

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

Juliana Tonietto Domingues

**EFEITOS NEUROQUÍMICOS, HISTOLÓGICOS E
FUNCIONAIS DO HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO E DO T₃
REVERSO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE RATOS EM
DESENVOLVIMENTO**

Florianópolis
2018

**EFEITOS NEUROQUÍMICOS, HISTOLÓGICOS E
FUNCIONAIS DO HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO E DO T₃
REVERSO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE RATOS EM
DESENVOLVIMENTO**

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Doutor em Bioquímica
Orientador: Prof^a. Dr^a. Ariane
Zamoner Pacheco de Souza

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Domingues, Juliana Tonietto
EFEITOS NEUROQUÍMICOS, HISTOLÓGICOS E FUNCIONAIS
DO HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO E DO T3 REVERSO NO
SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE RATOS EM DESENVOLVIMENTO
/ Juliana Tonietto Domingues ; orientador, Ariane
Zamoner Pacheco de Souza, 2018.
178 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

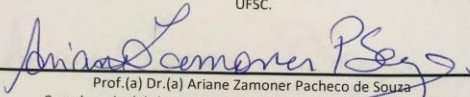
1. Bioquímica. 2. Hipotireoidismo. 3. T3r. 4.
Sistema glutamatérgico. 5. Estresse oxidativo. I.
Zamoner Pacheco de Souza, Ariane . II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação
em Bioquímica. III. Título.

"Efeitos neuroquímicos, histológicos e funcionais do hipotireoidismo congênito e do T₃ reverso no sistema nervoso central de ratos em desenvolvimento"

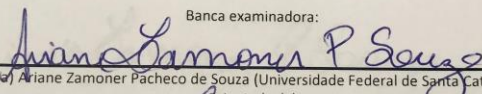
Por

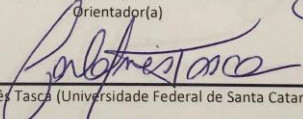
Juliana Tonietto Domingues

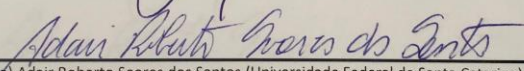
Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (003/2018/PPGBQA) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC.

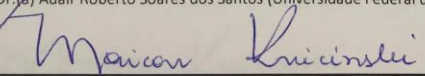

Prof.(a) Dr.(a) Ariane Zamoner Pacheco de Souza
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Banca examinadora:


Dr.(a) Ariane Zamoner Pacheco de Souza (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)


Dr.(a) Carla Inês Tasca (Universidade Federal de Santa Catarina)


Dr.(a) Adair Roberto Soares dos Santos (Universidade Federal de Santa Catarina)


Dr.(a) Maicon Roberto Kvicinski (Universidade do Sul de Santa Catarina)

Florianópolis, 27 de fevereiro de 2018.

Dedico esta tese ao meu amado e saudoso pai Josmar e a minha querida mãe Beloni, pela vida e formação que me deram.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Josmar e Beloni, pelo amor e carinho incondicionais, e ao meu querido irmão Guilherme por sempre acreditar nos meus sonhos e caminhar ao meu lado.

À minha querida amiga e orientadora, Profa. Dra. Ariane Zamoner Pacheco de Souza, pela paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a execução e conclusão desta tese, e por todo suporte, confiança, aprendizado, atenção e tempo dedicado a mim.

Aos pesquisadores, Profa. Dra. Fátima R. Barreto Silva, Profa. Dra. Regina Pessoa-Pureur, Profa. Dra. Elisa Winkelmann-Duarte, Dra. Paula Pierozan, Prof. Dr. Márcio Dutra, Prof. Dr. Guilherme Razzera Maciel, Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho, pela colaboração no desenvolvimento desta tese.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica Experimental e Sinalização Celular (LaBioSignal), Patrícia A. Cesconetto, Daiane Cattani, Alessandra Hellbrugge, Bianka Alzira Nascimento, Eduardo Benedetti Parisotto, Bárbara Rhan, Carolinne Sayury, Nicolas Gabriel, Vitória C. Hayduck, Natália F. Napolini, Carla E. H. Rieg e Mauren Kruger, pelos momentos de trabalho e descontração e pela amizade.

À minha amiga Dra. Raphaela Desiderio, por todo apoio, por todas as conversas e por acreditar que o ensino, o estudo e a pesquisa, são o melhor caminho a seguir.

Aos meus queridos amigos, Isadora Schumacher Winkler, Kátia Gomes, Rodrigo Brito, Eva Rid, Juliana Garcia de Castro, Mariana Remus e Daniela Morais, por todo apoio, incentivo, carinho e amizade em todos os momentos.

A todos os funcionários desta universidade que de uma forma ou outra contribuíram para que esta tese fosse realizada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica (PGBQA) por ter oportunizado a realização deste trabalho.

À FAPESC pela bolsa concedida.

Às agências de fomento CAPES, CNPq, FAPESC pelo apoio financeiro.

Por fim, agradeço a todos aqui não mencionados e que de uma maneira ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

“Gam zu le tovah”

(Rabi Nachum Ish Gamzu)

RESUMO

O hipotireoidismo congênito gera uma variedade de alterações neuroquímicas e morfofisiológicas que podem estar relacionadas a déficits cognitivos e falhas no desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC). No presente estudo investigou-se as consequências do hipotireoidismo congênito no córtex cerebral e hipocampo de ratos em desenvolvimento, bem como o possível efeito do hormônio 3,3',5'-triiodo-L-tironina (T_3 reverso; T_{3r}) em reverter as alterações neuroquímicas e morfológicas ocasionadas pela ausência dos hormônios da tireoide (HTs) no hipocampo de ratos de 15 dias de idade. O hipotireoidismo congênito foi induzido com propiltiouracil (PTU) 0,05% na água de beber de ratas Wistar prenas, desde o 8º dia gestacional até os filhotes completarem 15 dias de idade. O córtex cerebral e o hipocampo de ratos eutireoideos e hipotireoideos foram utilizados para investigar possíveis danos no sistema de glutamatérgico e no sistema redox nessas estruturas cerebrais. O estudo foi dividido em 3 partes: i) e ii) capacidade do T_{3r} em recuperar os danos gerados pelo hipotireoidismo no hipocampo de ratos em desenvolvimento; iii) estudo do efeito do hipotireoidismo congênito no córtex cerebral de ratos em desenvolvimento. Nos estudos i e ii demonstrou-se que os danos neuroquímicos induzidos pelo hipotireoidismo congênito em hipocampo de ratos em desenvolvimento podem ser revertidos, pelo menos em parte, pelo tratamento com T_{3r} *ex vivo* (1nM por 30 min) ou *in vivo* (50 ng/Kg por 3 dias consecutivos). O hipotireoidismo levou à alteração no metabolismo do glutamato, bem como, desregulação na fosforilação do citoesqueleto, acúmulo de Ca^{2+} intracelular, indução do estresse oxidativo e redução da densidade de neurônios NeuN positivos em hipocampo de ratos em desenvolvimento. O T_{3r} foi capaz de reverter estes danos tanto após exposição por 30 minutos quanto por 3 dias consecutivos, demonstrando que esse hormônio atua por mecanismos não genômicos rápidos e sustentados em hipocampo de ratos em desenvolvimento. Desta forma fornecemos evidências que o T_{3r} é um metabolito ativo dos HTs e estes resultados representam uma importante contribuição para elucidar o mecanismo de ação não clássico desse metabólito no SNC em desenvolvimento.

Palavras-chave: Hipotireoidismo, T_{3r} , Sistema glutamatérgico, Estresse oxidativo, sistema redox, citoesqueleto.

ABSTRACT

Congenital hypothyroidism is associated with neurochemical and morphophysiological changes within the brain, leading to cognitive deficits and misdevelopment of the central nervous system (CNS). In the present study we investigated the effects of congenital hypothyroidism on the cerebral cortex and hippocampus of developing rats. It was also evaluated the possible effect of the hormone 3,3',5'-triiodo-L-thyronine (reverse T₃; rT₃) in reversing neurochemical and morphological changes caused by the absence of thyroid hormones (THs) in the hippocampus. Congenital hypothyroidism was induced with 0.05% propylthiouracil (PTU) in the drinking water of pregnant Wistar rats, from the 8th gestational day until the offspring completed 15 days of age. The cerebral cortex and hippocampus of euthyroid and hypothyroid rats were used to investigate possible damage to the glutamatergic system and the redox system of developing rats. The study was divided into three parts: i) and ii) ability of rT₃ to restore the hypothyroid-induced cell damage to the hippocampus of developing rats; iii) the histological and neurochemical effects of hypothyroidism in the cerebral cortex of developing rats. Results from studies i and ii have shown that neurochemical damage induced by congenital hypothyroidism in hippocampus of developing rats can be reversed, at least in part, by *ex vivo* and *in vivo* treatment with rT₃. Hypothyroidism leads to intracellular Ca²⁺ accumulation, glutamate excitotoxicity, affects cytoskeletal dynamics, decreases the NeuN-positive neuronal density and induces oxidative stress in hippocampus of developing rats. These results were reverted by rT₃ through non-genomic and sustained mechanisms in the hippocampus of developing rats. Thus, we provide evidence that rT₃ is an active metabolite of THs. These results represent an important contribution to elucidate the non-classical mechanism of action of this metabolite in the developing CNS.

Keywords: Congenital hypothyroidism, rT₃, Glutamatergic system, Oxidative stress, redox system, cytoskeleton.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide e a gestação	35
Figura 2 - Desiodação enzimática dos hormônios da tireoide pelas desiodases.....	36
Figura 3 - Mecanismo clássico de ação dos hormônios da tireoide	38
Figura 4 - Desenvolvimento e maturação da glândula tireoide em ratos	42
Figura 5 - Resumo do desenvolvimento do cérebro fetal e pós-natal humano em comparação com ratos, com relação aos hormônios tireoidianos	45
Figura 6 - Representação do papel dos astrócitos no metabolismo dos hormônios da tireoide.....	46
Figura 7 - Figura representativa das camadas moleculares da região parietal do córtex cerebral de ratos.....	47
Figura 8 - Representação esquemática da orientação do hipocampo ao longo do eixo longitudinal em ratos e humanos.....	50
Figura 9 - Sistema de neurotransmissão glutamatérgica	52
Figura 10 - Diagrama da geração de lactato a partir dos astrócitos.....	54
Figura 11 - Representação esquemática do sistema de defesa antioxidante das células.....	59
Figura 12 - Possíveis danos do hipotireoidismo congênito e a ação protetora do T ₃ r	62
Figura 13 - Desenho experimental da indução do hipotireoidismo congênito e tratamento <i>in vivo</i> com T ₃ r.....	64
Figura 14 - Efeito do tratamento <i>ex vivo</i> do T ₃ r sobre a fosforilação da GFAP em animais hipotireoideos.....	82
Figura 15 - Efeitos do tratamento <i>ex vivo</i> e <i>in vivo</i> do T ₃ r sobre a captação de ¹⁴ C-glutamato no hipocampo de animais hipotireoideos...	83
Figura 16 - Efeitos do tratamento <i>in vivo</i> do T ₃ r sobre o influxo de ⁴⁵ Ca ²⁺ no hipocampo de animais hipotireoideos.	84
Figura 17 - Efeitos do tratamento <i>ex vivo</i> e <i>in vivo</i> do T ₃ r sobre a atividade da enzima glutamina sintetase no hipocampo de animais hipotireoideos.....	85
Figura 18 - Efeitos do tratamento <i>in vivo</i> do T ₃ r sobre a atividade das enzimas aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase no hipocampo de animais hipotireoideos.	86
Figura 19 - Efeitos do tratamento do T ₃ r <i>ex vivo</i> sobre a atividade da LDH.	87

Figura 20 - Efeitos do tratamento <i>in vivo</i> do T ₃ r no conteúdo de GSH.	87
Figura 21 - Efeitos do tratamento <i>in vivo</i> do T ₃ r sobre a atividade da GGT.	88
Figura 22 - Modelagem molecular mostrando a ligação do T ₃ r com o receptor de integrina $\alpha\beta 3$	89
Figura 23 - Mecanismo proposto para o T ₃ r na restauração a homeostase metabólica no hipocampo dos ratos hipotireoideos em desenvolvimento	97
Figura 24 - Efeitos do tratamento <i>in vivo</i> do T ₃ r sobre a viabilidade celular das fatias de hipocampo de ratos hipotireoideos em desenvolvimento.	100
Figura 25 - Efeitos do hipotireoidismo congênito sobre a produção de EROs e a ação protetora do tratamento <i>in vivo</i> do T ₃ r em fatias hipocampais de animais em desenvolvimento.	100
Figura 26 - Efeitos <i>in vivo</i> do T ₃ r no hipocampo de animais hipotireoideos e eutireoideos em desenvolvimento sobre a lipoperoxidação lipídica.....	101
Figura 27 - Efeitos <i>in vivo</i> do T ₃ r no hipocampo de animais hipotireoideos e eutireoideos em desenvolvimento com sobre a atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase.....	102
Figura 28 - Efeito do tratamento <i>in vivo</i> com T ₃ r nas fatias de hipocampo de animais hipotireoideos e eutireoideos em desenvolvimento sobre a atividade da glutathione peroxidase.	103
Figura 29 - Efeito do tratamento <i>in vivo</i> com T ₃ r nas fatias de hipocampo de animais hipotireoideos e eutireoideos em desenvolvimento sobre a atividade da G6PD e da GR.....	104
Figura 30 - Efeito do tratamento <i>in vivo</i> com T ₃ r sobre a expressão da proteína NeuN na região CA1 do hipocampo de ratos hipotireoideos e eutireoideos em desenvolvimento.	105
Figura 31 - Fotomicrografias de imunofluorescência para Neu-N no hipocampo de animais hipotireoideos e eutireoideos em desenvolvimento.	105
Figura 32 - Efeito do hipotireoidismo congênito sobre a atividade da enzima GS no córtex de animais em desenvolvimento.....	114
Figura 33 - Efeito do hipotireoidismo congênito sobre o transporte de aminoácidos neutros no córtex de animais em desenvolvimento.....	115
Figura 34 - Efeito do hipotireoidismo congênito sobre o influxo de ⁴⁵ Ca ²⁺ no córtex de animais em desenvolvimento	115

Figura 35 - Conseqüências do hipotireoidismo congênito sobre a produção de espécies reativas de oxigênio no córtex cerebral de animais em desenvolvimento.....	116
Figura 36 - Conseqüências do hipotireoidismo congênito sobre a lipoperoxidação lipídica no córtex cerebral de animais em desenvolvimento.	117
Figura 37 - Conseqüências do hipotireoidismo congênito sobre os níveis de GSH no córtex cerebral de animais em desenvolvimento....	117
Figura 38 - Conseqüências do hipotireoidismo congênito sobre a atividade da GGT e da G6PD no córtex cerebral de animais em desenvolvimento.	118
Figura 39 - Efeitos do hipotireoidismo congênito na atividade da colinesterase no córtex cerebral de animais em desenvolvimento	118
Figura 40 - Efeito do hipotireoidismo congênito na fosforilação da GFAP em cultura primária de astrócitos corticais de animais eutireoideos e hipotireoideos.....	119
Figura 41 - Efeito do hipotireoidismo congênito sobre a espessura das camadas do córtex sensorio-motor dos ratos em desenvolvimento.....	121
Figura 42 - Fotomicrografias de coloração Nissil das camadas do córtex cerebral de animais em desenvolvimento.....	121
Figura 43 - Efeito do hipotireoidismo congênito sobre o tamanho dos neurônios nas diferentes camadas do córtex sensorio-motor dos ratos em desenvolvimento.	123
Figura 44 - Efeito do hipotireoidismo congênito sobre a densidade dos neurônios Neu-N positivos nas diferentes camadas do córtex sensorio-motor dos ratos em desenvolvimento.	124
Figura 45 - Fotomicrografias do córtex sensorio-motor de ratos em desenvolvimento e a densidade das células NeuN positivas através de imunohistoquímica.	125
Figura 46 - Efeito do hipotireoidismo congênito sobre a densidade de células positivas para GFAP nas diferentes camadas do córtex sensorio-motor dos ratos em desenvolvimento.	126
Figura 47 - Fotomicrografias do córtex sensorio-motor de ratos em desenvolvimento e a densidade das células positivas para GFAP através de imunohistoquímica.	126
Figura 48 - Efeito do hipotireoidismo congênito sobre a função locomotora através do teste de “foot-fault” em ratos em desenvolvimento.	127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo do efeito do hipotireoidismo e do tratamento <i>ex vivo</i> e <i>in vivo</i> com o hormônio T ₃ r.....	98
Tabela 2 - Resumo do efeito do hipotireoidismo e do tratamento <i>in vivo</i> com o hormônio T ₃ r.	112
Tabela 3 - Efeito do hipotireoidismo congênito sobre a relação massa do córtex cerebral/massa corpórea em ratos em desenvolvimento.....	120

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina amino transferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Trifosfato de Adenosina
BHE	Barreira hematoencefálica
¹⁴ C-DG	¹⁴ C-2-desoxi-D-glicose
Ca ²⁺	Íon cálcio
CaMKII	Proteína cinase dependente de Ca ²⁺ /Calmodulina II
CCDV	Canal de cálcio dependente de voltagem
D1	Desiodase tipo 1
D2	Desiodase tipo 2
D3	Desiodase tipo 3
DG	Giro dentado
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
DTNB	Ácido ditionitrobenzóico
EAAT	Transportador de aminoácido excitatório
ERK	Cinase regulada por sinal extracelular
EROs	Espécies reativas do oxigênio
F-actina	Filamentos de actina
FIs	Filamentos intermediários
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GDH	Glutamato desidrogenase
GGT	Gama-glutamilttransferase
GLAST	Transportador glutamato/aspartato
GLT-1	Transportador de glutamato-1
GLUR	Receptor de glutamato
GLUT	Transportador de glicose
Glu	Glutamato
Gln	Glutamina
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GS	Glutamina sintetase
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
GST	Glutationa S-transferase
HOCl	Ácido hipocloroso
HTs	Hormônios da tireoide

H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IP ₃	1,4,5-trifosfato de inositol
JNK 1/2	Cinase c-Jun N-terminal 1/2
LDH	Lactato desidrogenase
MAPK	Proteína serina-treonina cinase ativada por mitógeno
MCT8	Transportadores de monocarboxilato 8
MDA	Malondialdeído
MeAIB	Ácido α-(metil-amino)-isobutírico
NADPH	Fosfato de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo reduzida
NMDA	N-metil-D-aspartato
N ₂ O ₃	Ácido nitroso
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
•NO	Óxido nítrico
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ ^{-•}	Radical ânion superóxido
•OH	Radical hidroxila
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PC	Piruvato carboxilase
PI ₃ K	Fosfatidilinositol-3-cinase
PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína cinase C
PLC	Fosfolipase C
PTU	6n-propil-2-tiouracil
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
RO•	Radical alcóxil
ROO•	Radical peróxil
RXR	Receptor retinoide X
SNC	Sistema nervoso central
T ₃	Triiodotironina; 3,3',5-triiodo-L-tironina
T _{3r}	3,3',5'-triiodo-L-tironina; T ₃ reverso
T ₄	Tiroxina; 3,3',5,5'-tetraiodotironina
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácidos tricarboxílicos
TETRAC	Ácido tetraiodotiroacético
TR	Receptor para hormônios da tireoide
TRα	Receptor nuclear dos hormônios da tireoide tipo α
TRβ	Receptor nuclear dos hormônios da tireoide tipo β
TRH	Hormônio de liberação da tireotrofina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	29
1.1	OBJETIVOS.....	31
1.1.1	Objetivo Geral.....	31
1.1.2	Objetivos Específicos	31
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	33
2.1	HORMÔNIOS DA TIREOIDE.....	33
2.1.1	Mecanismos moleculares de ação dos hormônios da tireoide	37
2.2	HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO.....	40
2.3	HORMÔNIOS DA TIREOIDE E SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	43
2.3.1	Córtex cerebral como alvo de ação dos hormônios da tireoide.....	47
2.3.2	Papel dos hormônios da tireoide na fisiologia e função hipocampal.....	49
2.4	SISTEMA GLUTAMATÉRGICO.....	51
2.5	METABOLISMO ENERGÉTICO CEREBRAL.....	53
2.6	CITOESQUELETO.....	55
2.7	ESTRESSE OXIDATIVO.....	57
2.7.1	Sistemas de defesa antioxidantes.....	58
2.8	HIPÓTESE E DIVISÃO DO ESTUDO.....	60
3	METODOLOGIA.....	63
3.1	MATERIAIS	63
3.2	MÉTODOS	63
3.2.1	Animais.....	63
3.2.2	Captação de ¹⁴C-glutamato.....	65
3.2.3	Influxo de ⁴⁵Ca²⁺.....	65
3.2.4	Captação de ¹⁴C-2-Desoxi-D-glicose	65
3.2.5	Captação de aminoácidos neutros	66
3.2.6	Cultura primária de astrócitos do córtex cerebral	66
3.2.7	Fosforilação da proteína fibrilar ácida (GFAP).....	67
3.2.8	Análises de <i>Western Blot</i>	68
3.2.9	Determinação da atividade enzimática	69
3.2.10	Conteúdo de GSH	71
3.2.11	Detecção de espécies reativas de oxigênio	71
3.2.12	Lipoperoxidação tecidual (TBARS)	72
3.2.13	Determinação da atividade de enzimas antioxidantes	72
3.2.14	Determinação da viabilidade celular	74

3.2.15	Concentração de proteínas	74
3.2.16	Procedimentos histológicos para contagem de células no córtex cerebral	74
3.2.17	Imunohistoquímica no córtex cerebral de ratos para GFAP e NeuN	75
3.2.18	Estimativa da densidade numérica de células neuronais gliais no córtex cerebral	76
3.2.19	Imunofluorescência do hipocampo para NeuN	76
3.2.20	Quantificação da imunofluorescência	77
3.2.21	Teste da função locomotora: performance no <i>foot-fault test</i>	77
3.2.22	Ensaio de docagem molecular	77
3.2.23	Análise estatística	78
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
4.1	ESTUDO I: INTERAÇÃO DO T _{3r} COM O RECEPTOR DE INTEGRINA $\alpha v \beta 3$ E RESTAURAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO GLUTAMATÉRGICO E ENERGÉTICO NO HIPOCAMPO DE RATOS COM HIPOTIREOIDISMO EM DESENVOLVIMENTO.....	81
4.1.1	Efeito do T _{3r} na homeostase da fosforilação da GFAP	81
4.1.2	Efeito do T _{3r} na captação de ¹⁴ C-L-glutamato e influxo de ⁴⁵ Ca ²⁺ no hipocampo de ratos hipotireóides	82
4.1.3	Efeito do T _{3r} na atividade da glutamina sintetase e das transaminases no hipocampo de ratos hipotireóides	84
4.1.4	Efeito do T _{3r} no transporte de glicose e na atividade da LDH no hipocampo de ratos hipotireóides	86
4.1.5	Efeito do T _{3r} no conteúdo de glutathiona e na atividade da gama-glutamyltransferase no hipocampo de ratos hipotireóides	87
4.1.6	Interação do T _{3r} com o receptor de integrina $\alpha v \beta 3$	88
4.1.7	Discussão	89
4.1.8	Conclusões Parciais	97
4.2	ESTUDO II: EFEITO DO T _{3r} SOBRE PARÂMETROS DO ESTRESSE OXIDATIVO E MORFOLOGIA DO HIPOCAMPO DE ANIMAIS EUTIREÓIDES E HIPOTIREÓIDES EM DESENVOLVIMENTO	99
4.2.1	Efeito do hipotireoidismo congênito e do T _{3r} sobre a viabilidade celular no hipocampo de ratos	99

4.2.2	Efeito do hipotireoidismo congênito e do T ₃ r na produção de espécies reativas de oxigênio no hipocampo de ratos	100
4.2.3	Efeito do T ₃ r na lipoperoxidação induzida pelo hipotireoidismo congênito em células de fatias hipocampais.....	101
4.2.4	Efeito do T ₃ r sobre o sistema de defesa antioxidante no hipocampo de ratos com hipotireoidismo congênito	101
4.2.5	Efeito do T ₃ r sobre a expressão de células NeuN positivas na região CA1 do hipocampo de ratos com hipotireoidismo congênito	104
4.2.6	Discussão	106
4.2.7	Conclusões Parciais	111
4.3	ESTUDO III: EFEITOS DO HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO SOBRE A HOMEOSTASE DO GLUTAMATO, PARÂMETROS OXIDATIVOS, MORFOLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS NO CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS EM DESENVOLVIMENTO	113
4.3.1	Efeitos do hipotireoidismo congênito sobre o sistema glutamatérgico no córtex cerebral	114
4.3.2	Efeitos do hipotireoidismo congênito no sistema redox celular	116
4.3.3	Investigação dos efeitos do hipotireoidismo congênito na atividade da colinesterase no córtex cerebral de animais em desenvolvimento	118
4.3.4	Efeitos do hipotireoidismo congênito na homeostase da fosforilação da GFAP em astrócitos corticais primários	119
4.3.5	Efeitos do hipotireoidismo congênito na morfologia do córtex sensoriomotor e função locomotora em ratos em desenvolvimento	120
4.3.6	Discussão	128
4.3.7	Conclusões Parciais	133
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	135
6	CONCLUSÕES	137
7	PERSPECTIVAS	139
	REFERÊNCIAS	141
	ANEXO I	175
	ANEXO II	177

1 INTRODUÇÃO

O hipotireoidismo congênito é um distúrbio endócrino que se refere à diminuição ou à ausência dos hormônios da tireoide ao nascer, podendo ser classificado como permanente ou transitório, dependendo de sua etiologia (Rastogi e Lafranchi, 2010; Grasberger e Refetoff, 2011). O hipotireoidismo transitório é atribuído principalmente a distúrbios na tireoide materna (Teng *et al.*, 2013). Sendo que até a completa maturação da glândula tireoide os fetos são totalmente dependentes das concentrações hormonais maternas (Williams, 2008; Ghanbari e Ghasemi, 2017).

Os hormônios da tireoide (HTs), 3,5,3'-triiodo-L-tironina (T_3) e tiroxina (T_4), são essenciais para o correto desenvolvimento celular e metabolismo nos vertebrados (Zamoner, Royer, *et al.*, 2007; Barez-Lopez e Guadano-Ferraz, 2017). Na última década, os efeitos do 3,3',5'-triiodo-L-tironina (T_3 reverso; T_{3r}), antes considerado a forma inativa dos HTs, vem sendo estudados em diferentes tipos celulares (Farwell *et al.*, 2005; Zanatta *et al.*, 2013), ainda o T_{3r} é descrito como a iodotironina mais abundante durante o período fetal (Roti, 1982).

O sistema nervoso central (SNC) em desenvolvimento é particularmente sensível a deficiência na sinalização dos HT. O hipotireoidismo congênito não tratado pode causar cretinismo, atraso neurocognitivo e retardo mental (Porterfield e Hendrich, 1993; De Escobar *et al.*, 2008; Berbel *et al.*, 2009). Ainda, já foi observado comprometimento dos processos de memória e aprendizado tanto em humanos quanto em roedores com essa deficiência dos HTs (Berbel *et al.*, 2001). No entanto a gravidade desses danos é dependente do tempo e da causa do déficit hormonal (Kunitake *et al.*, 1989; Morreale De Escobar *et al.*, 2000; Wong e Leung, 2001; Zoeller e Rovet, 2004).

Neste contexto, os HTs são considerados fundamentais nos processos de mielinização (Fernandez *et al.*, 2009), neuritogênese (Martínez e Gomes, 2002), maturação dos sistemas de neurotransmissores (Bauer e Whybrow, 2001), plasticidade sináptica (Vallortigara *et al.*, 2008; Fernandez *et al.*, 2009), fosforilação dos filamentos intermediários (Zamoner *et al.*, 2006b; Zamoner, Heimfarth, Oliveira Loureiro, *et al.*, 2008; Zamoner, Heimfarth e Pessoa-Pureur, 2008) e regulação de canais iônicos (Madeira *et al.*, 1988; Zamoner, Royer, *et al.*, 2007).

Os HTs podem atuar nas células cerebrais de diferentes maneiras: através de mecanismos de sinalização genômicos, clássicos, pela interação do T_3 com os receptores nucleares ocasionando a

modulação da expressão gênica (Williams, 2000), ou por mecanismos não genômicos, rápidos, independentes da ativação de receptores nucleares (Davis *et al.*, 2005). Neste sentido, o dímero de integrina $\alpha\beta3$ tem sido sugerido como um provável receptor de membrana para os HTs, tendo maior afinidade para o T_4 e o T_{3r} do que para o T_3 (Plow *et al.*, 2000; Bergh *et al.*, 2005), enquanto o receptor nuclear para os HTs interage com T_3 , mas é pouco responsivo aos demais HTs (Davis *et al.*, 2008).

Considerando nossos dados e evidências na literatura que o hormônio T_{3r} poderia desempenhar papéis biológicos no cérebro de ratos hipotireoideos em desenvolvimento, abordamos no presente estudo a capacidade do T_{3r} restaurar a homeostase do sistema glutamatérgico bem como a atividade de enzimas envolvidas no sistema de defesa antioxidante, além do papel do receptor de integrina $\alpha\beta3$. Ainda, investigamos a implicação do T_{3r} no metabolismo energético e na fosforilação da proteína glial fibrilar ácida (GFAP). Para isso, utilizamos um modelo experimental de hipotireoidismo congênito em ratos com foco em mecanismos genômicos e não genômicos de ação do hormônio através de ações rápidas *ex vivo* e clássicas *in vivo* do T_{3r} no hipocampo de filhotes imaturos. Utilizamos análises de “docagem” molecular para propor que as ações do T_{3r} podem estar relacionadas com a interação do hormônio com o receptor de integrina $\alpha\beta3$ na superfície celular.

A elucidação dos efeitos do T_{3r} , considerado um metabólito inativo dos HTs, no SNC poderá fornecer alvos moleculares de ação hormonal direcionados à terapia ou reversão dos danos causados por disfunções da tireoide.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Elucidar possíveis desequilíbrios histológicos e na homeostase do sistema glutamatérgico, sistema de defesa antioxidante, no metabolismo energético no hipocampo e córtex cerebral de ratos hipotireoideos em desenvolvimento e verificar o possível efeito biológico do hormônio T_{3r} após tratamento *ex vivo* e *in vivo* no hipocampo destes animais.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Verificar a capacidade do tratamento com o hormônio T_{3r} em restaurar os efeitos do hipotireoidismo congênito no sistema glutamatérgico no hipocampo de animais em desenvolvimento;
- Avaliar o efeito do T_{3r} no metabolismo energético no hipocampo de ratos hipotireoideos em desenvolvimento;
- Determinar a possível interação entre o T_{3r} e o receptor de integrina $\alpha\beta 3$ através de ensaios de “docagem” molecular;
- Estudar o efeito do T_{3r} na fosforilação da Proteína Glial Fibrilar Ácida em fatias de hipocampo de ratos hipotireoideos em desenvolvimento;
- Investigar o efeito da administração *in vivo* do T_{3r} sobre parâmetros morfológicos no hipocampo de ratos hipotireoideos em desenvolvimento;
- Determinar se o tratamento *in vivo* com o hormônio T_{3r} é capaz de reverter os efeitos do hipotireoidismo congênito sobre parâmetros do estresse no hipocampo de ratos em desenvolvimento.
- Estudar os efeitos do hipotireoidismo congênito sobre a captação e o metabolismo do glutamato no córtex cerebral e hipocampo de animais hipotireoideos;
- Avaliar o efeito do hipotireoidismo congênito no transporte de aminoácidos neutros no córtex cerebral de animais submetidos ao modelo experimental de hipotireoidismo congênito;
- Determinar parâmetros de estresse em fatias de córtex cerebral de animais hipotireoideos;

- Estudar o efeito do hipotireoidismo congênito sobre parâmetros histológicos no córtex cerebral de ratos;
- Avaliar a função locomotora dos animais com hipotireoidismo congênito.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 HORMÔNIOS DA TIREOIDE

Os HTs têm um papel chave no sistema endócrino, controlam o metabolismo global do corpo, a síntese de proteínas, a proliferação celular, o desenvolvimento neural, o crescimento normal e a maturação dos ossos, bem como as funções cardiovascular, reprodutiva e renal (Bernal *et al.*, 2003; Boelaert e Franklyn, 2005; Zamoner, Funchal, *et al.*, 2007; Patrick, 2009; Zamoner e Pessoa-Pureur, 2011; Zamoner *et al.*, 2011; Mullur *et al.*, 2014; Ramos e Zamoner, 2014; Mondal *et al.*, 2016; Barez-Lopez e Guadano-Ferraz, 2017). Os HTs são sintetizados e liberados pela glândula tireoide por um complexo processo que envolve a captação do iodeto da circulação sanguínea através do sistema de simporte Na^+/I^- (Dai *et al.*, 1996). A tireoide normal mantém uma concentração de iodeto livre 20 a 50 vezes maior que a do plasma, dependendo da quantidade de iodo disponível e da atividade da glândula. Uma vez no meio intracelular, o iodeto é oxidado na presença de peróxido de hidrogênio pela ação da tireoperoxidase (TPO) sob a influência da tireoglobulina, uma glicoproteína que contém cerca de 115 resíduos de tirosina; a iodação desses resíduos é capaz de produzir os HTs. As tirosinas iodadas são combinadas para formar a L-tiroxina (3,3',5,5'-tetraiodotironina; L-T₄), a triiodo-L-tironina (3,3',5-triiodo-L-tironina; T₃) e o T₃ reverso (3,3',5'-triiodo-L-tironina; T_{3r}) (Kohrle, 1999; Brent, 2012).

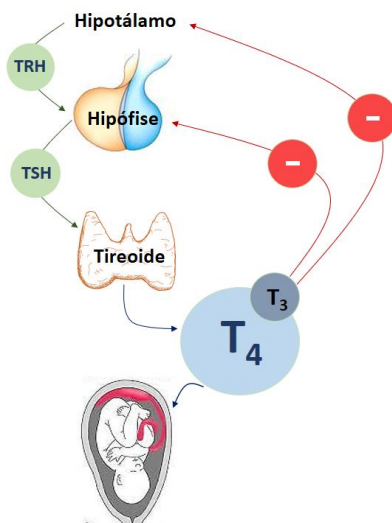
No sistema endócrino, o hipotálamo e a hipófise controlam a produção dos HTs pela glândula tireoide. Neurônios hipotalâmicos secretam o hormônio de liberação da tireotrofina (TRH), que por sua vez induz a liberação do hormônio estimulante da tireoide (TSH) pela hipófise. O TSH atua em receptores de membrana das células foliculares da glândula tireoide, estimulando a síntese e a liberação dos HTs. Uma vez na corrente sanguínea, esses hormônios exercem funções específicas em órgãos alvo. A ação combinada do hipotálamo, hipófise e glândula tireoide, é conhecida como eixo hipotálamo-hipófise-tireoide. Este eixo é responsável pelo controle das concentrações de TRH e TSH através de um sistema de retroalimentação negativa, no qual as concentrações plasmáticas dos HTs modulam negativamente a liberação hormonal, tanto no hipotálamo como na hipófise (Lechan e Fekete, 2004; Boelaert e Franklyn, 2005; Brent, 2012).

Sabe-se que a biodisponibilidade dos HTs durante a vida fetal apresenta diferenças entre humanos e algumas outras espécies. Em

humanos, a secreção de T_4 e T_3 é regulada pela da glândula tireoide do feto a partir da segunda metade da gestação; em ratos, isso só é observado a partir da segunda semana de vida pós-natal. O rato é, portanto, totalmente dependente das concentrações de HTs maternas ao longo de toda vida fetal (Forhead e Fowden, 2014; Barez-Lopez e Guadano-Ferraz, 2017; Ghanbari e Ghasemi, 2017). O mecanismo de regulação da atividade da tireoide, que envolve o eixo hipotálamo-hipófise-tireoide, bem como a regulação dos HTs na gravidez estão representados esquematicamente na Figura 1.

Após a biossíntese, o T_4 - o principal hormônio produzido e secretado pela glândula tireoide, é transportado e distribuído na circulação periférica através de sua associação com proteínas de ligação, como a globulina de ligação de tiroxina, transtirretina e albumina. Sua internalização nas células ocorre através da associação com transportadores acoplados a membrana como os de monocarboxilato 8 (MCT8) e monocarboxilato 10 (MCT10) (Kohrle, 1999; Mondal *et al.*, 2016). Desta maneira, o T_4 é amplamente distribuído nos tecidos periféricos, podendo inclusive atravessar as barreiras placentária e hematoencefálica. Uma vez dentro das células, o T_4 pode ser metabolizado a T_3 , considerado o HT biologicamente ativo sobre a modulação da transcrição gênica, ou ainda, ser metabolizado a T_{3r} , sendo esta iodotironina descrita como a mais abundante durante o período fetal (Chopra *et al.*, 1975; Roti *et al.*, 1982; Farwell *et al.*, 2005).

Figura 1 - Representação esquemática do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide e a gestação



A síntese e a liberação dos HTs reguladas pelo eixo hipotálamo-hipófise-tireoide. O hormônio de liberação da tireotrofina (TRH), liberado pelo hipotálamo, induz a liberação do hormônio estimulante da tiroide (TSH) pela hipófise, que estimula a síntese e liberação dos HTs. As concentrações de TRH e TSH são controladas por um sistema de retroalimentação negativa. Os HTs são transportados para o espaço extratireoidal através de proteínas de ligação como a globulina de ligação a tiroxina, transtiretina e albumina. O T₄ é capaz de atravessar a barreira placentária sendo as concentrações maternas fundamentais no período embrionário. Uma vez dentro das células os HTs podem ser desiodados por desiodases teciduais.

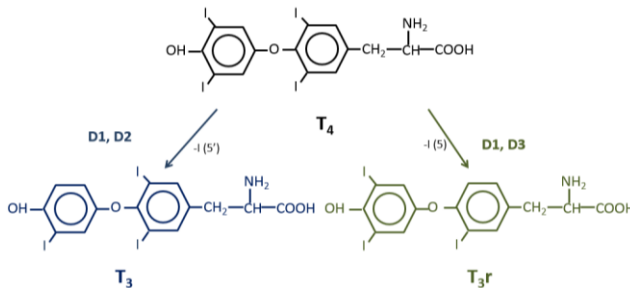
Fonte: Adaptado de Tingi, 2016.

As reações de metabolização dos HTs são catalisadas pelas desiodases teciduais, que são um conjunto de selenoenzimas expressas em todas as espécies de vertebrados em 3 isoformas (D1, D2, D3), essas desiodases se diferem por suas propriedades catalíticas, mecanismos de regulação e padrões de expressão durante o desenvolvimento, sendo específicas para cada tecido (Bianco *et al.*, 2002; Boelaert e Franklyn, 2005). A atividade das desiodases consiste na remoção dos iodos presentes nos anéis fenólico (externo) e tirosínico (interno) dos HTs, especificamente nas posições 5' e 5 (Bianco *et al.*, 2002).

A D1 tem atividade sobre os anéis tirosínico e fenólico, desta maneira esta isoenzima pode converter T₄ em T₃ ou T_{3r}, assim como

produzir 3,3'-T₂ a partir do T₃ ou T_{3r} (Gereben *et al.*, 2008). Semelhante a atividade da D1, a D2, também catalisa, porém com mais eficiência a produção de T₃ através da desiodação do T₄, agindo diretamente no anel fenólico (Sagar *et al.*, 2007). Não obstante, a D3 é responsável por remover o iodo somente do anel tirosínico, desta forma converte o T₄ em T_{3r} e o T₃ em T₂, esses metabolitos apresentam baixa afinidade com o receptor nuclear dos HTs (Kohrle, 1999). As reações de desiodação de T₄ a T₃ ou a T_{3r} estão representadas esquematicamente na Figura 2.

Figura 2 - Desiodação enzimática dos hormônios da tireoide pelas desiodases



A metabolização do hormônio T₄ para T₃ é catalisada pelas desiodases D1 e D2. A metabolização de T₄ a T_{3r} ocorre pela atividade D1 e D3. Fonte: O autor

Uma forte característica das desiodases é seu padrão de expressão tecidual. O fígado, o rim, a glândula tireoide e a glândula pituitária expressam altos níveis de D1, com menores quantidades no encéfalo e células do tecido adiposo (Berry *et al.*, 1991). Em contraste, a D2 é a mais abundante na glândula pituitária e no tecido adiposo marrom de roedores, com quantidades significativas observadas no sistema nervoso central (Ortega *et al.*, 2012). A D3 é uma proteína de membrana que contém um único domínio transmembrana entre os resíduos 16 e 41 (Baqui *et al.*, 2003). Esta localização favorece a função da D3 na placenta, útero e cérebro e fígado fetais, limitando a passagem dos HTs maternos para o feto (Gereben *et al.*, 2008).

A ação determinante da D3 no cérebro catalisa a formação dos metabolitos T_{3r} a partir do T₄ e de T₂ a partir de T₃ (Peeters e Visser, 2000). O T_{3r} foi considerado durante muito tempo um metabolito inativo do T₄, mas hoje já são conhecidas várias ações deste hormônio, que atua provavelmente por meio da interação com receptores de membrana para os HTs (Farwell e Dubord-Tomasetti, 1999; Peeters e Visser, 2000; Farwell *et al.*, 2005; Zanatta *et al.*, 2013; Mondal *et al.*, 2016).

2.1.1 Mecanismos moleculares de ação dos hormônios da tireoide

2.1.1.1 Mecanismo clássico, genômico, de ação dos hormônios da tireoide

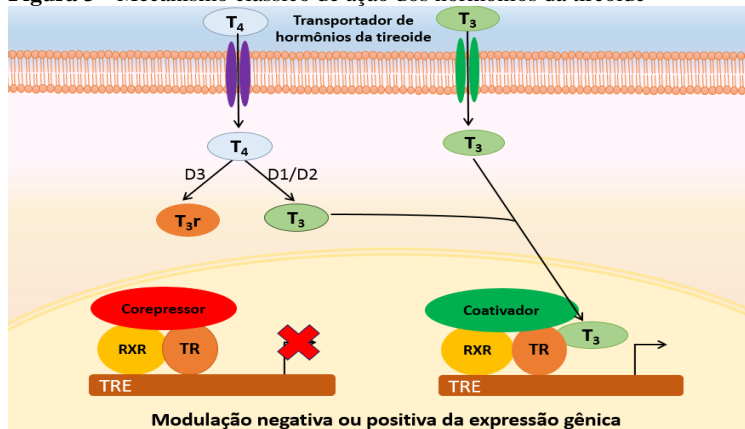
O T_3 é considerado o HT biologicamente ativo em relação a modulação da expressão gênica, tendo fundamental importância na regulação do metabolismo de inúmeros tecidos, tanto durante a fase de desenvolvimento, quanto na fase adulta. Em conjunto, os HTs são essenciais para o desenvolvimento e funções neurais (Anderson, 2001; Bernal *et al.*, 2003; Zamoner *et al.*, 2005; Cattani *et al.*, 2013), bem como para funções do sistema cardiovascular (Patrick, 2009), sistema reprodutor (Holsberger e Cooke, 2005; Zamoner *et al.*, 2005; Zamoner *et al.*, 2006a; Zamoner *et al.*, 2011; Zanatta, Zamoner, Goncalves, Zanatta, Bouraima-Lelong, Bois, *et al.*, 2011; Zanatta *et al.*, 2013), entre outros.

O mecanismo clássico de ação do T_3 é mediado através de receptores nucleares para os HTs (TRs), os quais apresentam alta afinidade para o hormônio T_3 (Ikeda *et al.*, 1994). Os TRs pertencem a uma superfamília de receptores nucleares, que também incluem receptores para retinoides, vitamina D, ácidos graxos e prostaglandinas (Evans, 1988). Os TRs são codificados por dois genes, denominados $TR\alpha$ e $TR\beta$, localizados em diferentes cromossomos, sendo que quatro importantes isoformas dos TRs foram bem caracterizadas em seres humanos ($TR\alpha 1$, $TR\alpha 2$, $TR\beta 1$ e $TR\beta 2$) (Plow *et al.*, 2000; Williams, 2000).

Uma vez captados pelas células, os HTs exercem uma série de efeitos, dependentes ou independentes da interação com os TRs. A clássica forma de ação dos HTs envolve a formação do complexo $TR-T_3$, o qual se liga na forma de homo ou heterodímero em regiões específicas do DNA, conhecidas como elementos de resposta dos hormônios da tireoide (TREs), que estão localizadas na região promotora dos genes alvo. A interação do T_3 com o TR favorece a formação de heterodímeros com o receptor retinoide X (RXR). Durante este processo, proteínas conhecidas como corepressoras ou coativadoras são recrutadas na região promotora do gene alvo. Este mecanismo leva a uma modificação na cromatina e na regulação da transcrição gênica (Bassett *et al.*, 2003; Boelaert e Franklyn, 2005). O hormônio T_4 também pode atuar através dos receptores nucleares; entretanto, a afinidade de ligação destes receptores ao T_3 é bem maior do que ao T_4 .

