachs e cols., 2005). Ao quantificar a massa do compartimento adiposo visceral e subcutâneo, Belzung e colaboradores (1993) observaram redução na massa visceral, sem alteração no compartimento subcutâneo entre animais alimentados com dieta hiperlipídica contendo alta concentração de AGPI n-3 quando comparado à dieta contendo baixa concentração deste AG. O padrão de resposta diferente deste trabalho em comparação ao nosso, em relação ao compartimento subcutâneo, pode ser conseqüente ao percentual lipídico da dieta, tempo ou modelo de comparação utilizado.

Esta alteração no padrão de distribuição do tecido adiposo poderia favorecer as ações do óleo de peixe sobre metabolismo lipídico e glicídico, dada as diferentes características de expressão e de secreção de adipocinas dos compartimentos adiposos (Arner, 2001). Enquanto o tecido adiposo visceral possui maior expressão e por isso maior capacidade de secreção de adipocinas de caráter pró-inflamatório, promotoras de resistência à insulina, tais como resistina e outras, as adipocinas com ação benéfica sobre a sensibilidade à insulina e metabolismo energético, como adiponectina e leptina, são produzidas em maior quantidade no tecido adiposo subcutâneo (Van Harmelen e cols., 1998; Phillips e cols., 2008).

Além de afetar o padrão de distribuição, os AGPI n-3 têm demonstrado a capacidade de afetar diferentemente as características dos tecidos adiposos, sendo relatado aumento na expressão do RNAm da adiponectina (Neschen e cols. 2006, Guimarães, 2006) no tecido adiposo epididimal, assim como redução da expressão do RNAm da leptina no tecido adiposo retroperitoneal (Raclot e cols., 1997; Guimarães, 2006), sem alteração da expressão no tecido adiposo subcutâneo.

Os efeitos dos AGPI n-3 sobre a expressão e secreção de leptina ainda são contraditórios. A administração de dieta hiperlipídica contendo óleo de peixe por um curto (15 dias) (Neschen e cols., 2006) ou por um longo período (7 semanas) (Wang e cols., 2002) promoveu menor concentração sérica de leptina em camundongos, quando comparada a dieta contendo óleo de girassol (AGPI n-6). Entretanto, a administração de dieta hiperlipídica por 10 semanas promoveu maior concentração sérica de leptina nos grupos tratado com óleo de peixe (AGPI n-3) ou óleo de girassol (AGPI n-6) quando comparado ao grupo alimentado com fonte de AG saturados (Cha & Jones, 1998). Rossi e colaboradores (2005), utilizando modelo de dieta normolipídica rica em sacarose, observaram maior concentração sérica de leptina após 2 meses de tratamento com óleo de peixe, quando comparado ao grupo alimentado com fonte de AGPI n-6.

Em ensaios *in vitro*, a contradição quanto aos efeitos do AGPI n-3 também existe. A incubação de cultura primária de adipócitos com EPA durante 96 horas aumentou a secreção e expressão do RNAm da leptina (Pérez-Matute e cols., 2005), enquanto a incubação de adipócitos 3T3-L1 com EPA promoveu menor expressão do RNAm da leptina após 48 horas (Reseland e cols., 2001).

No nosso modelo experimental não observamos diferenças significativas na concentração sérica de leptina, apesar da tendência a aumento desta no grupo OP ( $p=0,09$ ) (Figura 16). Sua tendência a maior concentração poderia ser justificada pela maior massa de tecido adiposo subcutâneo apresentada pelo grupo tratado com óleo de peixe, já que este tecido tem capacidade de secreção de leptina duas a três vezes maior do que o tecido adiposo visceral (Van Harmelen e cols., 1998).

Utilizando o mesmo modelo experimental que o nosso, entretanto, com oferta das dietas a partir da gestação, Guimarães (2006) observou redução na expressão do RNAm da leptina e menor concentração de leptina sérica. A única diferença entre o nosso modelo experimental e o de Guimarães (2006) seria a oferta do óleo durante a gestação. O suprimento de nutrientes fornecidos pela mãe durante a vida intrauterina associado à capacidade de adaptação metabólica deste feto às condições ambientais as quais é submetido durante o desenvolvimento, são capazes de programar condições metabólicas que acompanharão o indivíduo ao longo de sua vida (Moura e Passos, 2005). Assim, condições como desnutrição (Lisboa e cols., 2008), manipulações dietéticas (Joshi e cols., 2003) e até mesmo exposição a altas concentrações de leptina (de Oliveira Cravo e cols., 2002) durante a fase neonatal podem programar mecanismos que na vida adulta do animal culminarão em alterações na deposição de tecido adiposo e na concentração sérica de alguns hormônios, como leptina e hormônio tireoideano. Assim, a exposição dos AGPI n-3 durante a vida intrauterina, promovida pelo modelo de Guimarães (2006), poderia resultar em programação metabólica, que justificaria as diferenças na produção de leptina entre o modelo deles e o nosso, observadas na vida adulta dos animais.

Observamos, no nosso modelo experimental, menor concentração sérica de triglicerídeos e colesterol no grupo tratado com óleo de peixe (Figura 13), corroborando dados da literatura quanto à sua ação hipolipemiante (Al-Shurbaji e cols., 1991; Rustan e cols., 1992; Kim e cols., 1999; Sugiyama e cols., 2008). As alterações no perfil lipídico são mais sensíveis à ação do óleo de peixe do que o peso corporal, aparecendo de forma rápida em dietas hiperlipídicas (Neschen e cols., 2006) e suplementação (Willumsen e cols., 1993) e até mesmo em dietas normolipídicas (Herzberg e Rogerson, 1988).

Em modelo de suplementação oral, com uma única dose diária, o óleo de peixe promoveu redução no triglicerídeo sérico e colesterol, após o primeiro e quinto dia de tratamento, respectivamente (Willumsen e cols., 1993). A redução do triglicerídeo sérico, assim como em nosso modelo e em outros (Neschen e cols., 2006), foi mais intensa, sugerindo maior suscetibilidade deste lipídeo à ação dos AGPI n-3. Esta característica

provavelmente é dada pelos diferentes mecanismos hipolipemiantes do óleo de peixe, que abrangem vários pontos limitantes e determinantes para a concentração de triglicerídeo sérico (Davidson, 2006; Jump, 2008; Jump e cols., 2008). Os mecanismos descritos para a ação hipocolesterolêmica não seriam tão amplos já que não contemplam todas as possíveis vias (Jump, 2008).

Em revisão da literatura, Herold e Kinsella (1986) relatam que em humanos, a redução no triglicerídeo é observada na maior parte dos ensaios clínicos, sendo demonstrado melhor efeito em indivíduos hiperlipidêmicos. No entanto, os efeitos sobre colesterol total e HDL não são tão evidentes, sendo dependentes do modelo e dose utilizada.

Um dos mecanismos hipolipemiantes do óleo de peixe envolve a redução da síntese e secreção de VLDL pelo fígado (Lombardo e cols., 2006), resultando em menor concentração sérica de VLDL que contribui para a redução na concentração de LDL. Corroborando os dados da literatura, observamos redução de 61% na concentração sérica de VLDL (Tabela 7). No entanto, inesperadamente, não houve alteração na concentração sérica de LDL (Tabela 7). O efeito inesperado sobre a concentração de LDL já foi observado em outros trabalhos (Stalenhoef e cols., 2000). A justificativa do autor para a não alteração ou aumento da concentração da LDL é que a depleção de triglicerídeo nas lipoproteínas precursoras de LDL (VLDL e IDL) facilitaria sua conversão a LDL, devido ao seu tamanho reduzido e densidade aumentada.

A redução na concentração dos lipídeos séricos foi acompanhada por redução de 26% na concentração de HDL (Tabela 7), lipoproteína responsável pelo transporte reverso de colesterol, no grupo tratado com óleo de peixe. Baixas concentrações desta lipoproteína são descritas como fator de risco para doenças coronarianas (Li e cols., 2004), devido à redução na proporção de HDL para a concentração total de colesterol. No entanto, apesar da menor concentração de HDL, o grupo tratado com óleo de peixe apresentou razão colesterol total: HDL similar ao grupo tratado com óleo de soja (Tabela 7), demonstrando que a redução na concentração de HDL é reflexo, proporcional, da redução do colesterol total. O mesmo

comportamento na concentração sérica de HDL já foi demonstrado por outros autores (Roach e cols., 1987; Gaíva e cols., 2003; Neschen e cols., 2006).

A princípio o modelo experimental pareceu incapaz de alterar o estado tireoideano, já que não foram observadas diferenças nas concentrações séricas de  $T_3$  e  $T_4$  totais (Figura 14). Entretanto, a expressão hepática do receptor de hormônio tireoideano,  $TR\beta 1$ , apresentou-se 24% maior no grupo alimentado com óleo de peixe (Figura 17), sugerindo aumento da ação do hormônio neste tecido. Dada a importância da isoforma  $TR\beta 1$  no fígado sobre o metabolismo lipídico (Gullberg e cols., 2002), o aumento desta expressão favoreceria a maior responsividade deste tecido ao hormônio, podendo ser determinante para acentuar as ações hipolipemiantes dos hormônios tireoideanos. Neste trabalho, observamos, ainda, correlação negativa entre a expressão do  $TR\beta 1$  hepático e as alterações no perfil lipídico. Estes dados sugerem que o aumento do receptor hepático aumentaria a ação local do hormônio, e estaria envolvido no efeito hipolipemiante observado neste modelo experimental.

Em relação ao comportamento da concentração sérica dos hormônios tireoideanos, os nossos resultados concordam com Tsuboyana-Kasaoka e colaboradores (1999). Apesar destes autores terem empregado dieta hiperlipídica, também não observaram alterações na concentração destes hormônios em camundongos alimentados com dieta contendo óleo de peixe por 5 meses, em comparação ao grupo que recebeu óleo de girassol (AGPI n-6). Entretanto, utilizando dieta hiperlipídica, Cha e Jones (1998) observaram menor concentração sérica de  $T_4$ , mas não de  $T_3$ , em animais alimentados com óleo de peixe em comparação ao óleo de girassol.

Apesar de não haver diferenças na concentração sérica de  $T_3$  e  $T_4$  totais entre os grupos do nosso modelo experimental, o aumento na fração livre do hormônio poderia ser esperado já que outros AG demonstraram, em experimento agudo, a capacidade de aumentar o percentual da fração livre do hormônio (Hollander e cols., 1967). Entretanto, a dosagem de  $T_3$  e  $T_4$  livre não foi realizada no nosso modelo, já que em experimentos

crônicos seria esperado o restabelecimento das concentrações normais do hormônio, por ação do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide.

