BEATRIZ DE SOUZA AMORIM

PAPEL DO TR β NA TERMOGÊNESE INDUZIDA PELA DIETA

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Mestre em Ciências (Ciências
Morfofuncionais)

São Paulo
2010

BEATRIZ DE SOUZA AMORIM

PAPEL DO TR β NA TERMOGÊNESE INDUZIDA PELA DIETA

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Mestre em Ciências (Ciências
Morfofuncionais)

São Paulo
2010

BEATRIZ DE SOUZA AMORIM

PAPEL DO TR β NA TERMOGÊNESE INDUZIDA PELA DIETA

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientador: Profa. Dra Cecília Helena de Azevedo
Gouveia Ferreira

São Paulo
2010

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Amorim, Beatriz de Souza.

Papel do TR β na termogênese induzida pela dieta / Beatriz de Souza Amorim. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Cecília Helena de Azevedo Gouveia Ferreira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Hormônios tireoidianos e metabolismo energético.

Versão do título para o inglês: Role of TR β in diet induced thermogenesis.

Descritores: 1. Termogênese 2. Hormônios tireoidianos 3. Metabolismo energético 4. Receptores hormonais 5. Obesidade 6. Análogos do TR β I. Ferreira, Cecília Helena de Azevedo Gouveia II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB08/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Beatriz de Souza Amorim.

Título da Dissertação: Papel do TR β na termogênese induzida pela dieta .

Orientador(a): Cecília Helena de Azevedo Gouveia Ferreira.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **90** nas fls. **60** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Cecília Helena A Gouveia Ferreira, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**Especificidade dos subtipos de receptores de T3 no controle o metabolismo energético em dieta hipercalórica**" do qual participou(aram) o(s) alunos **Beatriz de Souza Amorim**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em **21.10.08**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 22 de outubro de 2008.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEA - ICB/USP

À minha família
uma homenagem
pela motivação e
suporte constante
durante a execução
deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder sabedoria, força, coragem e determinação, permanecendo ao meu lado durante a realização deste trabalho.

À Profa Dra. Cecília Helena Gouveia por tornar possível a realização deste projeto e ceder gentilmente o espaço e o equipamento para a realização de experimentos.

À Profa. Dra. Miriam Oliveira Ribeiro, pela orientação desde a iniciação científica, pelo conhecimento transmitido e por proporcionar a realização do meu mestrado.

Ao Prof. Dr. Newton Sabino Canteras por me aceitar no programa de pós-graduação e permitir a realização do meu mestrado junto ao departamento de anatomia.

Aos colegas de trabalho e colaboradores: Anselmo Moriscot, Antônio Bianco, Beatriz Freitas, Carmen Lancelloti, Cintia Ueta, Flávia Llimona, Heraldo de Souza, Hermes Barbeiro, Marcelo Aoki, Marcelo Christoffolete, Marisa Passarelli, Renata Nassif e Sérgio Catanozi.

Aos colegas de trabalho da USP: Fátima Freitas, Luciane Capelo, Tatiana Fonseca, Cristiane Costa e Eduardo Beber, pelos ensinamentos, paciência, predisposição e amizade.

A todos do departamento de anatomia que, de alguma forma, ajudaram na realização deste projeto.

Aos laboratoristas, funcionários e colegas da Universidade Presbiteriana Mackenzie, pela amizade e ajuda sempre presente.

Aos meus irmãos, Marcos e Débora, e aos demais familiares, por estarem sempre ao meu lado e pela motivação.

Aos meus pais, Almir e Eliete, pelo amor, ajuda, dedicação, paciência e motivação constantes para a realização deste projeto.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq), por fornecer subsídios para a realização deste trabalho e bolsa de estudos.

RESUMO

AMORIM, B. S. **Papel do TR β na termogênese induzida pela dieta.** 2010.

Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O hormônio tireoideano (T3) desempenha papel importante no desenvolvimento, no crescimento e no metabolismo celular. Um dos seus principais efeitos é a ativação do metabolismo basal, contribuindo de forma importante com a regulação do peso corporal, enquanto diminui os níveis plasmáticos de triglicérides e colesterol. A ativação seletiva do receptor β para o hormônio tireoideano (TR β) por meio de agonistas seletivos reduziu níveis séricos de colesterol além de aumentar o metabolismo sem causar efeitos indesejáveis sobre o coração, osso ou músculo esquelético. Estes dados sugerem que estes agonistas poderiam ser úteis no tratamento das manifestações da síndrome metabólica tais como obesidade, hipercolesterolemia e resistência à insulina. Dessa forma, estudamos os efeitos da ativação do TR β usando um agonista também da série GC, o GC-24, em ratos machos *Wistar* tratados com dieta rica em gordura e submetidos a injeções diárias de T3 correspondente a 10x a dose fisiológica (30ng/g P.C./dia) ou GC-24 em dose equimolar (17ng/g P.C./dia). Nosso estudo mostrou que o GC-24 preveniu algumas alterações metabólicas típicas da síndrome metabólica, tais como o aumento da massa gorda, intolerância à glicose e hipertrigliceridemia e corrigiu parcialmente outras como a hipercolesterolemia, o aumento do conteúdo de colesterol hepático e IL-6. Estes achados sugerem um papel importante do TR β na mediação dos efeitos do T3 e devem ter repercussão importante na utilização potencial de agonistas seletivos ao TR β como agentes hipocolesterolemiantes.

Palavras-chave: Análogos do TR β , termogênese, hormônios tireoideanos, metabolismo.

ABSTRACT

AMORIM, B. S. **Role of TR β in diet- induced thermogenesis.** 2010.

Master thesis (Science) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Thyroid hormone (T3) plays an important role in the development, growth and cell metabolism. One of its main effects is to activate the basal metabolic rate significantly contributing to the regulation of body weight, while decreasing serum triglycerides and cholesterol levels. Thyroid hormone receptor β selective activation through selective agonists reduced serum cholesterol levels besides increasing metabolic rate without causing undesirable side effects on the heart, bone or skeletal muscle. These data suggest that these agonists could be useful in the treatment of metabolic syndrome manifestations such as obesity, hypercholesterolemia and insulin resistance. Thus, we studied the effects of TR β activation also using an agonist from the GC series, the GC-24 in male *Wistar* rats treated with high fat diet and submitted to daily T3 injections, corresponding to 10x physiological dose (30ng/g B.W. /day) or equimolar doses of GC-24 (17ng/g P.C. /day). Our study has shown that GC-24 prevented some of the metabolic abnormalities typical of metabolic syndrome such as increase in fat mass, glucose intolerance and hypertriglyceridemia and partially corrected other ones like hypercholesterolemia, the increase in hepatic cholesterol and IL-6 levels. These findings suggest that TR β has an important role in the mediating of T3 effects and should have important repercussions in the potential use of selective agonists to TR β as cholesterol lowering agents.

Key words: TR β analogs, thermogenesis, thyroid hormones, metabolism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Fórmulas estruturais dos hormônios tireoideanos e seus compostos precursores.	5
Figura 2. Estruturas químicas dos moduladores para TR.....	12
Figura 3. Variação média do peso corporal de animais submetidos à dieta rica em gordura e tratados com T3 10x (30 ng/g P.C./dia) ou GC-24 em dose equimolar.	23
Figura 4. Variação do peso corporal de animais submetidos à dieta rica em gordura e tratados com T3 10x (30 ng/g P.C./dia) ou GC-24 em dose equimolar.	24
Figura 5. Ingestão alimentar de animais submetidos à dieta rica em gordura e tratados com T3 10x (30 ng/g P.C./dia) ou GC-24 em dose equimolar.....	25
Figura 6. Ingestão alimentar cumulativa de animais submetidos à dieta rica em gordura e tratados com T3 10x (30 ng/g P.C./dia) ou GC-24 em dose equimolar	25
Figura 7. Ingestão calórica de animais submetidos à dieta rica em gordura e tratados com T3 10x (30 ng/g P.C./dia) ou GC-24 em dose equimolar	26
Figura 8. Consumo de oxigênio de animais submetidos à dieta rica em gordura e tratados com T3 10x (30 ng/g P.C./dia) ou GC-24 em dose equimolar.....	27
Figura 9. Gordura corporal de animais submetidos à dieta rica em gordura e tratados com T3 10x (30 ng/g P.C./dia) ou GC-24 em dose equimolar.	28
Figura 10. Média das áreas estimadas de adipócitos brancos de animais submetidos à dieta rica em gordura e tratados com T3 10x (30 ng/g P.C./dia) ou GC-24 em dose equimolar.	29
Figura 11. Histologia do tecido adiposo marrom(BAT), fígado e tecido adiposo branco(WAT) de animais submetidos à dieta rica em gordura e tratados com T3 10x (30 ng/g P.C./dia) ou GC-24 em dose equimolar.....	30
Figura 12. Dosagem do conteúdo de água total de animais submetidos à dieta rica em gordura e tratados com T3 10x (30 ng/g P.C./dia) ou GC-24 em dose equimolar..	30
Figura 13. Dosagem de colesterol plasmático total de animais submetidos à dieta rica em gordura e tratados com T3 10x (30 ng/g P.C./dia) ou GC-24 em dose equimolar.....	31
Figura 14. Dosagem de colesterol hepático de animais submetidos à dieta rica em gordura e tratados com T3 10x (30 ng/g P.C./dia) ou GC-24 em dose equimolar.	32
Figura 15. Dosagem de triglicérides de animais submetidos à dieta rica em gordura e tratados com T3 10x (30 ng/g P.C./dia) ou GC-24 em dose equimolar.....	32
Figura 16. Dosagem de ácidos graxos livres de animais submetidos à dieta rica em gordura e tratados com T3 10x (30 ng/g P.C./dia) ou GC-24 em dose equimolar.	33

Figura 17. Teste de tolerância à glicose (2g/kg) de animais submetidos à dieta rica em gordura e tratados com T3 10x (30 ng/g P.C./dia) ou GC-24 em dose equimolar.	34
Figura 18. Teste de tolerância à insulina (0.5U/kg) de animais submetidos à dieta rica em gordura e tratados com T3 10x (30 ng/g P.C./dia) ou GC-24 em dose equimolar.	35
Figura 19. Dosagem de interleucina-6 (IL-6) de animais submetidos à dieta rica em gordura e tratados com T3 10x (30 ng/g P.C./dia) ou GC-24 em dose equimolar.	36
Figura 20. Dosagem de fator de necrose tumoral (TNF α) de animais submetidos à dieta rica em gordura e tratados com T3 10x (30 ng/g P.C./dia) ou GC-24 em dose equimolar.	37
Figura 21. Peso do coração de animais submetidos à dieta rica em gordura e tratados com T3 10x (30 ng/g P.C./dia) ou GC-24 em dose equimolar.	38
Figura 22. Perfil de expressão gênica de animais submetidos à dieta rica em gordura e tratados com T3 10x (30 ng/g P.C./dia) ou GC-24 em dose equimolar.	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5'DII	-	enzima desiodase tipo 2. Desiodação no carbono 5'
ACC	-	acetil coA carboxilase
AMPc	-	adenosina monofosfato cíclico
Asp	-	aspargina
ATP	-	adenosina trifosfato
BAT	-	tecido Adiposo Marrom
BW	-	"Body weight"
cDNA	-	ácido desoxiribonucleico complementar
CPT1	-	carnitina Palmitoil Tranferase tipo 1
D1	-	desiodase tipo 1
D2	-	desiodase tipo 2
D3	-	desiodase tipo 3
DIT	-	diiodotirosina
DNA	-	ácido desoxiribonucleico
EDTA	-	"disodium ethylene diamine tetra acetate"
EPM	-	erro padrão da média
GC-24	-	ácido dimetil 4 (4' hidroxil, 3' benzil) benzilfenoxiacético
GDP	-	difosfato de guanidina
GLUT-4	-	transportador de glicose isoforma 4
Gs	-	proteína G estimulatória
GTT	-	Teste de tolerância à glicose
H ₂ SO ₄	-	ácido sulfúrico
HE	-	hematoxilina-eosina
IL-6	-	Interleucina-6
ip	-	intra peritoneal
ITT	-	Teste de tolerância à insulina
KOH	-	Hidróxido de potássio
LATs	-	transportadores L Aminoácidos
LBD	-	domínio de Ligação ao ligante
LHS	-	lipase Hormônio Sensível
MCT-8	-	transportadores de Monocarboxilatos Isoforma 8
MCTs	-	transportadores de Monocarboxilatos
MIT	-	moniodotirosina
NE	-	norepinefina
OATPs	-	transportadores de ânions orgânicos
PC	-	Peso corporal
PEPCK	-	enzima fosfo-enol-piruvato carboxiquinase
PGC1	-	coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador do peroxisoma
PKA	-	proteína Quinase A
RNA _m	-	ácido ribonucleico mensageiro
RPM	-	Rotações por minuto
rT3	-	triiodotironina reversa
RT-qPCR	-	reação da polimerase em cadeia em tempo real quantitativo
RXR	-	receptor de ácido retinóico 9-cis
SD	-	succinato desidrogenase
Ser	-	serina
SERCA 1	-	"sarco/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ ATPase 1"

SERCA	-	“ <i>sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPases</i> ”
SNS	-	sistema Nervoso Simpático
$t_{1/2} \sim 7$ dias	-	meia-vida de aproximadamente 7 dias
$t_{1/2}$	-	meia vida
$t_{1/2} \sim 1$ dia	-	meia-vida de aproximadamente 1 dia
T3	-	triiodotironina
T4	-	tiroxina
TNF- α	-	fator de Necrose Tumoral alfa
TR	-	receptor de hormônio Tiroidiano
TR $\Delta\beta$ 3	-	receptor de hormônio Tiroidiano delta β 3
TREs	-	elementos Responsivos
TRs	-	receptores de hormônio tiroidiano
TR α 1	-	receptor de hormônio Tiroidiano α 1
TR α 2	-	receptor de hormônio Tiroidiano α 2
TR α	-	receptor de hormônio Tiroidiano α
TR β 1	-	receptor de hormônio Tiroidiano β 1
TR β 2	-	receptor de hormônio Tiroidiano β 2
TR β 3	-	receptor de hormônio Tiroidiano β 3
TR β	-	receptor de hormônio Tiroidiano β
UCP1	-	proteína Desacopladora tipo 1
UCP2	-	proteína Desacopladora tipo 2
UCP3	-	proteína Desacopladora tipo 3
VLDL	-	lipoproteínas de muito baixa densidade
VO ₂	-	volume de oxigênio
WAT	-	tecido adiposo branco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	- 1 -
<i>1.1 Metabolismo e Termogênese</i>	<i>- 1 -</i>
<i>1.2 Hormônios Tireoideanos e Termogênese</i>	<i>- 4 -</i>
<i>1.3 Ação dos Hormônios Tireoideanos</i>	<i>- 8 -</i>
<i>1.4 Hormônio Tireoideano e Composição Corporal</i>	<i>- 12 -</i>
<i>1.5 Síndrome Metabólica.....</i>	<i>- 14 -</i>
2 OBJETIVO	- 17 -
3 MATERIAIS E MÉTODOS	- 18 -
<i>3.1 Animais</i>	<i>- 18 -</i>
<i>3.2 Procedimentos</i>	<i>- 19 -</i>
<i>3.2.1 Dieta rica em gordura</i>	<i>- 19 -</i>
<i>3.2.2 Consumo de oxigênio</i>	<i>- 19 -</i>
<i>3.2.3 Análise da composição corporal.....</i>	<i>- 19 -</i>
<i>3.2.4 Teste de Tolerância à Glicose –GTT</i>	<i>- 20 -</i>
<i>3.2.5 Teste de Tolerância à Insulina -ITT</i>	<i>- 20 -</i>
<i>3.2.6 Dosagem de colesterol total.....</i>	<i>- 20 -</i>
<i>3.2.7 Dosagem de colesterol hepático</i>	<i>- 20 -</i>
<i>3.2.8 Dosagem de triglicérides e ácidos graxos livres.....</i>	<i>- 21 -</i>
<i>3.2.9 Citocinas</i>	<i>- 21 -</i>
<i>3.2.10 Histologia</i>	<i>- 21 -</i>
<i>3.2.11 Análise de RNAm e PCR em tempo real</i>	<i>- 22 -</i>
<i>3.3 Análise estatística.....</i>	<i>- 22 -</i>
4 RESULTADOS	- 23 -
5 DISCUSSÃO	- 41 -
6 CONCLUSÕES.....	- 53 -
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	- 54 -

1 INTRODUÇÃO

1.1 Metabolismo e Termogênese

Organismos e células vivas realizam trabalho para crescer, reproduzir e permanecer vivos. A habilidade de controlar e transformar energia em trabalho biológico é uma propriedade fundamental de todos os organismos vivos adquirida nos primórdios da evolução celular. Organismos mais evoluídos possuem uma ampla variedade de mecanismos de transferência e transformação de uma forma de energia em outra e utilizam-se da energia química como combustível para sintetizar macromoléculas complexas a partir de precursores mais simples. Eles também são capazes de converter energia química de substratos energéticos em gradientes elétricos e de concentração, movimento e calor (NELSON e COX, 2005).

A atividade celular altamente coordenada, na qual múltiplos sistemas enzimáticos cooperam para obter energia química a partir de substratos energéticos, converter nutrientes em moléculas características da própria célula, sintetizar e degradar macromoléculas específicas para a execução das funções celulares é denominada metabolismo (NELSON e COX, 2005). Nesse processo inerente à vida, grande parte da energia é dissipada na forma de calor em decorrência da baixa eficiência termodinâmica, por volta de 30%, em homeotérmicos. A baixa eficiência termodinâmica desses animais resulta em um metabolismo mais ativo, ou seja, sustentam um número maior de transformações energéticas em determinado espaço de tempo. Além disso, uma fração maior da energia envolvida nessas transformações é dissipada como calor (SILVA, 2006).

Os mecanismos de liberação de calor pelo corpo deram aos animais homeotérmicos a capacidade de manter relativamente constante a temperatura corporal, um parâmetro fisiológico importante para a homeostasia. Tais mecanismos são chamados de termogênicos. O mecanismo denominado termogênese obrigatória ocorre à termoneutralidade ($\sim 30^\circ\text{C}$ em camundongos, $\sim 28^\circ\text{C}$ em ratos e $\sim 23^\circ\text{C}$ em humanos) e não inclui os custos energéticos da prática de atividades físicas ou do processamento de alimentos, uma vez que representa o gasto energético mínimo necessário à sobrevivência (GORDON, 1993; SILVA, 2006). Entretanto, a quantidade de calor liberada por um organismo em repouso pode aumentar em resposta a quedas na temperatura ambiente ou aumento da ingestão alimentar. A quantidade

de calor liberada nessas condições é denominada termogênese facultativa (DANFORTH e BURGUER, 1984; KIM, 2008).

A exposição ao frio leva o hipotálamo a iniciar uma resposta de tremor, o mecanismo involuntário mais importante de termogênese facultativa induzida pelo frio em humanos adultos e grandes mamíferos. Contudo, constitui uma forma menos econômica de geração de calor, se comparada à produção pelo processo de desacoplamento de ATP na mitocôndria. Logo, termogênese facultativa que não envolve tremor é a mais importante fonte de calor em recém-nascidos e outros pequenos mamíferos (BIANCO *et al.*, 2005).

Como mecanismo de geração de calor mais eficiente e duradouro, os animais homeotérmicos desenvolveram a “*non-shivering facultative thermogenesis*” ou simplesmente termogênese facultativa (SILVA, 2006).

A ingestão de dieta rica em gordura pode, da mesma maneira que o frio, induzir a termogênese facultativa, que é então denominada termogênese facultativa induzida pela dieta. Essa é controlada pelo hipotálamo que, por sua vez, regula a atividade simpática em diversos tecidos (CURCIO *et al.*, 1999; FELDMANN *et al.*, 2009; LOWELL e BACHMAN, 2003; ROTHWELL e STOCK, 1979; ROTHWELL *et al.*, 1983; STOCK e ROTHWELL, 1986).

Embora a musculatura esquelética apresente um potencial termogênico importante, o tecido adiposo marrom (BAT) é o mais importante sítio de termogênese facultativa (CANNON e NEDERGAARD, 1985). Segundo Silva (2006), efetivamente o BAT pode gerar mais calor e com um custo energético mais baixo do que mecanismos naturais e bioquímicos, provavelmente devido a sua localização anatômica particular (SILVA, 2006). O BAT é encontrado de forma mais abundante em fetos e recém-nascidos e está presente em todos os pequenos mamíferos (CANNON e NEDERGAARD, 2004). Em ratos, está localizado em maior quantidade entre as escápulas (BAT interescapular), mas também é encontrado entre as costelas (intercostal), ao lado da aorta (para-aórtico) e ao redor dos rins (peri-renal) (CANNON e NEDERGAARD, 2004). Em recém-nascidos humanos, acumula-se tipicamente no pescoço, axilas, costas, mediastino, abdômen e coxa (CARTER e SCHUCANY, 2008). Recentemente, descreveu-se a existência de tecido adiposo marrom em humanos adultos nas regiões supraclavicular e no pescoço por meio de técnicas de medicina nuclear (CHIBA *et al.*, 2006). Além disso, a presença da proteína desacopladora tipo 1 (UCP-1) foi identificada em depósitos de tecido adiposo perinéfricos e paraaórticos, caracterizando esse tecido como adiposo marrom (GARRUTI e RICQUIER, 1992; KORTELAJINEN *et al.*, 1993). Além de ser mais frequente em mulheres, sua proporção seria maior em humanos

adultos com menos de 50 anos, vindo a diminuir com a idade (STURKENBOOM *et al.*, 2004; COHADE *et al.*, 2003; CINTI, 2006).

O papel do BAT como principal sítio de termogênese química baseia-se na expressão da proteína desacopladora UCP1, que acelera muitas vezes o retorno de prótons para a matriz mitocondrial e faz com que a maior parte da energia proveniente do ciclo de Krebs e, por conseguinte, da oxidação dos substratos energéticos, perca-se na forma de calor. Um aumento na área de superfície na membrana mitocondrial e mudanças na sua composição fosfolipídica com consequente aumento na sua permeabilidade aos prótons também estão envolvidos na termogênese do BAT (KROTKIEWSKI, 2002).

Avanços na biologia molecular permitiram a descoberta de genes codificantes de proteínas com diversos graus de homologia à UCP-1. A clonagem de duas novas UCPs, uma delas a UCP-2, cuja sequência de aminoácidos mostra 59% de homologia à UCP-1 humana e de distribuição tecidual mais ubíqua e UCP-3, cuja sequência de aminoácidos mostra 57% de homologia à UCP-1 e 73% à UCP-2 humanas, trouxe a expectativa de que elas poderiam explicar o mecanismo de desacoplamento da síntese de ATP na mitocôndria em outros tecidos além do BAT e que poderiam estar envolvidas na regulação do gasto energético (BOSS *et al.*, 1997; FLEURY *et al.*, 1997; GIMENO *et al.*, 1997; VIDAL-PULG *et al.*, 1997; GONG *et al.*, 2000).