(Ikeda et al., 1994). O mecanismo clássico de ação dos HTs está representado na Figura 3.

Figura 3 - Mecanismo clássico de ação dos hormônios da tireoide



Os transportadores de monocarboxilato transportam os hormônios da tireoide T₄ e T₃ para o interior da célula, onde estes podem ser desidatados, pela ação das desidatases teciduais (D1, D2, D3). O T₃ interage com o receptor nuclear para os hormônios da tireoide (TR), favorecendo a formação de heterodímeros com o receptor RXR, que interagem com os elementos de resposta dos hormônios da tireoide (TRE), acarretando na modulação da expressão gênica.

Fonte: Adaptado de Brent (2012).

2.1.1.2 Ações não genômicas dos hormônios da tireoide

Diferentemente dos efeitos genômicos, as ações não genômicas ocorrem rapidamente e não são afetadas por inibidores de síntese proteica (Bitiktas et al., 2017). Neste contexto, já são conhecidos sítios de ligação na membrana celular para os HTs. O primeiro estudo descrevendo a existência destes sítios foi na membrana de células vermelhas do sangue (Schwartz et al., 1967).

Décadas depois, Farwell e colaboradores (1995) sugeriram que a integrina $\alpha\beta 3$ poderia ser um possível receptor de superfície para os HTs. O sítio de reconhecimento Arg-Gly-Asp (RGD) na integrina $\alpha\beta 3$ foi descrito como o local responsável por mediar a interação com os HTs (Bergh *et al.*, 2005). Nesse contexto, o peptídeo RGD pode atuar como antagonista da interação dos HTs com o receptor de integrina $\alpha\beta 3$ (Vinatier, 1995; Kumar, 1998), enquanto o tetrac, um análogo do

T₄, também pode interferir na ligação dos HTs com a integrina $\alpha\beta 3$ (Bergh *et al.*, 2005).

As integrinas são uma família de moléculas de adesão celular, que estão envolvidas com interação celular, tanto com outras células como também com moléculas da matriz extracelular (Hynes e Lander, 1992). Essas moléculas são expressas na superfície celular como heterodímeros constituídos de subunidades α e β , nos mamíferos podem se combinar de diferentes maneiras e desta forma produzir cerca de 25 diferentes formas de heterodímeros de integrina (Hynes, 1992).

Do ponto de vista estrutural, as integrinas são glicoproteínas transmembranas com um grande domínio extracelular e um pequeno domínio transmembrana e citoplasmático. Foi demonstrado que a interação dos HTs, T₃ e T₄, com a integrina $\alpha\beta 3$ ativa à via de sinalização de proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) e desta maneira, inicia eventos intracelulares mediados por esta via de transdução de sinal, incluindo a modulação da transcrição gênica (Bergh *et al.*, 2005).

A interação desses hormônios com a integrina $\alpha\beta 3$ também pode levar a ativação da proteína cinase regulado por sinal extracelular (ERK1/2), culminando em ações locais de membrana como no sistema de transporte de íons, tais como a modulação do trocador H^+/Na^+ , afetando a concentração intracelular de Na^+ e o pH intracelular (D'arezzo *et al.*, 2004). Sabe-se que um grande número de mecanismos celulares não genômicos estão envolvidos no sistema de transporte de íons, entre estes Na^+ , K^+ e Ca^{2+} , e estes efeitos parecem ser relevantes para a função neural (Zamoner, Royer, *et al.*, 2007; Davis *et al.*, 2010; Zamoner e Pessoa-Pureur, 2011).

Além disso (Zamoner, Royer, *et al.*, 2007) descreveram que o T₃ e o T₄ aumentam o influxo de Ca^{2+} no córtex cerebral de ratos em desenvolvimento, levando à uma oscilação intracelular do íon através dos canais de cálcio dependentes de voltagem (CCDV) do tipo L e T. A identificação do Ca^{2+} como primeiro mensageiro para a ação do T₃ na membrana plasmática enfatiza a captação de Ca^{2+} como um evento pioneiro após a ligação do hormônio com seu receptor de membrana (Zamoner, Funchal, *et al.*, 2007; Zamoner, Heimfarth e Pessoa-Pureur, 2008).

Há algumas décadas, Faivre-Sarrailh e Rabie (1988) descreveram que o tratamento agudo com T₄ é capaz de restaurar a redução dos filamentos de actina no cerebelo de ratos hipotireoideos. Esse estudo demonstrou pela primeira vez a capacidade dos HTs para regular a dinâmica do citoesqueleto, um componente estrutural essencial para a

migração celular e interação da célula com o ambiente. Posteriormente, demonstrou-se que a formação de filamentos de actina (F-actina) em astrócitos pode ser modulada pelos hormônios T_4 ou T_{3r} através de mecanismos rápidos, não genômicos, no entanto, não foi observado o mesmo efeito com o T_3 (Farwell et al., 2005). A formação de F-actina e a organização dos microfilamentos na migração de neurônios do cerebelo também é dependente dos hormônios T_4 e T_{3r} , consistente com achados anteriores que descreveram que a polimerização da actina em astrócitos é regulada por esses hormônios (Farwell e Dubord-Tomasetti, 1999).

Nosso grupo de pesquisa também observou ações não genômicas do T_3 e do T_4 sobre a fosforilação do citoesqueleto, através de mecanismos GABAérgicos em córtex cerebral de ratos de 10 dias de idade (Zamoner *et al.*, 2006). Contudo, em animais hipotireoideos com 15 dias de idade, apenas o T_4 foi capaz de estimular a fosforilação de filamentos intermediários no córtex cerebral desses animais. O mecanismo de ação do T_4 foi independente dos neurotransmissores GABA, L-glutamato, noradrenalina e ATP, enfatizando desta forma que os HTs atuam sobre as células neurais por mecanismos distintos e dependentes do estágio do desenvolvimento.

2.2 HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO

O hipotireoidismo congênito é um distúrbio endócrino que se refere à diminuição ou à ausência dos HTs ao nascer, podendo ser classificado como permanente ou transitório, dependendo de sua etiologia (Rastogi e Lafranchi, 2010; Grasberger e Refetoff, 2011). O hipotireoidismo congênito permanente ocorre em 85% dos casos devido a anomalias relacionadas ao desenvolvimento da glândula tireoide do feto e em menor incidência (10 – 15%) por distúrbios na síntese, metabolismo ou transporte dos HTs (Rastogi e Lafranchi, 2010; Grasberger e Refetoff, 2011). Já o hipotireoidismo transitório é atribuído principalmente a distúrbios na tireoide materna (Teng *et al.*, 2013).

A incidência do hipotireoidismo congênito transitório é menos observada em áreas ricas em iodo como Estados Unidos e Canadá, afetando cerca de 1:5000 nascidos vivos (Ordookhani *et al.*, 2008; Ghanbari e Ghasemi, 2017). Dados recentes, publicados nas Diretrizes de Consenso sobre o rastreo, diagnóstico e gestão de hipotireoidismo congênito da Sociedade Europeia de Endocrinologia Pediátrica, relatam que o hipotireoidismo congênito afeta até 1:2000 recém-nascidos na

Europa (Leger *et al.*, 2014). No Brasil, a incidência é de aproximadamente 1:2595 a 1:4795 nascidos vivos (Ramos *et al.*, 2008; Magalhaes *et al.*, 2009; Maciel *et al.*, 2013).

A triagem neonatal no Brasil é realizada conforme a Portaria GM/MS nº 822, de 6 de junho de 2001, por meio da medida do TSH em amostra de sangue colhida em um papel filtro (Teste do Pezinho), seguida de medida do T₄ (total ou livre) em amostras de soro quando o TSH é superior a 20 mUI/L. O tratamento precoce com doses elevadas de levotiroxina parece ser o mais adequado para pacientes com hipotireoidismo congênito (Fisher, 2000; Maciel *et al.*, 2013; Leger *et al.*, 2014).

A indução do hipotireoidismo neonatal em ratos tem sido largamente utilizada para entender os mecanismos pelos quais os HTs maternos exercem sua ação no sistema nervoso central (SNC) em ratos em desenvolvimento (Zamoner, Heimfarth e Pessoa-Pureur, 2008; Morte *et al.*, 2010; Cattani *et al.*, 2013). Sendo que a gravidade e as condições geradas pelo hipotireoidismo em modelos animais devem refletir as condições observadas em seres humanos.

Os modelos experimentais de hipotireoidismo durante o período gestacional, associados a deficiência dos HTs podem ser obtidos pela tireoidectomia materna seguida por um tratamento com drogas antitiroideas, ou também mantendo as ratas grávidas sob a ação de agentes antitiroideos, como 2-mercapto-1-metimidazol (MMI) ou 6-propil-2-tiouracil (PTU) (Morte *et al.*, 2010; Ghanbari e Ghasemi, 2017).

O PTU inibe a biossíntese da tireoglobulina e também tem efeitos inibitórios sobre a biossíntese dos HTs (Sue *et al.*, 2012). Em relação aos efeitos extratiroideais, o PTU e o MMI diminuem cerca de 85% a ligação do T₃ com os receptores nucleares e ainda apresentam efeito inibitório sobre a atividade da D1 (Moriyama *et al.*, 2007). As possíveis ações dos HTs do feto também são bloqueadas, uma vez que o PTU e MMI atravessam a barreira placentária (Cooper, 2005; Azizi e Amouzegar, 2011) e são secretados no leite materno (Cooper, 2005; Karras e Krassas, 2012).

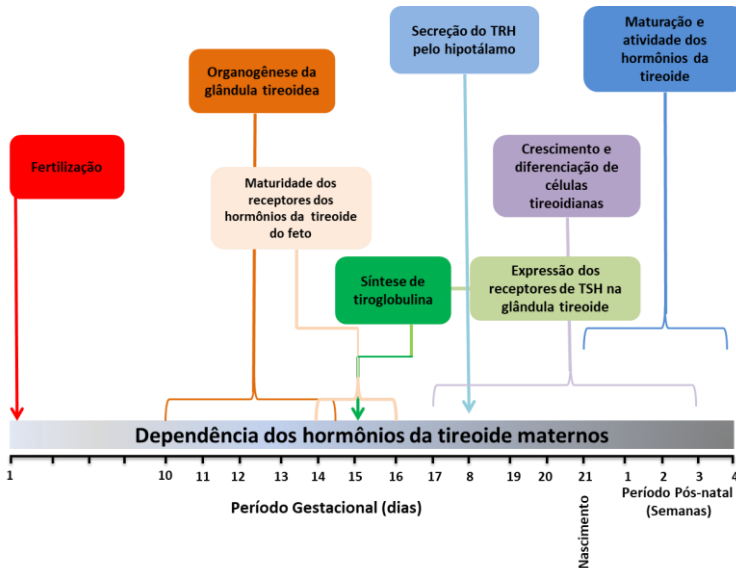
Os HTs exercem um papel crucial no neurodesenvolvimento, sendo que o hipotireoidismo congênito não tratado pode levar a déficits neurológicos e psiquiátricos, incluindo transtorno cognitivo, espasticidade e distúrbios da marcha e coordenação (Paone *et al.*, 2016). Contudo, o rápido diagnóstico e imediato tratamento com reposição hormonal com levotiroxina pode minimizar esses danos. Programas de triagem neonatal, realizados há mais de 30 anos nos países

industrializados, têm tido grande êxito na detecção precoce e no tratamento de recém-nascidos com hipotireoidismo congênito. Estudos sobre a função cognitiva de pacientes com deficiência dos HTs tratados com levotiroxina logo após o nascimento, demonstraram um desenvolvimento normal, embora danos neurocognitivos sutis foram observados, em alguns pacientes (Bargagna *et al.*, 1999).

Neste sentido, o desenvolvimento adequado do feto depende tanto de sua genética (Shapira e Dolan, 2006), quanto dos ambientes metabólicos e nutricionais oferecidos pela mãe (Tzanetakou *et al.*, 2011). Salienta-se que os HTs são essenciais para o metabolismo, desenvolvimento e crescimento normais dos órgãos do feto (Ghanbari e Ghasemi, 2017).

Em humanos, a glândula tireoide do feto se desenvolve a partir do segundo trimestre de gestação (Williams, 2008); em ratos, a formação da glândula tireoide e a produção dos HTs ocorre somente a partir da segunda semana neonatal, sendo esses animais dependentes dos HTs da mãe até esse período (Figura 4) (Barez-Lopez e Guadano-Ferraz, 2017; Ghanbari e Ghasemi, 2017).

Figura 4 - Desenvolvimento e maturação da glândula tireoide em ratos



A diferenciação das células tireoidianas no feto de rato acontece aproximadamente nos dias 10-15 do período gestacional. Nos dias 14-16 de gestação, os HTs maternos

podem se ligar a receptores em alguns órgãos do feto (coração, pulmão e fígado) e também se observa a síntese da tireoglobulina e a expressão dos receptores de TSH nas células da glândula tireoide fetal. Entre os dias 17 de gestação e 21 após o nascimento observa-se o crescimento e diferenciação das células tireoide, síntese e secreção dos HTs. No entanto, as concentrações e atividade dos hormônios são mais baixos em comparação aos ratos adultos.

Fonte: Adaptado de Bernal, 2007.

A deficiência dos HTs durante a vida fetal e pós-natal pode afetar a maturação do SNC e causar disfunções irreversíveis no SNC tanto de humanos quanto de roedores (Wong e Leung, 2001). O hipotireoidismo neonatal provoca sintomas cardíacos, baixo ganho de peso e manifestações neurológicas severas, como o cretinismo (Cheron *et al.*, 1978; Wing *et al.*, 1994; Polak, 1998; Caffrey, 2000). O hipotireoidismo congênito pode causar modificações permanentes na morfologia e fisiologia neurais (Bernal *et al.*, 2003; Bernal, 2015), as quais são dependentes do período de desenvolvimento e da duração do déficit hormonal (Zoeller e Rovet, 2004).

2.3 HORMÔNIOS DA TIREOIDE E SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Os HTs influenciam uma ampla variedade de processos durante a maturação do SNC, como a mielinização, diferenciação e migração dos neurônios e células gliais (Bernal, 2007). A alteração no fornecimento dos HTs em humanos em desenvolvimento pode levar ao retardo mental irreversível bem como a déficits neurológicos. Em adultos, as ações dos HTs no SNC influenciam o comportamento e o humor, alterações nas concentrações desses hormônios podem levar a manifestações psiquiátricas, sendo que o hipotireoidismo é descrito como a principal causa de demência não Alzheimer (Joffe e Sokolov, 1994; Cordes *et al.*, 2000; Bauer e Whybrow, 2001).

Durante a primeira metade da gestação em humanos, antes da maturação da glândula tireoidiana, o fornecimento dos HTs maternos é de extrema importância para o desenvolvimento do SNC do feto. Apesar das baixas concentrações fetais circulantes de T₄ e T₃, os níveis de T₃ aumentam no córtex cerebral durante o segundo trimestre, devido a maior atividade da D2 (Kester *et al.*, 2004). Desta maneira, a expressão de D2 parece ser um importante fator regulador da ação precoce do T₃ no cérebro. Os níveis de T₄ no encéfalo antes do nascimento ainda são

conhecidos, desta forma a hipótese de que o desenvolvimento do SNC humano é dependente dos HTs recebeu apoio experimental a partir de estudos com ratos (Bernal, 2007).

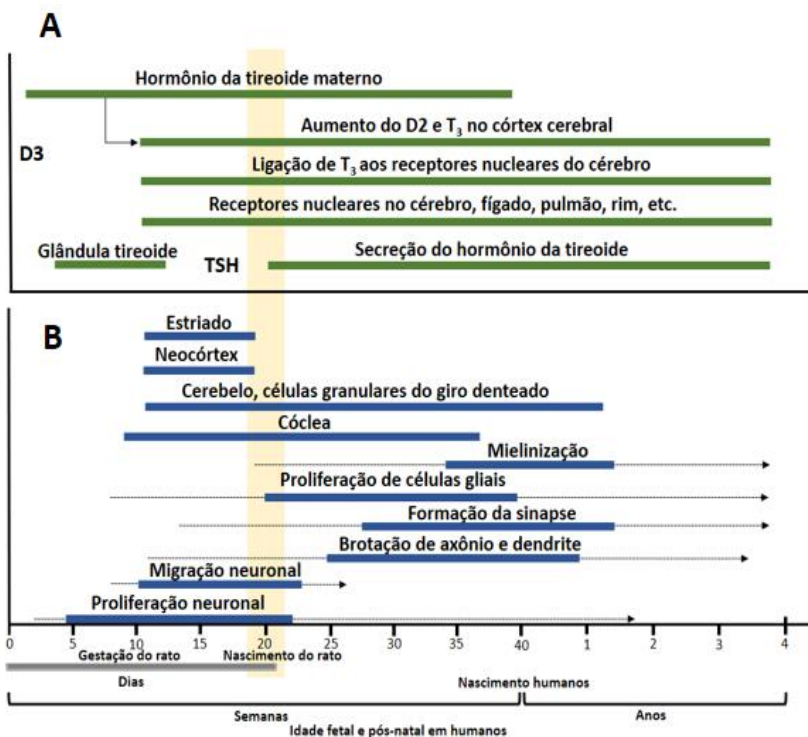
Os estágios de desenvolvimento dos humanos e roedores podem ser comparados. O desenvolvimento do encéfalo dos ratos no décimo dia de vida pós-natal equivale ao encéfalo de humanos no nascimento. Essa relação também pode comparar o encéfalo do rato no momento do nascimento ao encéfalo do feto humano entre o quinto e o sexto mês de gestação (Porterfield e Hendrich, 1993).

Nos modelos experimentais de ratos, o período crítico da ação dos HTs no encéfalo acontece por volta do décimo oitavo dia de gestação até o vigésimo primeiro dia de vida pós-natal (Porterfield e Hendrich, 1993). Sendo assim, a maior parte das alterações associadas ao hipotireoidismo nesse modelo animal são observadas nas primeiras 2-3 semanas de vida pós-natal, onde ocorre um aumento na secreção dos HTs, principalmente em regiões do encéfalo que sofrem maturação após o nascimento, como o cerebelo e o hipocampo (Clos *et al.*, 1982; Vincent *et al.*, 1982; Clos e Legrand, 1990).

Já é bem estabelecido que importantes eventos do desenvolvimento do SNC ocorrem no início do desenvolvimento, como: mielinização (Fernandez *et al.*, 2009), neuritogênese (Martinez e Gomes, 2002), maturação dos sistemas de neurotransmissores (Bauer e Whybrow, 2001), plasticidade sináptica (Fernandez *et al.*, 2009) e fosforilação dos filamentos intermediários (Zamoner, Funchal, *et al.*, 2007; Zamoner, Heimfarth, Oliveira Loureiro, *et al.*, 2008). Praticamente todos os eventos de maturação do SNC são influenciados pelos HTs, e muitos dos genes envolvidos nesse processo têm a sua expressão dependente desses hormônios (Bernal, 2015). Na Figura 5 está demonstrado a linha do tempo do desenvolvimento do cérebro fetal e pós-natal de humanos em comparação com ratos, com relação aos HTs.

Sabe-se que o SNC fetal de ratos é impermeável ao T_3 e que desta maneira todo o T_3 presente no cérebro destes animais é proveniente do T_4 materno (Calvo *et al.*, 1990). O T_4 é capaz de atravessar a placenta e a barreira hematoencefálica, e uma vez dentro do SNC pode ser desiodado a T_3 (Grijota-Martinez *et al.*, 2011). Diferente do que ocorre em ratos adultos, onde a concentração de T_3 cerebral é derivada tanto do plasma, quanto da desiodação de T_4 local (Galton *et al.*, 2007).

Figura 5 - Resumo do desenvolvimento do cérebro fetal e pós-natal humano em comparação com ratos, com relação aos hormônios tireoidianos

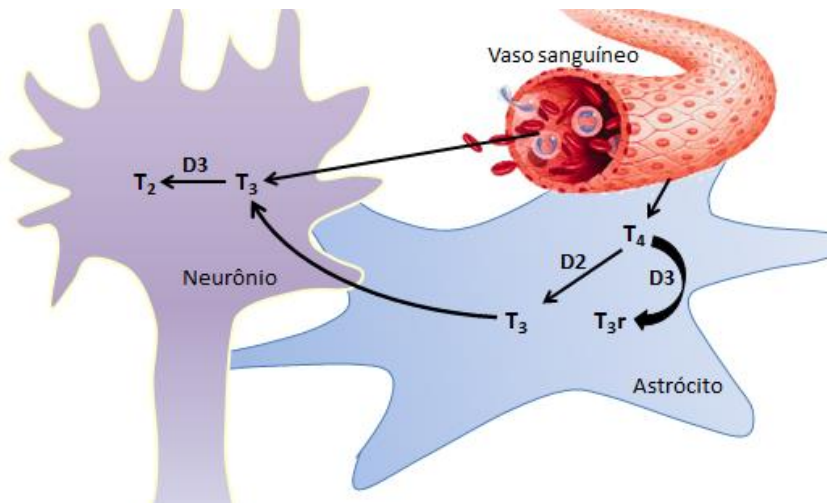


O período de gestação do rato está representado em dias, com o nascimento aproximadamente no vigésimo dia de gestação. A marcação vertical em amarelo equivale ao momento do nascimento do rato, o que corresponde aproximadamente a metade da gestação de humanos representada em 20 semanas. Após o nascimento do rato o sistema nervoso central assim como a glândula tireoide continuam a maturação, observada a direita da linha vertical amarela. A - Representa a maturação da glândula tireoide: hormônio estimulante da tireoide (TSH), secreção dos hormônios tireoidianos, receptores nucleares dos hormônios da tireoide e expressão da desidase tipo 2 (D2). A expressão da desidase tipo 3 (D3) pode ser observada desde os primeiros estágios da gestação. Os hormônios da tireoide materno estão disponíveis para o feto por quase todo tempo de gestação, e se sugere que seja uma fonte de T₄, servindo como substrato para D2 e consequente formação de T₃, como demonstrado na seta perpendicular preta. B - Representa o tempo do neurodesenvolvimento de alguns importantes fenômenos no sistema nervoso central, influenciado pelos hormônios da tireoide tanto em humanos como em ratos.

Fonte: Adaptado de Bernal, 2007.

Os astrócitos desempenham um papel central no metabolismo dos HTs no cérebro, sendo os principais transportadores de T_4 do sangue para o cérebro, responsáveis pela sua conversão para T_3 , fornecendo a forma considerada biologicamente ativa dos HTs às células neurais (Bernal, 2015) (Figura 6). As ações dos HTs na diferenciação e maturação astrocitárias incluem a produção de proteínas da matriz extracelular e fatores de crescimento, controlado assim o crescimento neuronal e neuritogênese (Trentin, 2006).

Figura 6 - Representação do papel dos astrócitos no metabolismo dos hormônios da tireoide.



A entrada dos HTs no cérebro ocorre por dois caminhos. O primeiro é através do transporte do T_4 do plasma para o astrócito via transportadores MCT8. Uma vez no astrócito, o T_4 pode ser desidiodado a T_3 ou a T_{3r} . O segundo caminho é através da captação do hormônio pelos neurônios diretamente da matriz extracelular, após atravessar a barreira hematoencefálica. Nos neurônios, o T_3 pode ser desidiodado a T_2 por ação da D3. Fonte: O autor.

Uma vez no SNC em desenvolvimento, os HTs exercem uma série de efeitos importantes, sendo que no final da gestação controlam a expressão de genes envolvidos na biogênese do citoesqueleto, migração neuronal e crescimento e ramificação dos neuritos no córtex cerebral (Schwartz *et al.*, 1997; Sampson *et al.*, 2000; Dowling *et al.*, 2001; Chatonnet *et al.*, 2015).

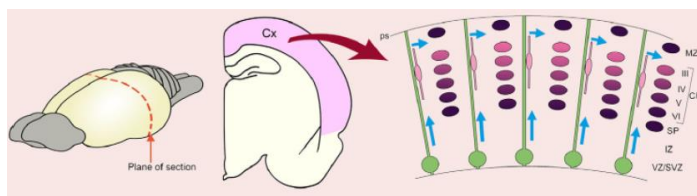
2.3.1 Córtex cerebral como alvo da ação dos hormônios da tireoide

O córtex cerebral corresponde à camada mais externa do cérebro dos vertebrados sendo um elemento anatômico e funcional onde ocorre a maior parte da interpretação, organização e armazenamento das informações sensoriais. Para cada modalidade sensorial existe uma área do córtex especializada em seu processamento. Desta maneira o córtex cerebral desempenha um papel central em diversas funções complexas do cérebro como na memória, atenção, consciência, linguagem, percepção e pensamento (Mcconnell, 1995).

De forma geral, os neurônios do neocórtex se originam na zona ventricular (ZV), um epitélio proliferativo pseudoestratificado contendo células progenitoras neurais multipotentes localizadas na superfície ventricular da parede telencefálica. Os progenitores adjacentes à superfície ventricular são chamados de progenitores radiais (ou apicais), enquanto progenitores na zona subventricular são denominados progenitores intermediários (ou basais) (Montiel *et al.*, 2016).

Os neurônios do neocortex são organizados em duas dimensões em relação à superfície cortical. Cada área é caracterizada por um conjunto distinto de características arquitetônicas (Kawamura, 2010). Na dimensão perpendicular, o córtex é composto por seis camadas (I, II, III, IV, V e VI), sendo que cada uma é definida pela densidade morfológica dos neurônios que fazem parte da sua constituição. A maioria dos neurônios são granulares, fusiformes e piramidais. Desta forma, podem ser distinguidas a área motora principal, a área sensitiva principal e a área visual (Mcconnell, 1995). A Figura 7 apresenta uma representação esquemática das camadas celulares na região parietal do córtex cerebral de ratos.

Figura 7 - Figura representativa das camadas moleculares da região parietal do córtex cerebral de ratos.



Representação esquemática das 6 camadas de neurônios do córtex cerebral de ratos. Salienta-se que essas camadas não possuem delimitação entre elas. Fonte: Adaptado de Montiel, 2015.

O aumento do número de células progenitoras e a modulação da citoarquitetura, são controlados por sinais locais e distantes durante o desenvolvimento neocortical, resultando em mudanças e eventos neurogênicos que conduzem alterações evolutivas do cérebro (Smart *et al.*, 2002). Neste sentido, destaca-se a interação do T₄ com o receptor de integrina $\alpha\beta 3$ na regulação da proliferação de células progenitoras na zona subventricular levando a expansão do neocórtex no cérebro em desenvolvimento. (Stenzel *et al.*, 2014).

Em humanos, a neurogênese do córtex cerebral ocorre em torno da décima semana de gestação, contudo em ratos esse fenômeno acontece após o nascimento, fazendo deste um excelente modelo experimental para o estudo de eventos que ocorrem dentro do útero em humanos (Porterfield e Hendrich, 1993). A atividade proliferativa da camada granular externa do córtex cerebral de ratos ainda está ativa no vigésimo dia de vida neonatal, e a ausência dos HTs nesse período resultará na organização anormal do córtex cerebral, com aumento na densidade celular bem como a redução dos neurópilos (Madeira *et al.*, 1988; Bernal, 2015). Alguns tipos específicos de células apresentam retardo na maturação e crescimento axonal, como por exemplo as células piramidais da camada V do córtex (Ruiz-Marcos *et al.*, 1982).

Os HTs têm extrema importância na formação adequada das seis camadas do córtex cerebral. A deficiência desses hormônios durante o período de desenvolvimento cortical, resulta em camadas menos definidas em resposta a distúrbios da migração celular (Berbel *et al.*, 2001).

Um dos mecanismos pelo qual os HTs podem influenciar a migração neuronal no córtex cerebral é através da regulação da expressão do gene de *Reln*. O produto deste gene é uma proteína de matriz extracelular fundamental para a ordenada migração das camadas neurocorticais, denominada Reelin, está proteína é produzida por neurônios localizados na camada I do neurocórtex, as células Cajal-Retzius (Marín-Padilla, 2015). As células de Retzius também tem um importante papel na migração de precursores neuronais no hipocampo e no estabelecimento de conexões sinápticas (Del Rio *et al.*, 1997; Bernal, 2015).

2.3.2 Papel dos hormônios da tireoide na fisiologia e função hipocampal

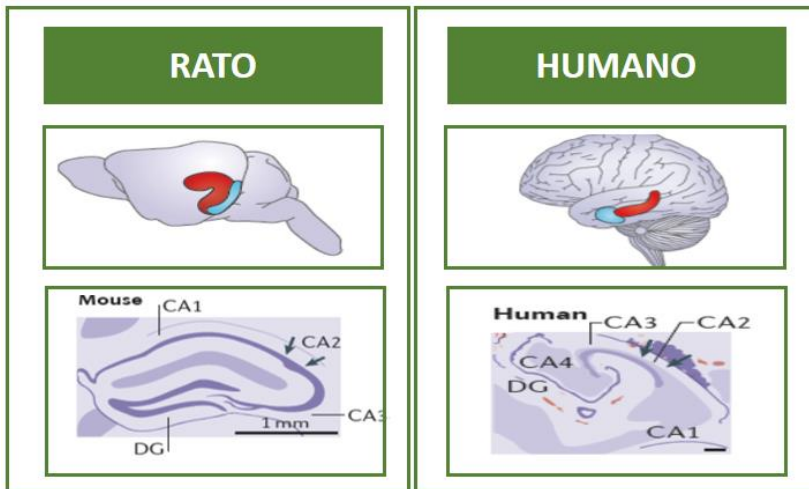
Diretamente associado ao córtex cerebral encontra-se o hipocampo, uma estrutura do lóbulo temporal medial que é criticamente envolvido na consolidação da informação a curto prazo para memória a longo prazo, bem como aprendizado e orientação espacial (Kim e Fanselow, 1992; Morris, 2006; Hou *et al.*, 2013). Esta estrutura apresenta altos níveis dos receptores nucleares para os HTs, TR α 1 e TR α 2 (Bradley *et al.*, 1989), diversos estudos indicam que a diminuição nos níveis dos HTs durante o desenvolvimento pode afetar diretamente a formação do hipocampo (Bradley *et al.*, 1989; Martinez-Galan *et al.*, 1997; Cattani *et al.*, 2013; Bernal, 2015; Mercer e Thomson, 2017).

A proliferação e a migração neuronal no hipocampo ocorrem antes mesmo do início da síntese fetal dos HTs, sendo totalmente dependentes dos hormônios maternos. Em humanos, a formação do hipocampo ocorre aproximadamente entre a 16-20 semanas após a fertilização, e em ratos esse fenômeno é observado entre 17-18 dias de gestação (Williams, 2008).

Além das diferenças na migração neuronal, é possível observar diferenças na orientação do hipocampo ao longo do eixo em roedores e humanos. Sua forma é longa e curva em ambas as espécies. O eixo longitudinal é descrito como ventro-dorsal em roedores e antero-posterior em primatas. Contudo, o mesmo circuito intrínseco é mantido ao longo dos eixos e entre as espécies (Insausti, 1993; Strange *et al.*, 2014). Na Figura 8 estão representados o hipocampo de roedores e o de humanos.

A formação hipocampal inclui além do próprio hipocampo, as áreas corticais adjacentes ao qual ele está ligado. O “cornu ammonis” (CA) é composto pelas sub-regiões: CA1, CA2 e CA3. A constituição da formação hipocampal se apresenta como: córtex entorrinal (dividida em córtices lateral e medial), giro denteado, CA1, CA2, CA3, subiculum, presubiculum e parasubiculum (Hartley *et al.*, 2014). Tais áreas estão envolvidas na regulação emocional (regiões mais ventrais) e processamento espacial (regiões dorsais) (Strange *et al.*, 2014). O giro denteado é constituído de células granulares, e é considerado uma das importantes regiões do SNC, pois possui a capacidade, ao longo da vida, de formar novos neurônios em mamíferos (Hou *et al.*, 2013).

Figura 8 - Representação esquemática da orientação do hipocampo ao longo do eixo longitudinal em ratos e humanos.



Esquema de ilustrações da orientação do hipocampo ao longo do eixo longitudinal em ratos e humanos. O eixo longitudinal é descrito como ventro-dorsal em roedores e antero-posterior em humanos. O eixo longo completo do hipocampo (vermelho) pode ser visto em cérebros de ratos e humanos, com o córtex entorrinal (CE) mostrado em azul. Desenhos de seções transversais do hipocampo de roedores e humanos corados com Nissl. GD, giro denteado; CA, “cornus ammonis”.

Fonte: Adaptado de Strange *et al.*, 2014.

As conexões neuronais no hipocampo são altamente ordenadas, de maneira que o córtex entorrinal serve como porta de entrada para a formação hipocampal, e os axônios dos neurônios no córtex entorrinal entram no GD e assim, formam as sinapses glutamatérgicas com células granulares do GD (Small *et al.*, 2011). A atividade total de neurotransmissão do tecido cerebral representa-se predominantemente pelo sistema glutamatérgico, sendo que no hipocampo, aproximadamente 80 a 90% das sinapses são também glutamatérgicas. A atividade do sistema glutamatérgico é responsável pelo gasto de aproximadamente 80% da energia do cérebro (Danbolt, 2001).

Estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa demonstraram que o hipotireoidismo congênito altera a fosforilação dos filamentos intermediários do citoesqueleto de neurônios e astrócitos, bem como induz à desregulação na homeostase do glutamato e na morfologia celular, sugerindo excitotoxicidade glutamatérgica (Zamoner, Heimfarth

e Pessoa-Pureur, 2008; Cattani *et al.*, 2013). Além disso, pesquisadores descreveram que animais com hipotireoidismo apresentam redução no volume do hipocampo (Hasegawa *et al.*, 2010).

2.4 SISTEMA GLUTAMATÉRGICO

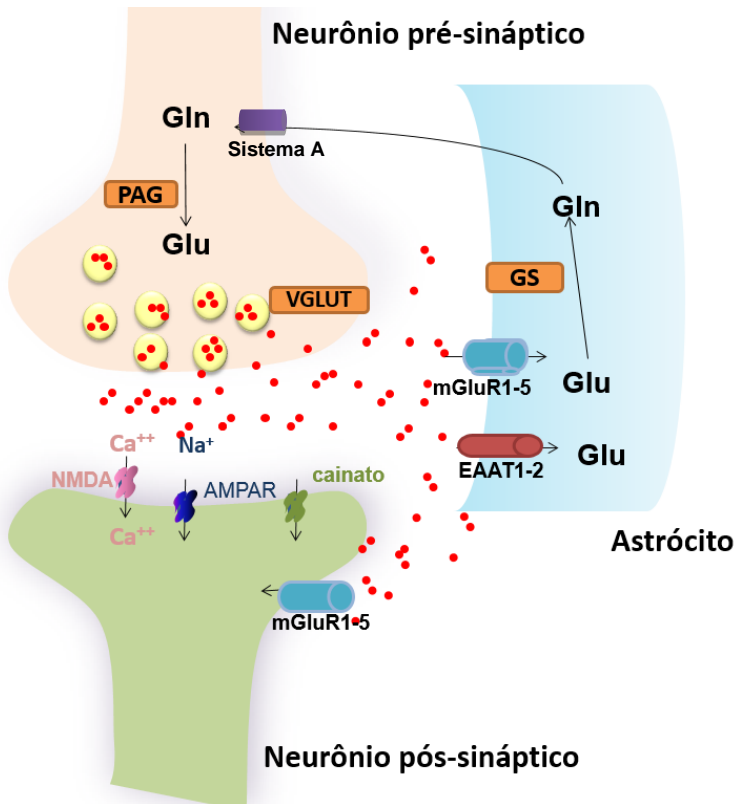
O glutamato é o principal aminoácido excitatório do SNC, e sua transmissão é mantida sob fino controle e uma vez desregulada, pode comprometer o correto funcionamento das funções neurais (Mattson *et al.*, 2008). Após ser liberado na fenda sináptica, o glutamato pode interagir com uma série de receptores e desencadear diversas funções incluindo: a formação de redes neurais durante o desenvolvimento, cognição, memória, movimento e aprendizado (Ottersen e Storm-Mathisen, 1984; Gasic e Hollmann, 1992; Hanson *et al.*, 2015).

Os receptores de glutamato (GLURs) são classificados como: ionotrópicos (iGlu) e metabotrópicos (mGluRs). Os receptores ionotrópicos são receptores de canais iônicos, cuja a abertura é favorecida quando o glutamato interage com o receptor. Dentre os receptores ionotrópicos estão os do tipo NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropionico) e cainato (Meldrum, 2000). Os receptores mGluRs por sua vez, ativam ou inibem os sistemas de segundos mensageiros através da interação com as proteínas G (Niciu *et al.*, 2012). Estes compreendem 8 subtipos de receptores (mGlu1 a mGlu8), conforme sua homologia estrutural e função farmacológica (Coutinho e Knopfel, 2002). Além disso, 5 transportadores de glutamato foram identificados no SNC de mamíferos, sendo dois deles predominantes nas células da glia e três em neurônios (Seal e Amara, 1999). O sistema de neurotransmissão glutamatérgica está representado na Figura 9.

O glutamato também pode servir como precursor para a glutamina em células gliais, e para o ácido γ -aminobarbitúrico (GABA) em neurônios GABAérgicos. Além disso, o glutamato é constituinte de proteínas e peptídeos, como a GSH (γ -glutamil-cisteinil-glicina), considerada o principal antioxidante não enzimático (Meister e Anderson, 1983; Michaelis, 1998; Danbolt, 2001; Niciu *et al.*, 2012). Contudo, tanto a diminuição nas concentrações de glutamato, quanto seu excesso podem ser prejudiciais às células. A ativação excessiva de receptores glutamatérgicos pode excitar as células nervosas e levá-las à morte por meio de um processo conhecido como excitotoxicidade glutamatérgica (Danbolt, 2001).

A entrada do glutamato no SNC é impedida pela barreira hematoencefálica, assim a maior parte do glutamato presente no cérebro é sintetizado *de novo* pelos astrócitos. O importante papel dos astrócitos nesse processo, é limitar a difusão do glutamato a partir da fenda sináptica, após sua liberação pelos neurônios. A eficiência deste mecanismo resulta em um constante tráfego de glutamato a partir dos neurônios para os astrócitos, e desta forma esse aminoácido pode ser devolvido novamente aos neurônios através do ciclo glutamato-glutamina ou então, ser degradado (Hertz *et al.*, 1999; Popoli *et al.*, 2011).

Figura 9 - Sistema de neurotransmissão glutamatérgica



A glutamina (Gln) é convertida a glutamato (Glu) pela ação da glutaminase ativada por fosfato (PAG). O Glu é empacotado em vesículas pré-sinápticas (VGLUT) e liberado pelos neurônios durante a neurotransmissão. O Glu é retirado do espaço

extracelular através dos transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs) presentes predominantemente em células gliais. Em células gliais, Glu é convertido a Gln pela glutamina sintetase. Vários receptores Glu estão presentes em neurônios pré e pós-sinápticos, bem como em células gliais. Estes incluem os receptores ionotrópicos (AMPA, NMDA e cainato), bem como receptores metabotrópicos (mGluRs). O sistema A de transporte de aminoácidos é responsável pela captação neuronal de Gln, exercendo um papel central no suprimento de Gln para a sinapse glutamatérgica. Fonte: Adaptado de Albrecht et al. (2010) e Popoli et al. (2011).

O controle rígido das concentrações de glutamato extracelular tem o intuito de impedir a morte celular através da excitotoxicidade glutamatérgica. Entretanto, quando o controle da excitação glutamatérgica é perdido, há uma hiperativação do sistema glutamatérgico, a qual gera excitotoxicidade, devido ao aumento nos níveis de Ca^{2+} e Na^+ intracelular, desencadeando assim, uma série de eventos que culminam em morte celular (Lipton e Rosenberg, 1994). Um fator crucial na manutenção da homeostase do glutamato é o equilíbrio entre a liberação e captação de glutamato (Sanacora *et al.*, 2008; Albrecht *et al.*, 2010).

2.5 METABOLISMO ENERGÉTICO CEREBRAL

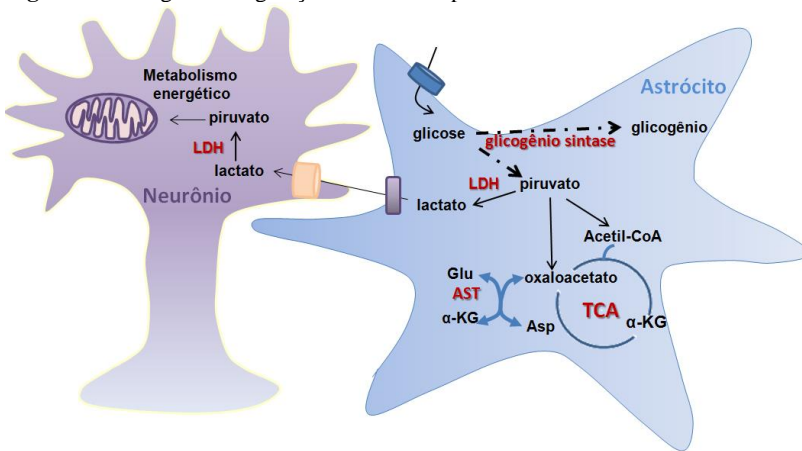
O metabolismo energético cerebral depende prioritariamente da captação de glicose e do consumo de oxigênio. Sabe-se que as células do SNC têm necessidades metabólicas diferentes, sendo que os neurônios, astrócitos, oligodendrócitos e células endoteliais dos capilares tem uma taxa elevada de metabolismo oxidativo. Contudo, todas as células do cérebro são capazes de utilizar a glicose como fonte energética, pois possuem transportadores de glicose (GLUTs), enzimas glicolíticas e enzimas do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) (Erecinska e Silver, 1990; Castro *et al.*, 2009). Uma diminuição no fornecimento de glicose para o SNC, gera uma rápida redução nos níveis de ATP e do gradiente iônico, bem como na síntese de neurotransmissores, como o glutamato (Erecinska e Silver, 1990). Por outro lado, evidências sugerem que durante a neurotransmissão, o metabolismo oxidativo neuronal é dependente do lactato derivado dos astrócitos (a hipótese do *shuttle* de lactato astrócitos-neurônio), ao invés da glicose (Castro *et al.*, 2009; Sonnewald, 2014).

A geração de lactato pelos astrócitos, ocorre por meio da metabolização da glicose. Uma vez no meio intracelular, a glicose pode ser convertida a glicogênio, através da reação da enzima glicogênio

sintase ou então pode ser metabolizada à piruvato via glicólise. Este piruvato por sua vez, pode ser convertido a lactato, pela ação da lactato desidrogenase (LDH) ou então a acetil-CoA e desta forma entrar no TCA. O α -cetoglutarato formado no TCA pode ser convertido a glutamato (Palmada e Centelles, 1998). O diagrama de geração de lactato pelos astrócitos está representada na Figura 10.

A LDH é uma enzima tetramérica no qual duas subunidades distintas combinam-se para formar as cinco isoenzimas (LDH-1, LDH-2, LDH-3, LDH-4 e LDH-5). Estudos têm demonstrado que os neurônios contêm predominantemente a LDH-1, principal produtora de piruvato. Já os astrócitos parecem expressar a LDH-5, a qual é associada à alta produção de lactato (Pellerin *et al.*, 1998). Sabe-se que os astrócitos liberam uma maior quantidade de lactato do que os neurônios, e que lactato é preferencialmente metabolizado em células neuronais (Castro *et al.*, 2009; Rodriguez-Rodriguez *et al.*, 2013).

Figura 10 - Diagrama da geração de lactato a partir dos astrócitos



A metabolização da glicose dentro do astrócito pode gerar glicogênio, através da reação da enzima glicogênio sintase ou então ser metabolizada à piruvato via glicólise. O piruvato por sua vez, é convertido a lactato, pela ação da lactato desidrogenase (LDH) ou então a acetil-CoA e desta forma entrar no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) gerando α -cetoglutarato (α -KG), o qual pode ser convertido a glutamato, tanto no astrócito quanto no neurônio pós-sináptico por transaminação. Fonte: Adaptado de Cesconetto *et al.* (2016).