Quanto à expressão do receptor de hormônio tireoideano, há escassos dados na literatura em modelos distintos do nosso. A administração de dieta rica em sacarose suplementada com óleo de peixe (representando 30% dos lipídeos totais) durante duas semanas provocou redução do RNAm da isoforma TR $\alpha$ 1 no fígado de ratos (Brtko e cols. 1997). No entanto, a oferta de dieta rica em carboidrato suplementada com 10% de óleo de peixe durante 3 horas ao dia (por 5 dias) não surtiu efeito sobre a expressão do RNAm do TR $\beta$ 1 hepático (Jump e cols., 1994). Os efeitos contraditórios possivelmente devem-se a diferença nos modelos experimentais e à composição dos óleos de peixe utilizados, podendo também ocorrer modulação isoforma específica. O percentual de lipídeos ofertados também poderia ser determinante no efeito observado. A dieta hiperlipídica por si só já demonstra a capacidade de diminuir a expressão do RNAm do TR (Redonnet e cols., 2001). Desta forma, a administração de dieta normolipídica descartaria os supostos efeitos promovidos pelo excesso de lipídeo dietético, garantindo que o determinante do efeito seja a qualidade do lipídeo.

Como já descrito anteriormente, a concentração sérica de T<sub>3</sub> não seria o único mecanismo determinante de sua ação. Outros mecanismos, dentre os quais a disponibilidade de receptor nuclear, modulam a ação dos hormônios tireoideanos sobre seus tecidos alvos. A importância do receptor modulando os efeitos deste hormônio são evidentes em estudos de Oppenheimer e colaboradores (1977). Os autores observaram que o aumento da atividade das enzimas hepáticas alvos de hormônio tireoideano,  $\alpha$ GPD e enzima málica, em resposta à administração de concentrações crescentes de T<sub>3</sub> não é proporcional à dose utilizada. A saturação do efeito, refletida pela não linearidade de indução da enzima alvo, seria decorrente da saturação do receptor nuclear levando a resposta hormonal máxima (Oppenheimer e cols., 1977) e sugerindo que o percentual de ocupação do receptor seja determinante para a ação do hormônio.

Em ratos eutireoideos, 35-50% dos receptores são ocupados por hormônio tireoideano, na maior parte dos tecidos (Li e Inoue, 1994). Em tecidos como o fígado, o aumento na concentração de  $T_3$  plasmático levaria ao aumento na sua concentração intracelular, dado o rápido equilíbrio estabelecido entre as concentrações de  $T_3$  no plasma e no núcleo (Oppenheimer e cols., 1973). O aumento na disponibilidade de sítios nucleares de ocupação seria um importante mecanismo para acentuar a ação do hormônio (Guerra e cols., 1994), seja no estado eutireoideo ou, principalmente, na sobrecarga do hormônio.

Entretanto, estudos *in vitro* têm sugerido mecanismos de competição entre hormônios tireoideanos e AG pela ligação ao TR, o que poderia reduzir a ação do hormônio (van der Klis e cols., 1989),

Desta forma, visando verificar se a maior expressão do TR $\beta$ 1 no fígado dos animais tratados com óleo de peixe se traduziria em intensificação da ação do hormônio, avaliamos a atividade de um alvo hepático bastante sensível à ação do hormônio, a enzima  $\alpha$ GPDm (Rauchová e cols., 2004). O controle de sua expressão por hormônios tireoideanos parece ser mediado de forma mais importante pela isoforma beta do TR, já que animais apresentando mutação na isoforma alfa, que inibe ligação ao hormônio, apresentam alteração na expressão do RNAm da  $\alpha$ GPDm correspondente ao estado tireoideano observado (Zavacki e cols., 2005). No nosso modelo experimental, a atividade da enzima apresentou-se 1,92 vezes maior no grupo tratado com óleo de peixe em comparação ao grupo tratado com óleo de soja (Figura 19), sugerindo maior ação do hormônio no fígado destes animais, mesmo sem alteração da concentração sérica do hormônio.

A correlação entre o aumento da expressão do TR e o aumento da ação do hormônio já foi relatada por Guerra e colaboradores (1994). Os autores observaram que a indução de  $T_3$  sobre a expressão e atividade da UCP1 em cultura primária de adipócitos marrons fetais imaturos foi acompanhada por aumento em duas vezes na expressão do RNAm do c-erbA (gene responsável pela expressão dos TR $\alpha$ ) e conseqüente aumento da capacidade de ligação do hormônio ao receptor nuclear. Nakamura e cols (1979) observaram que a

administração de uma única dose de  $T_3$  a ratos tireoidectomizados promoveu aumento da atividade da enzima  $\alpha$ GPD precedido do aumento na concentração de receptor nuclear, afirmando que a modulação do receptor está fortemente associada ao efeito hormonal. Estes dados sugerem que o aumento da expressão do receptor pode potencializar a ação do hormônio de forma mais importante que o aumento apenas de sua concentração, já que com maior número de receptores, a ocupação e a saturação do receptor seriam potencialmente aumentadas. Este constituiria um importante mecanismo de intensificação da ação do hormônio.

Entretanto, devemos considerar a hipótese de que o aumento na expressão do TR associado à não alteração na concentração intracelular do hormônio poderia levar ao maior número de receptores desocupados, favorecendo o efeito repressor independente de ligante. Este efeito é dado pela capacidade do TR não ligado ao hormônio de interagir com fatores transcricionais, como as proteínas co-repressoras *Nuclear Receptor Corepressor* (NCoR) e *Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor* (SMRT), inibindo a transcrição basal do gene alvo (Barra e cols., 2004). Entretanto, neste trabalho, não há nenhuma evidência que isto esteja ocorrendo, já que a enzima alvo  $\alpha$ GPDm está aumentada.

Atualmente, sabe-se que a via de sinalização do hormônio tireoideano mediada pelo TR, não constitui o único mecanismo de ação do hormônio. Mecanismos envolvendo proteínas de membrana, citosólicas ou mitocondriais são descritos mediando algumas das ações dos hormônios tireoideanos (Basset e cols., 2003). No entanto, grande parte dos efeitos destes hormônios sobre o metabolismo lipídico, até então descritos, são mediados pelos TRs (Gullberg e cols., 2002).

O  $TR\alpha$  também tem demonstrado ação no metabolismo hepático, no entanto sua importância sobre o metabolismo lipídico é bastante inferior à do  $TR\beta_1$ , mas nem por isso nula. Liu e colaboradores (2007) utilizando camundongos com mutação no  $TR\alpha$  capaz de reduzir em 50% a ligação ao hormônio tireoideano, demonstraram prejuízo na atividade de

enzimas oxidativas estimuladas por PPAR $\alpha$ . Este modelo além de revelar o envolvimento desta isoforma no tecido hepático, demonstrou claramente a interferência na sinalização de TRs e PPARs. Entretanto, a importância do TR $\beta$  torna-se evidente em modelo de camundongos *knockout* do TR $\beta$  associado à superexpressão do TR $\alpha$ , cuja incapacidade do T<sub>3</sub> em reverter o aumento do colesterol não foi abolida nem mesmo pelo excesso de TR $\alpha$  (Gullberg e cols., 2002). Considerando-se estes dados, neste trabalho, nos ativemos apenas à avaliação da expressão do TR $\beta$ 1 no fígado desses animais.

A influência dos AGPI n-3 sobre a enzima  $\alpha$ GPDC já foi observada por Higuchi e colaboradores (2008). Estes descreveram aumento na atividade em animais alimentados durante 12 semanas com dieta normolipídica contendo óleo de peixe. No entanto, o aumento observado foi relativo ao controle alimentado com fonte de AG saturados. Na literatura não encontramos relatos quanto a comparação dos efeitos de AGPI n-3 e n-6 sobre a atividade da  $\alpha$ GPDM.

A enzima hepática  $\alpha$ GPDM compõe a lançadeira glicerol-3-fosfato, que constitui um cruzamento entre o metabolismo lipídico e glicídico, assim como a principal entrada de glicerol na gliconeogênese (Alfadda e cols., 2004). A GPDC catalisa a conversão da diidroxicetona fosfato, intermediário da via glicolítica, em glicerol-3-fosfato, oxidando Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), formado durante a glicólise, a NAD. Em seguida a GPDM catalisa esta retroconversão, reduzindo Flavina adenina dinucleotídeo (FAD) a FADH<sub>2</sub>, que transporta elétrons diretamente para a cadeia respiratória, gerando duas moléculas de adenosina tri-fosfato (ATP) e calor para cada par de elétrons transportado (Voet & Voet, 1995; Nelson & Cox, 2006; Alfadda e cols., 2004).

A alta expressão da  $\alpha$ GPDM em tecidos com altas taxas de geração de ATP, como o músculo da asa de insetos, sugere importante ação no metabolismo energético (Weitzel e cols., 2001). Modelos de deleção (*Knock-out*) da  $\alpha$ GPDM reforçam seu papel sobre o metabolismo energético, já que sua ausência leva ao aumento da razão NADH/NAD, inibindo o metabolismo oxidativo de AG, reduzindo a termogênese e aumentando a

concentração plasmática de triglicerídeos (Alfadda e cols., 2004). Considerando-se essas ações, a ativação desta enzima contribuiria de forma importante para as adaptações metabólicas promovidas pelos AGPI n-3, favorecendo as vias oxidativas. Este seria apenas um dos muitos mecanismos hipolipemiantes dos hormônios tireoideanos que potencialmente contribuiriam para a redução do perfil lipídico promovida pelo óleo de peixe.

Contudo não podemos descartar a possibilidade de que outros mecanismos ativados pela ação dos AGPI n-3, independentes do TR, sejam os responsáveis pelo aumento na atividade da  $\alpha$ GPDm neste modelo experimental. Apesar de não existirem dados quanto a influência dos fatores transcricionais modulados pelos AGPI n-3 (SREBP-1c, HNF $\alpha$ -4 e ChREBP) sobre a atividade da  $\alpha$ GPD, o receptor nuclear PPAR tem demonstrado a capacidade de alterar sua atividade.

A administração de agonistas de PPAR $\alpha$  promoveu aumento na expressão e atividade da  $\alpha$ GPDm em ratos (Pacot e cols., 1993; Patsouris e cols., 2004). O aumento na expressão foi abolido em animais com deleção do PPAR $\alpha$  (Patsouris e cols., 2004), demonstrando a importância deste receptor em ativar esta enzima. No entanto, este papel parece depender dos hormônios tireoideanos, já que a magnitude de indução da enzima  $\alpha$ GPD por agonista de PPAR $\alpha$  é reduzida em animais hipotireoideos (Pacot e cols., 1993).

Esta dependência de ação entre TRs e PPARs já foi descrita por outros autores (de Lange e cols., 2007; Lui e cols., 2007) e sugere que as ações mediadas por um receptor poderiam sofrer contribuição do outro receptor.

