

Camila Mariana Andrade

**ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS E MORFOLÓGICAS
INDUZIDAS PELO HIPERTIREOIDISMO NO HIPOCAMPO DE
RATOS IMATUROS**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção de Grau de
Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ariane
Zamoner Pacheco de Souza.

Florianópolis
2014

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

Andrade, Camila Mariana

Alterações neuroquímicas e morfológicas induzidas pelo hipertireoidismo em hipocampo de ratos imaturos / Camila Mariana Andrade ; orientadora, Ariane Zamoner Pacheco de Souza - Florianópolis, SC, 2014.
128 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

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

Dedico essa dissertação a minha família e meus bons amigos, em especial a minha mãe pelo apoio e amor inesgotável.

AGRADECIMENTO

A Deus minha fonte de luz.

À minha família, em especial meus irmãos, minha avó e minha mãe que mesmo longe são meu porto seguro e, sinônimos de amor, carinho e apoio infinito.

À minha orientadora Prof^ª Dr^ª Ariane Zamoner Pacheco de Souza por me oportunizar estar em seu laboratório, por me explicar e ensinar praticamente tudo que aprendi em dois anos através dos seus vários desenhos nos rascunhos e enfim concluir este trabalho. Tu és um exemplo de professora.

Às meninas do Laboratório de Bioquímica Experimental e Sinalização Celular; Vera pelo carinho, amizade e bom acolhimento, pela paciência em me ensinar a pipetar; Daia pela ajuda nos primeiros e árduos experimentos, pela paciência com o glutamato, pelas conversas maduras; Carlinha minha querida amiga de todas as horas, pelo companheirismo nos momentos de diversão, mas também de tensão; Pati e sua ternura, amiga dedicada e ótima companheira de bancada; Ju, Bi, Paulina, Mauren pelos poucos, mas bons momentos que passamos no lab.

Aos amigos e colegas do laboratório da Professora Dr^ª.Fátima, Alisson, Delsi, Gabi e Marisa, em especial a Ana companheira de lar e de boas conversas, a Rezinha pela sua bondade e pela paciência de me ensinar muitas coisas.

Aos amigos e colegas do laboratório da Professora Dr^ª. Rosângela e Professor Dr. Danilo, em especial ao Beni pela ajuda no “estresse” e pelas suas frases divertidas.

Aos técnicos do Lameb II e do departamento de Histologia, e a Professora Dr^ª. Elisa muito obrigada pela ajuda e carinho.

As amigas do Laboratório da Professora Dr^ª. Cristina Pitorese, da Universidade Nacional de Córboða, por me proporcionarem três meses maravilhosos.

Aos amigos do Instituto de Patologia- IPA, por me incentivarem a chegar aqui.

A minha família de graduação, pelo carinho e por me apoiarem e estarem comigo sempre, obrigada Aline, Fer e Leo.

Ao meu amor, companheiro e acreditador dos meus sonhos e potencial. Obrigada por me ajudares em tudo.

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

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

Por fim, a todos não mencionados aqui, mas que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho.

“Mestre não é quem ensina, mas quem de repente aprende.”

(Guimarães Rosa)

RESUMO

O hipertireoidismo está relacionado a diversas manifestações neurológicas. Todavia, os mecanismos precisos pelos quais os HT induzem seus efeitos no cérebro durante o desenvolvimento ainda são controversos. Os objetivos deste trabalho foram analisar o efeito desta patologia sobre a indução de estresse oxidativo, bem como as defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas e o desenvolvimento de alterações neuroquímicas relacionadas com a captação de glutamato, de cálcio e de glicose, além do transporte de aminoácidos e atividades enzimáticas. Além disso, foram avaliadas possíveis alterações histológicas no hipocampo. Para tal, o hipertireoidismo foi induzido em ratos Wistar machos, através de injeção intraperitoneal de T_3 80 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de peso corporal durante 7 dias, a partir do 8º dia de vida pós-natal. Os experimentos foram realizados com fatias de hipocampo quando os animais completavam os 15 dias de idade. Em conjunto, nossos resultados apontam que o hipertireoidismo devido ao excesso de T_3 , induz aumento na captação de glutamato, bem como de sua metabolização a glutamina, por ação da glutamina sintetase em astrócitos de ratos imaturos. Este evento diminui a concentração de glutamato na fenda sináptica, levando ao menor influxo de Ca^{2+} , corroborando o T_3 como um agente neuroprotetor. Uma vez nos astrócitos, o glutamato pode ser ainda convertido, por transaminação, a alfa-cetoglutarato ($\alpha\text{-KG}$), e este ser oxidado no ciclo de Krebs, ou ainda, ser utilizado para a síntese de GSH ou proteínas, dentre outras funções. Os dados obtidos neste estudo demonstraram ainda, que o hipertireoidismo diminuiu a atividade da Catalase (CAT) e da Glutathiona Peroxidase (GPx) e elevação nos níveis de glutathiona reduzida (GSH), bem como na atividade da glutathiona redutase (GR) e da gama-glutamil transferase (GGT), envolvidas respectivamente na redução da glutathiona oxidada (GSSG) em GSH e no “turnover” de GSH, reforçando o papel protetor do T_3 no cérebro. Por outro lado, o aumento na peroxidação lipídica e na carbonilação de proteínas induzidos pelo hipertireoidismo, sugerem a presença de dano oxidativo, reforçando a hipótese proposta de que o T_3 possui um efeito “duplo” protegendo o cérebro da excitotoxicidade glutamatérgica e aumentando os níveis de GSH, enquanto aumenta o dano oxidativo.

Palavras-Chave: 1. Hipertireoidismo. 2. Hipocampo. 3. Estresse oxidativo. 4. Excitotoxicidade glutamatérgica.

ABSTRACT

Hyperthyroidism leads to severe neurological manifestations. Altered levels of thyroid hormones (TH) have been associated with decrease in the synaptic plasticity, changes in neurotransmission, depression and anxiety. However, the precise mechanisms by which HT induces its effects in the brain during development are still controversial. The objectives of this study were to analyze the effect of this disease on the induction of oxidative stress, as well as on enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses and the development of neurochemical changes associated with the uptake of glutamate, calcium and glucose, in addition to the transport of amino acids and enzymatic activities. Morphological analyzes were also performed in this experiment. Thus, hyperthyroidism was induced in male Wistar rats by intraperitoneal injection of T₃ 80µg/kg body weight for 7 days, from the 8th day of postnatal life. The experiments were performed with slices of hippocampus when animals completed 15 days of age. The results achieved in this experiment show that hyperthyroidism, due to the excess of T₃ induces to an increase in the intake of glutamate and metabolization of glutamine by the action of glutamine synthetase in astrocytes of immature rats. This event decreases the concentration of glutamate in the synaptic cleft leading to lower Ca²⁺ influx, "supporting" the T₃ as a neuroprotective agent. In astrocytes, the glutamate can also be converted by transamination, alpha-ketoglutarate (α-KG), which is oxidized in the Krebs cycle, or even it is used for the synthesis of GSH or proteins, among other functions. Data from this study also demonstrated that hyperthyroidism caused an increase in GSH, as well as in the GR and GGT activity, respectively involved in the reduction of GSSG to GSH and in the "turnover" of GSH, reinforcing the protective role of T₃ in brain. On the other hand, increased lipid peroxidation and protein carbonylation suggest the presence of oxidative damage, reinforcing the hypothesis proposed that T₃ has a "double" effect protects the brain glutamatergic excitotoxicity and increasing GSH levels, while increasing oxidative damage.

Keywords: 1. Hyperthyroidism. 2. Hippocampus. 3. Oxidative stress, 4. Glutamatergic excitotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via bioquímica da formação da tiroxina e triiodotironina.	30
Figura 2. Metabolização dos HT pelas desidases.	31
Figura 3. Representação esquemática do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide.	33
Figura 4. Regiões do hipocampo.....	36
Figura 5. Representação esquemática das reações catalisadas pelas transaminases AST e ALT durante o metabolismo dos aminoácidos	38
Figura 6. A sinapse tripartite do glutamato.	40
Figura 7. Primeira reação para a geração de ERO. Redução tetravalente de oxigênio	46
Figura 8. Segunda reação da formação de ERO.....	46
Figura 9. Terceira reação da formação de ROS.	47
Figura 10. Representação da formação de •OH através das reações de Haber-Weiss/ Fenton.....	47
Figura 11. Esquema das defesas antioxidantes, mostrando a geração de espécies reativas.	50
Figura 12. Possíveis influências do hipertireoidismo sobre o hipocampo de ratos imaturos.	55
Figura 13. Efeitos do hipertireoidismo nos níveis de peroxidação lipídica.	69
Figura 14. Efeitos do hipertireoidismo nos níveis de carbonilação de proteínas.	70
Figura 15. Efeitos do hipertireoidismo sobre a atividade da Catalase.....	71
Figura 16. Efeitos do hipertireoidismo sobre a atividade da Glutaciona Peroxidase (GPx).	71
Figura 17. Efeitos do hipertireoidismo sobre o conteúdo da GSH.....	72
Figura 18. Efeitos do hipertireoidismo sobre a atividade da glutaciona redutase (GR)	72
Figura 19. Efeitos do hipertireoidismo sobre a atividade da Glicose 6- Fosfato desidrogenase (G6PD)	73
Figura 20. Efeitos do hipertireoidismo sobre a atividade da Gama- glutamyltransferase (GGT)	73
Figura 21. Efeitos do hipertireoidismo na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em hipocampo de ratos imaturos.	74
Figura 22. Efeitos do hipertireoidismo na captação de ^{14}C -desoxiglicose em hipocampo de ratos de 15 dias de idade.....	75
Figura 23. Efeitos do hipertireoidismo sobre a atividade das aminotrasferases (AST e ALT) em hipocampo de ratos imaturos.	76

Figura 24. Efeitos do hipertireoidismo na captação de L-[¹⁴ C] Glutamato em hipocampo de ratos de 15 dias de idade.	77
Figura 25. Efeitos do hipertireoidismo sobre a atividade da Glutamina Sintetase em hipocampo de ratos imaturos.....	77
Figura 26. Efeitos do hipertireoidismo no acúmulo de ¹⁴ C-MeAIB em hipocampo de ratos imaturos.....	78
Figura 27. Efeitos do hipertireoidismo sobre a atividade da colinesterase em hipocampo de ratos com 15 dias de idade.	79
Figura 28. Efeitos do hipertireoidismo sobre o imunoconteúdo da GSK3β total e fosforilada em hipocampo de ratos imaturos.....	80
Figura 29. Consequência do hipertireoidismo sobre o número de células neuronais em hipocampus de ratos imaturos.....	81
Figura 30. Efeito de lateralidade induzido pelo hipertireoidismo sobre o número de neurônios na subregião CA2 do hipocampo de ratos imaturos..	82
Figura 31. Efeito hipertireoidismo sobre a densidade da GFAP nas subregiões do hipocampo de ratos imaturos.....	83
Figura 32. Mecanismos de neurotoxicidade e/ou neuroproteção induzidos pelo hipertireoidismo sobre células hipocámpais de ratos em desenvolvimento.....	96

LISTA DE ABREVIATURA

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ADP	Difosfato de adenosina
Akt	Proteína cinase B
ALT	Alanina aminotransferase
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izozazol-Propiônico
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
AOX	Antioxidante
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Trifosfato de adenosina
BHE	Barreira hematoencefálica
BuChE	Butirilcolinesterase
Ca ⁺²	Cálcio
CA	Corno de ammon
CAT	Catalase
CCDV	Canal de cálcio dependente de voltagem
CREB	Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc
D ₁	Iodotironina desiodase 1
D ₂	Iodotironina desiodase 2
D ₃	Iodotironina desiodase 3
DIT	3, 5-diiodo-L-tirosina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
D.O.	Densidade Óptica
DPTA	Ácido dietilenotriaminopentacético
EAAT	Transportador de aminoácido excitatório
ERN	Espécies reativas do nitrogênio
ERO	Espécies reativas do oxigênio
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GAD	Glutamato descarboxilase
GD	Giro denteado
GDH	Glutamato desidrogenase
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida

GGT	Gama-glutamyltransferase
GLAST	Transportador astrocitário de glutamato tipo 1
Gln	Glutamina
GLT-1	Transportador astrocitário de glutamato tipo 2
Glu	Glutamato
GO	Oftalmia de graves
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GS	Glicogênio sintase
GS	Glutamina sintetase
GSH	Glutathione reduzida
GSK3 β	Cinase da glicogênio sintase 3 β
GSSG	Glutathione oxidada
GST	Glutathione S-transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HT	Hormônios da tireóide
IP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
KA	Receptor cainato
L \cdot	Radical alquil
LDH	Lactato desidrogenase
LOO \cdot	Radical peroxil
LPO	Lipoperoxidación
LTD	Depressão de longa duração
LTP	Potencial de longa duração
MAPK	Proteína serina-treonina cinase ativada por mitógeno
MCT	Transportador de monocarboxilato
MDA	Malondialdeído
MeAIB	Ácido α -(metil-amino)-isobutírico
mGluR	Receptor metabotrópico para glutamato
MIT	3-monoiodo-L-tirosina
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADPH	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo Reduzido
NIS	Simporte sódio/iodo
NMDA	N-metil-D-aspartato
N ₂ O ₃	Ácido nitroso
NO ₂ \cdot	Nitrito
NO ₃ \cdot	Nitrato
\cdot NO	Óxido nítrico
NTCP	Polipeptídeos co-transportadores Na ⁺ /Tauroclorato

O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ ^{-•}	Radical ânion superóxido
¹ O ₂	Oxigênio singlete
OATP	Polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos independentes de Na ⁺
•OH	Radical hidroxila
ONOO ⁻	Peroxinitrito
OOH [•]	Radical peroxil
PAG	Glutaminase ativada por fosfato
PC	Proteína carbonilada
PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína cinase C
PLC	Fosfolipase C
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucléico
RO [•]	Radical alcóxil
ROO [•]	Radical peroxil
RXR	Receptor 9-cis-ácido retinóico
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SOD	Superóxido dismutase
T ₂	3,3'-diiodotironina
T ₃	3,3',5-triiodo-L-tironina
T ₃ r	3,3',5'-triiodo-L-tironina; T ₃ reverso
T ₄	3,3',5,5'-tetraiodotironina; tiroxina
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
t-BuOOH	Tert-butilhidroperóxido
TCA	Ácido tricloroacético
TG	Tireoglobulina
TPO	Peroxidase tireóide
TR	Receptor nuclear
TRE	Elemento de resposta ao hormônio da tireóide
TRH	Hormônio liberador de tireotrofina
TSH	Hormônio estimulante da tireóide
VGLUT	Transportador de glutamato vesicular