O fato de a UCP-2 estar expressa no BAT e no cérebro de roedores sugere que essa proteína desempenhe um papel na termogênese facultativa e que esteja também envolvida na função neuronal e talvez em termogênese local (RICHARD *et al.*, 1998; ADAMS, 2000). Da mesma forma, a expressão relativamente abundante de UCP-3 no BAT e no músculo esquelético e seu aumento em resposta à administração de hormônio tireoideano contribui para a possível caracterização dessa proteína como termogênica (ADAMS, 2000; SPRAGUE *et al.*, 2007).

Entretanto, estudos sugerem que a UCP-2 esteja envolvida no metabolismo de gorduras e na sensibilidade à glicose das células β das ilhotas de Langerhans e ainda mostraram que a UCP-3 não está envolvida no fluxo basal de prótons através da membrana interna da mitocôndria (CADENAS *et al.*, 1999; BEZAIRE *et al.*, 2001), nem contribui para a termogênese no BAT (GONG *et al.*, 2000., LIEBIG *et al.*, 2004; MACLELLAN *et al.*, 2005). Tais evidências sugerem que essas proteínas não tenham um papel termogênico.

Portanto, a função das proteínas UCP-2 e UCP-3, bem como a possibilidade de possuírem ação termogênica, ainda constituem alvo de controvérsia.

Sabe-se há décadas que o tecido adiposo marrom é dependente do Sistema Nervoso Simpático (SNS) (ROTHWELL, 1989). O controle do BAT pelo SNS é realizado através da liberação do seu principal neurotransmissor, a norepinefrina (NE), em resposta ao frio ou à ingestão alimentar, eventos que ativam a termogênese facultativa. A ligação da NE a receptores adrenérgicos presentes na membrana da célula adiposa marrom estimula, por intermédio da proteína G estimulatória (Gs), a enzima adenil ciclase, cujo estímulo aumenta a concentração de AMPc intracelular, o que leva à ativação da proteína quinase A (PKA). Esta, por sua vez, é responsável pela ativação por fosforilação da enzima lipase hormônio-sensível (LHS), que eleva a hidrólise de triglicerídeos intracelulares com consequente liberação de ácidos graxos. Estes são transportados pela proteína carnitina palmitoil-transferase tipo 1 (CPT1) para o interior da mitocôndria. Na matriz mitocondrial sofrem oxidação e liberam energia na forma de prótons de hidrogênio no espaço intermembranoso, o que gera um gradiente eletroquímico. Devido à existência desse gradiente, os prótons retornam à matriz mitocondrial através da ATP sintetase, o que resulta na síntese de ATP. Porém, devido à presença da UCP-1 no tecido adiposo marrom, parte dos prótons de hidrogênio retornam à matriz mitocondrial através dessa proteína e a energia do processo é liberada na forma de calor (BIANCO *et al.*, 2005). Além de servir como substrato energético, os ácidos graxos estão envolvidos na ativação fisiológica da UCP-1. Esta está acoplada ao nucleotídeo citosólico GDP que bloqueia sua atividade. Os ácidos graxos são capazes de deslocar o sítio de ligação de GDP da UCP-1 que fica disponível aos prótons de hidrogênio. Estes agora são capazes de retornar à matriz mitocondrial através da UCP-1, que se encontra ativada (CANNON e NEDERGAARD, 2004; HEATON *et al.*, 1978).

1.2 Hormônios Tireoideanos e Termogênese

A estrutura do hormônio tireoideano consiste em um aminoácido tirosina conjugado com uma cadeia alanina formando assim um bifenil éter, ao qual são incorporados quatro átomos de iodo sob a forma de iodeto (Figura 1).

Figura 1: Fórmulas estruturais dos hormônios tireoideanos e seus compostos precursores. Monoiodotirosina (MIT), Diiodotirosina (DIT), 3,5,3',5'-tetraiodotironina ou tiroxina (T4), 3,5,3'-triiodotironina (T3), 3,3',5'-triiodotironina (T3 reverso) Fonte: Leslie e Hennemann, (2002).

Supõe-se que o propósito da molécula de bifenil éter seja posicionar os átomos grandes de iodeto na posição espacial correta, a fim de promover a ligação do hormônio tireoideano com alto grau de especificidade e afinidade à porção ligadora ou ligante do seu receptor (BIANCO, 2002).

Dependendo do conteúdo e distribuição de iodeto em cada estrutura fenólica, uma série de iodotironinas é formada, das quais tiroxina (T4), triiodotironina (T3) e T3 reverso (rT3) são biologicamente as mais relevantes (BIANCO, 2002).

A tiroxina é o principal produto da glândula tireóide, um pró-hormônio que deve ser convertido na forma ativa (T3), pois esta é a molécula biologicamente ativa com a menor meia-vida ($t_{1/2} \sim 1$ dia) responsável pela ação tiroideana. Se, entretanto, constituísse o principal produto de secreção da glândula tireóide, a viabilidade do hormônio tireoideano biologicamente ativo flutuaria de acordo com a ingestão de iodeto. Logo, a glândula tireóide secreta grande quantidade de T4, molécula com meia-vida longa ($t_{1/2} \sim 7$ dias), que se liga a proteínas circulantes e constitui uma grande reserva extratiroidal circulante (aproximadamente 1 umol) no adulto humano (BIANCO, 2002).

O hormônio tireoideano (T3) desempenha efeitos importantes no desenvolvimento, crescimento e metabolismo. Em adultos, os efeitos primários dos hormônios tireoideanos são manifestados por alterações no metabolismo energético basal. De fato, o hormônio tireoideano aumenta a taxa metabólica basal, que pode ser verificada pelo consumo de oxigênio dos

animais tratados com T3 (ABRAHAM *et al.*, 1985; MAGNUS-LEVY, 1895; OPPENHEIMER *et al.*, 1991; STAMP *et al.*, 1969).

Entretanto, os mecanismos pelos quais os hormônios tiroideanos aumentam o metabolismo basal não estão inteiramente claros e podem envolver estimulação de diversos ciclos de substratos e ciclos iônicos, levando ao aumento do *turnover* de ATP e consequente liberação de calor (CURCIO *et al.*, 1999).

Um dos mecanismos por meio do qual o hormônio tireoideano aumenta a termogênese consiste no aumento da permeabilidade da membrana celular ao sódio e ao potássio, permitindo a entrada passiva de Na⁺ na célula e saída passiva de K⁺, o que faz com que a Na⁺ K⁺ ATPase gaste mais energia para manter os gradientes (DESAI-YAJNIK *et al.*, 1995; HARBER e LOEB, 1984; HARBER e LOEB, 1986; HARBER e LOEB, 1988).

Outro mecanismo positivamente influenciado pelo hormônio tireoideano é o ciclo do Ca²⁺ entre o citosol e o retículo sarcoplasmático, envolvido no mecanismo de contração e relaxamento muscular. A energia utilizada para tal processo provém do acoplamento da hidrólise do ATP por uma ATPase Ca²⁺ dependente, cuja família é denominada SERCA (*sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPases*). O T3 aumenta a atividade da SERCA1, ou seja, a da hidrólise de ATP, sem acúmulo significativo de Ca²⁺ no interior do retículo sarcoplasmático, mas com aumento na recirculação desse íon resultando em aumento de energia liberada no processo, a qual é dissipada na forma de calor (ARRUDA *et al.*, 2003; DE MEIS, 2000; DE MEIS *et al.*, 2003; DE MEIS *et al.*, 2005).

Além do ciclo do Ca²⁺, outros ciclos como glicogenólise/glicogênese, proteólise/síntese proteica e lipólise/lipogênese são influenciados pelo hormônio tireoideano (OPPENHEIMER *et al.*, 1991).

O gasto energético de repouso aumenta de forma significativa em resposta a mudanças ambientais ou comportamentais como alterações na temperatura ambiente e/ou ingestão de alimentos e este fenômeno é chamado de termogênese facultativa. Além do seu papel na regulação do metabolismo basal, o T3 é um potente estimulador da termogênese facultativa.

O BAT, um dos tecidos profundamente regulados pelo T3, constitui o principal sítio de termogênese facultativa em pequenos mamíferos. O papel do hormônio tireoideano na ativação da termogênese no BAT pode ser verificado por meio da ação direta do T3 na expressão da UCP-1 e na sinalização adrenérgica.

Animais hipotireoideos não são capazes de tolerar a exposição ao frio, pois apresentam baixos níveis de UCP-1 nessa condição. Mesmo após administração de

norepinefrina, a resposta do BAT ao frio não é restaurada aos níveis eutireoideanos. Essa situação é revertida após administração de tiroxina ou doses suprafisiológicas de triiodotironina (BIANCO e SILVA, 1987b; DE JESUS *et al.*, 2001). O papel do T3 de estimular a expressão da UCP-1, aliás, foi extensamente demonstrado. Ele não só aumenta os níveis de RNAm para UCP1 como também aumenta sua expressão nas mitocôndrias. (BRANCO *et al.*, 1999; HERNÁNDEZ e OBREGÓN, 2000; MASAKI; YOSHIMATSU; SAKATA, 2000; PETROVIC; CVIJIC; DAVIDOVIC, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2001).

O fato de animais hipotireoideos não serem capazes de tolerar a exposição ao frio foi inicialmente atribuído aos baixos níveis de UCP-1. Entretanto, estudos posteriores mostraram que a resposta termogênica do BAT era restaurada pelo tratamento com T3, mesmo com níveis de UCP-1 mais baixos (BRANCO *et al.*, 1999). Embora a concentração de UCP-1 seja importante na resposta do BAT, é possível que existam outros mecanismos independentes da UCP-1 influenciando a resposta termogênica do tecido.

O hormônio tireoideano potencializa sinais iniciados por receptores β adrenérgicos tanto em humanos quanto em ratos, em diversos tecidos, inclusive no tecido adiposo marrom. (BILEZIKIAN e LOEB, 1983; GINSBERG *et al.*, 1981; HELLSTRÖM *et al.*, 1997; ROTHWELL; STOCK; SUDERA, 1985; RUBIO *et al.*, 1995a; RUBIO; RAASMAJA; SILVA, 1995b). Evidências sugerem que um dos mecanismos de tal potencialização seja o aumento do número de receptores β adrenérgicos pelo T3 (BILEZIKIAN e LOEB, 1983; GINSBERG *et al.*, 1981; HELLSTRÖM *et al.*, 1997; ROTHWELL; STOCK; SUDERA, 1985; RUBIO *et al.*, 1995a; RUBIO; RAASMAJA; SILVA, 1995b). Entretanto demonstrações de aumento modesto, inalteração do número de receptores β adrenérgicos pelo T3, e manutenção do número de receptores no hipotireoidismo dão a entender que este mecanismo pode não ser o responsável pelo aumento da responsividade de receptores β adrenérgicos pelo T3 (HELLSTRÖM *et al.*, 1997; MALBON *et al.*, 1978; SUNDIN; MILLS; FAIN, 1984; WAHRENBERG; WENNLUND; ARNER, 1994), propondo contribuição significativa de efetores pós-receptores regulados pelo hormônio tireoideano.

No que diz respeito a tais efetores, sabe-se que o T3 aumenta a atividade e a expressão das isoformas da adenil ciclase e potencializa o acúmulo de AMPc em resposta a catecolaminas (BUMGARNER; RAMKUMAR; STILES, 1989; MILLS; GARCIA-SAINZ; FAIN, 1986; PRACYK e SLOTKIN, 1992; SUNDIN; MILLS; FAIN, 1984; WAHRENBERG; WENNLUND; ARNER, 1994).

Além disso, foi demonstrado *in vivo* que o receptor adrenérgico $\alpha 1$ estimula a desidase tipo 2, que é a isoforma de desidase expressa em maior extensão no BAT e responsável pela conversão de T4 em T3 (SILVA e LARSEN, 1983; SILVA e LARSEN 1985). Esta é outra via de sinergismo entre o hormônio tiroideano e o SNS na regulação da termogênese observada no BAT.

Além de influenciar a sinalização adrenérgica, o T3 tem papel essencial no estímulo da lipogênese no BAT. Em adipócitos marrons isolados, a norepinefrina estimula a lipogênese e a atividade de enzimas como a enzima málica e acetil CoA carboxilase somente na presença de T4 ou em concentrações de T3 que saturem os TRs, o que demonstra o papel essencial do T3 e da desidase nesse processo (BIANCO *et al.*, 1998).

A lipogênese no BAT é importante porque fornece o substrato necessário pra manter a alta taxa oxidativa na mitocôndria do BAT.

A descoberta da enzima desidase do tipo 2 (5'DII), responsável pela conversão de T4 em T3 no BAT, permitiu entender de maneira mais precisa o papel do hormônio tiroideano nesse tecido. A 5'DII é estimulada pela norepinefrina, resultando no aumento das concentrações de T3 no BAT, o que leva a uma saturação na ocupação dos receptores de T3 no tecido, estimulando a expressão da UCP-1. Esse fato mostra que o hormônio tiroideano tem papel crítico na função do adipócito marrom. Além disso, constitui uma evidência de que os sinais gerados pela norepinefrina interagem de forma sinérgica com os sinais gerados pelo T3 para estimular a expressão da UCP-1. (BIANCO e SILVA, 1987a; BIANCO e SILVA, 1987b; BIANCO e SILVA, 1987c; BIANCO e SILVA, 1988; BIANCO; SHENG; SILVA, 1988; BIANCO; KIEFER; SILVA, 1992; BRANCO *et al.*, 1999).

1.3 Ação dos Hormônios Tiroideanos

Para que o hormônio tiroideano possa exercer seus efeitos, é necessário que este seja captado pelas células, um processo realizado por meio de transportadores localizados na membrana celular. Foram identificados e caracterizados inicialmente os transportadores de ânions orgânicos (OATPs) e os transportadores L- aminoácidos (LATs). Posteriormente, foram identificadas diversas isoformas de transportadores de monocarboxilatos (MCTs). Embora a família de MCTs compreenda quatorze membros (MCT-1-14), somente os MCTs 1, 2, 3, 4 e 6 mostraram transportar monocarboxilatos. A isoforma 8 (MCT-8) tem alta

afinidade por iodotironinas e facilita o transporte de hormônio tireoideano para o interior da célula (FRIESEMA *et al.*, 2003).

Mutações no gene que codifica o transportador MCT-8 estão associadas a uma forma de retardo mental ligada ao cromossomo X, a prejuízos neurológicos severos e a concentrações elevadas de T3 e baixas concentrações de T4 na corrente sanguínea (DUMITRESCU *et al.*, 2004; DUMITRESCU *et al.*, 2006; FRIESEMA *et al.*, 2004). O fato de a expressão específica de MCT-8 estar em populações de neurônios sensíveis ao hormônio tireoideano no cérebro em desenvolvimento mostra que o transportador desempenha um papel importante na captação de T3 por estas células e que influencia na concentração intracelular e na ação do T3 durante o desenvolvimento cerebral. A expressão de MCT-8 em tecidos como o fígado e o coração em humanos mostra que é possível este transportador estar implicado na regulação da concentração de T3 intracelular em outros tecidos além do cérebro, o que influencia a ação do T3 nesses tecidos.

É possível que o hormônio tireoideano exerça efeitos por intermédio de mecanismos não-clássicos independente de transcrição gênica, as chamadas ações não-genômicas. Essa teoria se baseia no fato de se observarem efeitos celulares minutos após a administração T3 e que, portanto, não poderiam envolver a ligação com os receptores no núcleo, na medida em que esse efeito levaria de horas a dias para ocorrer. Além disso, tais efeitos não são afetados por inibidores de transcrição e tradução (BASSET; HARVEY; WILLIAMS, 2003; DAVIS; DAVIS, 2002). Entretanto a existência dessas ações ainda não está estabelecida e é objeto de controvérsias, uma vez que as doses necessárias para se observarem esses efeitos são da ordem de centenas de vezes maiores do que as de doses fisiológicas.

É estabelecido que os hormônios tireoidianos ajam por meio de receptores nucleares (TRs), que são fatores de transcrição dependentes de ligantes codificados por dois genes diferentes os quais, por sua vez, codificam duas proteínas, TR α e TR β . Enquanto a ligação do hormônio tireoideano aos TRs induz ativação da transcrição de seus genes-alvo, a ausência dessa ligação inibe essa transcrição. O contrário também é verdade, ou seja, quando a ligação do T3 aos TRs resulta em inibição da transcrição gênica, a ausência da ligação do T3 aos TRs estimula a transcrição gênica (FREEDMAN, 1992; LAZAR, 1993; LESLIE e HENNEMANN, 2002).

Os receptores TR α ao sofrerem *splicings* alternativos originam isoformas distintas, $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$. A isoforma $\alpha 1$ se liga ao T3 e ao DNA e constitui um receptor funcional, enquanto as isoformas $\alpha 2$ e $\alpha 3$ não se ligam ao T3 e se mostram antagonistas em estudos *in vitro*. O papel dessas isoformas *in vivo* não está claro. Estudos mais recentes descreveram duas variantes

adicionais, $\Delta\alpha 1$ e $\Delta\alpha 2$, que se mostram repressoras *in vitro* e cujo significado fisiológico permanece desconhecido. O *splicing* alternativo sofrido pelo TR β codifica duas variantes, $\beta 1$ e $\beta 2$ (WILLIAMS, 2000).

Foram também identificadas duas novas variantes do TR β , o TR β_3 e TR $\Delta\beta_3$ que são geradas por *splicings* alternativos de RNA mensageiro (RNAm). No entanto, suas ações não foram caracterizadas em detalhes e sua importância fisiológica é incerta (WILLIAMS, 2000). Ademais, tais variantes foram identificadas somente em ratos (HARVEY *et al.*, 2007).

A variante $\alpha 2$ é altamente expressa no cérebro, ovário, fígado e gordura marrom. Contudo, sua função permanece pouco compreendida. Propõe-se que a variante $\alpha 2$ seja um inibidor endógeno da função do receptor do hormônio tireoideano, pois não se liga ao T3 e inibe a atividade do TR α e TR β em ensaios de expressão gênica. O mRNA do TR $\alpha 1$ é expresso no músculo cardíaco e esquelético, enquanto o mRNA do TR $\beta 1$ é predominante no fígado, rins e cérebro. Em contrapartida, o mRNA do TR $\beta 2$ tem a expressão tecidual mais restrita e está presente na glândula hipófise anterior, hipotálamo e cóclea (LESLIE e HENNEMANN, 2002).

Os receptores para hormônio tireoideano (TRs) possuem um domínio de ligação ao DNA (DBD), central, e um domínio de ligação ao ligante (LBD), carboxi-terminal.

O domínio de ligação ao DNA (DBD) liga o receptor ao elemento responsivo e também atua como transmissor de informações para outras regiões da molécula do receptor, localizadas no promotor do gene regulado pelo receptor nuclear (LESLIE e HENNEMANN, 2002).

As principais isoformas de TRs (TR α e TR β) possuem alta homologia nos seus respectivos DBDs e LBDs. De acordo com Borngraeber *et al.*, (2003), as LBDs de TR $\alpha 1$, TR $\alpha 2$, TR $\beta 1$ e TR $\beta 2$ são aproximadamente 75% idênticas na sua sequência de aminoácidos e a cavidade hidrofóbica que se prende ao hormônio difere somente em um aminoácido, serina (Ser) no TR α e aspargina (Asp) no TR β . Domínios de dimerização também são encontrados em ambos, DBD e LBD. As regiões mais variáveis entre as isoformas TR α e TR β são as aminoterminais que contêm domínios de ativação ligante-independentes (BORNGRAEBER *et al.*, 2003).

Os TRs ligam-se a elementos regulatórios (TREs), repetições das sequências de oligonucleotídeos hexaméricas específicas AGGTCA espaçadas por quatro nucleotídeos, os quais podem apresentar diferentes arranjos na região promotora dos genes-alvos. Na maioria das vezes, os TRs ligam-se ao DNA dimerizados com o receptor do ácido retinóico 9-cis

(RXR). A ligação do hormônio da tireóide no TR ligado ao TRE induz à mudança de conformação na região carboxiterminal da porção LBD do TR, promovendo a ligação de coativadores e a liberação de co-repressores (MORKIN *et al.*, 2004).

O fato de isoformas distintas de receptores de hormônio tireoideano apresentarem expressão tecidual diferenciada sugere que os efeitos do T3 sejam isoforma de TR específicos.

De fato, estudos em camundongos com nocaute para TR α , TR β ou ambos, demonstraram que algumas ações são preferencialmente mediadas por isoforma de TR, como o fato de que as ações do T3 no coração seriam mediadas pelo TR α (FORREST *et al.*, 1996a; FORREST *et al.*, 1996b; GAUTHIER *et al.*, 1999; GOTHE *et al.*, 1999; WIKSTRÖM *et al.*, 1998).

Os efeitos benéficos que o T3 exerce no metabolismo têm gerado um interesse muito grande no potencial terapêutico do hormônio tireoideano e de seus derivados. A ativação seletiva dos seus receptores nucleares oferece o potencial para um alvo mais limitado no que concerne às ações dos hormônios tireoideanos.

Com o intuito de se isolar as ações do T3 mediadas pela isoforma TR β foi criado, há alguns anos, um análogo do T3, o GC-1, que se liga com afinidade de 4 a 10 vezes maior ao TR β que ao TR α (CHIELLINI *et al.*, 1998). Essa ferramenta farmacológica atua na diminuição dos níveis plasmáticos de colesterol e triglicerídeos, além de aumentar o metabolismo com perda de peso corporal, sem os efeitos deletérios sobre o coração e sobre o músculo esquelético (FREITAS *et al.*, 2003; GROVER *et al.*, 2004; TROST *et al.*, 2000; VILLICEV *et al.*, 2007).

Outro análogo ao T3, recentemente desenvolvido e também componente da série GC, o GC-24 ou ácido dimetil 4 (4' hidroxil, 3' benzil) benzilfenoxiacético, liga-se ao TR β aproximadamente 40 vezes mais do que ao TR α e permite-nos isolar os efeitos do T3 mediados pelo TR β com o uso de doses mais altas evitando, assim, a ativação do TR α . Acresce-se ainda que os efeitos do GC-24 são similares aos do GC-1 (MIYABARA *et al.* 2005).

Logo, o GC-24 constitui uma ferramenta farmacológica com grande potencial no tratamento de diversas doenças, inclusive no tratamento contra a obesidade, embora não se saibam quais os efeitos do GC-24 em situações de alteração nutricional, como durante a ingestão de dietas ricas em gordura.

Figura 2: Estruturas químicas dos moduladores para TR: (a) GC-24. (b) GC-1. (c) Hormônio Tiroideano (T₃). Fonte: Borngraeber *et al.*, (2003).

1.4 Hormônio Tiroideano e Composição Corporal

O tecido adiposo branco é o principal reservatório energético do organismo de mamíferos. Em situações de oferta aumentada de energia os ácidos graxos são armazenados como triglicerídeos principalmente no tecido adiposo branco e pequenas quantidades em tecidos como fígado e músculo (COPPACK; JENSEN; MILES, 1994). Quando o gasto energético excede a ingestão calórica, os triglicerídeos são mobilizados e os ácidos graxos são utilizados como fonte de energia.