Outro gene alvo, regulado positivamente pelo T<sub>3</sub> via TR $\beta$  é a D1 hepática que neste trabalho, não se mostrou significativamente diferente entre os grupos (Figura 20). Esta enzima, além de contribuir com a conversão de T<sub>4</sub> a T<sub>3</sub> para o meio extracelular (Bianco e Kim, 2006), é altamente sensível à concentração sérica dos hormônios tireoideanos (Zavacki e cols., 2005). Dado o aumento observado na expressão do TR $\beta$ 1 hepático e na atividade da  $\alpha$ GPDm, seria esperado o aumento concomitante da D1, já que tal isoforma do receptor medeia predominantemente sua expressão e atividade no tecido hepático (Amm e

cols., 2001). Isto poderia ocorrer devido ao fato dos hormônios tireoideanos estarem inalterados e, neste caso, a maior expressão do receptor não seria suficiente para aumentar a atividade da enzima. Estes dados revelam que a interferência dos AGPI n-3 presentes no óleo de peixe na atividade funcional de enzimas reguladas por hormônio tireoideano exibe especificidade de alvo, o que sugere o envolvimento de múltiplos mecanismos. No entanto, é possível que outros sinalizadores ativados pelos AGPI n-3 possam influenciar a atividade das desidases hepáticas. Uma possibilidade é a interação com o PPAR $\gamma$ , já que sua ativação em ratos, por administração de rosiglitazona durante 7 dias, reduziu o RNAm da desidase hepática (Festuccia e cols., 2008). Outra hipótese a ser testada seria uma possível regulação negativa da isoforma alfa do TR que também contribui para estimular a expressão da D1 (Ammann e cols., 2001).

Não existem dados na literatura acerca da influência do óleo de peixe sobre a atividade das desidases. No nosso trabalho, observamos regulação tecido-específica destas enzimas, na qual o óleo de peixe promoveu menor atividade das desidases hipofisárias sem alterar a atividade da desidase hepática. Outros modelos experimentais descritos na literatura também relatam diferentes comportamentos destas enzimas de acordo com o tecido estudado (Cabanelas e cols., 2006).

A modulação alvo específica da ação de hormônios tireoideanos por AGPI já foi descrita por outros autores utilizando AGPI n-6. Estes autores relataram que a administração de dieta contendo AGPI n-6 intensificou a perda de peso causada pelo T<sub>3</sub>, assim como atenuou o efeito estimulatório do T<sub>3</sub> em apenas algumas das proteínas de vias lipogênicas (Deshpande e cols., 1995).

Quanto às desidases hipofisárias, observamos menor atividade da D1 e D2 hipofisárias no grupo alimentado com dieta contendo óleo de peixe, representando 49% e 62,6%, respectivamente, da atividade apresentada pelo grupo tratado com óleo de soja (Figura 21).

A D2 promove conversão de T<sub>4</sub> a T<sub>3</sub> para uso no meio intracelular, contribuindo para a concentração celular de T<sub>3</sub> e, assim, determinando sua ação local, independente da

concentração plasmática de hormônio tireoideano (Bianco e cols., 2002; Kogai e Brent, 2005). As desidases hipotalâmicas e hipofisárias, especialmente a D2, possuem grande importância no controle do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide (Schneider e cols., 2001; Christoffolete e cols., 2006). Tal papel é evidente em modelo de deleção desta enzima, no qual os animais apresentam resistência ao *feedback* negativo exercido por  $T_4$ , demonstrado pela incapacidade do  $T_4$  administrado a animais hipotireoideos em suprimir o TSH sérico (Schneider e cols., 2001). Por outro lado, a D2 hipofisária é regulada negativamente pelo hormônio tireoideano (Bianco e Kim, 2006), aumentando no hipotireoidismo e diminuindo no hipertireoidismo. No entanto, aparentemente os tireotrofos possuem alta expressão de D2 que permite produção de  $T_3$  aumentada, mesmo com atividade reduzida desta enzima em resposta à influência inibitória de elevadas concentrações de  $T_4$  (Christoffolete e cols., 2006).

Os mecanismos pelos quais as desidases hipofisárias têm menor atividade nos animais tratados com óleo de peixe do que com óleo de soja não podem ser elucidados pelo nosso trabalho. No entanto, parece ser independente das concentrações de hormônio tireoideano sérico, já que estas não variaram entre os grupos. Não existem trabalhos, do nosso conhecimento, que estudem a influência das vias de PPAR, ativadas pelos AGPI, nas desidases hipofisárias. Entretanto, o aumento da atividade da D2 em cultura de mioblastos de camundongos e humanos estimuladas por agonista de  $PPAR\gamma$  já foi descrito (Grosovsky e cols., 2008), assim como, foi identificado um sítio responsivo ao  $PPAR\gamma$  no promotor do gene da D2 (Fiorito e cols., 2007).

Quanto às possíveis conseqüências funcionais da menor atividade de D1 e D2 hipofisária, estas estariam envolvidas na secreção de TSH e hormônio do crescimento (GH).

Apesar do TSH não estar alterado significativamente, houve tendência a maior concentração nas dietas com óleo de peixe do que com óleo de soja. Isto poderia ser correlacionado com a menor atividade da desidase hipofisária, gerando menos  $T_3$  intracelular, levando a maior secreção de TSH e conseqüentemente de hormônio tireoideano. Este mecanismo restabeleceria a supressão, retornando o eixo a um patamar

de normalidade. Como se trata de um tratamento crônico poderíamos especular que a menor atividade das desidases hipofisárias possam ser um mecanismo adaptativo suscitado pela dieta rica em óleo de peixe para a manutenção da faixa de normalidade de secreção dos hormônios tireoideanos

A alteração na concentração sérica de TSH em resposta ao tratamento crônico com alta concentração de AGPI n-3 já foi descrita por Clandinin e colaboradores (1998) que relataram aumento de TSH na vida adulta de animais que receberam desde a gestação concentrações altas de DHA (AGPI n-3), comparado aqueles que receberam dieta contendo menor percentual de AGPI n-3.

Entretanto, dada a pequena parcela de tireotrofos presentes na hipófise, esta menor atividade da desidase hipofisária no grupo tratado com óleo de peixe poderia ser reflexo mais importante de outros tipos celulares presentes em maior parcela neste tecido, como os somatotrofos (Genuth, 2004).

A atividade da D1 e D2 hipofisária também parece modular a ação dos hormônios tireoideanos na produção de outros hormônios hipofisários, como o GH. O aumento da atividade da D2 no estado de hipotireoidismo aumenta a responsividade do GH ao hormônio tireoideano, abolindo a correlação existente no estado hipertireoideo entre concentração sérica de GH e de hormônio tireoideano (Volpato e Nunes, 2001). A redução na atividade da D2 hipofisária observada no nosso modelo poderia favorecer a menor ação estimulatória do hormônio tireoideano sobre o GH, promovendo menor concentração sérica deste hormônio e assim, alteração do padrão de ganho de peso, com redução de massa protéica da carcaça. Entretanto, a maior massa das vísceras, como o coração e fígado é evidência contra esta hipótese, já que se esperaria o contrário na deficiência de GH/IGF-1. Além disto, não há dados na literatura que suportem esta hipótese. Ao contrário, Clandinin e colaboradores (1998) relatam que a administração a ratos do AGPI n-3 DHA desde a gestação até a sexta semana de vida, não alterou a concentração sérica de GH quando comparado a dieta contendo menor percentual de AGPI n-3.

## 5 CONCLUSÃO

---

Em resumo, neste trabalho observamos que a dieta normolipídica contendo óleo de peixe, ofertada desde o nascimento até a vida adulta, promoveu alterações na composição corporal e no perfil lipídico de caráter benéfico em ratos. A série de mecanismos até então descritos para a promoção deste efeito, não incluíam a modulação dos hormônios tireoideanos, apesar deste caracterizar um candidato potencial, dados os seus efeitos sobre o metabolismo lipídico. O modelo experimental sugeriu maior ação dos hormônios tireoideanos no tecido hepático dos animais que receberam a dieta contendo óleo de peixe, promovida pela maior expressão do TR $\beta$ 1, sem alteração da concentração sérica do hormônio. Esta maior ação do hormônio foi refletida pela maior atividade da enzima  $\alpha$ GPD hepática, entretanto, a D1 hepática manteve-se inalterada. Além dos efeitos hepáticos, a dieta pareceu modular levemente o eixo-hipotálamo-hipófise-tireóide, através da modulação negativa da atividade das desidases hipofisárias, promovendo mecanismo favorecedores para o aumento da síntese do hormônio, que não foi refletido em aumento da concentração sérica. Os dados sugerem que o óleo de peixe é capaz de intensificar a ação hepática dos hormônios tireoideanos, contribuindo para os efeitos hipolipemiantes promovidos pela dieta.

Portanto, os AGPI n-3 presentes no óleo de peixe, são capazes de influenciar as vias de sinalização dos hormônios tireoideanos, modulando assim, suas ações hepáticas e hipofisárias. Estas alterações poderiam, potencialmente, contribuir para as alterações na composição corporal e perfil lipídico promovidas pela dieta.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ABRAMS, J.J.; GRUNDY, S.M.; GINSBERG, H. **Metabolism of plasma triglycerides in hypothyroidism and hyperthyroidism in man.** *J Lipid Res.*, v. 22, n.2, p.307-22, 1981.

AHMED, W.; ZIOUZENKOVA, O.; BROWN, J.; DEVCHAND, P.; FRANCIS, S.; KADAKIA, M.; KANDA, T.; ORASANU, G.; SHARLACH, M.; ZANDBERGEN, F.; PLUTZKY, J. **PPARs and their metabolic modulation: new mechanisms for transcriptional regulation?.** *J Intern Med*, v. 262, n. 2, p. 184-98, 2007.

ALFADDA, A.; DOSSANTOS, R.A.; STEPANYAN, Z.; MARRIF, H.; SILVA, J.E. **Mice with deletion of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene exhibit a thrifty phenotype: effect of gender.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 287, n. 1, p. R147-56, 2004.

AL-HASANI, H.; JOOST, H.G. **Nutrition-/diet-induced changes in gene expression in white adipose tissue.** *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.*,v.19, n.4, p.589-603,.2005.

AL-SHURBAJI, A.; LARSSON-BACKSTRÖM, C.; BERGLUND, L.; EGGERTSEN, G.; BJÖRKHEM, I. **Effect of n-3 fatty acids on the key enzymes involved in cholesterol and triglyceride turnover in rat liver.** *Lipids*, v. 26,n. 5, p. 385-9, 1991.

AL-TONSI, A.A.; ABDEL-GAYOUM, A.A.; SAAD, M. **The secondary dyslipidemia and deranged serum phosphate concentration in thyroid disorders.** *Exp Mol Pathol*, v. 76, n. 2, p.182-7, 2004.