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	23
1.1	OBJETIVOS	25
1.1.1	Objetivo geral	25
1.1.2	Objetivos específicos	25
2.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	27
2.1	HIPERTIREOIDISMO	27
2.2	HORMÔNIOS DA TIREOIDE	28
2.1.1	Síntese dos Hormônios Tireoidianos.....	28
2.3	MECANISMOS DE REGULAÇÃO DA SÍNTESE E SECREÇÃO DOS HORMÔNIOS DA TIREOIDE	32
2.3.1	Mecanismos moleculares de ação hormonal.....	34
2.4	HIPOCAMPO.....	35
2.5	GLUTAMATO	36
2.5.1	Transporte de aminoácidos	41
2.6	ACETILCOLINA	41
2.7	CÁLCIO E SINALIZAÇÃO CELULAR NO SISTEMA NERVOSO.....	42
2.8	VIA DE SINALIZAÇÃO	43
2.8.1	Glicogênio-Sintase Cínase 3 (GSK3)	43
2.9	RADICAIS LIVRES E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO	44
2.9.1	Mecanismos de geração de radicais livres	45
2.9.2	Lipoperoxidação	47
2.9.3	Estresse Oxidativo	48
2.10	DEFESAS ANTIOXIDANTES.....	49
2.10.1	Antioxidantes Enzimáticos	49
2.10.2	Antioxidantes não enzimáticos	51
2.11	HIPERTIREOIDISMO E ESTRESSE OXIDATIVO	52
3.	HIPÓTESE	55
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	57
4.1	REAGENTES	57
4.2	ANIMAIS	57
4.3	TRATAMENTO IN VIVO.....	57
4.4	CAPTAÇÃO DE [¹⁴ C]-GLUTAMATO	57
4.5	CAPTAÇÃO DE ⁴⁵ Ca ²⁺	58
4.6	CAPTAÇÃO DE [¹⁴ C]-DESOXIGLICOSE.....	58
4.7	ACÚMULO DE AMINOÁCIDOS NEUTROS	59
4.8	CONTEÚDO DE GSH	59

4.9	ATIVIDADE ENZIMÁTICA	60
4.9.1	Atividade da gama-glutamil transferase	60
4.9.2	Glutamina Sintetase	60
4.9.3	Atividade das enzimas ALT e AST	60
4.9.4	Atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase	61
4.9.5	Atividade da Colinesterase	61
4.10	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES	61
4.10.1	Catalase	62
4.10.2	Glutaciona peroxidase	62
4.10.3	Glutaciona redutase	62
4.11	DETERMINAÇÃO DOS MARCADORES DE DANOS OXIDATIVO	63
4.11.1	Lipoperoxidação tecidual – TBARS	63
4.11.2	Proteína carbonilada	63
4.12	NÍVEIS DA PROTEÍNA GSK-3 β TOTAL E FOSFORILADA	64
4.13	PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS	64
4.13.1	Imunohistoquímica para GFAP em hipocampo de ratos imaturos	65
4.13.1.1	Densidade óptica para a imunorreatividade da GFAP nas subregiões do hipocampo	66
4.13.2	Imunohistoquímica para NeuN em hipocampo de ratos imaturos	67
4.13.2.1	Estimativa da densidade numérica das células NeuN positivas nas sub-regiões do hipocampo de ratos imaturos	67
4.14	ANÁLISE ESTATÍSTICA	68
5.	RESULTADOS	69
5.1	Efeitos do hipertireoidismo sobre parâmetros bioquímicos envolvidos no estresse oxidativo	69
5.2	Alteração no influxo de Ca^{++} em hipocampo de ratos imaturos submetidos ao hipertireoidismo	74
5.3	Efeito do hipertireoidismo induzido sobre a captação de glicose e na atividade das aminotransferases	75
5.4	Participação do sistema glutamatérgico no efeito do hipertireoidismo induzido	76
5.5	Efeito do hipertireoidismo no transporte de aminoácidos neutros	78
5.6	Participação da GSK3B no mecanismo de neuroproteção do hipertireoidismo sobre o hipocampo de ratos imaturos	79

5.7	Imunohistoquímica para NeuN e GFAP	80
5.7.1	Efeito do hipertireoidismo sobre o número de neurônios em hipocampo de ratos imaturos	80
5.7.2	Consequências do hipertireoidismo sobre o número de células astrocíticas em hipocampo de ratos imaturos	82
6.	DISCUSSÃO	85
7.	CONCLUSÃO	97
8.	PERSPECTIVAS	99
9.	REFERÊNCIAS	101

1. INTRODUÇÃO

As disfunções da tireoide figuram entre as doenças endócrinas mais comuns na população mundial (BERNAL, 2002; AHMED *et al.*, 2008), ressaltando a importância de conhecer melhor as alterações provocadas pelas mesmas. Os estudos documentados na literatura demonstram uma diversidade de alvos para ação dos hormônios da tireoide (HT) no cérebro durante o desenvolvimento, sendo muitos deles ainda controversos. Dentre os principais efeitos dos HT no SNC durante o desenvolvimento pode-se destacar a regulação da citoarquitetura neuronal, sinaptogênese, mielinização, proliferação neuronal e modulação da neurotransmissão (MASON *et al.*, 1987, 1990; BERNAL, 2002; ANDERSON, 2001; AHMED *et al.*, 2008; LOSI *et al.*, 2008; ZAMONER *et al.*, 2011). Neste contexto, alterações nos níveis dos HT podem afetar a maturação do SNC e causar disfunções irreversíveis no cérebro tanto de roedores quanto de humanos (WONG; LEUNG, 2001).

O hipertireoidismo neonatal foi descrito como uma doença crítica, marcada principalmente por sintomas cardíacos, baixo ganho de peso e manifestações neurológicas severas, sendo que este acelera os processos envolvidos no desenvolvimento neural (SELENKOW, 1975; WING *et al.*, 1994; POLAK, 1998; CAFFREY, 2000). Os mecanismos moleculares pelos quais os HT induzem seus efeitos no cérebro durante o desenvolvimento são pouco conhecidos e acredita-se que a maioria deles seja mediada pela ativação de seus receptores nucleares, modulando a expressão de proteínas específicas (BERNAL, 2007).

A excitotoxicidade glutamatérgica, a modulação do citoesqueleto e o estresse oxidativo são eventos característicos nas doenças neuropsiquiátricas (PESSOA-PUREUR; WAJNER, 2007), sendo, portanto alvos promissores para as ações dos HT. Diversas evidências demonstram um importante papel da ativação excessiva dos receptores glutamatérgicos resultando em morte neuronal e neurodegeneração. A subclasse de receptores ionotrópicos para glutamato do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) é a subclasse mais seletiva e mais efetiva que as demais em mediar danos neurodegenerativos. A superativação do receptor NMDA pelo glutamato acarreta em aumento no influxo de cálcio e níveis elevados deste íon são responsáveis pelo fenômeno de excitotoxicidade glutamatérgica que leva a estresse oxidativo, dano mitocondrial e morte celular (FAN; RAYMOND, 2007; WANG; MICHAELIS, 2010). Além da modulação via sistema glutamatérgico, a sinalização celular mediada por Ca^{2+} pode

ser regulada por diversos mecanismos, incluindo atividade de proteínas cinases, neurotransmissores, hormônios, nucleotídeos e fatores de crescimento (BIRD; PUTNEY, 2006; ZAMONER *et al.*, 2007, 2008a).

Os astrócitos são os principais responsáveis pela captação e metabolismo do glutamato. Uma vez dentro dos astrócitos o glutamato pode ser convertido em glutamina pela glutamina sintetase. Além disso, o grupo α -amino do glutamato pode ser transferido ao oxaloacetato gerando aspartato e α -cetoglutarato (α -KG) através da reação catalisada pela aspartato aminotransferase (AST). Outra reação de transaminação, catalisada pela alanina aminotransferase (ALT), transfere o grupo α -amino do glutamato para o piruvato, resultando na formação de alanina e α -KG para o ciclo de Krebs (ZIGMOND *et al.*, 1999). Considerando-se o que foi exposto, avaliar o efeito das disfunções tireoidianas sobre o influxo de cálcio, o sistema glutamatérgico, o estresse oxidativo e a atividade das aminotransferases, pode demonstrar importantes alvos destes hormônios sobre o SNC, que potencialmente estariam induzindo dano neuronal.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do hipertireoidismo induzido por T₃ sobre o estresse oxidativo e o desenvolvimento de alterações neuroquímicas e morfológicas sobre o hipocampo de ratos imaturos.

1.1.2 Objetivos específicos

1. Avaliar o efeito do hipertireoidismo nos níveis de peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas;

2. Avaliar os efeitos do hipertireoidismo sobre a atividade enzimas envolvidas nas defesas antioxidantes (GR, GPx e CAT) no hipocampo de ratos imaturos; Além da GGT e G6PD;

3. Determinar os níveis de GSH, no hipocampo de animais submetidos ao hipertireoidismo.

4. Investigar as alterações na fosforilação da proteína GSK3-beta;

5. Avaliar as consequências do hipertireoidismo induzido sobre a captação de [¹⁴C]-glutamato e a atividade da glutamina sintetase, além da captação de ⁴⁵Ca²⁺ no hipocampo de ratos imaturos;

6. Estudar o efeito do hipertireoidismo sobre a captação de [¹⁴C] 2-desoxiglicose e na captação de aminoácidos neutros em hipocampo de ratos imaturos.

7. Investigar as consequências do hipertireoidismo sobre a atividade das aminotransferases (AST e ALT).

8. Estudar o efeito do hipertireoidismo induzido sobre o número de células NeuN positivas (neurônios) nas subregiões do hipocampo em ratos de 15 dias de idade.

9. Verificar as consequências do hipertireoidismo sobre a densidade da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) no hipocampo de ratos imaturos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 HIPERTIREOIDISMO

O hipertireoidismo é caracterizado pela secreção aumentada dos HT que não se encontram mais sobre o controle regulador dos centros hipotalâmicos e hipofisários levando as manifestações clínicas de um estado hipermetabólico, tais como perda de peso, fraqueza muscular, exoftalmia, intolerância ao calor, irritabilidade, ansiedade, taquicardia, tremores, distúrbios do sono, paranoia, mania, depressão e labilidade emocional (STEDMAN, 1996; KLEIN; OJAMAA, 2001; SMITH *et al.*, 2002, FARWELL; BRAVERMAN, 2006).

Certos sintomas também podem ocorrer com a administração excessiva de HT para o tratamento do hipotireoidismo. O uso duradouro de HT na ausência de monitoração rigorosa pode ser uma causa de sintomas de hipertireoidismo (BARE; SMELTHEZER, 2005).

As manifestações clínicas do hipertireoidismo e outros estados de tireotoxicose são similares, mesmo que os mecanismos pelos quais se produzam sejam diferentes, os sinais e sintomas são característicos. O excesso de HT acarreta uma hiperestimulação do metabolismo, o que por sua vez afeta direta ou indiretamente todos os sistemas.

Em decorrência do aumento do metabolismo basal, há também um aumento do apetite e intolerância ao calor. Quando existe uma maior gravidade na doença, o aumento de ingesta alimentar é inadequado para o aumento das necessidades calóricas, resultando em perda de peso de grau variável. Ainda existe um aumento na velocidade do trânsito intestinal (VILLAREJO *et al.*, 2012).

A prevalência de hipertireoidismo é de aproximadamente 1,3% da população (0,5% clínico e 0,7% subclínico). A doença de Graves, o bócio multinodular tóxico e o adenoma tóxico são as causas subjacentes mais frequentes de hipertireoidismo (HOLLOWELL *et al.*, 2002; IGLESIAS *et al.*, 2010). De maneira geral, as doenças da tireoide afetam as mulheres com uma frequência oito vezes maior que os homens e têm o máximo de sua incidência na segunda a quarta décadas. A prevalência de alterações na função tireoidiana na mulher é elevada sendo aproximadamente 5/1.000 casos de hipotireoidismo e 3/1.000 casos de hipertireoidismo (FERNANDÉZ, 2013).

Quanto ao tratamento, atualmente existem três métodos para tratar o hipertireoidismo, sendo eles os medicamentos antitireoide, cirurgia e radioisótopos. No entanto, nenhum deles é ideal, cada um tem

suas vantagens e desvantagens e frequentemente uma combinação de terapias é feita.

2.2 HORMÔNIOS DA TIREOIDE

Os HT são moléculas hidrofóbicas e lipossolúveis que desempenham funções fundamentais na regulação do metabolismo, crescimento e desenvolvimento em mamíferos. São conhecidos por apresentarem efeitos pleiotrópicos em diversos órgãos e por modularem essencialmente as rotas metabólicas através de alterações no consumo de oxigênio e mudanças no metabolismo das proteínas, lipídeos, carboidratos e vitaminas (NORMAN; LITWACK, 1997; KÖHRLE, 1999; BERNAL, 2002; ZAMONER *et al.*, 2007, 2008). Estão ainda, envolvidos na calorigênese e na diferenciação de tecidos (HARVEY; WILLIAMS, 2002; SMITH *et al.*, 2002).

2.1.1 Síntese dos Hormônios Tireoidianos

A tireoide sintetiza, armazena e secreta os hormônios L-tiroxina (3,3',5,5'-tetraiodotironina; L-T₄), triiodotironina (3,3',5-triiodo-L-tironina; T₃) e T₃ reverso (3,3',5'-triiodo-L-tironina; T_{3r}), sendo T₄ o produto secretado em maior quantidade (KÖHRLE, 1999; MORENO *et al.*, 2008; SCAPIN *et al.*, 2010).

A glândula tireoide consiste em dois lobos laterais conectados por um istmo. É dividida em lóbulos, compostos por 20 a 40 folículos que são preenchidos pela substância colóide (ROBBINS; COTRAN, 2010). As células foliculares sintetizam a proteína tireoglobulina (TG), a qual contém o aminoácido tirosina na sua composição. Dessa forma a TG serve como matriz para a síntese dos hormônios da tireoide e para estocar a forma inativa do iodo (CHAMPION *et al.*, 1987; HAIYAN; CARAYANNIOTIS, 2006).

A síntese dos HT requer a integridade de um complexo sistema protéico e de uma sequência de etapas, além de depender diretamente do iodo (VAN HERLE *et al.*, 1979; DUNN *et al.*, 2000; KOPP, 2005).

As etapas de síntese iniciam-se com a absorção do iodo proveniente da dieta. Esta molécula recentemente absorvida pelo trato gastrointestinal entra na célula folicular tireoidiana através do simporte sódio/iodo (NIS) e posteriormente a pendrina (PDS) transporta o iodo até o lúmen folicular (DOHAN *et al.*, 2000; LI; CARAYANNIOTIS, 2007). Ao ocorrer à captação do iodeto, este migra para a superfície

apical onde será convertido e oxidado para a sua forma ativa (I^+) pela enzima tireoperoxidase (COOPER, 1984).

A tireoperoxidase, também denominada peroxidase tireóidea (TPO), é a principal enzima relacionada à biossíntese hormonal. É uma proteína de membrana apical que age como catalisador enzimático sendo responsável pela catálise da incorporação do I^+ aos resíduos de tirosina (Tyr) e pela ligação das moléculas de iodotirosina, já incorporadas na tireoglobulina. Esta etapa é chamada de organificação do iodo. A TPO é ativa na presença do catalisador peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual é gerado por um complexo sistema formado por membros da família NADPH oxidase (BERNAL *et al.*, 2003; WU *et al.*, 2005).

O H_2O_2 é essencial como oxidante na reação de oxidação do iodeto catalisada pela TPO e, quando os níveis intracelulares de iodeto são suficientes, a geração de H_2O_2 passa a ser o passo limitante na biossíntese dos HT (FIGUEIREDO *et al.*, 2001).