Além de estocar triglicerídeos e liberar ácidos graxos o tecido adiposo branco também cataboliza triglicérides com a finalidade de liberar glicerol e ácidos graxos que participam do metabolismo de glicose no fígado e em outros tecidos. Além disso, secreta adipocinas o que inclui hormônios e citocinas com efeitos biológicos específicos. Portanto, o tecido adiposo branco tem influência importante em vários processos biológicos como, por exemplo, a homeostase energética (CURI, *et al.*, 2002)

A obesidade, que pode ser definida como o crescimento excessivo da massa de tecido adiposo, é resultado do desbalanço do metabolismo de lipídeos, isto é, o equilíbrio entre lipólise e lipogênese, no tecido adiposo branco.

Sabe-se que o hormônio tiroideano é importante regulador da taxa metabólica basal e aumenta o gasto energético. Como resultado do aumento no gasto energético, o peso corporal pode ser reduzido em média 15% durante hipertiroidismo (KROTKIEWSKI, 2002; BAHÍ *et al.*, 2005), embora alguns pacientes hipertiroídeos não exibam alterações no peso corporal,

pois o aumento no gasto energético pode ser compensado por aumento concomitante da ingestão calórica (LÖNN *et al.*, 1998; RIIS *et al.*, 2008). Além do aumento no gasto energético, o hormônio tireoideano atua tanto na lipogênese quanto na lipólise do tecido adiposo branco.

O processo de lipogênese constitui a síntese de ácidos graxos esterificados, os quais formam os triglicerídeos, e ocorre tanto no tecido adiposo branco como no fígado. A lipogênese pode ocorrer a partir da captação de ácidos graxos circulantes, que provêm da hidrólise de triglicerídeos dos quilomícrons pela lipoproteína lipase. Posteriormente os ácidos graxos são reesterificados com glicerol 3 fosfato e estocados na forma de triglicerídeos. Em situações de disponibilidade aumentada de substratos energéticos os ácidos graxos podem ser sintetizados “de novo” a partir de acetil coenzima A, que é, em sua maior parte, proveniente da via glicolítica e, portanto, de glicose. Algumas enzimas estão envolvidas nesse processo, tais como ácido graxo sintase, acetil CoA carboxilase e a enzima málica. Diversos estudos mostraram que o hormônio tireoideano aumenta a expressão e o RNAm dessas enzimas (BLENNEMANN; MOON; FREAKER, 1992; DIAMANT; GORIN; SHAFRIR, 1972; GNONI; LANDRISCINA; QUAGLIARIELLO, 1980; ZABROCKA; KLIMEK; SWIERCZYNSKI, 2006), tanto no tecido adiposo branco quanto no fígado.

O processo de lipólise, que consiste na liberação de ácidos graxos a partir de triglicerídeos armazenados no tecido adiposo e visa fornecer ácidos graxos para outros tecidos em caso de necessidade energética, depende da atividade de enzimas lipolíticas presentes no tecido adiposo. A lipase hormônio sensível é uma das enzimas envolvidas nesse processo e tem sua atividade regulada por vias estimulatórias e inibitórias, mediando a lipólise no adipócito. Além disso, hormônios como a insulina e as catecolaminas atuam na regulação da lipólise, inibindo e estimulando, respectivamente este processo. As catecolaminas regulam a mobilização de lípidos no tecido adiposo e são responsáveis pelo aumento do suprimento de ácidos graxos livres para o músculo (CURI *et al.*, 2002)

O hormônio tireoideano estimula a lipólise induzida por catecolaminas através da potencialização dos sinais iniciados pelos receptores β adrenérgicos. Como resultado da ativação da lipólise os ácidos graxos livres são liberados na circulação e transportados para o músculo, fígado e outros tecidos onde serão utilizados como fonte de energia.

A disponibilidade aumentada de ácidos graxos pelo hormônio tireoideano está associada ao aumento da oxidação lipídica e contribui para a produção de corpos cetônicos pelo fígado. Além disso, aumenta a disponibilidade de Acetil CoA e leva ao aumento na

reesterificação hepática e, portanto, na síntese de triglicérides pelo fígado (BRADBURY, 2006; CACHEFO *et al.*, 2001; IOSSA *et al.*, 2001; NELSON e COX, 2005)

A produção elevada de triglicérides pode levar ao aumento na síntese e secreção de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) pelo fígado, se houver resistência à insulina (YUAN; AL-SHALI; HEGELE, 2007; TESSARI *et al.*, 2009).

Estes efeitos do T3 são observados através do aumento na expressão e síntese de RNAm de enzimas, como a carnitina palmitoil transferase 1 α , enzima chave na oxidação de ácidos graxos, ácido graxo sintase, acetil CoA carboxilase e a enzima málica, enzimas envolvidas na síntese de triglicerídeos.(BARRERO; MARRERO; HARO, 2000; JANSEN *et al.*, 2000; PETTY *et al.*, 1990; XIONG *et al.*, 1998; ZHANG; YIN; HILLGARTNER, 2001).

1.5 Síndrome Metabólica

A manutenção do peso corporal é dada por um balanço entre a quantidade de energia ingerida e a energia gasta de tal forma que o aumento no ganho energético ou a diminuição no gasto podem levar ao ganho ou perda de peso. Logo, a manutenção do peso corporal implica no balanço entre a ingestão alimentar e as necessidades energéticas, evitando o acúmulo de energia na forma de gordura (WESTERTERP-PLATENGA, 2004) e portanto o excesso de tecido adiposo.

O peso corporal é regulado por uma interação entre hormônios e neuropeptídeos que estão sob o controle de diversas áreas do cérebro. O hipotálamo constitui uma região importante para a regulação da ingestão alimentar (KING, 2006), pois contém diversas populações de neurônios ou núcleos que regulam a ingestão calórica, centro da saciedade e da fome, que são ativados por fatores periféricos circulantes como leptina, grelina e glicemia (MAGNI *et al.*, 2009). Esses sinalizadores fornecem aos núcleos do hipotálamo informações a respeito do *status* energético, regulando a ingestão alimentar e, consequentemente, o peso corporal(COLL; FAROOGI; O'RAHILY, 2007; DHILLO, 2007; KENNEDY; 1953).

O excesso de tecido adiposo está associado ao aparecimento de diversas alterações metabólicas que recentemente foram agrupadas e denominadas síndrome metabólica(WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999; ZIMMET; ALBERTI; SANTOS RIOS, 2005). Essas alterações consistem no desenvolvimento de resistência insulínica, diabetes mellitus tipo II, hipertrigliceridemia, dislipidemia e hipertensão arterial.

A resistência a insulina representa a dificuldade deste hormônio em exercer seus efeitos na homeostase glicolítica (TURNER *et al.*, 2007) e ocorre quando há uma diminuição na responsividade de tecidos sensíveis aos seus efeitos, tais como músculo esquelético, tecido adiposo e fígado (HUANG, 2009).

A disponibilidade aumentada de ácidos graxos livres e a resistência a insulina podem favorecer o acúmulo de ácidos graxos sob a forma de triglicerídeos em tecidos como fígado e músculo esquelético. Este fato poderia ser resultado de a resistência à insulina aumentar o fluxo de ácidos graxos livres para o fígado, devido à ausência da inibição da lipólise, além de aumentar a lipogênese *de novo* (KIM, 2008; UTZSCHNEIDER e KAHN, 2006).

O depósito de gordura no fígado caracteriza a doença gordurosa hepática não alcoólica ou fígado gorduroso, que apresenta alta prevalência em condições associadas à resistência à insulina, como obesidade, diabetes tipo II, hipertrigliceridemia e síndrome metabólica (KOTRONEN e YKI-JÄRVINEN, 2008; UTZSCHNEIDER e KAHN, 2006).

Adicionalmente, a deposição de gordura no tecido hepático e a resistência à insulina podem levar a um aumento na síntese e liberação de VLDL por este tecido, devido a ausência de inibição da síntese de apolipoproteína B e disponibilidade aumentada de triglicerídeos, contribuindo com a hipertrigliceridemia (TESSARI *et al.*, 2009; YUAN *et al.*, 2007).

Outra alteração encontrada em associação à obesidade é a hipertensão arterial, que pode favorecer doenças cardiovasculares. Estudos demonstraram que o aumento nos níveis de ácidos graxos livres observados na obesidade leva a disfunção endotelial, que pode ser definida como ausência ou prejuízo do endotélio dos vasos sanguíneos. É possível que a geração de espécies reativas de oxigênio no endotélio vascular induzida pelos ácidos graxos livres contribua para a diminuição da disponibilidade de óxido nítrico, que, por sua vez, diminui a vasodilatação, levando à hipertensão (HUANG, 2009; INOUCHI *et al.*, 2000.).

Portanto, é evidente que o excesso de tecido adiposo apresenta papel central no desenvolvimento da síndrome metabólica e mecanismos capazes de reduzir seus depósitos são promissores no tratamento da obesidade e da síndrome metabólica.

O tratamento com hormônio tireoideano resulta em efeitos metabólicos benéficos, como redução dos níveis plasmáticos de colesterol e triglicerídeos, além de aumentar o gasto energético, o que pode levar à perda de peso corporal. (BAHI *et al.*, 2005; KROTKIEWSKI, 2002). Esses fatores sugerem que o hormônio tireoideano poderia ter papel importante no tratamento da obesidade e da síndrome metabólica. Entretanto os efeitos indesejáveis do T3 no coração, na musculatura esquelética e no osso, impedem seu uso terapêutico (KLEIN e OJAMAA., 2001a; KLEIN e OJAMAA., 2001b; WILES *et al.*, 1979; ROOYACKERS e

NAIR., 1997; RIIS *et al.*, 2005; VON RECKLINGHAUSEN, 1891; MOSEKILDE; ERIKSEN; CHARLES, 1990; ROSS, 1994; WILLIAMS, 2009).

Portanto, encontrar uma maneira de se isolarem os efeitos benéficos do T3 sem a ocorrência dos efeitos indesejáveis tornaria possível o uso terapêutico desse hormônio. A ativação seletiva dos receptores do hormônio tireoideano, conforme mencionado anteriormente, oferece potencial para alcançar esse objetivo.

2 OBJETIVO

Definir o perfil metabólico de ratos alimentados com dieta rica em gordura e tratados com GC-24.

O tratamento crônico com hormônio tireoideano aumenta a taxa metabólica basal com consequente aumento no gasto energético, levando a perda de peso, além de reduzir os níveis séricos de colesterol. Entretanto, esses efeitos “benéficos” estão comumente associados a efeitos colaterais indesejáveis sobre o coração e tecido muscular esquelético. Já o tratamento crônico de mamíferos com agonista seletivo do TR β , GC-1, reduz os níveis séricos de colesterol, além de aumentar o metabolismo, sem causar efeitos sobre o coração, osso ou músculo esquelético.

Dessa forma, estudamos os efeitos da ativação do TR β usando um agonista, o GC-24, em animais tratados com dieta rica em gordura, apresentando alterações compatíveis com a síndrome metabólica. A nossa hipótese é a de que as alterações metabólicas decorrentes do excesso de peso corporal possam ser evitadas ou minimizadas pelo tratamento com GC-24.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 40 ratos machos *Wistar* com peso inicial entre 190 e 220g, provenientes do biotério da Faculdade de Medicina da USP. Os animais foram mantidos no biotério da Universidade Presbiteriana Mackenzie em gaiolas coletivas com não mais de 5 animais cada, acondicionados em biotério termorregulado ($23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), com ciclo claro/escuro 12/12 horas (início do período claro às 6h00min) e com água e alimentação *ad libitum*. O controle de ventilação, de luminosidade e de temperatura foi feito automaticamente por um sistema central (Argon Flex, Sistema VMA 40/02, Smaflex, Piedade, SP). Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

- (I) Controle:** ratos sem qualquer tratamento recebendo água e ração comercial;
- (II) Dieta:** ratos sem qualquer tratamento recebendo dieta rica em gordura, conforme descrição abaixo, por 30 dias;
- (III) Dieta + T3 (10X):** ratos recebendo dieta rica em gordura e injeções (i.p) diárias de T3 na dose de 30 ng/g P.C./dia, concentração equivalente a 10 vezes a dose fisiológica por 30 dias;
- (IV) Dieta + GC-24 (10X):** ratos recebendo dieta rica em gordura e injeções diárias (i.p.) de GC24 em dose equimolar à dose de T3 utilizada no grupo anterior (17 ng/g P.C./dia), também por 30 dias.

Drogas: Todas as drogas utilizadas nesse estudo foram obtidas da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). O GC-24 foi gentilmente cedido pelo Dr. Thomas Scanlan, da Universidade da Califórnia, São Francisco, EUA.

O peso corpóreo e o consumo de comida dos animais foram acompanhados diariamente. Os animais foram submetidos ao protocolo de consumo de oxigênio ao final do protocolo experimental, conforme descrito a seguir, a fim de se determinar o metabolismo energético. Após a medida do consumo de O₂, os animais, alimentados durante a noite anterior, foram submetidos à eutanásia. Todos os grupos estudados foram submetidos à eutanásia pela manhã em um único dia. O procedimento foi realizado por dessangramento sob anestesia utilizando-se anestésico Uretana (1200mg/Kg P.C.) e o sangue foi coletado em tubo de ensaio contendo EDTA 10% e centrifugado a 10000 RPM durante 20 minutos para

extração do plasma. Esse, por sua vez, foi congelado para posterior análise dos níveis de colesterol plasmático total, triglicérides, ácidos graxos livres e citocinas. Além disso, o coração inteiro dos animais foi retirado e pesado a fim de se determinar a ocorrência de hipertrofia cardíaca.

3.2 Procedimentos

3.2.1 Dieta rica em gordura

A dieta rica em gordura é produzida pela Rhoster Ind. e Com. Ltda. (Rhoster Ltda - Araçoiaba da Serra, SP, Brasil) e é constituída de 42% de carboidrato, 24% de proteína e 23% de gordura, totalizando ~ 4,7Cal/g. A dieta padrão é produzida pela Nuvital Nutrientes S/A. (Nuvital Nutrientes S/A- Colombo, PR, Brasil) e é constituída de 55% de carboidrato, 22% de proteína e 4,6% de gordura, totalizando ~ 1,8 Cal/g.

3.2.2 Consumo de oxigênio

A medida do consumo de oxigênio (VO₂) foi obtida em repouso utilizando-se de um sistema de respirometria aberta (Sable Systems, Las Vegas, NV, EUA) conforme o descrito na literatura (CURCIO *et al.*, 1999; WITHERS, 1977). As medidas foram feitas por 30 minutos, à tarde (14h00-18h00), em temperatura controlada (25 °C), com os animais alimentados durante a noite anterior. Os dados foram coletados e analisados utilizando-se um software (Sable Systems, Salt Lake City, UT, EUA) e os resultados estão expressos em termos de ml de O₂ / min/Kg P.C.

3.2.3 Análise da composição corporal

A determinação da composição corporal foi realizada pela análise da carcaça. Brevemente, as carcaças foram descongeladas, pesadas e colocadas em autoclave. A seguir as carcaças foram homogeneizadas com água destilada em volume de água equivalente ao peso das carcaças, usando-se um liquidificador (Kinematica AG., Lucerne, Suíça). Alíquotas dos homogenatos foram usadas para medir o conteúdo de gordura de acordo com Folch; Lees; Sloane-Stanley, (1957). Resumidamente, a gordura foi extraída de alíquotas de 3,0g de

homogenados com KOH 30%, H₂SO₄ (6N) e éter de petróleo. A camada de gordura contendo éter de petróleo foi separada e colocada para secar ao ar durante 48 horas e depois efetuou-se a pesagem.

3.2.4 Teste de Tolerância à Glicose –GTT

Os animais foram submetidos ao jejum por 12 horas na noite anterior. Entre 9h00 e 10h00 horas, foi administrada glicose (2g/ kg P.C.) por meio de injeção intraperitoneal e amostras de sangue foram coletadas da cauda dos animais em intervalos de 30 minutos durante 2 horas. A leitura da glicemia foi determinada em medidor de glicose (Johnson & Johnson, One Touch Ultra, São Paulo, SP, Brasil).

3.2.5 Teste de Tolerância à Insulina -ITT

A ração padrão e a dieta rica em gordura foram removidas pela manhã, 6 horas antes da realização do experimento. Entre 14h00 e 15h00 horas, foi administrada insulina (0.5 U/kg) por injeção intraperitoneal e amostras de sangue foram coletadas da cauda dos animais em intervalos de 15 minutos durante 1 hora. A leitura da glicemia foi determinada conforme a descrita para curva de GTT.

3.2.6 Dosagem de colesterol total

A dosagem foi feita em plasma por colorimetria, utilizando-se kit enzimático comercial (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha), de acordo com as indicações do fabricante.

3.2.7 Dosagem de colesterol hepático

A dosagem de colesterol hepático foi determinada por método enzimático (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). Em resumo, os lípides foram extraídos de aproximadamente 200 mg de amostras de fígado congelado em 2 ml de álcool isopropil com o auxílio de homogeneizador (Potter Elvehjem modelo MA 099; Marconi Piracicaba, SP, Brasil). Os homogenatos foram mantidos a 37 °C por 30 minutos e, então, a 4 °C por uma noite. O colesterol total foi determinado em uma alíquota do sobrenadante. A concentração de

proteína foi determinada de acordo com o método de Lowry *et al.*, (1951) em amostras de fígado (200mg) previamente homogeneizadas em 4 ml de água.

3.2.8 Dosagem de triglicérides e ácidos graxos livres

A dosagem de triglicérides foi realizada em plasma, por colorimetria, utilizando-se kit enzimático comercial (Merck-Darmstadt, Alemanha), de acordo com as indicações do fabricante. Para a determinação dos níveis de ácidos graxos livres, foram adicionados 24 μ l de orlistat (1mg/ml) a 1 ml de plasma de cada amostra, antes do seu congelamento, com o objetivo de inibir a ação de lipases gastrointestinais e pancreáticas, a fim de impedir a quebra de triglicerídeos por essas enzimas e obter resultados mais precisos (MANCINI; HALPERN, 2008). A dosagem dos níveis de ácidos graxos livres foi obtida posteriormente, também por colorimetria e com o auxílio de kit enzimático comercial (Wako Chemicals-Richmond, EUA), segundo as indicações do fabricante.

3.2.9 Citocinas

A determinação quantitativa da concentração do Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) e de Interleucina-6 (IL-6) foi realizada por imunoensaio enzimático (ELISA) com o auxílio de kit comercial (R&D Systems, Inc-Minneapolis, EUA), de acordo com as indicações do fabricante.

3.2.10 Histologia

Amostras de tecido adiposo branco, tecido adiposo marrom e do fígado foram coletadas com solução de fixador Bouin, na qual permaneceram durante 24 horas para fixação. Posteriormente, as amostras foram emblocadas em parafina, seccionadas transversalmente (cortes de 5 μ m de espessura) conforme Kerr *et al.* (1995). e coradas com hematoxilina-eosina (HE). A área dos adipócitos brancos foi estimada pela análise de fotografias executadas com aumento de 100x. As fotografias foram impressas, recortadas e a área de 38 adipócitos por animal foi estimada.

3.2.11 Análise de RNAm e PCR em tempo real

O RNA total do fígado, tecido adiposo branco epididimal e tecido adiposo marrom interescapular foi extraído utilizando-se o Trizol (Life Technologies Inc., Rockville, Maryland, EUA), de acordo com as instruções do fabricante e quantificado por espectrofotometria.

Para a reação de transcriptase reversa, foi utilizado termociclador (Robocycler, Stratagene, La Jolla, California, EUA), kit comercial específico (SuperScriptTM First-Strand System for RT-PCR, Invitrogen, Carlsbad, California, EUA) e 0.8 μ g do RNA total.

Para a amplificação utilizou-se cerca de 120 ng de cDNA, e o PCR em tempo real quantitativo (RT-qPCR) foi realizado com o auxílio do kit IQTM SYBR Green PCR (BioRad, Hercules, California, EUA) em termociclador iCycler (BioRad). Os *primers* foram desenvolvidos com o software Beacon Designer 3.0 (Premiere Biosoft Intl., Palo Alto, California, EUA), e o gene constitutivo ciclofilina A foi utilizado como referência interna.

As condições do ciclo foram: 5 minutos a 94 °C (*Hot Start*); 30 segundos a 94 °C; 30 segundos a 58 °C e 45 segundos a 72 °C por 50 ciclos, seguidos do protocolo da curva de dissociação a fim de verificar a especificidade da geração de amplicons. A expressão gênica foi determinada por $\Delta\Delta$ CT e todos os valores foram expressos utilizando o RNAm de ciclofilina A como controle interno de acordo com Christoffolete, et al. (2004).

3.3 Análise estatística

Todos os dados experimentais foram submetidos a análise estatística para levantamento da relevância pelo método estatístico ANOVA e testes posteriores do tipo Student-Newman-Keuls, quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Com a finalidade de avaliar se a ativação do TR β poderia reverter a obesidade induzida pela dieta, ratos machos *Wistar* foram tratados com dieta rica em gordura e submetidos a injeções diárias de T3 correspondentes a 10x a dose fisiológica (30ng/g P.C./dia) ou GC-24 em dose equimolar (17ng/g P.C./dia). As doses de T3 e GC-24 utilizadas no presente estudo mostraram promover efeitos característicos do estado de hipertireoidismo e portanto permitiram que avaliássemos os efeitos do T3 e do GC-24.

Como podemos observar nas figuras 3 e 4, a dieta rica em gordura induziu aumento significativo no peso corporal quando comparado aos animais-controle. O tratamento com T3 não apenas preveniu o ganho de peso corporal induzido pela dieta, mas reduziu significativamente o ganho de peso quando comparado com os animais-controle. No entanto, o tratamento com GC-24 não impediu que os animais ganhassem peso quando submetidos à dieta rica em gordura.

Figura 3: Variação média do peso corporal de animais submetidos à dieta rica em gordura e tratados com T3 10x (30 ng/g P.C./dia) ou GC-24 em dose equimolar. Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM. * vs controle, $p < 0.001$; # vs dieta + T3, $p < 0.001$. (n=6).

Figura 4: Variação do peso corporal de animais submetidos à dieta rica em gordura e tratados com T3 10x (30 ng/g P.C./dia) ou GC-24 em dose equimolar. Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM. * vs controle, $p < 0.01$; # vs dieta + T3, $p < 0.001$. Cada grupo analisado foi composto por 6 animais ($n=6$).

Nas figuras 5 e 6, está representado o consumo de ração padrão e de dieta rica em gordura. Podemos observar que os animais alimentados com a dieta rica em gordura apresentam uma queda significativa no consumo diário de ração. Embora o consumo alimentar dos animais que receberam dieta rica em gordura tenha sido menor em relação aos animais tratados com ração padrão, os animais que receberam dieta rica em gordura ingeriram uma quantidade de calorias muito mais elevada do que a dos animais que receberam a ração padrão, garantindo assim sua condição hipercalórica (Figura 7).