É importante salientar, que a síntese de glutamato a partir da glicose ou lactato, com posterior liberação do glutamato das células, poderá esgotar o ciclo do TCA e seus intermediários. A reposição dos intermediários do ciclo do TCA, anaplerose, é, portanto, necessária para a continuada síntese de ATP. Os astrócitos são as únicas células capazes de realizar a anaplerose devido à sua expressão preferencial da piruvato carboxilase (PC), a qual é responsável por converter piruvato a oxaloacetato. Uma vez que os neurônios não possuem a capacidade de anaplerose, estes são criticamente dependentes dos astrócitos para a síntese de glutamato. Ainda, o ciclo glutamato-glutamina, responsável por transferir a glutamina a partir dos astrócitos para os neurônios, é fundamental para a síntese de glutamato nos neurônios (Coulter e Eid, 2012).

2.6 CITOESQUELETO

Todas as funções realizadas na célula são, de alguma forma, associadas a uma rede sofisticada de filamentos de proteínas com diferentes composições, distribuição e atividade, formando uma malha integrada conhecida como citoesqueleto (Huber *et al.*, 2015). Contudo, a característica mais marcante do citoesqueleto está relacionada com a sua capacidade de responder a sinais e condições aos quais as células são submetidas, desta forma o citoesqueleto está relacionado com adaptação em relação à sobrevivência (Bolin *et al.*, 2016), proliferação (Yi *et al.*, 2015), diferenciação (Compagnucci *et al.*, 2016) e migração celular (Le Clainche e Carlier, 2008).

O citoesqueleto é um ponto final das vias de sinalização, adaptando as células a comportamentos duradouros em organismos saudáveis e doentes. Na maioria das células animais o citoesqueleto forma uma rede de três subsistemas de filamentos interligados: microfilamentos (MF), microtúbulos (MT) e filamentos intermediários (FIs). Esses sistemas de proteínas atuam em conjunto juntamente com proteínas acessórias e/ou vias de sinalização que permitem que o citoesqueleto participe de inúmeras respostas celulares de sobrevivência ou morte celular (Pierozan e Pessoa-Pureur, 2017).

Os MFs e os MTs são polímeros de subunidades proteicas globulares de actina e tubulina, respectivamente, as quais são altamente conservadas nas células animais. Essas estruturas possuem a característica comum de terem sua dinâmica controlada pela hidrólise de nucleotídeos (Herrmann e Aebi, 2000). Por outro lado, os FIs são

formados pela polimerização de uma família de subunidades proteicas fibrosas, específicas para os diferentes tipos celulares (Strelkov *et al.*, 2003).

Os FIs são codificados por uma família de mais de 65 genes, que formam 5 diferentes categorias de FIs, 4 destas são proteínas citoplasmáticas e uma nuclear. O perfil de expressão dos FIs citoplasmáticos é célula- e tecido-específico, sendo que células mesenquimais e os astrócitos imaturos expressam vimentina, as musculares desmina, os astrócitos maduros proteína glial fibrilar ácida (GFAP), os neurônios neurofilamentos (NFs) e as células epiteliais citoqueratina (Albert *et al.*, 2008). Os FIs citoplasmáticos estão envolvidos em processos fisiológicos como migração celular e crescimento tecidual, e também modulam respostas celulares ao estresse metabólico, levando à morte celular programada (Depianto e Coulombe, 2004). Entretanto, ainda é um grande desafio o melhor entendimento da função dos FIs citoplasmáticos.

A GFAP é considerada um marcador astrocitário, essencial na modulação da motilidade e da estrutura celular, fornecendo estabilidade estrutural aos astrócitos. Além disso, a GFAP participa de um sistema sofisticado de comunicação recíproca entre astrócitos e neurônios (Mccall *et al.*, 1996; Eliasson *et al.*, 1999), regulando a liberação de neurotransmissores (Carmignoto, 2000). Evidências mostraram que a GFAP desempenha um papel crítico em uma variedade de funções adicionais nos astrócitos, como migração e proliferação celular, homeostase de glutamato bem como crescimento de neuritos (Middeldorp e Hol, 2011).

O principal mecanismo de regulação da dinâmica dos FIs é através da fosforilação de suas subunidades. A fosforilação/desfosforilação de proteínas tem um papel essencial em diversos aspectos de bioquímica celular, regulando o metabolismo, transcrição gênica, progressão do ciclo celular, apoptose, comunicação intracelular, funções neurais e imunológicas. Em especial a fosforilação/desfosforilação dos FIs do citoesqueleto é um dos principais mecanismos pós-transcricionais que regulam a diferenciação, rearranjo e movimentação do citoesqueleto em resposta a sinais intra e extracelulares (Johnson, 2009).

Proteínas alvo são fosforiladas por uma ampla variedade de cinases e os grupamentos fosfato das fosfoproteínas são removidos por fosfatases, traduzindo-se num processo dinâmico capaz de modular uma resposta fisiológica (Helfand *et al.*, 2005). As proteínas fosfatases também desempenham um papel importante na manutenção da

integridade estrutural dos FIs (Inagaki *et al.*, 1990; Goto *et al.*, 1998). O balanço entre as atividades de proteínas cinases e fosfatases parece ser essencial não só na modulação da estrutura e plasticidade dos FIs, como também na adesão célula-substrato, motilidade celular e reorganização dos filamentos de actina durante a interfase. O estudo do mecanismo molecular da ação dessas proteínas é de grande importância na compreensão da dinâmica das proteínas do citoesqueleto e seu envolvimento no funcionamento da célula (Inada *et al.*, 1999).

Nesse contexto, dados prévios de nosso grupo de pesquisa demonstraram que o hipotireoidismo congênito compromete a dinâmica associada ao sistema fosforilante dos FIs astrocitários (GFAP) e neuronais (NF) em córtex cerebral e hipocampo de ratos em desenvolvimento (Zamoner, Heimfarth e Pessoa-Pureur, 2008; Cattani *et al.*, 2013). Os resultados mostraram que os efeitos do hipotireoidismo congênito nessas estruturas cerebrais estão associados a modulação das vias de sinalização das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK) e desregulação do sistema redox acarretando em estresse oxidativo.

2.7 ESTRESSE OXIDATIVO

Denomina-se estresse oxidativo situações onde as células são expostas a um ambiente pró-oxidante e os mecanismos de defesa antioxidantes estão diminuídos, afetando o estado redox celular (Halliwell, 2006). Em condições fisiológicas normais, a formação de espécies reativas é mantida por um rigoroso controle de mecanismos de defesa celular. Contudo, em situações patológicas essa produção pode aumentar substancialmente, comprometendo esses mecanismos, podendo causar lesão celular por oxidação de proteínas, DNA e membranas lipídicas (Dringen, 2000; Halliwell, 2006; Weber, 2012).

Nos sistemas biológicos a maioria dos elementos pró-oxidantes provem do oxigênio, e, portanto, são denominados genericamente de espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs e seu potencial deletério vem sendo relacionado com diversas doenças, como o câncer, diabetes, doenças neurodegenerativas e também patologias associadas com a desregulação na síntese dos HTs (Stuffins e Weatherall, 1945; Gerschman *et al.*, 1954; Pasquini e Adamo, 1994; Halliwell, 2006).

O cérebro pode ser particularmente vulnerável ao estresse oxidativo devido sua alta demanda por oxigênio pela cadeia respiratória (Menon *et al.*, 2012). Esta, que por sua vez, é a maior fonte de EROs

intracelular. A maior parte da ocorrência de EROs ocorre como um resultado da redução parcial do oxigênio molecular, formando o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que pode ser precursor de várias EROs, incluindo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e o radical hidroxila ($\bullet OH$), bem como as moléculas orgânicas, tais como o radical alcoxil (RO^{\bullet}) e o radical peroxil (ROO^{\bullet}) (Dasuri *et al.*, 2013).

Embora diversos fatores possam influenciar o surgimento de EROs no cérebro, um dos principais é a excitotoxicidade glutamatérgica. A toxicidade desencadeada pelo glutamato leva a um aumento na produção de radicais livres os quais prejudicam o sistema de transporte iônico da membrana, resultando na diminuição do conteúdo de GSH (Gilgun-Sherki *et al.*, 2001; Emerit *et al.*, 2004; Kaur e Ling, 2008; Sayre *et al.*, 2008).

2.7.1 Sistemas de defesa antioxidantes

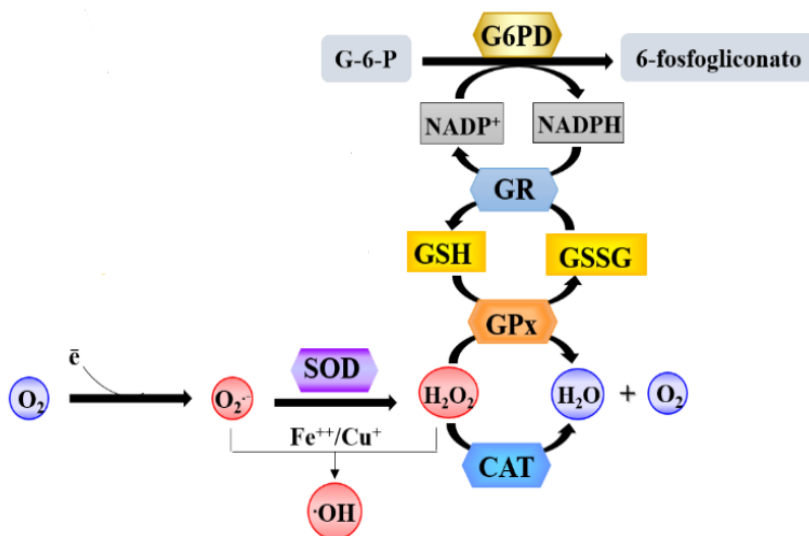
Os antioxidantes são definidos como qualquer substância que atrasa, previne ou remove o dano oxidativo a uma molécula alvo e estão presentes em todos os organismos aeróbicos (Halliwell, 2006).

Os efeitos deletérios das EROs são equilibrados pela ação de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos, esses sistemas servem como uma tentativa para as células manterem baixas quantidades do radical ânion superóxido e de peróxido de hidrogênio, prevenindo desta forma a geração do radical hidroxila, que é altamente reativo e deletério (Valko *et al.*, 2007). Sendo que o sistema de defesa antioxidante enzimático mais eficiente envolve a glutatona peroxidase (GPx), a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD). Nesse sentido, a SOD dismuta o $O_2^{\bullet-}$ gerando H_2O_2 , enquanto que a CAT e a GPx convertem o H_2O_2 em H_2O e O_2 . Esse sistema também inclui enzimas envolvidas na manutenção da GSH, como a glutatona redutase (GR) e glutamato-cisteína ligase (GCL) (Kaur e Ling, 2008). A Figura 11 esboça o funcionamento do mecanismo de defesa antioxidante das células.

Dentre os mecanismos de defesa celular não enzimáticos frente as EROs, destaca-se o tripeptídeo, L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina (Gly-Cis-Glu) conhecido como glutatona reduzida (GSH), considerado o antioxidante mais importante de baixo peso molecular sintetizado em células. A GSH possui papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na detoxificação celular de EROs nas células do SNC, como por exemplo as células gliais (Dringen, 2000; Dickinson e Forman, 2002; Forman *et al.*, 2009).

A GSH participa nas reações de detoxificação de compostos eletrofilicos ao atuar como substrato para ação da enzima glutationa-S-transferase (GST). Também atua como doador de elétrons na redução do H_2O_2 catalisada pela GPx. Essa doação de elétrons para detoxificação de peróxidos leva formação de GSSG, a qual é reduzida novamente a GSH pela ação da GR dependente de NADPH. O NADPH é proveniente do ciclo das pentoses pela enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) (Halliwell e Whiteman, 2004; Dammeyer e Arner, 2011). A depleção nos níveis de GSH através da conjugação ou perda pela excreção de GSSG demandam reposição através da síntese *de novo* de GSH (Dickinson e Forman, 2002).

Figura 11 - Representação esquemática do sistema de defesa antioxidante das células.



A superóxido dismutase (SOD) dismuta o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) gerando peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A catalase e a glutaciona peroxidase (GSH peroxidase) convertem o H_2O_2 em H_2O e O_2 . A glutaciona reduzida (GSH) atua como doadora de elétrons na redução do H_2O_2 catalisada pela GPx. Essa doação de elétrons leva formação de glutaciona oxidada (GSSG), a qual é reduzida novamente a GSH pela ação da glutaciona redutase (GSH redutase) dependente de NADPH proveniente do ciclo das pentoses pela ação da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-P desidrogenase). Fonte: adaptado de Halliwell e Gutteridge, 2006.

A biossíntese da GSH ocorre no ambiente intracelular e dependente da disponibilidade dos aminoácidos que a constituem. Nesse

contexto destaca-se a ação da γ -glutamil transferase (GGT), uma glicoproteína ligada a membrana celular, responsável pela transferência de grupos γ -glutamil da GSH para inúmeros aminoácidos ou peptídeos. Sua ação permite a captação de cisteína, elemento limitante para a síntese *de novo* de GSH (Meister e Anderson, 1983). A GGT, portanto, é responsável pela degradação da GSH aumentando a disponibilidade dos aminoácidos para síntese proteica e principalmente para síntese *de novo* de GSH, desempenhando desta maneira um papel crítico na defesa antioxidante (Zhang *et al.*, 2006).

Estudos demonstraram que a ausência dos HTs, leva a formação de EROs, associado com um declínio nas concentrações de GSH (Rahaman *et al.*, 2001). Nesse sentido, pesquisadores sugerem que os HTs estimulam a síntese de GSH, através da regulação da atividade da γ -glutamilcisteína (Dasgupta *et al.*, 2007). Em concordância com esses resultados, nosso grupo de pesquisa demonstrou previamente que o hipotireoidismo induz excitotoxicidade glutamatérgica e estresse oxidativo no hipocampo de ratos imaturos (Cattani *et al.*, 2013), reforçando a importância dos HTs para o correto funcionamento dos sistemas de defesa frente a espécies reativas.

2.8 HIPÓTESE E DIVISÃO DO ESTUDO

O grupo de pesquisa coordenado pela Profa. Dra. Ariane Zamoner Pacheco de Souza tem contribuído muito para o esclarecimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na sinalização celular induzida pelos HTs em diferentes modelos experimentais. Resultados anteriores do grupo demonstraram que o hipotireoidismo congênito está associado com a desregulação do sistema fosforilante associado ao citoesqueleto e à indução da excitotoxicidade glutamatérgica (Zamoner, Heimfarth e Pessoa-Pureur, 2008; Cattani *et al.*, 2013). O grupo demonstrou também que os HTs, T₃ e T₄, induzem o influxo de Ca²⁺ (Zamoner, Royer, *et al.*, 2007) e a fosforilação dos filamentos intermediários (Zamoner *et al.*, 2006; Zamoner, Heimfarth e Pessoa-Pureur, 2008) em córtex cerebral de ratos em desenvolvimento por meio de mecanismos rápidos, independentes da síntese *de novo* de proteínas. Os efeitos dos HTs foram mediados pela modulação do sistema GABAérgico e de cascatas de sinalização celular envolvendo proteínas cinases.

Além disso, resultados prévios demonstraram que o T_{3r}, metabólito considerado biologicamente inativo durante muito tempo, é

capaz de modular o sistema de defesas antioxidantes e a atividade de enzimas envolvidas no metabolismo energético por meio de mecanismos não genômicos envolvendo as MAPKs, a PKA, a CaMKII e o influxo de cálcio (Domingues, 2014).

Considerando-se os dados do presente estudo e dos trabalhos anteriores demonstrando ações genômicas e não genômicas dos HTs, nossas metas vislumbram novas possibilidades de trabalho com a finalidade de elucidar o mecanismo de ação desses hormônios no desenvolvimento do sistema nervoso e na fisiopatologia do hipotireoidismo. Pretende-se compreender os mecanismos moleculares envolvidos das disfunções tireoidianas no início de desenvolvimento cerebral e comprovar a hipótese de que o T_{3r} pode ser um importante modulador de processos fundamentais para o desenvolvimento do SNC (Figura 12). Esta é uma proposta inovadora, visto que pretende demonstrar o T_{3r} não como um metabólito inativo, mas como um hormônio fundamental nos estágios iniciais do desenvolvimento cerebral.

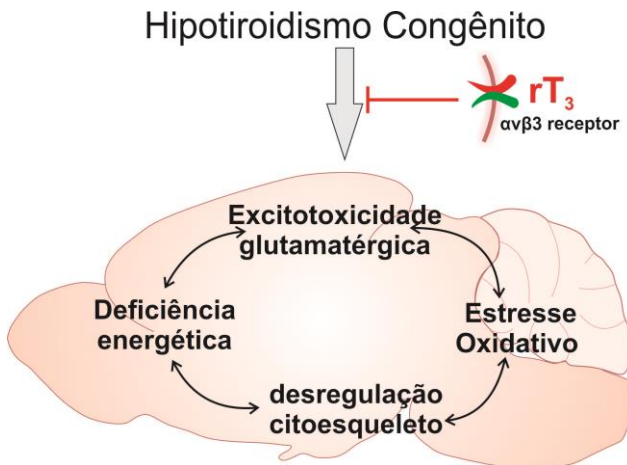
Neste trabalho foi utilizado um modelo experimental de hipotireoidismo congênito e avaliado a possível ação neuroprotetora do hormônio T_{3r} frente ao estresse oxidativo e excitotoxicidade glutamatérgica gerados pelo hipotireoidismo congênito, através do tratamento *ex vivo* de fatias de hipocampo com T_{3r} 1nM por 30 minutos e/ou tratamento *in vivo* com T_{3r} 50 ng/Kg no 12^o, 13^o e 14^o dias de vida (TRABALHO I e II). Foi investigado também o possível dano neurotóxico no córtex cerebral de ratos em desenvolvimento com hipotireoidismo congênito, através do fenômeno de excitotoxicidade glutamatérgica (TRABALHO III). Para isso, o presente trabalho foi dividido em 3 estudos:

- Estudo I: Interação do T_{3r} com o receptor de integrina $\alpha v \beta 3$ e restauração da atividade de enzimas envolvidas no metabolismo glutamatérgico e energético no hipocampo de ratos com hipotireoidismo em desenvolvimento.

-Estudo II: Efeito do T_{3r} sobre parâmetros do estresse oxidativo e morfologia do hipocampo de animais eutireoideos e hipotireoideos em desenvolvimento;

-Estudo III: Efeitos do hipotireoidismo congênito sobre a homeostase do glutamato, parâmetros oxidativos, morfológicos e comportamentais no córtex cerebral de animais em desenvolvimento.

Figura 12 - Possíveis danos do hipotireoidismo congênito e a ação protetora do T_3



O hipotireoidismo congênito desregula diversos sistemas no SNC de ratos em desenvolvimento como a homeostase do glutamato, o metabolismo energético, enzimas envolvidas no sistema de defesa antioxidante e a fosforilação do citoesqueleto. Nossa hipótese de estudo é que o T_3 interage com o receptor de integrina $\alpha v \beta 3$ e dessa forma pode ser capaz de reverter esses danos. Fonte: Adaptado de Domingues *et al.*, 2017.

3 METODOLOGIA

3.1 MATERIAIS

As substâncias radioativas, [$^{45}\text{Ca}^{2+}$]- CaCl_2 (sp. act. 321 KBq/mg Ca^{2+}), ^{14}C -2-deoxi-D-glicose (^{14}C -DG), (sp act 9.25 GBq/mmol), [^{14}C]-glutamato (atividade específica 1,85MBq) e ([^{14}C] -MeAIB) (sp.act. 1.85 GBq/mmol), foram obtidos da “Du Pont NEN Products” (Boston, EUA), [^{32}P] Na_2HPO_4 foi obtido da CNEN (São Paulo, Brasil), e o líquido de cintilação biodegradável Optiphase Hisafe III foi adquirido da Perkin Elmer (São Paulo, SP, Brasil). Os reagentes referentes às análises bioquímicas, foram adquiridos da marca Sigma (St. Louis, MO, EUA). Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico. Para a medida das absorvâncias das atividades enzimáticas foi utilizado o leitor de placas Tecan Infinito® 200 PRO. Anticorpo de camundongo anti-NeuN (Núcleo NEUronal; clone A60) obtido da Chemicon Internacional (São Paulo, Brasil). Anti-GFAP, anti-NeuN de camundongo monoclonal - MAB377 (Burlington, Massachusetts, EUA) e anticorpo secundário Alexa 568 de camundongo.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos com 15 dias de idade, período em que ocorre o pico de sinaptogênese ou ratas Wistar fêmeas gestantes, provenientes do Biotério Central da UFSC, os quais foram mantidos em gaiolas com controle do ciclo claro/escuro 12/12 h a $23 \pm 2^\circ\text{C}$, com água e ração *ad libitum*. Foram seguidos os Princípios Éticos do COBEA durante todos os experimentos. O protocolo de pesquisa foi aprovado pela CEUA/UFSC (PP00318 e PP00820).

3.2.1.1 Ensaios *in vivo*

Para indução do hipotireoidismo, ratas Wistar fêmeas foram expostas ao PTU 0,05% na água de beber desde o 8º dia gestacional até os filhotes completarem 15 dias de idade, que corresponde ao período imaturo do desenvolvimento. Os animais foram eutanasiados por decapitação, seguida de rápida remoção do hipocampo e córtex cerebral para a realização dos testes bioquímicos. As fatias foram

homogeneizadas nos tampões específicos dependendo da determinação bioquímica a ser realizada.

3.2.1.2 Tratamento *in vivo* com T_{3r}

Ratos Wistar machos com hipotireoidismo congênito receberam injeções i.p. de T_{3r} (50 ng/Kg de peso corporal) por 3 dias consecutivos a partir do 12º dia de idade pós natal e os experimentos foram realizados 24 horas após a última injeção, quando os animais tinham 15 dias de idade (Figura 13).

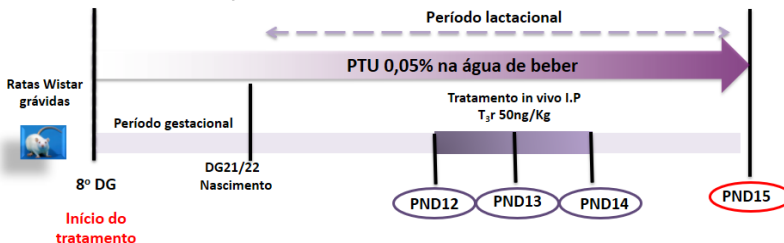
3.2.1.3 Preparação das fatias de hipocampo e córtex cerebral

Os ratos foram eutanasiados por decapitação, o hipocampo e o córtex cerebral foram dissecados em placas de Petri em gelo e após ambas as estruturas foram cortadas em fatias de 400µm com o chopper McIlwain.

3.2.1.4 Tratamento *ex vivo* das fatias do hipocampo

Para todos os experimentos com tratamento *ex vivo* com os HTs, as fatias de hipocampo foram previamente pré-incubadas por 15 min a 37°C, em solução salina balanceada de Hanks (HBSS = CaCl₂ 1,29 mM, NaCl 136,9 mM, KCl 5,36mM, MgSO₄ 0,65 mM, Na₂HPO₄ 0,27 mM, KH₂PO₄ 1,1 mM, D-glicose 2 mM e Hepes 5 mM) seguido por uma incubação de 30 minutos com ou sem os hormônios T_{3r} (1nM).

Figura 13 - Desenho experimental da indução do hipotireoidismo congênito e tratamento *in vivo* com T_{3r}



O tratamento das fêmeas gestantes com PTU 0,05% na água de beber iniciou no oitavo dia gestacional (DG). No DG21/22 os filhotes nasceram e continuaram a exposição ao PTU através do leite materno, o período lactacional durou por todo período experimental. No 12º, 13º e 14º dias de vida pós-natal (PND 12, 13 e 14) os animais que foram utilizados nos experimentos *in vivo* foram tratados com

injeções intra-peritoniais com T_{3r} 50ng/Kg, no 15º dia de vida pós-natal (PDN15) os animais foram eutanasiados por decapitação e o hipocampo e o córtex cerebral foram removidos para as análises bioquímicas.

3.2.2 Captação de ¹⁴C-glutamato

A captação teve início com a adição de 0,33 µCi/mL L-[¹⁴C]-glutamato. As fatias permaneceram por 10 minutos nesse meio de captação. A incubação foi interrompida com a retirada do meio de captação e lavagem por duas vezes com HBSS gelado. Solução de NaOH 0,1 N/SDS 0,01% foi adicionada para solubilização das fatias (Cesconetto *et al.*, 2016). Após a completa solubilização foi determinado o conteúdo intracelular de glutamato pela avaliação de cintilação líquida, medida em espectrômetro de cintilação líquida (Modelo LS 6500, Multi-Purpose Scintillation Counter-Beckman Coulter, Boston, USA). A captação de glutamato foi corrigida para a captação independente de Na⁺, sendo este sal substituído por cloreto de colina. Os resultados são expressos como nmol [¹⁴C]-glutamato/mg proteína/min.

3.2.3 Influxo de ⁴⁵Ca²⁺

Após a pré-incubação, o meio foi trocado por HBSS fresco com 0,1 µCi/mL ⁴⁵Ca²⁺ e o tecido incubado durante 30 minutos. O ⁴⁵Ca²⁺ extracelular foi totalmente lavado com solução de lantânio (NaCl 127,5 mM, KCl 4,6 mM, MgSO₄ 1,2 mM, HEPES 10 mM, Glicose 11 mM, LaCl₃ 10 mM) pH 7,2 a 2°C, interrompendo o fluxo de cálcio na preparação (Batra e Sjogren, 1983). Após 10 min a solução de cloreto de lantânio foi removida e o tecido foi homogeneizado em solução NaOH 0,5 M. A concentração de proteínas em cada amostra foi determinada. Alíquotas do homogeneizado foram colocadas em líquido de cintilação para a determinação da radioatividade, que foi realizada em espectrômetro de cintilação líquida (Modelo LS 6500, Multi-Purpose Scintillation Counter-Beckman Coulter, Boston, USA). Os resultados foram expressos como pmol ⁴⁵Ca²⁺/µg proteína (Zamoner, Royer, *et al.*, 2007).

3.2.4 Captação de ¹⁴C-2-Desoxi-D-glicose

Para determinação da captação de ¹⁴C-2-desoxi-D-glicose (¹⁴C-DG), fatias de hipocampo de ratos de 15 dias de idade, trados *in vivo*

durante 3 dias com T₃r, foram pré-incubadas, em seguida o tecido foi incubado por 30 min em HBSS fresco contendo D-glicose 2 mM e ¹⁴C-desoxiglicose 0,2 µCi/mL. Após a incubação, o tecido foi lavado com HBSS gelado e digerido com NaOH 0,5 M. Alíquotas da amostra foram colocadas em líquido de cintilação e a radioatividade foi medida em espectrômetro de cintilação líquida (Modelo LS 6500, Multi-Purpose Scintillation Counter-Beckman Coulter, Boston, USA). Os resultados foram expressos em mg de glicose/mL/µg de proteína (Cesconetto *et al.*, 2016).

3.2.5 Captação de aminoácidos neutros

No estudo do transporte de aminoácidos, fatias de córtex cerebral foram pré-incubadas em tampão HBSS por 15 min a 37°C, para estabilização. No período de incubação (30 min), o tecido foi transferido para um meio igual ao anterior, porém, na presença do aminoácido modelo do sistema A de transporte, o [¹⁴C]- Ácido metilaminoisobarbitúrico (MeAIB) (3,7 kBq/mL) (Silva *et al.*, 2002). Após a incubação as fatias foram lisadas em NaOH 0,5 M. Após o processamento das amostras, alíquotas de 25 µL do líquido tissular e do meio de incubação foram utilizadas para medir a radioatividade do [¹⁴C]- MeAIB em um espectrômetro de cintilação líquida (Modelo LS 6500, Multi-Purpose Scintillation Counter-Beckman Coulter, Boston, USA). Os resultados foram expressos pela razão da radioatividade no tecido e no meio de incubação, avaliada pelo número de contas por minuto (cpm), por mL do líquido tissular/número de contas por minuto por mL do líquido de incubação por µg de proteína (T/M).

3.2.6 Cultura primária de astrócitos do córtex cerebral

A cultura primária de astrócitos do córtex cerebral de ratos Wistar foi preparada como descrito previamente por (Gottfried *et al.*, 2003). Resumidamente, os córtex cerebrais de ratos eutireoideos e hipotireoideos recém-nascidos (1-2 dias de idade) foram removidos e as células isoladas por dissociação mecânica e enzimática, seguida de sedimentação e, posteriormente cultivadas em meio DMEM (pH 7,6), contendo: HEPES 8,39 mM, NaHCO₃ 23,8 mM, fungizona 0,1%, gentamicina 0,032% e suplementado com soro fetal bovino 10%. A confluência da cultura de astrócitos ocorreu aproximadamente no 14º

dia. As células viáveis foram então utilizadas para os protocolos de fosforilação da GFAP e imunoblotting.

3.2.7 Fosforilação da proteína glial fibrilar ácida (GFAP)

3.2.7.1 Incorporação ^{32}P *in vitro*

As fatias de hipocampo ou os astrócitos em cultura foram primeiramente pré-incubados a 30°C por 20 min em um tampão Krebs-Hepes contendo em mM: NaCl₂ 124, KCl 4, MgSO₄ 1,2, NaHEPES 25 (pH 7,4), glicose 12, CaCl₂ 1 e os seguintes inibidores de protease: benzodiamina 1mM, leupeptina 0,1 μM, antipaina 0,7 μM, pepstaina 0,7 μM e 0,7μM quimostatina. Após a pré-incubação o meio foi trocado e a incubação seguiu a 30°C com 100μl com o meio básico contendo 80μCi de [^{32}P] ortofosfato para as fatias de hipocampo ou 10μCi de [^{32}P] ortofosfato nas culturas primárias de astrócitos corticais, com ou sem a adição de T₃r 1nM. A reação seguiu por 30 minutos para as fatias de hipocampo, ou por 1 h para os astrócitos em cultura, a 30°C e foi interrompida com 1 mL de solução de NaF gelado contendo em mM: NaF 150, EDTA 5, EGTA 5, Tri-HCl 50, pH 6,5 e os inibidores de protease descritos acima. As fatias/células em cultura foram então lavadas duas vezes com o tampão com NaF para remover o excesso de radioatividade. As frações citoesqueléticas enriquecidas com filamentos intermediários foram obtidas das fatias de hipocampo ou das células em cultura. Resumidamente, após a incorporação de ^{32}P , as amostras foram homogeneizadas com 400μL em tampão de alta força iônica contendo em mM: 5 KH₂PO₄ (pH 7,1), 600 KCl, 10 MgCl₂, 2 EGTA, 1 EDTA, 1% Triton X-100 e os inibidores de protease descritos acima. O homogeneizado foi centrifugado a 15.800 x g por 10 minutos a 4°C, em um centrífuga Eppendorf, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso e homogeneizado com o mesmo volume do tampão de alta força iônica gelado. O homogeneizado foi centrifugado novamente como descrito acima e o sobrenadante descartado. O pellet enriquecido em FIs insolúveis em Triton X-100, contendo GFAP, foi dissolvido em SDS 1% e a concentração de proteínas foi determinada (Lowry *et al.*, 1951).

3.2.7.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A fração do citoesqueleto foi preparada como descrito acima. As amostras foram diluídas 25% (v/v) uma solução contendo 40% de

glicerol, 5% de mercaptoetanol, 50mM de Tris-HCl, pH 6,8 e fervidas por 3 minutos. Concentrações iguais de proteínas foram transferidas para o gel de poliacrilamida 10% e analisadas por SDS-PAGE de acordo com o sistema descontínuo de Laemli (Laemmli, 1970). Os geis foram expostos a filmes radiográficos a -70 °C por 3-5 dias.

3.2.7.3 Quantificação da incorporação de ^{32}P na GFAP

A radioatividade incorporada na GFAP foi quantificada através da digitalização das autoradiografias através do *scanner* Hewlett-Packard Scanjet 6100C e a densidade ótica foi determinada com o software OpiQuant versão 02.00 (Packard Instrument Company). Os valores da densidade óptica foram obtidos através da banda correspondente da GFAP. Os valores dos controles foram normalizados a 100% e as mudanças nas porcentagens nas amostras foi calculada. Os geis corados com Coomassie Blue foram utilizados como controle de carga.

3.2.8 Análises de *Western blot*

As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida e posteriormente transferidos para uma membrana de nitrocelulose. As membranas de nitrocelulose foram lavadas por 10 minutos em tampão Tris (TBS; NaCl 0,5M, 20mM Trizma pH 7,5), seguido por uma incubação de 2 h em uma solução de bloqueio contendo leite desnatado (MTBS). Após a incubação, o blot foi lavado duas vezes por 5 minutos com TBS 0,05%; Tween-20 (TTBS), e incubado overnight a 4 °C em solução bloqueadora contendo o anticorpo primários anti-GFAP (clone G-A-5) diluído 1:500. O “blotting” foi então lavado duas vezes por 5 minutos com TTBS e incubado por 2 horas em TBS contendo anticorpo secundário IgG anti-camundongo conjugado com peroxidase diluído 1:1000. Além disso, para os experimentos com anticorpos foram utilizados os seguintes controles: apenas anticorpo primário, apenas anticorpo secundário e controle negativo (amostra sem o antígeno de interesse). Os controles indicaram a especificidade e sensibilidade dos anticorpos utilizados. O “blotting” foi revelado usando o *kit* comercial Immobilon™ Western.

3.2.9 Determinação da atividade enzimática

As fatias de córtex cerebral e hipocampo foram pré-incubadas por 15 minutos em tampão HBSS e, quando especificado, o hormônio T₃r (1nM) foi adicionado ao meio de incubação por 30 minutos.

3.2.9.1 Glutamina Sintetase (GS)

A atividade da GS foi realizada de acordo com o método descrito por (Petito *et al.*, 1992) e modificado por (Dos Santos *et al.*, 2006). Os tecidos foram homogeneizados em Tampão de Lise (KCl 150 mM). À uma alíquota de 100 µL do homogeneizado foi adicionado 100 µL de meio de reação contendo Imidazol-HCl 100 mM (pH 7,4), Glutamato 50 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM, Hidroxilamina 50 mM, MgCl₂ 10 mM e ATP 10 mM e incubados por 30 min a 37 °C. A reação foi parada por adição de 400 µL de uma mistura contendo FeCl₃ 370 mM, HCl 670 mM, TCA 200 mM, seguido por centrifugação a 10.000 x g por 10 min e leitura da absorbância do sobrenadante. O produto da reação, γ -glutamilhdroxamato, foi medido a 540 nm utilizando um leitor de ELISA e convertido para a quantidade de produto formado por comparação com uma curva padrão de γ -glutamilhdroxamato. A atividade enzimática foi expressa como mM hidroxamato/mg proteína (Shapiro e Stadtman, 1970; Dos Santos *et al.*, 2006).

3.2.9.2 Gama-Glutamil-Transferase (GGT)

Após a incubação as fatias foram homogeneizadas em tampão Tris HCl 100 mM pH 8,5. A atividade enzimática da GGT foi realizada através da técnica modificada descrita por (Orlowski e Meister, 1963), utilizando o grupo glutamil, da γ -Glutamyl-p-Nitroanilida como substrato e a glicilglicina como molécula aceptora, com liberação de p-Nitroanilina, a qual é diazotada, gerando um composto final de cor rósea. Alíquotas do homogeneizado foram incubadas com o substrato enzimático por 90 min a 37 °C e a reação enzimática foi bloqueada pela adição de ácido acético. Foi realizada a leitura da absorbância a 530 nm. Resultados foram expressos como U/L/µg proteína.

3.2.9.3 Atividade da glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD)

A atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) foi determinada através da reação com G6PD na presença do NADP⁺, que

catalisa a oxidação da G-6P a 6-fosfogliconato. O NADPH produzido foi quantificado de modo cinético durante 10 minutos. Os resultados foram calculados pela avaliação do aumento da densidade óptica por minuto (declínio) da amostra contra o “declínio” da atividade enzimática do padrão da G6PD. Resultados foram expressos como U/ μ g de proteína.

3.2.9.4 Atividade da Colinesterase

Após a incubação as fatias de córtex foram homogeneizadas em 300 μ l de tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 7,4. Na reação a colinesterase (CHE) catalisa a hidrólise do substrato de butiriltiocolina liberando tiocolina e butirato. A atividade catalítica da colinesterase (CHE) na amostra analisada é diretamente proporcional ao decréscimo da absorbância medida em 405 nm quando o ferricianeto (amarelo) é reduzido para ferrocianeto (incolor) pela ação da tiocolina. A atividade foi expressa em U/mg de proteína.

3.2.9.5 Alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST)

Após a incubação com os hormônios, as fatias de hipocampo foram homogeneizadas em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4 e a atividade enzimática foi medida colorimetricamente. A alanina aminotransferase (ALT/TGP) catalisa especificamente a transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato com formação de glutamato e piruvato. A aspartato aminotransferase (AST/TGO) catalisa especificamente a transferência do grupo amina do aspartato para o cetoglutarato com formação de glutamato e oxaloacetato. Ambas as enzimas também catalisam as reações inversas. Tanto o piruvato quanto o oxaloacetato formado reagem com a 2-4-dinitrofenilhidrazina formando a hidrazona que adquire coloração máxima pela adição de hidróxido de sódio. A intensidade de coloração é proporcional à atividade enzimática da amostra, e é medida espectrofotometricamente em um comprimento de onda de 505 nm. Os resultados foram expressos como U/L/ μ g proteína.

3.2.9.6 Atividade da lactato desidrogenase (LDH)

Após a incubação as fatias foram homogeneizadas em tampão Tris-HCl 0,2 M pH 7,4, e a atividade da LDH foi determinada segundo

(Bermeyer e Bergmeyer, 1983). A quantificação da atividade da LDH foi baseada na oxidação de NADH a NAD⁺ e os resultados foram expressos em U/L/mg de proteína.

3.2.10 Conteúdo de GSH

Os níveis de GSH foram medidos em fatias de córtex e hipocampo de animais controle e hipotireoideos. O tecido foi homogeneizado em ácido tricloroacético 12% (1:10, P:V), seguido por centrifugação a 5000 xg durante 5 minutos. Uma alíquota de 50 µL das amostras foi acrescentada em 950 µL de Tampão Fosfato 0,2 M pH 8,0. Posteriormente, 100 µL de ácido 5,5'-Ditio-bis(2-nitrobenzóico) 2,525 mM (DTNB; Reagente de Ellman) foram adicionados a cubeta e a absorbância foi medida em comprimento de onda de 412 nm (Beutler *et al.*, 1963). GSH reage com DTNB e por redução de GSSG, a GSH total (GSH + GSSG) pode ser medida. DTNB reage com GSH para produzir um ânion conjugado, TNB, que pode ser detectado por fluorescência ou absorbância e é proporcional à quantidade inicial de GSH (Forman *et al.*, 2009). Os resultados foram expressos em gráficos como conteúdo de GSH em mmol/µg proteína.

3.2.11 Detecção de espécies reativas de oxigênio

A formação de EROs foi medida utilizando a sonda diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA), permeável as células. Esterases celulares hidrolisam a sonda para o não fluorescente 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCF), que é retido nas células. Na presença de EROs e peroxidases celulares, H₂DCF é transformada no 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), substância altamente fluorescente (Halliwell e Whiteman, 2004). Fatias de córtex e hipocampo foram homogeneizadas em solução contendo fosfato de sódio 20 mM e KCl 140 mM, pH 7,4, com posterior centrifugação (960xg por 10 min a 4°C). Em placa preta de 96 poços, 10 µL de H₂DCFDA 1 mM (preparado em DMSO e protegido da luz) foram adicionados em 90 µL de sobrenadante, seguido de uma incubação no escuro a 37°C por 30 min. O produto foi detectado em comprimento de onda de excitação de 485 nm e comprimento de onda de emissão de 520 nm. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias, sendo os valores corrigidos pela concentração de proteína de cada amostra.

3.2.12 Lipoperoxidação tecidual (TBARS)

A avaliação do dano oxidativo lipídico foi realizada no homogeneizado através da detecção de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), destacando-se o produto majoritário, malondialdeído (MDA), produzindo uma base de Schiff de coloração rosa, os quais são derivados de oxidação do processo de lipoperoxidação (Bird e Draper, 1984). O método consiste na precipitação do homogenato (100 μ L) com 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 12%, seguido da incubação em 900 μ L de tampão tris-HCl 60 mM 7,4 e 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,73% durante 60 min. a 100 °C. Posteriormente, o material foi resfriado em banho de gelo, centrifugado (5.000 x g por 5 min), e a mensuração do cromóforo rosa foi detectada 535 nm, os valores foram expressos em nmol MDA.g⁻¹.

3.2.13 Determinação da atividade das enzimas antioxidantes

As fatias de hipocampo foram homogeneizadas em uma solução contendo fosfato de sódio 20mM, pH 7,4; Triton 01% e NaCl 150 mM (1:20 p/v). As determinações foram realizadas utilizando o sobrenadante após a centrifugação do homogeneizado (5.000 x g durante 5 min).

3.2.13.1 Glutathione redutase (GR)

Para o ensaio da GR os homogeneizados do hipocampo foram submetidos ao método de (Carlberg e Mannervik, 1985), o qual mensura em 340 nm a taxa de oxidação do NADPH devido à formação de GSH, a partir da GSSG, pela ação desta enzima presente na amostra. Um meio de reação contendo tampão fosfato 0,1 M pH 7,0; 8,6 mg de NADPH; 30,6 mg de glutathione oxidada e DPTA 5 mM foi adicionado na cubeta (0,95mL), e a adição de 50 μ L do homogenato do hipocampo deu início à reação que foi monitorada durante 3 minutos, gerando uma curva descendente. Os valores da atividade desta enzima foram também expressos em μ mol. g⁻¹.min⁻¹.

3.2.13.2 Glutathione peroxidase (GPx)

Para a análise enzimática de GPx o método de (Flohe e Gunzler, 1984) foi utilizado, a reação é baseada na redução de tert-butilhidroperóxido (t-BuOOH) pela oxidação de GSH e formação de

GSSG, catalisada pela GPx, e consequente regeneração de GSH através da enzima GR, com oxidação de NADPH em 340 nm. Portanto, a velocidade de oxidação do NADPH é proporcional à atividade de GPx na amostra. Para a realização da técnica, foi preparado um meio de reação contendo 25 ml de tampão fosfato 0,1 M (pH 7.0), 8,6 mg de NADPH, 10 mL de ácido dietilenotriaminopentacético (DPTA) a 5 mM, 15 mL de água destilada, 24 mg de GSH, e 5 U de GR, no momento do ensaio. Em seguida, foram adicionados 10 μ L de t-BuOOH e 10 μ L do homogenato do hipocampo em 1 mL de um meio de reação na cubeta. Os valores foram expressos em $\mu\text{mol.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

3.2.13.3 Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada segundo o método descrito por (Aebi, 1984), que é baseado na velocidade de degradação do peróxido de hidrogênio (10 mM) em tampão fosfato 50 mM pH 7,0. Adicionou-se 2 mL desta solução na cubeta, com acréscimo de 20 μ L do homogenato de hipocampo, em seguida realizou-se leitura da queda da absorbância em 240 nm durante 30 segundos. Os valores foram expressos em $\text{mmol.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

3.2.13.4 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi realizada de acordo com o método de (Misra e Fridovich, 1972), modificado por (Boveris *et al.*, 1983), mediante a oxidação da adrenalina (mudança de pH 2.0 para pH 10.0) que produz o ânion superóxido e um cromóforo róseo, o adrenocromo, o qual é mensurado em 480 nm. A uma alíquota da amostra, de 5 a 40 μ L, foram acrescentados 200 μ L de tampão glicina 50 mM, pH 10.2, seguido pela realização de uma leitura pontual. Após, foi adicionado uma solução com adrenalina 60 mM (pH em torno de 2.0, gelo e frasco âmbar), seguido pelo monitoramento da reação por 10 minutos. A adição da adrenalina retarda a oxidação e consequentemente a produção de adrenocromo através da enzima SOD. Curvas de 3 ou 4 pontos permitiram avaliar indiretamente a atividade enzimática da SOD. Os valores da SOD (USOD/mL) foram expressos em termos de atividade da enzima, onde uma unidade arbitrária de SOD é definida como a quantidade de SOD necessária para diminuir à metade a velocidade de formação do adrenocromo.