AMMA, L.L.; CAMPOS-BARROS, A.; WANG, Z.; VENNSTRÖM, B.; FORREST, D. **Distinct tissue-specific roles for thyroid hormone receptors beta and alpha1 in regulation of type 1 deiodinase expression.** *Mol Endocrinol*, v. 15, n. 3, p. 467-75, 2001.

ARAKI, O.; YING, H.; FURUYA, F.; ZHU, X.; CHENG, S.Y. **Thyroid hormone receptor beta mutants: Dominant negative regulators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma action.** *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, v. 102, n. 45, p. 16251-6, 2005.

ARNER, P. **Regional differences in protein production by human adipose tissue.** *Biochem Soc Trans*, v. 29, n. (Pt 2), p. 72-5, 2001.

AWAD, A. B.; BERNARDIS, L.L.; FINK, C.S. **Failure to demonstrate an effect of dietary fatty acid composition on body weight; body composition and parameters of lipid metabolism in mature rats.** *J Nutr*, v. 120, n. 11, p. 1277-82, 1990.

BALASUBRAMANIAM, S.; SIMONS, L.A.; CHANG, S.; HICKIE, J.B. **Reduction in plasma cholesterol and increase in biliary cholesterol by a diet rich in n-3 fatty acids in the rat.** *J Lipid Res*, v. 26, n. 6, p. 684-9, 1985.

BANG, H.O.; DYERBERG, J. **Plasma lipids and lipoproteins in Greenlandic west coast Eskimos.** *Acta Med Scand*, v. 192, n. 1-2, p. 85-94, 1972.

BANG, H.O.; DYERBERG, J.; SINCLAIR, H.M. **The composition of the Eskimo food in north western Greenland.** *Am J Clin Nutr*, v. 33, n. 12, p. 2657-61, 1980.

BARRA, G.B.; VELASCO, L.F.; PESSANHA, R.P.; CAMPOS, A.M.; MOURA, F.N.; DIAS, S.M.; POLIKARPOV, I.; RIBEIRO, R.C.; SIMEONI, L.A.; NEVES, F.A. **Mecanismo molecular da ação do hormônio tireoideano.** *Arq Bras Endocrinol Metabol*, v. 48, n. 1, p. 25-39, 2004.

BASSETT, J.H.; HARVEY, C.B.; WILLIAMS, G.R. **Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions.** *Mol Cell Endocrinol*, v. 213, n. 1, p.1-11, 2003.

BAXTER, J.D.; WEBB, P.; GROVER, G.; SCANLAN, T.S. **Selective activation of thyroid hormone signaling pathways by GC-1: a new approach to controlling cholesterol and body weight.** *Trends Endocrinol Metab*, v. 15, n. 4, p. 154-7. 2004.

BELZUNG, F.; RACLOT, T.; GROSCOLAS, R. **Fish oil n-3 fatty acids selectively limit the hypertrophy of abdominal fat depots in growing rats fed high-fat diets.** *Am J Physiol*, v. 264, n. (6 Pt 2), p. R1111-8, 1993.

BERKENSTAM, A.; KRISTENSEN, J.; MELLSTRÖM, K.; CARLSSON, B.; MALM, J.; REHNMARK, S.; GARG, N.; ANDERSSON, C.M.; RUDLING, M.; SJÖBERG, F.; ANGELIN, B.; BAXTER, J.D. **The thyroid hormone mimetic compound KB2115 lowers plasma LDL cholesterol and stimulates bile acid synthesis without cardiac effects in humans.** *Proc Natl Acad Sci U. S. A.*, v. 105, n. 2, p. 663-7, 2008.

BIANCO, A.C.; KIM, B.W. **Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action.** *J Clin Invest*, v. 116, n. 10, p. 2571-9, 2006.

BIANCO, A.C.; LARSEN, P.R. **Cellular and structural biology of the deiodinases.** *Thyroid*, v. 15, n. 8, p. 777-86, 2005.

BIANCO, A.C.; SALVATORE, D.; GEREKEN, B.; BERRY, M.J.; LARSEN, P.R. **Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases.** *Endocr Rev*, v. 23, n. 1, p. 38-89, 2002.

BOGAZZI, F.; HUDSON, L.D.; NIKODEM, V.M. **A novel heterodimerization partner for thyroid hormone receptor. Peroxisome proliferator-activated receptor.** *J Biol Chem*, v. 269, n. 16, p. 11683-6, 1994.

BORDONI, A.; DI NUNZIO, M.; DANESI, F.; BIAGI, P.L. **Polyunsaturated fatty acids: From diet to binding to ppars and other nuclear receptors.** *Genes Nutr*, v. 1, n. 2, p. 95-106, 2006.

BRADFORD, M.M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem*, v. 72, p. 248-54, 1976.

BRTKO, J.; SEBÖKOVÁ, E.; GASPERÍKOVÁ, D.; KLIMES, I.; HUDECOVÁ, S.; BRANSOVÁ, J. **Nuclear all-trans retinoic acid receptors in liver of rats with diet-induced insulin resistance.** *Ann N. Y. Acad Sci*, v. 827, p. 480-4, 1997.

BUROKER, N.E.; YOUNG, M.E.; WEI, C.; SERIKAWA, K.; GE, M.; NING, X.H.; PORTMAN, M.A. **The dominant negative thyroid hormone receptor beta-mutant {Delta}337T alters PPAR{alpha} signaling in heart.** *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 292, n. 2, p. E453-60, 2007.

CABANELAS, A.; LISBOA, P.C.; MOURA, E.G.; PAZOS-MOURA, C.C. **Leptin acute modulation of the 5'-deiodinase activities in hypothalamus; pituitary and brown adipose tissue of fed rats.** *Horm Metab Res*, v. 38, n. 8, p. 481-5, 2006.

CACHEFO, A.; BOUCHER, P.; VIDON, C.; DUSSERRE, E.; DIRAISON, F.; BEYLOT, M. **Hepatic lipogenesis and cholesterol synthesis in hyperthyroid patients.** *J Clin Endocrinol Metab*, v. 86, n. 11, p. 5353-7, 2001.

CHA, M.C.; JONES, P.J. **Dietary fat type and energy restriction interactively influence plasma leptin concentration in rats.** *J Lipid Res*, v. 39, n. 8, p. 1655-60, 1998.

CHAPMAN, C.; MORGAN, L.M.; MURPHY, M.C. **Maternal and early dietary fatty acid intake: changes in lipid metabolism and liver enzymes in adult rats.** *J Nutr*, v. 130, n. 2, p. 146-51, 2000.

CHARD, T. **An introduction to radioimmunoassay and related techniques.** In: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*,. Eds RH Burdon & PH van Kiniooenberg, Editora Elsevier Science, Amsterdam, p 1-74, 1987.

CHRISTOFFOLETE, M.A.; RIBEIRO, R.; SINGRU, P.; FEKETE, C.; DA SILVA, W.S.; GORDON, D.F.; HUANG, S.A.; CRESCENZI, A.; HARNEY, J.W.; RIDGWAY, E.C.; LARSEN, P.R.; LECHAN, R.M.; BIANCO, A.C. **Atypical expression of type 2 iodothyronine deiodinase in thyrotrophs explains the thyroxine-mediated pituitary thyrotropin feedback mechanism.** *Endocrinology*, v. 147, n. 4, p. 1735-43, 2006.

CHU, R.; MADISON, L.D.; LIN, Y.; KOPP, P.; RAO, M.S.; JAMESON, J.L.; REDDY, J.K. **Thyroid hormone (T3) inhibits ciprofibrate-induced transcription of genes encoding beta-oxidation enzymes: cross talk between peroxisome proliferator and T3 signaling pathways.** *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, v. 92, n. 25, p. 11593-7, 1995.

CLANDININ, M.T.; CLAERHOUT, D.L.; LIEN, E.L. **Docosahexaenoic acid increases thyroid-stimulating hormone concentration in male and adrenal corticotrophic hormone concentration in female weanling rats.** *J Nutr*, v. 128, n. 8, p. 1257-61, 1998.

CLARKE, S.D. **Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome.** *J Nutr*, v. 131, n. 4, p. 1129-32, 2001.

CLARKE, S.D.; HEMBREE, J. **Inhibition of triiodothyronine's induction of rat liver lipogenic enzymes by dietary fat.** *J Nutr*, v. 120, n. 6, p. 625-30, 1990.

COPPOLA, A.; HUGHES, J.; ESPOSITO, E.; SCHIAVO, L.; MELI, R.; DIANO, S. **Suppression of hypothalamic deiodinase type II activity blunts TRH mRNA decline during fasting.** *FEBS Lett*, v. 579, n. 21, p. 4654-8, 2005.

CORPOREAU, C.; FOLL, C.L.; TAOUIS, M.; GOUYGOU, J.P.; BERGÉ, J.P.; DELARUE, J. **Adipose tissue compensates for defect of phosphatidylinositol 3'-kinase induced in liver and muscle by dietary fish oil in fed rats.** *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 290, n. 1, p. E78-E86, 2006.

COUET, C.; DELARUE, J.; RITZ, P.; ANTOINE, J.M.; LAMISSE, F. **Effect of dietary fish oil on body fat mass and basal fat oxidation in healthy adults.** *Int J Obes Relat Metab Disord*, v. 21, n. 8, p. 637-43, 1997.

DANESE, M.D.; LADENSON, P.W.; MEINERT, C.L.; POWE, N.R. **Clinical review 115: effect of thyroxine therapy on serum lipoproteins in patients with mild thyroid failure: a quantitative review of the literature.** *J Clin Endocrinol Metab*, v. 85, n. 9, p. 2993-3001, 2000.

DANFORTH, E. JR.; BURGER, A.G. **The impact of nutrition on thyroid hormone physiology and action.** *Annu Rev Nutr*, v. 9, p. 201-27, 1989.

DAVIDSON, M.H. **Mechanisms for the hypotriglyceridemic effect of marine omega-3 fatty acids.** *Am J Cardiol*, v. 98, n. 4A, p. 27i-33i, 2006.

DE LANGE, P.; FEOLA, A.; RAGNI, M.; SENESE, R.; MORENO, M.; LOMBARDI, A.; SILVESTRI, E.; AMAT, R.; VILLARROYA, F.; GOGLIA, F.; LANNI, A. **Differential 3;5;3'-triiodothyronine-mediated regulation of uncoupling protein 3 transcription: role of Fatty acids.** *Endocrinology*, v. 148, n. 8, p. 4064-72, 2007.

DE OLIVEIRA CRAVO, C.; TEIXEIRA, C.V.; PASSOS, M.C.; DUTRA, S.C.; DE MOURA, E.G.; RAMOS, C. **Leptin treatment during the neonatal period is associated with higher food intake and adult body weight in rats.** *Horm Metab Res*, v. 34, n. 7, p. 400-5, 2002.