Figura 5: Ingestão alimentar em animais submetidos à dieta rica em gordura e tratados com T3 10x (30 ng/g P.C./dia) ou GC-24 em dose equimolar. Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM. * vs controle, $p < 0.001$. (n=6).

Figura 6: Ingestão alimentar cumulativa de animais submetidos à dieta rica em gordura e tratados com T3 10x (30 ng/g P.C./dia) ou GC-24 em dose equimolar. * vs Controle, $p < 0.001$; § vs dieta, $p < 0.001$. (n=6).

Embora a quantidade de ração diária ingerida pelos grupos dieta+T3 e dieta + GC-24 não tenha diferido do grupo Dieta, quando analisamos a quantidade de ração ingerida cumulativamente, podemos notar que os animais tratados com dieta rica em gordura + T3 ou GC-24 ingeriram significativamente mais dieta quando comparados com animais tratados apenas com a ração rica em gordura (Figura 6).

Figura 7: Ingestão calórica de animais submetidos à dieta rica em gordura e tratados com T3 10x (30 ng/g P.C./dia) ou GC-24 em dose equimolar. Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM. * vs controle, $p < 0.001$. Cada grupo analisado foi composto por 6 animais ($n=6$).

O hormônio tireoideano é o principal determinante da taxa metabólica basal em animais homeotérmicos (SILVA, 1995). Durante a transição de hipo para hipertiroidismo, observa-se uma diferença de 2 a 3 vezes na taxa metabólica basal. Muitos estudos demonstraram que a ativação do TR β é capaz de estimular o consumo de oxigênio de forma semelhante ao T3 em indivíduos tratados com dieta padrão (GROVER *et al.*, 2003; GROVER *et al.*, 2004; GROVER; MELLSTROM; MALM, 2005; VILLICEV *et al.*, 2007). Contudo, não se sabe se o mesmo ocorre durante a ingestão de dieta rica em gordura. Como se observa na figura 8, a dieta rica em gordura aumentou de modo significativo a taxa metabólica basal dos animais. Ao analisarmos os efeitos causados pelo tratamento com T3 e GC-24, constatamos que ambos aumentaram o consumo de oxigênio a níveis mais elevados do que os da dieta rica em gordura. Além disso, ambos aumentaram o consumo de oxigênio de forma semelhante, demonstrando a importância do TR β na ação do T3 no aumento do metabolismo durante a termogênese induzida pela dieta.

Figura 8: Consumo de oxigênio de animais submetidos à dieta rica em gordura e tratados com T3 10x (30 μ g/g P.C./dia) ou GC-24 em dose equimolar. Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM. * vs controle, $p < 0,001$; § vs dieta, $p < 0,01$. (n=6).

Como a ativação do TR β aumentou o consumo de oxigênio, porém não alterou o peso corporal, investigamos se o tratamento com GC-24 teria influência na composição corporal dos animais. Assim, fizemos a análise da carcaça para determinar o conteúdo total de gordura dos animais submetidos à ingestão de dieta rica em gordura e tratados com T3 ou GC-24 (Figura 9). Os dados mostram que a gordura corporal dos animais submetidos à dieta rica em gordura foi significativamente mais elevada, se comparada à dos animais que receberam dieta padrão. Nos grupos que receberam T3 ou GC-24, observa-se uma grande diminuição nos níveis de gordura não só em relação à dieta rica em gordura, mas também em relação ao grupo controle.

Figura 9: Gordura corporal (mg/g P.C.) de animais submetidos à dieta rica em gordura e tratados com T3 10x (30 ng/g P.C./dia) ou GC-24 em dose equimolar. Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM. * vs controle, $p < 0.001$ § vs dieta, $p < 0.001$. Os grupos controle e dieta foram compostos por 9 animais cada ($n=9$). O grupo dieta + T3 foi composto por 7 animais ($n=7$) e o grupo dieta + GC-24 foi composto por 8 animais ($n=8$).

Em concordância com a quantidade de gordura corporal, podemos observar que houve um aumento significativo no tamanho dos adipócitos brancos epididimais (Figuras 10 e 11) dos animais submetidos à dieta rica em gordura. Tanto o tratamento com T3 quanto com GC-24 diminuíram significativamente a áreas destas células.

Figura 10: Média das áreas estimadas de adipócitos brancos de animais submetidos à dieta rica em gordura e tratados com T3 10x (30 ng/g P.C./dia) ou GC-24 em dose equimolar. Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM. * vs controle, $p < 0,001$; # vs dieta, $p < 0,001$; & vs dieta + T3, $p < 0,05$. Cada grupo analisado foi composto por 6 animais ($n=6$). Foram analisadas 38 células para cada grupo.

No entanto, apesar da diminuição no conteúdo corporal de gordura, o ganho de peso observado nos animais tratados com dieta rica em gordura + GC-24 ainda permanecia a ser esclarecido. Por isso, avaliamos o conteúdo de água total dos animais (Figura 12).

Como podemos ver na figura 12, o conteúdo de água total dos animais foi significativamente diminuído pelo tratamento com T3, mas não pelo GC-24. Estes dados sugerem que, diferentemente do T3, o GC-24 não reduz a quantidade corporal de água total, o que poderia contribuir para o aumento no peso corporal dos animais tratados com dieta rica em gordura+GC-24.

Figura 11: Histologia do tecido adiposo marrom(BAT), fígado e tecido adiposo branco(WAT) de animais submetidos à dieta rica em gordura e tratados com T3 10x (30 ng/g P.C./dia) ou GC-24 em dose equimolar. Coloração hematoxilina-eosina (HE) e aumento 200x.

Figura 12: Dosagem do conteúdo de água total de animais submetidos à dieta rica em gordura e tratados com T3 10x (30 ng/g P.C./dia) ou GC-24 em dose equimolar. Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM. * vs dieta e dieta + GC-24, $p < 0.05$. Os grupos controle e dieta foram compostos por 9 animais cada ($n=9$). O grupo dieta + T3 foi composto por 7 animais ($n=7$) e o grupo dieta + GC-24 foi composto por 8 animais ($n=8$).

A redução da gordura corporal total induzida pela ativação do TR β nos levou a perguntar se outras alterações metabólicas ocasionadas pela ingestão de dieta rica em gordura também seriam minimizadas e em quais aspectos. Dessa forma, nós avaliamos os níveis de colesterol, triglicérides, ácidos graxos e de algumas citocinas que sabidamente estão alteradas durante a obesidade.

Os resultados obtidos para os níveis plasmáticos de colesterol (Figura 13) mostram que a dieta rica em gordura aumentou significativamente os níveis de colesterol e que o tratamento com T3 corrigiu essa alteração. Embora o tratamento com GC-24 não tenha o mesmo efeito que o T3, ele diminuiu parcialmente a hipercolesterolemia induzida pela dieta rica em gordura (Figura 13). Os níveis de colesterol hepático, aumentados pela dieta rica em gordura, foram corrigidos pelo T3, mas não pelo GC-24. (Figura 14). Já os níveis plasmáticos de triglicérides foram significativamente aumentados pelo tratamento com a dieta rica em gordura e diminuídos tanto pelo tratamento com T3 quanto com GC-24. O fato de ambos terem diminuído, os níveis de triglicérides aumentados pela dieta de forma similar mostra a importância do TR β na ação do T3 em diminuir a trigliceridemia induzida pela dieta (Figura 15).

A elevação dos níveis de ácidos graxos livres, induzida pela dieta rica em gordura, foi levemente exacerbada pelo T3 e GC-24 (Figura 16).

Em concordância com o aumento nos níveis plasmáticos de ácidos graxos e triglicérides, a ingestão de dieta rica em gordura levou a deposição de gordura no tecido hepático, conforme mostra a figura 11. Esse efeito foi revertido pelo tratamento com GC-24.

Figura 13: Dosagem de colesterol plasmático total de animais submetidos à dieta rica em gordura e tratados com T3 10x (30 η g/g P.C./dia) ou GC-24 em dose equimolar. Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM. * vs controle, $p < 0.01$; # vs dieta, $p < 0.01$. (n=6).

Figura 14: Dosagem de colesterol hepático de animais submetidos à dieta rica em gordura e tratados com T3 10x (30 ng/g P.C./dia) ou GC-24 em dose equimolar. Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM. ⁺ vs controle, $p < 0.01$; [#] vs dieta, $p < 0.01$. (n=6).

Figura 15: Dosagem de triglicérides de animais submetidos à dieta rica em gordura e tratados com T3 10x (30 ng/g P.C./dia) ou GC-24 em dose equimolar. Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM. ⁺ vs controle, $p < 0.01$; [#] vs dieta, $p < 0.05$. (n=6).

Figura 16: Dosagem de ácidos graxos livres de animais submetidos à dieta rica em gordura e tratados com T3 10x (30 ng/g P.C./dia) ou GC-24 em dose equimolar. Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM. ⁺ vs controle, $p < 0.001$; [#] vs dieta, $p < 0.05$. (n=6).

A obesidade está intimamente relacionada ao desenvolvimento da resistência à insulina (DAVIDSON, 1995; DEFRONZO, 1991; MOLLER e FLIER, 1991). Assim, realizamos os testes de tolerância à glicose (GTT) e tolerância à insulina (ITT).

Inicialmente, observamos que a dieta rica em gordura *per se* aumenta a glicemia dos animais em jejum mesmo antes da sobrecarga de glicose. Além disso, a glicemia de jejum é também significativamente mais alta nos grupos tratados com dieta rica em gordura+ T3 ou GC-24, quando comparados ao grupo controle. No entanto, o tratamento com T3 ou GC-24 corrigiu a resposta dos animais à sobrecarga de glicose (Figura 17).

É interessante notar que, nos animais tratados com T3 ou GC-24, a glicemia de jejum também esteja aumentada, apesar da maior facilidade em metabolizar a glicose.

Figura 17: Teste de tolerância à glicose (2g/kg) de animais submetidos à dieta rica em gordura e tratados com T3 10x (30 ng/g P.C./dia) ou GC-24 em dose equimolar. Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM. * vs controle, $p < 0.01$; # vs dieta, $p < 0.01$. (n=5).

Adicionalmente, os dados obtidos com o teste de tolerância à insulina (Figura 18) mostram que os animais submetidos à dieta rica em gordura e tratados com T3 ou GC-24 obtiveram uma maior queda da glicemia, quando comparados aos animais do grupo controle ou aos animais que receberam somente a dieta rica em gordura. Ademais, a queda dos níveis de glicose dos animais que receberam T3 ou GC-24 foi mais abrupta, quando comparada aos demais grupos de estudo, mostrando que esses animais são mais responsivos à insulina.

Figura 18: Teste de tolerância à insulina (0.5U/kg) de animais submetidos à dieta rica em gordura e tratados com T3 10x (30 μ g/g P.C./dia) ou GC-24 em dose equimolar. Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM. * vs controle e dieta, $p < 0.001$; § vs dieta+ T3, $p < 0.001$. (n=5).

Dentre os produtos de secreção do tecido adiposo branco, estão a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Ambos constituem citocinas com função imunológica. Sua secreção e expressão no tecido adiposo se mostram aumentadas na obesidade, além de exercerem papel no metabolismo dos lipídeos e da glicose (SETHI e HOTAMISLIEGIL *et al.*, 1999; FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2006)

A interleucina-6 (IL-6) induz lipólise e aumenta a captação de glicose. Além disso, seus níveis mostram-se aumentados na obesidade, sendo também indicadores de resistência à insulina (TILG e MOSCHEN, 2008; WALENIUS *et al.*, 2002).

O TNF- α tem recebido atenção particular devido ao seu papel-chave na regulação da massa do tecido adiposo. Mudanças na massa do tecido adiposo podem estar associadas com mudança no número ou volume dos adipócitos. Além disso, processos como o da captação de ácidos graxos, lipogênese e lipólise podem alterar o volume do adipócito. Foi mostrado também que o TNF- α desempenha papel importante na modulação desses processos, como a inibição da expressão de enzimas envolvidas na lipogênese e estimulação de lipólise, além de mostrar sua implicação no desenvolvimento de resistência à insulina na obesidade

(FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2006; SETHI e HOTAMISLIEGIL *et al.*, 1999; TILG e MOSCHEN, 2008; WARNE, 2003).

Levando em conta esses fatores e resultados prévios, como o aumento na gordura total e os dados do teste de tolerância à glicose e à insulina de animais submetidos à dieta rica em gordura, a investigação dos níveis de IL-6 e TNF- α nesses animais torna-se um parâmetro importante e adicional no que diz respeito ao desenvolvimento de processo inflamatório devido ao aumento no tecido adiposo pela dieta.

De acordo com os dados apresentados na figura 19, verificamos que a dieta rica em gordura elevou os níveis plasmáticos de IL-6 quando comparados aos do controle. O tratamento com T3 foi capaz de corrigir os aumentos de IL-6 induzidos pela dieta, mas no tratamento com GC-24 não se observa esse efeito.

Figura 19: Dosagem de interleucina-6 (IL-6) de animais submetidos à dieta rica em gordura e tratados com T3 10x (30 ng/g P.C./dia) ou GC-24 em dose equimolar. Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM. * vs controle, $p < 0.01$; # vs dieta + T3, $p < 0.01$. (n=6).

De maneira semelhante a IL-6, a dieta rica em gordura aumentou significativamente os níveis de TNF- α plasmáticos. O T3 corrigiu este aumento, mas não o GC-24 (Figura 20).

Figura 20: Dosagem de fator de necrose tumoral (TNF- α) de animais submetidos à dieta rica em gordura e tratados com T3 10x (30 η g/g P.C./dia) ou GC-24 em dose equimolar. Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM. * vs controle, $p < 0.01$; # vs dieta, $p < 0.05$; (n=6).

O coração também é um alvo importante da ação do hormônio tireoideano. Foram descritos diversos efeitos do T3 neste órgão. Entre esses efeitos, está o aumento na frequência cardíaca, velocidade e a força de contração sistólica e diminuição na duração do relaxamento diastólico, além de afetar o tônus vascular (GRAETTINGER *et al.*, 1959; MORKIN; FLINK; GOLDMAN, 1983; TROST *et al.*, 2000) e causar hipertrofia cardíaca concêntrica (GUPTA, 2007; PANTOS *et al.*, 2008;). Esses efeitos do T3 são principalmente mediados pelo TR α (TROST *et al.*, 2000; WIKSTRÖM *et al.*, 1998). Portanto, no nosso estudo, utilizamos o peso cardíaco como controle interno.

Como mostra a figura 21, o T3 aumentou de modo significativo o peso cardíaco total. Tal efeito não foi observado no grupo GC-24 nem tampouco no grupo que recebeu somente dieta rica em gordura, os quais mantiveram valores semelhantes. Esses dados confirmam que a administração do análogo do TR β não induz hipertrofia cardíaca.

Figura 21: Peso do coração de animais submetidos à dieta rica em gordura e tratados com T3 10x (30 ng/g P.C./dia) ou GC-24 em dose equimolar. Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM.; [&] vs controle, dieta e dieta + GC-24 $p < 0,001$. Cada grupo analisado foi composto por 6 animais (n=6).

Os hormônios tireoideanos têm sua ação mediada por receptores nucleares (TR α e TR β) e exercem efeitos ativadores ou inibidores na transcrição gênica de praticamente todas as células. Diversos genes envolvidos no metabolismo são alvos da ação deste hormônio e, portanto, a análise da expressão gênica possibilita um estudo mais profundo dos efeitos do agonista ao TR β GC-24 observados até o momento. Logo, com o objetivo de avaliar de que maneira o GC-24 exerce seus efeitos no metabolismo, os níveis de RNAm de genes específicos foram avaliados por meio da técnica de PCR em tempo real, conforme mostra a figura 22.

No tecido hepático (Figura 22 A) a ingestão de dieta rica em gordura estimulou a expressão dos genes SD, D1 e PGC-1 α , efeito semelhante ao tratamento com GC-24. A expressão do gene D1 foi aumentada ainda mais pelo GC-24 o que não ocorreu com o tratamento com T3. Este, por sua vez, diminuiu a expressão dos genes SD, D1 e PGC-1 α se comparado a dieta rica em gordura. Os genes CPT-1 e ACC não tiveram a expressão alterada pela dieta, T3 ou GC-24.

Além disso, no tecido adiposo marrom (Figura 22B), o tratamento com GC-24 estimulou a expressão dos genes CPT-1, SD e ACC além dos níveis observados somente com a ingestão de dieta rica em gordura. O gene da UCP-1 teve sua expressão diminuída pelo GC-

24. O tratamento com T3 aumentou a expressão dos genes SD e ACC, porém não alterou os genes CPT1 e UCP-1 se comparado à dieta rica em gordura.

O perfil de expressão gênica observado no tecido adiposo marrom está de acordo com a histologia do tecido, conforme mostra a figura 11. O aumento na expressão do gene ACC e nos depósitos de gordura, além dos níveis observados somente com a ingestão de dieta rica em gordura, sugerem que a lipogênese esteja aumentada neste tecido como um mecanismo de manutenção dos estoques energéticos necessários para a ativação da termogênese no BAT.

No músculo gastrocnemius e no tecido adiposo branco (Figura 22 C e D respectivamente), os efeitos do GC-24 foram mais reduzidos. No gastrocnemius o tratamento com GC-24 aumentou a expressão dos genes CPT-1 e PGC-1 α a níveis superiores à ingestão de dieta rica em gordura apenas. O tratamento com T3 não alterou a expressão desses genes, se comparado a dieta rica em gordura. Os genes UCP-3, SD e Glut 4 não tiveram a expressão alterada pela dieta, T3 ou GC-24.

No tecido adiposo branco (figura 22D), somente o gene ACC teve a expressão gênica alterada. A ingestão de dieta rica em gordura aumentou significativamente a expressão do gene. O tratamento com GC-24 e T3 exerceu efeito oposto, diminuindo significativamente a expressão do gene ACC.

Figura 22: Perfil de expressão gênica de animais submetidos à dieta rica em gordura e tratados com T3 10x (30 ng/g P.C./dia) ou GC-24 em dose equimolar. Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM; * vs controle, $p < 0.05$; ** vs dieta, $p < 0.005$; *** vs dieta + T3, $p < 0.05$; $n = 3$. Fígado (A), BAT (B), Gastrocnemius (C), WAT (D). Tecido adiposo marrom (BAT), tecido adiposo branco (WAT), carnitina palmitoil transferase 1 (CPT1), succinato desidrogenase (SD), desidase tipo 1 (D1), coativador 1 alfa de receptor proliferador ativado de peroxissomo (PGC1- α), acetil Coenzima A carboxilase (ACC), proteína desacopladora isoforma 1 (UCP-1), proteína desacopladora isoforma 3 (UCP-3) e transportador de glicose isoforma 4 (Glut-4).

5 DISCUSSÃO

O hormônio tireoideano (T3) desempenha papel importante no desenvolvimento, no crescimento e também no metabolismo celular. Um dos seus principais efeitos é o aumento da taxa metabólica basal (MAGNUS-LEVI., 1895; OPPENHEIMER *et al.*, 1987) e do gasto energético, contribuindo de forma importante com a regulação do peso corporal (KROTKIEWSKI, 2002; BAHÍ et al., 2005).

Diversos estudos demonstram que indivíduos hipotireoideos apresentam níveis elevados de triglicerídeos e colesterol, os quais constituem fatores de risco para o desenvolvimento de doenças como a aterosclerose, que pode levar à falência cardíaca. Portanto, tratamentos capazes de diminuir os níveis de colesterol são necessários no combate a essas doenças. O tratamento com T3 diminui os níveis plasmáticos de triglicérides e colesterol e, conseqüentemente, constitui uma estratégia para prevenir ou reduzir doenças cardiovasculares (ABRAMS *et al.*, 1981; HAGENFELDT *et al.*, 1981; HANSSON *et al.*, 1983; BEYLOT *et al.*, 1991; O'BRIEN *et al.*, 1990; DUNTAS, 2002; ITO *et al.*, 2003; ICHIKI., 2009). O tratamento com T3 poderia ser útil no combate à obesidade e às alterações metabólicas a ela associadas, caso não fosse acompanhado de efeitos indesejáveis sobre o coração, músculo esquelético e osso, tais como taquicardia, fraqueza e fadiga muscular e perda óssea, que impedem seu uso terapêutico (KLEIN e OJAMAA., 2001; KLEIN e OJAMAA., 2001; WILES *et al.*, 1979; ROOYACKERS e NAIR., 1997; RIIS *et al.*, 2005; VON RECKLINGHAUSEN., 1891; MOSEKILDE *et al.*, 1990; ROSS *et al.*, 1994; WILLIAMS., 2009).

As isoformas dos receptores nucleares para T3, TR α e TR β parecem mediar efeitos fisiológicos distintos nos tecidos. É provável que esta especificidade dos receptores esteja relacionada à sua abundância tecidual diferenciada (WIKSTRÖM *et al.*, 1998; FORREST e VENNSTRÖM, 2000). Esta descoberta levantou a possibilidade de que ferramentas farmacológicas poderiam atuar em apenas um subtipo de receptor e, assim, dissociar os efeitos do T3 mediados pelo TR β dos efeitos mediados pelo TR α . Entre os análogos desenvolvidos está o GC-24, ou ácido dimetil 4 (4' hidroxil, 3' benzil) benzilfenoxiacético, o qual se liga ao TR β aproximadamente 40 vezes mais do que ao TR α e permite-nos isolar os efeitos do T3 mediados pelo TR β com o uso de doses mais altas, evitando, assim, a ativação do TR α (CHIELLINI *et al.*, 1998; BORNGRAEBER *et al.*, 2003; GROVER *et al.*, 2003).

Os resultados benéficos obtidos com o uso de agonistas seletivos ao TR β , tais como perda de peso, diminuição dos níveis de colesterol e triglicérides, na ausência de efeitos indesejáveis sobre o coração, tecido ósseo e tecido muscular, sugerem que estes agentes farmacológicos apresentam grande potencial no tratamento contra a síndrome metabólica (TROST *et al.*, 2000; GROVER *et al.*, 2003; GROVER *et al.*, 2004; FREITAS *et al.*, 2003 ; VILLICEV *et al.*, 2007; JOHANSSON *et al.*, 2005; BRYZGALOVA *et al.*, 2008; CABLE *et al.*, 2009).

No entanto, nenhum estudo havia sido feito sobre os efeitos do GC-24 em situações de alteração nutricional, como durante a ingestão de dietas ricas em gordura. O nosso estudo mostrou que diversas alterações metabólicas induzidas pela dieta rica em gordura podem ser evitadas, ou pelo menos minimizadas, através da ativação do TR β .

A ingestão de dietas ricas em gordura e portanto o aumento de calorias ingeridas pode levar ao ganho de peso excessivo e ao desenvolvimento de obesidade. O modelo presentemente estudado, ratos tratados com dieta rica em gordura, apresentou alterações metabólicas significativas, tais como aumento no ganho de peso corporal, hiperglicemia, assim como dislipidemias, que podem ser caracterizadas como síndrome metabólica.