3.2.14 Determinação da Viabilidade Celular

A determinação da viabilidade celular foi feita por meio do teste do MTT (3-4,5-dimetiltiazol-2yl-2,5-di-fenil brometo de tetrazolina). As fatias de hipocampo foram pré-incubadas por 15 min. em tampão HBSS, (quando necessário, o T₃r foi incubado no tempo de 30 min). Após as fatias foram incubadas com MTT, a uma concentração final de 0,5 mg/mL, em HBSS durante 30 minutos a 37°C em placa sob agitação. Após a primeira incubação, foi removido completamente o meio contendo MTT e foi adicionado 200 µL de DMSO. Novamente a placa foi incubada sob agitação, até a fatia ficar esbranquiçada e então solubilizar-se completamente ao meio. A intensidade de coloração (azul escuro, que corresponde a quantidade de formazan) reflete o estado funcional da cadeia respiratória e é medida espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 560 e 650 nm simultaneamente. Durante todo o procedimento a placa permaneceu protegida da luz. As fatias de hipocampo foram de 400 µm e o teste foi feito em duplicata.

3.2.15 Concentração de proteínas

A concentração de proteínas foi avaliada pelo método de (Lowry *et al.*, 1951). Uma curva padrão utilizando a albumina de soro bovino (Sigma®) foi utilizada para calcular os níveis de proteína nas amostras.

3.2.16 Procedimentos histológicos para contagem de células no córtex cerebral

Os animais eutireoideos e hipotireoideos foram anestesiados com xilazina: cetamina e perfundidos com tampão fosfato-salino (PBS) contendo heparina (50 mL). A administração da solução salina com heparina foi realizada em temperatura ambiente e em quantidade suficiente para permitir um retorno vascular quase transparente. Em prosseguimento, foi administrado solução fixadora filtrada (aproximadamente 100 mL por animal) composta de formaldeído a 4%, recém-preparada a partir de paraformaldeído em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4 em temperatura ambiente. Após a perfusão, o cérebro foi retirado, pesado e colocado na mesma solução de fixação por 72 h. Após a fixação, o cérebro foi lavado durante 1 hora em água corrente, desidratado em concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 90%, 95% e etanol absoluto) e eliminados com xilol. Os cérebros foram

então incorporados em resina paraplástica (Histosec). Cortes de 6 μm de espessura foram obtidos com um micrótomo e coletados em série. O tecido foi corado com violeta de cresyl, e então os cortes foram desidratados através de uma série de álcool, limpos com xileno e cobertas com Entellan. A camada de células do I, II e III, IV, V e VI do córtex cerebral foram identificadas com o auxílio de atlas (Paxinos, 2013).

3.2.17 Imunohistoquímica do córtex cerebral de ratos para GFAP e NeuN

Após a perfusão, como descrito acima, os encéfalos dos animais eutireoideos e hipotireoideos foram submetidos à crioproteção em solução de sacarose a 30% em tampão fosfato de sódio (PBS) 0,1M pH 7,4 por 48h. Após a crioproteção, os encéfalos foram cortados no plano coronal em secções seriadas de 30 μm , obtidas em micrótomo. Os cortes foram recolhidos sequencialmente a cada 100 μm . Posteriormente, os cortes foram processados para imunohistoquímica para marcação de GFAP ou NeuN. Para o método da imunoperoxidase os cortes foram inicialmente lavados 3 vezes de 10 minutos em PBS 0,1M, com posterior inibição da peroxidase endógena através de incubação por 30 min com solução de peróxido de hidrogênio a 3% em PBS-TX (PBS 0,1M acrescido de 0,3% de triton X-100). Posteriormente os cortes foram cuidadosamente lavados e pré-incubados PBS-Tx contendo 3% de soro normal de cabra (NGS) durante 30 min. Então, os cortes foram incubados com anticorpo policlonal anti-GFAP de coelho diluído 1: 150 ou anticorpo anti-NeuN de camundongo, diluído 1:500 em 3% NGS em PBS-Tx por 48 horas à 4°C. O anticorpo NeuN reconhece especificamente a ligação do DNA, a proteína específica de neurônio NeuN, que está presente na maioria dos neurônios. A distribuição da proteína NeuN aparentemente está restrita aos núcleos neuronais (Mullen *et al.*, 1992), enquanto a GFAP é uma proteína de FI usada como biomarcador de astrócitos. Depois de várias lavagens com PBS-Tx, os cortes foram incubados em uma solução anti-IgG de coelho diluída 1:50 em PBS-Tx à temperatura ambiente durante 2 horas. Os cortes foram lavados novamente em PBS e incubados em anti-IgG de coelho (para GFAP) ou anti-IgG de camundongo (para NeuN) peroxidase-anti-peroxidase (PAP) diluído 1:500 em PBS durante 2 horas a temperatura ambiente. A reação de imunohistoquímica foi realizada incubando os cortes em um meio histoquímico contendo 0,06% de 3'3'-diaminobenzidina (DAB) dissolvido em PBS durante 10 min e depois em uma solução contendo 1 μM de H_2O_2 a 3% por mL de

meio DAB por 10 min. Posteriormente, os cortes foram lavados em PBS, montados em lâminas gelatinizadas, secos a temperatura ambiente ou estufa e cobertos com Entellan e lamínulas. Os tecidos de todos os animais neste experimento foram processados (perfusão e imunodeteção) no mesmo dia, usando as mesmas soluções para evitar mudanças nos antecedentes e diferenças na reação cromogênica.

3.2.18 Estimativa da densidade numérica de células neuronais e gliais no córtex cerebral

As análises dos cortes histológicos submetidos à técnica de imunohistoquímica e de Nissl foram feitas através de microscopia de luz em campo claro. A localização e denominação das regiões analisadas basearam-se no atlas de referência neuroanatômica para roedores (Paxinos, 2013) e em cortes histológicos corados pela técnica de Nissl que auxiliaram na localização citoarquitetônica. As imagens foram capturadas com um microscópio invertido (Olympus IX83), sendo digitalizadas 5 imagens/corte de cada animal. As imagens foram avaliadas com o programa *CellSens Dimension 1.12* e as análises estatísticas realizadas com o programa *GraphPad Prism 5*. Os cortes foram visualizados com um aumento de 40X. Os neurônios com um núcleo bem focado foram contados. Foram contados os núcleos das células que estavam dentro da área de teste ($7.000.000 \mu\text{m}^2$), mas não que não tocassem duas bordas da área teste previamente escolhida (linhas proibidas). O centro do núcleo, em oposição ao topo do núcleo, foi medido.

3.2.19 Imunofluorescência do hipocampo para NeuN

Os encéfalos foram fixados com 4% de paraformaldeído por 48 horas em temperatura ambiente e crioprotetidos por imersão em solução crescente de sacarose (15% e 30%), diluída em PBS (0,1M, pH 7,4), a 4 °C, até a submersão completa do material na solução. Os encéfalos foram, então, congelados rapidamente (vitrificação) por imersão em isopentano resfriado com CO₂ e armazenados em freezer (-80°C) para análises posteriores. Cortes coronais seriados de 40 μm de espessura do hipocampo foram obtidos utilizando-se o criostato a -20°C (Thermo Scientific). Os cortes foram processados para realização da técnica *free floating* de marcação por imunofluorescência para a proteína NeuN, sendo incubados por 48 horas a 4°C com anticorpo monoclonal anti-NeuN produzido em camundongo (Milipore, MAB377) diluído 1:1000

em PBS com 1% de BSA e 0,2% de Triton X-100. Após os cortes foram lavados cinco vezes com PBS a temperatura ambiente, por 5 min cada lavagem. A seguir, os cortes foram incubados com o anticorpo Alexa 568 anti-camundongo, diluído 1:500 em PBS com 1% de BSA e 0,2% de Triton X-100, durante 1 h a temperatura ambiente. Os cortes foram lavados cinco vezes com PBS a temperatura ambiente, por 5 min cada lavagem e a seguir foram transferidos para lâminas, montados com Fluor Save e cobertos com lamínulas. O controle negativo foi feito pela omissão do anticorpo primário. A análise da imunomarcação foi realizada com a utilização do microscópio de fluorescência Olympus BX41.

3.2.20 Quantificação da Imunofluorescência

Para a quantificação da imunomarcação da proteína NeuN, foram capturadas de oito a dez imagens com a objetiva de 10X (magnificação total de 100X), de cortes diferentes, para cada um dos animais dos dois grupos experimentais. As imagens foram convertidas para a escala de 8 bits e de cada imagem foram quantificadas três áreas (triplicata), de igual tamanho (474 μm), da região CA1 do hipocampo, sendo realizada a correção do background para cada uma das imagens. Durante a captura das imagens, todas as condições de iluminação e magnificação foram mantidas iguais entre os grupos experimentais. A quantificação da imunofluorescência foi realizada com o programa ImageJ.

3.2.21 Teste de função locomotora: performance no *foot-fault test*

Este teste é uma ferramenta utilizada para avaliar a função locomotora em roedores. O teste consiste em uma superfície de grade na qual o rato é colocado e livre para explorar. O número de vezes que o rato tenta colocar o peso em um pé que cai entre as grades de arame é marcada. Essa ação é denominada de número de erros na realização da tarefa ou número de “Foot-faults”. Este teste foi validado como uma avaliação sensório-motora (Grill *et al.*, 1997).

3.2.22 Ensaio de Docagem Molecular

O ensaio de docagem molecular foi realizado em parceria com o Prof. Dr. Guilherme Razzera (Departamento de Bioquímica/UFSC). O software Autodock vina (Trott e Olson, 2010) foi utilizado para o

acoplamento molecular. O receptor de integrina $\alpha\beta3$ (PDB 1L5G) foi preparada para o encaixe usando Chimera 10.1 (Pettersen *et al.*, 2004) em parâmetros padrão considerando pH 7, em campo de força AMBER (Wang e Bordey, 2008). O ligante T₃ reverso foi selecionado a partir do banco de dados de Zinc, código 4097418 (<http://zinc.docking.org>). Resíduos flexíveis, 3Å do centro ligado ao ligante (sítio de ligação do peptídeo RGD), foram utilizados para correr a análise de acoplamento. A postura ΔG com RMSD inferior ao ligante cristalográfico foi selecionado para análise de ligação ao ligante com o software LigPlot (Wallace *et al.*, 1996).

3.2.23 Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de determinações feitas em duplicatas em 3 a 4 experimentos independentes. As comparações estatísticas foram realizadas através do teste “t” de Student, ANOVA de uma via ou ANOVA de duas vias seguidos do pós-teste de Bonferroni quando necessário, utilizando-se o programa INSTAT versão 2.02. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para um “p” igual ou menor que 0,05.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foi utilizado o modelo experimental de hipotireoidismo congênito induzido pelo tratamento com PTU nas ratas prenhas, que já foi previamente validado pelo nosso grupo de pesquisa (Zamoner, Barreto, *et al.*, 2008; Zamoner, Heimfarth e Pessoa-Pureur, 2008; Cattani *et al.*, 2013). Nossa equipe tem buscado demonstrar os efeitos dos HTs sobre o sistema reprodutor e o sistema nervoso central de ratos em desenvolvimento através de modelos experimentais de hipertireoidismo e hipotireoidismo congênito, bem como de exposição *ex vivo* aos HTs. Nesse sentido, a ênfase dos estudos do grupo está na investigação do mecanismo de ação rápido, não genômico, dos HTs em células neurais e em outros sistemas (Zamoner *et al.*, 2005; Zamoner *et al.*, 2006a; Zamoner *et al.*, 2006b; Zamoner, Royer, *et al.*, 2007; Zamoner *et al.*, 2007c; Zamoner, Heimfarth, Oliveira Loureiro, *et al.*, 2008; Zamoner, Heimfarth e Pessoa-Pureur, 2008; Cattani *et al.*, 2013). Logo, o modelo experimental de hipotireoidismo congênito, bem como os estudos dos efeitos “*ex vivo*” e “*in vivo*” dos HTs já estão padronizados no Laboratório, utilizando metodologias que permitem avaliar os efeitos desses hormônios nos diferentes sistemas biológicos.

No presente trabalho foi dado ênfase no estudo das consequências do hipotireoidismo congênito durante o período de neurodesenvolvimento de ratos. Apoiados nos trabalhos prévios do grupo de pesquisa e em dados da literatura científica internacional sobre os danos gerados pela ausência dos HTs no hipocampo em desenvolvimento, iniciamos uma pesquisa pioneira investigando a capacidade do hormônio T_{3r}, por muito tempo considerado uma metabólito inativo dos HTs, em reestabelecer algumas das consequências neuroquímicas, o desbalanço redox e as alterações histológicas do hipotireoidismo congênito no hipocampo de ratos em desenvolvimento (Estudo I e II).

Além disso, com o intuito de dar continuidade às investigações do grupo a cerca dos danos celulares e moleculares gerados pelo hipotireoidismo congênito no córtex cerebral de ratos em desenvolvimento (Zamoner, Royer, *et al.*, 2007; Zamoner, Heimfarth e Pessoa-Pureur, 2008), investigamos as consequências dessa disfunção da tireoide no córtex cerebral de animais em desenvolvimento (Estudo III). No estudo III foram investigadas as consequências do hipotireoidismo congênito em parâmetros neuroquímicos, na histologia e na função do córtex sensorio-motor de ratos em desenvolvimento.

Cada estudo supracitado (I, II e III) está apresentado separadamente nesta tese de doutorado contendo a descrição dos resultados bem como discussão e conclusão parciais.

Os três estudos foram intitulados da seguinte maneira:

- ESTUDO I: Interação do T_3r com o receptor de integrina $\alpha\beta_3$ e restauração da atividade de enzimas envolvidas no metabolismo glutamatérgico e energético no hipocampo de ratos com hipotireoidismo em desenvolvimento.

- ESTUDO II: Efeito do T_3r sobre parâmetros do estresse oxidativo e morfologia do hipocampo de animais eutireoideos e hipotireoideos em desenvolvimento.

- ESTUDO III: Efeitos do hipotireoidismo congênito sobre a homeostase do glutamato, parâmetros oxidativos, morfológicos e comportamentais no córtex cerebral de ratos em desenvolvimento.

4.1 ESTUDO I: INTERAÇÃO DO T_{3r} COM O RECEPTOR DE INTEGRINA $\alpha\beta 3$ E RESTAURAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO GLUTAMATÉRGICO E ENERGÉTICO NO HIPOCAMPO DE RATOS COM HIPOTIREOIDISMO EM DESENVOLVIMENTO.

Neste estudo avaliamos a capacidade do tratamento com o hormônio T_{3r} restaurar os efeitos do hipotireoidismo congênito sobre a captação do glutamato, bem como as vias de sinalização envolvidas no mecanismo de ação desse hormônio, com enfoque no papel do receptor de integrina $\alpha\beta 3$ no mecanismo de ação hormonal. Além disso, investigamos o papel do T_{3r} no metabolismo energético e na fosforilação da GFAP. Para tanto, utilizamos o modelo experimental de hipotireoidismo congênito em ratos em desenvolvimento com ênfase em mecanismos genômicos e não genômicos de ação do T_{3r} através de ações *ex vivo* – rápidas e *in vivo* – clássicas, no hipocampo de filhotes.

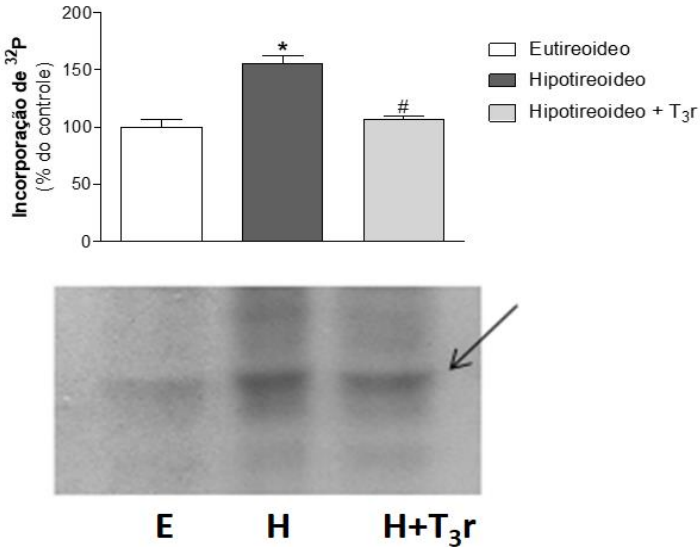
Resultados demonstrados na dissertação de mestrado mostraram algumas ações *ex vivo* do T_{3r}, principalmente relacionado às vias de sinalização implicadas na ação desse hormônio (Domingues, 2014). Esta tese de doutorado contém resultados *ex vivo* e resultados *in vivo* que permitem um melhor entendimento das ações do T_{3r} no hipocampo de ratos em desenvolvimento. Utilizamos análises de modelagem molecular para propor que as ações de T_{3r} podem ter início através da interação com o receptor de integrina $\alpha\beta 3$.

Na abordagem *ex vivo*, as fatias de hipocampo de ratos hipotireoideos com 15 dias de idade foram incubadas com T_{3r} 1nM durante 30 minutos. Na abordagem *in vivo*, o T_{3r} (50ng/Kg de peso corporal) foi administrado por via intraperitoneal (i.p.) por 3 dias consecutivos nos filhotes eutireoideos e hipotireoideos a partir dos 12 dias de idade pós-natal. As análises bioquímicas foram realizadas em fatias de hipocampo de ratos de 15 dias de idade (24 horas após a última administração hormonal).

4.1.1 Efeito do T_{3r} na homeostase da fosforilação da GFAP

Nossos resultados demonstraram que o hipotireoidismo congênito leva a hiperfosforilação da GFAP no hipocampo de ratos em desenvolvimento. O tratamento *ex vivo* por 30 minutos com T_{3r} nas fatias hipocampais desses animais foi capaz de restaurar a fosforilação ao nível dos animais eutireoideos (Figura 14).

Figura 14 - Efeito do tratamento *ex vivo* do T₃r sobre a fosforilação da GFAP em animais hipotireoideos.



Fatias de hipocampus de ratos eutireoideos e hipotireoideos com 15 dias de idade foram incubadas com ³²P-ortofosfato na ausência ou presença de T₃r 1 nM, durante 30 min. A fração citoesquelética enriquecida em FIs foi extraída, analisada por SDS-PAGE e a radioatividade incorporada na GFAP foi medida determinando os valores de densidade óptica para a banda correspondente à proteína. Os resultados foram expressos como média ± SEM de 6 animais em cada grupo e expressos em % do controle. As diferenças estatisticamente significativas foram determinadas por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de múltiplas comparações de Bonferroni: *p < 0,0001 em comparação com o grupo eutireoideo; #p < 0,0001 em comparação com o grupo hipotireoideo. A autorradiografia representativa da incorporação de ³²P nas proteínas da fração citoesquelética enriquecida com FIs está demonstrada. E = eutireoideo; H= hipotireoideo; H+T₃r = hipotireoideo + T₃r. A seta indica a banda correspondente a GFAP.

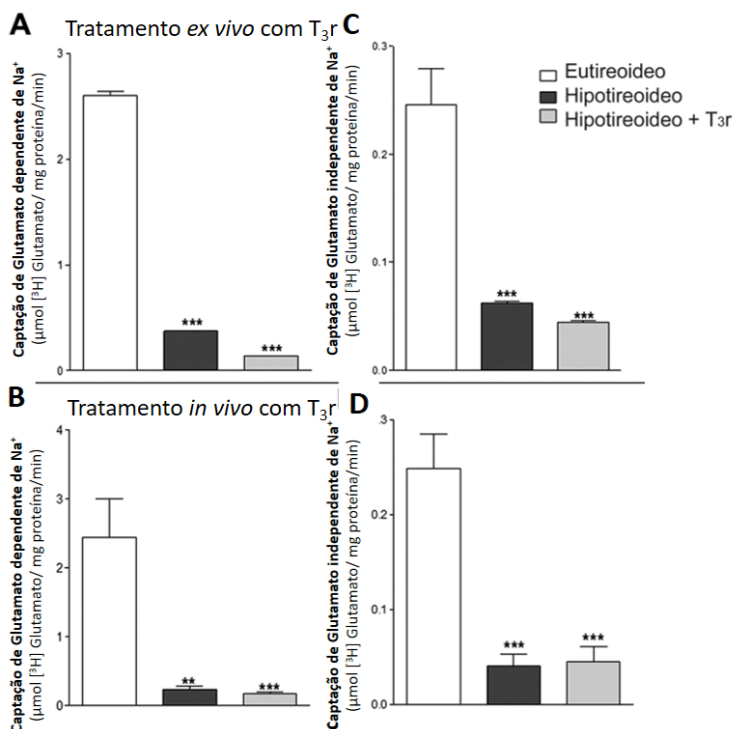
4.1.2 Efeito do T₃r na captação de ¹⁴C-L-glutamato e influxo de ⁴⁵Ca²⁺ no hipocampo de ratos hipotireoideos.

Com intuito de investigar a captação do glutamato em fatias de hipocampo de animais hipotireoideos e a habilidade do T₃r reestabelecer esse possível desequilíbrio, analisamos a captação de ¹⁴C-glutamato dependente de Na⁺, também conhecido como sistema X_{AG} e a captação

de ^{14}C -glutamato independente de Na^+ , sistema X_C^- (Danbolt, 2001; Kanai e Hediger, 2003). Sabe-se que esses dois sistemas são necessários para manter a homeostase do glutamato no cérebro (Melendez *et al.*, 2016).

Nossos resultados mostraram uma regulação negativa em ambos sistemas de captação de glutamato (X_AG e X_C^-) no hipocampo de animais hipotireoideos. Além disso, o tratamento *ex vivo* e o *in vivo* com $\text{T}_{3\text{r}}$ não foi capaz de restaurar a homeostase do glutamato em nenhum dos dois sistemas (Figura 15A, 15B, 15C e 15D).

Figura 15 - Efeitos do tratamento *ex vivo* e *in vivo* do $\text{T}_{3\text{r}}$ sobre a captação de ^{14}C -glutamato no hipocampo de animais hipotireoideos.

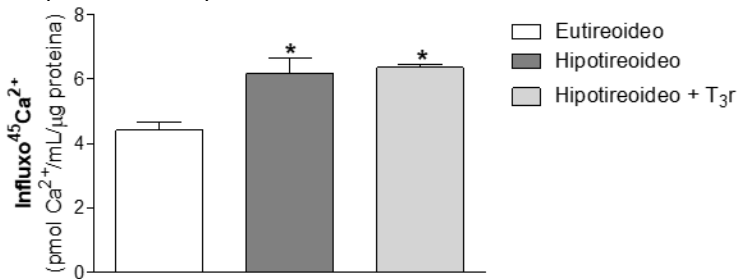


Tratamento *ex vivo* por 30 minutos com $\text{T}_{3\text{r}}$ (1 nM) – A. e C. e *in vivo* por 3 dias consecutivos (50ng/kg de peso) – B. e D. Captação de ^{14}C -glutamato dependente de Na^+ (A e B). Captação de ^{14}C -glutamato independente de Na^+ (C e D). Os resultados foram expressos com média \pm E.P.M de oito animais por grupo. Análises estatísticas

ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Bonferroni: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$ em comparação com o grupo eutireoideo.

Dados anteriores demonstraram que o hipotireoidismo congênito aumenta a captação de Ca^{2+} e o tratamento *ex vivo* com T_3r (1nM) por 30 minutos nas fatias de hipocampo foi capaz de diminuir o influxo de Ca^{2+} (Domingues, 2014). Entretanto, observamos no presente estudo que o tratamento *in vivo* com T_3r (50ng/kg) não foi capaz de reverter o efeito do hipotireoidismo no influxo de Ca^{2+} (Figura 16).

Figura 16 - Efeitos do tratamento *in vivo* do T_3r sobre o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no hipocampo de animais hipotireoideos.

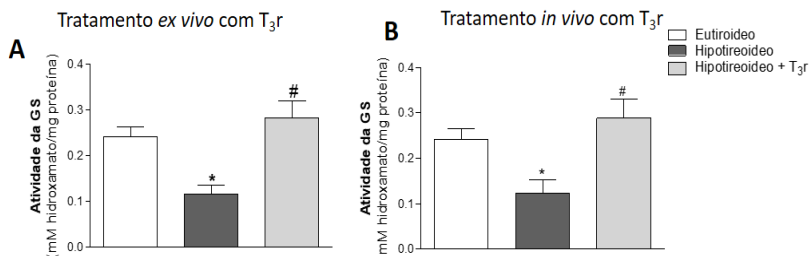


Tratamento *in vivo* por 3 dias consecutivos (50ng/kg de peso) sobre o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no hipocampo de ratos hipotireoideos. Os resultados foram expressos com média \pm E.P.M de oito animais por grupo. Análises estatísticas ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Bonferroni: * $p < 0,05$; em comparação com o grupo eutireoideo.

4.1.3 Efeito do T_3r na atividade da glutamina sintetase e das transaminases no hipocampo de ratos hipotireoideos.

O glutamato extracelular captado pelos astrócitos através dos transportadores presentes na membrana das células gliais irá reagir com a amônia para formar glutamina, reação mediada pela enzima GS. Essa enzima faz parte do ciclo glutamato-glutamina e está ativamente envolvida no metabolismo do glutamato. Portanto, devido ao papel chave dessa enzima no metabolismo do glutamato sua atividade também foi avaliada nesse estudo. Nossos resultados mostraram que há uma diminuição da atividade da GS nos animais hipotireoideos em desenvolvimento e que o tratamento *in vivo* e *ex vivo* com o T_3r foram capazes de restaurar a atividade da enzima (Figura 17 A e B).

Figura 17 - Efeitos do tratamento *ex vivo* e *in vivo* do T₃r sobre a atividade da enzima glutamina sintetase no hipocampo de animais hipotireoideos.

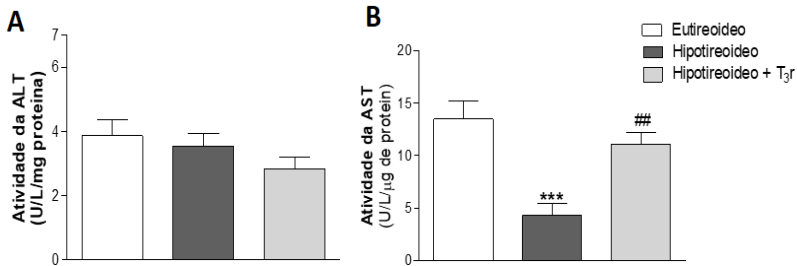


Tratamento *ex vivo* por 30 minutos com T₃r (1 nM) – A. e *in vivo* por 3 dias consecutivos (50ng/kg de peso) – B. sobre a atividade enzimática da GS. Os dados foram expressos com média ± E.P.M de 6 animais em cada grupo. Análise estatística ANOVA de uma via seguido pelo pós teste de Bonferroni: *p <0,01; em comparação com o grupo eutireoideo; #p<0,01; com o grupo hipotireoideo.

Além de sofrer amidação e ser convertido em glutamina, o glutamato também tem um papel ativo nas reações de transaminação que levam a produção de energia através do metabolismo mitocondrial. Desta maneira, analisamos a atividade da alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). Dados prévios do grupo de pesquisa demonstraram que o hipotireoidismo congênito não altera a atividade da ALT, mas diminuiu a atividade da AST em hipocampo de ratos em desenvolvimento. Além disso, observou-se que a atividade da AST pode ser reestabelecida após o tratamento *ex vivo* por 30 minutos com T₃r (Domingues, 2014).

Nesse contexto, no presente estudo investigou-se se o tratamento *in vivo*, por 3 dias consecutivos, com T₃r poderia modificar a atividade dessas aminotransferases. Os resultados mostraram que assim como após tratamento *ex vivo*, o tratamento *in vivo* não modificou a atividade da ALT. Contudo, semelhante ao que foi observado anteriormente, o tratamento dos filhotes hipotireoideos por 3 dias consecutivos com T₃r foi capaz de restaurar a atividade da AST (Figura 18A e 18B).

Figura 18 - Efeitos do tratamento *in vivo* do T₃r sobre a atividade das enzimas aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase no hipocampo de animais hipotireoideos.



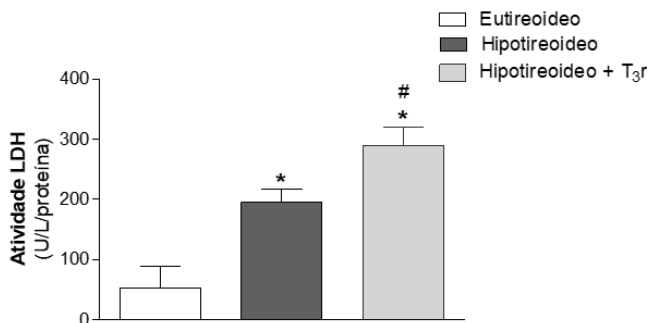
Tratamento *in vivo* por 3 dias consecutivos (50ng/kg de peso) sobre a atividade enzimática. (A) alanina aminotransferase (ALT); (B) aspartato aminotransferase (AST). Os dados foram expressos com média \pm E.P.M de 6 animais em cada grupo. Análise estatística ANOVA de uma via seguido pelo pós teste de Bonferroni *** $p < 0,0001$ em comparação com o grupo eutireoideo; ## $p < 0,001$ em comparação com o grupo hipotireoideo.

4.1.4 Efeito do T₃r no transporte da glicose e na atividade da LDH no hipocampo de ratos hipotireoideos.

Estudo anterior do grupo demonstrou que o hipotireoidismo congênito não altera a captação de ¹⁴C-DG em fatias de hipocampo de ratos imaturos. Por outro lado, após exposição *ex vivo* das fatias hipocampais com T₃r, observou-se um incremento na captação e acúmulo de glicose intracelular (Domingues, 2014). Contudo, o mesmo não foi observado após exposição *in vivo* ao hormônio (dados não mostrados).

Considerando-se que o tratamento curto, por 30 min, com T₃r foi capaz de estimular a captação de ¹⁴C-DG em fatias de hipocampo de ratos imaturos, investigamos se esse hormônio era capaz de modular a atividade da LDH nessas mesmas condições de tratamento. A LDH catalisa a interconversão de piruvato e lactato envolvendo a coenzima NAD⁺. Os resultados mostraram aumento atividade de LDH no hipocampo de animais hipotireoideos. Além disso, observamos que o aumento na captação de glicose está de acordo com a indução na atividade enzimática da LDH após tratamento *ex vivo* com T₃r (Figura 19).

Figura 19 - Efeitos do tratamento do T_{3r} *ex vivo* sobre a atividade da LDH.

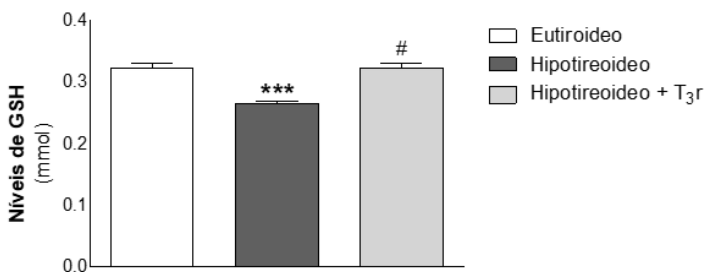


Efeito do tratamento *ex vivo*, por 30 minutos, com T_{3r} (1 nM) sobre atividade da LDH no hipocampo de ratos hipotireoideos. Os resultados foram expressos com média ± E.P.M. de 8 animais em cada grupo. Análise estatística ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Bonferroni: *p<0,01 comparado com o grupo eutireoideo; #p<0,05 comparado com o grupo hipotireoideo.

4.1.5 Efeito do T_{3r} no conteúdo de glutatona e na atividade da gama-glutamil transferase no hipocampo de ratos hipotireoideos.

Demonstramos previamente que o hipotireoidismo congênito diminui o conteúdo de GSH no hipocampo de ratos em desenvolvimento, e T_{3r} foi capaz de restaurar esse efeito após exposição *ex vivo* por 30 min (Domingues, 2014). No presente estudo demonstramos que o tratamento *in vivo* com T_{3r} também foi capaz de restaurar os níveis da GSH em hipocampo de ratos hipotireoideos (Figura 20).

Figura 20 - Efeitos do tratamento *in vivo* do T_{3r} no conteúdo de GSH.

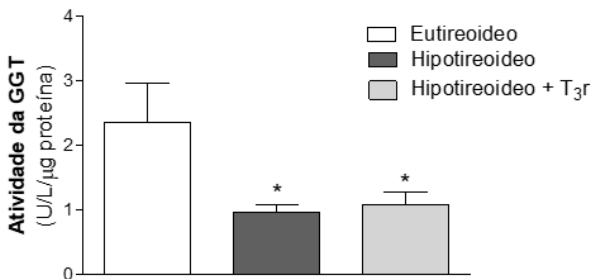


Efeito da administração *in vivo* com T_{3r} (50ng/kg de massa corpórea) por três dias consecutivos no conteúdo de GSH no hipocampo de ratos hipotireoideos. Os resultados foram expressos com média ± E.P.M de 8 animais em cada grupo.

Análise estatística ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Bonferroni: *** $p < 0,001$ em comparação com o grupo eutireoideo; # $p < 0,05$ em comparação com o grupo hipotireoideo.

O metabolismo da GSH pode ser modulado pela atividade da GGT. Resultados prévios de nosso grupo de pesquisa mostraram que o hipotireoidismo congênito causa diminuição na atividade da GGT em fatias de hipocampo de ratos imaturos, que é revertida pela exposição *ex vivo* com T_{3R} por 30 min (Domingues, 2014). Contudo, no presente trabalho verificamos que o tratamento *in vivo* dos filhotes com T_{3R} não foi capaz de restaurar a atividade GGT em hipocampo de ratos hipotireoideos (Figura 21). Analisando os dados em conjunto, sugere-se que o T_{3R} exerce um efeito rápido, não genômico e não sustentado sobre a modulação da atividade da GGT em células de hipocampo de ratos imaturos.

Figura 21 - Efeitos do tratamento *in vivo* do T_{3R} sobre a atividade da GGT.



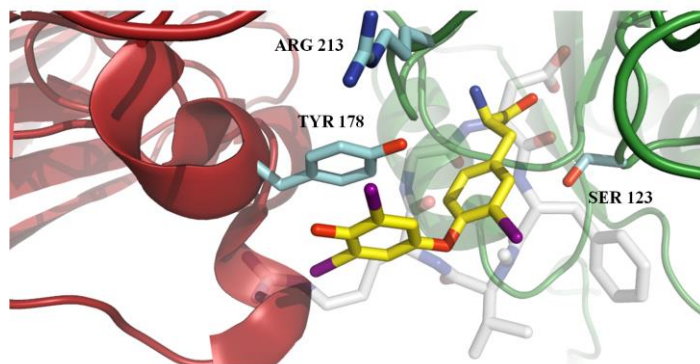
Efeito do T_{3R} *in vivo* por três dias consecutivos (50ng/kg de peso) no hipocampo de ratos hipotireoideos, sobre a atividade da gama glutamil transferase (GGT). Os resultados foram expressos com média \pm E.P.M de 8 animais em cada grupo. Análise estatística ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Bonferroni * $p < 0,05$; em comparação com o grupo eutireoideo.

4.1.6 Interação do T_{3R} com o receptor de integrina $\alpha\beta 3$

Com o intuito de mapear as potenciais interações do hormônio T_{3R} com o receptor de integrina $\alpha\beta 3$ utilizamos uma estrutura 3D do receptor (PDB ID: 1L5G) para as análises de modelagem molecular. Os nossos resultados sugerem que o T_{3R} é capaz de se ligar com o receptor de integrina no sítio de ligação do peptídeo RGD (Figura 22). Os principais aminoácidos envolvidos na ligação do T_{3R} com a integrina $\alpha\beta 3$ foram TYR¹⁷⁸ (domínio A) e ARG²¹³ e SER¹²³ (domínio B).

Distâncias similares com o anel TYR foram observadas utilizando o T_3 como ligante (dados não apresentados). Sugerimos dessa forma que a TYR^{178} é um resíduo chave para a interação do T_3 com a integrina.

Figura 22 - Modelagem molecular mostrando a ligação do T_3 com o receptor de integrina $\alpha\beta_3$.



O domínio A está representado em vermelho e o domínio B em verde. Em amarelo o T_3 na cavidade de ligação do RGD e em branco transparente a sobreposição do peptídeo RGD da estrutura cristalográfica da integrina (PDB ID: 1L5G).

4.1.7 Discussão

No presente estudo foram investigadas possíveis ações do hormônio T_3 frente às alterações neuroquímicas induzidas pelo hipotireoidismo congênito em hipocampo de ratos. Na abordagem *ex vivo*, as fatias do hipocampo de animais hipotireoideos de 15 dias de idade foram incubadas com 1nM de T_3 durante 30 minutos, desta forma avaliamos os efeitos a curto prazo do hormônio, compatível com os mecanismos de ação não genômicos dos HTs (Bernal *et al.*, 2003; Zamoner *et al.*, 2011). Na abordagem *in vivo* do tratamento com T_3 , filhotes de 12 dias de idade com hipotireoidismo congênito receberam injeções diárias de T_3 (50ng/kg de peso corporal) até o 14º dia de vida (3 injeções). As análises bioquímicas nas fatias de hipocampo foram realizadas 24 horas após a última injeção hormonal (filhotes com 15 dias de idade). Essa exposição de longo prazo nos permitiu avaliar as ações genômicas do hormônio.

Inicialmente, abordamos a capacidade do T_3 em restaurar a homeostase do sistema fosforilante associado a GFAP no hipocampo de ratos hipotireoideos. Os resultados mostraram que o hipotireoidismo

leva a uma hiperfosforilação da GFAP e que o tratamento das fatias de hipocampo por 30 minutos com T_{3r} 1nM foi capaz de restaurar a fosforilação ao nível dos animais eutireoideos.

Os astrócitos expressam FIs como a GFAP, vimentina, nestina e sinemina; no entanto, a GFAP é a principal proteína de FI expressa em astrócitos maduros e sua função está relacionada com a manutenção da força mecânica, bem como da forma celular. Evidências recentes mostraram que a GFAP é importante para uma variedade de funções como motilidade/migração celular, proliferação celular, homeostase do glutamato, crescimento de neuritos e proteção a insultos celulares (Hol e Pekny, 2015; Pierozan *et al.*, 2016).

Nosso grupo descreveu que os mecanismos de sinalização envolvidos na regulação da fosforilação/desfosforilação de FIs são importantes alvos de toxinas (Pierozan *et al.*, 2016) e metabólitos (Pierozan e Pessoa-Pureur, 2017), incluindo os HTs (Zamoner, Heimfarth, Oliveira Loureiro, *et al.*, 2008; Zamoner, Heimfarth e Pessoa-Pureur, 2008; Zamoner e Pessoa-Pureur, 2011). Uma característica comum de doenças neurodegenerativas é o desequilíbrio na fosforilação dos FIs (Holmgren *et al.*, 2012) no hipocampo de filhotes hipotireoideos. Nossas descobertas mostram que o T_{3r} é capaz de restaurar a homeostase da GFAP, corroborando com evidências anteriores que sugerem que o T_{3r} pode modular o citoesqueleto no cérebro de animais hipotireoideos (Farwell *et al.*, 1990; Leonard e Farwell, 1997; Farwell *et al.*, 2005).

Para o melhor entendimento do papel dos HTs sobre a homeostase do glutamato no cérebro de animais em desenvolvimento, investigamos a habilidade do T_{3r} em restaurar equilíbrio no sistema glutamatérgico em hipocampo de ratos hipotireoideos. Para isso, avaliamos, em fatias hipocampais de ratos eutireoideos e hipotireoideos, a captação de ^{14}C -glutamato dependente de Na^+ , também conhecido como sistema X_{AG} e a captação de ^{14}C -glutamato independente de Na^+ , sistema X_C .

O sistema X_{AG} é mediado por transportadores de glutamato GLAST e GLT1, predominantemente expressos em astrócitos, e responsáveis por aproximadamente 90% da captação total de glutamato no SNC. Esse sistema permite que a captação de glutamato esteja associada com o influxo de Na^+ , e desta forma se torna fundamental para manter o gradiente iônico da membrana celular (Barros-Barbosa *et al.*, 2015). O sistema X_C regula a captação de cistina em troca da liberação do glutamato intracelular, a cistina posteriormente é oxidada a

cisteína e poderá participar da síntese de glutatona (Cho e Bannai, 1990; Bridges *et al.*, 2012).

Nossos resultados mostraram uma regulação negativa em ambos sistemas de captação de glutamato (X_{AG} e X_C) no hipocampo de animais hipotireoideos. Além disso, nem o tratamento *ex vivo* e nem o tratamento *in vivo* com T_3r foi capaz de restaurar o transporte do glutamato em nenhum dos dois sistemas. Essa desregulação na homeostase do glutamato pode estar relacionada com as deficiências cognitivas associadas ao hipotireoidismo congênito (Zamoner, Heimfarth e Pessoa-Pureur, 2008; Cattani *et al.*, 2013), uma vez que déficits em qualquer um dos sistemas de captação de glutamato podem estar associados a danos neurodegenerativos e a distúrbios neurocognitivos (Choi, 1988).

O resultado deste estudo relacionado a regulação negativa do sistema X_{AG} está de acordo com publicações anteriores do nosso grupo onde foi observado uma diminuição no imunocontéudo dos receptores GLAST e GLT-1 no modelo de hipotireoidismo (Zamoner, Heimfarth e Pessoa-Pureur, 2008).

Já é bem estabelecido que alterações na homeostase do glutamato extracelular podem gerar uma contínua excitação dos receptores de glutamato, levando conseqüentemente a um aumento do influxo de Ca^{2+} , principalmente através do receptor NMDA, podendo induzir a excitotoxicidade glutamatérgica no SNC de ratos em desenvolvimento com hipotireoidismo congênito (Zamoner, Heimfarth e Pessoa-Pureur, 2008; Cattani *et al.*, 2013).

Nosso grupo de pesquisa já descreveu um maior influxo de Ca^{2+} nos animais hipotireoideos em desenvolvimento (Cattani *et al.*, 2013), os resultados no presente estudo corroboraram com os dados anteriores e também estão de acordo com a diminuição na captação de ^{14}C -L-glutamato. Já havíamos demonstrado que o tratamento *ex vivo* com T_3r nas fatias de hipocampo foi capaz de normalizar o influxo de Ca^{2+} nos animais hipotireoideos (Domingues, 2014), contudo, o tratamento *in vivo* com o hormônio não foi capaz de normalizar o influxo de Ca^{2+} .

Apoiados nesses resultados, nós sugerimos que o T_3r tem um efeito protetor, através de mecanismos rápidos, sobre as células hipocampais. Neste contexto, sugerimos que o T_3r induz uma modulação rápida, mas não sustentada no influxo de Ca^{2+} , através de mecanismos não genômicos.

Estudos pioneiros, investigando as ações não genômicas da T_3 e T_4 , mostraram que esses hormônios induzem o influxo de Ca^{2+} independentemente da síntese proteica (Segal e Ingbar, 1989; Segal,

1990). Além disso, (Chakrabarti e Ray, 2000) demonstraram que o T_3 aumenta o nível intra sinaptossomal de Ca^{2+} que leva a ativação da oxido nítrico sintase no córtex cerebral do rato adulto. Ainda, (Sarkar e Ray, 2003) demonstraram a mobilização do cálcio dentro de sinaptossomas do cérebro de ratos hipotireoideos adultos. Nesse sentido, nosso grupo já demonstrou que ambos T_3 e T_4 induziram influxo de $^{45}Ca^{2+}$ em fatias de córtex cerebral de ratos em desenvolvimento (Zamoner, Royer, *et al.*, 2007).

Apesar de evidências que o T_{3r} estimula influxo de $^{45}Ca^{2+}$, em células de Sertoli de ratos eutireoideos (Zanatta, Zamoner, Goncalves, Zanatta, Bouraima-Lelong, Carreau, *et al.*, 2011), é importante enfatizar que o presente estudo é a primeira evidência experimental do papel T_{3r} como um modulador de influxo de Ca^{2+} em células neurais de ratos hipotireoideos.

Uma vez no meio intracelular, o glutamato desempenha diversos papéis metabólicos, incluindo sua conversão à glutamina em astrócitos através da atividade da GS. No presente estudo, observamos uma diminuição na atividade da GS no hipocampo de animais hipotireoideos, compatível com os resultados em relação a homeostase do glutamato. Curiosamente, ambos os tratamentos *ex vivo* e *in vivo* com T_{3r} foram capazes de restaurar a atividade da GS.

Os astrócitos desempenham um papel fundamental na sinapse glutamatérgica, pois são responsáveis tanto por retirar o glutamato da fenda sináptica, quanto por expressar enzimas que irão converter o glutamato a glutamina. Uma diminuição da atividade da GS astrocitária poderia contribuir para uma desregulação no ciclo glutamato-glutamina, o qual desempenha um papel fundamental na neurotransmissão glutamatérgica (Schousboe *et al.*, 2014). A regulação astrocitária da GS não é claramente entendida, embora estudos demonstrem uma regulação hormonal para a GS (Blutstein *et al.*, 2006). Neste sentido, sugerimos um importante papel do T_{3r} no estabelecimento da atividade da GS, reestabelecendo o correto funcionamento do ciclo glutamato-glutamina e a neurotransmissão glutamatérgica no hipocampo de animais hipotireoideos em desenvolvimento.