DENTIN, R.; BENHAMED, F.; PÉGORIER, J.P.; FOUFELLE, F.; VIOLLET, B.; VAULONT, S.; GIRARD, J.; POSTIC, C. **Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation.** *J Clin Invest*, v. 115, n. 10, p. 2843-54, 2005.

DESHPANDE, N.; HULBERT, A.J. **Dietary omega 6 fatty acids and the effects of hyperthyroidism in mice.** *J Endocrinol*, v. 144, n. 3, p. 431-9, 1995.

DROVER, V.A.; AGELLON, L.B. **Regulation of the human cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A1) by thyroid hormone in transgenic mice.** *Endocrinology*, v. 145, n. 2, p. 574-81, 2004.

DULLOO, A.G.; MENSİ, N.; SEYDOUX, J.; GIRARDIER, L. **Differential effects of high-fat diets varying in fatty acid composition on the efficiency of lean and fat tissue deposition during weight recovery after low food intake.** *Metabolism*, v. 44, n. 2, p. 273-9, 1995.

DUMITRESCU, A.M.; LIAO, X.H.; WEISS, R.E.; MILLEN, K.; REFETOFF, S. **Tissue-specific thyroid hormone deprivation and excess in monocarboxylate transporter (mct) 8-deficient mice.** *Endocrinology*, v. 147, n. 9, p. 4036-43, 2006.

DUTRA, S.C.; MOURA, E.G.; RODRIGUES, A.L.; LISBOA, P.C.; BONOMO, I.; TOSTE, F.P.; PASSOS, M.C. **Cold exposure restores the decrease in leptin receptors (OB-Rb) caused by neonatal leptin treatment in 30-day-old rats.** *J Endocrinol*, v. 195, n. 2, p. 351-8, 2007.

EL-BADRY, A.M.; GRAF, R.; CLAVIEN, P.A. **Omega 3 - Omega 6: What is right for the liver?** *J Hepatol*, v. 47, n. 5, p. 718-25, 2007.

EREM, C.; DEĞER, O.; BOSTAN, M.; OREM, A.; SÖNMEZ, M.; ULUSOY, S.; TELATAR, M. **Plasma lipoprotein (a) concentrations in hypothyroid, euthyroid and hyperthyroid subjects.** *Acta Cardiol*, v. 54, n. 2, p. 77-81, 1999.

FESTUCCIA, W.T.; OZTEZCAN, S.; LAPLANTE, M.; BERTHIAUME, M.; MICHEL, C.; DOHGU, S.; DENIS, R.G.; BRITO, M.N.; BRITO, N.A.; MILLER, D.S.; BANKS, W.A.; BARTNESS, T.J.; RICHARD, D.; DESHAIES, Y. **Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated positive energy balance in the rat is associated with reduced sympathetic drive to adipose tissues and thyroid status.** *Endocrinology*, v. 149, n. 5, p. 2121-30, 2008.

FIORITO, M.; TORRENTE, I.; DE COSMO, S.; GUIDA, V.; COLOSIMO, A.; PRUDENTE, S.; FLEX, E.; MENGHINI, R.; MICCOLI, R.; PENNO, G.; PELLEGRINI, F.; TASSI, V.; FEDERICI, M.; TRISCHITTA, V.; DALLAPICCOLA, B. **Interaction of DIO2 T92A and PPARgamma2 P12A polymorphisms in the modulation of metabolic syndrome.** *Obesity (Silver Spring)*, v.15, n.12, p.2889-95, 2007.

FLACHS, P.; HORAKOVA, O.; BRAUNER, P.; ROSSMEISL, M.; PECINA, P.; FRANSSSEN-VAN HAL, N.; RUZICKOVA, J.; SPONAROVA, J.; DRAHOTA, Z.; VLCEK, C.; KEIJER, J.; HOUSTEK, J.; KOPECKY, J. **Polyunsaturated fatty acids of marine origin upregulate mitochondrial biogenesis and induce beta-oxidation in white fat.** *Diabetologia*, v. 48, n. 11, p. 2365-75, 2005.

FORSYTHE, W.A. 3rd. **Soy protein; thyroid regulation and cholesterol metabolism.** *J. Nutr*, v. 125, 3 Supl, p. 619S-623S, 1995.

FRANCO, M.; CASTRO, G.; ROMERO, L.; REGALADO, J.C.; MEDINA, A.; HUESCA-GÓMEZ, C.; RAMÍREZ, S.; MONTAÑO, L.F.; POSADAS-ROMERO, C.; PÉREZ-MÉNDEZ, O. **Decreased activity of lecithin:cholesterol acyltransferase and hepatic lipase in chronic hypothyroid rats: implications for reverse cholesterol transport.** *Mol Cell Biochem*, v. 246, n. 1-2, p. 51-6, 2003.

FRIEDEWALD, W.T.; LEVY, R.I.; FREDRICKSON, D.S. **Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma; without use of the preparative ultracentrifuge.** *Clin Chem*, v. 18, n. 6, p. 499-502, 1972.

GAÍVA, M.H.; COUTO, R.C.; OYAMA, L.M.; COUTO, G.E.; SILVEIRA, V.L.; RIBERIO, E.B.; NASCIMENTO, C.M. **Polyunsaturated fatty acid-rich diets: effect on adipose tissue metabolism in rats.** *Br J Nutr*, v. 86, n. 3, p. 371-7, 2001.

GENUTH, SM. **A glândula tireóide.** In: BERNE, R.M.; LEVY, M.N.; KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A. (Eds.) *Fisiologia*. Tradução, 5<sup>a</sup>.ed., Editora Elsevier Science, Rio de Janeiro p.915-938, 2004.

GROZOVSKY, R.; RIBICH, S.; ROSENE, M.L.; MULCAHEY, M.A.; HUANG, S.A.; PATTI, M.E.; BIANCO, A.C.; KIM, B.W. **Type 2 deiodinase expression is induced by PPAR- $\gamma$  agonists in skeletal myocytes.** [Epub ahead of print]. *Endocrinology*, 2008.

GUERRA, C.; PORRAS, A.; RONCERO, C.; BENITO, M.; FERNANDEZ, M. **Triiodothyronine induces the expression of the uncoupling protein in long term fetal rat brown adipocyte primary cultures: role of nuclear thyroid hormone receptor expression.** *Endocrinology*, v. 134, n. 3, p. 1067-74, 1994.

GUIMARÃES, D.E.D. **Efeito da ingestão dos ácidos graxos trans e poliinsaturados da série n-6 e n-3 na expressão de genes associados à função endócrina do tecido adiposo branco – estudo em ratos.** *Dissertação (Mestrado em Nutrição) - Curso de Nutrição*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006.

GULLBERG, H.; RUDLING, M.; FORREST, D.; ANGELIN, B.; VENNSTRÖM, B. **Thyroid hormone receptor beta-deficient mice show complete loss of the normal cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7A) response to thyroid hormone but display enhanced resistance to dietary cholesterol.** *Mol Endocrinol*, v. 14, n. 11, p. 1739-49, 2000.

GULLBERG, H.; RUDLING, M.; SALTÓ, C.; FORREST, D.; ANGELIN, B.; VENNSTRÖM, B. **Requirement for thyroid hormone receptor beta in T3 regulation of cholesterol metabolism in mice.** *Mol Endocrinol*, v. 16, n. 8, p. 1767-77, 2002.

HAMADA, S.; NAKAMURA, H.; NANNO, M.; IMURA, H. **Tri-iodothyronine-induced increase in rat liver nuclear thyroid-hormone receptors associated with increased mitochondrial alpha-glycerophosphate dehydrogenase activity.** *Biochem J*, v. 182, n. 2, p. 371-5, 1979.

HARRIS, W.S.; LU, G.; RAMBJØR, G.S.; WÅLEN, A.I.; ONTKO, J.A.; CHENG, Q.; WINDSOR, S.L. **Influence of n-3 fatty acid supplementation on the endogenous activities of plasma lipases.** *Am J Clin Nutr*, v. 66, n. 2, p. 254-60, 1997.

HARVEY, C.B., WILLIAMS, G.R. **Mechanism of thyroid hormone action.** *Thyroid*, v. 12, n. 6, p. 441-6, 2002.

HASHIMOTO, K.; YAMADA, M.; MATSUMOTO, S.; MONDEN, T.; SATOH, T.; MORI, M. **Mouse sterol response element binding protein-1c gene expression is negatively regulated by thyroid hormone.** *Endocrinology*, v. 147, n. 9, p. 4292-302, 2006a.

HASHIMOTO, K.; COHEN, R.N.; YAMADA, M.; MARKAN, K.R.; MONDEN, T.; SATOH, T.; MORI, M.; WONDISFORD, F.E. **Cross-talk between thyroid hormone receptor and liver X receptor regulatory pathways is revealed in a thyroid hormone resistance mouse model.** *J Biol Chem*, v. 281, n. 1, p. 295-302, 2006b.

HASHIMOTO, K.; MATSUMOTO, S.; YAMADA, M.; SATOH, T.; MORI, M. **Liver X receptor-alpha gene expression is positively regulated by thyroid hormone.** *Endocrinology*, v. 148, n. 10, p. 4667-75, 2007.

HEROLD, P.M.; KINSELLA, J.E. **Fish oil consumption and decreased risk of cardiovascular disease: a comparison of findings from animal and human feeding trials.** *Am J Clin Nutr.*, v.43, n.4, p.566-98, 1986.

HERZBERG, G.R.; ROGERSON, M. **Hepatic fatty acid synthesis and triglyceride secretion in rats fed fructose- or glucose-based diets containing corn oil; tallow or marine oil.** *J Nutr*, v. 118, n. 9, p. 1061-7, 1988.

HIGUCHI, T.; SHIRAI, N.; SAITO, M.; SUZUKI, H.; KAGAWA, Y. **Levels of plasma insulin; leptin and adiponectin; and activities of key enzymes in carbohydrate metabolism in skeletal muscle and liver in fasted ICR mice fed dietary n-3 polyunsaturated fatty acids.** *J Nutr Biochem*, v. 19, n. 9, p. 577-86, 2008.

HIRSCHBERG, Y.; POMPOSELLI, J.J.; BLACKBURN, G.L.; ISTFAN, N.W.; BABAYAN, V.; BISTRIAN, B.R. **The effects of chronic fish oil feeding in rats on protein catabolism induced by recombinant mediators.** *Metabolism*, v. 39, n. 4, p. 397-402, 1990.

HOLLANDER, C.S.; SCOTT, R.L.; BURGESS, J.A.; RABINOWITZ, D.; MERIMEE, T.J.; OPPENHEIMER, J.H. **Free fatty acids: a possible regulator of free thyroid hormone levels in man.** *J Clin Endocrinol Metab*, v. 27, n. 8, p. 1219-23, 1967.