O consumo alimentar em gramas dos animais que receberam dieta rica em gordura foi menor do que o dos animais alimentados com ração padrão, provavelmente por mecanismos compensatórios desenvolvidos pelo cérebro em resposta ao aumento na ingestão calórica. No entanto, os animais que receberam dieta rica em gordura ingeriram uma quantidade de calorias muito mais elevada do que a dos animais que receberam a ração padrão, garantindo assim sua condição hipercalórica. O aumento na ingestão calórica pelos animais que ingeriram somente a ração rica em gordura leva ao aumento do gasto energético, devido à ativação da termogênese facultativa induzida pela dieta como um mecanismo compensatório, a fim de evitar o excesso de peso corporal (SIMS e DANFORTH, 1987; SHIBATA e BUKOWIECKI, 1987).

A quantidade de ração ingerida pelos animais tratados com dieta apenas e pelos animais tratados com dieta+T3 e dieta+GC-24 foi semelhante. No entanto, quando analisamos a quantidade de ração ingerida cumulativamente, podemos notar que os animais tratados com dieta rica em gordura+T3 ou GC-24 ingeriram significativamente mais dieta quando comparados com animais tratados apenas com a ração rica em gordura. Estes dados corroboram com estudos anteriores, que mostram que o hormônio tireoideano aumenta a ingestão alimentar, o que pode ser atribuído ao aumento do gasto energético induzido pelo T3

e também pelo GC-24 (IOSSA, 2001; KROTKEWISKI, 2002; VILLICEV *et al.*, 2007; OPPENHEIMER *et al.*, 1991; GROVER *et al.*, 2004; MIYABARA *et al.*, 2005).

De fato, o tratamento com T3 ou GC-24 aumentou o consumo de oxigênio a níveis mais elevados do que a dieta rica em gordura, mostrando que o T3 e o GC-24 ativaram ainda mais o metabolismo durante a termogênese induzida pela dieta

É surpreendente que o GC-24 tenha aumentado o consumo de oxigênio de forma semelhante ao T3, indicando que este efeito do hormônio tireoideano é mediado principalmente pelo TR β .

O peso corporal é determinado pelo balanço entre o ganho e o gasto energético, evitando o acúmulo de energia na forma de gordura e o excesso de tecido adiposo, de forma que o aumento ou diminuição de ambos se reflete no ganho ou perda de peso corporal (ZHANG *et al.*, 1994).

Diversos estudos mostram que a ingestão calórica aumentada está associada também a maiores depósitos de gordura corporal e hipertrofia de adipócitos (AKYAMA *et al.*, 1996; JO *et al.*, 2009). Como consequência do maior depósito de gordura e da hipertrofia há um aumento na taxa lipolítica dessas células o que ocasiona liberação aumentada de ácidos graxos livres na corrente sanguínea e, portanto, aumento da disponibilidade desses substratos aos tecidos (MORIMOTO *et al.*, 1998; AHIMA e FLIER., 2000).

Em concordância com esses achados nossos dados mostram que a ingestão de dieta rica em gordura está associada a maiores depósitos de gordura, conforme os dados de gordura corporal total, e à hipertrofia dos adipócitos conforme mostram a histologia e a área dos adipócitos desses animais. Além disso, a ingestão da dieta rica em gordura também aumentou os níveis plasmáticos de ácidos graxos livres. Nossos dados sugerem que esse aumento de ácidos graxos livres pela dieta rica em gordura tenha favorecido o seu acúmulo na forma de triglicérides em tecidos como o fígado, conforme podemos observar na histologia hepática.

Por outro lado, a ativação do TR β e o tratamento com T3, apesar de aumentarem a ingestão calórica, diminuíram a gordura total a níveis mais baixos do que os dos animais-controle. É provável que esta diminuição da gordura total seja resultado do aumento no gasto energético induzido pelo T3 e seu análogo, GC-24.

Diversos estudos demonstraram que o T3 aumenta o gasto energético e que provavelmente utiliza os ácidos graxos como principal fonte de energia (HEIMBERG; OLUBADEWO; WILCOX, 1985; IOSSA *et al.*, 2001; RIIS *et al.*, 2002). O aumento do gasto energético induzido pelo T3 se reflete na alteração da transcrição de genes importantes na regulação do metabolismo, tais como UCP-1, succinato desidrogenase (SD), acetil coA

carboxilase (ACC), carnitina palmitoil transferase 1 (CPT1), coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador do peroxisoma (PGC-1 α) em diversos tecidos, como o tecido adiposo marrom e branco, fígado e músculo esquelético (WEITZEL; RADTKE; SEITZ, 2001; ZHANG; YIN; HILLGARTNER, 2001; ZHANG *et al.*, 2004).

No presente estudo tentou-se determinar quais tecidos seriam os responsáveis pelo aumento no metabolismo energético induzido pela ativação do TR β , ou seja, quais seriam os tecidos-alvo para GC-24. Com base nos genes estudados, observou-se que o efeito do GC-24 foi notado principalmente no BAT, com elevação significativa da expressão da carnitina palmitoil transferase 1 (CPT1), SD e ACC.

A enzima carnitina palmitoil transferase 1 (CPT1) é considerada enzima chave do processo de β oxidação, por meio do qual os ácidos graxos de cadeia longa (a maioria dos ácidos graxos) são convertidos em energia, regulando assim o fluxo de ácidos graxos nesse processo. Devido ao fato de a CPT-1 ser inibida por malonil CoA, um intermediário da síntese de ácidos graxos, o aumento na atividade de CPT1 está associado ao aumento da oxidação de ácidos graxos (MC GARRY, 1992; MYNATT *et al.*, 1994).

O aumento nos níveis de RNAm da enzima succinato desidrogenase pelo GC-24 no BAT também é um indicativo do aumento no gasto energético neste tecido. Esta enzima está envolvida em uma das etapas do ciclo de Krebs, o que indica aumento na síntese de ATP e, consequentemente, do gasto energético.

O aumento no RNAm da ACC, enzima envolvida na lipogênese, também constitui evidência de que o GC-24 ativou o BAT. A lipogênese é essencial para a função termogênica do BAT, pois fornece os ácidos graxos que serão utilizados como principal substrato energético para a geração de calor, além de ativar a UCP1. Estes dados sugerem que o tecido adiposo marrom foi ativado pelo GC-24.

O músculo esquelético também apresenta potencial termogênico importante e a análise dos efeitos do GC-24 sobre este tecido mostrou que esse análogo do TR β aumentou a expressão de CPT1 e de PGC1 α . Como o PGC-1 α está envolvido na via da regulação da biogênese mitocondrial, a sua maior expressão está associada ao aumento da oxidação de ácidos graxos. Assim, o aumento na expressão dessas duas enzimas no músculo gastrocnemius pelo GC-24 sugere que o músculo esquelético também parece contribuir com o aumento no metabolismo induzido pela ativação do TR β , além de ser também um tecido alvo para este agonista do T3.

Nossos dados também mostram que genes envolvidos no metabolismo energético apresentam respostas diferentes ao tratamento com GC-24 do tratamento com T3. Essas

diferenças observadas provavelmente se devem à ativação concomitante do TR α e do TR β pelo T3, em oposição à ativação predominante do TR β pelo GC-24.

Apesar da diminuição no conteúdo corporal de gordura pela ativação do TR β , os animais tratados com dieta rica em gordura+GC-24, não perderam peso. Ao contrário, ganharam tanto peso quanto os animais tratados com dieta rica em gordura apenas. Assim, o ganho de peso observado nos animais tratados com dieta rica em gordura +GC-24 ainda permanece a ser esclarecido.

Estudos com o agonista seletivo ao TR β , GC-1 e com T3 mostraram que, ao contrário do T3, o tratamento com GC-1 não causa perda óssea (FREITAS *et al.*, 2003; FREITAS *et al.*, 2005) e não alteram a massa muscular (MIYABARA *et al.*, 2005; VILLICEV *et al.*, 2007). Assim, seria possível que o agonista da mesma série, GC-24, pudesse induzir não apenas um efeito protetor, mas um aumento na massa óssea e/ou no tecido muscular, contribuindo dessa maneira para o ganho de peso observado nos animais tratados com GC-24. Entretanto, nossos dados mostram que nenhum dos tratamentos efetuados alterou o peso dos ossos ou o tecido muscular estudado, sugerindo que esses tecidos não tenham contribuído para o ganho de peso observado no tratamento com GC-24.

Como os animais estudados não apresentaram alteração na massa dos músculos ou do tecido ósseo (dados não mostrados), investigamos se teria havido alteração no conteúdo total de água dos animais. O tratamento com T3 reduziu significativamente a quantidade de água. Por outro lado, o tratamento com GC-24 e a ingestão de dieta rica em gordura somente, não alteraram o conteúdo de água total, o que sugere que a diferença no ganho de peso de animais tratados com dieta + GC-24 e dieta + T3 pode ser o resultado da diferença no conteúdo de água desses animais. Assim, a quantidade de água corporal total poderia ser uma explicação para a elevação do peso corporal nos animais tratados com dieta e GC-24.

Embora não tenha sido o foco do nosso estudo, é sabido que a condição tiroidiana influencia a função renal. Tanto em pacientes quanto em animais hipertiroideos, pode-se observar aumento de ingestão de líquidos e aumento do fluxo urinário. Embora ainda não sejam conhecidas as causas do aumento do fluxo urinário, estudos recentes mostram que, em animais hipertiroideos mesmo quando a ingestão alimentar e de água é equivalente, ocorre aumento do volume urinário, e o inverso ocorre no hipotireoidismo. Estudos experimentais demonstraram que o tratamento com tiroxina é capaz de normalizar o reduzido fluxo urinário de ratos hipotireoideos. Uma hipótese proposta para explicar o aumento do débito urinário é a de que animais hipertiroideos podem apresentar expressão diminuída de canais de água no córtex e na medula renal, o que poderia contribuir para a maior eliminação de água por esses

animais (SCHRIER, 2006; WANG *et al.*, 2007). Assim, é possível que o efeito da eliminação de água observada no hipertireoidismo não seja mimetizado pelo GC-24, o que poderia ser uma possível explicação para a diferença no ganho de peso observada após o tratamento com T3 e GC-24.

O aumento da disponibilidade de ácidos graxos livres está positivamente associado com o aumento na oxidação lipídica e inibição da oxidação de glicose. De acordo com o ciclo de Randle, a oxidação de ácidos graxos leva a um aumento da concentração intramitocondrial de acetil coenzima A e de citrato, o que inibe a atividade da piruvato desidrogenase e fosfofrutoquinase, enzimas limitantes da glicólise, inibindo a via glicolítica e culmina com aumento nos níveis de glicose 6 fosfato, os quais impedem a atividade da hexoquinase II, levando à diminuição da captação de glicose e, consequentemente, elevação da glicemia (RANDLE *et al.*, 1963; RANDLE *et al.*, 1994).

Além disso, estudos posteriores mostram que o aumento nos níveis plasmáticos de ácidos graxos livres leva à inibição do transporte de glicose mediado pela insulina para o músculo esquelético (BODEN e SCHULMAN, 2002; DRESNER *et al.*, 1999; KELLEY *et al.*, 1993).

Nossos dados mostram que, de fato, a ingestão de dieta rica em gordura induz a hiperglicemia de jejum. Além disso, 30 minutos após a sobrecarga de glicose a glicemia dos animais que receberam somente a dieta rica em gordura foi significativamente mais elevada do que a dos demais grupos, demonstrando que esses animais apresentam maior intolerância à glicose. Isto está positivamente associado ao fato de esses animais se mostrarem menos responsivos à insulina e, portanto, apresentarem maior dificuldade em metabolizar a glicose após a sobrecarga de insulina.

O fato de o músculo esquelético representar uma grande porcentagem do peso corporal revela a importância desse tecido na homeostase glicolítica. A captação de glicose pela célula muscular ocorre principalmente pelo transportador de glicose isoforma 4 (GLUT-4), assim como no tecido adiposo e tem sua expressão mediada pela insulina. Diversos estudos demonstraram que a ingestão de dieta rica em gordura diminui o transporte de glicose, associado à diminuição na expressão gênica deste transportador no tecido adiposo (IKEMOTO *et al.*, 1995; KAHN, 1994; FENG *et al.*, 2008;) Entretanto, nossos dados mostram que a expressão gênica do GLUT-4 não sofreu alteração pela dieta rica em gordura em nenhum dos tecidos estudados, o que sugere que outros mecanismos, além da expressão gênica do transportador, estejam envolvidos na hiperglicemia de jejum observada durante a ingestão de dieta rica em gordura. Essa hipótese é suportada por diversos estudos, que

demonstraram que a expressão gênica do GLUT-4 em músculo esquelético não sofre alteração por dietas ricas em gordura (IKEMOTO *et al.*, 1995; KUSUNOKI *et al.*, 1993, ROSHOLT *et al.*, 1994), mas se observa diminuição na translocação desse transportador para a membrana plasmática com consequente diminuição na atividade do transportador (HANSEN; HAN; MARSHALL, 1998; ZIERATH *et al.*, 1997; ROSHOLT *et al.*, 1994).

Evidências sugerem que essa diminuição resulte de alterações na via de sinalização da insulina decorrentes do acúmulo de metabólitos envolvidos na reesterificação de ácidos graxos, como, por exemplo, o diacilglicerol. Propõe-se que metabólitos como o diacilglicerol ocasionam a interrupção da via de sinalização da insulina por meio da ativação da proteína quinase C e da diminuição da fosforilação dos substratos do receptor de insulina, inibindo ações metabólicas como a transcrição gênica dos transportadores de glicose e a captação de glicose pelas células. Este fato contribui para a hiperglicemia de jejum, característica do diabetes tipo II (DRESNER *et al.*, 1999; BODEN, 2008; RAGHEB *et al.*, 2009).

O tratamento com T3 ou GC-24 corrigiu a resposta dos animais à sobrecarga de glicose, o que está positivamente relacionado a maior responsividade à insulina apresentada por esses animais. Embora diversos estudos tenham demonstrado que o hormônio tireoidiano aumenta a expressão de GLUT-4 mediada pela insulina, tanto no músculo quanto no tecido adiposo (CASLA *et al.*, 1990; SHIMIZU e SHIMAZU, 2002; TORRANCE *et al.*, 1997, WEINSTEIN, 1991; WEINSTEIN, 1994), esse efeito não foi observado nos animais tratados com T3 ou GC-24, os quais não apresentaram alteração na expressão gênica desse transportador.

Embora não tenha havido alteração na expressão gênica do GLUT-4 pelo T3 e pelo GC-24, é possível que haja um aumento na translocação do GLUT-4 para a membrana plasmática, e consequentemente, da atividade deste transportador. O aumento da atividade do GLUT-4 poderia ser responsável pela melhora da resposta glicêmica observada nos animais tratados com T3 ou GC-24.

Além disso, o fato de os animais tratados com GC-24 apresentarem melhora na resposta glicêmica e corrigirem a intolerância à glicose induzida pela dieta da mesma forma que o T3, mostra que esse efeito do hormônio tireoideano provavelmente é mediado pelo TR β .

Nos animais tratados com T3 ou GC-24, apesar da maior facilidade em metabolizar a glicose, a glicemia de jejum também está aumentada. É possível que o principal fator responsável pelo aumento da glicemia de jejum seja o aumento da produção hepática de glicose.

O aumento da produção de glicose hepática é atribuído ao aumento na gliconeogênese, pois a disponibilidade aumentada de ácidos graxos livres leva a maior captação desses metabólitos pelo fígado. Isto aumenta a oxidação lipídica e ocasiona o acúmulo de acetil coenzima A intramitocondrial, o que estimula as enzimas piruvato carboxilase e fosfoenolpiruvato carboxiquinase, enzimas limitantes no processo de gliconeogênese, assim como a glicose 6 fosfatase, que é limitante para a liberação de glicose pelos hepatócitos, levando à liberação de glicose pelos hepatócitos, o que leva à hiperglicemia (WILLIAMSON *et al.*, 1969; GOLAY *et al.*, 1987; CONSOLI *et al.*, 1990; PUNHAKAINEN *et al.*, 1992, KOVACKS e STURMVOLL., 2005).

Além disso, o aumento dos níveis de ácidos graxos e a interrupção da via de sinalização da insulina impedem o efeito supressor da insulina sobre a gliconeogênese hepática (SHEEHAN e JENSEN, 2000). Como os animais que ingeriram a dieta rica em gordura são menos responsivos à insulina, é possível que a ausência do efeito supressor desse hormônio sobre a gliconeogênese hepática tenha contribuído para a hiperglicemia.

Além disso, a enzima fosfo-enol-piruvato carboxiquinase (PEPCK), envolvida na neoglicogênese, é estimulada pelo T3. Portanto, é possível que esta via esteja envolvida no aumento da glicemia de jejum observada nesses animais e que este efeito do T3 seja mediado pelo TR β (BARTHEL e SCHMOLL, 2003; HANSON e GARBER, 1972; GURNEY *et al.*, 1994; PARK; JERDEN; BAHOUTH, 1995).

Sabe-se que o tamanho dos adipócitos depende do acúmulo de lipídeos no seu interior e, portanto, está relacionado com o seu conteúdo de gordura (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2006; KNITTLE e HIRSCH, 1968; JOHNSON *et al.*, 1973). Além disso, estudos mostram que células adiposas de tamanho maior apresentam atividade lipolítica aumentada e, com isso, liberam mais ácidos graxos livres na circulação (MORIMOTO, 1998; AHIMA, 2000; BODEN, 2008).

Apesar de nossos dados mostrarem que o T3 e o GC-24 aumentam o gasto energético e a oxidação de gordura, e embora de fato tenham diminuído a gordura total, esse efeito não foi suficiente para diminuir a concentração plasmática de ácidos graxos livres. Pelo contrário, o tratamento com T3 e com GC-24 aumentou a concentração plasmática de ácidos graxos livres, além dos observados pela dieta rica em gordura somente. Estes dados sugerem que o T3 estimula a lipólise mesmo durante a ingestão de dieta rica em gordura e, portanto, há maior liberação de ácidos graxos na circulação pelos adipócitos. Provavelmente, o TR β tem

participação importante nesse efeito do hormônio tireoidiano, já que o GC-24 aumentou os níveis de ácidos graxos livres de forma semelhante ao T3.

Além disso, a disponibilidade aumentada de ácidos graxos eleva a disponibilidade de Acetil CoA, o que pode levar a uma síntese maior de triglicérides pelo fígado. A produção elevada de triglicérides pode levar ao aumento na síntese e secreção de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) pelo fígado e causar hipertrigliceridemia (SHEEHAN e JENSEN, 2000).

De fato, nossos dados mostram que a dieta rica em gordura induziu aumento nos níveis de ácidos graxos livres o que provavelmente favoreceu a deposição de triglicérides no fígado, conforme sugere a histologia.

Diversos estudos demonstraram que o hipotireoidismo está associado a altos níveis de triglicérides plasmáticos, o que está correlacionado com uma baixa taxa de remoção de VLDL de triglicérides da circulação. No hipotireoidismo, a hipertrigliceridemia é atribuída à diminuição da atividade da lipase de lipoproteínas ou da lipase hepática (NIKKILÄ e KEKKI, 1972; ABRAMS; GRUNDY; GYNSBERG, 1981; OBRIEN *et al.*, 1990).

Por outro lado estudos em pacientes hipertiroídeos demonstram que esses indivíduos apresentam taxas elevadas de remoção de VLDL de triglicérides da circulação. Além disso, o tratamento com T3 está associado ao aumento da atividade da lipase de lipoproteínas e da lipase hepática. Embora alguns estudos tenham demonstrado somente uma tendência na diminuição ou até mesmo inalteração dos níveis de triglicérides plasmáticos, diversos estudos mostram diminuição da trigliceridemia pelo hormônio tireoidiano (TAN; SHIU; KUNG, 1998; ITO *et al.*, 2003; PRIEUR *et al.*, 2005).

Nossos dados reafirmam esses achados e mostram que a hipertrigliceridemia induzida pela dieta foi normalizada não só pelo T3, mas também pelo GC-24. Embora não tenhamos avaliado a taxa de remoção de VLDL de triglicérides da circulação e a atividade da lipase de lipoproteínas e da lipase hepática, é possível que o aumento da atividade dessas enzimas e da remoção de lipoproteínas ricas em triglicérides seja responsável pela diminuição dos níveis plasmáticos de triglicérides pelo T3 e pelo GC-24. Além disso, o fato de o tratamento com GC-24 ter diminuído a hipertrigliceridemia da mesma forma que o T3 sugere que provavelmente esse efeito do hormônio tireoidiano seja mediado pelo TR β .

A maior deposição de gordura no fígado, conforme foi observado neste estudo, fornece quantidades aumentadas de Acetil Coenzima A às células hepáticas para a formação de colesterol, o que aumenta a sua concentração sanguínea (WANG *et al.*, 2008). Altos níveis de colesterol no sangue estão relacionados ao acúmulo de colesterol nos vasos sanguíneos, o

que constitui fator de risco para o desenvolvimento de aterosclerose, que consiste em um importante problema de saúde com grande impacto na morbidez e mortalidade. Logo, tratamentos capazes de diminuir os níveis de colesterol são necessários (NELSON e COX., 2005; GROVER *et al.*, 2003).

Consistentes com a maior deposição de gordura no fígado nossos dados mostram que a ingestão de dieta rica em gordura induziu hipercolesterolemia e aumento do colesterol hepático.

O uso do GC-24 diminuiu parcialmente] a hipercolesterolemia induzida pela dieta mas não teve efeito sob os níveis de colesterol hepático, os quais permaneceram elevados. Este efeito do GC-24 sobre a metabolização hepática de gorduras pode ser explicado pela maior expressão desta isoforma no fígado. Foi demonstrado que o TR β é a isoforma predominante no fígado e responde por cerca de 80% das ligações de T3 ao seu receptor (SCHWARTZ *et al.*, 1992). Portanto, haveria grande possibilidade de que a maioria dos efeitos dos agonistas seletivos ao TR β ocorresse no tecido hepático. Entretanto, nossos dados mostraram que a maioria dos efeitos do GC-24 ocorrem no tecido adiposo marrom.

Apesar dos agonistas seletivos ao TR β se mostrarem eficientes na normalização dos níveis de colesterol (ERION *et al.*, 2007; TROST *et al.*, 2000; GROVER *et al.*, 2003; GROVER *et al.*, 2004; JOHANSSON *et al.*, 2005; MIYABARA *et al.*, 2005), no nosso estudo o tratamento com GC-24 minimizou mas não normalizou a hipercolesterolemia induzida pela dieta rica em gordura. Os estudos anteriores foram realizados em animais tratados com dieta padrão ou dieta rica em colesterol e, portanto, em modelos de hipercolesterolemia diferentes do que foi utilizado no presente estudo, o que pode contribuir para a diferença de resultados observados. Entretanto, é possível que dietas ricas em gordura possam dessensibilizar o TR β no fígado, o que levaria à diminuição do sinal do GC-24 no fígado e, portanto, à redução apenas parcial nos níveis de colesterol observados (CRUNKHORN e PATTI, 2008)

Portanto, é possível que, no nosso modelo de dieta rica em gordura, a ativação do TR β não seja eficiente na diminuição do colesterol plasmático como o observado em animais tratados com dieta padrão (MIYABARA *et al.*, 2005; GROVER *et al.*, 2003; GROVER *et al.*, 2004; TROST *et al.*, 2000; AMORIM *et al.*, 2009).