Após a primeira etapa, o iodeto então é incorporado aos resíduos de tirosina para em seguida unir-se ao núcleo tirosil da tireoglobulina formando as iodotirosinas, 3-monoiodo-L-tirosina (MIT) e 3,5-diiodo-L-tirosina (DIT). A síntese de T_4 se dá pela fusão de duas moléculas de DIT para que seja produzida a estrutura definitiva com dois anéis iodados, enquanto a síntese de T_3 ocorre com a junção de MIT e DIT (Figura 1) (WILSON; FOSTER; KRONENBERG, 1998; YEN *et al.*, 2001)

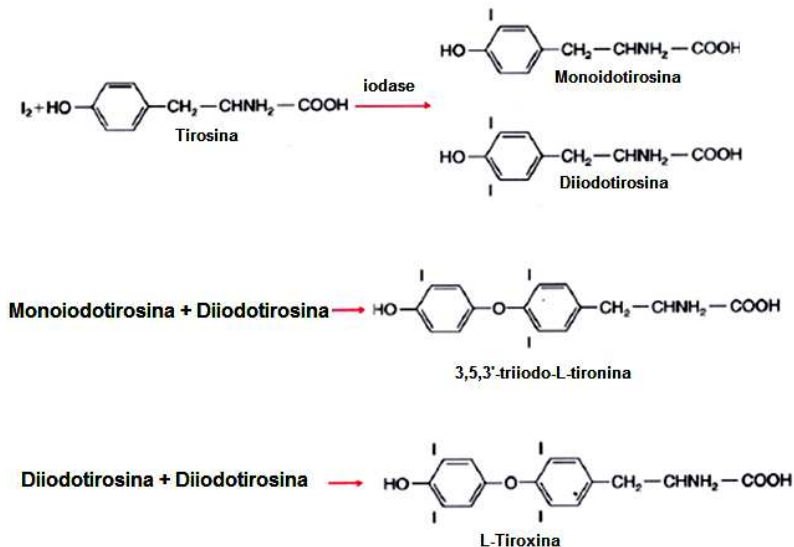
Os hormônios recém-formados permanecem armazenados no coloide e uma parte é liberada quando requisitada pela ação do hormônio estimulante da tireoide (TSH). Aproximadamente 20% da produção diária de T_3 é liberada diretamente na circulação, a maior parte da conversão de T_4 em T_3 se dá em tecidos periféricos. Este processo no qual o precursor T_4 é convertido na forma ativa do hormônio T_3 é conhecido como desiodação central e periférica (WU *et al.*, 2005).

Como mencionado, o principal produto secretado pela tireoide é o T_4 , que é considerado por alguns autores como um pró-hormônio. Em menores concentrações são também secretados o T_3 , o T_{3r} e as tirosinas monoiodinadas. O T_4 é convertido por desiodação do anel externo em T_3 por ação das enzimas desiodases (UTIGER, 1987; PUYMIRAT, 1992; DARRAS *et al.*, 1999).

As iodotironinas desiodases I (D1), II (D2) e III (D3) constituem um grupo de proteínas diméricas de membrana que podem ativar ou

inativar os HT, dependendo se agem nos anéis fenólicos ou tirosínicos das iodotironinas (BERRY *et al.*, 1991; MANDEL *et al.*, 1992).

Figura 1. Via bioquímica da formação da tiroxina e triiodotironina.



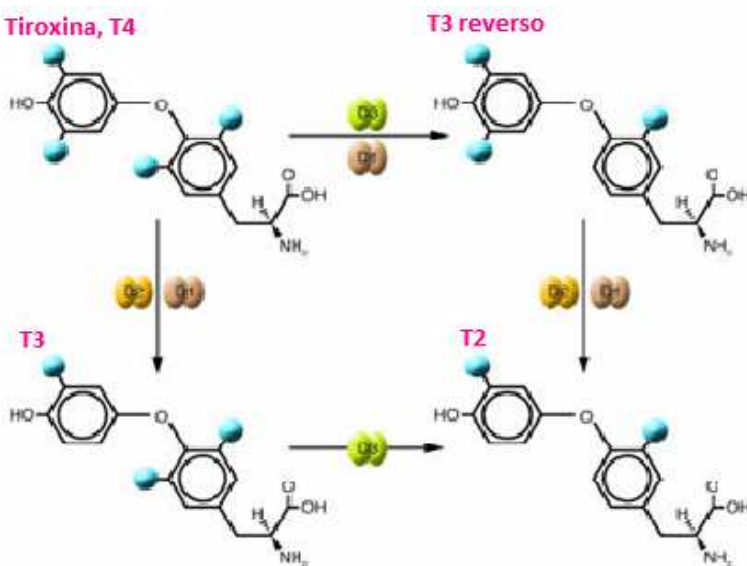
Fonte: Adaptado de GUYTON, 1997.

A D1 apresenta uma capacidade única em relação às outras desidases, pois é capaz de catalisar a desidatação tanto do anel fenólico (externo) quando do anel tirosínico (interno) das diversas iodotironinas. D1 é capaz de converter T_4 em T_3 ou T_{3r} , assim como pode produzir 3,3'- T_2 a partir do T_3 ou T_{3r} (Figura 2). Em humanos, apesar da D1 colaborar para a produção de T_3 plasmático, sua contribuição mais significativa se dá em pacientes com hipertireoidismo (DARRAS *et al.*, 1999; BIANCO *et al.*, 2002; MEYER *et al.*, 2007; GEREBEN *et al.*, 2008).

Nos mamíferos de forma geral, a D1 apresenta maior atividade no fígado, mas pode ser expressa em tecidos renais, na glândula tireoide, pituitária, placenta e intestino. Em roedores, é expressa no SNC. A expressão desta desidase é regulada positivamente pelo T_3 (MAIA *et al.*, 1995; BIANCO; KIM, 2006; MEYER *et al.*, 2007).

A D2 catalisa exclusivamente a desiodação do anel externo das iodotironinas fazendo a conversão de T_4 para T_3 , ou ainda, de T_3 em T_2 (Figura 2) (BAQUI *et al.*, 2000; CURCIO *et al.*, 2001). Em geral, a atividade da D2 apresenta uma correlação inversa com os níveis séricos dos HT, estando aumentada no hipotireoidismo e diminuída no hipertireoidismo. Em humanos, o RNA mensageiro e/ou a atividade da D2 estão presentes principalmente no cérebro, hipófise, tireoide, placenta e músculos cardíaco e esquelético. Em roedores, a D2 é expressa na glândula pituitária, cérebro, tecido adiposo marrom, gônadas, glândula pineal e timo de ratos, e glândula mamária de camundongos (MAYER *et al.*, 2007; GEREBEN *et al.*, 2008).

Figura 2. Metabolização dos HT pelas desidases.



As desidases catalisam a remoção do iodo (esfera azul) do anel fenólico ou tirosínico das iodotironinas produzindo T_3 , T_3r e T_2 por desiodação gradual do T_4 .

Fonte: Adaptado de Bianco; Kim (2006).

A D3 é uma proteína de membrana que catalisa a desiodação do anel interno das moléculas de T_4 e T_3 , resultando na formação dos metabólitos T_{3r} e T_2 (Figura 2) (BIANCO; KIM, 2006). A expressão de D3 é mais elevada em tecidos fetais humanos e de roedores, na placenta, útero gravídico e vasos umbilicais. Essa localização sugere que a D3 regule os níveis circulantes e teciduais de T_3 , de modo a proteger o feto em desenvolvimento de uma indevida exposição aos HT (HUANG, 2003; MAYER *et al.*, 2007; GEREKEN *et al.*, 2008).

2.3 MECANISMOS DE REGULAÇÃO DA SÍNTESE E SECREÇÃO DOS HORMÔNIOS DA TIREOIDE

O hipotálamo e a hipófise controlam a função de várias glândulas endócrinas como a tireoide, adrenais e gônadas o que, por conseguinte, modula uma série de funções orgânicas. O controle que o sistema nervoso exerce sobre o sistema endócrino e a modulação que este efetua sobre o sistema nervoso central, constitui um dos principais mecanismos reguladores de praticamente todos os processos fisiológicos.

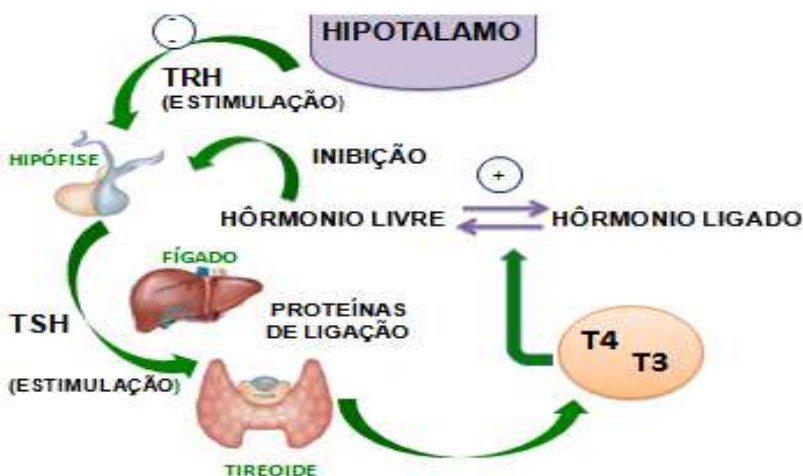
O hormônio estimulante da tireoide (TSH) é o principal regulador da secreção de T_3 e T_4 . A interação do TSH com seus receptores ativa a adenililciclase, aumentando a formação de AMP cíclico (cAMP), o que ativa uma sequência de ativação de proteínas cinases (MAGNER, 1990; YEN, 2001).

O TSH, por sua vez é estimulado pelo hormônio liberador de tirotrofina (TRH), um pequeno peptídeo liberado pelas células neurosecretoras no hipotálamo e no interior dos capilares hipotálamo-hipofisários portais, onde são transportados para os tireótrofos pituitários. Sua meia-vida plasmática é de aproximadamente três minutos (YEN, 2001). O estímulo de TRH sobre a secreção de TSH ocorre pela ativação mediada por receptor via fosfolipase C, o que mobiliza o cálcio intracelular. Dessa maneira, o TSH produzido pelas células tireotróficas da hipófise anterior interage com receptores específicos na tireoide e estimula todas as etapas de síntese do T_4 e T_3 , bem como sua liberação pela glândula (Figura 3). A concentração dos HT na circulação é regulada por um processo de retroalimentação homeostático. O principal efeito dos HT é reduzir a resposta dos tireótrofos mais do que alterar a taxa de secreção do TRH pelo hipotálamo. A sensibilidade dos tireótrofos ao TRH depende da concentração intracelular de T_3 . Quando a concentração de T_4 circulante é baixa, há um aumento na síntese dos receptores de TRH e na síntese

de TSH o que resulta no aumento da resposta do TSH ao TRH (WILSON *et al.*, 1998).

A síntese de TSH pode ser inibida por outros hormônios como a somatostatina e a dopamina, e também por citocinas, particularmente IL-1 β , IL-6 e TNF- α (NUSSEY; WHITEHEAD, 2001; REIS-LUNARDELLI *et al.*, 2007). Ainda, o processo de retroalimentação que regula a concentração dos HT é afetado por fatores como o balanço energético, variação circadiana, temperatura ambiente, além de algumas doenças como anorexia nervosa (LECHAN; FEKETE, 2006).

Figura 3. Representação esquemática do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide.



Fonte: Adaptado de Zamoner (2006).

Portanto, a síntese e a secreção do TSH são influenciadas pelos hormônios da tireoide por retroalimentação negativa e pelo TRH por retroalimentação positiva, representados esquematicamente pela figura 3. Como resultado desse controle na secreção do TSH, a secreção dos hormônios tireoidianos é mantida dentro de limites muito estreitos (YEN, 2001).

2.3.1 Mecanismos moleculares de ação hormonal

Os efeitos biológicos do T_3 são inicialmente mediados pela interação do hormônio com receptores nucleares, sendo estes efeitos conhecidos como efeitos genômicos. Entretanto, os HT também podem desencadear efeitos conhecidos como de membrana e/ou não genômicos, através da interação destes hormônios com receptores putativos presentes na membrana plasmática (BERNAL, 2007).

No mecanismo clássico de ação dos HT, o T_3 atua nas células alvo através de seus receptores nucleares, TRs. Esses receptores são produtos do protooncogene *c-erbA* e homólogos ao oncogene *v-erbA*. São conhecidas duas isoformas desses receptores, $TR\alpha$ e $TR\beta$ (BERNAL, 2007).

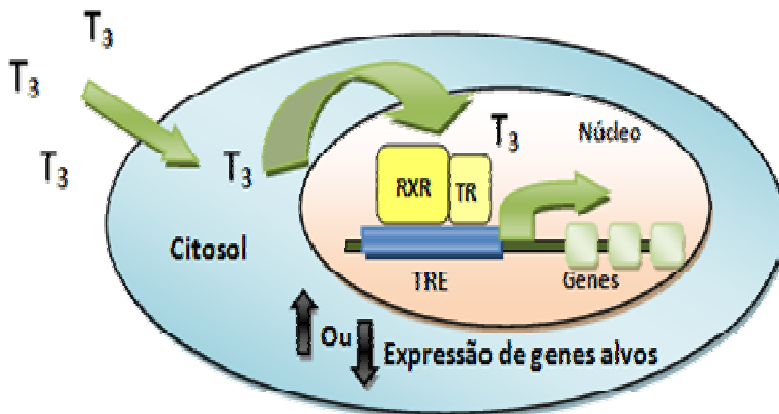
Os receptores $TR\alpha$, dividem-se ainda em $TR\alpha_1$, $TR\alpha_2$ e $TR\alpha_3$. As isoformas $TR\alpha_1$ predominam durante desenvolvimento neural, com níveis mais elevados no córtex cerebral, córtex piriforme, hipocampo e no colículo superior. Sugere-se que o $TR\alpha_1$ é responsável por praticamente toda a capacidade de ligação de T_3 no cérebro (SCHWARTZ *et al.*, 1994).

O segundo grupo de receptores, os $TR\beta$, compreendem as variantes $TR\beta_1$, $TR\beta_2$, $TR\beta_3$ e $TR\Delta\beta_3$ (BERNAL, 2007). Os receptores da família $TR\beta_1$ apresentam, em ratos, sua expressão principalmente pós-natal, no striatum e na região CA1 do hipocampo, com uma expressiva elevação nos níveis de concentração do seu RNAm coincidindo com o nascimento e atingindo o pico máximo de concentração aproximadamente em 10 dias pós-natal. A isoforma $TR\beta_2$ está distribuída em núcleos neuronais por todo cérebro.

Contudo, as três isoformas funcionais foram identificadas como $TR\alpha_1$, $TR\beta_1$ e $TR\beta_2$ e são receptores nucleares verdadeiros que induzem a transcrição gênica. Sabe-se que enquanto o $TR\alpha$ está envolvido com os efeitos metabólicos dos HT, o $TR\beta$ é o regulador chave no controle do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide e o responsável pelo estado eutireoideo (ANDERSON, 2001).

Estes receptores ligam-se a regiões específicas do DNA, conhecidas como elementos de resposta ao hormônio da tireoide (TREs), na forma de monômeros, homodímeros ou mais comumente, como heterodímeros formados entre o TR e o receptor de 9-cis-ácido retinóico (RXR), o que resulta na liberação dos co-repressores e recrutamento de coativadores da transcrição gênica (Figura 4) (ANDERSON, 2001).