No meio intracelular, o glutamato também pode participar de reações de transaminação. As aminotransferases são fundamentais no metabolismo intermediário, sendo que no cérebro, a AST e a ALT são consideradas enzimas neuronais ativas no metabolismo do glutamato (Kugler, 1993). Neste contexto a ALT pode ser considerada como a principal contribuinte do estado estacionário dos níveis de glutamato. Desta forma, alteração na atividade dessas enzimas em células neurais

podem gerar falhas na produção de energia e comprometer o sistema glutamatérgico.

Nossos resultados mostraram que o tratamento *in vivo* com T_{3r} foi capaz de modular positivamente a atividade da AST, observamos este mesmo comportamento na atividade da enzima quando as fatias de hipocampo foram tratadas com T_{3r} 1nM por 30 minutos (Domingues, 2014). Os dados apresentados apoiam um papel para esse hormônio na restauração de atividades enzimáticas no modelo experimental de hipotireoidismo congênito.

A regulação negativa na atividade da AST em filhotes hipotireoideos pode estar relacionada com o desequilíbrio no metabolismo do glutamato e a redução do metabolismo mitocondrial no hipocampo de animais hipotireoideos (Jojua *et al.*, 2015). Essas alterações podem estar relacionadas a falhas no metabolismo energético e na neurotransmissão, bem como a anormalidades cognitivas observadas no hipotireoidismo congênito. Portanto, o papel do T_{3r} na restauração da atividade AST poderia representar um importante mecanismo que neutraliza, pelo menos em parte, o efeito deletério do hipotireoidismo congênito sobre células hipocampais de ratos em desenvolvimento. Neste contexto, é importante considerar que o oxaloacetato e o α -cetoglutarato, dois substratos alfa-cetoácidos de AST, são intermediários de ciclo TCA. Assim, a modulação da atividade dessa enzima pelo T_{3r}, reflete também o efeito desse hormônio sobre o estado metabólico do hipocampo de animais em desenvolvimento com hipotireoidismo.

Com o objetivo de investigar o mecanismo envolvido no efeito do T_{3r} sobre o metabolismo energético no hipocampo de ratos hipotireoideos, nós avaliamos primeiramente o efeito do T_{3r} através de tratamento *ex vivo* sobre a captação de ¹⁴C-DG em hipocampo de ratos em desenvolvimento. Nossos resultados mostraram que a condição de hipotireoidismo não altera a captação de ¹⁴C-DG, porém o tratamento *ex vivo* com T_{3r} estimula a entrada e o acúmulo de glicose em células hipocampais (Domingues, 2014). Contudo, os resultados do presente estudo demonstram que o tratamento *in vivo* com T_{3r} não têm o mesmo efeito sobre a captação de glicose. Em conjunto, estes achados reforçam a hipótese que o T_{3r} apresenta mecanismo de ação rápido em parâmetros metabólicos no hipocampo de ratos em desenvolvimento, sugerindo diferentes mecanismos de ação após tratamento *ex vivo* e *in vivo* sobre o metabolismo energético no hipocampo de animais hipotireoideos, possivelmente devido à ativação de mecanismos não genômicos e genômicos, respectivamente.

Ainda neste estudo, investigamos o efeito do T_{3r} na modulação da atividade da LDH no hipocampo de animais hipotireoideos após tratamento *ex vivo*. Os resultados mostraram que o hipotireoidismo aumenta a atividade da enzima e o tratamento com o hormônio aumenta ainda mais a atividade dessa enzima. A indução na atividade da LDH com o tratamento *ex vivo* está de acordo com o aumento na captação de glicose induzida por T_{3r}.

A modulação positiva da atividade LDH pode estar relacionada com uma maior eficiência na via glicolítica. Sua atividade pode estar sendo mantida através da produção de lactato no hipocampo dos animais hipotireoideos. Desta forma, levantamos a hipótese que o hipocampo dos animais hipotireoideos pode apresentar um metabolismo adaptativo, utilizando o lactato como um combustível alternativo, após o tratamento a curto prazo com o hormônio T_{3r}. No entanto, não foi possível determinar o fluxo direcional de lactato entre os astrócitos e neurônios.

O efeito do T_{3r} no transporte de glicose, bem como na atividade enzimática da LDH e da AST, pode representar um papel protetor deste hormônio, na restauração de pelo menos uma parte do metabolismo energético deficiente em animais hipotireoideos. A glicose também pode ser utilizada como combustível energético para o fornecimento do esqueleto de carbono para a síntese de glutamato/glutamina. Desta maneira, a AST pode estar envolvida na síntese de glutamato e de α -cetoglutarato. Em conjunto, nossos resultados sugerem que o T_{3r} ajuda a manter a disponibilidade do ciclo glutamato-glutamina pela estimulação da síntese *de novo* e glutamina nos astrócitos, e também interferindo em outras vias metabólicas.

Devido a importância da GSH na defesa antioxidante não enzimática e da participação do glutamato intracelular na sua síntese *de novo*, investigamos os níveis de GSH no hipocampo de ratos com hipotireoidismo congênito. Nossos resultados mostraram uma diminuição nos níveis de GSH no hipocampo de ratos hipotireoideos. Os dados estão de acordo com a diminuição dos níveis de glutamato e o desequilíbrio no sistema redox nesses animais (Dasgupta *et al.*, 2007; Zamoner, Barreto, *et al.*, 2008; Cattani *et al.*, 2013). Nossos resultados prévios mostraram que o tratamento *ex vivo* com T_{3r} é capaz de reestabelecer os níveis da GSH no hipocampo dos animais (Domingues, 2014), este trabalho apresenta dados que demonstram que o tratamento *in vivo* também é capaz de equilibrar os níveis de GSH, sugerindo que o T_{3r} pode ter um efeito não genômico e sustentado frente aos níveis desse antioxidante não enzimático.

O metabolismo da GSH também pode ser regulado pela atividade da enzima GGT, que é capaz de clivar o tripeptídeo, gerando um aminoácido γ -glutamil e o dipetídeo cistenil-glicina. Essa ação além de disponibilizar os aminoácidos para síntese de outras proteínas também permite a captação da cisteína pelos neurônios, sendo a GGT considerada uma enzima limitante na síntese *de novo* de GSH neuronal.

Nossos primeiros resultados mostraram que há uma diminuição na atividade da GGT no hipocampo de ratos hipotireoideos e que no tratamento *ex vivo* com os HTs (T_3 , T_4 e T_{3r}) apenas o T_{3r} foi capaz de modular positivamente a atividade da GGT. Sugerimos assim, uma especificidade do T_{3r} sobre a restauração da atividade da GGT, através de um mecanismo rápido, não genômico. Nesse estudo pioneiro, demonstramos também que o tratamento *ex vivo* das fatias hipocampais com o T_{3r} , ativas vias de sinalização como a p38, PKA, ERK, CamKII, e que desta forma ocorre a modulação positiva sobre a atividade da GGT (Domingues, 2014). Contudo, os resultados desta tese demonstraram que o tratamento *in vivo* com T_{3r} não teve o mesmo efeito sobre a GGT. A ação rápida e de curto prazo do T_{3r} reforça um mecanismo de ação não genômico desse hormônio sobre a atividade da GGT no hipocampo de animais hipotireoideos.

Farwell e colaboradores sugeriram que os HTs poderiam interagir com receptores de integrinas presente na membrana da célula (Farwell *et al.*, 1995). Neste contexto, um estudo pioneiro investigando os efeitos não genômicos dos HTs na angiogênese, demonstrou que o tripeptídeo Arg-Gly-Asp (RGD) bloqueia a ligação dos HTs com o receptor de superfície celular e ainda as ações intracelulares do hormônio (Bergh *et al.*, 2005). Essa foi a primeira demonstração que o receptor de integrina $\alpha\beta_3$ no sítio de reconhecimento do RGD poderia mediar as ações dos HTs (Vinatier, 1995; Kumar, 1998). Além disso, o RGD tem sido proposto como um antagonista competitivo da ação dos HTs, uma vez que o sítio de ligação dos HTs na integrina foi descrito como muito próximo a região de reconhecimento do RGD (Bergh *et al.*, 2005; Cody *et al.*, 2007).

Nesse sentido, buscamos o envolvimento do receptor de integrina $\alpha\beta_3$ nas ações do T_{3r} utilizando o RGD como antagonista. Nossos resultados mostraram que o peptídeo RGD bloqueia o efeito do T_{3r} sobre a modulação da atividade da GGT (Domingues, 2014). Sugerimos que o RGD se liga de forma reversível ao receptor de integrina, no mesmo sítio de ligação do T_{3r} , reforçando o RGD como um antagonista competitivo de ação do T_{3r} .

Esses achados implicam o envolvimento da integrina $\alpha\beta3$ como receptor para o T_{3r} no hipocampo de animais hipotireoideos. Nossos resultados estão de acordo com (Zanatta *et al.*, 2013), que demonstrou que o efeito do T_{3r} sobre o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no testículo de ratos imaturos poderia ser evitado pelo peptídeo RGD.

Com o intuito de mapear as potenciais interações do hormônio T_{3r} com o receptor de integrina $\alpha\beta3$ utilizamos uma estrutura 3D do receptor para as análises de modelagem molecular. Os nossos resultados demonstram que o T_{3r} é capaz de se ligar com o receptor de integrina no sítio de ligação do RGD. Em particular a TYR¹⁷⁸ parece estar envolvida com interações π *stacking* com o anel do T_{3r} . Distâncias similares com o anel TYR foram observadas utilizando o T_3 como ligante (dados não apresentados). Sugerimos dessa forma que a TYR¹⁷⁸ é um resíduo chave para a interação do T_{3r} com a integrina.

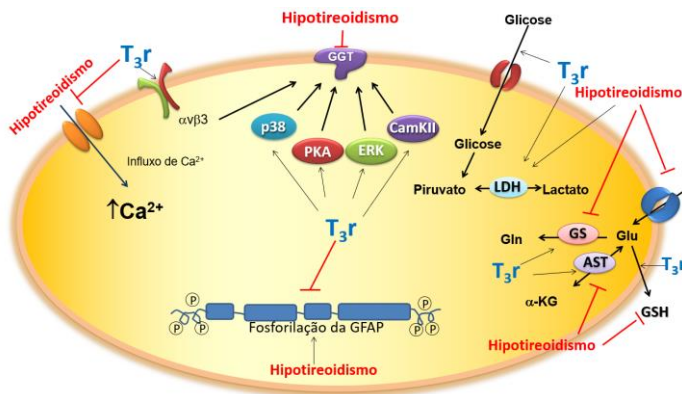
Os resultados obtidos a partir da docagem molecular sugerem que os efeitos não genômicos do T_{3r} podem ser desencadeados através de um receptor de superfície celular para este hormônio no domínio extracelular da integrina $\alpha\beta3$.

Em conjunto, os resultados deste estudo demonstram que o T_{3r} , a iodoironina mais abundante durante o período fetal (Roti *et al.*, 1982), pode agir como uma molécula neuroprotetora contra a desregulação neuroquímica induzida pelo hipotireoidismo congênito. Sugerimos que o T_{3r} interage com o receptor de membrana (integrina $\alpha\beta3$) no hipocampo de ratos hipotireoideos, restaurando a fosforilação da GFAP e a homeostase do glutamato através da atividade das enzimas GS, AST e GGT. Além disso, o T_{3r} protege as células do hipocampo contra o desequilíbrio do sistema redox através da restauração dos níveis de GSH e da atividade da GGT. Os efeitos do T_{3r} podem ser sustentados a longo prazo através da ativação de vias de sinalização. O mecanismo proposto para as ações não genômicas do T_{3r} está representado na Figura 23. Porém, não somos capazes de compreender os motivos das diferentes respostas nas abordagens *ex vivo* e *in vivo* de alguns parâmetros bioquímicos avaliados.

Contudo, nossas descobertas fornecem provas experimentais que o T_{3r} é um hormônio da tireoide biologicamente ativo atuando por mecanismos não genômicos. Além disso, comprovamos a hipótese que as ações do T_{3r} são iniciadas pela interação do hormônio com o receptor de integrina $\alpha\beta3$, ativando cascatas de sinalização através de mecanismos não genômicos independentes da transcrição gênica. Estudos adicionais são necessários para compreender o mecanismo de ação e o papel fisiológico do T_{3r} no SNC.

Os resultados apresentados no Estudo (I) foram publicados no periódico “Molecular and Cellular Endocrinology” em Novembro de 2017 com o título “Reverse T₃ interacts with $\alpha\beta$ 3 integrin receptor and restores enzyme activities in the hippocampus of hypothyroid developing rats: Insight on signaling mechanisms” (ANEXO I).

Figura 23 - Mecanismo proposto para o T₃r na restauração a homeostase metabólica no hipocampo dos ratos hipotireoideos em desenvolvimento



O hipotireoidismo rompe a homeostase da GFAP, leva a um acúmulo intracelular de Ca²⁺ e gera danos no metabolismo do glutamato. Neste cenário, propomos que o T₃r interage com a integrina $\alpha\beta$ 3, ativando as vias de sinalização PKA, CaMKII e p38 MAPK. Esses eventos restauram a homeostase da GFAP, diminuem o influxo de Ca²⁺, estimulam a captação de glicose e produção de lactato, induzem a atividade da GGT e aumentam os níveis de GSH, que foram depletados pelo hipotireoidismo. O aumento na captação de glicose pode representar um mecanismo compensatório para o baixo índice intracelular de glutamato/glutamina. A indução da glicólise e a produção de lactato sugerem que o T₃r aumenta a biodisponibilidade de substrato para o metabolismo energético, bem como para a síntese de neurotransmissores. Fonte: Adaptado de Domingues *et al.*, 2017.

4.1.8 Conclusões Parciais

- O hormônio T₃r apresenta um efeito protetor frente a excitotoxicidade glutamatérgica, uma vez que restaura atividade de enzimas (AST, GS e GGT) que estão diretamente envolvidas no metabolismo do glutamato e ainda é capaz de modular a captação de Ca²⁺ no hipocampo de animais imaturos com hipotireoidismo congênito induzido;

- O T_{3r} atua na recuperação do desequilíbrio do sistema redox no hipocampo de ratos hipotireoideos através de sua ação sobre os níveis de GSH e atividade da GGT. Os efeitos do T_{3r} podem ser sustentados a longo prazo através da ativação de vias de sinalização;
- As ações do T_{3r} são iniciadas pela interação do hormônio com o receptor de integrina $\alpha\beta3$, ativando cascatas de sinalização através de mecanismos não genômicos independente da transcrição gênica.

Tabela 1 - Resumo do efeito do hipotireoidismo e do tratamento *ex vivo* e *in vivo* com o hormônio T_{3r} .

	Hipotireoideo	T_{3r} <i>ex vivo</i>	T_{3r} <i>in vivo</i>
GFAP	↑	↓	?
Captação de Glutamato	↓	↓	↓
Influxo de Cálcio	↑	↓*	↓
Atividade da GS	↓	↑	↑
Atividade da ALT	=	=	=
Atividade da AST	↓	↑*	↑
Captação de Glicose	=	↑*	=
Atividade da LDH	↑	↑	?
Atividade da GGT	↓	↑*	↓
Níveis de GSH	↓	↑*	↑

Consequências do hipotireoidismo, do tratamento das fatias hipocampais – *ex vivo* e dos animais – *in vivo* com o hormônio T_{3r} . (↑) aumento dos níveis ou atividade, (↓) diminuição dos níveis ou atividade, (=) sem alteração dos níveis ou atividade (?) dado não investigado (*) referente a dados obtidos na dissertação de mestrado (Domingues, 2014).

4.2 ESTUDO II: EFEITO DO T_{3r} SOBRE PARÂMETROS DO ESTRESSE OXIDATIVO E MORFOLOGIA DO HIPOCAMPO DE ANIMAIS EUTIREOIDEOS E HIPOTIREOIDEOS EM DESENVOLVIMENTO

Os HTs exercem diferentes ações durante o desenvolvimento neural, sendo necessários para modular importantes processos na maturação do SNC durante períodos específicos. A deficiência dos HTs, mesmo que por períodos curtos, pode levar a danos irreversíveis no SNC, sendo que as consequências dependem não apenas da gravidade, mas do momento de início e duração da deficiência hormonal (Bernal, 2015).

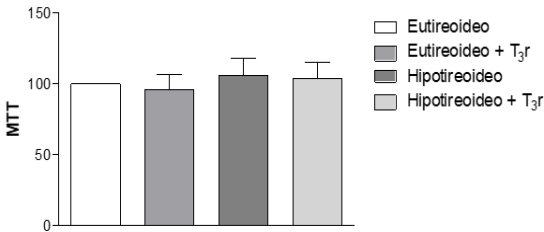
Estudos prévios descreveram o hipotireoidismo como indutor do estresse oxidativo, e uma das primeiras manifestações observadas foi a depleção de GSH (Rahaman *et al.*, 2001; Dasgupta *et al.*, 2005; Zamoner, Barreto, *et al.*, 2008; Domingues, 2014). Nesse sentido, nosso grupo de pesquisa demonstrou a diminuição na concentração deste tripeptídeo no hipocampo de ratos hipotireoideos em desenvolvimento (Cattani *et al.*, 2013) e recentemente descrevemos que o tratamento *ex vivo* das fatias de hipocampo com T_{3r} (1nM) foi capaz de restaurar os níveis da GSH (Domingues *et al.*, 2017). A GSH exerce um papel de extrema importância no SNC, sendo considerado o principal antioxidante não enzimático intracelular (Halliwell, 2006).

No presente estudo, avaliamos a capacidade do tratamento com o hormônio T_{3r} restaurar o metabolismo de enzimas envolvidas com o sistema de defesa antioxidante, bem como a habilidade desse hormônio em restaurar alterações morfológicas observadas no hipocampo de animais hipotireoideos. Utilizamos o modelo experimental de hipotireoidismo congênito descrito previamente com ênfase em mecanismos genômicos de ação do T_{3r} através de ações *in vivo* – clássicas, no hipocampo de filhotes.

4.2.1 Efeito do hipotireoidismo congênito e do T_{3r} sobre viabilidade celular em hipocampo de ratos.

Inicialmente investigou-se se o tratamento *in vivo* com T_{3r} altera a viabilidade de células hipocampais, utilizando-se o ensaio do MTT. A Figura 24 mostra que o T_{3r} não foi capaz de alterar a viabilidade de células das fatias hipocampais.

Figura 24 - Efeitos do tratamento *in vivo* do T₃r sobre a viabilidade celular das fatias de hipocampo de ratos hipotireoideos.

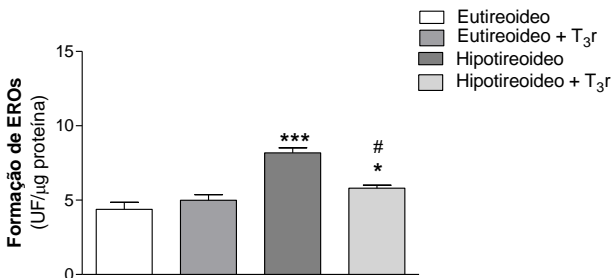


Efeito do tratamento *in vivo* com T₃r (50ng/kg de peso) por 3 dias consecutivos sobre a viabilidade celular. Os dados foram expressos com média ± E.P.M de 6 animais em cada grupo. Análise estatística ANOVA de duas vias.

4.2.2 Efeito do hipotireoidismo congênito e do T₃r na produção de espécies reativas de oxigênio no hipocampo de ratos.

Com intuito de investigar se o modelo experimental de hipotireoidismo congênito induz a formação de EROs e se tratamento *in vivo* com T₃r é capaz de diminuir a formação de EROs nas células hipocampais, foi realizado o ensaio do DCF-DA, uma sonda que na presença de EROs torna-se fluorescente. Os resultados mostraram que o hipotireoidismo induz a formação de EROs e que o tratamento com T₃r foi capaz de restaurar a produção de EROs até níveis basais (Figura 25).

Figura 25 - Efeitos do hipotireoidismo congênito sobre a produção de EROs e a ação protetora do tratamento *in vivo* do T₃r em fatias hipocampais de animais em desenvolvimento.



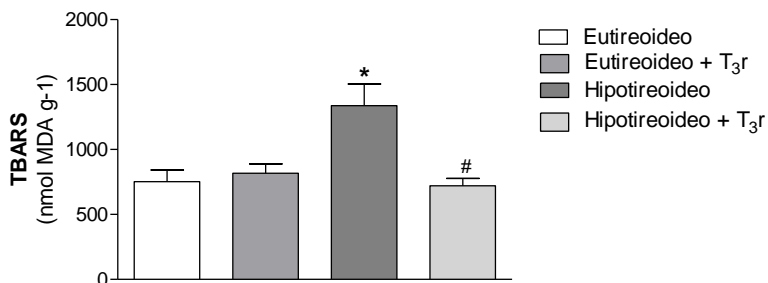
Tratamento *in vivo* com (50ng/kg de peso) T₃r por 3 dias consecutivos. Os resultados foram expressos com média ± E.P.M de oito animais por grupo. Análises estatísticas ANOVA de duas vias seguido pelo post-hoc de Bonferroni: $F_{(1,12)} = 40,90$; $P < 0,0001$ sobre o fator hipotireoideo; $F_{(1,12)} = 5,93$ $P = 0,031$ sobre o fator

T₃r. *p <0,05; ***p<0,0001 em comparação com o grupo eutireoideo; #p<0,05 em comparação com o grupo hipotireoideo.

4.2.3 Efeito do T₃r na lipoperoxidação induzida pelo hipotireoidismo congênito em células de fatias hipocampais

A indução do estresse oxidativo no hipocampo de ratos com hipotireoidismo congênito foi descrita anteriormente pelo nosso grupo (Cattani *et al.*, 2013), bem como a capacidade do hormônio T₃r reverter alguns desequilíbrios no sistema redox, através do mecanismo de ação rápido, não genômico (Domingues, 2014). Sendo assim, com o objetivo de investigar se o tratamento *in vivo* com o hormônio T₃r durante três dias consecutivos é capaz de promover efeito similar ao observado após tratamento *ex vivo*, determinou-se o conteúdo de TBARS. Os resultados demonstraram que assim como no tratamento *ex vivo*, o tratamento *in vivo* com o hormônio T₃r (50 ng/kg) é capaz de diminuir a lipoperoxidação induzida pelo hipotireoidismo congênito em hipocampo de ratos. Entretanto, o tratamento de animais eutireoideos com T₃r não apresentou o mesmo efeito (Figura 26).

Figura 26 - Efeitos *in vivo* do T₃r no hipocampo de animais hipotireoideos e eutireoideos em desenvolvimento sobre a lipoperoxidação lipídica.



Os animais foram tratados por três dias consecutivos com injeções i.p de salina ou T₃r 50ng/kg. Os resultados foram expressos com média ± E.P.M. de 06 animais em cada grupo. Análise estatística ANOVA de duas vias seguido pelo post-hoc de Bonferroni: A - $F_{(1,16)} = 5,352$; $P = 0,0343$ sobre o fator hipotireoideo; $F_{(1,16)} = 6,902$ $P = 0,0183$ sobre o fator T₃r; #p<0,05 comparando com o grupo eutireoideo; *p<0,05 comparando com o grupo hipotireoideo.

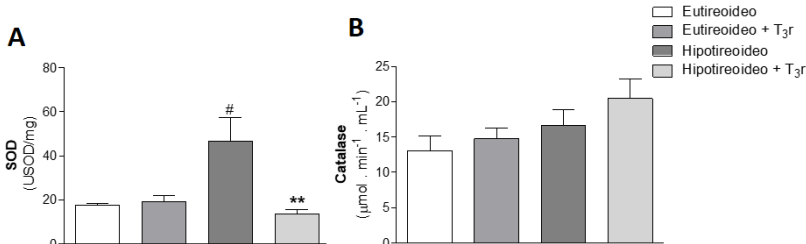
4.2.4 Efeito do T₃r sobre o sistema de defesa antioxidante no hipocampo de ratos com hipotireoidismo congênito

Para investigar o efeito do tratamento *in vivo* do hormônio T₃r sobre os parâmetros bioquímicos relacionados ao sistema de defesa

antioxidante avaliamos as atividades enzimáticas da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD) e glutatona redutase (GR).

A SOD catalisa a dismutação do O_2^- produzindo H_2O_2 , que por sua vez é eliminado através da reação catalisada pela CAT. Nossos resultados mostraram que o hipotireoidismo induz a atividade da SOD e que o tratamento *in vivo* com T_3r é capaz de restaurar a atividade desta enzima (Figura 27A), por outro lado, nem o hipotireoidismo congênito nem o tratamento *in vivo* com T_3r alteram a atividade da CAT (Figura 27B).

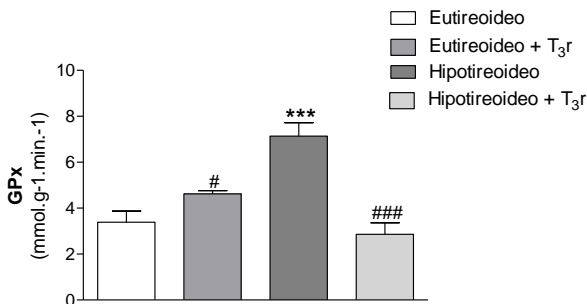
Figura 27 - Efeitos *in vivo* do T_3r no hipocampo de animais hipotireoideos e eutireoideos em desenvolvimento com sobre a atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase.



Tratamento *in vivo* por 3 dias consecutivos (50ng/kg de peso). Os resultados foram expressos com média \pm E.P.M de oito animais por grupo. Análises estatísticas ANOVA de duas vias seguido pelo post-hoc de Bonferroni: A- $F_{(1,12)} = 8,617$ $P = 0,012$ sobre o fator hipotireoideo; $F_{(1,12)} = 13,44$ $P = 0,0032$ sobre o fator T_3r : [#] $p < 0,05$; em comparação com o grupo eutireoideo; ^{**} $p < 0,01$ em comparação com o grupo hipotireoideo.

Outra enzima importante na detoxificação do H_2O_2 é a GPx, que reduz essa espécie reativa à água ao utilizar a GSH como cofator da reação e formar a glutatona oxidada (GSSG). Nossos resultados mostraram que o hipotireoidismo congênito induz um aumento na atividade da enzima e que o tratamento *in vivo* com T_3r é capaz de reestabelecer a atividade da GPx nas fatias de hipocampo de animais em desenvolvimento (Figura 28).

Figura 28 - Efeito do tratamento *in vivo* com T₃r nas fatias de hipocampo de animais hipotireoideos e eutireoideos em desenvolvimento sobre a atividade da glutationa peroxidase.

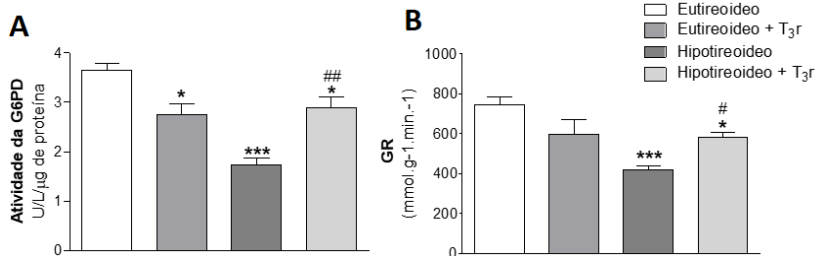


Tratamento *in vivo* por 3 dias consecutivos (50ng/kg de peso). Os resultados foram expressos com média \pm E.P.M de oito animais por grupo. Análises estatísticas ANOVA de duas vias seguido pelo post-hoc de Bonferroni: $F_{(1,12)} = 6,404$ $P = 0,0264$ sobre o fator hipotireoideo; $F_{(1,12)} = 13,79$ $P = 0,0030$ sobre o fator T₃r; *** $p < 0,001$; em comparação com o grupo eutireoideo; ### $p < 0,001$, # $p < 0,05$ em comparação com o grupo hipotireoideo.

Nossos dados recentes mostraram que o hipotireoidismo congênito depleta o conteúdo da GSH no hipocampo de ratos em desenvolvimento. Observamos também que o T₃r é capaz de reestabelecer as concentrações de GSH, um dos mais importantes antioxidantes não enzimáticos do SNC, no hipocampo de ratos submetidos ao modelo de hipotireoidismo congênito (Domingues *et al.*, 2017).

Considerando o metabolismo da GSH, destacamos o papel da GR responsável pela regeneração/redução da GSSG em GSH às custas de NADPH, o qual é disponibilizado pela atividade da G6PD, enzima passo-limitante da via das pentoses-fosfato. Os resultados do presente estudo mostraram diminuição na atividade da G6PD no hipocampo de animais hipotireoideos, a atividade desta enzima foi reestabelecida após tratamento *in vivo*, por 3 dias consecutivos, com T₃r (Figura 29A). O tratamento *in vivo* com T₃r também foi capaz de reestabelecer a atividade da GR em fatias de hipocampo de ratos hipotireoideos (Figura 29B). Nesse sentido, salienta-se que a depleção na GSH, provocada pelo hipotireoidismo congênito, foi restaurada pelo T₃r, através da restauração da atividade das enzimas G6PD e GR.

Figura 29 - Efeito do tratamento *in vivo* com T₃r nas fatias de hipocampo de animais hipotireoideos e eutireoideos em desenvolvimento sobre a atividade da G6PD e da GR.



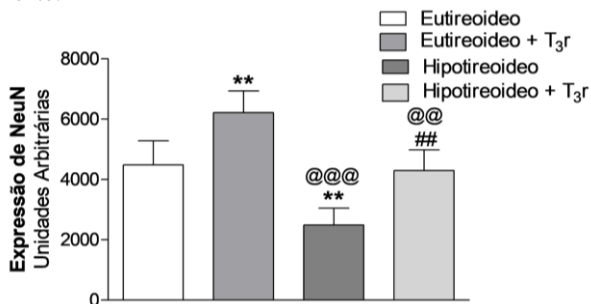
Tratamento *in vivo* por 3 dias consecutivos (50ng/kg de peso). Os resultados foram expressos com média \pm E.P.M de oito animais por grupo. Análises estatísticas ANOVA de duas vias seguido pelo post-hoc de Bonferroni: A- $F_{(1,16)} = 24,89$ $P = 0,0001$ sobre o fator hipotireoideo; $F_{(1,16)} = 0,5234$ $P = 0,4799$ sobre o fator T₃r. B- $F_{(1,16)} = 17,81$ $P = 0,0007$ sobre o fator hipotireoideo; $F_{(1,16)} = 0,0909$ $P = 0,7668$ sobre o fator T₃r * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ em comparação com o grupo eutireoideo; # $p < 0,05$ ## $p < 0,01$ em comparação com o grupo hipotireoideo.

4.2.5 Efeito do T₃r sobre a expressão de células NeuN positivas na região CA1 do hipocampo de ratos com hipotireoidismo congênito

Com intuito de estabelecer uma ligação entre as alterações dos parâmetros neuroquímicos observados no presente estudo e as possíveis alterações histológicas, bem como a capacidade do hormônio T₃r reverter os danos sobre a maturação de neurônios no hipocampo de animais hipotireoideos e eutireoideos em desenvolvimento investigou-se a presença de neurônios maduros na região CA1 no hipocampo destes animais, através da técnica de imunomarcagem por fluorescência para proteína NeuN. A partir desta técnica, foi possível quantificar a densitometria óptica da imunofluorescência para a proteína de interesse.

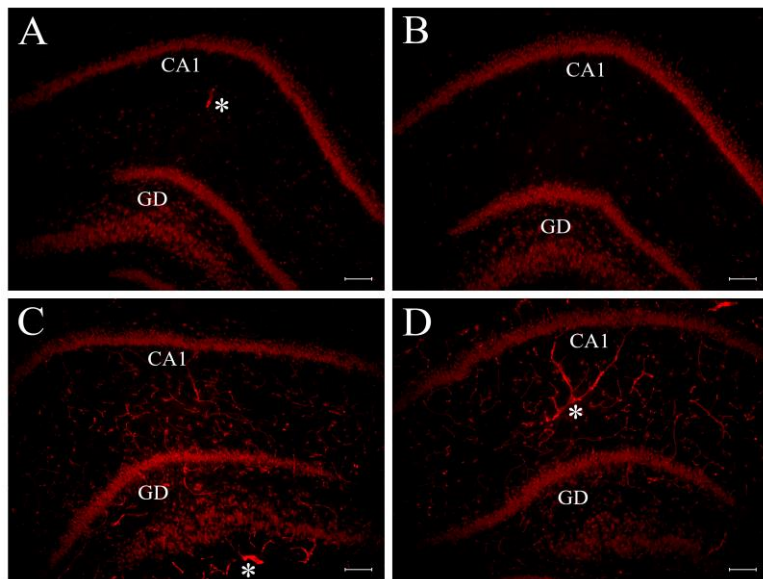
Os resultados demonstraram uma redução significativa na expressão de NeuN no grupo hipotireoideo quando comparado com todos outros grupos. Ainda, os resultados indicaram que o tratamento com T₃r foi capaz de restaurar a expressão de NeuN a valores equivalentes ao grupo eutireoideo. Curiosamente, o grupo eutireoideo quando tratado com T₃r apresentou um efeito *per se*, tendo um aumento significativo quando comparado com todos os demais grupos (Figura 30). Além disso, observou-se uma maior vascularização no hipocampo de animais hipotireoideos tratados ou não com T₃r (Figura 31).

Figura 30 - Efeito do tratamento *in vivo* com T₃r sobre a expressão da proteína NeuN na região CA1 do hipocampo de ratos hipotireoideos e eutireoideos em desenvolvimento.



Os resultados foram expressos com média \pm E.P.M de cinco animais por grupo. Análises estatísticas ANOVA de duas vias seguido pelo post-hoc de Bonferroni: $F_{(1,16)} = 32,35$; $P < 0,0001$ sobre o fator hipotireoideo; $F_{(1,16)} = 39,37$ $P < 0,0001$ sobre o fator T₃r; ** $p < 0,01$ em comparação com o grupo eutireoideo; @@@ $p < 0,001$; @@ $p < 0,001$ em comparação com o grupo eutireoideo+T₃r; ## $p < 0,001$ em comparação com o grupo hipotireoideo.

Figura 31 - Fotomicrografias de imunofluorescência para NeuN no hipocampo de animais hipotireoideos e eutireoideos em desenvolvimento.



As imagens foram obtidas utilizando-se o Microscópio Olympus BX41 e representam os seguintes grupos: A) Eutireoideo, B) Eutireoideo+T₃r, C)

Hipotireoideo e D) Hipotireoideo+T₃r. Pode ser observado imunomarcção para NeuN em regiões como CA1 (Corno de Ammon 1) e GD (Giro Denteado), bem como uma maior presença de vasos sanguíneos (*) nos grupos hipotireoideos (C e D). Magnificação de 100X, barra de escala = 100 µm.

4.2.6 Discussão

No presente estudo investigou-se a capacidade do hormônio T₃r reequilibrar algumas disfunções bioquímicas e histológicas no hipocampo de animais hipotireoideos durante o período de desenvolvimento com enfoque principal na ação *in vivo* do T₃r sobre o sistema de defesa antioxidante e a maturação neuronal. Para isso, os filhotes de 12 dias de idade com hipotireoidismo congênito foram injetados diariamente com T₃r (50ng/kg de peso corporal) até o 14º dia de vida. As análises bioquímicas nas fatias de hipocampo, bem como a preparação do material histológico foram realizadas 24 horas após a última injeção hormonal (filhotes com 15 dias de idade). Relatos que apontam que o T₃r é a iodotironina mais abundante durante a vida fetal (Roti *et al.*, 1982) poderiam justificar a ação deste metabólito no hipocampo de ratos em desenvolvimento.

Nossos resultados demonstram que o T₃r é capaz de restaurar os níveis de GSH, depletados no hipotireoidismo, através de mecanismos não genômicos, sustentados a longo prazo (Domingues *et al.*, 2017). Com intuito de investigar outras possíveis ações deste hormônio frente ao estresse oxidativo ocasionado pelo hipotireoidismo, primeiramente avaliamos a geração de EROs nas fatias hipocampais de animais hipotireoideos, e a possível ação do T₃r nesse parâmetro. Nossos resultados mostraram que o hipotireoidismo aumenta a formação de EROs nas fatias de hipocampo de ratos em desenvolvimento e que o tratamento com T₃r foi capaz de diminuir a geração de EROs a níveis semelhantes aos observados no hipocampo de ratos eutireoideos. Esta ação do hormônio acontece através de um mecanismo de ação rápido, não genômico, sustentado a longo prazo.

A produção de EROs está diretamente ligada a síntese de ATP intracelular, sendo que a relação entre a frequência respiratória (volume de O₂ consumido por minuto) e a produção de EROs não é direta, uma vez que a baixa atividade respiratória é frequentemente associada à alta geração de EROs, enquanto que um aumento na atividade da cadeia respiratória pode resultar na diminuição na taxa de produção de EROs. Essa relação é justificada pelo fato de que a transferência de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial, pode ser regulada não somente através

do consumo de oxigênio, mas também pela disponibilidade de substratos energéticos e ADP (Chance e Williams, 1955; Villanueva *et al.*, 2013).

Neste sentido, o efeito clássico dos HTs na estimulação da frequência respiratória, poderia intuitivamente gerar uma maior produção de EROs, mas como descrito anteriormente, a relação entre estas variáveis não é linear. Desta forma, nossos resultados corroboram com essa hipótese, uma vez que observamos um aumento na produção de EROs nas fatias hipocâmpais de animais hipotireoideos, e um reequilíbrio nessa produção através do tratamento com T₃r. Sugerimos que a diminuição na geração das EROs pelo tratamento com T₃r pode estar relacionada com uma regulação positiva do metabolismo energético, fornecendo assim substratos para a cadeia respiratória mitocondrial. Esses achados estão em concordância com os resultados do nosso grupo de pesquisa, onde demonstramos que o T₃r pode através de mecanismos rápidos, é capaz de aumentar a captação de glicose nas fatias hipocâmpais de animais hipotireoideos e dessa forma modular o metabolismo energético (Domingues *et al.*, 2017).

A indução na geração de EROs em ratos neonatos e adultos devido a alterações na função da glândula tireoide têm sido relatadas por diversos grupos de pesquisa (Venditti *et al.*, 1997; Rahaman *et al.*, 2001). Essa geração de EROs pode estar promovendo consequentes oxidações em diversos compostos celulares incluindo DNA, RNA, lipídios de membranas e proteínas corroborando com possíveis danos celulares. O estresse oxidativo é um mecanismo já reconhecido no envelhecimento e em algumas doenças, como por exemplo, problemas cardiovasculares, diabetes melitus, câncer e doenças neurodegenerativas, como Alzheimer. Além disso, evidências sugerem que o estresse oxidativo pode estar associado a transtornos psiquiátricos, incluindo depressão (Black *et al.*, 2015). Essas evidências não são surpreendentes, uma vez que o SNC é altamente susceptível ao estresse oxidativo e ao desequilíbrio redox devido ao seu elevado consumo de oxigênio e também por ser um rico em lipídios (Shohami *et al.*, 1997; Salim, 2014).

Corroborando nossos resultados, onde o T₃r reverteu a peroxidação lipídica, foi demonstrado que o T₄ pode ter um efeito protetor sustentado contra esse dano oxidativo, restaurando os níveis de TBARS aumentados pela falta dos HTs (Pan *et al.*, 2013). Contudo, a reposição hormonal, em conjunto com a suplementação com a vitamina E, reduziu significativamente a peroxidação lipídica, este tratamento em conjunto é capaz ainda de prevenir a morte celular por apoptose

ocasionada pelo estresse oxidativo no hipocampo de animais hipotireoideos (Guo *et al.*, 2014). Ressalta-se desta maneira a importância da suplementação com antioxidantes, sugerindo futuras perspectivas de estudo com o T_{3r} em associação com substâncias antioxidantes.

Como uma forma de defesa primária contra as EROs, os organismos têm desenvolvido sistemas de defesa antioxidantes para proteger as células contra estes danos. As enzimas envolvidas no sistema de defesa antioxidante e reguladoras do metabolismo como SOD, CAT, GPx, GR e G6PD podem proteger as células de efeitos deletérios de radicais livres. Já é bem estabelecido na literatura que o hipotireoidismo altera o status destas enzimas (Das e Chainy, 2004; Zamoner, Barreto, *et al.*, 2008; Cattani *et al.*, 2013) e o tratamento de animais hipotireoideos com os HTs (T₃ e T₄) se demonstrou capaz de reverter a diminuição na atividade destas enzimas em diferentes tecidos (Das e Chainy, 2001; 2004; Dasgupta *et al.*, 2005; 2007).

A SOD tem sido reportada como um indicador da capacidade dos tecidos em lidar com o estresse oxidativo (Nwani *et al.*, 2013). Nossos resultados demonstram que o hipotireoidismo aumenta a atividade da SOD e o tratamento *in vivo* com T_{3r} é capaz de reestabelecer a atividade da enzima. Sugerimos que o aumento da atividade da SOD está diretamente relacionado com o aumento da geração das EROs observado nos animais hipotireoideos em desenvolvimento. Dados do nosso grupo de pesquisa já haviam demonstrado que o tratamento *ex vivo* com o T_{3r} também foi capaz de reequilibrar a atividade da SOD (Domingues, 2014). Sendo assim, sugerimos que esse hormônio pode ter um efeito não genômico, sustentado a longo prazo sobre a atividade da SOD.

O H₂O₂ gerado através da ação da SOD é posteriormente metabolizado por outras enzimas antioxidantes, como a CAT que promove a decomposição direta de H₂O₂ à água e oxigênio. Nossos resultados mostraram que a atividade da CAT não é alterada pela ausência dos hormônios bem como pelo tratamento *in vivo* com T_{3r}. Esses achados estão de acordo com dados anteriores do grupo de pesquisa onde também não se observou alteração na atividade dessa enzima no tratamento *ex vivo* das fatias de hipocampo com o hormônio T_{3r}.

A GPx também é capaz de metabolizar o H₂O₂ gerado pela atividade da SOD. A GPx é uma enzima antioxidante tiol-específica que decompõe peróxidos inorgânicos e orgânicos, como o H₂O₂, utilizando a GSH como doadora de elétrons (Banerjee *et al.*, 1999). Observamos em

nossos resultados que o hipotireoidismo aumenta a atividade da GPx e o tratamento *in vivo* com T_{3r} foi capaz de normalizar a atividade dessa enzima para níveis equivalentes ao controle. Analisando nossos resultados em conjunto, a diminuição da atividade da SOD para níveis basais, devido ao tratamento com T_{3r}, sugere que este hormônio pode diminuir a geração de H₂O₂. Essa hipótese está em concordância com a diminuição da atividade da GPx induzida pelo T_{3r}, visto que esta enzima também é responsável por detoxificar o H₂O₂. Esses achados corroboram com evidências anteriores do nosso grupo de pesquisa com relação aos efeitos do hormônio T_{3r} (Domingues, 2014). Sugerimos assim, que essa iodotironina possui um efeito contra o estresse oxidativo induzido pela falta dos HTs através de um mecanismo de ação rápido, sustentado a longo prazo. Contudo, novos estudos poderão elucidar os mecanismos pelos quais o T_{3r} exerce este efeito.

Recentemente nosso grupo demonstrou que o hipotireoidismo congênito acarreta uma diminuição nos níveis da GSH, considerada o principal antioxidante não enzimático presente no SNC, nossos dados ainda evidenciaram que o T_{3r} é capaz de normalizar os níveis da GSH, através de mecanismos não genômicos, sustentados a longo prazo (Domingues *et al.*, 2017). Sabe-se que o metabolismo da GSH ocorre através da doação de elétrons para a redução da GSSG em GSH através da ação da GR. A atividade da enzima G6PD, que participa da via das pentoses-fosfato, gera NADPH que atuará como um doador de elétrons para essa reação para a regeneração da GSH. Os resultados do presente estudo demonstraram que o tratamento *in vivo* com T_{3r} reestabelece a atividade da GR e da G6PD que se apresentava diminuída no hipocampo de animais com hipotireoidismo congênito. Esses resultados corroboram os efeitos do T_{3r} na recuperação das concentrações de GSH no hipocampo de ratos imaturos submetidos ao modelo de hipotireoidismo congênito.

Desta forma, sugerimos que o T_{3r} pode atuar como um agente capaz de reverter pelo menos algumas das alterações relacionadas com o estresse oxidativo, restaurando os níveis da GSH através da modulação positiva da atividade das enzimas GR e G6PD as quais são relevantes na redução da glutatona.