Embora a avaliação da regulação e função das desidases das iodotironinas não sejam o objetivo do presente estudo, nossos dados mostram que a ativação do TR β aumentou a expressão gênica da desidase de iodotironinas isoforma 1 (D1), sugerindo que pudesse haver uma regulação isoforma de TR específica da D1 no nosso modelo de dieta rica em gordura.

Embora os mecanismos mediados pelas desidases de iodotironinas não sejam totalmente compreendidos, é aceito que sua função é manter a homeostase do hormônio tireoidiano. A localização subcelular e o substrato utilizado pelos diferentes tipos de desidases, a saber, D1, D2 e D3 bem como sua expressão tecidual específica, mostram que estas selenoenzimas têm papel distinto na regulação da disponibilidade de T3 plasmática e intracelular.

Até anos recentes, o papel atribuído à D1 era o de ser fonte importante de T3 plasmático. Assim, o tratamento com GC-24 elevaria a atividade da D1 com consequente aumento dos níveis de T3 plasmáticos. Assim, o aumento nos níveis de T3 circulante ativaria tanto TR α quanto TR β , comprometendo sobremaneira a utilização do GC-24 como agonista do TR β . No entanto, estudos feitos em camundongos com nocaute para a D1 mostraram que esta desidase não é relevante para o T3 plasmático, mas contribui significativamente com o metabolismo e excreção das iodotironinas, uma vez, que quando conjugadas representam um excelente substrato para a D1 (SCHNEIDER *et al.*, 2006). De fato, apesar da atividade aumentada da D1, a concentração plasmática de T3 não diferiu nos grupos estudados (dados não adicionados).

Diversos estudos enfatizam que o tecido adiposo branco apresenta também função endócrina e, portanto, tem a propriedade de secretar substâncias com importantes efeitos biológicos e que podem exercer efeitos locais e sistêmicos (ALESSI *et al.*, 2000; BRUUN; PEDERSEN; RICHEKSEN, 2001; HOTAMISLIGIL; SHARGIL; SPIEGELMAN, 1993; MOHAMED-ALI *et al.*, 1997; WOZNIAK *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 1994;).

Dentre os produtos de secreção, estão a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que, além de constituírem citocinas com função imunológica, parecem estar implicadas na regulação da secreção de insulina e no metabolismo lipídico em tecidos periféricos. O excesso de tecido adiposo está associado ao desenvolvimento de processo inflamatório e se caracteriza pela liberação aumentada de citocinas como o TNF- α e a interleucina -6 (BODEN *et al.*, 2005; JIAO *et al.*, 2008; UYSAL *et al.*, 1997; ARNER, 1995; HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993)

A ingestão de dieta rica em gordura e o aumento nos níveis de ácidos graxos livres estão associados ao aumento nos níveis plasmáticos de TNF- α e IL-6. Além disso, a expressão e a secreção dessas citocinas mostram-se aumentadas na obesidade (JIAO *et al.*, 2008; UYSAL *et al.*, 1997).

Nossos dados concordam com dados da literatura, uma vez que os animais tratados com dieta rica em gordura apresentam níveis elevados de TNF- α e IL-6.

O tratamento com T3 reduziu discretamente os níveis de IL-6 e TNF- α . O papel do T3 na regulação dos níveis dessas citocinas não é claro. Alguns estudos realizados em pacientes hipertireoideos mostraram níveis plasmáticos normais, enquanto outros estudos encontraram elevação dos níveis de TNF- α e IL-6 (WAHRENBORG; WENNLUND; HOFFSTEDT, 2002; SALVI *et al.*, 2000; SENTURK *et al.*, 2003; DIEZ *et al.*, 2002; AL-HUMAIDI, 2000; CELIK; AKALIN; ERBAS, 1995; MITROU *et al.*, 2010).

A expressão aumentada de TNF- α em animais obesos parece estar relacionada com o tamanho da célula adiposa e com o desenvolvimento da resistência à insulina pois estudos em animais nocaute para TNF- α demonstraram que estes animais desenvolvem menos adiposidade e melhoram a sensibilidade à insulina quando se alimentam de uma dieta rica em gordura (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1994; HOTAMISLIGIL e SPIEGELMAN, 1994; HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993; HOTAMISLIGIL *et al.*, 1995; UYSAL *et al.*, 1993). É possível que a redução nos níveis de IL-6 e TNF- α nos animais tratados com T3 tenha sido um efeito indireto causado pela redução no tamanho dos adipócitos, induzido por este hormônio. No entanto, o GC-24 não reduziu as citocinas plasmáticas, embora tenha reduzido o tamanho dos adipócitos. Assim, nossos dados sugerem que o efeito do T3 em reduzir os níveis de TNF- α e IL-6, mesmo que discretamente, seja um efeito direto e provavelmente mediado pelo TR α e não pelo TR β .

6 CONCLUSÕES

Nosso estudo mostrou que a ativação do TR β por um agonista altamente seletivo, o GC-24, em ratos tratados com dieta rica em gordura, preveniu algumas alterações metabólicas típicas dessa condição, tais como o aumento da massa gorda, intolerância à glicose e hipertrigliceridemia e corrigiu parcialmente outras, como a hipercolesterolemia, o aumento do conteúdo de colesterol hepático e IL-6. Estes achados mostram um papel importante do TR β na mediação dos efeitos do T3 e devem ter repercussão importante na utilização potencial de agonistas seletivos ao TR β como agentes hipocolesterolemiantes. No entanto, não podemos descartar o TR α na participação desses eventos, uma vez que nos animais tratados com GC-24 encontramos níveis normais de T3 plasmáticos. Assim, embora a estimulação do TR β pelo GC-24 seja mais intensa, o TR α continuou sendo ativado pelo T3. Dessa forma, devemos levar em consideração um eventual papel permissivo ou coadjuvante do TR α no modelo estudado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, R. R.; DENSEM, J. W.; DAVIES, P.; DAVIES, M. W.; WYNN, V. The effects of triiodothyronine on energy expenditure, nitrogen balance and rates of weight and fat loss in obese patients during prolonged caloric restriction. **Int. J. Obes.**, v. 9, n. 6, p. 433-442, 1985.
- 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. 307-322, 1981.
- ADAMS, S. H. Uncoupling protein homologs: emerging views of physiological function. **J. Nutr.**, v. 130, n. 4, p. 711-714, 2000.
- AHIMA, R. S.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Trends. Endocrinol. Metab.**, v. 11, n. 8, p. 327-332, 2000.
- AKIYAMA, T.; TACHIBANA, I.; SHIROHARA, H.; WATANABE, N.; OTSUKI, M. High-fat hypercaloric diet induces obesity, glucose intolerance and hyperlipidemia in normal adult male Wistar rat. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v. 31, n. 1-3, p. 27-35, 1996.
- ALESSI, M. C.; BASTELICA, D.; MORANGE, P.; BERTHET, B.; LEDUC, I.; VERDIER, M.; GEEL, O.; JUHAN-VAGUE, I. Plasminogen activator inhibitor 1, transforming growth factor-beta1, and BMI are closely associated in human adipose tissue during morbid obesity. **Diabetes**, v. 49, n. 8, p. 1374-1380, 2000.
- AL-HUMAIIDI, M. A. Serum cytokines levels in Graves' disease. **Saudi Med. J.**, v. 21, p. 639-644, 2000.
- AMORIM, B. S.; UETA, C. B.; FREITAS, B. C.; NASSIF, R. J.; GOUVEIA, C. H.; CHRISTOFFOLETE, M. A.; MORISCOT, A. S.; LANCELLOTTI, C. L.; LLIMONA, F.; BARBEIRO, H. V.; DE SOUZA, H. P.; CATANOZI, S.; PASSARELLI, M.; AOKI, M. S.; BIANCO, A. C.; RIBEIRO, M. O. A TR β -selective agonist confers resistance to diet-induced obesity. **J. Endocrinol.**, v. 203, n. 2, p. 291-299, 2009.
- ARNER P Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose. **Ann. Med.**, v. 27, n. 4, p. 435-438, 1995.
- ARRUDA, A. P.; DA-SILVA, W. S.; CARVALHO, D. P.; DE MEIS, L. Hyperthyroidism increases the uncoupled ATPase activity and heat production by the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. **Biochem. J.**, v. 375 pt. 3, p. 753-760, 2003.
- BAHI, L.; GARNIER, A.; FORTIN, D.; SERRURIER, B; VEKSLER, V.; BIGARD, A.X.; VENTURA-CLAPIER, R. Differential effects of thyroid hormones on energy metabolism of rat slow-and-fast-twitch muscles. **J. Cell. Physiol.**, v. 203, p. 589-598, 2005.

BARRERO, M. J.; MARRERO, P. F.; HARO, D. Regulation of the rat liver carnitine palmitoyltransferase I gene transcription by thyroid hormone. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 279, n. 1, p. 81-88, 2000.

BASSET, 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.

BARTHEL, A.; SCHMOLL, D. Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 285, n. 4, p. E685-E692, 2003.

BEYLOT, M.; MARTIN, C.; LAVILLE, M.; RIOU, J. P.; COHEN, R.; MORNEX, R. Lipolytic and ketogenic flux in hyperthyroidism. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 73, p. 42-49, 1991.

BÉZAIRE, V.; HOFMANN, W.; KRAMER, J. K.; KOZAK, L. P.; HARPER, M. E. Effects of fasting on muscle mitochondrial energetics and fatty acid metabolism in Ucp3(-/-) and wild-type mice. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 281, n. 5, p. E975-982, 2001.

BIANCO, A. C.; SILVA, J. E. Nuclear 3, 5, 3'-triiodothyronine (T3) in brown adipose tissue: receptor occupancy and sources of T3 as determined by in vivo techniques. **Endocrinology**, v. 120, n. 1, p. 55-62, 1987a.

BIANCO, A. C.; SILVA, J. E. Intracellular conversion of thyroxine to triiodothyronine is required for the optimal thermogenic function of brown adipose tissue. **J. Clin. Invest.**, v. 79, p. 295-300, 1987b.

BIANCO, A. C.; SILVA, J. E. Optimal response of key enzymes and uncoupling protein to cold in BAT depends on local T3 generation. **Am. Physiol. Soc.**, v. 253, n. 3, pt. 1, p. E255-E263, 1987c.

BIANCO, A. C.; SILVA, J. E. Cold exposure rapidly induces virtual saturation of brown adipose tissue nuclear T3 receptors. **Am. J. Physiol.**, v. 255, n. 4, pt. 1, p. E496-E503, 1988.

BIANCO, A. C.; SHENG, X. Y.; SILVA, J. E. Triiodothyronine amplifies norepinephrine stimulation of uncoupling protein gene transcription by a mechanism not requiring protein synthesis. **J. Biol. Chem.**, v. 263, n. 34, p. 18168-18175, 1988.

BIANCO, A. C.; KIEFER, J. D.; SILVA, J. E. Adenosine 3', 5'-monophosphate and thyroid hormone control of uncoupling protein messenger ribonucleic acid in freshly dispersed brown adipocytes. **Endocrinology**, v. 130, n. 5, p. 2625-2633, 1992.

BIANCO, A. C.; CARVALHO, S. D.; CARVALHO, C. R.; RABELO, R.; MORISCOT, A. S. Thyroxine 5'-deiodination mediates norepinephrine-induced lipogenesis in dispersed brown adipocytes. **Endocrinology**, v. 139, n. 2, p. 571-578, 1998.

BIANCO, A. C. Impact of gene cloning, disruption and over-expression of iodothyronine deiodinases on thyroid hormone homeostasis. **Endocrinol. Metab.**, v. 46, n. 4, p. 402-411, 2002.

BIANCO, A. C.; MAIA, A. L.; DA SILVA, W. S.; CHRISTOFFOLETE, M. A. Adaptive activation of thyroid hormone and energy expenditure. **Biosci. Rep.**, v. 25, n. 3-4, p. 191-208, 2005.

BILEZIKIAN, J. P.; LOEB, J. N. The influence of hyperthyroidism and hypothyroidism on alpha- and beta-adrenergic receptor systems and adrenergic responsiveness. **Endocr. Rev.**, v. 4, n. 4, p. 378-388, 1983.

BLENNEMANN, B.; MOON, Y. K.; FREAKER, H. C. Tissue-specific regulation of fatty acid synthesis by thyroid hormone. **Endocrinology**, v. 130, n. 2, p. 637-643, 1992.

BODEN, G.; SHULMAN, G. I. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 32, Suppl 3, p.14-23, 2002.

BODEN, G.; SHE, P.; MOZZOLI, M.; CHEUNG, P.; GUMIREDDY, K.; REDDY, P.; XIANG, X.; LUO, Z.; RUDERMAN, N. Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor-kappaB pathway in rat liver. **Diabetes**, v. 54, n. 12, p. 3458-3465, 2005.

BODEN, G. Obesity and free fatty acids. **Endocrinol. Metab. Clin. North Am.**, v. 37, n. 3, p. 635-646, 2008.

BORNGRAEBER, S.; BUDNY, M. J.; CHIELLINI, G.; LIMA, C. S. T.; TOGASHI, M.; WEBB, P.; BAXTER, J. D.; SCANLAN, S.; FLETTERICK, R. J. Ligand selectivity by seeking hydrophobicity in thyroid hormone receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 100, n. 26, p. 15358-15363, 2003.

BOSS, O.; SAMEC, S.; PAOLONI-GIACOBINO, A.; ROSSIER, C.; DULLOO, A.; SEYDOUX, J.; MUZZIN, P.; GIACOBINO, J. P. Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. **FEBS Lett.**, v. 408, p. 39-42, 1997.

BRADBURY, M. W. Lipid metabolism and liver inflammation. I. Hepatic fatty acid uptake: possible role in steatosis. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 290, n. 2, p. 194-198, 2006.

BRANCO, M.; RIBEIRO, M. O.; NEGRÃO, N.; BIANCO, A. C. 3,3',5' – triiodothyronine actively stimulates UCP in brown fat under minimal sympathetic activity. **Am. J. Physiol.**, v. 276, n. 1, pt. 1, p. E179-E187, 1999.

BRUUN, J. M.; PEDERSEN, S. B.; RICHELSEN, B. Regulation of interleukin 8 production and gene expression in human adipose tissue in vitro. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 86, n. 3, p. 1267-1273, 2001.

BRYZGALOVA, G.; EFFENDIC, S.; KHAN, A.; REHNMARK, S.; BARBOUNIS, P.; BOULET, J.; DONG, G.; SINGH, R.; SHAPSES, S.; MALM, J.; WEBB, P.; BAXTER, J. D.; GROVER, G. J. Anti-obesity, anti-diabetic, and lipid lowering effects of the thyroid receptor beta subtype selective agonist KB-141. **J Steroid Biochem Mol Biol.**, v. 111, n. 3-5, p. 262-267, 2008.

BUMGARNER, J. R.; RAMKUMAR, V.; STILES, G. L. Altered thyroid status regulates the adipocyte A1 adenosine receptor-adenylate cyclase system. **Life Sci.**, v. 44, n. 22, p. 1705-1712, 1989.

CABLE, E. E.; FINN, P. D.; STEBBINS, J. W.; HOU, J.; ITO, B. R.; VAN POELIE, P. D.; LINEMEYER, D. L.; ERION, M. D. Reduction of hepatic steatosis in rats and mice after treatment with a liver-targeted thyroid hormone receptor agonist. **Hepatology**, v. 49, n. 2, p. 407-417, 2009.

CACHEFO, A.; BOUCHER, P.; VIDON, C.; DUSSEYRE, E.; DIRAISON, F.; BEYLOT, M. Hepatic lipogenesis and cholesterol synthesis in hyperthyroid patients. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 86, n. 11, p. 5353-5357, 2001.

CADENAS, S.; BUCKINGHAM, J. A.; SAMEC, S.; SEYDOUX, J.; DIN, N.; DULOO, A. G.; BRAND, M. D. UCP2 and UCP3 rise in starved rat skeletal muscle but mitochondrial proton conductance is unchanged. **FEBS Lett.**, v. 462, n. 3, p. 257-260, 1999.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. The biochemistry of an inefficient tissue: brown adipose tissue. **Essays Biochem.**, v. 20, p. 110-164, 1985.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue; function and physiological significance **Physiol Rev.**, v. 20, p. 110-164, 2004.

CARTER, B. W.; SCHUCANY, W. G. Brown adipose tissue in a newborn. **Proc (Bayl Univ. Med. Cent.)**, v. 21, n. 3, p. 328–330, 2008.

CASLA, A.; ROVIRA, A.; WELLS, J. A.; DOHM, G. L. Increased glucose transporter (GLUT-4) protein expression in hyperthyroidism. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 171, n. 1, p. 182-188, 1990.

CELIK, I.; AKALIN, S.; ERBAS, T. Serum levels of interleukin 6 and tumor necrosis factor- α in hyperthyroid patients before and after propylthiouracil treatment. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 132, p. 668–672, 1995.

CHIBA, S.; KATSURAGI, I.; SIMADA, T.; ADACHI, I.; SATOH, Y.; NOGUCHI, H.; GOTOH, K.; TSUBONE, T.; FUJIWARA, K.; MASAKI, T.; KAKUMA, T.; KANG, M.; TANAKA, K.; HAMAGUCHI, K.; WADA, C.; YOSHIMATSU, H. Evaluation of human brown adipose tissue using positron emission tomography, computerised tomography and histochemical studies in association with body mass index, visceral fat accumulation and insulin resistance. **Obes Rev.**, v. 7, Suppl. 2, 87, 2006.

CHIELLINI, G.; APRILETTI, J. W.; YOSHIBARA, H.; BAXTER, J. D.; RIBEIRO, R. C.; SCANLAN, T. S. A high-affinity subtype-selective agonist ligand for the thyroid hormone receptor. **Chem. Biol.**, v. 5, p. 299-306, 1998.

CHRISTOFFOLETE, M. A.; LINARDI, C. C.; DE JESUS, L.; EBINA, K. N.; CARVALHO, S. D.; RIBEIRO, M. O.; RABELO, R.; CURCIO, C.; MARTINS, L.; KIMURA, E. T.; BIANCO, A. C. Mice with targeted disruption of the Dio2 gene have cold-induced overexpression of the uncoupling protein 1 gene but fail to increase brown adipose tissue lipogenesis and adaptive thermogenesis. **Diabetes**, v. 53, n. 3, p. 577-584, 2004.

CINTI, S. The role of brown adipose tissue in human obesity. **Nutr. Metab. Cardiovas. Dis.**, v. 16, n. 8, p. 569-574, 2006.

COHADE, C.; OSMAN, M.; PANNU, H. K.; WAHL, R. L. Uptake in supraclavicular area fat (“USA-Fat”): description on 18F-FDG PET/CT. **J. Nucl. Med.**, v. 44, p. 170–176, 2003.

COLL, A. P.; FAROOGI, I. S.; O’RAHILY, S. The hormonal control of food intake. **Cell**, v.129, n. 2, p. 251-262, 2007.

CONSOLI, A.; NURHJAN, N.; REILY, J. J. Jr.; Mechanism of increased gluconeogenesis in noninsulin-dependent diabetes mellitus. **J. Clin. Invest.**, v. 86, p. 2038-2045, 1990.

COPPACK, S. W.; JENSEN, M. D.; MILES, J. M. In vivo regulation of lipolysis in humans. **J. Lipid Res.**, v. 35, n. 2, p. 177-193, 1994.

CRUNKHORN, S.; PATTI, M. E. Links between thyroid hormone action, oxidative metabolism, and diabetes risk? **Thyroid**, v. 18, n. 2, p. 227-237, 2008.

CURCIO, C.; LOPES, A. M.; RIBEIRO, M. O.; FRANCOSE, O. A.; CARVALHO, S. D.; LIMA, F. B.; BICUDO, J. E.; BIANCO, A. C. Development of compensatory thermogenesis in response to overfeeding in hypothyroid rats. **Endocrinology**, v. 140, p. 3438-3443, 1999.

CURI, R., POMPEIA, C., MIYASAKA, C. K., PROCOPIO, J., **Entendendo a gordura: os ácidos graxos**, São Paulo: Manole, 2002. 580p.

DANFORTH, JR., E.; BURGER, A. The role of thyroid hormones in the control of energy expenditure. **Clin. Endocrinol. Metab.** v. 13, n. 3, p. 581-595, 1984.

DAVIDSON, M. B. Clinical implications of insulin resistance syndromes. **Am. J. Med.**, v. 99, p. 420-426, 1995.

DAVIS, P. J.; DAVIS, F. B. Nongenomic actions of thyroid hormone on the heart. **Thyroid**, v. 12, n. 6, p. 459-466, 2002.

DEFRONZO, R. A.; FERRANNINI, E. Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. **Diabetes Care**, v. 14, p. 173-194, 1991.

DE JESUS, L. A.; CARVALHO, S. D.; RIBEIRO, M. O.; SCHNEIDER, M.; KIM, S. W.; HARNEY, J. W.; LARSEN, P. R.; BIANCO, A. C. The type 2 iodothyronine deiodinase is essential for adaptive thermogenesis in Brown adipose tissue. **J. Clin. Invest.**, v. 108, n. 9, p. 1379-1385, 2001.

DE MEIS, L. ATP synthesis and heat production during Ca(2+) efflux by sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 276, n. 1, p. 35-39, 2000.

DE MEIS, L. Brown adipose tissue Ca²⁺-ATPase: uncoupled ATP hydrolysis and thermogenic activity. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 43, p. 41856-41861, 2003.

DE MEIS, L.; ARRUDA, A. P.; CARVALHO, D. P. Role of sarco/endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in thermogenesis. **Biosci. Rep.**, v. 25, n. 3-4, p. 181-190, 2005.

DESAI-YAJNIK, V.; ZENG, J.; OMORI, K.; SHERMAN, J.; MORIMOTO, T. The effect of thyroid hormone treatment on the gene expression and enzyme activity of rat liver sodium-potassium dependent adenosine triphosphatase. **Endocrinology**, v. 136, n. 2, p. 629-639, 1995.

DHILLO, W. S. Appetite regulation: An overview. **Thyroid**, v. 17, n. 5, p. 433-445, 2007.

DIAMANT, S.; GORIN, E.; SHAFRIR, E. Enzyme activities related to fatty-acid synthesis in liver and adipose tissue of rats treated with triiodothyronine. **Eur. J. Biochem.**, v. 26, n. 4, p. 553-559, 1972.

DIEZ, J. J.; HERNANZ, A.; MEDINA, S.; BAYON, C.; IGLESIAS, P. Serum concentrations of tumor necrosis factor-alpha (TNF-a) and soluble TNF-a receptor p55 in patients with hypothyroidism and hyperthyroidism before and after normalization of thyroid function. **Clin. Endocrinol.**, v. 57, p. 515-521, 2002

DRESNER, A.; LAURENT, D.; MARCUCCI, M.; GRIFFIN, M. E.; DUFOUR, S.; CLINE, G. W.; SLEZAK, L. A.; ANDERSEN, D. K.; HUNDAL, R. S.; ROTHMAN, D. L.; PETERSEN, K. F.; SHULMAN, G. I. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. **J. Clin. Invest.**, v. 103, n. 2, p. 253-259, 1999.