Figura 4. Mecanismo clássico de ação dos hormônios tireoidianos



Fonte: Adaptado de Zamoner (2006).

A regulação de cada um dos receptores varia conforme cada isoforma, o tecido e o estágio de desenvolvimento, como mencionado anteriormente. Em geral, $TR\alpha$ é expresso em altos níveis no início do desenvolvimento, enquanto a expressão de $TR\beta$ é aumentada no final do desenvolvimento cerebral (ANDERSON, 2001; FORREST *et al.*, 2002). A presença de TRs nos astrócitos pode explicar os efeitos do T_3 em vários aspectos da função astrocitária *in vitro*, incluindo transporte de glicose, secreção proteica, proliferação e diferenciação morfológica (AIZENMAN; DE VELLIS, 1987; TRENTIN *et al.*, 1995; TRENTIN; MOURA NETO, 1995).

2.4 HIPOCAMPO

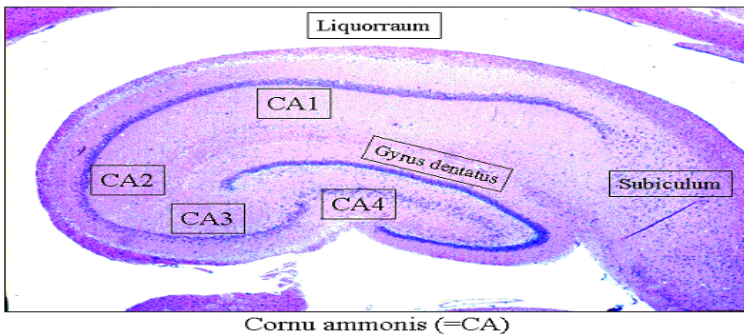
Os HT estão criticamente envolvidos no desenvolvimento e função no SNC (BERNAL, 2002). Dessa maneira, alterações nos níveis desses hormônios podem resultar em alterações morfofisiológicas do hipocampo e outras partes do cérebro.

Caracterizações mais específicas da função do hipocampo, com base em dados experimentais de animais e seres humanos, demonstram implicações na formação do hipocampo na doença de Alzheimer, hipotireoidismo, epilepsia do lobo temporal, envelhecimento cognitivo, amnésia, esquizofrenia e transtornos depressivos e de ansiedade (SMALL *et al.*, 2011).

A região hipocampal está localizada na porção medial do lobo temporal e é uma das estruturas que compõe o sistema límbico. A região hipocampal consiste da formação hipocampal e da região parahipocampal. A formação hipocampal, ou o hipocampo propriamente dito, é uma estrutura em forma de C e inclui o giro denteado (GD) e o Corno de Ammon (CA), sendo este último dividido em CA1, CA2, CA3 e CA4 e o subículo (Figura 5). A região parahipocampal consiste do pré-subículo, para-subículo, córtex entorrinal, córtex perirhinal e córtex pós-rihal (VAN STRIEN *et al.*, 2009; HOU; YANG; YUAN, 2013).

Os seres humanos e outros mamíferos possuem dois hipocampos, um em cada hemisfério cerebral. Considerando uma definição mais restrita, a formação do hipocampo se refere apenas ao hipocampo e GD. O GD é constituído por células granulares, e é uma das principais regiões do cérebro, pois possui a capacidade, ao longo da vida, de formação de novos neurônios em mamíferos (YANG; YUAN, 2013).

Figura 5. Regiões do hipocampo



Corno de Ammon (CA1, CA2, CA3, CA4); Giro denteado (GD) e subículo. Hipocampo de rato corado com azul de cresil.

Fonte: Adaptado de CASSIM (2007).

2.5 GLUTAMATO

O glutamato é o aminoácido livre mais abundante no sistema nervoso central. A maior parte do glutamato presente no tecido nervoso (70%) apresenta funções metabólicas (biossíntese de proteínas, entre outras) idênticas às exercidas por este aminoácido em outros tecidos. Além dessa função, o glutamato é o principal neurotransmissor

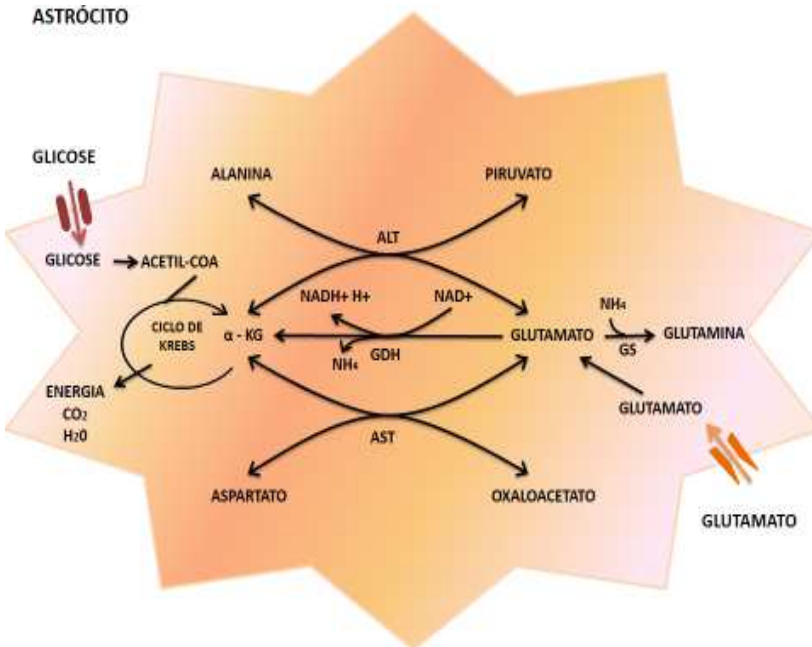
excitatório de mamíferos e participa ativamente de atividades relacionadas com a informação sensorial, coordenação motora, emoção e cognição, aprendizado, memória e plasticidade neural (ERICINSKA; SILVER, 1990; OZAWA *et al.*, 1998;)

Este aminoácido pode ser sintetizado a partir do α -cetogluturato (α -CG), intermediário do ciclo de Krebs, pela enzima desidrogenase do ácido glutâmico (GDH); ou a partir da glutamina, pela enzima glutaminase ativada por fosfato (PAG). O glutamato tem muitos destinos no cérebro, incluindo a conversão em glutamina pela glutamina sintetase (GS) em astrócitos, a conversão para o GABA neuronal pela enzima descarboxilase do ácido glutâmico (GAD), a oxidação na via de energia do ciclo de Krebs, a síntese de proteínas, e a síntese de glutatona, dentre outros (MCKENNA, 2007; BRADY *et al.*, 2012).

A barreira hematoencefálica (BHE), essencialmente, impede a entrada de glutamato derivado do sangue no SNC. Deste modo, uma grande quantidade de glutamato é sintetizada a partir da glicose plasmática, que entra no cérebro por meio de moléculas transportadoras de glicose (GLUT) presentes nas células endoteliais, astrócitos, neurônios, e, possivelmente, outras células no cérebro. A glicose é captada pelos astrócitos sendo posteriormente convertida em glicogênio, através da reação catalisada pela glicogênio sintase, ou a piruvato via glicólise. O piruvato gerado na glicólise pode ser convertido em lactato pela lactato desidrogenase (LDH), ou ainda, pode ser convertido em acetil-coenzima A pela piruvato desidrogenase. A acetil-coenzima A será então metabolizada no ciclo de Krebs. Conforme discutido anteriormente, o α -CG gerado como um intermediário do ciclo de Krebs poderá dar origem ao glutamato através da reação catalisada pela GDH ou por reação de transaminação.

Na reação de transaminação, a aspartato aminotransferase (AST) catalisa a transferência de um grupo amino entre aspartato e α -cetogluturato formando oxalacetato e glutamato, a reação é reversível e seu equilíbrio favorece a formação do aspartato. O aspartato representa uma importante reserva de grupamento amina para a síntese de glutamato. Os neurônios também apresentam uma via metabólica para síntese de glutamato a partir de alanina e α -CG, liberados pelos astrócitos, os quais são convertidos em glutamato e piruvato, em uma reação de transaminação catalisada pela alanina aminotransferase (ALT). Essas reações estão esquematicamente ilustradas na Figura 6 (MARTINEZ-HERNANDEZ *et al.*, 1977; LAAKE *et al.*, 1995; MCKENNA *et al.*, 1996).

Figura 6. Representação esquemática das reações catalisadas pelas transaminases AST e ALT durante o metabolismo dos aminoácidos



O glutamato captado pelo astrócitos pode ser metabolizado por 2 rotas diferentes: i) transformado em glutamina pela ação da glutamina sintetase; ou ii) convertido em α -cetogluturato (α -KG), por desaminação pela glutamato desidrogenase (GDH) ou transaminação por uma aminotransferase. O α -KG será metabolizado através do ciclo de Krebs, produzindo em última instância o lactato. Ambos, lactato e glutamina, são liberados no fluido extracelular.

Fonte: Adaptado de Zigmond *et al.* (1999).

Em neurônios, após sua síntese, o glutamato é armazenado em vesículas sinápticas através de transportadores vesiculares (VGLUTs), que fazem antiporte de glutamato e H⁺. A liberação das vesículas sinápticas contendo o neurotransmissor glutamato ocorre através de potenciais de ação, que invadem o terminal nervoso e iniciam o influxo de Ca²⁺ pré-sináptico por canais de Ca²⁺ dependente de voltagem (CCDV). Estes neurotransmissores se difundem através da fenda

sináptica e iniciam uma resposta no neurônio pós-sináptico ao ligarem-se aos de diversos tipos de receptores glutamatérgicos (LIGUZ-LECZNAK; SKANGIEL-KRAMSKA, 2007; COULTER; EID, 2012).

Os receptores glutamatérgicos são classicamente divididos em duas categorias: receptores ionotrópicos e receptores metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos de glutamato podem ser divididos em dois grupos: os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e os receptores não-NMDA, entre os quais estão incluídos os subtipos α -amino-3-hidroxi-5-metil-4 isozazole-ácido propiônico (AMPA) e cainato (KA) (STEPHENSON, 2006).

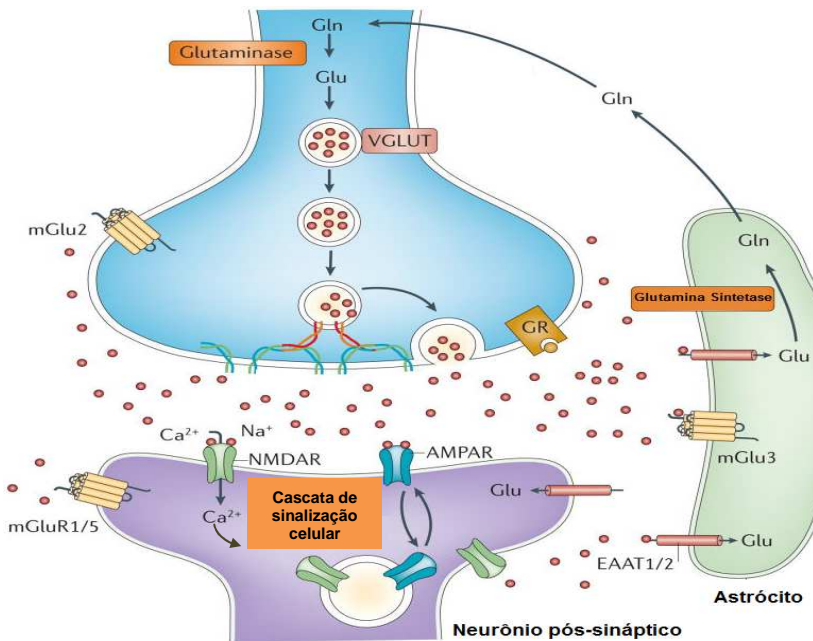
Quanto aos receptores metabotrópicos (mGluRs), são os acoplados à proteína G e conduzem fluxo de íons. Os mGluRs podem ser divididos em três grupos com base nas vias de transdução de sinal que ativam: o grupo I, do qual fazem parte os receptores dos tipos 1 e 5 (mGluR1 e mGluR5); o grupo II, do qual fazem parte os receptores dos tipos 2 e 3 (mGluR2 e mGluR3); e o grupo III, do qual fazem parte os receptores dos tipos 4, 6, 7 e 8 (mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8). (ERICINSKA; SILVER, 1990; VAROQUI *et al.*, 2002; SANACORA, 2008).

O término da ação do glutamato se dá pela sua recaptação através de transportadores de glutamato na membrana plasmática. Sendo estes de dois tipos: os dependentes de sódio e que também transportam aspartato, conhecidos como transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs), sendo subdivididos em cinco tipos (EAAT1 a 5); e os independentes de sódio, como o trocador cistina-glutamato (Xc-) (GETHER *et al.*, 2006).

Por fim o glutamato pode ser reciclado através do ciclo glutamato/glutamina (amidação de glutamato a glutamina pela enzima glutamina sintetase), via metabólica quantitativamente predominante nos astrócitos, como descrito na figura 7 (HANSEN, 2002; SANACORA, 2008; COULTER; EID, 2012).

Embora o glutamato seja o principal neurotransmissor excitatório do SNC de mamíferos, sua concentração deve ser mantida baixa na fenda sináptica, pois a excessiva ativação de seus receptores pode ser tóxica para as células neurais. Este fenômeno é conhecido como excitotoxicidade glutamatérgica e tem sido implicado em diferentes situações agudas (como acidente vascular cerebral, convulsão, trauma) e crônicas (demência vascular, doenças neurodegenerativas, doenças psiquiátricas, entre outras) que levam a comprometimentos da função das células neurais (CHAO *et al.*, 2010).

Figura 7. A sinapse tripartite do glutamato.



O glutamato é sintetizado *de novo* a partir de glicose como de glutamina (Gln) fornecidas por células gliais. O glutamato é, então, embalado em vesículas sinápticas por transportadores de glutamato vesiculares (VGLUT). Proteínas complexas SNARE medeiam à interação e fusão das vesículas com a membrana pré-sináptica. Após a liberação para o espaço extracelular, o glutamato interage com receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA) e metabotrópicos (mGluR) tanto em neurônios pós-sinápticos quanto pré-sinápticos e com células gliais. Após esta interação, os receptores iniciam várias respostas, incluindo a despolarização da membrana, a ativação de cascatas de mensageiros intracelulares, a modulação da síntese local de proteínas e, eventualmente, a expressão de genes (não mostrado). O glutamato é eliminado da sinapse através de transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs) que estão localizados sobre as células gliais vizinhas (EAAT1 e 2) e, em menor grau, em neurônios (EAAT 3-5). Dentro da célula glial, o glutamato é convertido em glutamina, por ação da glutamina sintetase, e esta é subsequentemente liberada através do sistema de transportadores de N e captada por neurônios através de um sistema A de transportadores de aminoácidos para completar o ciclo de glutamato- glutamina. Fonte: POPOLI *et al.*(2011).