Além das alterações bioquímicas relatadas na literatura e no presente estudo, sabe-se que a falta dos HTs durante o período fetal e/ou neonatal provoca diversas alterações morfológicas no encéfalo em desenvolvimento como: redução na conectividade sináptica, retardo na mielinização, desequilíbrio na migração neuronal e modificação na neurotransmissão, acarretando efeitos deletérios para o

neurodesenvolvimento (Bernal, 2007). Desta forma, o hipotireoidismo congênito é conhecido por retardar marcadamente a maturação e desenvolvimento do SNC (Darbra *et al.*, 2003).

Neste trabalho foi dado ênfase ao hipocampo, uma estrutura que integra a codificação e armazenamento da memória (Jones e Mchugh, 2011). Os efeitos deletérios do hipotireoidismo congênito no desenvolvimento da morfologia do hipocampo já estão bem estabelecidos (Rami *et al.*, 1986; Madeira *et al.*, 1991). Ainda, a ausência dos HTs está associada a comprometimento comportamentais para executar tarefas que requerem a integridade do hipocampo (Darbra *et al.*, 2003; Guadano-Ferraz *et al.*, 2003). Alguns estudos eletrofisiológicos demonstraram que o hipotireoidismo induzido pelo PTU altera a transmissão sináptica e a plasticidade na região CA1 do hipocampo de ratos no período neonatal (Vara *et al.*, 2002; Sui *et al.*, 2005).

A região CA1 do hipocampo desempenha um papel chave na memória episódica (Hoge e Kesner, 2007; Barbosa *et al.*, 2012), embora essa região pareça exercer um efeito no componente espacial em uma tarefa associativa de memória, similar à episódica (Barbosa *et al.*, 2012). Além disso, a subárea CA1 dorsal é considerada a maior via de saída do hipocampo para o neocórtex e ainda possui vias que ligam a CA3 e ao córtex entorrinal (Agster e Burwell, 2009).

Nosso grupo de pesquisa demonstrou que a falta dos HTs durante o período de desenvolvimento leva a uma diminuição na densidade dos neurônios em todas as regiões do hipocampo (CA1, CA2, CA3, CA4 e DG) sendo mais expressiva na CA1 (Cattani *et al.*, 2013), o que justificou a escolha da quantificação da proteína NeuN nessa região no presente estudo. Além disso, o processamento rápido e preciso das informações que acontece no hipocampo depende da rede interconectada correspondente aos subcampos anatômicos DG, CA3 e CA1 (Chamberlain *et al.*, 2012). Mudanças morfológicas expressivas nestas regiões podem esclarecer, pelo menos em parte os mecanismos que geram as alterações cognitivas observadas no hipotireoidismo.

No presente estudo, observamos uma diminuição na expressão de neurônios NeuN positivos na região CA1 do hipocampo de animais em desenvolvimento com hipotireoidismo congênito e o tratamento *in vivo* com T_{3r} foi capaz de restaurar a expressão dessa proteína. Curiosamente, os animais eutireoideos tratados com T_{3r} apresentaram uma maior expressão de NeuN mesmo quando comparado ao grupo controle, demonstrando, desta maneira, um efeito *per se* do T_{3r} frente a maturação neuronal. Até o presente momento, este é o único trabalho

científico que demonstrou o efeito benéfico do T₃r em reestabelecer a expressão de NeuN, bem como pelo aumento direto na expressão desta proteína.

Muitos estudos já descreveram os efeitos deletérios da ausência dos HTs na morfologia do encéfalo. Porém, poucos trabalhos relatam moléculas biologicamente ativas capazes de reverter esses danos. Nesse sentido, pesquisadores relataram que o hipotireoidismo congênito, além de regular negativamente a expressão da proteína NeuN, gera um aumento na apoptose na região CA1 do hipocampo de ratos com hipotireoidismo com 15 dias de idade ainda, o tratamento desses animais com miR-124 foi capaz tanto de diminuir a apoptose quanto restaurar a expressão de neurônios NeuN positivos na região CA1. O miR-124 é altamente expresso no cérebro e conhecido por regular o crescimento de diversos sistemas como o SNC. Os animais hipotireoideos apresentam uma redução na expressão do miR-124. A resposta positiva frente a apoptose e morfologia celular faz do miR-124 uma possível substância de proteção neuronal no modelo de hipotireoidismo (Shao *et al.*, 2015).

Estes achados podem apoiar o comprometimento cognitivo associado com o hipotireoidismo não só na fase de desenvolvimento como em adultos. No presente estudo apresentamos resultados pioneiros dos efeitos benéficos do hormônio T₃r perante a morfologia do hipocampo. Ademais, observamos um aumento na vascularização no hipocampo de animais hipotireoideos, quando comparado aos animais eutireoideos. O tratamento com T₃r não foi capaz de normalizar a vascularização hipocampal e sugerimos que este aumento pode ser uma resposta compensatória do organismo para, de alguma forma, reestabelecer os níveis hormonais no encéfalo em desenvolvimento. Contudo, mais estudos são necessários para comprovar esta hipótese.

4.2.7 Conclusões Parciais

- O hormônio T₃r apresenta um efeito positivo na diminuição das concentrações de marcadores de dano oxidativo como a geração de EROs e a peroxidação lipídica;
- O T₃r reestabelece a atividade de enzimas envolvidas no sistema de defesa antioxidante (SOD, GPx, G6PD e GR);
- O T₃r tem ação benéfica perante a morfologia neuronal, através do reestabelecimento da expressão de neurônios no hipocampo de animais hipotireoideos em desenvolvimento.

Tabela 2 - Resumo do efeito do hipotireoidismo e do tratamento *in vivo* com o hormônio T₃r.

	Hipotireoideo	T ₃ r <i>in vivo</i>
MTT	=	=
DCFDA	↑	↓
Lipoperoxidação	↑	↓
Atividade da SOD	↑	↓
Atividade da CAT	=	=
Atividade da GPx	↑	↓
Atividade da G6PD	↓	↑
Atividade da GR	↓	↑
NeuN	↓	↑

Consequências do hipotireoidismo, do tratamento – *in vivo* com o hormônio T₃r sobre as fatias hipocâmpais. (↑) aumento da atividade ou densidade, (↓) diminuição da atividade ou densidade, (=) sem alteração atividade ou densidade.

4.3 ESTUDO III: EFEITOS DO HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO SOBRE A HOMEOSTASE DO GLUTAMATO, PARÂMETROS OXIDATIVOS, MORFOLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS NO CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS EM DESENVOLVIMENTO

Estudos realizados em roedores demonstraram que a deficiência dos HTs maternos durante diferentes estágios da gestação está associada a uma ampla gama de anormalidades no cérebro da prole (Morreale De Escobar *et al.*, 2000; Morte *et al.*, 2010). As consequências do hipotireoidismo relacionam-se tanto com a gravidade quanto o tempo de deficiência materna para as HTs. Nesse contexto, foram demonstrados defeitos na migração neuronal (Auso *et al.*, 2004), crescimento reduzido de axônios e dendritos (Berbel *et al.*, 1985; Navarro *et al.*, 2015) e indução de apoptose (Mohan *et al.*, 2012). Esses efeitos geralmente estão localizados em diferentes regiões cerebrais, especialmente o córtex parietal e occipital (Lucio *et al.*, 1997; Lavado-Autric *et al.*, 2003), com consequências nas funções motoras, visuais e auditivas (Zoeller e Rovet, 2004).

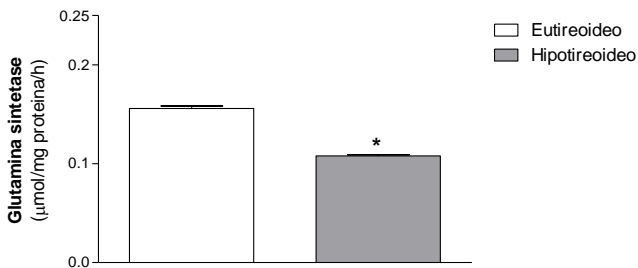
Estudo prévio de nosso grupo de pesquisa demonstrou que a ausência dos HTs durante o desenvolvimento do SNC afeta a dinâmica do sistema fosforilante associado ao citoesqueleto através de mecanismos associados a via da MAPK e diminuição da expressão dos transportadores de glutamato GLAST e GLT-1 em córtex cerebral de ratos imaturos (Zamoner, Heimfarth e Pessoa-Pureur, 2008). Além disso, demonstramos que os HTs induzem o influxo de Ca^{2+} e a fosforilação de FIs em fatias de córtex cerebral de ratos em desenvolvimento por meio de mecanismos não genômicos, independentes da síntese *de novo* de proteínas (Zamoner *et al.*, 2006b; Zamoner, Heimfarth, Oliveira Loureiro, *et al.*, 2008).

Dando continuidade aos estudos do grupo, no intuito de esclarecer os efeitos e os mecanismos relacionados aos danos no córtex cerebral de ratos induzidos pelo hipotireoidismo congênito, investigamos no presente estudo, alguns parâmetros neuroquímicos, histológicos e funcionais associados ao hipotireoidismo no córtex cerebral de ratos em desenvolvimento.

4.3.1 Efeitos do hipotireoidismo congênito sobre o sistema glutamatérgico no córtex cerebral de animais em desenvolvimento

Estudo prévio do grupo mostrou que o hipotireoidismo congênito leva a diminuição no conteúdo de GLAST e GLT-1 em córtex cerebral de ratos imaturos, o que pode levar a modificações na entrada de glutamato para o interior dos astrócitos. Uma vez captado pelos astrócitos, o glutamato pode ser convertido à glutamina, pela ação da GS. Assim, com o intuito de investigar o destino do glutamato astrocitário, mensurou-se a atividade da GS, enzima que está diretamente envolvida no ciclo glutamato-glutamina. A Figura 32 mostra que o hipotireoidismo congênito regula negativamente a atividade da GS, o que pode estar provavelmente levando a uma diminuição na síntese da glutamina associada e ao desbalanço do sistema glutamatérgico.

Figura 32 - Efeito do hipotireoidismo congênito sobre a atividade da enzima GS no córtex de animais em desenvolvimento



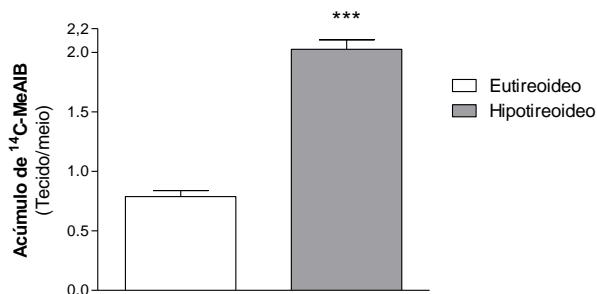
Os resultados são expressos como média \pm E.P.M de 6 animais em cada grupo. Análise estatística pelo teste “t” de Student * $p < 0,05$.

A glutamina produzida nos astrócitos a partir do glutamato é posteriormente translocada aos neurônios através do sistema transporte de aminoácidos neutros. Esses transportadores são fundamentais para aumentar a disponibilidade de aminoácidos essenciais para a síntese proteica ou para o metabolismo energético nos neurônios.

Dentre os principais transportadores de aminoácidos neutros, o Sistema A possui a capacidade de transportar substratos N-metilados, como o aminoácido modelo metil aminoisobutírico (MeAIB). Desta forma, o MeAIB é um modelo essencial para investigar sistemas de entrada de aminoácidos como a glutamina e a alanina. Sendo assim, estudou-se o efeito do hipotireoidismo congênito sobre o acúmulo de [^{14}C]-MeAIB no córtex cerebral dos ratos imaturos. Os resultados

mostraram que o hipotireoidismo congênito leva ao acúmulo de ^{14}C -MeAIB no córtex cerebral desses animais, sugerindo um possível aumento no transporte de glutamina para o interior dos neurônios (Figura 33).

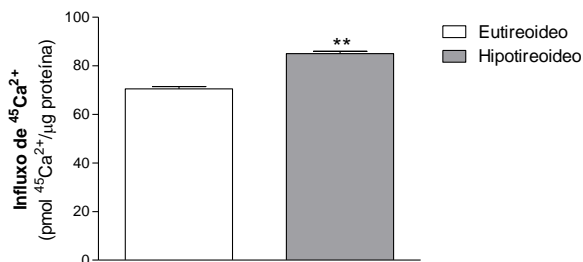
Figura 33 - Efeito do hipotireoidismo congênito sobre o transporte de aminoácidos neutros nas fatias de córtex de animais em desenvolvimento



Os resultados são expressos como média \pm E.P.M de 6 animais em cada grupo. Análise estatística pelo teste "t" de Student *** $p < 0,001$.

Corroborando o aumento de transporte de glutamina para os neurônios e também o possível excesso de glutamato na fenda sináptica, observou-se o aumento do influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no córtex cerebral de animais hipotireoideos em desenvolvimento (Figura 34), sugerindo a indução do fenômeno conhecido como excitotoxicidade glutamatérgica.

Figura 34 - Efeito do hipotireoidismo congênito sobre o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no córtex de animais em desenvolvimento

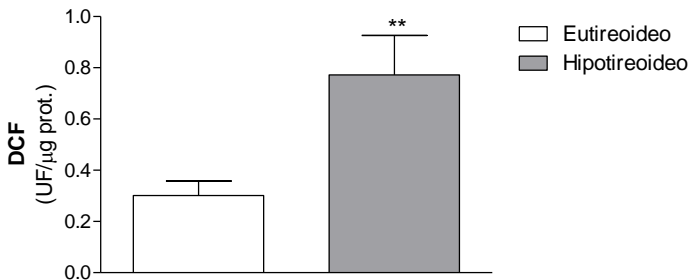


Os resultados são expressos como média \pm E.P.M de 6 animais em cada grupo. Análise estatística pelo teste "t" de Student ** $p < 0,01$.

4.3.2 Efeitos do hipotireoidismo congênito no sistema redox celular

Para investigar parâmetros bioquímicos relacionados ao equilíbrio redox no córtex cerebral de ratos hipotireoideos em desenvolvimento, foi determinada primeiramente a produção de EROs e peroxidação lipídica. Os resultados mostraram um aumento na produção de EROs no córtex cerebral desses animais (Figura 35) sugerindo que essa desregulação hormonal pode induzir o estresse oxidativo.

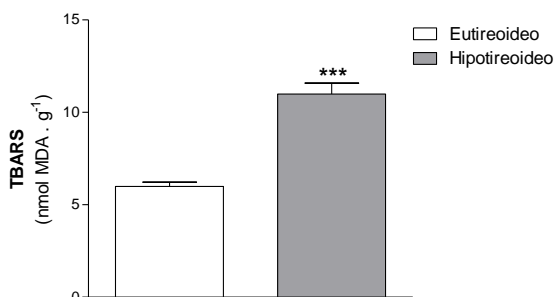
Figura 35 - Consequências do hipotireoidismo congênito sobre a produção de espécies reativas de oxigênio no córtex cerebral de animais em desenvolvimento.



Os resultados foram expressos com média \pm E.P.M. de 06 animais em cada grupo. Análise estatística: teste "t" de Student * $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$.

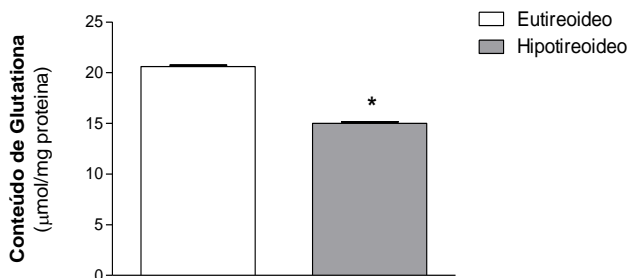
Corroborando o aumento na produção de EROs observamos um aumento na peroxidação lipídica no córtex cerebral de animais com hipotireoidismo congênito em desenvolvimento (Figura 36), bem como uma diminuição nos níveis de GSH (Figura 37).

Figura 36 - Conseqüências do hipotireoidismo congênito sobre a lipoperoxidação lipídica no córtex cerebral de animais em desenvolvimento.



Os resultados foram expressos com média \pm E.P.M. de 06 animais em cada grupo. Análise estatística: teste “t” de Student *** $p < 0,001$.

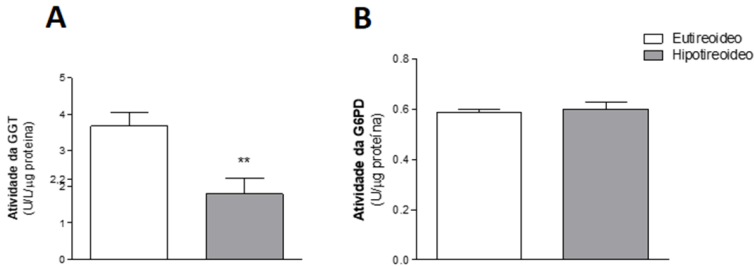
Figura 37 - Conseqüências do hipotireoidismo congênito sobre os níveis de GSH no córtex cerebral de animais em desenvolvimento.



Os resultados foram expressos com média \pm E.P.M. de 06 animais em cada grupo. Análise estatística: teste “t” de Student * $p < 0,05$.

Em conjunto com estes resultados, demonstrou-se uma diminuição na atividade da GGT (Figura 38A), enzima envolvida na síntese *de novo* da GSH. Porém, a G6PD, enzima limitante da via das pentoses-fosfato, a qual é importante na produção de equivalentes redutores como o NADPH (H^+), importante para a redução da glutaciona, não teve alteração na sua atividade em córtex cerebral de animais hipotireoideos com relação aos eutireoideos (Figura 38B).

Figura 38 - Consequências do hipotireoidismo congênito sobre a atividade da GGT e da G6PD no córtex cerebral de animais em desenvolvimento.

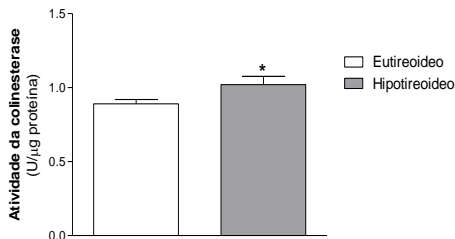


A- atividade da GGT; B- atividade da G6PD. Os resultados foram expressos com média \pm E.P.M. de 06 animais em cada grupo. Análise estatística: teste “t” de Student $**p < 0,01$.

4.3.3 Investigação dos efeitos do hipotireoidismo congênito na atividade da colinesterase no córtex cerebral de animais em desenvolvimento

Com o intuito de esclarecer as consequências do hipotireoidismo congênito sobre a integridade da via colinérgica, estudamos o efeito dessa disfunção da tireoide sobre a atividade da colinesterase, ectoenzima responsável pela metabolização da acetilcolina na fenda sináptica. Nossos resultados mostraram que animais com hipotireoidismo congênito apresentam um aumento na atividade desta enzima, resultando na diminuição da disponibilidade da acetilcolina para interagir com seus receptores e modular a resposta celular a essa molécula (Figura 39).

Figura 39 - Efeitos do hipotireoidismo congênito na atividade da colinesterase no córtex cerebral de animais em desenvolvimento

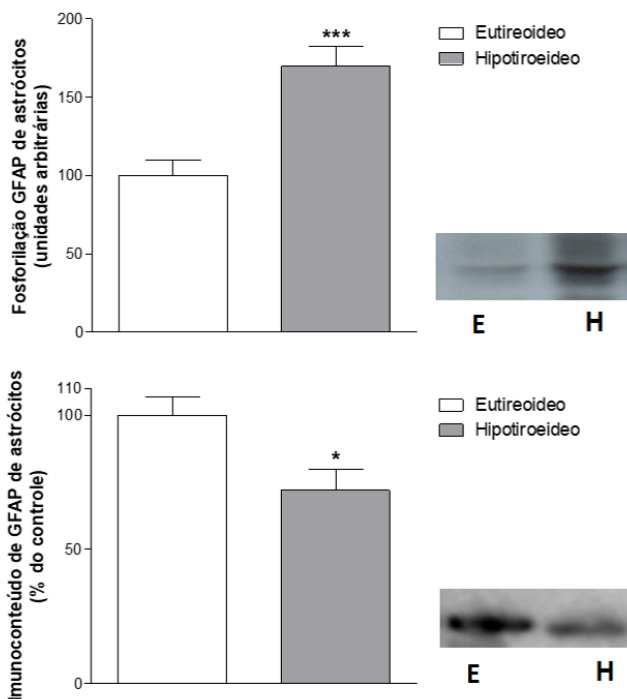


Os resultados foram expressos com média \pm E.P.M. de 06 animais em cada grupo. Análise estatística: teste “t” de Student $*p < 0,05$.

4.3.4. Efeito de hipotireoidismo congênito na homeostase da fosforilação de GFAP em astrócitos corticais primários

Apesar dos resultados prévios do grupo terem demonstrado que o hipotireoidismo congênito não afeta a fosforilação de GFAP em fatias de córtex cerebral de ratos imaturos (Zamoner, Heimfarth e Pessoa-Pureur, 2008), no presente estudo demonstramos hiperfosforilação da GFAP em cultura primária de astrócitos corticais de filhotes hipotireoideos. Por outro lado, o imunoconteúdo de GFAP diminuiu (Figura 40).

Figura 40 - Efeito do hipotireoidismo congênito na fosforilação da GFAP em cultura primária de astrócitos corticais de animais eutireoideos e hipotireoideos.



Os resultados foram expressos com média \pm E.P.M. de 06 animais em cada grupo. Análise estatística: teste "t" de Student *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$.

4.3.5. Efeitos do hipotireoidismo congênito na morfologia do córtex sensoriomotor cerebral e função locomotora dos ratos em desenvolvimento

Inicialmente avaliamos se o hipotireoidismo congênito foi capaz de modificar a relação massa do córtex cerebral/massa corpórea. Os resultados mostraram que o hipotireoidismo diminuiu a relação massa do córtex cerebral/massa corpórea (mg/g) em ratos em desenvolvimento (Tabela 1). Posteriormente, foram realizadas análises histoquímicas para investigar alterações na histologia do córtex cerebral de ratos hipotireoideos em desenvolvimento.

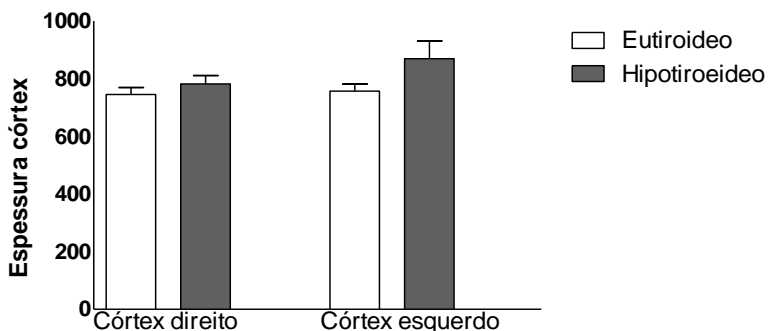
Tabela 3 - Efeito do hipotireoidismo congênito sobre a relação massa do córtex cerebral/massa corpórea em ratos em desenvolvimento.

	Relação massa do córtex cerebral/massa corpórea (mg/g)
Eutireoideo	42.0 ± 0.72
Hipotireoideo	34.7 ± 0.73***

Os ratos foram pesados no dia do experimento e logo após a eutanásia, o peso do córtex cerebral foi determinado. Então a razão massa do córtex cerebral/massa corpórea foi calculada. Os dados foram expressos como média ± E.P.M de 8 animais por grupo. Análise estatística teste “t” de Student ***p <0,001.

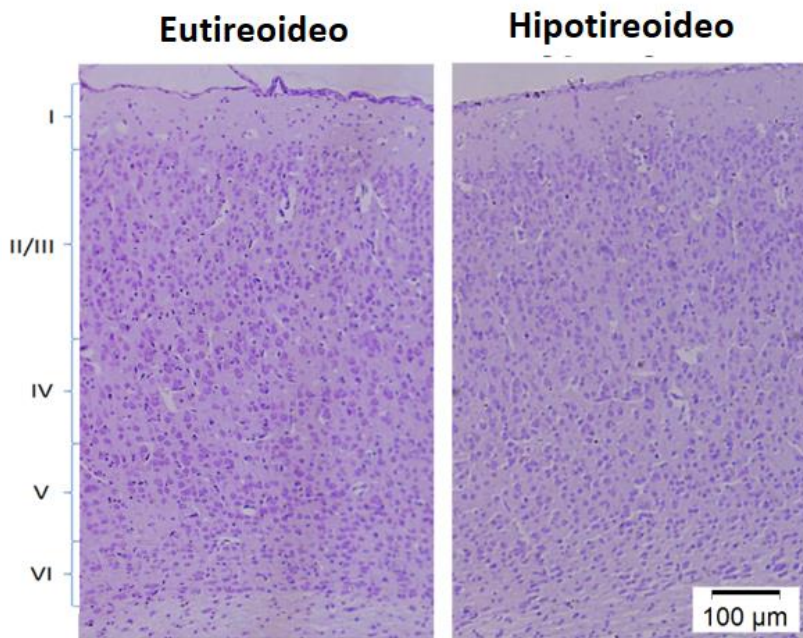
A caracterização histológica e estrutural das diferentes camadas do córtex sensorio-motor (CSM) dos filhotes eutireoideos e hipotireoideos foi analisada através da coloração com Nissl. Inicialmente, mensurou-se a espessura do CSM de animais eutireoideos e hipotireoideos nos hemisférios cerebrais esquerdo e direito. Os resultados mostraram que o hipotireoidismo congênito não modifica a espessura do CSM (Figura 41). A Figura 42 demonstra representativamente, que as condições gerais do tecido foram preservadas e mostra as delimitações das camadas I a VI do CSM que foram analisadas posteriormente (Figura 42).

Figura 41 - Efeito do hipotireoidismo congênito sobre a espessura das camadas do córtex sensorio-motor dos ratos em desenvolvimento



Os resultados foram expressos com média \pm E.P.M. de 06 animais em cada grupo. Análise estatística Anova de uma via seguido pelo pós teste de Bonferroni.

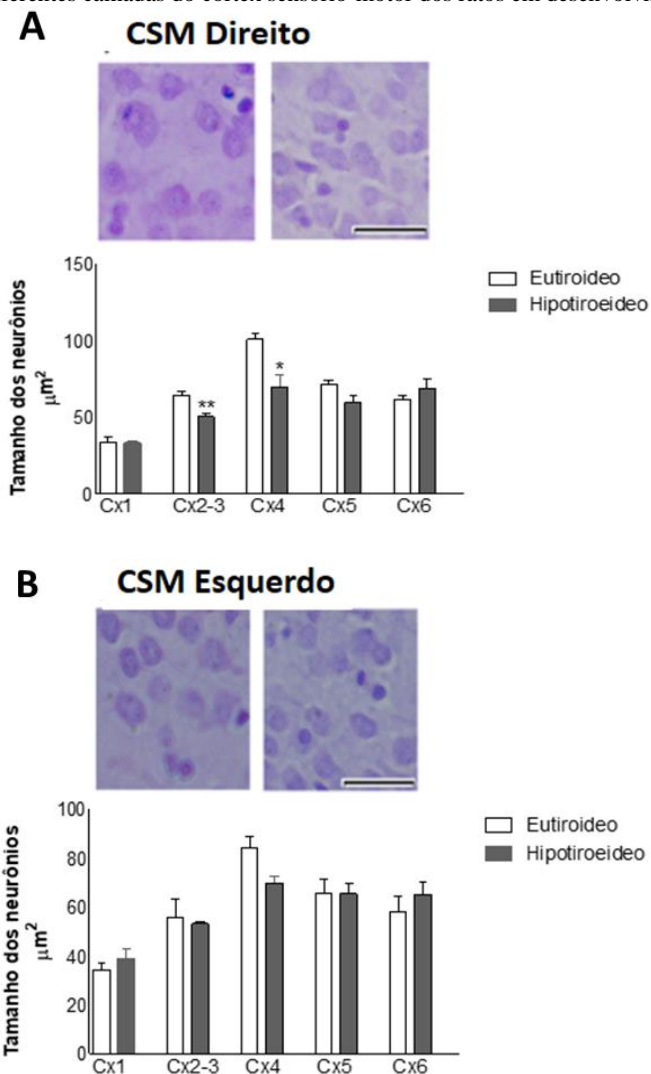
Figura 42 - Fotomicrografias de coloração Nissl das camadas do córtex cerebral de animais em desenvolvimento.



Prancha representativa com as camadas do córtex cerebral de animais em desenvolvimento, através da coloração de Nissil. Magnificação de 100X, barra de escala = 100 μ m.

Apesar de não alterar a espessura do CSM, o hipotireoidismo congênito acarretou em diminuição do tamanho dos neurônios nas camadas II e III e IV no CSM do hemisfério cerebral direito (Figura 43A). No entanto, não observamos diferença significativa no tamanho dos neurônios no CSM do hemisfério cerebral esquerdo (Figura 43B). A imagem apresentada nas Figuras 43A e 43B demonstra representativamente a diminuição no tamanho dos neurônios na camada II-III e IV do CSM de ratos eutireoideos e hipotireoideos.

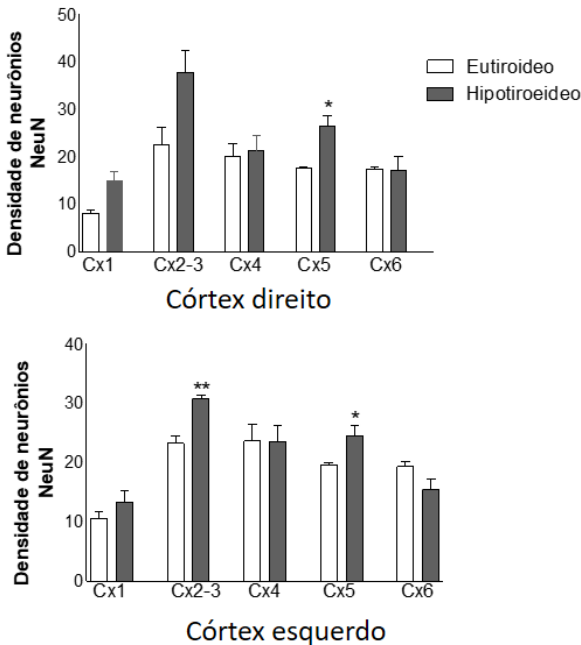
Figura 43 - Efeito do hipotireoidismo congênito sobre o tamanho dos neurônios nas diferentes camadas do córtex sensório-motor dos ratos em desenvolvimento.



A. Imagem representativa dos neurônios das camadas II e III e IV do CSM do hemisfério cerebral direito. B- Imagem representativa dos neurônios das camadas II e III e IV do CSM do hemisfério cerebral esquerdo. Os resultados foram expressos com média \pm E.P.M. de 06 animais em cada grupo. Anova de uma via seguido pelo pós teste de Bonferroni ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ em relação ao grupo eutiroideo. Magnificação de 400X, barra de escala = 20 μ m.

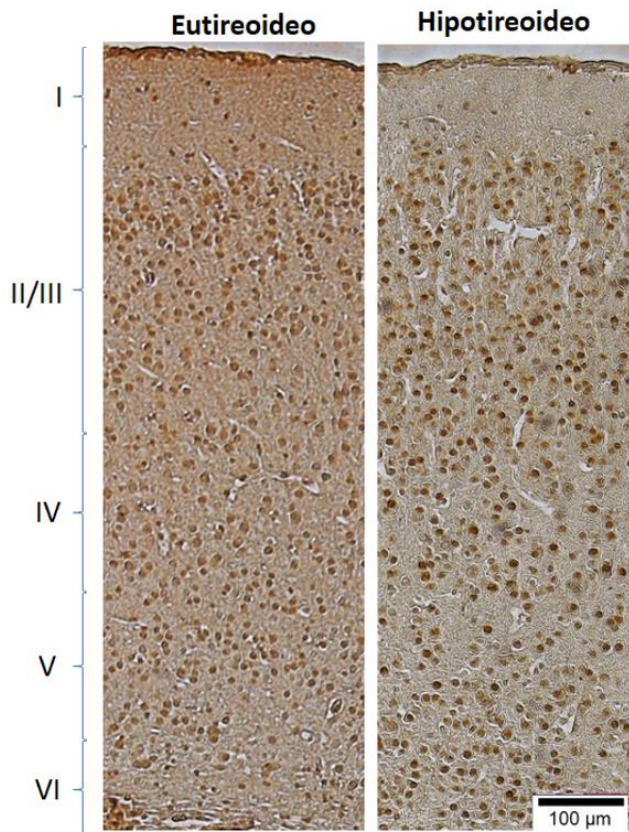
Posteriormente, uma vez definido que a espessura do CSM não foi alterada pelo hipotireoidismo congênito, procedeu-se a análise do número de células GFAP e NeuN positivas nessa sub-região do córtex cerebral de animais eutireoideos e hipotireoideos. Para tal, foram realizados ensaios de imuno histoquímica utilizando os anticorpos específicos para essas proteínas. Os resultados mostraram aumento significativo na densidade de células NeuN positivas em camadas específicas do CSM (II-III e V) dos animais hipotireoideos (Figuras 44 e 45), sugerindo que as camadas CSM são afetadas de forma diferente pelos baixos níveis dos HTs durante o desenvolvimento neural.

Figura 44 - Efeito do hipotireoidismo congênito sobre a densidade dos neurônios NeuN positivos nas diferentes camadas do córtex sensorio-motor dos ratos em desenvolvimento.



Os resultados foram expressos com média \pm E.P.M. de 06 animais em cada grupo. Análise estatística Anova de uma via seguido pelo pós teste de Bonferroni ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

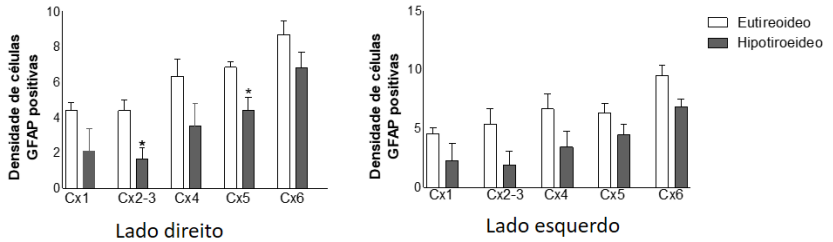
Figura 45 - Fotomicrografias do córtex sensório-motor de ratos em desenvolvimento e a densidade das células NeuN positivas através de imunohistoquímica.



Prancha representativa das células NeuN positivas em animais em desenvolvimento. Magnificação de 100X, barra de escala = 100 µm.

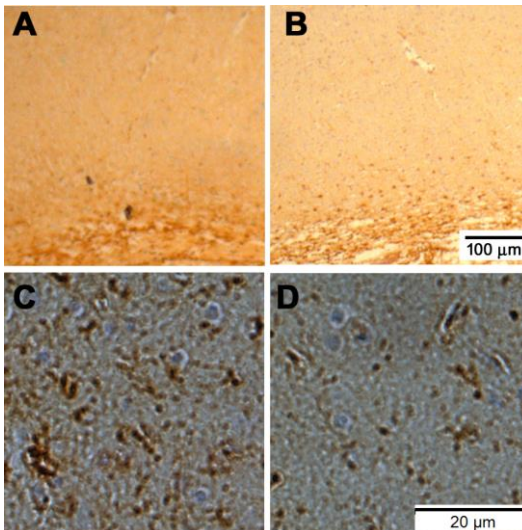
Além do que foi exposto, determinamos a densidade de células positivas para a GFAP no CSM de ratos eutireoideos e hipotireoideos através de imunohistoquímica. Os resultados demonstraram que o hipotireoidismo congênito diminui significativamente a densidade de células positivas para GFAP, em camadas específicas do CSM (Figura 46 e 47), sugerindo um atraso na maturação de astrócitos em córtex cerebral de animais hipotireoideos.

Figura 46 - Efeito do hipotireoidismo congênito sobre a densidade de células positivas para GFAP nas diferentes camadas do córtex sensório-motor dos ratos em desenvolvimento.



Os resultados foram expressos com média \pm E.P.M. de 06 animais em cada grupo. Análise estatística: Anova de uma via seguido pelo pós teste de Bonferroni * $p < 0,05$.

Figura 47 - Fotomicrografias do córtex sensório-motor de ratos em desenvolvimento e a densidade das células positivas para GFAP através de imunohistoquímica.

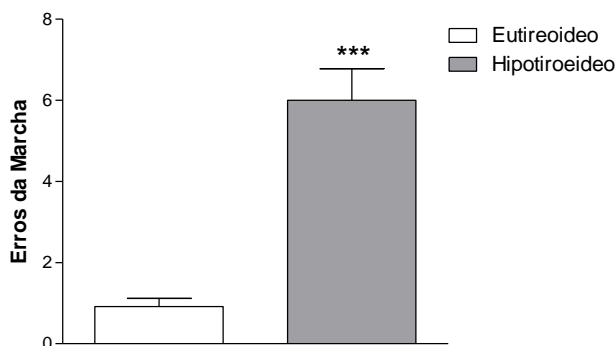


Imagens representativas da imunohistoquímica para marcação de células positivas para GFAP em CSM de animais em desenvolvimento (A e C = eutireoideos; B e D = hipotireoideos). A e B) Magnificação de 40X, barra de escala = 100 μ m. C e D) Magnificação de 400X, barra de escala = 20 μ m.

Considerando-se que o hipotireoidismo congênito provoca várias alterações neuroquímicas e histoquímicas no CSM de ratos em desenvolvimento, investigou-se se os efeitos observados eram capazes de afetar a função do córtex motor. Nesse contexto, realizamos o teste de “foot-fault” para acessar as possíveis diferenças na função locomotora entre animais eutireoideos e hipotireoideos. A Figura 48 mostrou que o hipotireoidismo congênito aumentou significativamente o número de “erros” cometidos pelo grupo hipotireoideos no teste, demonstrando que a deficiência dos HTs afeta a função motora de ratos durante o desenvolvimento.

O aumento observado no número de “erros” no teste do “Foot-fault” está provavelmente associado à redução das habilidades locomotoras dos animais. Esse resultado pode refletir a maturação tardia das estruturas responsáveis pelas respostas sensorio-motoras devido à deficiência de hormônio da tireoide. Corroborando esta hipótese, a mielinização tardia, bem como o atraso no desenvolvimento motor e nas funções motoras foram descritos em um relato de caso de uma menina de 1 ano de idade com hipotireoidismo congênito (Ariyuca *et al.*, 2014).

Figura 48 - Efeito do hipotireoidismo congênito sobre a função locomotora através do teste de “foot-fault” em ratos.



Os resultados foram expressos com média \pm E.P.M. de 06 animais em cada grupo. Análise estatística: teste “t” de Student *** $p < 0,001$.

4.3.6 Discussão

O hipotireoidismo congênito foi induzido no presente estudo pela administração de 0,05% de PTU na água de beber de ratas gestantes até os filhotes nascerem e completarem 15 dias de idade. A eficácia do tratamento com PTU para indução do hipotireoidismo já foi previamente demonstrada pelo nosso grupo de pesquisa, através da diminuição dos níveis plasmáticos de T_3 e T_4 , que foram associados a altos níveis de TSH (Cattani *et al.*, 2013).

Os resultados do presente estudo mostraram que o hipotireoidismo congênito aumenta o transporte de aminoácidos neutros e neste sentido sugerimos uma maior captação de glutamina, bem como influxo de Ca^{2+} em córtex cerebral de ratos em desenvolvimento. Esses efeitos podem estar associados a diminuição da atividade da GS, bem como à indução de estresse oxidativo.

Diversos trabalhos relataram que a diminuição da concentração ou ausência dos HTs pode acarretar inúmeros danos ao SNC. Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que o hipotireoidismo congênito diminui a captação de glutamato nos astrócitos hipocâmpais, devido a diminuição nos níveis dos transportadores glutamatérgicos astrogliais (GLAST e GLT-1) aumentando a disponibilidade deste aminoácido na fenda sináptica (Cattani *et al.*, 2013). Outro trabalho do nosso grupo relatou também uma diminuição dos níveis GLAST e GLT-1 no córtex cerebral de animais hipotireoídeos com 15 dias de idade (Zamoner, Heimfarth e Pessoa-Pureur, 2008).

Os astrócitos são a principal proteção dos neurônios contra a excitotoxicidade glutamatérgica, esta defesa ocorre através da captação do glutamato presente no meio extracelular (Danbolt, 2001). Uma vez dentro dos astrócitos o glutamato é convertido a glutamina, a qual é transportada para os neurônios e desta forma, serve como um importante precursor para a síntese de glutamato pelos neurônios através da atividade da GS neuronal. Cattani e colaboradores (2013), observaram que a falta dos HTs gera uma falha no ciclo glutamato-glutamina, por inibição da atividade da GS. Esses dados corroboram os resultados do presente estudo, onde foi observado uma diminuição na atividade desta enzima no córtex cerebral de animais hipotireoídeos. Salienta-se que a glutamina é considerada uma maneira não tóxica de transporte de glutamato no sistema nervoso central (Fernandes *et al.*, 2010).

A expressão da GS e sua atividade são reguladas positivamente pelo hormônio T_3 , de forma que a redução da atividade desta enzima

evidencia este achado no hipotireoidismo. Diversos aminoácidos (Ibarrola e Rodriguez-Pena, 1997) necessários para a síntese dos componentes da bainha de mielina, são em parte, gerados através da via de sinalização da GS (Baas *et al.*, 1998). Desta forma, a ação do T₃ no desenvolvimento da mielinização e maturação pode ser mediado em parte, através da regulação genômica da GS (Tosic *et al.*, 1992; Ibarrola e Rodriguez-Pena, 1997).

A glutamina, por sua vez, é captada para os neurônios através do o sistema A de transporte de aminoácidos neutros, o qual serve como um controle para manter o equilíbrio glutamina/glutamato dentro das células do SNC. Observamos no presente estudo, um estímulo no transporte de aminoácidos neutros no córtex cerebral de animais com hipotireoidismo. Este fenômeno pode estar contribuindo com a maior entrada de glutamina nos neurônios e conseqüentemente a formação de glutamato no interior destas células.

Já foi demonstrado que a transferência de glutamato dos neurônios para os astrócitos é menor no cérebro de ratos neonatos, quando comparado com ratos adultos, enquanto a transferência de glutamina a partir dos astrócitos para os neurônios glutamatérgicos é relativamente aumentada (Morken *et al.*, 2014). Esses dados estão de acordo com os resultados obtidos no presente estudo, onde se observou um estímulo no transporte de aminoácidos neutros, representado através do acúmulo de ¹⁴C-MeAIB. O aumento no transporte de glutamina para os neurônios pode estar associado a maior disponibilidade desse aminoácido para a síntese de glutamato e, conseqüentemente, pode estar indiretamente associado ao fenômeno de excitotoxicidade glutamatérgica.

O sistema A de transporte de aminoácidos está acoplado a entrada de Na⁺ nas células. A entrada desse íon pode alterar o potencial de membrana da célula e evocar a abertura de canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem (CCDV). Nesse sentido, o aumento no influxo de Ca²⁺ demonstrado no presente estudo pode ser consequência tanto da entrada deste íon por CCDV quanto via receptores do subtipo NMDA ativados pelo aumento de glutamato na fenda sináptica. Pesquisadores demonstraram que o aumento na captação de Ca²⁺, através da ativação dos receptores NMDA, ativa a fosforilação de neurofilamentos, gerando uma desregulação no citoesqueleto e desta forma a morte celular (Pessoa-Pureur e Wajner, 2007).

Salienta-se que oscilações nas concentrações intracelulares de Ca²⁺ durante o estágio de desenvolvimento neural pode acarretar em alterações dos processos relacionados ao neurodesenvolvimento, tal

como crescimento axonal de neurônios e migração de células neuronais (Berridge *et al.*, 2003; Berridge, 2014). Estes eventos interconectados podem causar disfunções astrogliais, além de comprometer o ciclo glutamato-glutamina, induzir estresse oxidativo e ocasionar a morte celular.

Nós anteriormente descrevemos que o hipotireoidismo congênito alterava a integridade do citoesqueleto neuronal atuando no sistema de fosforilação associado ao neurofilamento e na modulação de vias de sinalização da MAPK em células de glioma C6 (Zamoner, Funchal, *et al.*, 2007). Além disso, o hipotireoidismo congênito induz a hiperfosforilação de GFAP no hipocampo de ratos imaturos (Cattani *et al.*, 2013). Por outro lado, a fosforilação de GFAP não foi alterada em fatias de córtex cerebral de ratos hipotireoideos imaturos (Zamoner, Heimfarth e Pessoa-Pureur, 2008). Curiosamente, no presente estudo, observamos hiperfosforilação da GFAP em astrócitos corticais primários de filhotes hipotireoideos, enquanto o imunoconteúdo dessa diminuiu.