DUMITRESCU, A. M.; LIAO, X. H.; BEST, T. B.; BROCKMANN, K.; REFEROFF, S. A novel syndrome combining thyroid and neurological abnormalities is associated with mutations in a monocarboxylate transporter gene. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 74, n. 1, p. 168-175, 2004.

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. 4036-4043, 2006.

DUNTAS L. H. Thyroid disease and lipids. **Thyroid**, v.12, n. 4, p. 287-293, 2002.

ERION, M. D.; CABLE, E. E.; ITO, B. R.; JIANG, H.; FUJITAKI, J. M.; FINN, P. D.; ZHANG, B. H.; HOU, J.; BOYER, S. H.; VAN POELJE, P. D.; LINEMEYER, D. L. Targeting thyroid hormone receptor-beta agonists to the liver reduces cholesterol and triglycerides and improves the therapeutic index. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 104, n. 39, p. 15490-15495, 2007.

FLEURY, C.; NEVEROYA, M.; COLLINS, S.; RAIMBAULT, S.; CHAMPGNY, O.; LEVY-MEYRUIS, C.; BOUILLAUD, F.; SELDIN, M. F.; SURWIT, R. S.; RICQUIER, D.; WARDEN, C. H. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. **Nat. genet.**, v. 15, p. 269-272, 1997.

FELDMANN, H. M.; GOLOZOUBOVA, V.; CANNON, B.; NEDERGAARD, J. UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. **Cell Metab.**, v. 9, n. 2, p. 203-209, 2009.

FENG, L.; GAO, L.; GUAN, Q.; HOU, X.; WAN, Q.; WANG, X.; ZHAO, J. Long-term moderate ethanol consumption restores insulin sensitivity in high-fat-fed rats by increasing SLC2A4 (GLUT4) in the adipose tissue by AMP-activated protein kinase activation. **J. Endocrinol.**, v. 199, n. 1, p. 95-104, 2008.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE-STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J. Biol. Chem.**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

FONSECA-ALANIZ, M. H.; TAKADA, J.; ALANSO-VALE, M. I.; LIMA, F. B. The adipose tissue as a regulatory center of the metabolism. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 50, n. 2, p. 216-229, 2006.

FORREST, D.; HANEBUTH, E.; SMEYNE, R. J.; EVERDS, N.; STEWART, C. L.; WEHNER, J. M.; CURRAN, T. Recessive resistance to thyroid hormone in mice lacking thyroid hormone receptor beta: evidence for tissue-specific modulation of receptor function. **EMBO. J.**, v. 15, n. 12, p. 3006-3015, 1996a.

FORREST, D.; ERWAY, L. C.; Ng L.; ALTSCHULER, R.; CURRAN, T. Thyroid hormone receptor beta is essential for development of auditory function. **Nat. Genet.**, v. 13, n. 3, p. 354-357, 1996b.

FORREST, D.; VENNSTRÖM, B. Functions of thyroid hormone receptors in mice. **Thyroid**, v. 10, n. 1, p. 41-52, 2000.

FREEDMAN, L. P. Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. **Endocr. Rev.**, v. 13, p. 129-145, 1992.

FREITAS, F. R.; MORISCOT, A. S.; JORGETTI, V.; SOARES, A. G.; PASSARELLI, M.; SCANLAN, T. S.; BRENT, G. A.; BIANCO, A. C.; GOUVEIA, C. H. Sparing bone mass in rats treated with thyroid hormone receptor TR beta-selective compound GC-1. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 285, n. 5, p. E1135-E1141, 2003.

FREITAS, F. R.; CAPELO, L. P.; O'SHEA, P. J.; JORGETTI, V.; MORISCOT, A. S.; SCANLAN, T. S.; WILLIAMS, G. R.; ZORN, T. M.; GOUVEIA, C. H. The thyroid hormone receptor beta-specific agonist GC-1 selectively affects the bone development of hypothyroid rats. **J. Bone Miner. Res.**, v. 20, n. 2, p. 294-304, 2005.

FRIESEMA, E. C.; GANGULY, S.; ABDALLA, A.; MANNING FOX, J. E.; HALESTRAP, A. P.; VISSER, T. J. Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 41, p. 40128-40135, 2003.

FRIESEMA, E. C.; GRUETERS, A.; BIEBERMANN, H.; KRUDE, H.; VON MOERS, A.; REESER, M.; BARRETT, T. G.; MANCILLA, E. E.; SVENSSON, J.; KESTER, M. H.; KUIPER, G. G.; BALKASSMI, S.; UITTERLINDEN, A. G.; KOEHRLE, J.; RODIEN, P.; HALESTRAP, A. P.; VISSER, T. J. Association between mutations in a thyroid hormone transporter and severe X-linked psychomotor retardation. **Lancet.**, v. 364, n. 9443, p. 1435-1437, 2004.

GARRUTI, G.; RICQUIER, D. Analysis of uncoupling protein and its mRNA in adipose tissue deposits of adult humans. **Int J Obes.**, v. 16, p. 383-390, 1992.

GAUTHIER, K.; CHASANDE, O.; PLATEROTI, M.; ROUX, J. P.; LEGRAND, C.; PAIN, B.; ROUSSET, B.; WEISS, R.; TROUILLAS, J.; SAMARUT, J. Different functions for the thyroid hormone receptors TR α and TR β in the control of thyroid hormone production and post-natal development. **EMBO. J.**, v. 18, n. 3, p. 623-631, 1999.

GIMENO, R. E.; DEMBSKI, M.; WENG, X.; DENG, N.; SHYIAN, A. W.; GIMENO, C. J.; IRIS, F.; ELLIS, S. J.; WOOLF, E. A.; TARTAGLIA, L. A. Cloning and characterization of an uncoupling protein homolog. A potential molecular mediator of human thermogenesis. **Diabetes**, v. 46, p. 900-906, 1997.

GINSBERG, A. M.; CLUTTER, W. E.; SHAH, S. D.; CRYER, P. E. Triiodothyronine-induced thyrotoxicosis increases mononuclear leukocyte beta-adrenergic receptor density in man. **J. Clin. Invest.**, v. 67, n. 6, p. 1785-1791, 1981.

GNONI, G. V.; LANDRISCINA, C.; QUAGLIARIELLO, E. Fatty acid biosynthesis in adipose tissue and lung subcellular fractions of thyrotoxic rats. **FEBS Lett.**, V. 122, n. 1, p. 37-40, 1980.

GOLAY, A.; SWISLOCKI, A. L. M.; CHEN, Y-DI. Relationships between plasma-free fatty acid concentration, endogenous glucose production, and fasting hyperglycemia in normal and non-insulin-dependent diabetic individuals. **Metabolism**, v. 36, p. 692-696, 1987.

GONG, D. W.; MONEMDJOU, S.; GAVRILOVA, O.; LEON, L. R.; MARCUS-SAMUELS, B.; CHOU, C. J.; EVERETT, C.; KOZAK, L. P.; LI, C.; DENG, C.; HARPER, M. E.; REITMAN, M. L. Lack of obesity and normal response to fasting and thyroid hormone in mice lacking uncoupling protein-3. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 16251-16257, 2000.

GORDON, C. J. **Temperature regulation in laboratory rodents**. New York: Cambridge Univ. Press, 1993. 296p.

GÖTHE, S.; WANG, Z.; Ng, L.; KINDBLOM, J. M.; BARROS, A. C.; OHLSSON, C.; VENNSTRÖM, B.; FORREST, D. Mice devoid of all known thyroid hormone receptors are viable but exhibit disorders of the pituitary-thyroid axis, growth, and bone maturation. **Genes Dev.**, v. 13, n. 10, p. 1329-1341, 1999.

GRAETTINGER, J. S.; MUENSTER, J. J.; SELVERSTONE, L. A.; CAMPBELL, L. A. A correlation of clinical and hemodynamic studies in patients with hyperthyroidism with and without congestive heart failure. **J Clin Invest.**, v. 38, n. 8, p. 1316-1327, 1959.

GROVER, G. J.; MELLSTROM, K.; YE, L.; MALM, J.; LI, Y.; BLADH, L. G.; SLEPH, P. G.; SMITH, M. A.; GEOGE, R.; VENNSTROM, B.; MOOKHTIAR, K. P. G.; HORVARTH, R.; SPEELMAN, J.; BAXTER, J. D. Selective thyroid hormone receptor β activation: a strategy for reduction of weight, cholesterol, and Lp(a) with reduced cardiovascular liability. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 100, n. 17, p. 1067-1072, 2003.

GROVER, G. J.; EGAN, D. M.; SLEPH, P. G.; BEEHLER, B. C.; CHIELLINI, G.; NGUYEN, N. H.; BAXTER, J. D.; SCANLAN, T. S. Effects of the thyroid hormone receptor agonist GC-1 on metabolic rate and cholesterol in rats and primates: selective actions relative to 3,5,3'-triiodo-L-thyronine. **Endocrinology**, v. 145, n. 4, p. 1656-1661, 2004.

GROVER, G. J.; MELLSTROM, K.; MALM, J. Development of the thyroid hormone receptor beta-subtype agonist KB-141: a strategy for body weight reduction and lipid lowering with minimal cardiac side effects. **Cardiovasc. Drug Rev.**, v. 23, n. 2, p. 133-148, 2005.

GUPTA, M. P. Factors controlling cardiac myosin-isoform shift during hypertrophy and heart failure. **J. Mol. Cell Cardiol.**, v. 43, n. 4, p. 388-403, 2007.

GURNEY, A. L.; PARK, E. A.; GIRALT, M.; MC GRANE, M. M.; PATEL, Y. M.; CRAWFORD, D. R.; NIZIELSKI, S. E.; SAVON, S.; HANSON, R. W. Metabolic regulation of gene transcription. **J. Nutr.**, v. 124, Suppl. 8, , p. S1533-S1539, 1994.

HAGENFELDT, L.; WENNLUND, A.; FELIG, P.; WAHREN, J. Turnover and splanchnic metabolism of free fatty acids in hyperthyroid patients. **J. Clin. Invest.**, v. 67, p. 1672-1677, 1981.

HANSSON, P.; VALDEMARSSON, S.; NILSSON-EHLE, P. Experimental hyperthyroidism in man: effects on plasma lipoproteins, lipoprotein lipase and hepatic lipase. **Horm. Metab. Res.**, v. 15, n. 9, p. 449-452, 1983.

HANSEN, P. A.; HAN, D. H.; MARSHALL, B. A.; NOLTE, L. A.; CHEN, M. M.; MUECKLER, M.; HOLLOSZY, J. O. A high fat diet impairs stimulation of glucose transport in muscle. Functional evaluation of potential mechanisms. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 40, p. 26157-26163, 1998.

HANSON, R. W.; GARBER, A. J. Phosphoenolpyruvate carboxikinase. I. Its role in gluconeogenesis. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 25, n. 10, p. 1010-1021, 1972.

HARBER, R. S.; LOEB, J. N. Early enhancement of passive potassium efflux from rat liver by thyroid hormone: relation to induction of Na, K-ATPase. **Endocrinology**, v. 115, n. 1, p. 291-297, 1984.

HARBER, R. S.; LOEB, J. N. Stimulation of potassium efflux in rat liver by a low dose of thyroid hormone: evidence for enhanced cation permeability in the absence of Na,K-ATPase induction. **Endocrinology**, v. 118, n. 1, p. 207-211, 1986.

HARBER, R. S.; LOEB, J. N. Selective induction of high-ouabain-affinity isoform of Na⁺-K⁺-ATPase by thyroid hormone. **Am. J. Physiol.**, v. 255, n. 6, pt. 1, p. E912-E919, 1988.

HARVEY, C. B.; DUNCAN BASSET, J. H.; MARUVADA, P.; YEN, P. M.; WILLIAMS, G. R. The rat thyroid hormone receptor (TR) $\Delta\beta 3$ displays cell-, TR isoform and thyroid hormone response element-specific actions. **Endocrinology**, v. 148, n. 4, p. 1764–1773, 2007.

HEATON, G. M.; WAGENVOORD, R. J.; KEMP, A. Jr.; NICHOLLS, D. G. Brown-adipose-tissue mitochondria: photoaffinity labelling of the regulatory site of energy dissipation. **Eur. J. Biochem.**, v. 82, n. 2, p. 515-521, 1978.

HEIMBERG, M.; OLUBADEWO, J. O.; WILCOX, H. G. Plasma lipoproteins and regulation of hepatic metabolism of fatty acids in altered thyroid states. **Endocr Rev.**, v. 6, n. 4, p. 590-607, 1985.

HELLSTRÖM, L.; WAHRENBERG, H.; REYNISDOTIR, S.; ARNER, P. Catecholamine-induced adipocyte lipolysis in human hyperthyroidism. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 82, n. 1, p. 159-166, 1997.

HERNÁNDEZ, A.; OBREGÓN, M. J. Triiodothyronine amplifies the adrenergic stimulation of uncoupling protein expression in rat brown adipocytes. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 278, n. 5, p. E769-E777, 2000.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGIL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, n. 5091, p. 87-91, 1993.

HOTAMISLIGIL, G. S.; BUDAVARI, A.; MURRAY, D.; SPIEGELMAN, B. M. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor- α . **J. Clin. Invest.**, v. 94, n. 4, p. 1543-1549, 1994.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SPIEGELMAN, B. M. Tumor necrosis factor α : a key component of the obesity-diabetes link. **Diabetes**, v. 43, n. 11, p. 1271-1278, 1994.

HOTAMISLIGIL, G. S.; ARNER, P.; CARO, J. F.; ATKINSON, R. L.; SPIEGELMAN, B. M. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. **J Clin Invest.**, v. 95, n. 5, p. 2409-2415, 1995.

HUANG, P. L. A comprehensive definition for metabolic syndrome. **Dis. Model. Mech.**, v. 2, n. 5-6, p. 231-237, 2009.

ICHIKI, T. Thyroid hormone and atherosclerosis. **Vascul. Pharmacol.**, 2009, In press.

IKEMOTO, S.; THOMPSON, K. S.; TAKAHASHI, M. ITAKURA, H.; LANE, M. D. A.; EZAKI, O. High fat diet-induced hyperglycemia: prevention by low level expression of a glucose transporter (GLUT4) minigene in transgenic mice (insulin resistance/type 2 diabetes). **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 92, n. 8, p. 3096-3099, 1995.

INOUCHI, T.; LI, P.; UMEDA, F.; YU, H. Y.; KAKIMOTO, M.; IMAMURA, M.; AOKI, T.; ETOH, T.; HASHIMOTO, T.; NARUSE, M.; SANO, H.; UTSUMI, H.; NAWATA, H. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. **Diabetes**, v. 49, n. 11, p. 1939-1945, 2000.

IOSSA, S.; LIONETT, L.; MOLICA, M. P.; CRESCENZO, R.; BARLETTA, A.; LIVERINI, G. Fat balance and serum leptin concentration in normal, hypothyroid and hyperthyroid rats. **Int. J. Obes.**, v. 24, p. 417-425, 2001.

ITO, M.; TAKAMATSU, J.; MATSUO, T.; KAMEOKA, K.; KUBOTA, S.; FUKATA, S.; TAMAI, H.; MIYAUCHI, A.; KUMA, K.; HANAFUSA, T. Serum concentrations of remnant-like particles in hypothyroid patients before and after thyroxine replacement. **Clin. Endocrinol.**, v. 58, n. 5, p. 621-626, 2003.

JANSEN, M. S.; COOK, G. A.; SONG, S.; PARK, E. A. Thyroid hormone regulates carnitine palmitoyltransferase I alpha gene expression through elements in the promoter and first intron. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 45, p. 34989-34997, 2000.

JIAO, K.; LIU, H.; CHEN, J.; TIAN, D.; HOU, J.; KAYE, A. D. Roles of plasma interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha and FFA and TG in the development of insulin resistance induced by high-fat diet. **Cytokine**, v. 42, n. 2, p. 161-169, 2008.

JO, J.; GAVRILOVA, O.; PACK, S.; JOU, W.; MULLEN, S.; SUMNER, A. E.; CUSHMAN, S. W.; PERIWAL, V. Hypertrophy and/or hyperplasia: dynamics of adipose tissue growth. **PLoS Comput Biol.**, v. 5, n. 3, p. 1-11, 2009.

JOHANSSON, L.; RUDLING, M.; SCANLAN, T. S.; LUNDASEN, T.; WEBB, P.; BAXTER, J.; ANGELIN, B.; PERINI, 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. 10297-10302, 2005.

JOHNSON, P. R.; STERN, J. S.; GREENWOOD, M. R. C.; ZUCKER, L. M.; HIRSCH, J. Effect of early nutrition on adipose cellularity and pancreatic insulin release in the Zucker rat. **J. Nutr.**, v. 103, p. 738-743, 1973.

KAHN, B. B. Dietary regulation of glucose transporter gene expression: tissue specific effects in adipose cells and muscle. **J. Nutr.**, v. 124, Suppl. 8, p. 1289S-1295S, 1994.

KELLEY, D. E.; MOKAN, M.; SIMONEAU, J. A.; MANDARINO, L. J. Interaction between glucose and free fatty acid metabolism in human skeletal muscle. **J. Clin. Invest.**, v. 92, n. 1, p. 91-98, 1993.

KENNEDY, G. C. The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. **Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 140, n. 901, p. 578-596, 1953.

KERR, J. F.; GOBÉ, G. C.; WINTWRFORD, C. M.; HARMON, B. V. Anatomical methods in cell death. **Meth Cell Biol.**, v. 46, p. 1-27, 1995.

KIM, B. Thyroid hormone as a determinant of energy expenditure and the basal metabolic rate. **Thyroid**, v. 18, n. 2, p. 141-144, 2008.

KING, B. M. The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight. **Physiol. Behav.**, v. 87, p. 221-244, 2006.

KLEIN, I.; OJAMAA, K. Thyroid hormone-targeting the heart. **Endocrinology**, v. 142, n. 1, p. 11-12, 2001a.

KLEIN, I.; OJAMAA, K. Thyroid hormone and the cardiovascular system. **N. Engl. J. Med.**, v. 344, n. 7, p. 501-509, 2001b.

KNITTLE, J. L.; HIRSCH, J. Effect of early nutrition on the development of rat epididymal pads: cellularity and metabolism. **J. Clin. Invest.**, v. 47, p. 2091-2098, 1968.

KORTELAJINEN, M. L.; PELLETIER, G.; RICQUIER, D.; BUKOWIECKI, L. J. Immunohistochemical detection of human brown adipose tissue uncoupling protein in an autopsy series. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 41, p. 759-764, 1993.

KOTRONEN, A.; YKI-JÄRVINEN, H. Fatty liver: a novel component of the metabolic syndrome. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 28, n. 1, p. 27-38, 2008.

KOVACKS, P.; STUMVOLL, M. Fatty acids and insulin resistance in muscle and liver. **Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 19, n. 4, p. 625-635, 2005.

KROTKIEWSKI, M. Thyroid hormones in the pathogenesis and treatment of obesity. **Euro. J. Pharmacol.**, v. 440, p. 85-98, 2002.

KUSUNOKI M.; STORLIEN, L. H.; MACDESSI, J.; OAKES, N. D.; KENNEDY C.; CHISHOLM, D. J.; KRAEGEN, E. W. Muscle glucose uptake during and after exercise is normal in insulin-resistant rats. **Am. J. Physiol.**, v. 264, n. 2, pt. 1, p. E167-E172, 1993.

LAZAR, M. A. Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. **Endocr. Rev.**, v. 14, n. 2, p. 184-193, 1993.

LESLIE, J. G.; HENNEMANN, G. Thyroid disease manager: the thyroid and its disease. **Philadelphia; Saunders**, 2002. 793p.

LIEBIG, M.; VON PRAUN, C.; HELDMAIER, G.; KLINGENSPOR, M. Absence of UCP3 in brown adipose tissue does not impair nonshivering thermogenesis. **Physiol. Biochem. Zool.**, v. 77, n. 1, p. 116-126, 2004.

LÖNN, L.; STENLÖF, K.; OTTOSSON, M.; LINDROOS, A. K.; NYSTRÖM, E.; SJÖSTRÖM, L. Body weight and body composition changes after treatment of hyperthyroidism. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 83, n. 12, p. 4269-4273, 1998.

LOWELL, B. B.; BACHMAN, E. S. Beta-Adrenergic receptors, diet-induced thermogenesis, and obesity. **J Biol Chem.**, v. 278, n. 32, p. 29385- 29388, 2003.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MACLELLAN, J. D.; GERRITS, M. F.; GOWING, A.; SMITH, P. J.; WHEELER, M. B.; HARPER, M. E. Physiological increases in uncoupling protein 3 augment fatty acid oxidation and decrease reactive oxygen species production without uncoupling respiration in muscle cells. **Diabetes**, v. 54, n. 8, p. 2343-2350, 2005.

MAGNI, P. DOZIO, E.; RUSCICA, M.; CELOTTI, F.; MASINI, M. A.; PRATO, P.; BROCCOLI, M.; MAMBRO, A.; MORÉ, M.; STROLLO, F. Feeding behavior in mammals including humans. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.1163, p. 221-232, 2009.

MAGNUS-LEVY, A. Den respiratorischen Gaswechsel unter Einfluss de Thyroidea so wie unter verschiedenen pathologische Zustand. **Berlin Klin. Wochschr.**, v. 32, p. 650–652, 1895.

MALBON, C. C.; MORENO, F. J.; CABELLI, R. J.; FAIN, J. N. Fat cell adenylate cyclase and beta-adrenergic receptors in altered thyroid states. **J. Biol. Chem.**, v. 253, n. 3, p. 671-678, 1978.

MANCINI, M. C.; HALPERN, A. Orlistat in the prevention of diabetes in the obese patient. **Vasc. Health. Risk Manag.**, v. 4, n. 2, p. 325-336, 2008.

MASAKI, T.; YOSHIMATSU, H.; SAKATA, T. Expression of rat uncoupling protein family mRNA levels by chronic treatment with thyroid hormone. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 24, Suppl. 2, p. S162-S164, 2000.

MC GARRY, J. D.; BROWN, N. F.; INTHANOUSAY, P. P.; PARK, D. I.; COOK, B. A.; FOSTER, D. W. Insights into the topography of mitochondrial carnitine palmitoyltransferase gained from the use of proteases. **Prog. Clin. Biol. Res.**, v. 375, p. 47-61, 1992.

MILLS, I.; GARCIA-SAINZ, J. A.; FAIN, J. N. Pertussis toxin effects on adenylate cyclase activity, cyclic AMP accumulation and lipolysis in adipocytes from hypothyroid, euthyroid and hyperthyroid rats. **Biochem. Biophys. Acta.**, v. 876, n. 3, p. 619-630, 1986.