2.5.1 Transporte de aminoácidos

Os transportadores de aminoácidos neutros são um grupo de proteínas de membrana que transportam diversos tipos de aminoácidos através da membrana plasmática, favorecendo o fornecimento de substratos para a biossíntese de proteínas e metabolismo de precursores de neurotransmissores e hormônios (ALBERTS *et al.*, 2010). Dividem-se em duas categorias gerais: transporte do tipo uniporte de aminoácidos e o transporte do tipo simporte acoplado ao Na^+ . Neste simporte, o gradiente de Na^+ determina o transporte de aminoácidos através da membrana (ESCOTT; ROSA; LOSS, 2011).

Há quatro principais sistemas de transporte de aminoácidos neutros: (1) o sistema ASC transporta alanina, serina e cisteína; (2) o sistema L que reconhece e transporta aminoácidos de cadeias ramificadas e aminoácidos aromáticos; (3) o sistema N que medeia à captação de glutamina, histidina e aspargina e também é um trocador de hidrogênio (H^+), íon que atua no cotransporte com Na^+ ; e (4) o sistema A que transporta aminoácidos neutros de forma dependente de Na^+ , particularmente alanina, serina e glutamina e é muito similar ao sistema N (REIMER *et al.*, 2000).

Os aminoácidos neutros participam do metabolismo energético e do anabolismo influenciando a função e a sobrevivência neuronal no SNC. Por exemplo, a L-glutamina é uma moeda de energia neuronal importante derivada de astrócitos, L-serina é um elemento crucial para a síntese de esfingolípido neuronal, e L-cisteína é um regulador crítico para os níveis de glutatona neuronais (GLIDDON *et al.*, 2009).

2.6 ACETILCOLINA

A acetilcolina (Ach) é um mediador químico de sinapses no sistema nervoso central (SNC), no sistema nervoso periférico e também na junção neuromuscular. A Ach, seus receptores e o aparato enzimático responsável por sua síntese e degradação constituem o sistema de neurotransmissão colinérgica (DALE *et al.*, 1914).

A Colina-O-Acetil-Transferase (ChAT) é a enzima responsável pela síntese da Ach a partir de acetil-coenzima A e colina. A glicerofosforilcolina, a fosforilcolina e a fosfatidilcolina geram a colina que é utilizada como substrato e transportada para o SNC através da circulação sanguínea. Assim, as fontes de colina para a síntese de Ach provêm da circulação, além da sua recaptação após a liberação e

degradação desse neurotransmissor. Uma vez sintetizada, parte da Ach é transportada e armazenada em vesículas sinápticas. Esse processo é realizado por um transportador vesicular de Ach (VACHT), após ser liberada inteiramente por exocitose, a Ach interage especificamente com os receptores colinérgicos, os quais são classificados como muscarínicos e nicotínicos e estão presentes nas membranas pré- e pós-sinápticas. A ação da acetilcolina cessa quando é hidrolisada em acetato e colina pela enzima acetilcolinesterase (AChE), presente na fenda sináptica (TAYLOR; BROWN, 2006).

O conhecimento desse sistema, principalmente das vias de sinalização intracelular que se iniciam pela ativação dos receptores colinérgicos, tem sido utilizado no desenvolvimento de novos tratamentos para síndromes neurológicas e psiquiátricas. Nessas síndromes, observa-se uma disfunção do sistema de neurotransmissão colinérgica, como transtornos do humor e alguns tipos de esquizofrenia.

2.7 CÁLCIO E SINALIZAÇÃO CELULAR NO SISTEMA NERVOSO

O Ca^{2+} é um segundo mensageiro que tem papel fundamental na regulação de vários processos biológicos. O aumento na concentração de Ca^{2+} citoplasmático representa um passo crucial para a liberação de neurotransmissores e para a modulação da excitabilidade de membranas celulares. Esses processos dependem basicamente da passagem de Ca^{2+} através de canais presentes na membrana plasmática, do seu transporte por bombas iônicas ou da sua liberação a partir das reservas intracelulares (BERRIDGE; BOOTMAN; RODERICK, 2003; CARAFOLI, 2005).

O aumento nos níveis do íon cálcio ocorre via canais de Ca^{2+} , os quais estão divididos em cinco subtipos: dependentes de voltagem, operados por receptores, operados pela proteína G, operados por segundos mensageiros e ativados pela liberação de Ca^{2+} (OPPELT, 2004). A concentração de Ca^{2+} livre no citosol das células é extremamente baixa ($\leq 10^{-7}$ M), enquanto que a concentração no fluido extracelular ($\sim 10^{-3}$ M) e no retículo endoplasmático (RE) é alta. Assim, há um gradiente tendendo para a entrada de Ca^{2+} para o citosol através, tanto da membrana plasmática quanto da membrana do RE. O RE é o principal estoque de cálcio intracelular, enquanto que as mitocôndrias formam e decodificam sinais celulares do Ca^{2+} , liberando este íon (ALBERTS *et al.*, 2002).

Um aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular em dendritos neuronais através de canais NMDA é crucial para o início da formação da plasticidade sináptica e do potencial de longa duração (PASTI *et al.*, 1997). Os astrócitos, embora não possam gerar potenciais de ação, expressam em suas membranas canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, bem como canais operados por ligantes que em conjunto com os receptores metabotrópicos controlam a liberação de Ca^{2+} a partir das reservas intracelulares. Essas células possuem uma grande sensibilidade à liberação neuronal de glutamato, a qual desencadeia sinais de Ca^{2+} nessas células permitindo que haja um sistema de comunicação bidirecional entre neurônios e astrócitos. Desta forma, o glutamato liberado pelos terminais sinápticos pode modular, direta ou indiretamente, a maioria dos canais de cálcio (PARPURA *et al.*, 1994; CARMIGNOTO, 2000).

Por outro lado, o aumento exacerbado nos níveis intracelulares de Ca^{2+} e a excitotoxicidade glutamatérgica são fenômenos muitas vezes associados à indução de estresse oxidativo e a patologias neurodegenerativas e psiquiátricas. Estudos demonstram que o hipotireoidismo congênito leva ao acúmulo de Ca^{2+} intracelular e a excitotoxicidade glutamatérgica; entretanto, o efeito do hipertireoidismo sobre o influxo de Ca^{2+} ainda não foi demonstrado em células neurais.

2.8 VIA DE SINALIZAÇÃO

2.8.1 Glicogênio-Sintase Cinase 3 (GSK3)

O cérebro contém inúmeros tipos de proteínas cinases Ser/Thr que são independentes de segundos mensageiros, como por exemplo, a GSK3. A GSK3 é uma enzima presente em vários sistemas biológicos. A enzima tem duas principais isoformas: alfa (GSK3 α) de 51 KDa, e beta (GSK3 β), de 46 KDa. As isoformas de GSK3 são codificadas por genes diferentes, porém são reguladas de forma semelhante (PAP; COOPER, 1998).

A atividade da GSK3 é regulada pela fosforilação e desfosforilação de resíduos de serina e treonina, em um processo dependente do balanço entre diversas cinases e fosfatases proteicas. A GSK3 é uma enzima constitutivamente ativa, através da fosforilação de resíduos de tirosina 216 (GSK3 β) ou tirosina 279 (GSK3 α). A enzima é inativada pela fosforilação adicional dos resíduos de serina 9 (GSK3 β)

ou do resíduo de serina 21 (GSK3 α) (DOBLE; WOODGETT, 2003; DINIZ, 2011).

A GSK-3 β é a isoforma mais abundante no organismo, altamente expressa no SNC. Inicialmente, se acreditava que a GSK-3 β estava envolvida apenas no metabolismo energético, através da regulação da atividade da enzima glicogênio sintase (GS), passo fundamental no metabolismo do glicogênio intracelular. No entanto, a descoberta de que outras vias de sinalização intracelular, além da via de sinalização da insulina, convergiam sobre a GSK-3 β , como a via da Akt e a via Wnt/beta-catenina e outras proteínas além do glicogênio sintase, eram seus substratos (proteína Tau, β -catenina, CREB), apontando que esta enzima poderia estar envolvida em diversas funções celulares além da regulação do metabolismo energético (ALBERTS *et al.*, 2010; DINIZ, 2011).

Em neurônios, as principais vias de sinalização regulatórias da GSK-3 β são a via Wnt/beta-catenina e a via PI3K/Akt, sendo esta última uma via que estimula a sobrevivência e o crescimento celular. Dessa maneira, a atividade da GSK-3 β influencia direta ou indiretamente, diversas vias de sinalização intracelular que controlam aspectos essenciais do funcionamento neuronal como neuroplasticidade, neurotransmissão, metabolismo celular, crescimento neuronal, polarização e morte neuronal além da neurogênese hipocampal (DINIZ; 2011; ALBERTS *et al.*, 2010).

Estudos também apontam o envolvimento da GSK3 em doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e doença de Huntington e em doenças psiquiátricas, como esquizofrenia e desordem bipolar. Portanto, a atividade da GSK3 parece estar inversamente relacionada à viabilidade neuronal (MOLZ *et al.*, 2011).

2.9 RADICAIS LIVRES E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO

Os radicais livres são definidos como moléculas orgânicas e inorgânicas e átomos que contém um ou mais elétrons desemparelhados na última camada eletrônica, sendo capazes de existir independentemente de outras substâncias. A presença de elétrons não emparelhados geralmente confere alta reatividade a esse átomo ou molécula, além de possuir uma configuração química que a torna instável com tempo de meia-vida curto (HALLIWELL, 1994; BIANCHI; ANTUNES, 1999; HALLWELL; GUITTERIDGE, 2007).

As principais ERO distribuem-se em dois grupos, os radicalares dentre eles, os de maior interesse do ponto de vista biológico estão o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($\cdot OH$), radical peróxil (ROO^{\cdot}) e radical alcóxil (RO^{\cdot}); e os não radicalares, sendo eles: o oxigênio singlete (1O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e ácido hipoloroso (HOCL). Dentre as ERN incluem-se o óxido nítrico ($\cdot NO$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos ($ONOO^{\cdot}$) (SÁNCHEZ, 2012).

As ERO podem ser produzidas por fontes exógenas, pelos xenobióticos como os agrotóxicos, medicamentos, tabagismo, raios X, radiação ultravioleta, entre outros, ou por fontes endógenas (HALLIWEL, 1994). No entanto, elas podem ser geradas principalmente como consequência do metabolismo celular oxidativo, ou seja, através da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (ZWART *et al.*, 1999). Além disso, a degradação de ácidos graxos nos peroxissomas, os mecanismos de detoxificação mediados pelo complexo enzimático citocromo P-450, o processo de fagocitose e a oxidação de pequenas moléculas como hidroquinonas, ferredoxinas reduzidas e catecolaminas, são igualmente fontes de ERO (BLOKHINA *et al.*, 2003; FRIDOVICH, 1998; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

2.9.1 Mecanismos de geração de radicais livres

A mitocôndria é uma fonte importante de produção de ERO na maioria das células dos mamíferos. Aproximadamente 85 a 90% do oxigênio (O_2) são utilizados pela mitocôndria através da cadeia transportadora de elétrons, também chamada de cadeia respiratória. Os 10 a 15% restantes são utilizados por diversas enzimas oxidases, oxigenases e por reações químicas de oxidação diretas (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

Diferentes componentes da cadeia respiratória podem transformar O_2 em radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) quando reduzidos. Na cadeia respiratória quando plenamente em funcionamento, isso ocorre com aproximadamente 0,01 a 1% do oxigênio consumido dependendo das condições fisiológicas e dos substratos (KOWAHOWSKI, 2004). Na parte terminal da cadeia transportadora, a enzima citocromo oxidase remove um elétron de cada uma das quatro moléculas reduzidas de citocromo c, oxidando-as, e adiciona os quatro elétrons ao O_2 para formar água (Figura 8). Os 2 a 5% restantes são reduzidos

univalentemente em metabólitos denominados espécies reativas de oxigênio (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

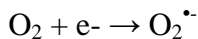
Figura 8. Primeira reação para a geração de ERO. Redução tetravalente de oxigênio



Fonte: Adaptado de Schneider; Oliveira, 2004.

A conversão univalente do oxigênio à água ocorre em uma cascata de eventos bioquímicos, sendo iniciada pela formação do radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$) através da adição de um elétron a uma molécula de oxigênio (Figura 9). Este radical possui meia vida mais longa que a hidroxila, 1×10^{-6} segundos, sendo capaz de reagir com as moléculas por mais tempo. O seu poder deletério está em gerar radicais secundários como o radical $\bullet\text{OH}$, ou ainda reagir com $\bullet\text{NO}$ e gerar ONOO (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Figura 9. Segunda reação da formação de ERO.



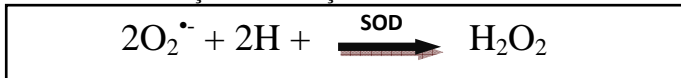
Fonte: Adaptado de Schneider; Oliveira, 2004.

O $\text{O}_2^{\bullet -}$ originado pela cadeia transportadora de elétrons pode ser gerado pela NADH desidrogenase, pela coenzima Q ou, possivelmente, por desidrogenases matriciais. O citocromo c oxidase é o lugar onde é realizada a transferência de elétrons para o oxigênio. Contudo, a liberação de $\text{O}_2^{\bullet -}$ pelo citocromo oxidado é relativamente baixa, pois este se liga fortemente aos intermediários do oxigênio parcialmente reduzidos, impedindo seu desligamento antes da redução completa a H_2O (TURRENS, 1997; STARKOV; FISKUM, 2002; KOWAHOWSKI, 2004).

Em sequência, o superóxido recebe um elétron e dois íons hidrogênio e forma H_2O_2 pelo processo de dismutação, cuja reação é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) (Figura 10). O H_2O_2 é pouco reativo frente às moléculas orgânicas na ausência de metais de transição. No entanto, exerce papel importante no estresse oxidativo por ser capaz de transpor as membranas celulares facilmente e

gerar o radical hidroxila (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004; BARREIROS; DAVID, 2006).

Figura 10. Terceira reação da formação de ROS.

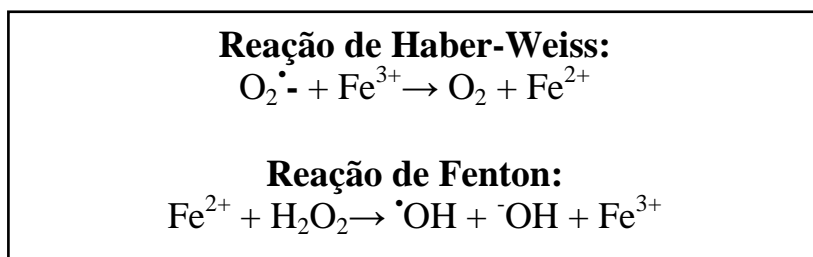


Fonte: Adaptado de Schneider; Oliveira (2004).

Quando o peróxido de hidrogênio recebe mais um elétron e um íon hidrogênio, forma-se o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$). Este radical é formado principalmente pela reação com metais de transição. Os metais de transição mais importantes para a ocorrência dessas reações são o Fe^{2+} e o Cu^+ que são denominadas como reações de Haber-Weiss e Fenton (Figura 11) (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004; BARREIROS; DAVID, 2006).

O radical hidroxila é o mais deletério ao organismo, pois possui meia-vida muito curta e dificilmente pode ser sequestrado. Frequentemente atacam moléculas por abstração de hidrogênio e por adição de insaturações. O $\bullet\text{OH}$ causa danos ao DNA, RNA, às proteínas, lipídios e membranas celulares do núcleo e mitocondrial (BARREIROS; DAVID, 2006).