A GFAP, proteína de filamento intermediário característica de astrócitos, tem sido implicada em uma variedade de funções celulares, incluindo migração celular e homeostase de glutamato (Hol e Pekny, 2015). Diminuição dos níveis de GFAP pode refletir um atraso e uma prisão parcial da diferenciação de astrócitos induzida pelo hipotireoidismo. Considerando que o astrócito desempenha papéis fundamentais no metabolismo cerebral, na plasticidade sináptica e no processamento da informação, a disfunção associada ao citoesqueleto causada pelo hipotireoidismo congênito pode levar à desorganização irreversível do sistema nervoso central. O efeito dos hormônios tireoidianos sobre a proliferação de células gliais foi previamente demonstrado por nós e outros grupos (Davis *et al.*, 2006; Zamoner, Funchal, *et al.*, 2007).

Estudos prévios descreveram o hipotireoidismo como indutor do estresse oxidativo, e uma das primeiras manifestações observadas foi a depleção dos níveis de GSH (Rahaman *et al.*, 2001). A glutatona é o componente mais importante nos processos de defesa contra toxicidade de xenobióticos e componentes oxidantes a qual as células são expostas diariamente. O metabolismo normalmente requer constante e rápido reabastecimento de GSH, o qual é realizado através tanto através da redução da GSSG quanto da síntese de novo de GSH (Dickinson e Forman, 2002).

Nossos resultados demonstraram diminuição nos níveis da GSH no córtex cerebral de animais com hipotireoidismo congênito,

corroborando resultados anteriores do grupo que observaram a depleção dos níveis de GSH, associado com o aumento da lipoperoxidação no hipocampo de ratos hipotireoideos em desenvolvimento (Cattani *et al.*, 2013). Esses dados em conjunto sugerem a indução de danos neurooxiativos no cérebro de ratos com hipotireoidismo. Além disso, o elevado consumo de O₂ confere ao cérebro uma maior vulnerabilidade ao estresse oxidativo. Assim, a regulação negativa da GSH, o principal antioxidante do cérebro, pode ser responsável, pelo menos em parte, pelo estresse oxidativo no cérebro de animais com falta ou ausência de HTs (Dasgupta *et al.*, 2007).

Dasgupta *et al.* (2007) propuseram através de experimentos com homogeneizado de cérebro bem como com culturas de astrócitos, que os HTs podem influenciar os níveis de GSH através da modulação da glutamato cisteína ligase (GCL), enzima passo limitante para a síntese da GSH. Os autores avaliaram que ratos neonatos (P5-P20) deficientes de HTs tiveram quedas na atividade da GCL o que acarretou diminuição dos níveis da GSH, sendo esta resposta dependente da idade do animal.

A síntese de GSH é coordenada principalmente pela enzima GGT, uma ectoenzima responsável pela degradação extracelular da GSH através da remoção do seu grupo gama-glutamil. Assim, ocorre à formação de um sulfidríldipeptídeo, a cisteinil-glicina (cysgly). Esta por sua vez, pode ser clivada por dipeptidases de membrana e os aminoácidos são reabsorvidos para o interior da célula, ou a própria cisteinil-glicina é levada para o meio intracelular. Dessa forma, ocorre um aumento da disponibilidade dos aminoácidos que fazem parte de sua estrutura, para serem captados pela célula e reutilizados para a síntese de novo de GSH (Dickinson e Forman, 2002).

No presente estudo, observamos uma diminuição na atividade da GGT, que pode estar relacionada diretamente à diminuição dos níveis de GSH, gerando um prejuízo na defesa antioxidante de ratos em desenvolvimento com hipotireoidismo.

Nossos resultados também demonstraram um aumento na atividade da colinesterase no córtex de animais com hipotireoidismo congênito, corroborando os resultados de (Salvati *et al.*, 1994), que descreveram aumento na atividade da colinesterase no córtex de animais em desenvolvimento com hipotireoidismo.

O sistema colinérgico desempenha um papel fundamental nos processos de aprendizado e memória. A síntese de acetilcolina ocorre nos terminais nervosos a partir dos precursores colina e a acetil-coenzima A fornecidos pela clivagem de fosfolipídios e a partir do metabolismo oxidativo da mitocôndria (Winkler *et al.*, 1995) . De

acordo com (Wu *et al.*, 2010), o aumento dos níveis de acetilcolina poderia estar implicado na ativação de receptores nicotínicos, permitindo o influxo extracelular de Na^+ e Ca^{2+} . A ativação de receptores para acetilcolina está relacionada a diversas funções no sistema nervoso central, incluindo respostas cognitivas.

No presente estudo, investigamos as consequências bioquímicas, histoquímicas e funcionais do hipotireoidismo congênito ao córtex sensorio-motor de ratos em desenvolvimento. Em conjunto, nossos resultados sugerem que o hipotireoidismo congênito altera a neurotransmissão glutamatérgica e colinérgica no córtex cerebral de ratos imaturos. Esses efeitos estão associados a alterações no metabolismo de glutamato, no influxo de Ca^{2+} e desequilíbrio redox, culminando em estresse oxidativo e neurotoxicidade. O desequilíbrio do sistema glutamatérgico pode afetar a homeostase do glutamato e o ciclo glutamato-glutamina, levando a comprometimentos importantes nas funções neurais. As alterações histológicas observadas no córtex cerebral sensorio-motor foram associadas ao comprometimento da função motora em animais hipotireoideos.

Outras abordagens experimentais são necessárias para esclarecer os mecanismos envolvidos na fisiopatologia das disfunções neurológicas induzidas por hipotireoidismo congênito, bem como possíveis alvos para intervenção clínica em prol dos indivíduos acometidos.

Os resultados apresentados no Estudo (III) foram submetidos ao periódico “Molecular and Cellular Endocrinology” em Fevereiro de 2018 com o título “Congenital hypothyroidism leads to oxidative stress and affects the sensorimotor cortex structure and functions during neurodevelopment in rats” (ANEXO II).

4.3.7 Conclusões Parciais

- O hipotireoidismo congênito altera a neurotransmissão colinérgica e glutamatérgica em córtex cerebral de ratos em desenvolvimento, esses efeitos podem estar associados com a indução do estresse oxidativo;
- O hipotireoidismo congênito altera a histologia do córtex sensório-motor de ratos em desenvolvimento;
- Os efeitos neuroquímicos e histoquímicos induzidos pelo hipotireoidismo congênito no córtex cerebral de ratos imaturos estão associados ao comprometimento da função motora.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através de estudos *ex vivo*, *in vivo* (ESTUDO I e II) e *in silico* (ESTUDO I) sobre a ação do hormônio T_{3r} em modelo animal e simulação computacional, nesta tese demonstramos de forma pioneira a interação do T_{3r} com o receptor de integrina $\alpha\beta3$.

Analisando estes dois estudos em conjunto, sugerimos que o T_{3r} pode atuar como um agente benéfico frente aos danos neurotóxicos relacionados com a ausência dos HTs durante o período de desenvolvimento como a excitotoxicidade glutamatérgica, metabolismo energético, estresse oxidativo, modulação do citoesqueleto e morfologia do hipocampo. Nossos resultados demonstraram que as ações positivas do T_{3r} ocorrem preferencialmente através de mecanismos não genômicos e têm início rápido, através da interação com receptores presentes na membrana das células. Contudo, sugerimos nesta Tese, que estes efeitos podem ser sustentados a longo prazo, através da ativação de vias de sinalização e segundos mensageiros.

Ainda apresentamos resultados dos efeitos do hipotireoidismo congênito sobre parâmetros relacionados com o metabolismo do glutamato, sistema de defesa antioxidante e morfologia no córtex de animais em desenvolvimento (ESTUDO III).

As disfunções da tireoide figuram entre as patologias endócrinas de maior prevalência no mundo e os HTs podem representar uma estratégia terapêutica importante no tratamento de neoplasias cerebrais, demência não Alzheimer, entre outros. Neste sentido, este estudo apresenta inúmeras perspectivas, propondo o T_{3r} como um hormônio biologicamente ativo no SNC, capaz modular diversos parâmetros bioquímicos.

O esclarecimento dos mecanismos que estão envolvidos na geração dos danos relacionados com a falta dos HTs vêm sendo há muitos anos alvo de estudo do nosso grupo de pesquisa, e agora de maneira pioneira estamos demonstrando as ações protetoras do hormônio T_{3r} que foi durante muitos anos considerado uma forma inativa dos HTs. Entretanto, estudos mais aprofundados se fazem necessários para entender o papel fisiológicos deste hormônio sobre células neurais. Sendo assim, pretende-se dar continuidade a este trabalho, aprofundando a investigação dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos nas ações do T_{3r} sobre células neuronais e gliais.

6 CONCLUSÕES

- Este estudo demonstrou, através de ações não genômicas sustentadas a longo prazo, efeitos protetores pioneiros do hormônio T_{3r} sobre danos relacionados a falta ou ausência dos HTs durante o período de desenvolvimento.

- O hormônio T_{3r} interage com o receptor de membrana (integrina $\alpha\beta3$) no hipocampo de ratos hipotireoideos, restaurando a fosforilação da GFAP e a homeostase do glutamato através da atividade das enzimas GS, AST e GGT apresentando dessa forma um efeito protetor frente a excitotoxicidade glutamatérgica e sobre a modulação da captação de Ca²⁺.

- O T_{3r} reestabelece o equilíbrio redox em fatias de hipocampo de animais hipotireoideos através da ação sobre os níveis de GSH e lipoperoxidação lipídica e sobre a atividade das enzimas GGT, SOD, GPx, GR e G6PD. Os efeitos do T_{3r} podem ser sustentados a longo prazo através da ativação de vias de sinalização.

- O hormônio T_{3r} é capaz de modular a morfologia dos neurônios da região CA1 do hipocampo de animais hipotireoideos, mostrando-se desta forma um agente benéfico frente aos danos cognitivos relacionados ao hipotireoidismo congênito.

- Nossas descobertas fornecem provas experimentais que o T_{3r} é um hormônio da tireoide biologicamente ativo atuando por mecanismos não genômicos. Além disso, comprovamos a hipótese que as ações do T_{3r} são iniciadas pela interação do hormônio com o receptor de integrina $\alpha\beta3$, ativando cascatas de sinalização através de mecanismos não genômicos independente da transcrição gênica.

-Estudos adicionais são necessários para compreender o mecanismo de ação e o papel fisiológico do T_{3r} no SNC.

-O hipotireoidismo congênito altera a neurotransmissão colinérgica e glutamatérgica em córtex cerebral de ratos em desenvolvimento, esses efeitos podem estar associados com a indução do estresse oxidativo.

- O hipotireoidismo congênito provoca alterações neuroquímicas, histológicas e comportamentais em ratos em desenvolvimento.

7 PERSPECTIVAS

Apoiados nos resultados obtidos até o presente momento pretende-se dar continuidade aos estudos com intuito de melhor entender as consequências do hipotireoidismo congênito sobre as estruturas do SNC de ratos em desenvolvimento, bem como a capacidade do hormônio T_{3R} reverter alguns desequilíbrios ocasionados pela falta ou ausência dos HTs durante o período de desenvolvimento. Sendo assim, pretende-se:

- Caracterizar o efeito do T_{3R} sobre a expressão dos transportadores glutamatérgicos (GLAST e GLT-1) e dos transportadores de aminoácidos neutros no hipocampo dos animais em desenvolvimento;
- Investigar o efeito da administração *in vivo* do T_{3R} sobre parâmetros morfológicos como neuronitogênese e sinaptogênese através de microscopia óptica;
- Estudar o efeito protetor do T_{3R} sobre a morte neuronal através do teste TUNEL;
- Verificar a modulação de vias de sinalização neuronal envolvidas com o estresse oxidativo;
- Realizar os mesmos experimentos com a suplementação hormonal avaliando as ações do T_{3R} no córtex cerebral de animais em desenvolvimento;
- Analisar a formação da bainha de mielina e a integridade da mitocôndria no hipotireoidismo congênito bem como a ação do T_{3R} sobre esses parâmetros através de microscopia eletrônica.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 121-6, 1984. ISSN 0076-6879 (Print)0076-6879. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

AGSTER, K. L.; BURWELL, R. D. Cortical efferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. **Hippocampus**, v. 19, n. 12, p. 1159-86, Dec 2009. ISSN 1050-9631. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/hipo.20578> >.

ALBRECHT, J. et al. Roles of glutamine in neurotransmission. **Neuron Glia Biol**, v. 6, n. 4, p. 263-76, Nov 2010. ISSN 1740-925x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1017/s1740925x11000093> >.

ALVA-SANCHEZ, C. et al. Participation of NMDA-glutamatergic receptors in hippocampal neuronal damage caused by adult-onset hypothyroidism. **Neurosci Lett**, v. 453, n. 3, p. 178-81, Apr 10 2009. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2009.02.017> >.

ANDERSON, G. W. Thyroid hormones and the brain. **Front Neuroendocrinol**, v. 22, n. 1, p. 1-17, Jan 2001. ISSN 0091-3022 (Print)0091-3022. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1006/frne.2000.0208> >.

ARIYUCA, S. et al. A case of congenital hypothyroidism presented with dysmyelination findings. **Journal of Acute Disease**, v. 3, n. 1, p. 74-76, 2014/01/01/ 2014. ISSN 2221-6189. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2221618914600184> >.

AUSO, E. et al. A moderate and transient deficiency of maternal thyroid function at the beginning of fetal neocortico-genesis alters neuronal migration. **Endocrinology**, v. 145, n. 9, p. 4037-47, Sep 2004. ISSN 0013-7227 (Print)0013-7227. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1210/en.2004-0274> >.

AZIZI, F.; AMOUZEGAR, A. Management of hyperthyroidism during pregnancy and lactation. **Eur J Endocrinol**, v. 164, n. 6, p. 871-6, Jun 2011. ISSN 0804-4643. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1530/eje-10-1030> >.

BAAS, D. et al. Glutamine synthetase expression and activity are regulated by 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and hydrocortisone in rat oligodendrocyte cultures. **Int J Dev Neurosci**, v. 16, n. 5, p. 333-40, Aug 1998. ISSN 0736-5748 (Print)0736-5748. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BANERJEE, B. D. et al. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. **Toxicol Lett**, v. 107, n. 1-3, p. 33-47, Jun 30 1999. ISSN 0378-4274 (Print)0378-4274. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BAQUI, M. et al. Human type 3 iodothyronine selenodeiodinase is located in the plasma membrane and undergoes rapid internalization to endosomes. **J Biol Chem**, v. 278, n. 2, p. 1206-11, Jan 10 2003. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M210266200> >.

BARBOSA, F. F. et al. Differential roles of the dorsal hippocampal regions in the acquisition of spatial and temporal aspects of episodic-like memory. **Behav Brain Res**, v. 232, n. 1, p. 269-77, Jun 15 2012. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2012.04.022> >.

BAREZ-LOPEZ, S.; GUADANO-FERRAZ, A. Thyroid Hormone Availability and Action during Brain Development in Rodents. **Front Cell Neurosci**, v. 11, p. 240, 2017. ISSN 1662-5102 (Print)1662-5102. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2017.00240> >.

BARGAGNA, S. et al. School attainments in children with congenital hypothyroidism detected by neonatal screening and treated early in life. **Eur J Endocrinol**, v. 140, n. 5, p. 407-13, May 1999. ISSN 0804-4643 (Print)0804-4643. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BARROS-BARBOSA, A. R. et al. P2X7 receptor activation downmodulates Na(+)-dependent high-affinity GABA and glutamate transport into rat brain cortex synaptosomes. **Neuroscience**, v. 306, p. 74-90, Oct 15 2015. ISSN 0306-4522. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.08.026> >.

BASSETT, J. H.; HARVEY, C. B.; WILLIAMS, G. R. Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. **Mol Cell Endocrinol**, v. 213, n. 1, p. 1-11, Dec 31 2003. ISSN 0303-7207 (Print)0303-7207. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2003.10.033> >.

BATRA, S.; SJOGREN, C. Effect of estrogen treatment on calcium uptake by the rat uterine smooth muscle. **Life Sci**, v. 32, n. 4, p. 315-9, Jan 24 1983. ISSN 0024-3205 (Print)0024-3205. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BAUER, M.; WHYBROW, P. C. Thyroid hormone, neural tissue and mood modulation. **World J Biol Psychiatry**, v. 2, n. 2, p. 59-69, Apr 2001. ISSN 1562-2975 (Print)1562-2975. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BERBEL, P. et al. Role of thyroid hormones in the maturation and organisation of rat barrel cortex. **Neuroscience**, v. 107, n. 3, p. 383-94, 2001. ISSN 0306-4522 (Print)0306-4522. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

_____. Delayed neurobehavioral development in children born to pregnant women with mild hypothyroxinemia during the first month of gestation: the importance of early iodine supplementation. **Thyroid**, v. 19, n. 5, p. 511-9, May 2009. ISSN 1050-7256. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/thy.2008.0341> >.

BERBEL, P. J. et al. Effect of hypothyroidism on the size of spines of pyramidal neurons of the cerebral cortex. **Brain Res**, v. 337, n. 2, p. 217-23, Jul 1 1985. ISSN 0006-8993 (Print)0006-8993. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BERGH, J. J. et al. Integrin alphaVbeta3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. **Endocrinology**, v. 146, n. 7, p. 2864-71, Jul 2005. ISSN 0013-7227 (Print)0013-7227. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1210/en.2005-0102> >.

BERMEYER, J.; BERGMAYER, H.-U. **Bergmeyer Methods of Enzymatic Analysis**. Wiley-Blackwell, 1983. 574 ISBN 3527260412.

BERNAL, J. Thyroid hormone receptors in brain development and function. **Nat Clin Pract Endocrinol Metab**, v. 3, n. 3, p. 249-59, Mar 2007. ISSN 1745-8366 (Print)1745-8366. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/ncpendmet0424> >.

_____. Thyroid Hormones in Brain Development and Function. 2015/09/02 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> >.

BERNAL, J.; GUADANO-FERRAZ, A.; MORTE, B. Perspectives in the study of thyroid hormone action on brain development and function. **Thyroid**, v. 13, n. 11, p. 1005-12, Nov 2003. ISSN 1050-7256 (Print)1050-7256. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/105072503770867174> >.

BERRIDGE, M. J. Calcium regulation of neural rhythms, memory and Alzheimer's disease. **J Physiol**, v. 592, n. 2, p. 281-93, Jan 15 2014. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2013.257527> >.

BERRIDGE, M. J.; BOOTMAN, M. D.; RODERICK, H. L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 4, n. 7, p. 517-29, Jul 2003. ISSN 1471-0072 (Print)1471-0072. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrm1155> >.

BERRY, M. J.; BANU, L.; LARSEN, P. R. Type I iodothyronine deiodinase is a selenocysteine-containing enzyme. **Nature**, v. 349, n. 6308, p. 438-40, Jan 31 1991. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/349438a0> >.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **J Lab Clin Med**, v. 61, p. 882-8, May 1963. ISSN 0022-2143 (Print)0022-2143. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BIANCO, A. C. et al. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. **Endocr Rev**, v. 23, n. 1, p. 38-89, Feb 2002. ISSN 0163-769X (Print)0163-769x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1210/edrv.23.1.0455> >.

BIRD, R. P.; DRAPER, H. H. Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 299-305, 1984. ISSN 0076-6879 (Print)0076-6879. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BITIKTAS, S. et al. The effects of intra-hippocampal L-thyroxine infusion on long-term potentiation and long-term depression: A possible role for the alphavbeta3 integrin receptor. **J Neurosci Res**, v. 95, n. 8, p. 1621-1632, Aug 2017. ISSN 0360-4012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jnr.23985> >.

BLACK, C. N. et al. Is depression associated with increased oxidative stress? A systematic review and meta-analysis.

Psychoneuroendocrinology, v. 51, p. 164-75, Jan 2015. ISSN 0306-4530. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.09.025> >.

BLUTSTEIN, T. et al. Oestradiol up-regulates glutamine synthetase mRNA and protein expression in the hypothalamus and hippocampus: implications for a role of hormonally responsive glia in amino acid neurotransmission. **J Neuroendocrinol**, v. 18, n. 9, p. 692-702, Sep 2006. ISSN 0953-8194 (Print)0953-8194. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2826.2006.01466.x> >.

BOELAERT, K.; FRANKLYN, J. A. Thyroid hormone in health and disease. **J Endocrinol**, v. 187, n. 1, p. 1-15, Oct 2005. ISSN 0022-0795 (Print)0022-0795. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1677/joe.1.06131> >.

BOLIN, K. et al. miR-8 modulates cytoskeletal regulators to influence cell survival and epithelial organization in Drosophila wings. **Dev Biol**, v. 412, n. 1, p. 83-98, Apr 01 2016. ISSN 0012-1606. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.01.041> >.

BOVERIS, A. et al. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. **Arch Biochem Biophys**, v. 227, n. 2, p. 534-41, Dec 1983. ISSN 0003-9861 (Print)0003-9861. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BRADLEY, D. J.; YOUNG, W. S., 3RD; WEINBERGER, C. Differential expression of alpha and beta thyroid hormone receptor genes in rat brain and pituitary. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 18, p. 7250-4, Sep 1989. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BRENT, G. A. Mechanisms of thyroid hormone action. **J Clin Invest**, v. 122, n. 9, p. 3035-43, Sep 2012. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1172/jci60047> >.

BRIDGES, R. J.; NATALE, N. R.; PATEL, S. A. System xc(-) cystine/glutamate antiporter: an update on molecular pharmacology and roles within the CNS. **Br J Pharmacol**, v. 165, n. 1, p. 20-34, Jan 2012. ISSN 0007-1188. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01480.x> >.

CAFFREY, T. J. Transient hyperthyroidism of hyperemesis gravidarum: a sheep in wolf's clothing. **J Am Board Fam Pract**, v. 13, n. 1, p. 35-8, Jan-

Feb 2000. ISSN 0893-8652 (Print)0893-8652. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

CALVO, R. et al. Congenital hypothyroidism, as studied in rats. Crucial role of maternal thyroxine but not of 3,5,3'-triiodothyronine in the protection of the fetal brain. **J Clin Invest**, v. 86, n. 3, p. 889-99, Sep 1990. ISSN 0021-9738 (Print)0021-9738. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1172/jci114790> >.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods Enzymol**, v. 113, p. 484-90, 1985. ISSN 0076-6879 (Print)0076-6879. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

CARMIGNOTO, G. Reciprocal communication systems between astrocytes and neurones. **Prog Neurobiol**, v. 62, n. 6, p. 561-81, Dec 2000. ISSN 0301-0082 (Print)0301-0082. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

CASTRO, M. A. et al. A metabolic switch in brain: glucose and lactate metabolism modulation by ascorbic acid. **J Neurochem**, v. 110, n. 2, p. 423-40, Jul 2009. ISSN 0022-3042. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06151.x> >.

CATTANI, D. et al. Congenital hypothyroidism alters the oxidative status, enzyme activities and morphological parameters in the hippocampus of developing rats. **Mol Cell Endocrinol**, v. 375, n. 1-2, p. 14-26, Aug 15 2013. ISSN 0303-7207. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2013.05.001> >.

CESCONETTO, P. A. et al. Maternal Exposure to Ethanol During Pregnancy and Lactation Affects Glutamatergic System and Induces Oxidative Stress in Offspring Hippocampus. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 40, n. 1, p. 52-61, Jan 2016. ISSN 0145-6008.

CHAKRABARTI, N.; RAY, A. K. Rise of intrasynaptosomal Ca²⁺ level and activation of nitric oxide synthase in adult rat cerebral cortex pretreated with 3-5-3'-L-triiodothyronine. **Neuropsychopharmacology**, v. 22, n. 1, p. 36-41, Jan 2000. ISSN 0893-133X (Print)0893-133x. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0893-133x\(99\)00073-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0893-133x(99)00073-1) >.

CHAMBERLAIN, S. E.; JANE, D. E.; JONES, R. S. Pre- and post-synaptic functions of kainate receptors at glutamate and GABA synapses in the rat entorhinal cortex. **Hippocampus**, v. 22, n. 3, p. 555-76, Mar 2012. ISSN 1050-9631. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/hipo.20921> >.

CHANCE, B.; WILLIAMS, G. R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state. **J Biol Chem**, v. 217, n. 1, p. 409-27, Nov 1955. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

CHATONNET, F.; FLAMANT, F.; MORTE, B. A temporary compendium of thyroid hormone target genes in brain. **Biochim Biophys Acta**, v. 1849, n. 2, p. 122-9, Feb 2015. ISSN 0006-3002 (Print)0006-3002. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.05.023> >.

CHERON, R. G.; MARAIS, H. J.; SELENKOW, H. A. Thyroid function and dysfunction: gestational considerations. **Compr Ther**, v. 4, n. 3, p. 64-73, Mar 1978. ISSN 0098-8243 (Print)0098-8243. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

CHO, Y.; BANNAI, S. Uptake of glutamate and cysteine in C-6 glioma cells and in cultured astrocytes. **J Neurochem**, v. 55, n. 6, p. 2091-7, Dec 1990. ISSN 0022-3042 (Print)0022-3042. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

CHOI, D. W. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. **Neuron**, v. 1, n. 8, p. 623-34, Oct 1988. ISSN 0896-6273 (Print)0896-6273. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

CHOPRA, I. J.; SACK, J.; FISHER, D. A. 3,3',5'-Triiodothyronine (reverse T3) and 3,3',5-triiodothyronine (T3) in fetal and adult sheep: studies of metabolic clearance rates, production rates, serum binding, and thyroidal content relative to thyroxine. **Endocrinology**, v. 97, n. 5, p. 1080-8, Nov 1975. ISSN 0013-7227 (Print)0013-7227. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1210/endo-97-5-1080> >.

CLOS, J.; LEGRAND, C. An interaction between thyroid hormone and nerve growth factor promotes the development of hippocampus, olfactory bulbs and cerebellum: a comparative biochemical study of normal and hypothyroid rats. **Growth Factors**, v. 3, n. 3, p. 205-20, 1990. ISSN 0897-7194 (Print)0897-7194. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

CLOS, J. et al. Effects of thyroid state and undernutrition on S100 protein and astroglia development in rat cerebellum. **Dev Neurosci**, v. 5, n. 2-3, p. 285-92, Mar-Jun 1982. ISSN 0378-5866 (Print)0378-5866. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

CODY, V.; DAVIS, P. J.; DAVIS, F. B. Molecular modeling of the thyroid hormone interactions with alpha v beta 3 integrin. **Steroids**, v. 72, n. 2, p. 165-70, Feb 2007. ISSN 0039-128X (Print)0039-128x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2006.11.008> >.

COMPAGNUCCI, C. et al. The cytoskeletal arrangements necessary to neurogenesis. **Oncotarget**, v. 7, n. 15, p. 19414-29, Apr 12 2016. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.6838> >.

COOPER, D. S. Antithyroid drugs. **N Engl J Med**, v. 352, n. 9, p. 905-17, Mar 03 2005. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra042972> >.

CORDES, J.; CANO, J.; HAUPT, M. [Reversible dementia in hypothyroidism]. **Nervenarzt**, v. 71, n. 7, p. 588-90, Jul 2000. ISSN 0028-2804 (Print)0028-2804. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

COULTER, D. A.; EID, T. Astrocytic regulation of glutamate homeostasis in epilepsy. **Glia**, v. 60, n. 8, p. 1215-26, Aug 2012. ISSN 0894-1491. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/glia.22341> >.

COUTINHO, V.; KNOPFEL, T. Metabotropic glutamate receptors: electrical and chemical signaling properties. **Neuroscientist**, v. 8, n. 6, p. 551-61, Dec 2002. ISSN 1073-8584 (Print)1073-8584. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

D'AREZZO, S. et al. Rapid nongenomic effects of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine on the intracellular pH of L-6 myoblasts are mediated by intracellular calcium mobilization and kinase pathways. **Endocrinology**, v. 145, n. 12, p. 5694-703, Dec 2004. ISSN 0013-7227 (Print)0013-7227. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1210/en.2004-0890> >.

DAI, G.; LEVY, O.; CARRASCO, N. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. **Nature**, v. 379, n. 6564, p. 458-60, Feb 01 1996. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/379458a0> >.

DAMMEYER, P.; ARNER, E. S. Human Protein Atlas of redox systems - what can be learnt? **Biochim Biophys Acta**, v. 1810, n. 1, p. 111-38, Jan 2011. ISSN 0006-3002 (Print)0006-3002. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2010.07.004> >.

DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Prog Neurobiol**, v. 65, n. 1, p. 1-105, Sep 2001. ISSN 0301-0082 (Print)0301-0082. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

DARBRA, S. et al. Perinatal hypothyroidism effects on neuromotor competence, novelty-directed exploratory and anxiety-related behaviour and learning in rats. **Behav Brain Res**, v. 143, n. 2, p. 209-15, Aug 14 2003. ISSN 0166-4328 (Print)0166-4328. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

DAS, K.; CHAINY, G. B. Modulation of rat liver mitochondrial antioxidant defence system by thyroid hormone. **Biochim Biophys Acta**, v. 1537, n. 1, p. 1-13, Jul 27 2001. ISSN 0006-3002 (Print)0006-3002. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

_____. Thyroid hormone influences antioxidant defense system in adult rat brain. **Neurochem Res**, v. 29, n. 9, p. 1755-66, Sep 2004. ISSN 0364-3190 (Print)0364-3190. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

DASGUPTA, A.; DAS, S.; SARKAR, P. K. Thyroid hormone stimulates gamma-glutamyl transpeptidase in the developing rat cerebra and in astroglial cultures. **J Neurosci Res**, v. 82, n. 6, p. 851-7, Dec 15 2005. ISSN 0360-4012 (Print)0360-4012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jnr.20657> >.

_____. Thyroid hormone promotes glutathione synthesis in astrocytes by up regulation of glutamate cysteine ligase through differential stimulation of its catalytic and modulator subunit mRNAs. **Free Radic Biol Med**, v. 42, n. 5, p. 617-26, Mar 1 2007. ISSN 0891-5849 (Print)0891-5849. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.11.030> >.

DASURI, K.; ZHANG, L.; KELLER, J. N. Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. **Free Radic Biol Med**, v. 62, p. 170-85, Sep 2013. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.016> >.

DAVIS, F. B. et al. Acting via a cell surface receptor, thyroid hormone is a growth factor for glioma cells. **Cancer Res**, v. 66, n. 14, p. 7270-5, Jul 15 2006. ISSN 0008-5472 (Print)0008-5472. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-05-4365> >.

DAVIS, P. J.; DAVIS, F. B.; CODY, V. Membrane receptors mediating thyroid hormone action. **Trends Endocrinol Metab**, v. 16, n. 9, p. 429-35, Nov 2005. ISSN 1043-2760 (Print)1043-2760. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2005.09.007> >.

DAVIS, P. J.; LEONARD, J. L.; DAVIS, F. B. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. **Front Neuroendocrinol**, v. 29, n. 2, p. 211-8, May 2008. ISSN 0091-3022. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.yfrne.2007.09.003> >.

DAVIS, P. J. et al. Mini-review: Cell surface receptor for thyroid hormone and nongenomic regulation of ion fluxes in excitable cells. **Physiol Behav**, v. 99, n. 2, p. 237-9, Feb 9 2010. ISSN 0031-9384. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.02.015> >.

DE ESCOBAR, G. M. et al. The changing role of maternal thyroid hormone in fetal brain development. **Semin Perinatol**, v. 32, n. 6, p. 380-6, Dec 2008. ISSN 0146-0005. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1053/j.semperi.2008.09.002> >.

DEL RIO, J. A. et al. A role for Cajal-Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connections. **Nature**, v. 385, n. 6611, p. 70-4, Jan 02 1997. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/385070a0> >.

DEPIANTO, D.; COULOMBE, P. A. Intermediate filaments and tissue repair. **Exp Cell Res**, v. 301, n. 1, p. 68-76, Nov 15 2004. ISSN 0014-4827 (Print)0014-4827. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.08.007> >.

DICKINSON, D. A.; FORMAN, H. J. Glutathione in defense and signaling: lessons from a small thiol. **Ann N Y Acad Sci**, v. 973, p. 488-504, Nov 2002. ISSN 0077-8923 (Print)0077-8923. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

DOMINGUES, J. Efeito do T3 reverso sobre o estresse oxidativo induzido pelo hipotireoidismo congênito em hipocampo de ratos imaturos: envolvimento de mecanismos não genômicos. 2014. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina

DOMINGUES, J. T. et al. Reverse T3 interacts with alphavbeta3 integrin receptor and restores enzyme activities in the hippocampus of hypothyroid developing rats: Insight on signaling mechanisms. **Mol Cell Endocrinol**,

Nov 16 2017. ISSN 0303-7207. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2017.11.013> >.

DOS SANTOS, A. Q. et al. Resveratrol increases glutamate uptake and glutamine synthetase activity in C6 glioma cells. **Arch Biochem Biophys**, v. 453, n. 2, p. 161-7, Sep 15 2006. ISSN 0003-9861 (Print)0003-9861. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2006.06.025> >.

DOWLING, A. L.; IANNAcone, E. A.; ZOELLER, R. T. Maternal hypothyroidism selectively affects the expression of neuroendocrine-specific protein A messenger ribonucleic acid in the proliferative zone of the fetal rat brain cortex. **Endocrinology**, v. 142, n. 1, p. 390-9, Jan 2001. ISSN 0013-7227 (Print)0013-7227. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1210/endo.142.1.7871> >.

DRINGEN, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Prog Neurobiol**, v. 62, n. 6, p. 649-71, Dec 2000. ISSN 0301-0082 (Print)0301-0082. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ELIASSON, C. et al. Intermediate filament protein partnership in astrocytes. **J Biol Chem**, v. 274, n. 34, p. 23996-4006, Aug 20 1999. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

EMERIT, J.; EDEAS, M.; BRICAIRE, F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. **Biomed Pharmacother**, v. 58, n. 1, p. 39-46, Jan 2004. ISSN 0753-3322 (Print)0753-3322. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ERECINSKA, M.; SILVER, I. A. Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. **Prog Neurobiol**, v. 35, n. 4, p. 245-96, 1990. ISSN 0301-0082 (Print)0301-0082. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

EVANS, R. M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. **Science**, v. 240, n. 4854, p. 889-95, May 13 1988. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

FAIVRE-SARRAILH, C.; RABIE, A. A lower proportion of filamentous to monomeric actin in the developing cerebellum of thyroid-deficient rats. **Brain Res**, v. 469, n. 1-2, p. 293-7, Jun 1 1988. ISSN 0006-8993 (Print)0006-8993. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

FARWELL, A. P.; DUBORD-TOMASETTI, S. A. Thyroid hormone regulates the extracellular organization of laminin on astrocytes. **Endocrinology**, v. 140, n. 11, p. 5014-21, Nov 1999. ISSN 0013-7227

(Print)0013-7227. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1210/endo.140.11.7114>>.

FARWELL, A. P. et al. Regulation of cerebellar neuronal migration and neurite outgrowth by thyroxine and 3,3',5'-triiodothyronine. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 154, n. 1, p. 121-35, Jan 1 2005. ISSN 0165-3806 (Print)0165-3806. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1016/j.devbrainres.2004.07.016>>.

_____. The actin cytoskeleton mediates the hormonally regulated translocation of type II iodothyronine 5'-deiodinase in astrocytes. **J Biol Chem**, v. 265, n. 30, p. 18546-53, Oct 25 1990. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/>>.

FARWELL, A. P.; TRANTER, M. P.; LEONARD, J. L. Thyroxine-dependent regulation of integrin-laminin interactions in astrocytes. **Endocrinology**, v. 136, n. 9, p. 3909-15, Sep 1995. ISSN 0013-7227 (Print)0013-7227. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1210/endo.136.9.7649099>>.

FERNANDES, S. P. et al. Neurones express glutamine synthetase when deprived of glutamine or interaction with astrocytes. **J Neurochem**, v. 114, n. 5, p. 1527-36, Sep 1 2010. ISSN 0022-3042. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06869.x>>.

FERNANDEZ, M. et al. Thyroid hormone induces glial lineage of primary neurospheres derived from non-pathological and pathological rat brain: implications for remyelination-enhancing therapies. **Int J Dev Neurosci**, v. 27, n. 8, p. 769-78, Dec 2009. ISSN 0736-5748. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2009.08.011>>.

FISHER, D. A. The importance of early management in optimizing IQ in infants with congenital hypothyroidism. In: (Ed.). **J Pediatr**. United states, v.136, 2000. p.273-4. ISBN 0022-3476 (Print)0022-3476 (Linking).

FLOHE, L.; GUNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 114-21, 1984. ISSN 0076-6879 (Print)0076-6879. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/>>.

FORHEAD, A. J.; FOWDEN, A. L. Thyroid hormones in fetal growth and prepartum maturation. **J Endocrinol**, v. 221, n. 3, p. R87-r103, Jun 2014. ISSN 0022-0795. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1530/joe-14-0025>>.

FORMAN, H. J.; ZHANG, H.; RINNA, A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. **Mol Aspects Med**, v. 30, n. 1-2, p. 1-12, Feb-Apr 2009. ISSN 0098-2997. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.006> >.

GALTON, V. A. et al. Thyroid hormone homeostasis and action in the type 2 deiodinase-deficient rodent brain during development. **Endocrinology**, v. 148, n. 7, p. 3080-8, Jul 2007. ISSN 0013-7227 (Print)0013-7227. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1210/en.2006-1727> >.

GASIC, G. P.; HOLLMANN, M. Molecular neurobiology of glutamate receptors. **Annu Rev Physiol**, v. 54, p. 507-36, 1992. ISSN 0066-4278 (Print)0066-4278. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ph.54.030192.002451> >.

GEREBEN, B. et al. Activation and inactivation of thyroid hormone by deiodinases: local action with general consequences. **Cell Mol Life Sci**, v. 65, n. 4, p. 570-90, Feb 2008. ISSN 1420-682X (Print)1420-682x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-007-7396-0> >.

GERSCHMAN, R. et al. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. **Science**, v. 119, n. 3097, p. 623-6, May 7 1954. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GHANBARI, M.; GHASEMI, A. Maternal hypothyroidism: An overview of current experimental models. **Life Sci**, v. 187, p. 1-8, Oct 15 2017. ISSN 0024-3205. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2017.08.012> >.

GILGUN-SHERKI, Y.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. **Neuropharmacology**, v. 40, n. 8, p. 959-75, Jun 2001. ISSN 0028-3908 (Print)0028-3908. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GINE, E. et al. Developmental hypothyroidism increases the expression of kainate receptors in the hippocampus and the sensitivity to kainic acid-induced seizures in the rat. **Endocrinology**, v. 151, n. 7, p. 3267-76, Jul 2010. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1210/en.2010-0070> >.

GOTO, H. et al. Phosphorylation of vimentin by Rho-associated kinase at a unique amino-terminal site that is specifically phosphorylated during

cytokinesis. **J Biol Chem**, v. 273, n. 19, p. 11728-36, May 08 1998. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GOTTFRIED, C. et al. The influence of the extracellular matrix on the morphology and intracellular pH of cultured astrocytes exposed to media lacking bicarbonate. **Neuroscience**, v. 121, n. 3, p. 553-62, 2003. ISSN 0306-4522 (Print)0306-4522. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GRASBERGER, H.; REFETTOFF, S. Genetic causes of congenital hypothyroidism due to dysmorphogenesis. **Curr Opin Pediatr**, v. 23, n. 4, p. 421-8, Aug 2011. ISSN 1040-8703. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/MOP.0b013e32834726a4> >.

GRIJOTA-MARTINEZ, C. et al. Lack of action of exogenously administered T3 on the fetal rat brain despite expression of the monocarboxylate transporter 8. **Endocrinology**, v. 152, n. 4, p. 1713-21, Apr 2011. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1210/en.2010-1014> >.

GRILL, R. et al. Cellular delivery of neurotrophin-3 promotes corticospinal axonal growth and partial functional recovery after spinal cord injury. **J Neurosci**, v. 17, n. 14, p. 5560-72, Jul 15 1997. ISSN 0270-6474 (Print)0270-6474. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GUADANO-FERRAZ, A. et al. Lack of thyroid hormone receptor alpha1 is associated with selective alterations in behavior and hippocampal circuits. **Mol Psychiatry**, v. 8, n. 1, p. 30-8, Jan 2003. ISSN 1359-4184 (Print)1359-4184. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.mp.4001196> >.

GUO, Y. et al. Levothyroxine replacement therapy with vitamin E supplementation prevents the oxidative stress and apoptosis in hippocampus of hypothyroid rats. **Neuro Endocrinol Lett**, v. 35, n. 8, p. 684-90, 2014. ISSN 0172-780X (Print)0172-780x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **J Neurochem**, v. 97, n. 6, p. 1634-58, Jun 2006. ISSN 0022-3042 (Print)0022-3042. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03907.x> >.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol**, v. 142, n. 2, p. 231-55, May 2004.

ISSN 0007-1188 (Print)0007-1188. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0705776> >.

HANSON, E. et al. Astrocytic glutamate uptake is slow and does not limit neuronal NMDA receptor activation in the neonatal neocortex. **Glia**, v. 63, n. 10, p. 1784-96, Oct 2015. ISSN 0894-1491. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/glia.22844> >.

HARTLEY, T. et al. Space in the brain: how the hippocampal formation supports spatial cognition. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 369, n. 1635, p. 20120510, Feb 5 2014. ISSN 0962-8436. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2012.0510> >.

HASEGAWA, M.; KIDA, I.; WADA, H. A volumetric analysis of the brain and hippocampus of rats rendered perinatal hypothyroid. **Neurosci Lett**, v. 479, n. 3, p. 240-4, Aug 2 2010. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2010.05.070> >.

HELFAND, B. T. et al. Intermediate filament proteins participate in signal transduction. **Trends Cell Biol**, v. 15, n. 11, p. 568-70, Nov 2005. ISSN 0962-8924 (Print)0962-8924. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2005.09.009> >.

HERRMANN, H.; AEBI, U. Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. **Curr Opin Cell Biol**, v. 12, n. 1, p. 79-90, Feb 2000. ISSN 0955-0674 (Print)0955-0674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

HERTZ, L. et al. Astrocytes: glutamate producers for neurons. **J Neurosci Res**, v. 57, n. 4, p. 417-28, Aug 15 1999. ISSN 0360-4012 (Print)0360-4012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

HOGE, J.; KESNER, R. P. Role of CA3 and CA1 subregions of the dorsal hippocampus on temporal processing of objects. **Neurobiol Learn Mem**, v. 88, n. 2, p. 225-31, Sep 2007. ISSN 1074-7427 (Print)1074-7427. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2007.04.013> >.

HOL, E. M.; PEKONY, M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. **Curr Opin Cell Biol**, v. 32, p. 121-30, Feb 2015. ISSN 0955-0674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2015.02.004> >.

HOLMGREN, A.; BOUHY, D.; TIMMERMAN, V. Neurofilament phosphorylation and their proline-directed kinases in health and disease. **J Peripher Nerv Syst**, v. 17, n. 4, p. 365-76, Dec 2012. ISSN 1085-9489. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1529-8027.2012.00434.x> >.

HOLSBERGER, D. R.; COOKE, P. S. Understanding the role of thyroid hormone in Sertoli cell development: a mechanistic hypothesis. **Cell Tissue Res**, v. 322, n. 1, p. 133-40, Oct 2005. ISSN 0302-766X (Print)0302-766x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-005-1082-z> >.

HOU, G.; YANG, X.; YUAN, T. F. Hippocampal asymmetry: differences in structures and functions. **Neurochem Res**, v. 38, n. 3, p. 453-60, Mar 2013. ISSN 0364-3190. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11064-012-0954-3> >.

HUBER, F. et al. Cytoskeletal crosstalk: when three different personalities team up. **Curr Opin Cell Biol**, v. 32, p. 39-47, Feb 2015. ISSN 0955-0674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2014.10.005> >.

HYNES, R. O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. **Cell**, v. 69, n. 1, p. 11-25, Apr 03 1992. ISSN 0092-8674 (Print)0092-8674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

HYNES, R. O.; LANDER, A. D. Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons. **Cell**, v. 68, n. 2, p. 303-22, Jan 24 1992. ISSN 0092-8674 (Print)0092-8674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

IBARROLA, N.; RODRIGUEZ-PENA, A. Hypothyroidism coordinately and transiently affects myelin protein gene expression in most rat brain regions during postnatal development. **Brain Res**, v. 752, n. 1-2, p. 285-93, Mar 28 1997. ISSN 0006-8993 (Print)0006-8993. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

IKEDA, M.; RHEE, M.; CHIN, W. W. Thyroid hormone receptor monomer, homodimer, and heterodimer (with retinoid-X receptor) contact different nucleotide sequences in thyroid hormone response elements. **Endocrinology**, v. 135, n. 4, p. 1628-38, Oct 1994. ISSN 0013-7227 (Print)0013-7227. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1210/endo.135.4.7925126> >.