MIYABARA, E. H.; AOKI, M. S.; SOARES, A. G.; SALTAO, R. M.; VILICEV, C. M.; PASSARELLI, M.; SCANLAN, T. S.; GOUVEIA, C. H.; MORISCOT, A. S. Thyroid hormone receptor- β -selective agonist GC-24 spares skeletal muscle type I to II fiber shift. **Cell. Tissue Res.**, v. 321, p. 233-241, 2005.

MITROU, P.; BOUTATI, E.; LAMBADIARI, V.; TSEGKA, A.; RAPTIS, A. E.; TOUNTAS, N.; ECONOMOPOULOS, T.; RAPTIS, S. A.; DIMITRIADIS, G. Insulin resistance in hyperthyroidism: the role of IL6 and TNF alpha. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 162, n. 1, p. 121-126, 2010.

MOHAMED-ALI, V.; GOODRICK, S.; RAWESH, A.; KATZ, D. R.; MILES, J. M.; YUDKIN, J. S.; KLEIN, S.; COPPACK, S. W. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 82, n. 12, p. 4196-4200, 1997.

MOLLER, D. E.; FLIER, J. S. Insulin resistance-mechanisms, syndrome, and implications. **N.Engl. J. Med.**, v. 325, p. 938-948, 1991.

MORIMOTO, C.; TSUJITA, T.; OKUDA, H. Antilipolytic actions of insulin on basal and hormone-induced lipolysis in rat adipocytes. **J. Lipid Res.**, v. 39, n. 5, p. 957-962, 1998.

MORKIN, E.; FLINK, I. L.; GOLDMAN, S. Biochemical and physiologic effects of thyroid hormone on cardiac performance. **Prog. Cardiovasc. Dis.**, v. 25, n. 5, p. 435-464, 1983.

MORKIN, E.; LADENSON, P.; GOLDMAN, S.; ADAMSON, C. Thyroid hormone analogs for treatment of hypercholesterolemia and heart failure: past, present and future prospects. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 37, n. 6, p. 1137-1146, 2004.

MOSEKILDE, L.; ERIKSEN, E. F.; CHARLES, P. Effects of thyroid hormone on bone and mineral metabolism. **Endocrinol. Metab. Clin. North Am.**, v. 19, p. 35-63, 1990.

MYNATT, R. L.; PARK, E. A.; THORNGATE, F. E.; DAS, H. K.; COOK, G. A. Changes in carnitine palmitoyltransferase-I mRNA abundance produced by hyperthyroidism and hypothyroidism parallel changes in activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 201, n. 2, p. 932-937, 1994.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: principles of biochemistry**. 4. ed. New York; Freeman, 2005. 1119p.

NIKKILÄ, E. A.; KEKKI, M. Plasma triglyceride metabolism in thyroid disease. **J.Clin. Invest.**, v. 51, n. 82, p. 103-114, 1972.

O'BRIEN, T.; DINNEEN, S. F.; O'BRIEN, P. C.; PALUMBO, P. J. Hyperlipidemia in patients with primary and secondary hypothyroidism. **Mayo Clin. Endocrinol.**, v. 68, p. 860-866, 1990.

OPPENHEIMER, J.H.; SCHWARTZ, H. L. MARIASH, C. N.; KINLAW, W. B.; WONG, N. C.; FRAKE, H. C. Advances in our understanding of thyroid hormone action at the cellular level. **Endocr. Rev.**, v. 8, n. 3, p. 288-308, 1987.

OPPENHEIMER, J. H.; SCHWARTZ, H. L.; LANE, J. T.; THOMPSON, M. P. Functional Relationship of thyroid hormone-induced lipogenesis, lipolysis, and thermogenesis in the rat. **J. Clin. Invest.**, v. 87, p. 125-132, 1991.

PANTOS, C.; MOUROUZIS, I.; MARKAKIS, K.; TSAGOULIS, N.; PANAGIOTOU, M.; COKKINOS, D. V. Long-term thyroid hormone administration reshapes left ventricular chamber and improves cardiac function after myocardial infarction in rats. **Basic. Res. Cardiol.**, v. 103, n. 4, p. 308-318, 2008.

PARK, E. A.; JERDEN, D. C.; BAHOUTH, S. W. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxikinase gene transcription by thyroid hormone involves two distinct sites in the promoter. **Biochem. J.**, v. 309, pt. 3, p. 913-919, 1995.

PETROVIC, N.; CVIJIC, G.; DAVIDOVIC, V. Thyroxine and tri-iodothyronine differently affect uncoupling protein-1 content and antioxidant enzyme activities in rat interscapular brown adipose tissue. **J. Endocrinol.**, v. 176, n. 1, p. 31-38, 2003.

PETTY, K. J.; DESVERGNE, B.; MITSUASHI, T.; NIKODEM, V. M. Identification of a thyroid hormone response element in the malic enzyme gene. **J. Biol. Chem.**, v. 265, n. 13, p. 7395-7400, 1990.

PRACYK, J. B.; SLOTKIN, T. A. Thyroid hormone regulates ontogeny of beta adrenergic receptors and adenylate cyclase in rat heart and kidney: effects of propylthiouracil-induced perinatal hypothyroidism. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 261, n. 3, p. 951-958, 1992.

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. 27533-27543, 2005.

PUHAKAINEN, I.; KOIVISTO, V.; YKI-JARVINEN, H. Lipolysis and gluconeogenesis from glycerol are increased in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 75, p. 789-794, 1992.

RAGHEB, R.; SHANAB, A.; MEDHAT, A. M.; SEOUDI, D. M.; ADELI, K.; FANTUS, I. G. Free fatty acid-induced muscle insulin resistance and glucose uptake dysfunction: Evidence for PKC activation and oxidative stress-activated signaling pathways. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 389, n. 2, p. 211-216, 2009.

RANDLE, P. J.; GARLAND, P. B.; HALES, C. N.; NEWSHOLME, E. A. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. **Lancet.**, v. 1, n. 7285, p. 785-789, 1963.

RANDLE, P. J.; PRIESTMAN, D. A.; MISTRY, S. C.; HALSALL, A. Glucose fatty acid interactions and the regulation of glucose disposal. **J. Cell Biochem.**, v. 55, Suppl:1-11, 1994

RIBEIRO, M. O.; CARVALHO, S. D.; SCHULTZ, J.; CHIELLINI, G.; SCANLAN, T.; BIANCO, A. C.; BRENT, G. Thyroid hormone – sympathetic interaction and adaptative thermogenesis are thyroid hormone receptor isoform-specific. **J. Clin. Invest.**, v. 18, p. 97-105, 2001.

RICHARD, D.; RIVEST, R.; HUANG, Q.; BOULLILAUD, F.; SANCHIS, D.; CHAMPGNY, O.; RICQUIER, D. Distribution of the uncoupling protein 2 mRNA in the mouse brain. **J. Comp. Neurol.**, v. 397, p. 549–560, 1998.

RIIS AL, GRAVHOLT CH, DJURHUUS CB, NØRRELUND H, JØRGENSEN JO, WEEKE J, MØLLER N. Elevated regional lipolysis in hyperthyroidism. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 87, n. 10, p. 4747-4753, 2002.

RIIS, A.L.D.; JØRGENSEN, J.O.L.; GJEDDE, S.; NØRRELUND, H.; JURIK, A.G.; NAIR, K.S.; IVARSEN, P.; WEEKE, J; MØLLER, N. Whole body and forearm substrate metabolism in hyperthyroidism: evidence of increased basal muscle protein breakdown. **Am J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 288, n. 6, p. E1067-E1073, 2005.

RIIS, A. L.; JØRGENSEN, J. O.; IVARSEN, P.; FRYSTYK, J.; WEEKE, J.; MØLLER, N. Increased protein turnover and proteolysis is an early and primary feature of short-term experimental hyperthyroidism in healthy women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 93, n. 10, p. 3999-4005, 2008.

ROOYACKERS, O. E.; NAIR, K. S. Hormonal regulation of human muscle protein metabolism. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 17, p. 457-485, 1997.

ROSHOLT, M. N.; KING, P. A.; HORTON, E. S. High-fat diet reduces glucose transporter responses to both insulin and exercise **Am J Physiol.**, v. 266, n. 1, pt. 2, p. R95-R101, 1994.

ROSS, D. S. Hyperthyroidism, thyroid hormone therapy, and bone. **Thyroid**, v. 4, p. 319-326, 1994.

ROTHWELL, N. J.; STOCK, M. J. A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. **Nature**, v. 281, n. 5726, p. 31-35. 1979.

ROTHWELL, N. J.; SAVILLE, M. E.; STOCK, M. J.; WYLLIE, M. G. Influence of thyroid hormone on diet-induced thermogenesis in the rat. **Horm. Metab Res.**, v.15, n. 8, p. 394-398, 1983.

ROTHWELL, N. J.; STOCK, M. J.; SUDERA, D. K. Changes in adrenoreceptor density in brown adipose tissue from hyperthyroid rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 114, n. 2, p. 227-229, 1985.

ROTHWELL, N. J. Central control of brown adipose tissue. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 48, p. 197-206, 1989.

RUBIO, A.; RAASMAJA, A.; MAIA, A. L.; KIM, K.; SILVA, J. E. Effects of thyroid hormone on norepinephrine signalling in brown adipose tissue. I: β_1 - and β_2 -adrenergic receptors and cyclic adenosine monophosphate generation. **Endocrinology**, v. 136, p. 3267-3276, 1995a.

RUBIO, A.; RAASMAJA, A.; SILVA, J.E. Thyroid hormone and norepinephrine signaling in brown adipose tissue. II: Differential effects of thyroid hormone on β_3 -adrenergic receptors in brown and white adipose tissue. **Endocrinology**, v. 136, p. 3277-3284, 1995b

SALVI, M.; PEDRAZZONI, M.; GIRASOLE, G.; GIULIANI, N.; MINELLI, R.; WALL, J. R.; ROTI, E. Serum concentrations of proinflammatory cytokines in Graves' disease: effect of treatment, thyroid function, ophthalmopathy and cigarette smoking. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 143, p. 197-202, 2000.

SCHNEIDER, M. J.; FIERING, S. N.; THAI, B.; WU, S. Y.; ST GERMAIN, E.; PARLOW, A. F.; ST GERMAIN, D. L.; GALTON, V. A. Targeted disruption of the type 1 selenodeiodinase gene (Dio1) results in marked changes in thyroid hormone economy in mice. **Endocrinology**, v. 147, n. 1, p. 580-589, 2006.

SCHRIER, R. W. Body water homeostasis: clinical disorders of urinary dilution and concentration. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 17, n. 7, p. 1820-1832, 2006.

SCHWARTZ, H. L.; STRAIT, K. A.; LING, N. C.; OPPENHEIMER, J. H. Quantitation of rat tissue thyroid hormone binding receptor isoforms by immunoprecipitation of nuclear triiodothyronine binding capacity. **J Biol Chem.**, v. 267, n. 17, p. 11794-11799, 1992.

SENTURK, T.; KOZACI, L. D.; KOK F.; KADIKOYLU, G.; BOLAMAN, Z. Proinflammatory cytokines levels in hyperthyroidism. **Clin. Invest. Med.**, v. 26, p. 58-63, 2003.

SETHI, J. K.; HOTAMISLIGIL, G. S. The role of TNF- α in adipocyte metabolism. **Cell Develop. Biol.**, v. 10, n. 1, p. 19-29, 1999.

SHEEHAN, M. T.; JENSEN, M. D. Metabolic complications of obesity. Pathophysiologic considerations. **Med. Clin. North Am.**, v. 84, n. 2, p. 363-385, 2000.

SHIBATA, H.; BUKOWIECKI, L. J. Regulatory alterations of daily energy expenditure induced by fasting or overfeeding in unrestrained rats. **J. Appl. Physiol.**, v. 63, n. 2, p. 465-470, 1987.

SHIMIZU, Y.; SHIMAZU, T. Thyroid hormone augments GLUT4 expression and insulin-sensitive glucose transport system in differentiating rat brown adipocytes in culture. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 64, n. 8, p. 677-681, 2002.

SILVA, J. E.; LARSEN, P. R. Adrenergic activation of triiodothyronine production in brown adipose tissue. **Nature**, v. 305, n. 5936, p. 712-713, 1983.

SILVA, J. E.; LARSEN, P. R. Potential of brown adipose tissue type II thyroxine 5'-deiodinase as a local and systemic source of triiodothyronine in rats. **J. Clin. Invest.**, v. 76, n. 6, p. 2296-2305, 1985.

SILVA, J. E. Thyroid hormone control of thermogenesis and energy balance. **Thyroid**, v. 5, p. 481-492, 1995.

SILVA, J. E. Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. **Physiol. Rev.**, v. 86, n. 2, p. 435-464, 2006.

SIMS, E. A.; DANFORTH, E. JR. Expenditure and storage of energy in man. **J. Clin. Invest.**, v. 79, n. 4, p. 1019-1025, 1987.

SPRAGUE, J. E.; YANG, X.; SOMMERS, J.; GILMAN, T. L.; MILLS, E. M. Roles of norepinephrine, free Fatty acids, thyroid status, and skeletal muscle uncoupling protein 3 expression in sympathomimetic-induced thermogenesis. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 320, n. 1, p. 274-280, 2007.

STAMP, T. C.; DOAR, J. W.; WYNN, V. Observations on some effects of L-triiodothyronine on carbohydrate and lipid metabolism in man. **J. Clin. Pathol.**, v. 22, n. 2, p. 132-5, 1969.

STOCK, M. J.; ROTHWELL, N. J. The role of brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. **Int. J. Vitam. Nutr. Res.**, v. 56, n. 2, p. 205-210, 1986.

STURKENBOOM, M. G.; FRANSSEN, E. J.; BERKHOF, J.; HOEKSTRA, O. S. Physiological uptake of [18F] fludeoxyglucose in the neck and upper chest region: are there predictive characteristics? **Nucl. Med. Commun.**, v. 25, p. 1109-1111, 2004.

SUNDIN, U.; MILLS, I.; FAIN, J. N. Thyroid-catecholamine interactions in isolated rat brown adipocytes. **Metabolism**, v. 33, n. 11, p. 1028-1033, 1984.

TAN, K. C.; SHIU, S. W.; KUNG, A. W. Effect of thyroid dysfunction on high-density lipoprotein subfraction metabolism: roles of hepatic lipase and cholesteryl ester transfer protein. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 83, n. 8, p. 2921-2924, 1998.

TESSARI, P.; CORACINA, A.; COSMA, A.; TIENGO, A. Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.**, v. 19, n. 4, p. 291-302, 2009.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. **Mol. Med.**, v. 14, n. 3-4, p. 222-231, 2008.

TORRANCE, C. J.; DEVENTE, J. E.; JONES, J. P.; DOHM, G. L. Effects of thyroid hormone on GLUT4 glucose transporter gene expression and NIDDM in rats. **Endocrinology**, v. 138, n. 3, p. 1204-1214, 1997.

TROST, S. U.; SWANSON, E.; GLOSS, B.; WANG-IVERSON, D. B.; ZHANG, H.; VOLODARSKY, T.; GROVER, G. J.; BAXTER, J. D.; CHIELINI, G.; SCANLAN, T. S.; DILLMANN, W. H. The thyroid hormone receptor- β -selective agonist GC-1 differentially affects plasma lipids and cardiac activity. **Endocrinology**, v. 141, n. 9, p. 3057-3064, 2000.

TURNER, N.; BRUCE, C. R.; BEALE, S. M.; HOEHN, K. L.; SO, T.; ROLPH, M. S.; COONEY, G. J. Excess lipid availability increases mitochondrial fatty acid oxidative capacity in muscle: evidence against a role for reduced fatty acid oxidation in lipid-induced insulin resistance in rodents. **Diabetes**, v. 56, n. 8, p. 2085-2092, 2007.

UTZSCHNEIDER, K. M.; KAHN, S. E. The role of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 91, n. 12, p. 4753-4761, 2006.

UYSAL, K. T.; WIESBROCK, S. M.; MARINO, M. W.; HOTAMISLIGIL, G. S. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. **Nature**, v. 389, n. 6651, p. 610-614, 1997.

VIDAL-PUIG, A.; SOLANES, G.; GRUJIC, D.; FLIER, J. S.; LOWELL, B. B. UCP3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 235, p. 79-82, 1997.

VILLICEV, C. M.; FREITAS, F. R.; AOKI, M. S.; TAFFAREL, C.; SCANLAN, T. S.; MORISCOT, A. S.; RIBEIRO, M. O.; BIANCO, A. C.; GOUVEIA, C. H. Thyroid hormone beta-specific agonist GC-1 increases energy expenditure and prevents fat-mass accumulation in rats. **J. Endocrinol.**, v. 193, n. 1, p. 21-29, 2007.

VON RECKLINGHAUSEN, F. D. Die fibrose oder deformierende ostitis, die osteomalazie und die osteoplastische carzinose in ihren gegenseitigen beziehungen.[Osteitis fibrosa or deformans, osteomalacia and osteoplastic carcinosis in their relationships.] Berlin: George Reimer; 1891, [s. pag]

WAHRENBERG, H.; WENNLUND, A.; ARNER, P. Adrenergic regulation of lipolysis in fat cells from hyperthyroid and hypothyroid patients. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 78, n. 4, p. 898-903, 1994.

WAHRENBERG, H.; WENNLUND, A.; HOFFSTEDT, J. Increased adipose tissue secretion of interleukin-6, but not of leptin, plasminogen activator inhibitor-1 or tumor necrosis factor alpha, in Graves' hyperthyroidism. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 146, p. 607–611, 2002.

WALLENIUS, V.; WALLENIUS, K.; AHRÉN, B.; RUDLING, M.; CARLSTEN, H.; DICKSON, S. L.; OHLSSON, C.; JANSSON, J. O. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. **Nat. Med.**, v. 8, n. 1, p. 75-79, 2002.

WANG, W.; LI, C.; SUMMER, S. N.; FALK, S.; SCHRIER, R. W. Polyuria of thyrotoxicosis: downregulation of aquaporin water channels and increased solute excretion. **Kidney Int.**, v. 72, n. 9, p. 1088-1094, 2007.

WANG, S.; SONI, K. G.; SEMACHE, M.; CASAVANT, S.; FORTIER, M.; PAN, L.; MITCHELL, G. A. Lipolysis and the integrated physiology of lipid energy metabolism. **Mol. Genet. Metab.**, v. 95, n. 3, p. 117-126, 2008.

WARNE, S. P. Tumor necrosis factor alpha: a key regulator of adipose tissue mass. **J. Endocrinol.**, v. 177, n. 3, p. 351-355, 2003.

WEINSTEIN, S. P.; WATTS, J.; HABER, R. S. Thyroid hormone increases muscle/fat glucose transporter gene expression in rat skeletal muscle. **Endocrinology**, v. 129, n. 1, p. 455-464, 1991.

WEINSTEIN, S. P.; O'BOYLE, E.; HABER, R. S. Thyroid hormone increases basal and insulin-stimulated glucose transport in skeletal muscle. **Diabetes**, v. 43, p. 1185–1189, 1994.

WEITZEL J. M.; RADTKE, C.; SEITZ, H. J. Two thyroid hormone-mediated gene expression patterns in vivo identified by cDNA expression arrays in rat. **Nucleic Acids Res.**, v. 29, n. 24, p. 5148-5155, 2001.

WESTERTERP-PLANTENGA, M. S. Fat intake and energy balance effects. **Physiol. Behavior.**, v. 83, p. 579-585, 2004.

WIKSTRÖM, L.; JOHANSSON, C.; SALTÓ, C.; BARLOW, C.; CAMPOS-BARROS, A.; BAAS, F.; FORREST, D.; THORÉN, P.; VENNSTRÖM; B. Abnormal heart rate and body temperature in mice lacking thyroid hormone receptor alpha 1. **EMBO, J.**, v. 17, n. 2, p. 455-461, 1998.

WILES, C. M.; YOUNG, A.; JONES, D. A.; EDWARDS, R. H. Muscle relaxation rate, fiber-type composition and energy turnover in hyper- and hypo-thyroid patients. **Clin. Sci.**, v. 57, n. 4, p. 375-384, 1979.

WILLIAMS, G. R. Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor β isoforms. **Mol. Cell. Biol.**, v. 20, n. 22, p. 8329–8342, 2000.

WILLIAMS, G. R. Actions of thyroid hormones in bone. **Endokrynol. Pol.**, v. 60, n. 5, p. 380-388, 2009.

WITHERS, P. C. Metabolic, respiratory and haematological adjustments of the little pocket mouse to circadian torpor cycles. **Respir. Physiol.**, v. 31, n. 3, p. 295-307, 1977.

WILLIAMSON, J. R.; BROWNING, E. T.; SCHOLZ, R. Control mechanisms of gluconeogenesis and ketogenesis. **J. Biol. Chem.**, v. 244, p. 4607-4616, 1969.

World Health Organization. Definition, diagnosis and classification of Diabetes Mellitus and its complications. report of a WHO consultation. Geneva: World Health Organization 1999. [s.pag.]

WOZNIAK, S. E.; GEE, L. L.; WACHTEL, M. S.; FREZZA, E. E. Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article. **Dig. Dis. Sci.**, v.54, n. 9, p. 1847-1856, 2009.

XIONG, S.; CHIRALA, S. S.; HSU, M. H.; WAKIL, S. J. Identification of thyroid hormone response elements in the human fatty acid synthase promoter. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 95, n. 21, p. 12260-12265, 1998.

YUAN, G.; AL-SHALI, K. Z.; HEGELE, R. A. Hypertriglyceridemia: its etiology, effects and treatment. **CMAJ.**, v. 176, n. 8, p. 1113-1120, 2007.

ZABROCKA, L.; KLIMEK, J.; SWIERCZYNSKI, J. Pharmacological doses of triiodothyronine upregulate lipogenic enzyme gene expression in rat white adipose tissue. **Horm. Metab. Res.**, v. 38, n. 2, p. 63-68, 2006.

ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L.; FRIEDMAN, J. M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, n. 6505, p. 425-432, 1994.

ZHANG, Y.; YIN, L.; HILLGARTNER, F. B. Thyroid hormone stimulates acetyl coA carboxylase- α transcription in hepatocytes by modulating the composition of nuclear receptor complexes bound to a thyroid hormone response element. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 2, p. 974-983, 2001.

ZHANG, Y.; MA, K.; SONG, S.; ELAM, M. B.; COOK, G. A.; PARK, E. A. Peroxisomal proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α) enhances the thyroid hormone induction of carnitine palmitoyltransferase I (CPT-1 α). **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 52, p. 53963-53971, 2004.

ZIERATH, J. R.; HOUSEKNECHT, K. L. GNUDI, L.; KAHN, B. B. High-fat feeding impairs insulin-stimulated GLUT4 recruitment via an early insulin-signaling defect. **Diabetes**, v. 46, n. 2, p. 215-23, 1997.

ZIMMET, P.; ALBERT, K. G. M. M. ; SERRANO RIOS , M. A New International Diabetes Federation Definition of the metabolic Syndrome: The rationale and the results. **Rev. Esp. Cardiol.**, v. 58, n. 12, p. 1371-1376, 2005.