Figura 11. Representação da formação de $\bullet\text{OH}$ através das reações de Haber-Weiss/ Fenton.



Fonte: Adaptado de Halliwell; Gutteridge (2007).

2.9.2 Lipoperoxidação

A lipoperoxidação (LPO) pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultantes da ação de radicais livres sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares, levando à destruição de

sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e morte celular (HALIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Nos sistemas biológicos a LPO pode ocorrer principalmente por duas vias: uma via enzimática envolvendo as ciclooxigenases e lipoxigenases na oxidação de ácidos graxos poliinsaturados e a segunda via é a peroxidação não enzimática, que envolve a participação de ERO e ERN, metais de transição e outros radicais livres (HALIWELL, 1987).

O processo de peroxidação não enzimática está dividido em três fases: iniciação, propagação, e terminação ou degradação. É iniciado quando o $\bullet\text{OH}$ captura um átomo de hidrogênio do carbono metileno na cadeia do ácido graxo, que se torna radical alquil ($\text{L}\bullet$), e este, na presença de O_2 , gera radical peroxil ($\text{LOO}\bullet$), que é muito instável e captura um átomo de hidrogênio da molécula de ácido graxo adjacente (reação de propagação da peroxidação lipídica). Durante este processo, estas moléculas são decompostas em aldeídos, e o principal deles é o malondialdeído (MDA), altamente tóxico e, o 4-hidroxi-2-trans-nonenal (HNE), esses compostos reativos podem atacar grupamentos amino de proteínas e fosfolipídios, modificando moléculas biológicas. Os aldeídos formados pela peroxidação podem ainda interagir com o DNA. (SIES, 1999; HALIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Muitos estudos têm mostrado a associação entre o aumento do estresse oxidativo e a LPO com o surgimento de doenças. Além do mais a oxidações aos lipídios pelas ERO constituem a base da formação da placa de aterosclerose. Inúmeras patologias como diabetes, hiperlipidemia, apoplexia, doenças hepáticas, cardiovasculares, neurodegenerativas, entre outras, mostram níveis aumentados de lipoperoxidação (HALIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

2.9.3 Estresse Oxidativo

O desequilíbrio entre os mecanismos oxidativos e as defesas antioxidantes celulares resultam no estresse oxidativo (HALIWELL; WHITEMAN, 2004; JUNQUEIRA, 2004). Esse desequilíbrio pode ser ocasionado por diversos fatores que levam ao acúmulo intracelular de compostos reativos ao oxigênio e ao nitrogênio, principalmente das espécies reativas de oxigênio (ERO). Como consequência, há um desequilíbrio entre o sistema redox, devido ao excesso de ERO, à depleção de antioxidantes (AOX) ou de ambos (ECHTAY, 2007; MATSUZAWA-NAGATA, 2008).

Os danos oxidativos têm sido relacionados com uma série de estados fisiopatológicos como no processo de envelhecimento e, com a etiologia de doenças como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, aterosclerose, artrite reumatóide, inflamação crônica, hipertensão, degeneração macular, Parkinson e Alzheimer. Frente a essas condições os organismos possuem um sistema de defesa antioxidante, que tem como função a inibição ou a redução dos danos causados as células pela ação das ERO e ERN. (YUN-ZHONG *et al.*, 2002; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

2.10 DEFESAS ANTIOXIDANTES

Os antioxidantes são moléculas que têm a habilidade de remover radicais livres de um sistema, seja freando a reação de oxidação, ou pela reação com os agentes oxidantes, produzindo compostos menos ofensivos (BRITTON, 1995). De maneira geral, o sistema de defesa antioxidante da célula pode ser enzimático ou não enzimático.

Os antioxidantes primários são os que previnem a formação de novas ERO através da conversão dessas espécies reativas em moléculas menos prejudiciais antes que elas possam reagir. Destacam-se neste grupo as enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GPx), bem como as proteínas de união a metais, como a ferritina. Os antioxidantes secundários capturam os radicais e evitam as reações em cadeia, são exemplos as vitaminas E e C, os β -carotenos, o ácido úrico, a glutatona, dentre outros. Os antioxidantes terciários são encarregados da reparação das biomoléculas que sofreram danos, são inclusas as enzimas reparadoras do DNA e a metionina sulfóxido redutase.

2.10.1 Antioxidantes Enzimáticos

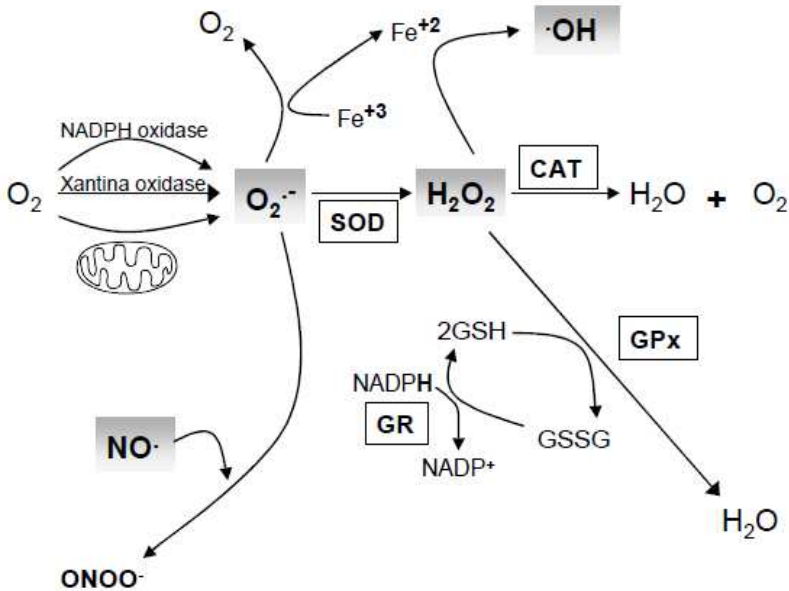
Dentre as principais enzimas antioxidantes destacam-se a SOD, a catalase (CAT) e a GPx (Figura 12). Através delas, as células podem manter baixas as quantidades do radical ânion superóxido e de peróxido de hidrogênio, evitando a formação do radical hidroxila.

- *Superóxido dismutase*: As superóxidos dismutases são um grupo de metaloenzimas que catalisam a dismutação do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) em oxigênio e peróxido de hidrogênio (VASCONCELOS *et al.*, 2007; SÁNCHEZ, 2012).

- *Catalase* (CAT): É uma metaloproteína tetramérica que contém o grupo heme no sítio ativo, sua função é degradar o H_2O_2 formando

água e oxigênio molecular. Está localizada nos peroxissomos e na matriz mitocondrial; entretanto, nos eritrócitos esta enzima encontra-se no citoplasma. Seu papel antioxidante consiste em diminuir o risco da formação do radical hidroxila a partir do H_2O_2 via reação de Fenton. (SÁNCHEZ, 2012).

Figura 12. Esquema das defesas antioxidantes, mostrando a geração de espécies reativas.



Antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), glutatona reduzida (GSH), glutatona redutase (GR).
Espécies reativas: radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($\cdot OH$), óxido nítrico ($NO\cdot$), peroxinitrito ($ONOO^-$).
Fonte: Adaptado de GRIENGLING; FITZGERALD, 2003.

-Glutaciona peroxidase (GPx) e Glutaciona Redutase (GR): A família das GPxs são enzimas dependentes de selênio (Se). Elas contêm um átomo de selênio unido a um resíduo de cisteína (selenocisteína) no sítio ativo. Sua atividade consiste em reduzir o H_2O_2 usando a glutatona reduzida (GSH) como cofator. Existem 5 isoformas da GPx sendo elas: GPx1 encontrada no citosol e na mitocôndria, GPx2 no trato gastrointestinal, GPx3 nos rins, GPx4 específica para hidroperóxidos

derivados de fosfolipídios, GPx5 expressa no epidídimo de ratos e é independente de selênio (SÁNCHEZ, 2012).

Os mecanismos de atuação da GPx levam a glutatona reduzida (GSH) a glutatona oxidada (GSSG) e para evitar a depleção da GSH e aumento da GSSG, a glutatona redutase (GR) reduz a GSSG as custas de NADPH, regenerando a GSH e mantendo o estado redox da célula. A enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) fornece os equivalentes redutores (NADPH) para regeneração de GSSG em GSH.

A GPx tem maior afinidade pelo H_2O_2 quando este encontra-se em concentrações relativamente baixas. Ou seja, nessas condições a GPx é mais ativa que a catalase (SÁNCHEZ, 2012).

- *Gama-Glutamiltransferase* (GGT): A GGT é uma enzima ligada à membrana plasmática, amplamente distribuída nos tecidos dos mamíferos, cuja função primária é metabolizar GSH extracelular. A enzima cataliza a remoção do resíduo gama-glutamil da GSH, o qual pode ser transferido para outros aminoácidos ou aceptores peptídicos. Assim, os aminoácidos provenientes da GSH podem ser reciclados e reutilizados na síntese *de novo* de GSH (MAÇÃO, 2006).

2.10.2 Antioxidantes não enzimáticos

Antioxidantes não enzimáticos são micromoléculas que provêm ou não do próprio organismo, que têm por função protegê-lo das ações deletérias das ERO e ERN. Entre os principais antioxidantes não enzimáticos endógenos estão a glutatona, ácido úrico e estradiol, como antioxidantes exógenos existem as vitaminas E, C, e A, os carotenoides, os polifenóis, dentre outros. (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 2007; SILVA; GUERRA, 2012).

- *Glutatona reduzida*: A GSH, L- γ - glutamil- L-cisteinilglicina, é um tripeptídeo formado por glutamato, cisteína e glicina, sendo o principal tiol intracelular de baixo peso molecular. Está presente na maioria das células em concentrações relativamente altas, em torno de 0,4 a 12 mM (HUBER *et al.*, 2008).

O núcleo do resíduo cisteinilglicina da GSH está envolvido na sua função como antioxidante, mais especificamente como um redutor intracelular, sendo capaz, de reagir com um elétron não pareado de um radical livre, formando um radical GS^\bullet , que produz, por dimerização, o GSSG (glutatona oxidada). O GSSG é então reduzido pela glutatona redutase, regenerando o GSH, em um processo às custas de NADPH. A glutatona redutase, que regenera o GSH tem o NADPH como substrato

e, a disponibilidade limitada de NADPH pode levar a aumento do GSSG e deixar as células mais sensíveis ao dano oxidativo (JORDÃO *et al.*, 1998; SÁNCHEZ, 2012).

Outra função da GSH envolve a regeneração da vitamina E oxidada e consequente proteção frente à peroxidação lipídica. Quanto ao seu papel contra a peroxidação lipídica, a GSH é usada como substrato pela glutatona peroxidase, na eliminação de peróxidos e também reduz a forma oxidada da vitamina C, que pode atuar, mantendo a vitamina E na sua forma reduzida e funcional. Além disso, a GSH pode através da glutatona-S- transferase, detoxificar aldeídos reativos, como o malondialdeído (GUERRA; 2012).

Em síntese a GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes na defesa das células contra o estresse oxidativo além de possuir um papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos. A alteração nos níveis da GSH afeta diretamente a síntese de proteínas e de DNA (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

2.11 HIPERTIREODISMO E ESTRESSE OXIDATIVO

Inúmeros estudos clínicos e experimentais em modelos animais apontam que o estresse oxidativo é um importante elemento de muitas patologias, nas mudanças dos processos patológicos e de processos fisiológicos em tecidos envelhecidos (SLATER, 1985; ANDRYSKOWSKI; OWCZAREK, 2007).

A aceleração do metabolismo basal e energético representa uma das mais importantes ações dos HT (VENDITTI; DI MEO, 2006). Alguns autores sugerem que o hipertireoidismo está associado à produção de radicais livres e com o aumento dos níveis da LPO. Nesse contexto, o hipertireoidismo aumentaria a geração de ERO e produziria mudanças no sistema antioxidante em vários tecidos (FERNANDEZ, *et al.*, 1985; ASAYAMA *et al.*, 1987; ASLAN *et al.*, 2011).

Segundo Pasquini e Adamo (1994), os animais hipertireoideos parecem ter vida útil mais curta e, na idade avançada, apresentam deficiência de mielina. Essas mudanças poderiam ser ocasionadas devido aos danos produzidos pelo estresse oxidativo gerado por excesso de HT.

A capacidade total de peroxidação da mitocôndria é influenciada pelo estado da tireoide. As variações dos níveis hormonais modulam o estresse oxidativo celular *in vivo*, principalmente, devido a sua ação sobre a mitocôndria (GUERRERO *et al.*, 1999). Desta forma, há

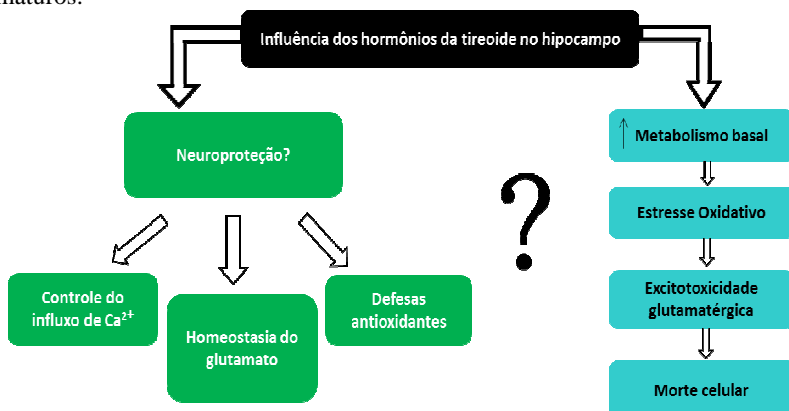
influência sobre a função mitocondrial, estimulando o consumo de oxigênio e a fosforilação oxidativa, torna essa organela um dos principais locais de produção das ERO, por ação dos HT (SAWYER *et al.*, 2002).

Em síntese, o estresse oxidativo pode ser modulado de acordo com as concentrações séricas dos HT, e o hipertireoidismo poderia aumentar a LPO e influenciar nas concentrações e atividade das moléculas antioxidantes (NIWA *et al.*, 2003).

3. HIPÓTESE

O hipertireoidismo está classicamente associado ao aumento no metabolismo basal e estresse oxidativo em diversos tecidos, sugerindo que esta disfunção tireoidiana possa causar danos ao SNC. Paradoxalmente, a terapia com HT mostrou-se eficaz no tratamento de pacientes com demência não Alzheimer (VILLANUEVA; SÁNCHEZ; ROSADO, 2013). Neste sentido, ainda há inúmeras controvérsias quanto ao papel neurotóxico e/ou neuroprotetor dos HT. Sendo assim, neste estudo pretendemos demonstrar que o hipertireoidismo induzido por T₃ pode modular o sistema glutamatérgico, o influxo de cálcio, a captação e o metabolismo de aminoácidos, bem como o sistema de defesas antioxidantes em hipocampo de ratos durante o desenvolvimento. A figura 13 apresenta os possíveis alvos do hipertireoidismo sobre as células hipocampais.

Figura 13. Possíveis influências do hipertireoidismo sobre o hipocampo de ratos imaturos.