INADA, H. et al. Balance between activities of Rho kinase and type 1 protein phosphatase modulates turnover of phosphorylation and dynamics

of desmin/vimentin filaments. **J Biol Chem**, v. 274, n. 49, p. 34932-9, Dec 03 1999. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

INAGAKI, M. et al. Phosphorylation sites linked to glial filament disassembly in vitro locate in a non-alpha-helical head domain. **J Biol Chem**, v. 265, n. 8, p. 4722-9, Mar 15 1990. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

INSAUSTI, R. Comparative anatomy of the entorhinal cortex and hippocampus in mammals. **Hippocampus**, v. 3 Spec No, p. 19-26, 1993. ISSN 1050-9631 (Print)1050-9631. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

JOFFE, R. T.; SOKOLOV, S. T. Thyroid hormones, the brain, and affective disorders. **Crit Rev Neurobiol**, v. 8, n. 1-2, p. 45-63, 1994. ISSN 0892-0915 (Print)0892-0915. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

JOJUA, N. et al. Nobiletin restores impaired hippocampal mitochondrial bioenergetics in hypothyroidism through activation of matrix substrate-level phosphorylation. **Nutr Neurosci**, v. 18, n. 5, p. 225-31, Jul 2015. ISSN 1028-415x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1179/1476830514y.0000000120> >.

JONES, M. W.; MCHUGH, T. J. Updating hippocampal representations: CA2 joins the circuit. **Trends Neurosci**, v. 34, n. 10, p. 526-35, Oct 2011. ISSN 0166-2236. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2011.07.007> >.

KANAI, Y.; HEDIGER, M. A. The glutamate and neutral amino acid transporter family: physiological and pharmacological implications. **Eur J Pharmacol**, v. 479, n. 1-3, p. 237-47, Oct 31 2003. ISSN 0014-2999 (Print)0014-2999. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KARRAS, S.; KRASSAS, G. E. Breastfeeding and antithyroid drugs: a view from within. **Eur Thyroid J**, v. 1, n. 1, p. 30-3, Apr 2012. ISSN 2235-0640 (Print)2235-0640. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1159/000336595> >.

KAUR, C.; LING, E. A. Antioxidants and neuroprotection in the adult and developing central nervous system. **Curr Med Chem**, v. 15, n. 29, p. 3068-80, 2008. ISSN 0929-8673 (Print)0929-8673. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KAWAMURA, M. [Emotion and Brodmann's areas: special reference on area 12]. **Rinsho Shinkeigaku**, v. 50, n. 11, p. 1010-1, Nov 2010. ISSN 0009-918x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KESTER, M. H. et al. Iodothyronine levels in the human developing brain: major regulatory roles of iodothyronine deiodinases in different areas. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 89, n. 7, p. 3117-28, Jul 2004. ISSN 0021-972X (Print)0021-972x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2003-031832> >.

KIM, J. J.; FANSELOW, M. S. Modality-specific retrograde amnesia of fear. **Science**, v. 256, n. 5057, p. 675-7, May 1 1992. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KOHRLE, J. Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family. **Mol Cell Endocrinol**, v. 151, n. 1-2, p. 103-19, May 25 1999. ISSN 0303-7207 (Print)0303-7207. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KUGLER, P. Enzymes involved in glutamatergic and GABAergic neurotransmission. **Int Rev Cytol**, v. 147, p. 285-336, 1993. ISSN 0074-7696 (Print)0074-7696. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KUMAR, C. C. Signaling by integrin receptors. **Oncogene**, v. 17, n. 11 Reviews, p. 1365-73, Sep 17 1998. ISSN 0950-9232 (Print)0950-9232. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1202172> >.

KUNITAKE, J. M. et al. 3,5,3'-triiodothyroacetic acid therapy for thyroid hormone resistance. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 69, n. 2, p. 461-6, Aug 1989. ISSN 0021-972X (Print)0021-972x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1210/jcem-69-2-461> >.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 15 1970. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LAVADO-AUTRIC, R. et al. Early maternal hypothyroxinemia alters histogenesis and cerebral cortex cytoarchitecture of the progeny. **J Clin Invest**, v. 111, n. 7, p. 1073-82, Apr 2003. ISSN 0021-9738 (Print)0021-9738. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1172/jci16262> >.

LE CLAINCHE, C.; CARLIER, M. F. Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. **Physiol Rev**, v. 88, n. 2, p. 489-513, Apr 2008. ISSN 0031-9333 (Print)0031-9333. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00021.2007> >.

LECHAN, R. M.; FEKETE, C. Feedback regulation of thyrotropin-releasing hormone (TRH): mechanisms for the non-thyroidal illness syndrome. **J Endocrinol Invest**, v. 27, n. 6 Suppl, p. 105-19, 2004. ISSN 0391-4097 (Print)0391-4097. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LEGER, J. et al. European Society for Paediatric Endocrinology consensus guidelines on screening, diagnosis, and management of congenital hypothyroidism. **Horm Res Paediatr**, v. 81, n. 2, p. 80-103, 2014. ISSN 1663-2818. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1159/000358198> >.

LEONARD, J. L.; FARWELL, A. P. Thyroid hormone-regulated actin polymerization in brain. **Thyroid**, v. 7, n. 1, p. 147-51, Feb 1997. ISSN 1050-7256 (Print)1050-7256. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/thy.1997.7.147> >.

LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 464-78, 1990. ISSN 0076-6879 (Print)0076-6879. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LIPTON, S. A.; ROSENBERG, P. A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. **N Engl J Med**, v. 330, n. 9, p. 613-22, Mar 3 1994. ISSN 0028-4793 (Print)0028-4793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1056/nejm199403033300907> >.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-75, Nov 1951. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

LUCIO, R. A. et al. The development of auditory callosal connections in normal and hypothyroid rats. **Cereb Cortex**, v. 7, n. 4, p. 303-16, Jun 1997. ISSN 1047-3211 (Print)1047-3211. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MACIEL, L. M. et al. Congenital hypothyroidism: recommendations of the Thyroid Department of the Brazilian Society of Endocrinology and Metabolism. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 57, n. 3, p. 184-92, Apr 2013. ISSN 0004-2730. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MADEIRA, M. D. et al. Effects of hypothyroidism upon the granular layer of the dentate gyrus in male and female adult rats: a morphometric study. **J Comp Neurol**, v. 314, n. 1, p. 171-86, Dec 1 1991. ISSN 0021-9967 (Print)0021-9967. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/cne.903140116> >.

_____. Unbiased estimate of hippocampal granule cell numbers in hypothyroid and in sex-age-matched control rats. **J Hirnforsch**, v. 29, n. 6, p. 643-50, 1988. ISSN 0021-8359 (Print)0021-8359. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MAGALHAES, P. K. et al. [Neonatal screening program at the university hospital of the Ribeirao Preto School of Medicine, Sao Paulo University, Brazil]. **Cad Saude Publica**, v. 25, n. 2, p. 445-54, Feb 2009. ISSN 0102-311x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MARTINEZ, R.; GOMES, F. C. Neuritogenesis induced by thyroid hormone-treated astrocytes is mediated by epidermal growth factor/mitogen-activated protein kinase-phosphatidylinositol 3-kinase pathways and involves modulation of extracellular matrix proteins. **J Biol Chem**, v. 277, n. 51, p. 49311-8, Dec 20 2002. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M209284200> >.

MARTINEZ-GALAN, J. R. et al. Early effects of iodine deficiency on radial glial cells of the hippocampus of the rat fetus. A model of neurological cretinism. **J Clin Invest**, v. 99, n. 11, p. 2701-9, Jun 01 1997. ISSN 0021-9738 (Print)0021-9738. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1172/jci119459> >.

MARÍN-PADILLA, M. Human cerebral cortex Cajal-Retzius neuron: development, structure and function. A Golgi study. **Front Neuroanat**, v. 9, 2015. ISSN 1662-5129 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3389/fnana.2015.00021> >.

MATTSON, M. P.; GLEICHMANN, M.; CHENG, A. Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders. **Neuron**, v. 60, n. 5, p. 748-66, Dec 10 2008. ISSN 0896-6273. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.010> >.

MCCALL, M. A. et al. Targeted deletion in astrocyte intermediate filament (Gfap) alters neuronal physiology. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 13,

p. 6361-6, Jun 25 1996. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MCCONNELL, S. K. Constructing the cerebral cortex: neurogenesis and fate determination. **Neuron**, v. 15, n. 4, p. 761-8, Oct 1995. ISSN 0896-6273 (Print)0896-6273. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annu Rev Biochem**, v. 52, p. 711-60, 1983. ISSN 0066-4154 (Print)0066-4154. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.bi.52.070183.003431> >.

MELDRUM, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **J Nutr**, v. 130, n. 4S Suppl, p. 1007s-15s, Apr 2000. ISSN 0022-3166 (Print)0022-3166. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MELENDEZ, R. I. et al. Decreased glial and synaptic glutamate uptake in the striatum of HIV-1 gp120 transgenic mice. **J Neurovirol**, v. 22, n. 3, p. 358-65, Jun 2016. ISSN 1355-0284. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s13365-015-0403-6> >.

MENON, B.; RAMALINGAM, K.; KUMAR, R. V. Oxidative stress in patients with epilepsy is independent of antiepileptic drugs. **Seizure**, v. 21, n. 10, p. 780-4, Dec 2012. ISSN 1059-1311. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.seizure.2012.09.003> >.

MERCER, A.; THOMSON, A. M. Cornu Ammonis Regions-Antecedents of Cortical Layers? **Front Neuroanat**, v. 11, p. 83, 2017. ISSN 1662-5129 (Print)1662-5129. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3389/fnana.2017.00083> >.

MICHAELIS, E. K. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. **Prog Neurobiol**, v. 54, n. 4, p. 369-415, Mar 1998. ISSN 0301-0082 (Print)0301-0082. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MIDDELDORP, J.; HOL, E. M. GFAP in health and disease. **Prog Neurobiol**, v. 93, n. 3, p. 421-43, Mar 2011. ISSN 0301-0082. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.01.005> >.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J**

Biol Chem, v. 247, n. 10, p. 3170-5, May 25 1972. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MOHAN, V. et al. Maternal thyroid hormone deficiency affects the fetal neocortico genesis by reducing the proliferating pool, rate of neurogenesis and indirect neurogenesis. **Exp Neurol**, v. 237, n. 2, p. 477-88, Oct 2012. ISSN 0014-4886. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.07.019> >.

MONDAL, S. et al. Chemistry and Biology in the Biosynthesis and Action of Thyroid Hormones. **Angew Chem Int Ed Engl**, May 25 2016. ISSN 1433-7851. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201601116> >.

MONTIEL, J. F. et al. From sauropsids to mammals and back: New approaches to comparative cortical development. **J Comp Neurol**, v. 524, n. 3, p. 630-45, Feb 15 2016. ISSN 0021-9967. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/cne.23871> >.

MORIYAMA, K. et al. Antithyroid drugs inhibit thyroid hormone receptor-mediated transcription. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 92, n. 3, p. 1066-72, Mar 2007. ISSN 0021-972X (Print)0021-972x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2006-1621> >.

MORREALE DE ESCOBAR, G.; OBREGON, M. J.; ESCOBAR DEL REY, F. Is neuropsychological development related to maternal hypothyroidism or to maternal hypothyroxinemia? **J Clin Endocrinol Metab**, v. 85, n. 11, p. 3975-87, Nov 2000. ISSN 0021-972X (Print)0021-972x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1210/jcem.85.11.6961> >.

MORRIS, R. G. Elements of a neurobiological theory of hippocampal function: the role of synaptic plasticity, synaptic tagging and schemas. **Eur J Neurosci**, v. 23, n. 11, p. 2829-46, Jun 2006. ISSN 0953-816X (Print)0953-816x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04888.x> >.

MORTE, B. et al. Thyroid hormone-regulated mouse cerebral cortex genes are differentially dependent on the source of the hormone: a study in monocarboxylate transporter-8- and deiodinase-2-deficient mice. **Endocrinology**, v. 151, n. 5, p. 2381-7, May 2010. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1210/en.2009-0944> >.

MULLEN, R. J.; BUCK, C. R.; SMITH, A. M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. **Development**, v. 116, n. 1, p. 201-11, Sep

1992. ISSN 0950-1991 (Print)0950-1991. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MULLUR, R.; LIU, Y.-Y.; BRENT, G. A. Thyroid Hormone Regulation of Metabolism. 2014-04-01 2014. Disponível em: < <http://physrev.physiology.org/content/94/2/355.long> >.

NAVARRO, D. et al. Gestational and early postnatal hypothyroidism alters VGluT1 and VGAT bouton distribution in the neocortex and hippocampus, and behavior in rats. **Front Neuroanat**, v. 9, p. 9, 2015. ISSN 1662-5129. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3389/fnana.2015.00009> >.

NICIU, M. J.; KELMENDI, B.; SANACORA, G. Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 100, n. 4, p. 656-64, Feb 2012. ISSN 0091-3057. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2011.08.008> >.

NWANI, C. D. et al. DNA damage and oxidative stress modulatory effects of glyphosate-based herbicide in freshwater fish, *Channa punctatus*. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 36, n. 2, p. 539-47, Sep 2013. ISSN 1382-6689. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2013.06.001> >.

ORDOOKHANI, A. et al. Transient congenital hypothyroidism in an iodine-replete area is not related to parental consanguinity, mode of delivery, goitrogens, iodine exposure, or thyrotropin receptor autoantibodies. **J Endocrinol Invest**, v. 31, n. 1, p. 29-34, Jan 2008. ISSN 0391-4097. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/bf03345563> >.

ORLOWSKI, M.; MEISTER, A. GAMMA-GLUTAMYL-P-NITROANILIDE: A NEW CONVENIENT SUBSTRATE FOR DETERMINATION AND STUDY OF L- AND D-GAMMA-GLUTAMYLTRANSPEPTIDASE ACTIVITIES. **Biochim Biophys Acta**, v. 73, p. 679-81, Aug 06 1963. ISSN 0006-3002 (Print)0006-3002. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ORTEGA, F. J. et al. Type I iodothyronine 5'-deiodinase mRNA and activity is increased in adipose tissue of obese subjects. **Int J Obes (Lond)**, v. 36, n. 2, p. 320-4, Feb 2012. ISSN 0307-0565. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2011.101> >.

OTTERSEN, O. P.; STORM-MATHISEN, J. Glutamate- and GABA-containing neurons in the mouse and rat brain, as demonstrated with a new immunocytochemical technique. **J Comp Neurol**, v. 229, n. 3, p. 374-92,

Nov 1 1984. ISSN 0021-9967 (Print)0021-9967. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/cne.902290308> >.

PALMADA, M.; CENTELLES, J. J. Excitatory amino acid neurotransmission. Pathways for metabolism, storage and reuptake of glutamate in brain. **Front Biosci**, v. 3, p. d701-18, Jul 20 1998. ISSN 1093-9946 (Print)1093-4715. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

PAN, T. et al. Levothyroxine replacement therapy with vitamin E supplementation prevents oxidative stress and cognitive deficit in experimental hypothyroidism. **Endocrine**, v. 43, n. 2, p. 434-9, Apr 2013. ISSN 1355-008x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s12020-012-9801-1> >.

PAONE, L. et al. Liothyronine Improves Biochemical Control of Congenital Hypothyroidism in Patients with Central Resistance to Thyroid Hormone. **J Pediatr**, May 10 2016. ISSN 0022-3476. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2016.04.022> >.

PASQUINI, J. M.; ADAMO, A. M. Thyroid hormones and the central nervous system. **Dev Neurosci**, v. 16, n. 1-2, p. 1-8, 1994. ISSN 0378-5866 (Print)0378-5866. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

PATRICK, L. Thyroid disruption: mechanism and clinical implications in human health. **Altern Med Rev**, v. 14, n. 4, p. 326-46, Dec 2009. ISSN 1089-5159 (Print)1089-5159. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

PAXINOS, G. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates - 7th Edition**. 2013. Disponível em: < <https://www.elsevier.com/books/the-rat-brain-in-stereotaxic-coordinates/paxinos/978-0-12-391949-6> >.

PEETERS, R. P.; VISSER, T. J. Metabolism of Thyroid Hormone. In: DE GROOT, L. J.; CHROUSOS, G., et al (Ed.). **Endotext**. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc., 2000.

PELLERIN, L. et al. Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle. **Dev Neurosci**, v. 20, n. 4-5, p. 291-9, 1998. ISSN 0378-5866 (Print)0378-5866. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

PETITO, C. K. et al. Brain glutamine synthetase increases following cerebral ischemia in the rat. **Brain Res**, v. 569, n. 2, p. 275-80, Jan 13 1992. ISSN 0006-8993 (Print)0006-8993. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

PIEROZAN, P. et al. Neurotoxicity of Methylmercury in Isolated Astrocytes and Neurons: the Cytoskeleton as a Main Target. **Mol Neurobiol**, Sep 22 2016. ISSN 0893-7648. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-016-0101-2> >.

PIEROZAN, P.; PESSOA-PUREUR, R. Cytoskeleton as a Target of Quinolinic Acid Neurotoxicity: Insight from Animal Models. **Mol Neurobiol**, Jun 24 2017. ISSN 0893-7648. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-017-0654-8> >.

PLOW, E. F. et al. Ligand binding to integrins. **J Biol Chem**, v. 275, n. 29, p. 21785-8, Jul 21 2000. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R000003200> >.

POLAK, M. Hyperthyroidism in early infancy: pathogenesis, clinical features and diagnosis with a focus on neonatal hyperthyroidism. **Thyroid**, v. 8, n. 12, p. 1171-7, Dec 1998. ISSN 1050-7256 (Print)1050-7256. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/thy.1998.8.1171> >.

POPOLI, M. et al. The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. **Nat Rev Neurosci**, v. 13, n. 1, p. 22-37, Nov 30 2011. ISSN 1471-003x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3138> >.

PORTERFIELD, S. P.; HENDRICH, C. E. The role of thyroid hormones in prenatal and neonatal neurological development--current perspectives. **Endocr Rev**, v. 14, n. 1, p. 94-106, Feb 1993. ISSN 0163-769X (Print)0163-769x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1210/edrv-14-1-94> >.

RAHAMAN, S. O. et al. Hypothyroidism in the developing rat brain is associated with marked oxidative stress and aberrant intraneuronal accumulation of neurofilaments. **Neurosci Res**, v. 40, n. 3, p. 273-9, Jul 2001. ISSN 0168-0102 (Print)0168-0102. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

RAMI, A.; RABIE, A.; PATEL, A. J. Thyroid hormone and development of the rat hippocampus: cell acquisition in the dentate gyrus. **Neuroscience**, v. 19, n. 4, p. 1207-16, Dec 1986. ISSN 0306-4522 (Print)0306-4522. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

RAMOS, C. F.; ZAMONER, A. Thyroid hormone and leptin in the testis. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 5, p. 198, 2014. ISSN 1664-2392.

RAMOS, H. E.; NESI-FRANCA, S.; MACIEL, R. M. [New aspects of genetics and molecular mechanisms on thyroid morphogenesis for the understanding of thyroid dysgenesis]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 52, n. 9, p. 1403-15, Dec 2008. ISSN 0004-2730. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

RASTOGI, M. V.; LAFRANCHI, S. H. Congenital hypothyroidism. **Orphanet J Rare Dis**, v. 5, p. 17, 2010. ISSN 1750-1172. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/1750-1172-5-17> >.

RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, P.; ALMEIDA, A.; BOLANOS, J. P. Brain energy metabolism in glutamate-receptor activation and excitotoxicity: role for APC/C-Cdh1 in the balance glycolysis/pentose phosphate pathway. **Neurochem Int**, v. 62, n. 5, p. 750-6, Apr 2013. ISSN 0197-0186. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2013.02.005> >.

ROTI, E. et al. Ontogenesis of placental inner ring thyroxine deiodinase and amniotic fluid 3,3',5'-triiodothyronine concentration in the rat. **Endocrinology**, v. 111, n. 3, p. 959-63, Sep 1982. ISSN 0013-7227 (Print)0013-7227. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1210/endo-111-3-959> >.

RUIZ-MARCOS, A. et al. Thyroxine treatment and recovery of hypothyroidism-induced pyramidal cell damage. **Brain Res**, v. 239, n. 2, p. 559-74, May 13 1982. ISSN 0006-8993 (Print)0006-8993. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SAGAR, G. D. et al. Ubiquitination-induced conformational change within the deiodinase dimer is a switch regulating enzyme activity. **Mol Cell Biol**, v. 27, n. 13, p. 4774-83, Jul 2007. ISSN 0270-7306 (Print)0270-7306. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/mcb.00283-07> >.

SALIM, S. Oxidative stress and psychological disorders. **Curr Neuropharmacol**, v. 12, n. 2, p. 140-7, Mar 2014. ISSN 1570-159X (Print)1570-159x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2174/1570159x11666131120230309> >.

SALVATI, S. et al. Effect of propylthiouracil-induced hypothyroidism on cerebral cortex of young and aged rats: lipid composition of synaptosomes, muscarinic receptor sites, and acetylcholinesterase activity. **Neurochem**

Res, v. 19, n. 9, p. 1181-6, Sep 1994. ISSN 0364-3190 (Print)0364-3190. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SAMPSON, D. et al. Maternal thyroid status regulates the expression of neuronal and astrocytic cytoskeletal proteins in the fetal brain. **J Endocrinol**, v. 167, n. 3, p. 439-45, Dec 2000. ISSN 0022-0795 (Print)0022-0795. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SANACORA, G. et al. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. **Nat Rev Drug Discov**, v. 7, n. 5, p. 426-37, May 2008. ISSN 1474-1776. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrd2462> >.

SARKAR, P. K.; RAY, A. K. Calcium mobilization within hypothyroid adult rat brain synaptosomes. **Horm Metab Res**, v. 35, n. 9, p. 562-4, Sep 2003. ISSN 0018-5043 (Print)0018-5043. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1055/s-2003-42660> >.

SAYRE, L. M.; PERRY, G.; SMITH, M. A. Oxidative stress and neurotoxicity. **Chem Res Toxicol**, v. 21, n. 1, p. 172-88, Jan 2008. ISSN 0893-228X (Print)0893-228x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/tx700210j> >.

SCHOUSBOE, A. et al. Glutamate metabolism in the brain focusing on astrocytes. **Adv Neurobiol**, v. 11, p. 13-30, 2014. ISSN 2190-5215 (Print). Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-08894-5_2 >.

SCHWARTZ, H. L. et al. Relationship of red blood cell 131-I-L-triiodothyronine binding coefficient and cell maturation. II. Effect of cell age and metabolic inhibitors. **Endocrinology**, v. 80, n. 1, p. 65-8, Jan 1967. ISSN 0013-7227 (Print)0013-7227. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1210/endo-80-1-65> >.

SCHWARTZ, H. L.; ROSS, M. E.; OPPENHEIMER, J. H. Lack of effect of thyroid hormone on late fetal rat brain development. **Endocrinology**, v. 138, n. 8, p. 3119-24, Aug 1997. ISSN 0013-7227 (Print)0013-7227. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1210/endo.138.8.5353> >.

SEAL, R. P.; AMARA, S. G. Excitatory amino acid transporters: a family in flux. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 39, p. 431-56, 1999. ISSN 0362-1642 (Print)0362-1642. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.39.1.431> >.

SEGAL, J. In vivo effect of 3,5,3'-triiodothyronine on calcium uptake in several tissues in the rat: evidence for a physiological role for calcium as the first messenger for the prompt action of thyroid hormone at the level of the plasma membrane. **Endocrinology**, v. 127, n. 1, p. 17-24, Jul 1990. ISSN 0013-7227 (Print)0013-7227. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1210/endo-127-1-17> >.

SEGAL, J.; INGBAR, S. H. Evidence that an increase in cytoplasmic calcium is the initiating event in certain plasma membrane-mediated responses to 3,5,3'-triiodothyronine in rat thymocytes. **Endocrinology**, v. 124, n. 4, p. 1949-55, Apr 1989. ISSN 0013-7227 (Print)0013-7227. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1210/endo-124-4-1949> >.

SHAO, Q.; JIANG, W.; JIN, Y. MiR-124 effect in neurons apoptosis in newborn rat with thyroid hypofunction. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 8, n. 11, p. 14465-71, 2015. ISSN 1936-2625 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SHAPIRA, S. K.; DOLAN, S. Genetic risks to the mother and the infant: assessment, counseling, and management. **Matern Child Health J**, v. 10, n. 5 Suppl, p. S143-6, Sep 2006. ISSN 1092-7875 (Print)1092-7875. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10995-006-0099-6> >.

SHAPIRO, B. M.; STADTMAN, E. R. The regulation of glutamine synthesis in microorganisms. **Annu Rev Microbiol**, v. 24, p. 501-24, 1970. ISSN 0066-4227 (Print)0066-4227. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.mi.24.100170.002441> >.

SHOHAMI, E. et al. Oxidative stress in closed-head injury: brain antioxidant capacity as an indicator of functional outcome. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 17, n. 10, p. 1007-19, Oct 1997. ISSN 0271-678X (Print)0271-678x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1097/00004647-199710000-00002> >.

SILVA, F. R.; LEITE, L. D.; WASSERMANN, G. F. Rapid signal transduction in Sertoli cells. **Eur J Endocrinol**, v. 147, n. 3, p. 425-33, Sep 2002. ISSN 0804-4643 (Print)0804-4643. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SMALL, S. A. et al. A pathophysiological framework of hippocampal dysfunction in ageing and disease. **Nat Rev Neurosci**, v. 12, n. 10, p. 585-601, Oct 2011. ISSN 1471-003x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3085> >.

SMART, I. H. et al. Unique morphological features of the proliferative zones and postmitotic compartments of the neural epithelium giving rise to striate and extrastriate cortex in the monkey. **Cereb Cortex**, v. 12, n. 1, p. 37-53, Jan 2002. ISSN 1047-3211 (Print)1047-3211. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SONNEWALD, U. Glutamate synthesis has to be matched by its degradation - where do all the carbons go? **J Neurochem**, v. 131, n. 4, p. 399-406, Nov 2014. ISSN 0022-3042. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/jnc.12812> >.

STENZEL, D. et al. Integrin alphavbeta3 and thyroid hormones promote expansion of progenitors in embryonic neocortex. **Development**, v. 141, n. 4, p. 795-806, Feb 2014. ISSN 0950-1991. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1242/dev.101907> >.

STRANGE, B. A. et al. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. **Nat Rev Neurosci**, v. 15, n. 10, p. 655-69, Oct 2014. ISSN 1471-003x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3785> >.

STRELKOV, S. V.; HERRMANN, H.; AEBI, U. Molecular architecture of intermediate filaments. **Bioessays**, v. 25, n. 3, p. 243-51, Mar 2003. ISSN 0265-9247 (Print)0265-9247. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/bies.10246> >.

STUFFINS, C. B.; WEATHERALL, H. Determination of the peroxide value of oils and fats. **Analyst**, v. 70, p. 403-9, Nov 1945. ISSN 0003-2654 (Print)0003-2654. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SUE, M. et al. Propylthiouracil increases sodium/iodide symporter gene expression and iodide uptake in rat thyroid cells in the absence of TSH. **Thyroid**, v. 22, n. 8, p. 844-52, Aug 2012. ISSN 1050-7256. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/thy.2011.0290> >.

SUI, L.; ANDERSON, W. L.; GILBERT, M. E. Impairment in short-term but enhanced long-term synaptic potentiation and ERK activation in adult hippocampal area CA1 following developmental thyroid hormone insufficiency. **Toxicol Sci**, v. 85, n. 1, p. 647-56, May 2005. ISSN 1096-6080 (Print)1096-0929. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfi095> >.

TENG, W. et al. Hypothyroidism in pregnancy. **Lancet Diabetes Endocrinol**, v. 1, n. 3, p. 228-37, Nov 2013. ISSN 2213-8587. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s2213-8587\(13\)70109-8](http://dx.doi.org/10.1016/s2213-8587(13)70109-8) >.

TOSIC, M. et al. Triiodothyronine has diverse and multiple stimulating effects on expression of the major myelin protein genes. **J Neurochem**, v. 59, n. 5, p. 1770-7, Nov 1992. ISSN 0022-3042 (Print)0022-3042. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

TRENTIN, A. G. Thyroid hormone and astrocyte morphogenesis. **J Endocrinol**, v. 189, n. 2, p. 189-97, May 2006. ISSN 0022-0795 (Print)0022-0795. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1677/joe.1.06680> >.

TZANETAKOU, I. P.; MIKHAILIDIS, D. P.; PERREA, D. N. Nutrition During Pregnancy and the Effect of Carbohydrates on the Offspring's Metabolic Profile: In Search of the "Perfect Maternal Diet". **Open Cardiovasc Med J**, v. 5, p. 103-9, 2011. ISSN 1874-1924. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2174/1874192401105010103> >.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007. ISSN 1357-2725 (Print)1357-2725. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001> >.

VALLORTIGARA, J. et al. T3 administration in adult hypothyroid mice modulates expression of proteins involved in striatal synaptic plasticity and improves motor behavior. **Neurobiol Dis**, v. 31, n. 3, p. 378-85, Sep 2008. ISSN 0969-9961. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2008.05.015> >.

VARA, H. et al. Thyroid hormone regulates neurotransmitter release in neonatal rat hippocampus. **Neuroscience**, v. 110, n. 1, p. 19-28, 2002. ISSN 0306-4522 (Print)0306-4522. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

VENDITTI, P. et al. Effect of thyroid state on lipid peroxidation, antioxidant defences, and susceptibility to oxidative stress in rat tissues. **J Endocrinol**, v. 155, n. 1, p. 151-7, Oct 1997. ISSN 0022-0795 (Print)0022-0795. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

VILLANUEVA, I.; ALVA-SANCHEZ, C.; PACHECO-ROSADO, J. The role of thyroid hormones as inductors of oxidative stress and neurodegeneration. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2013, p. 218145, 2013.

ISSN 1942-0994. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2013/218145> >.

VINATIER, D. Integrins and reproduction. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 59, n. 1, p. 71-81, Mar 1995. ISSN 0301-2115 (Print)0301-2115. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

VINCENT, J. et al. Effects of thyroid hormone on synaptogenesis in the molecular layer of the developing rat cerebellum. **J Physiol (Paris)**, v. 78, n. 8, p. 729-38, 1982. ISSN 0021-7948 (Print)0021-7948. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

WEBER, J. T. Altered calcium signaling following traumatic brain injury. **Front Pharmacol**, v. 3, p. 60, 2012. ISSN 1663-9812. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2012.00060> >.

WILLIAMS, G. R. Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms. **Mol Cell Biol**, v. 20, n. 22, p. 8329-42, Nov 2000. ISSN 0270-7306 (Print)0270-7306. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

_____. Neurodevelopmental and neurophysiological actions of thyroid hormone. **J Neuroendocrinol**, v. 20, n. 6, p. 784-94, Jun 2008. ISSN 0953-8194. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01733.x> >.

WING, D. A. et al. A comparison of propylthiouracil versus methimazole in the treatment of hyperthyroidism in pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, v. 170, n. 1 Pt 1, p. 90-5, Jan 1994. ISSN 0002-9378 (Print)0002-9378. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

WINKLER, J. et al. Essential role of neocortical acetylcholine in spatial memory. **Nature**, v. 375, n. 6531, p. 484-7, Jun 8 1995. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/375484a0> >.

WONG, C. C.; LEUNG, M. S. Effects of neonatal hypothyroidism on the expressions of growth cone proteins and axon guidance molecules related genes in the hippocampus. **Mol Cell Endocrinol**, v. 184, n. 1-2, p. 143-50, Nov 26 2001. ISSN 0303-7207 (Print)0303-7207. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

WU, P. C.; FANN, M. J.; KAO, L. S. Characterization of Ca²⁺ signaling pathways in mouse adrenal medullary chromaffin cells. **J Neurochem**, v.

112, n. 5, p. 1210-22, Mar 2010. ISSN 0022-3042. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06533.x> >.

YI, B. et al. Ezrin Regulating the Cytoskeleton Remodeling is Required for Hypoxia-Induced Myofibroblast Proliferation and Migration. **Front Cardiovasc Med**, v. 2, p. 10, 2015. ISSN 2297-055X (Print)2297-055x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3389/fcvm.2015.00010> >.

ZAMONER, A. et al. Propylthiouracil-induced congenital hypothyroidism upregulates vimentin phosphorylation and depletes antioxidant defenses in immature rat testis. **J Mol Endocrinol**, v. 40, n. 3, p. 125-35, Mar 2008. ISSN 0952-5041. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1677/jme-07-0089> >.

_____. Hyperthyroidism in the developing rat testis is associated with oxidative stress and hyperphosphorylated vimentin accumulation. **Mol Cell Endocrinol**, v. 267, n. 1-2, p. 116-26, Mar 15 2007c. ISSN 0303-7207 (Print)0303-7207. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2007.01.005> >.

_____. Genomic-independent action of thyroid hormones on NTPDase activities in Sertoli cell cultures from congenital hypothyroid rats. **Life Sci**, v. 80, n. 1, p. 51-8, Dec 3 2006a. ISSN 0024-3205 (Print)0024-3205. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2006.08.020> >.

_____. Involvement of calcium-dependent mechanisms in T3-induced phosphorylation of vimentin of immature rat testis. **Life Sci**, v. 77, n. 26, p. 3321-35, Nov 12 2005. ISSN 0024-3205 (Print)0024-3205. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2005.05.042> >.

_____. Short-term effects of thyroid hormones on cytoskeletal proteins are mediated by GABAergic mechanisms in slices of cerebral cortex from young rats. **Cell Mol Neurobiol**, v. 26, n. 2, p. 209-24, Mar 2006b. ISSN 0272-4340 (Print)0272-4340. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10571-006-9027-y> >.

_____. Thyroid hormones reorganize the cytoskeleton of glial cells through Gfap phosphorylation and Rho-dependent mechanisms. **Cell Mol Neurobiol**, v. 27, n. 7, p. 845-65, Nov 2007. ISSN 0272-4340 (Print)0272-4340. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10571-006-9084-2> >.

_____. Nongenomic actions of thyroxine modulate intermediate filament phosphorylation in cerebral cortex of rats. **Neuroscience**, v. 156, n. 3, p.

640-52, Oct 15 2008. ISSN 0306-4522 (Print)0306-4522. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.07.059> >.

ZAMONER, A.; HEIMFARTH, L.; PESSOA-PUREUR, R. Congenital hypothyroidism is associated with intermediate filament misregulation, glutamate transporters down-regulation and MAPK activation in developing rat brain. **Neurotoxicology**, v. 29, n. 6, p. 1092-9, Nov 2008. ISSN 0161-813X (Print)0161-813x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2008.09.004> >.

ZAMONER, A.; PESSOA-PUREUR, R. Nongenomic Actions of Thyroid Hormones: Every why has a Wherefore. **Immunology, Endocrine & Metabolic Agents in Medicinal Chemistry**: Bentham Science. 11: 165-178 p. 2011.

ZAMONER, A.; PESSOA-PUREUR, R.; SILVA, F. R. Membrane-initiated actions of thyroid hormones on the male reproductive system. **Life Sci**, v. 89, n. 15-16, p. 507-14, Oct 10 2011. ISSN 0024-3205. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2011.04.006> >.

ZAMONER, A. et al. Ionic involvement and kinase activity on the mechanism of nongenomic action of thyroid hormones on 45Ca^{2+} uptake in cerebral cortex from young rats. **Neurosci Res**, v. 57, n. 1, p. 98-103, Jan 2007. ISSN 0168-0102 (Print)0168-0102. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2006.09.012> >.

ZANATTA, A. P. et al. Rapid responses to reverse T(3) hormone in immature rat Sertoli cells: calcium uptake and exocytosis mediated by integrin. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e77176, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0077176> >.

ZANATTA, L. et al. Effect of $1\alpha,25\text{-dihydroxyvitamin D}_3$ in plasma membrane targets in immature rat testis: ionic channels and gamma-glutamyl transpeptidase activity. **Arch Biochem Biophys**, v. 515, n. 1-2, p. 46-53, Nov 2011. ISSN 0003-9861.

_____. $1\alpha,25\text{-Dihydroxyvitamin D}(3)$ signaling pathways on calcium uptake in 30-day-old rat Sertoli cells. **Biochemistry**, v. 50, n. 47, p. 10284-92, Nov 29 2011. ISSN 0006-2960.

ZHANG, H. et al. 4-Hydroxynonenal induces rat gamma-glutamyl transpeptidase through mitogen-activated protein kinase-mediated electrophile response element/nuclear factor erythroid 2-related factor 2

signaling. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 34, n. 2, p. 174-81, Feb 2006. ISSN 1044-1549 (Print)1044-1549. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1165/rcmb.2005-0280OC> >.

ZOELLER, R. T.; ROVET, J. Timing of thyroid hormone action in the developing brain: clinical observations and experimental findings. **J Neuroendocrinol**, v. 16, n. 10, p. 809-18, Oct 2004. ISSN 0953-8194 (Print)0953-8194. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2826.2004.01243.x> >.

ANEXO I – primeira página do artigo publicado no periódico Molecular and Cellular Endocrinology (2017), sob o título “Reverse T₃ interacts with α v β 3 integrin receptor and restores enzyme activities in the hippocampus of hypothyroid developing rats: Insight on signaling mechanisms” DOI: 10.1016/j.mce.2017.11.013.

Molecular and Cellular Endocrinology xxx (2017) 1–14



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular and Cellular Endocrinology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mce

Reverse T₃ interacts with α v β 3 integrin receptor and restores enzyme activities in the hippocampus of hypothyroid developing rats: Insight on signaling mechanisms

Juliana Toniello Domingues^{a, b}, Daiane Cattani^a, Patricia Acordi Cesconetto^a,
 Bianka Alzira Nascimento de Almeida^a, Paula Pierozan^c, Karin dos Santos^a,
 Guilherme Razzera^a, Fátima Regina Mena Barreto Silva^a, Regina Pessoa-Pureur^c,
 Ariane Zamoner^{a, b, *}

^a Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil^b Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil^c Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 September 2017

Received in revised form

10 November 2017

Accepted 15 November 2017

Available online xxx

Keywords:

3,3',5'-triiodo-L-thyronine (reverse T₃, rT₃)

Thyroid hormone

Nongenomic effects

Modeling

glutamate

Integrin

ABSTRACT

In the present study we provide evidence that 3,3',5'-triiodo-L-thyronine (reverse T₃, rT₃) restores neurochemical parameters induced by congenital hypothyroidism in rat hippocampus. Congenital hypothyroidism was induced by adding 0.05% propylthiouracil in the drinking water from gestation day 8 and continually up to lactation day 15. In the *in vivo* rT₃ exposure, hypothyroid 12-day old pups were daily injected with rT₃ (50 ng/kg body weight) or saline until day 14. In the *ex vivo* rT₃ treatment, hippocampal slices from 15-day-old hypothyroid pups were incubated for 30 min with or without rT₃ (1 nM). We found that *ex vivo* and/or *in vivo* exposure to rT₃ failed in restoring the decreased ¹⁴C-glutamate uptake; however, restored the phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP), ⁴⁵Ca²⁺ influx, aspartate transaminase (AST), glutamine synthetase (GS) and gamma-glutamyl transferase (GGT) activities, as well as glutathione (GSH) levels in hypothyroid hippocampus. In addition, rT₃ improved ¹⁴C-2-deoxy-D-glucose uptake and lactate dehydrogenase (LDH) activity. Receptor agonists/antagonists (RGD peptide and AP-5), kinase inhibitors of p38MAPK, ERK1/2, CaMKII, PKA (SB239063, PD98059, KN93 and H89, respectively), L-type voltage-dependent calcium channel blocker (nifedipine) and intracellular calcium chelator (BAPTA-AM) were used to determine the mechanisms of the nongenomic rT₃ action on GGT activity. Using molecular docking analysis, we found rT₃ interaction with α v β 3 integrin receptors, non-genomically activating signaling pathways (PKA, CaMKII, p38MAPK) that restored GGT activity. We provide evidence that rT₃ is an active TH metabolite and our results represent an important contribution to elucidate the nonclassical mechanism of action of this metabolite in hypothyroidism.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Thyroid hormones (TH), 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T₃) and thyroxine (T₄), are involved in metabolic and physiological functions of several tissues, being crucial for neural development and function (Bernal, 2007; Bernal et al., 2003). The classical

mechanism of hormone action involves the modulation of gene expression. However, several evidence point to nongenomic mechanisms of TH in different cell types, including neural cells (Dusart and Flamant, 2012; Morte and Bernal, 2014; Galton et al., 2007; Zamoner et al., 2005; Manzano et al., 2007; Gilbert et al., 2007; Madeira et al., 1988; Zamoner et al., 2007a, 2011; Schmöhl et al., 2015; Zamoner et al., 2011; Lischinsky et al., 2016; Zanatta et al., 2013a; Bernal et al., 2003). The nongenomic actions of TH might be associated with surface receptors, as well as kinase- and/or calcium-activated signaling pathways (Morte and Bernal, 2014; Gilbert et al., 2007; Zamoner et al., 2007a; Schmöhl et al., 2015;

* Corresponding author. Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, UFSC, Campus Universitário, Bairro Corrego Grande, Lab 101, bloco C, térreo, CEP: 88040-970, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

E-mail addresses: arianezamoner@ufsc.br, arianezps@gmail.com (A. Zamoner).

ANEXO II – carta de submissão no periódico Molecular and Cellular Endocrinology (2018), sob o título “Congenital hypothyroidism leads to oxidative stress and affects the sensorimotor cortex structure and functions during neurodevelopment in rats”

Elsevier Editorial System(tm) for Molecular
and Cellular Endocrinology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Experimentally-induced maternal hypothyroidism altered enzyme activities and the sensorimotor cortex of the developing rats

Article Type: Research Paper

Keywords: hypothyroidism; cytoskeleton; redox imbalance; cholinesterase; calcium; GFAP.

Corresponding Author: Professor Ariane Zamoner, PhD

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Santa Catarina

First Author: Juliana T Domingues

Order of Authors: Juliana T Domingues; Elisa Winkelmann-Duarte; Fátima Regina Mena B Silva; Regina Pessoa-Pureur; Ariane Zamoner, PhD

Manuscript Region of Origin: BRAZIL

Abstract: In this study, we used an experimental model of congenital hypothyroidism to show that the deficiency of thyroid hormones (TH) disrupts different neurochemical, morphological and functional aspects in cerebral cortex of 15-day-old rats. Misregulated glutamate metabolism is proposed from results showing downregulated glutamine synthase (GS) activity and upregulated Ca²⁺ uptake. Increased 14C-MeAIB indicates upregulated System A activity and glutamine uptake by neurons. Energy metabolism in hypothyroid cortical slices was preserved, as demonstrated by unaltered glucose metabolism. We also found upregulated acetylcholinesterase activity, depleting acetylcholine from the synaptic cleft, pointing to disrupted cholinergic system. Increased reactive oxygen species (ROS) generation, lipid peroxidation, glutathione (GSH) depletion and γ -glutamyltransferase (GGT) downregulation represent redox imbalance. Disrupted astrocyte cytoskeleton was evidenced by downregulated and hyperphosphorylated glial fibrillary acidic protein (GFAP). Morphological and structural characterization of the sensorimotor cerebral cortex (SCC) showed unaltered thickness of the SCC. However decreased size of neurons on the layers II & III and IV in the right SCC and increase in Neu-N positive neurons in specific CSS layers, suggest that they are differently affected by the low levels of HT during neurodevelopment. Hypothyroid pups presented increased number of foot-faults in the gridwalk test indicating affected motor functions. Taken together, our results show that congenital hypothyroidism disrupts glutamatergic and cholinergic neurotransmission, Ca²⁺ equilibrium, redox balance, cytoskeleton integrity, morphological and functional aspects in the cerebral cortex of young rats.

[home](#) | [main menu](#) | [submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [log out](#) | [Switch for \[user\]](#) | [Go to EES Hub](#) | [Contact us](#) | [Help](#) | [Feedback](#) | [mailto:arianezimmerone@ed.ac.uk](#) | [Go to EES Hub](#) | [Version: EES 2018.1](#)

Molecular and Cellular Endocrinology

Submissions Being Processed for Author Ariane Zimmer, PHD

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links	MCE-18-0095	Experimentally-induced maternal hypothyroidism altered enzyme activities and the sensorimotor cortex of the developing rat	Feb 06, 2018	Feb 06, 2018	With Editor

Display | 10 | results per page.

Display | 10 | results per page.

<< Author Main Menu