ILLMAN, R.J.; TRIMBLE, R.P.; STORER, G.B.; TOPPING, D.L.; OLIVER, J.R. **Time-Course of Changes in Plasma Lipids in Diabetic Rats Fed Diets High in Fish or Safflower Oils.** *Atherosclerosis*, v.59, p.313-321, 1986.

JATWA, R.; PARMAR, H.S.; PANDA, S.; KAR, A. **Amelioration of corticosteroid-induced type 2 diabetes mellitus by rosiglitazone is possibly mediated through stimulation of thyroid function and inhibition of tissue lipid peroxidation in mice.** *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, v. 101, n. 3, p. 177-80, 2007.

JOHANSSON, L.; RUDLING, M.; SCANLAN, T.S.; LUNDÅSEN, T.; WEBB, P.; BAXTER, J.; ANGELIN, B.; PARINI, P. **Selective thyroid receptor modulation by GC-1 reduces serum lipids and stimulates steps of reverse cholesterol transport in euthyroid mice.** *Proc Natl Acad Sci U. S. A.*, v. 102, n. 29, p. 10297-302, 2005.

JOSHI, S.; RAO, S.; GOLWILKAR, A.; PATWARDHAN, M.; BHONDE, R. **Fish oil supplementation of rats during pregnancy reduces adult disease risks in their offspring.** *J Nutr*, v. 133, n. 10, p. 3170-4, 2003.

JUGE-AUBRY, C.E.; GORLA-BAJSZCZAK, A.; PERNIN, A.; LEMBERGER, T.; WAHLI, W.; BURGER, A.G.; MEIER, C.A. **Peroxisome proliferator-activated receptor mediates cross-talk with thyroid hormone receptor by competition for retinoid X receptor. Possible role of a leucine zipper-like heptad repeat.** *J Biol Chem*, v. 270, n. 30, p. 18117-22, 1995.

JUMP, D.B. **The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids.** *J Biol Chem*, v. 277, n. 11, p. 8755-8, 2002.

JUMP, D.B. **N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription.** *Current Opinion in Lipidology*, v.19, p.242-247, 2008.

JUMP, D.B.; CLARKE, S.D.; THELEN, A.; LIIMATTA, M. **Coordinate regulation of glycolytic and lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids.** *J Lipid Res*, v. 35, n. 6, p. 1076-84, 1994.

JUMP, D.B.; BOTOLIN, D.; WANG, Y.; XU, J.; DEMEURE, O.; CHRISTIAN, B. **Docosahexaenoic acid (DHA) and hepatic gene transcription.** *Chem Phys Lipids*, v. 153, n. 1, p. 3-13, 2008.

JUNG, C.H.; SUNG, K.C.; SHIN, H.S.; RHEE E.J.; LEE, W.Y.; KIM, B.S.; KANG, J.H.; KIM, H.; KIM, S.W.; LEE, M.H.; PARK, J.R.; KIM, S.W. **Thyroid dysfunction and their relation to cardiovascular risk factors such as lipid profile; hsCRP; and waist hip ratio in Korea.** *Korean J Intern Med*, v. 18, n. 3, p.146-53, 2003.

KEYES, W.G.; WILCOX, H.G.; HEIMBERG, M. **Formation of the very low density lipoprotein and metabolism of [1-14C]-oleate by perfused livers from rats treated with triiodothyronine or propylthiouracil.** *Metabolism*, v. 30, n. 2, p. 135-46, 1981.

KIM H.J.; TAKAHASHI M.; EZAKI O. **Fish oil feeding decreases mature sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1) by down-regulation of SREBP-1c mRNA in mouse liver. A possible mechanism for down-regulation of lipogenic enzyme mRNAs.** *J Biol Chem*, v. 274, n. 36, p. 25892-8, 1999.

KIM, H.K.; DELLA-FERA, M.; LIN, J.; BAILE, C.A. **Docosahexaenoic acid inhibits adipocyte differentiation and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes.** *J Nutr*, v. 136, n. 12, p. 2965-9, 2006.

KNOPP, J.; KLIMES, I.; BRTKO, J.; SEBOKOVA, E.; BOHOV, P.; HROMADOVA, M.; LANGER, P.; BALAZ, V. **Nuclear 3,5,3'-triiodothyronine receptors and malic enzyme activity in liver of rats fed fish oil or cocoa butter.** *J Nutr. Biochem.*, v.3, p.587-593, 1992.

KOGAI, T.; BRENT, A.B. **Thyroid hormones (T<sub>4</sub>, T<sub>3</sub>).** In: *Endocrinology –Basic and Clinical Principles*. 2<sup>a</sup> Ed., Editora Human Press, p.267-281, 2005.

KUIPER, G.G.; KESTER, M.H.; PEETERS, R.P.; VISSER, T.J. **Biochemical mechanisms of thyroid hormone deiodination.** *Thyroid*, v. 15, n. 8, p. 787-98, 2005.

LAKER, M.E.; MAYES, P.A. **Effect of hyperthyroidism and hypothyroidism on lipid and carbohydrate metabolism of the perfused rat liver.** *Biochem J*, v. 196, n. 1, p. 247-55, 1981.

LANG CA, DAVIS RA. **Fish oil fatty acids impair VLDL assembly and/or secretion by cultured rat hepatocytes.** *J. Lipid Res.*, v.31, p.2079-2086, 1990.

LE FOLL, C.; CORPOREAU, C.; LE GUEN, V.; GOUYGOU, J.P.; BERGÉ, J.P.; DELARUE, J. **Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids dissociate phosphorylation of Akt from phosphatidylinositol 3'-kinase activity in rats.** *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 292, n. 4, p. E1223-30, 2007.

LE JOSSIC-CORCOS, C.; GONTHIER, C.; ZAGHINI, I.; LOGETTE, E.; SHECHTER, I.; BOURNOT, P. **Hepatic farnesyl diphosphate synthase expression is suppressed by polyunsaturated fatty acids.** *Biochem J*, v. 385 (Pt 3), p:787-94, 2005.

LENGQVIST, J.; MATA DE URQUIZA, A.; BERGMAN, A.C.; WILLSON, T.M.; SJÖVALL, J.; PERLMANN, T.; GRIFFITHS, W.J. **Polyunsaturated fatty acids including docosahexaenoic and arachidonic acid bind to the retinoid X receptor alpha ligand-binding domain.** *Mol Cell Proteomics*, v. 3, n. 7, p. 692-703, 2004.

LI, J.Z.; CHEN, M.L.; WANG, S.; DONG, J.; ZENG, P.; HOU, L.W. **Apparent protective effect of high density lipoprotein against coronary heart disease in the elderly.** *Chin Med J (Engl)*, v.117, n.4, p.511-5, 2004.

LI, Q.; INOUE, A. **Preparation of unoccupied thyroid-hormone receptor.** *Biochem J*, v. 297, n. ( Pt 1), p. 75-8, 1994.

LISBOA, P.C.; FAGUNDES, A.T.; DENOLATO, A.T.; OLIVEIRA, E.; BONOMO, I.T.; ALVES, S.B.; CURTY, F.H.; PASSOS, M.C.; MOURA, E.G. **Neonatal low-protein diet changes deiodinase activities and pituitary TSH response to TRH in adult rats.** *Exp Biol Med (Maywood)*, v. 233, n. 1, p. 57-63, 2008.

LISBOA, P.C.; PASSOS, M.C.; DUTRA, S.C.; SANTOS, R.S.; BONOMO, I.T.; CABANELAS, A.P.; PAZOS-MOURA, C.C.; MOURA, E.G. **Increased 5'-iodothyronine deiodinase activity is a maternal adaptive mechanism in response to protein restriction during lactation.** *J Endocrinol*, v. 177, n. 2, p. 261-7, 2003.

LIU, Y.Y.; HEYMAN, R.S.; MOATAMED, F.; SCHULTZ, J.J.; SOBEL, D.; BRENT, G.A. **A mutant thyroid hormone receptor alpha antagonizes peroxisome proliferator-activated receptor alpha signaling in vivo and impairs fatty acid oxidation.** *Endocrinology*, v. 148, n. 3, p. 1206-17, 2007.

LOMBARDO, Y.B.; CHICCO, A.G. **Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. A review.** *J Nutr Biochem*, v. 17, n. 1, p. 1-13, 2006.

LOPEZ, D.; ABISAMBRA SOCARRÁS, J.F.; BEDI, M.; NESS, G.C. **Activation of the hepatic LDL receptor promoter by thyroid hormone.** *Biochim Biophys Acta*, v. 1771, n. 9, p. 1216-25, 2007.

MAKINO, M.; ODA, N.; MIURA, N.; IMAMURA, S.; YAMAMOTO, K.; KATO, T.; FUJIWARA, K.; SAWAI, Y.; IWASE, K.; NAGASAKA, A.; ITOH, M. **Effect of eicosapentaenoic acid ethyl ester on hypothyroid function.** *J Endocrinol*, v. 171, n. 2, p. 259-65, 2001.

MAZZACHI, B.C.; KENNEDY, J.A.; WELLBY, M.L.; EDWARDS, A.M. **Effect of fatty acids on rat liver nuclear T3-receptor binding.** *Metabolism*, v. 41, n. 7, p. 788-92, 1992.

MIYAMOTO, T.; KANEKO, A.; KAKIZAWA, T.; YAJIMA, H.; KAMIJO, K.; SEKINE, R.; HIRAMATSU, K.; NISHII, Y.; HASHIMOTO, T.; HASHIZUME, K. **Inhibition of peroxisome proliferator signaling pathways by thyroid hormone receptor. Competitive binding to the response element.** *J Biol Chem*, v. 272, n. 12, p. 7752-8, 1997.

MORGADO, N.; RIGOTTI, A.; VALENZUELA, A. **Comparative effect of fish oil feeding and other dietary fatty acids on plasma lipoproteins; biliary lipids; and hepatic expression of proteins involved in reverse cholesterol transport in the rat.** *Ann Nutr Metab*, v. 49, n. 6, p. 397-406, 2005.

MORENO, M. ; DE LANGE, P. ; LOMBARDI, A. ; SILVESTRI, E. ; LANNI, A. ; GOGLIA, F. **Metabolic effects of thyroid hormone derivatives.** *Thyroid*. v.18, n.2, p.239-53, 2008.

MORI, T.A.; BAO, D.Q.; BURKE, V.; PUDDEY, I.B.; WATTS, G.F.; BEILIN, L.J. **Dietary fish as a major component of a weight-loss diet: effect on serum lipids; glucose; and insulin metabolism in overweight hypertensive subjects.** *Am J Clin Nutr*, v. 70, n. 5, p. 817-25, 1999.

MOURA, E.G.; MOURA, C.C. **Regulação da síntese e secreção de tireotrofina.** *Arq Bras Endocrinol Metabol*, v. 48, n. 1, p. 40-52, 2004.