Considerando-se que os HT classicamente aceleram a taxa de metabolismo basal, o hipertireoidismo pode induzir estresse oxidativo e este fenômeno pode estar associado à excitotoxicidade glutamatérgica e à morte celular. Por outro lado, os efeitos protetores desses hormônios também têm sido descritos. Nossa hipótese propõe que o hipertireoidismo induzido com T₃ possa desencadear tanto efeitos neuroprotetores quanto neurotóxicos em hipocampo de ratos.

Fonte: do Autor

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

Os hormônios L-tiroxina (T_4) e 3,5,3'-triiodo-L-tironina (T_3) e os reagentes referentes às análises de biomarcadores de estresse oxidativo foram adquiridos da Sigma Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, EUA). As substâncias radiotivas ($[^{14}C]$ MeAIB) (sp.act. 1.85 GBq/mmol), $[^{45}Ca]CaCl_2$ (sp. act. 321 KBq/mg Ca^{2+}) foram obtidos da Du Pont NEN Products, Boston, USA e o líquido de cintilação biodegradável Optiphase Hisafe III foi adquirido da Perkin Elmer São Paulo-SP, Brasil. Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.2 ANIMAIS

Ratos machos (linhagem Wistar) de 7 dias de idade, acompanhados pela mãe, foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas e submetidos a um ciclo claro/escuro (12/12 horas), em sala climatizada com temperatura controlada, ração e água à vontade. Todos os animais foram monitorados e mantidos conforme as recomendações do Conselho de Medicina Veterinária (CMV) e do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), protocolos PP00318/CEUA/UFSC e PP00820/CEUA/UFSC.

4.3 TRATAMENTO *IN VIVO*

O hipertireoidismo foi induzido através de injeções intraperitoneais de 80 μ g T_3 / Kg de peso corporal durante 7 dias consecutivos a partir do oitavo dia pós-natal (ZAMONER *et al.*, 2007; 2008). Os animais foram utilizados ao completar 15 dias de idade. Após a decapitação, o sangue foi coletado e o hipocampo foi rapidamente removido, dissecado e fatiado.

4.4 CAPTAÇÃO DE $[^{14}C]$ -GLUTAMATO

As fatias de hipocampo foram pré-incubadas por 15 minutos a 37°C, em solução salina balanceada de Hanks (HBSS = $CaCl_2$ 1,29mM, NaCl 136,9mM, KCl 5,36mM, $MgSO_4$ 0,65mM, Na_2HPO_4 0,27mM,

KH₂PO₄ 1,1mM, D-glicose 2mM e Hepes 5mM). A captação teve início com a adição de 0,2 μ Ci [¹⁴C]-glutamato. As fatias permaneciam por 10 minutos nesse meio de captação. A incubação foi interrompida com a retirada do meio de captação e lavagem por duas vezes com 1 ml de HBSS gelado. 300 μ L de uma solução de NaOH 0,1 M/SDS 0,01% foram adicionados para solubilização das fatias. Após a completa solubilização, foi determinado o conteúdo intracelular de glutamato pela avaliação de cintilação líquida. A captação de glutamato foi corrigida para a união não-específica em ensaios realizados na ausência de íons sódio, sendo este sal substituído por cloreto de colina. Os resultados foram expressos como nmol¹⁴C- glutamato/ μ g proteína/min.

4.5 CAPTAÇÃO DE ⁴⁵Ca²⁺

As fatias de hipocampo de ratos de 15 dias de idade foram pré-incubados em tampão KRb (NaCl 122 mM; KCl 3 mM; MgSO₄ 1,2 mM; CaCl₂ 1,3 mM; KH₂PO₄ 0,4 mM; NaHCO₃ 25 mM) por 15 min a 34 °C, pH 7,4, em banho metabólico sob agitação e atmosfera carbogênica (O₂:CO₂, 95:5 v/v). Após, o meio foi trocado por KRb fresco com 0,1 μ Ci/mL ⁴⁵Ca²⁺ e o tecido incubado durante 30 minutos. Posteriormente, o ⁴⁵Ca²⁺ extracelular foi totalmente lavado com uma solução de cloreto de lantânio (127,5 mM NaCl, 4,6 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄, 10 mM HEPES, 11 mM Glicose, 10 mM LaCl₃), pH 7,3 a 2°C, interrompendo o fluxo de cálcio na preparação. Após 30 min, a solução de cloreto de lantânio foi removida e 250 μ L de NaOH 0,5 M foram adicionados a cada amostra. Alíquotas de 100 μ L deste 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), e uma alíquota de 5 μ L foi usada para a dosagem de proteínas pelo método de Lowry e colaboradores (1951). Os resultados foram expressos como pmol ⁴⁵Ca²⁺/ μ g de proteína (ZAMONER *et al.*, 2007).

4.6 CAPTAÇÃO DE [¹⁴C]-DESOXIGLICOSE

Fatias do hipocampo foram pré-incubadas em tampão KRb pH 7,4 por 15 min para estabilização. O tecido foi incubado por 30 min em KRb fresco contendo D-glicose 2mM e [¹⁴C]-deoxiglicose 0,2 μ Ci/mL. Posteriormente, o meio de incubação foi retirado e o tecido lavado por 3

vezes com tampão KRb fresco, e lisado em solução NaOH 0,5 M. Alíquotas de 100 μL deste 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), e uma alíquota de 5 μL foi usada para a dosagem de proteínas pelo método de Lowry e colaboradores (1951). Os resultados foram expressos como pmol ^{14}C -desoxiglicose/mL/mgproteína (ZAMONER *et al.*, 2007).

4.7 ACÚMULO DE AMINOÁCIDOS NEUTROS

Fatias de hipocampo foram pré-incubados em solução tampão KRB (NaCl 122 mM; KCl 3 mM; MgSO_4 1,2 mM; CaCl_2 1,3 mM; KH_2PO_4 0,4 mM; NaHCO_3 25 mM) durante 15 minutos em um incubador metabólico Dubnoff a 37 °C, pH 7,4 e gaseificada com uma mistura contendo $\text{O}_2:\text{CO}_2$ (95:5, v/v). As fatias de hipocampo foram incubadas na presença de ^{14}C -MeAIB (3,7 kBq/ml) durante 1 hora (SILVA *et al.*, 2001). Alíquotas de 40 μl de tecido e meio externo foram colocados em líquido de cintilação e contadas em espectrômetro de cintilação Beckman beta líquido (modelo LS 6500; Multi-Purpose Scintillation Counter-Beckman Coulter, Boston, USA) para medições de radioatividade. Os resultados foram expressos como o tecido/meio/mg proteína/mL (SILVA *et al.*, 2001).

4.8 CONTEÚDO DE GSH

Para determinar o conteúdo de GSH, os hipocampus foram pesados e posteriormente homogeneizados com solução de ácido tricloroacético 12%, (TCA 12%) na proporção de 1:10 (p/v). As determinações foram realizadas com o sobrenadante após a centrifugação do homogeneizado. Todas as análises foram realizadas em duplicata, e mantidas em gelo durante todo o ensaio. Os níveis de glutatona foram determinados segundo o método descrito por Beutler *et al.* (1963), que é baseado na reação da GSH com DTNB (5,5'-Dithiobis (ácido 2-nitrobenzóico) formando um ânion conjugado, TNB (ácido tionitrobenzóico) de cor amarelada, que é mensurável em 412 nm. Para a realização da técnica, uma alíquota de 50 μL da amostra foi acrescentada na cubeta contendo 950 μL de Tampão Fosfato 0,2 M pH 8,0, seguida da adição de 100 μL de DTNB 2,5 mM. Após cerca de 2 min obtem-se a máxima formação de TNB, que foi medido

espectrofotometricamente. Os resultados foram expressos como conteúdo de GSH $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$.

4.9 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

4.9.1 Atividade da gama-glutamil transferase

Os hipocampos foram homogeneizados em 300 μL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5. A atividade enzimática da gama-glutamilttransferase (GGT) foi realizada através da seguinte reação: o grupo glutamil, da gama-glutamil-p-nitroanilida (substrato) é transferido pela GGT para a glicilglicina (aceptor), com liberação de p-Nitroanilina, a qual é diazotada, gerando um composto final de cor rósea com uma absorvância que pode ser medida num comprimento de onda de 530 nm. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry e colaboradores (1951). Os resultados da atividade da GGT foram expressos como U/L/ μg proteína.

4.9.2 Glutamina Sintetase

Fatias de hipocampo foram homogeneizadas em 150 μL de tampão de lise (Imidazol 20 mM; KCl 150 mM; EDTA 0,1 mM – pH 6,8), em seguida as amostras foram centrifugados a 1000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi separado. 50 μL deste sobrenadante foi adicionado em 100 μL de imidazol-HCl 80 mM, pH 7,0 (imidazol-HCl 80 mM, glutamina 30 mM, MnCl_2 3 mM, hidroxilamina-HCl 30 mM, arseniato de sódio 20 mM, ADP 4 mM). Após 30 minutos de incubação a 37°C a reação foi interrompida por adição de 200 μL de uma mistura contendo FeCl_3 3,7 mM; Ácido tricloroacético 1,2 M; HCl 10 M e água. 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. A atividade enzimática foi expressa como mM hidroxamato/mg proteína (SHAPIRO; STADTMAN, 1970; STADTMAN *et al.*, 1970; COSTA *et al.*, 2012).

4.9.3 Atividade das enzimas ALT e AST

Os hipocampos foram homogeneizados em 300 μl de tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 7,4 e a concentração de proteínas foi determinada

pelo método de Lowry *et al.* (1951). As atividades das enzimas AST e ALT foram determinadas através de reações colorimétricas.

Na reação, a alanina aminotransferase (ALT/TGP) catalisa 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. Tanto o piruvato quanto o oxaloacetato 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.

4.9.4 Atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase

Para este ensaio o hipocampo foi homogeneizado em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4. Posteriormente a atividade da G6PD foi determinada através da reação com a presença do NAD⁺, que catalisa a oxidação da G6P a 6-fosfogliconato. O NADPH produzido foi medido colorimetricamente em modo cinético, corrigindo para atividade enzimática de acordo com a concentração de proteína. Resultados foram expressos como U/ μ g proteína.

4.9.5 Atividade da Colinesterase

Os hipocampos foram homogeneizados em 300 μ l de tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 7,4 e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry *et al.*, (1951).

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.

4.10 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Para a determinação dos níveis dos marcadores de danos oxidativos (TBARS e proteína carbonilada - PC), assim como da atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD, GPx, GR e GST, o hipocampo foi pesado e homogeneizado com uma solução contendo tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4; 0,1% Triton e NaCl 150 mM, (1:20 p/v), e uma alíquota foi usada para a dosagem de proteínas pelo método de Lowry *et al.*, (1951). As determinações enzimáticas foram realizadas usando-se o sobrenadante após centrifugação do homogeneizado (5.000 x g por 5 min).

4.10.1 Catalase

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 µL da amostra, em seguida realizou-se leitura da queda da absorbância em 240 nm durante 30 segundos. Os valores foram expressos em $\text{mmol.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

4.10.2 Glutathione peroxidase

Para a análise enzimática de GPx o método de Flohé e Gunzler (1984) foi utilizado, no qual a reação é baseada na redução de tert-butilhidroperóxido (t-BuOOH) pela oxidação de GSH e formação de GSSG, catalisada pela GPx, e conseqüente 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 µL de t-BuOOH e 10 µL de amostra em 1 mL de um meio de reação na cubeta. Os valores foram expressos em $\mu\text{mol.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

4.10.3 Glutathione reductase

A GR foi determinada pelo método de Calberg e Mannervick (1985), o qual verificou 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 glutatona oxidada e DPTA 5 mM foi adicionado na cubeta (0,95mL), e a adição de 50µL de amostra deu início a reação que foi monitorada durante 3 minutos, gerando uma curva descendente. Os valores da atividade desta enzima foram expressos em $\mu\text{mol.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

4.11 DETERMINAÇÃO DOS MARCADORES DE DANOS OXIDATIVO

4.11.1 Lipoperoxidação tecidual – TBARS

A avaliação do dano oxidativo lipídico foi realizada no homogenato 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; DRAPER, 1984). O método consiste na precipitação da amostra (100 µL) com 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 12%, seguido da incubação em 900 µL 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 obtidos foram expressos em nmol MDA.g^{-1} .

4.11.2 Proteína carbonilada

Dano oxidativo a proteínas por carbonilação foi determinado pelo método descrito por Levine e colaboradores (1990). Inicialmente foram adicionados 100 µL da amostra em 600 µL de DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina) 10 Mm preparado em solução de HCl 2 N, seguido de uma incubação durante 1 hora à temperatura ambiente protegido da luz, com agitação contínua. Após, foi adicionado 600 µL de TCA 20 %, com agitação e banho de gelo durante 10 min, seguido de centrifugação (5 min a 10.000 x g), e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi lavado por três vezes consecutivas (centrifugação por 5 min a 10.000 x g), com 800 µL de etanol-acetato de etila (1:1 v/v). Finalmente, o excesso de etanol-acetato de etila foi retirado com auxílio de um cotonete e foram adicionados 900 µL de guanidina 6,0 M preparada em

solução de KH_2PO_4 20 Mm, seguido de incubação em banho-maria a 37 °C com agitação contínua por 60 min, para posteriormente proceder à leitura a 360 nm. A concentração de proteína carbonilada foi expressa em nmol.mg^{-1} proteína.

4.12 NÍVEIS DA PROTEÍNA GSK-3 β TOTAL E FOSFORILADA

Para investigar o envolvimento das vias de sinalização no hipocampo de ratos hipertireoideos foram realizados ensaios de imunodeteção utilizando anticorpos específicos para a forma total e fosforilada da GSK-3 β . Fatias de hipocampo foram lisadas e homogeneizadas em tampão contendo 2 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS e a concentração de proteínas foi determinada (LOWRY et al., 1951). Quantidades iguais de proteína foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e analisadas por SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de nitrocelulose em tampão de transferência (Trizma 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20% e SDS 0,25%) (60 min). As membranas de nitrocelulose foram lavadas, seguida por uma incubação de 2h em solução de bloqueio (TBS; NaCl 0,5M, Trizma 20 mM e leite em pó desnatado 5%). Após a incubação, as membranas foram lavadas e então incubadas durante a noite (18h) a 4°C com anticorpo primário (anti-GSK3 β ou anti-fosfo-GSK3 β , diluídos 1:2000). Após a incubação com os anticorpos, as membranas foram lavadas e incubadas por 2 horas com o anticorpo secundário (anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase, diluído 1:2000) para posterior revelação. O blot foi revelado (ImmobilonTM Western chemiluminescence HRP substrate kit), as autoradiografias foram quantificados com scanner Hewlett-Packard Scanjet 6100C e a densidade óptica foi determinada com o programa OptiQuant versão 02.00 da Packard Instrument Company.