MOURA, E.G.; PASSOS, M.C. **Neonatal programming of body weight regulation and energetic metabolism.** *Biosci Rep*, v. 25, n. 3-4, p. 251-69, 2005.

MÜLLER, M.J.; SEITZ, H.J. **Thyroid hormone action on intermediary metabolism. Part II: Lipid metabolism in hypo- and hyperthyroidism.** *Klin Wochenschr*, v. 62, n. 2, p. 49-55, 1984.

NAKAMURA, H.; HAMADA, S.; IMURA, H. **Sequential changes in rat liver nuclear tri-iodothyronine receptors and mitochondrial alpha-glycerophosphate dehydrogenase activity after administration of tri-iodothyronine.** *Biochem J.*, v.182, n.2, p.377-82, 1979.

NAKAMURA, M.T.; NARA, T.Y. **Essential fatty acid synthesis and its regulation in mammals.** *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, v. 68, n. 2, p. 145-50, 2003.

NAKATANI, T.; KIM, H.J.; KABURAGI, Y.; YASUDA, K.; EZAKI, O. **A low fish oil inhibits SREBP-1 proteolytic cascade, while a high-fish-oil feeding decreases SREBP-1 mRNA in mice liver: relationship to anti-obesity.** *J Lipid Res*, v. 44, n. 2, p. 369-79, 2003.

NAKATANI, T.; KATSUMATA, A.; MIURA, S.; KAMEI, Y.; EZAKI, O. **Effects of fish oil feeding and fasting on LXRA $\alpha$ /RXRA $\alpha$  binding to LXRE in the SREBP-1c promoter in mouse liver.** *Biochim Biophys Acta*, v. 1736, n. 1, p. 77-86, 2005.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Biosíntese de Lipídeos.** In: *Lehninger: Princípios de Bioquímica.* 4ª ed., Editora Sarvier, São Paulo, p.787-832, 2006.

NESCHEN, S.; MORINO, K.; ROSSBACHER, J.C.; PONGRATZ, R.L.; CLINE, G.W.; SONO, S.; GILLUM, M.; SHULMAN, G.I. **Fish oil regulates adiponectin secretion by a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-dependent mechanism in mice.** *Diabetes*, v. 55, n. 4, p. 924-8, 2006.

NESS, G.C.; PENDLETON, L.C.; LI, Y.C.; CHIANG, J.Y. **Effect of thyroid hormone on hepatic cholesterol 7 alpha hydroxylase, LDL receptor, HMG-CoA reductase, farnesyl pyrophosphate synthetase and apolipoprotein A-I mRNA levels in hypophysectomized rats.** *Biochem Biophys Res Commun*, v. 172, n. 3, p.1150-6, 1990.

NIKKILÄ, E.A.; KEKKI, M. **Plasma triglyceride metabolism in thyroid disease.** *J Clin Invest*, v. 51, n. 8, p. 2103-14, 1972.

OETTING, A.; YEN, P.M. **New insights into thyroid hormone action.** *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, v. 21, n. 2, p.193-208, 2007.

OPPENHEIMER, J.H.; SCHWARTZ, H.L.; DILLMAN, W.; SURKS, M.I. **Effect of thyroid hormone analogues on the displacement of 125I-L-triiodothyronine from hepatic and heart nuclei in vivo: possible relationship to hormonal activity.** *Biochem Biophys Res Commun*, v. 55, n. 3, p. 544-50, 1973.

OPPENHEIMER, J.H.; SILVA, E.; SCHWARTZ, H.L.; SURKS, M.I. **Stimulation of hepatic mitochondrial alpha-glycerophosphate dehydrogenase and malic enzyme by L-triiodothyronine. Characteristics of the response with specific nuclear thyroid hormone binding sites fully saturated.** *J Clin Invest*, v. 59, n. 3, p. 517-27, 1977.

ORTIGA-CARVALHO, T.M.; POLAK, J.; MCCANN, S.; PAZOS-MOURA, C.C. **Effect of thyroid hormones on pituitary neuromedin B and possible interaction between thyroid hormones and neuromedin B on thyrotropin secretion.** *Regul Pept*, v. 67, n. 1, p. 47-53, 1996.

PACKARD, C.J.; SHEPHERD, J.; LINDSAY, G.M.; GAW, A.; TASKINEN, M.R. **Thyroid replacement therapy and its influence on postheparin plasma lipases and apolipoprotein-B metabolism in hypothyroidism.** *J Clin Endocrinol Metab*, v. 76, n. 5, p. 1209-16, 1993.

PACOT, C.; CHARMOILLAUX, M.; GOUDONNET, H.; TRUCHOT, R.C.; LATRUFFE, N. **Role of thyroid state on induction by ciprofibrate of laurate hydroxylase and peroxisomal enzymes in rat liver microsomes.** *Biochem Pharmacol*, v. 45, n. 7, p. 1437-46, 1993.

PAN, D.A.; MATER, M.K.; THELEN, A.P.; PETERS, J.M.; GONZALEZ, F.J.; JUMP, D.B. **Evidence against the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) as the mediator for polyunsaturated fatty acid suppression of hepatic L-pyruvate kinase gene transcription.** *J Lipid Res*, v. 41, n. 5, p. 742-51, 2000.

PAN, J.S.; BERDANIER, C.D. **Thyroxine effects on parameters of glucose turnover in BHE rats fed menhaden oil.** *J Nutr Biochem*, v. 1, n. 5, p. 244-8, 1990.

PATSOURIS, D.; MANDARD, S.; VOSHOL, P.J.; ESCHER, P.; TAN, N.S.; HAVEKES, L.M.; KOENIG, W.; MÄRZ, W.; TAFURI, S.; WAHLI, W.; MÜLLER, M.; KERSTEN, S. **PPAR $\alpha$  governs glycerol metabolism.** *J Clin Invest*, v. 114, n. 1, p. 94-103, 2004.

PAWAR, A.; BOTOLIN, D.; MANGELSDORF, D.J.; JUMP, D.B. **The role of liver X receptor- $\alpha$  in the fatty acid regulation of hepatic gene expression.** *J Biol Chem*, v. 278, n. 42, p. 40736-43, 2003.

PAZOS-MOURA, C.C.; MOURA, E.G.; DORRIS, M.L.; REHNMARK, S.; MELENDEZ, L.; SILVA, J.E.; TAUROG, A. **Effect of iodine deficiency and cold exposure on thyroxine 5'-deiodinase activity in various rat tissues.** *Am J Physiol*, v. 260 (2 Pt 1), p. E175-82, 1991.

PEHOWICH, D.J. **Thyroid hormone status and membrane n-3 fatty acid content influence mitochondrial proton leak.** *Biochim Biophys Acta*, v. 1411, n. 1, p. 192-200, 1999.

PÉREZ-MATUTE, P.; MARTI, A.; MARTINEZ, J.A.; FERNÁNDEZ-OTERO, M.P.; STANHOPE, K.L.; HAVEL, P.J.; MORENO-ALIAGA, M.J. **Eicosapentaenoic fatty acid increases leptin secretion from primary cultured rat adipocytes: role of glucose metabolism.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 288, n. 6, p. R1682-8, 2005.

PHILLIPS, S.A.; CIARALDI, T.P.; OH, D.K.; SAVU, M.K.; HENRY, R.R. **Adiponectin secretion and response to pioglitazone is depot dependent in cultured human adipose tissue.** *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, v. 295, n. 4, p.842-50, 2008.

PRIEUR, X.; HUBY, T.; COSTE, H.; SCHAAP, F.G.; CHAPMAN, M.J.; RODRÍGUEZ, J.C. **Thyroid hormone regulates the hypotriglyceridemic gene APOA5.** *J Biol Chem*, v. 280, n. 30, p. 27533-43, 2005.

PRIGGE, W.F.; KETOVER, S.R.; GEBHARD, R.L. **Thyroid hormone is required for dietary fish oil to induce hypersecretion of biliary cholesterol in the rat.** *Lipids*, v. 30, n. 9, p. 833-8, 1995.

PUCCI, E.; CHIOVATO, L.; PINCHERA, A. **Thyroid and lipid metabolism.** *Int J Obes Relat Metab Disord*, v. 24, Supl 2, p. S109-12, 2000.

RACLOT, T.; GROSCOLAS, R.; LANGIN, D.; FERRÉ, P. **Site-specific regulation of gene expression by n-3 polyunsaturated fatty acids in rat white adipose tissues.** *J Lipid Res*, v. 38, n. 10, p. 1963-72, 1997.

RAO, G.N. **New diet (NTP-2000) for Rats in the National Toxicology Program Toxicity and Carcinogenicity Studies.** *Fundam. Appl. Toxicol.*, v. 32, p. 102-108, 1996.

RAUCHOVÁ, H.; ZACHAROVÁ, G.; SOUKUP, T. **Influence of chronically altered thyroid status on the activity of liver mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in female inbred lewis rats.** *Horm Metab Res*, v. 36, n. 5, p. 286-90, 2004.

REDONNET, A.; GROUBET, R.; NOËL-SUBERVILLE, C.; BONILLA, S.; MARTINEZ, A.; HIGUERET, P. **Exposure to an obesity-inducing diet early affects the pattern of expression of peroxisome proliferator; retinoic acid; and triiodothyronine nuclear receptors in the rat.** *Metabolism*, v. 50, n. 10, p. 1161-7, 2001.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. JR. **AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet.** *J Nutr*, v. 123, n. 11, p. 1939-51, 1993.

REN, B.; THELEN, A.; JUMP, D.B. **Peroxisome proliferator-activated receptor alpha inhibits hepatic S14 gene transcription. Evidence against the peroxisome proliferator-activated receptor alpha as the mediator of polyunsaturated fatty acid regulation of s14 gene transcription.** *J Biol Chem*, v. 271, n. 29, p. 17167-73, 1996.

REN, B.; THELEN, A.P.; PETERS, J.M.; GONZALEZ, F.J.; JUMP, D.B. **Polyunsaturated fatty acid suppression of hepatic fatty acid synthase and S14 gene expression does not require peroxisome proliferator-activated receptor alpha.** *J Biol Chem*, v. 272, n. 43, p. 26827-32, 1997.

RESELAND, J.E.; HAUGEN, F.; HOLLUNG, K.; SOLVOLL, K.; HALVORSEN, B.; BRUDE, I.R.; NENSETER, M.S.; CHRISTIANSEN, E.N.; DREVON, C.A. **Reduction of leptin gene expression by dietary polyunsaturated fatty acids.** *J Lipid Res*, v. 42, n. 5, p. 743-50, 2001.

ROACH, P.D.; KAMBOURIS, A.M.; TRIMBLE, R.P.; TOPPING, D.L.; NESTEL, P.J. **The effects of dietary fish oil on hepatic high density and low density lipoprotein receptor activities in the rat.** *FEBS Lett*, v. 222, n. 1, p. 159-62, 1987.

ROSSI, A.S.; LOMBARDO, Y.B.; LACORTE, J.M.; CHICCO, A.G.; ROUAULT, C.; SLAMA, G.; RIZKALLA, S.W. **Dietary fish oil positively regulates plasma leptin and adiponectin levels in sucrose-fed, insulin-resistant rats.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 289, n. 2, p. R 486-R 494, 2005.

RUSSO, G.L. **Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: From biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention.** *Biochem Pharmacol*, [Epub ahead of print], 2008.

RUSTAN, A.C.; CHRISTIANSEN, E.N.; DREVON, C.A. **Serum lipids, hepatic glycerolipid metabolism and peroxisomal fatty acid oxidation in rats fed -3 and -6 fatty acids.** *Biochem. J.*, v.283, p.333-339, 1992.

RUXTON, C.H.; REED, S.C.; SIMPSON, M.J.; MILLINGTON, K.J. **The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence.** *J Hum Nutr Diet*, v. 20, n. 3, p. 275-85, 2007.

SAHA, S.K.; OHINATA, H.; OHNO, T.; KUROSHIMA, A. **Thermogenesis and fatty acid composition of brown adipose tissue in rats rendered hyperthyroid and hypothyroid-**

with special reference to docosahexaenoic acid. *Jpn J Physiol*, v. 48, n. 5, p. 355-64, 1998.

SAMPATH, H.; NTAMBI, J.M. **Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism.** *Annu Rev Nutr*, v. 25, p. 317-40, 2005.

SCHNEIDER, M.J.; FIERING, S.N.; PALLUD, S.E.; PARLOW, A.F.; ST GERMAIN, D.L.; GALTON, V.A. **Targeted disruption of the type 2 selenodeiodinase gene (DIO2) results in a phenotype of pituitary resistance to T4.** *Mol Endocrinol*, v. 15, n. 12, p. 2137-48, 2001.

SERTER, R.; DEMIRBAS, B.; KORUKLUOGLU, B.; CULHA, C.; CAKAL, E.; ARAL, Y. **The effect of L-thyroxine replacement therapy on lipid based cardiovascular risk in subclinical hypothyroidism.** *J Endocrinol Invest*, v. 27, n. 10, p. 897-903, 2004.

SHIN, D.J.; OSBORNE, T.F. **Thyroid hormone regulation and cholesterol metabolism are connected through Sterol Regulatory Element-Binding Protein-2 (SREBP-2).** *J Biol Chem*, v. 278, n. 36, p. 34114-8, 2003.

SIMOPOULOS, A.P. **The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids.** *Biomed Pharmacother*, v. 56, n. 8, p. 365-79, 2002.

SMITH, H.J.; GREENBERG, N.A.; TISDALE, M.J. **Effect of eicosapentaenoic acid; protein and amino acids on protein synthesis and degradation in skeletal muscle of cachectic mice.** *Br J Cancer*, v. 91, n. 2, p. 408-12, 2004.

SOHAL, P.S.; BARACOS, V.E.; CLANDININ, M.T. **Dietary  $\omega$ 3 fatty acid alters prostaglandin synthesis, glucose transport and protein turnover in skeletal muscle of healthy and diabetic rats.** *Biochem. J.*, v. 286, p. 405-411, 1992.

SORIGUER, F.; MORENO F.; ROJO-MARTÍNEZ G.; CARDONA F.; TINAHONES F.; GÓMEZ-ZUMAQUERO J.M.; GARCÍA-FUENTES E.; MORCILLO S. **Redistribution of abdominal fat after a period of food restriction in rats is related to the type of dietary fat.** *Br J. Nutr*, v.89 n.1 p.115-22, 2003.

SPADY, D.K. **Regulatory effects of individual n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids on LDL transport in the rat.** *J Lipid Res*, v. 34, n. 8, p. 1337-46, 1993.

SPECTOR, A.A. **Essentiality of fatty acids.** *Lipids*, v. 34, Supl. S1-3, 1999.

STALENHOEF, A.F.; DE GRAAF, J.; WITTEKOEK, M.E.; BREDIE, S.J.; DEMACKER, P.N.; KASTELEIN, J.J. **The effect of concentrated n-3 fatty acids versus gemfibrozil on plasma lipoproteins; low density lipoprotein heterogeneity and oxidizability in patients with hypertriglyceridemia.** *Atherosclerosis*, v. 153, n. 1, p.129-38, 2000.

STANSBIE, D.; BROWNSEY, R.W.; CRETIAZ, M.; DENTON, R.M. **Acute effects in vivo of anti-insulin serum on rates of fatty acid synthesis and activities of acetyl-coenzyme A carboxylase and pyruvate dehydrogenase in liver and epididymal adipose tissue of fed rats.** *Biochem J*, v. 160, n. 2, p. 413-6, 1976.

SUGIYAMA, E.; ISHIKAWA, Y.; LI, Y.; KAGAI, T.; NOBAYASHI, M.; TANAKA, N.; KAMIJO, Y.; YOKOYAMA, S.; HARA, A.; AOYAMA, T. **Eicosapentaenoic acid lowers plasma and liver cholesterol levels in the presence of peroxisome proliferators-activated receptor alpha.** *Life Sci*, v. 83, n. 1-2, p. 19-28, 2008.

TOSTE, F.P.; ALVES, S.B.; DUTRA, S.C.; BONOMO, I.T.; LISBOA, P.C.; MOURA, E.G.; PASSOS, M.C. **Temporal evaluation of the thyroid function of rats programmed by leptin treatment on the neonatal period.** *Horm Metab Res*, v. 38, n. 12, p. 827-31, 2006.

TSUBOYAMA-KASAOKA, N.; TAKAHASHI, M.; KIM, H.; EZAKI, O. **Up-regulation of liver uncoupling protein-2 mRNA by either fish oil feeding or fibrate administration in mice.** *Biochem Biophys Res Commun*, v. 257, n. 3, p. 879-85, 1999.

VAN DER KLIS, F.R.; WIERSINGA, W.M.; DE VIJLDER, J.J. **Studies on the mechanism of inhibition of nuclear triiodothyronine binding by fatty acids.** *FEBS Lett*, v. 246, n. 1-2, p. 6-12, 1989.

VAN HARMELEN, V.; REYNISDOTTIR, S.; ERIKSSON, P.; THÖRNE, A.; HOFFSTEDT, J.; LÖNNQVIST, F.; ARNER, P. **Leptin secretion from subcutaneous and visceral adipose tissue in women.** *Diabetes*, v. 47, n. 6, p. 913-7, 1998.

VASANDANI, C.; KAFROUNI, A.I.; CARONNA, A.; BASHMAKOV, Y.; GOTTHARDT, M.; HORTON, J.D.; SPADY, D.K. **Upregulation of hepatic LDL transport by n-3 fatty acids in LDL receptor knockout mice.** *J Lipid Res*, v. 43, n. 5, p. 772-84, 2002.

VISSER, T.J. **Thyroid hormone transporters.** *Horm Res*, v. 68, Supl 5, p. 28-30, 2007.

VOET, D.; VOET, J.G. **Lipid-linked proteins and lipoproteins.** In: *Biochemistry*, 2<sup>a</sup> ed., Editora: John Wiley & Sons, Estados Unidos, p.317-325, 1995.

VOLPATO, C.B.; NUNES, M.T. **Functional evidence for the presence of type II 5'-deiodinase in somatotropes and its adaptive role in hypothyroidism.** *Neuroendocrinology*, v. 74, n. 4, p. 220-6, 2001.

WANG, H.; STORLIEN, L.H.; HUANG, X.F. **Effects of dietary fat types on body fatness; leptin; and ARC leptin receptor; NPY; and AgRP mRNA expression.** *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 282, n. 6, p. E 1352-9, 2002.

WEITZEL, J.M.; KUTZ, S.; RADTKE, C.; GROTT, S.; SEITZ, H.J. **Hormonal regulation of multiple promoters of the rat mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene: identification of a complex hormone-response element in the ubiquitous promoter B.** *Eur J Biochem*, v. 268, n. 14, p. 4095-103, 2001.

WILLUMSEN, N.; SKORVE, J.; HEXEBERG, S.; RUSTAN, A.C.; BERGE, R.K. **The hypotriglyceridemic effect of eicosapentaenoic acid in rats is reflected in increased mitochondrial fatty acid oxidation followed by diminished lipogenesis.** *Lipids*, v. 28, n. 8, p. 683-90, 1993.

WYRWOLL, C.S.; MARK, P.J.; MORI, T.A.; PUDDEY, I.B.; WADDELL, B.J. **Prevention of programmed hyperleptinemia and hypertension by postnatal dietary omega-3 fatty acids.** *Endocrinology*, v. 147, n. 1, p. 599-606, 2006.

XIAO, C.W.; L'ABBÉ, M.R.; GILANI, G.S.; COOKE, G.M.; CURRAN, I.H.; PAPADEMETRIOU, S.A. **Dietary soy protein isolate and isoflavones modulate hepatic thyroid hormone receptors in rats.** *J. Nutr*, v. 134, n. 4, p. 743-9, 2004.

YAHAGI, N.; SHIMANO, H.; HASTY, A.H.; AMEMIYA-KUDO, M.; OKAZAKI, H.; TAMURA, Y.; IIZUKA, Y.; SHIONOIRI, F.; OHASHI, K.; OSUGA, J.; HARADA, K.; GOTODA, T.; NAGAI, R.; ISHIBASHI, S.; YAMADA, N. **A crucial role of sterol regulatory element-binding protein-1 in the regulation of lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids.** *J Biol Chem*, v. 274, n. 50, p. 35840-4, 1999.

YAMAMOTO, N.; LI, Q.L.; MITA, S.; MORISAWA, S.; INOUE, A. **Inhibition of thyroid hormone binding to the nuclear receptor by mobilization of free fatty acids.** *Horm Metab Res*, v. 33, n. 3, p. 131-7, 2001.

ZAVACKI, A.M.; YING, H.; CHRISTOFFOLETE, M.A.; AERTS, G.; SO, E.; HARNEY, J.W.; CHENG, S.Y.; LARSEN, P.R.; BIANCO, A.C. **Type 1 iodothyronine deiodinase is a sensitive marker of peripheral thyroid status in the mouse.** *Endocrinology*, v. 146, n. 3, p. 1568-75, 2005.

ZHAO, A.; YU, J.; LEW, J.L.; HUANG, L.; WRIGHT, S.D.; CUI, J. **Polyunsaturated fatty acids are FXR ligands and differentially regulate expression of FXR targets.** *DNA Cell Biol*, v. 23, n. 8, p. 519-26, 2004.

# 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](#)