4.13 PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS

Os animais controles e hipertireoideos foram anestesiados com xilazina (0,1 mL/100 g de peso corporal, IM) e cetamina (0,1 mL/100 g de peso corporal, IM) e perfundidos com tampão fosfato (PBS) contendo heparina (50 mL/ratos), seguido por paraformaldeído a 4% diluído em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) a 4°C. A taxa de perfusão foi de aproximadamente 100 mL/animal. Após a perfusão, o cérebro foi extraído a partir do crânio, pesado e colocado na mesma solução de

fixação durante 12 h. Após a fixação, os cérebros foram lavados durante 1 hora em água, desidratados em concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 90%, 95% e etanol absoluto) e afastado com xilol. Os cérebros foram incluídos em resina paraplástica (Histosec). Cortes seriados coronais (5 μ M de espessura) foram obtidos com micrótomo e serialmente coletados em laminas gelatinizadas. O tecido foi corado em violeta de cresil, e em seguida, as seções foram desidratadas através de uma série de álcool, clareadas com xileno e Entellan. As camadas de CA1, CA2, CA3, CA4 e células do giro denteado foram identificadas de acordo com um atlas do cérebro de ratos (PAXINOS; WATSON, 2008).

4.13.1 Imunohistoquímica para GFAP em hipocampo de ratos imaturos

Os animais dos grupos controles e hiperteróides foram anestesiados com xilazina (0,1 mL/100 g de peso corporal, IM) e cetamina (0,1 mL/100 g de peso corporal, IM) e perfundidos com 100 mL de PBS com heparina seguido por paraformaldeído a 4% diluído em 0,1 M de fosfato de Buffer (pH 7,4) a 4 °C com a mesma taxa de fluxo e volume total. Após a perfusão, o cérebro foi extraído a partir do crânio e colocado na solução de fixação durante 8 h. Após a fixação, o cérebro foi crioprecipitado com a solução de sacarose PBS 15% até que a amostra estivesse saturada, seguida pela imersão em uma solução de PBS 30% de sacarose. As amostras foram então refrigeradas com isopentano, e cortes coronais seriados (5 μ m de espessura) do hipocampo foram obtidos utilizando um criostato, e para referência anatômica, o atlas do cérebro de ratos (PAXINOS; WATSON, 2008). Os cortes foram coletados em solução PBS a cada 50 μ m. O tecido foi processado para imunohistoquímica de GFAP usando o anticorpo peroxidase anti-peroxidase (PAP). Para esse procedimento, os cortes flutuantes livres foram tratados com 10 % de metanol e 3 % de H₂O₂ durante 30 minutos e lavados cuidadosamente. Em seguida, as seções foram pré-incubadas em 3 % de soro de cabra (NGS) em PBS contendo 0,3 % de Triton X-100 (PBS-Tx) durante 30 minutos e incubadas com anticorpo policlonal de coelho para GFAP (Sigma Chemical Co) diluído 1:150 em 3 % NGS em PBS-Tx, durante 48 h a 4° C. Depois de lavar várias vezes com PBS-Tx, os cortes foram incubados numa solução de anti-IgG de coelho diluído a 1:50 em PBS-Tx, a temperatura ambiente durante 2 h. As amostras foram lavadas em PBS e incubadas com o anticorpo PAP diluído 1:500 em PBS durante 2 horas à temperatura

ambiente. A reação da imunohistoquímica foi realizada por incubação das amostras no meio de histoquímica contendo 0,06% de 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma Chemical Co.) dissolvida em PBS durante 10 minutos e, em seguida, em uma solução semelhante contendo 1 μM de 3 % de H_2O_2 por cada mL de DAB durante 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram lavadas em PBS, desidratadas em etanol e clareadas com xileno. Para montagem das lâminas, as mesmas foram cobertas com Entellan e lamínulas. Para controle da reação imunológica, as amostras foram preparadas omitindo o anticorpo primário e substituindo-o com PBS (RASIA; FILHO *et al.*, 2002; WINKELMANN -DUARTE *et al.*, 2007).

4.13.1.1 Densidade óptica para a imunorreatividade da GFAP nas subregiões do hipocampo

A intensidade do produto de reação imunohistoquímica de GFAP foi medida por densitometria óptica, como descrito anteriormente (RASIA-FILHO *et al.*, 2002; WINKELMANN-DUARTE *et al.*, 2007). As imagens foram capturadas com um microscópio de luz (Olympus, BX-41), equipado com uma câmera digital (3,3 Mpixel QCOLOR3C, QimagingTM) e software de aquisição de imagem (Qcapture Pro 5.1, QimagingTM). Para evitar falsos resultados, as imagens foram adquiridas com o tempo de exposição constante e processamento pós-imagem idêntica foi utilizada para todas as amostras. A intensidade média da escala de cinza em cada região de interesse foi medida. Para estimar a densidade óptica regional gerada pela imunorreação da GFAP, foram pré-definidas regiões de interesse no hipocampo, sendo elas: CA1, CA2, CA3, CA4 e giro denteado (GD), medindo 274.274 μm^2 cada região. As imagens obtidas a partir das secções foram digitalizadas e convertidos numa escala de cinza de 12 bits. Para a densitometria óptica, foi utilizada uma lente objetiva de 40 \times . Para este estudo, ambos os hemisférios esquerdo e direito do cérebro foram analisados e, pelo menos, 5 leituras foram realizadas em cada região do hipocampo por lado. Imagens de imunorreatividade da GFAP foram adquiridas a partir de cinco áreas do hipocampo de oito animais cada um (n=8). A correção de fundo e a subtração de coloração de fundo foram realizadas de acordo com protocolo anteriormente descrito (XAVIER *et al.*, 2005). As D.O. foram expressas graficamente como unidades arbitrárias.

4.13.2 Imunohistoquímica para NeuN em hipocampo de ratos imaturos

Os animais controles e tratados (n=5 animais por grupo), foram anestesiados com xilazina (de 0,1 mL/100 g do peso corporal, IP) e cetamina (0,1mL/100g do peso corporal, IP) e perfundidos primeiramente com 50 ml de PBS com heparina e depois por uma solução fixadora composta por paraformaldeído a 4%, tampão de fosfato 0,1 M, pH 7,4. O cérebro foi removido e colocado na mesma solução fixadora durante 12 horas e em seguida incluído em parafina.

Cortes coronais do hipocampo (5 mm de espessura) foram obtidos com um micrótomo e processados para imunohistoquímica de acordo com protocolos Chemicon. Para tal, os cortes fixados na lâminas foram incubados com o anticorpo primário (anti-NeuN, Chemicon Internacional®), a uma diluição de 1:1000, e anticorpo secundário anti-rato /coelho (Imagem Max, HRP conjugado polímero marca Invitrogen) e o anticorpo terciário (Imagem Max, HRP Polymer marca conjugado Invitrogen). Posteriormente, os cortes foram lavados em PBS, desidratados em etanol, clareados com xileno e cobertos com Entellan e lamínulas. Para controle da reação imunológica alguns cortes foram processados omitindo a incubação com o anticorpo primário e substituindo-o com PBS.

4.13.2.1 Estimativa da densidade numérica das células NeuN positivas nas sub-regiões do hipocampo de ratos imaturos

As imagens foram capturadas com um microscópio de luz (Olympus, BX-41), equipado com uma câmera digital (3,3 Mpixel QCOLOR3C, Qimaging TM) e software de aquisição de imagem (Qcapture Pro 5.1, Qimaging TM). Os cortes foram observados com objetiva de 40 X. Foi usada uma área teste (AOI) de $2958 \mu\text{m}^3$. A contagem foi realizada usando o método Disector Óptico, concentrando-se na análise dos núcleos das células das superfícies superior e inferior de cada disector (MANDARIM-LACERDA *et al.*, 2010). Os neurônios com imunorreatividade positiva para NeuN, com um núcleo bem focado na superfície superior, mas não na inferior, foram contados. O núcleo da célula deveria estar dentro da área teste, mas não poderia tocar duas fronteiras das áreas teste previamente escolhidas (linhas proibidas) (GUNDERSEN, 1977; HOWARD; REED, 2005). Por questão de eficiência, foram analisados os núcleos dos neurônios. A espessura do

dissector (t) foi de 5 μm , o que representa 1/4 - 1/3 da altura dos núcleos, o qual na prática, é a restrição mais importante da espessura da secção (GUNDERSEN; OSTERBY, 1981). Foram analisadas 10 secções em todo o hipocampo, entre 27 (bregma: 2,30) e 42 (bregma: 6,04) do atlas (PAXINOS; WATSON, 2008). Os resultados foram expressos como unidades arbitrárias.

4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

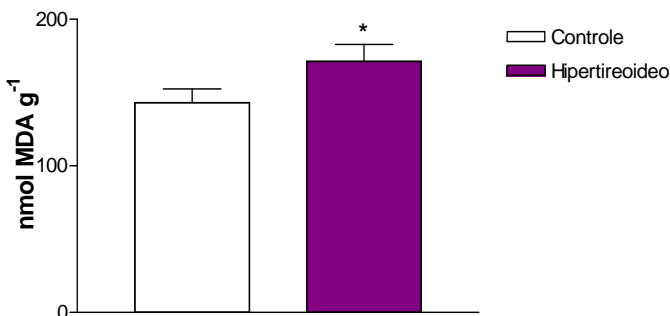
Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de determinações realizadas em duplicatas em 3 a 4 experimentos independentes. As comparações estatísticas foram realizadas através do teste “t” de Student ou ANOVA de uma ou duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni, quando 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.

5. RESULTADOS

5.1 EFEITOS DO HIPERTIREOIDISMO SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS ENVOLVIDOS NO ESTRESSE OXIDATIVO

Os processos de LPO conduzem a formação de numerosos derivados tóxicos, como o malondialdeído (MDA). Este é um aldeído de cadeia curta, sendo um dos mais conhecidos produtos secundários de lipoperoxidação e pode ser usado como um indicador de injúria á membrana celular, proveniente de situações de estresse oxidativo. Para tal, avaliamos substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), destacando o produto majoritário, MDA no hipocampo de ratos expostos ao excesso de T_3 . Os resultados mostraram níveis aumentados de TBARS no hipocampo de ratos hipertireoideos imaturos (Figura 14).

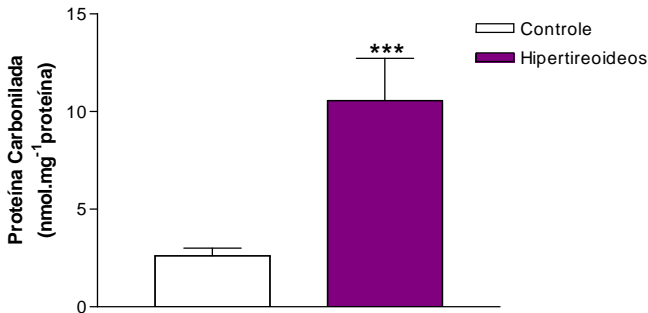
Figura 14. Efeitos do hipertireoidismo nos níveis de peroxidação lipídica.



Fatias de hipocampo de animais controles e tratados foram homogeneizadas e incubadas com ácido tiobarbitúrico (TBA) durante 60 mim. Os resultados foram reportados como a média \pm E.P.M. de 10 animais. Diferenças estatisticamente significativa a partir do controle, foram determinadas através do teste “t” de Student: * $p < 0,05$.

Outro importante dano oxidativo ocorreu nas proteínas, na oxidação dos grupos amino dos aminoácidos e grupos carbonilas. A figura 15 mostra que o hipertireoidismo foi capaz de aumentar os níveis da carbonilação de proteínas.

Figura 15. Efeitos do hipertireoidismo nos níveis de carbonilação de proteínas.

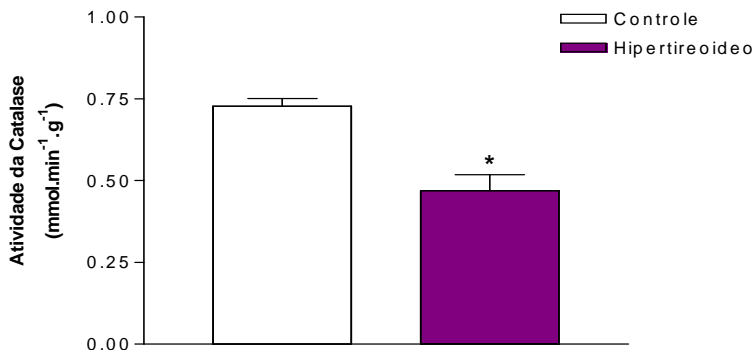


Fatias de hipocampo de animais controles e tratados foram homogeneizadas e incubadas com 2,4 dinitrofenilhidrazina 10mM durante 60 mim. Posteriormente houve a adição de TCA 20% e etanol-acetato de etila. Os resultados foram reportados como a média \pm E.P.M. de 10 animais e expressos como nmol. mg⁻¹ de proteína. Diferenças estatisticamente significativa a partir do controle, foram determinadas através do teste “t” de Student: ***p < 0, 001

Uma vez estabelecida à participação de eventos oxidativos no hipocampo de ratos imaturos, investigou-se o efeito do hipertireoidismo no sistema de defesa antioxidante. O equilíbrio entre a atividade das três principais enzimas antioxidantes, SOD, CAT e GPx é de extrema importância para a remoção dos intermediários tóxicos de oxigênio dos sistemas biológicos. Quando analisada a atividade das enzimas que podem detoxificar o peróxido de hidrogênio, como a CAT e a GPx, observamos que o hipertireoidismo é capaz de induzir uma diminuição na atividade de ambas as enzimas (Figura 16 e 17).

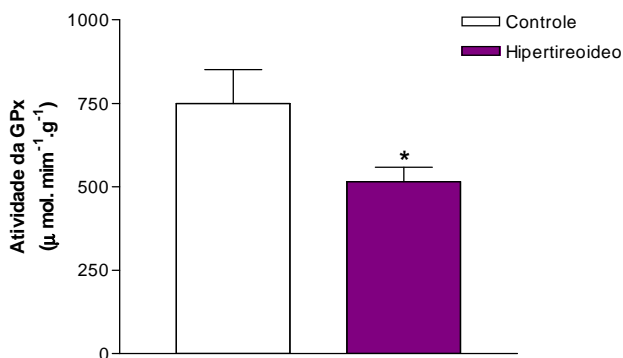
A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes na defesa das células contra o estresse oxidativo. Essa molécula apresenta um papel redutor em muitas reações, tendo uma função importante a detoxificação de H₂O₂, outros peróxidos e radicais livres. Após ser utilizada para a redução de determinados substratos, a GSH é convertida a sua forma oxidada (GSSG), mas é recuperada na sua forma reduzida através da atividade da glutathione redutase (GR). Nossos resultados indicaram um aumento dos níveis de GSH e na atividade da GR em hipocampo de animais hipertireoideos (Figura 18 e 19).

Figura 16. Efeitos do hipertireoidismo sobre a atividade da Catalase.



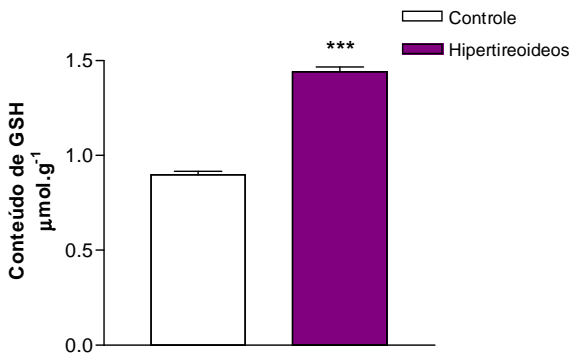
As amostras de hipocampus homogeneizadas foram transferidas para uma cubeta (20 μ L) seguida da adição de uma solução contendo peróxido de hidrogênio (10 mM) em tampão fosfato. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M de 10 animais. Análise estatística: Teste “t” de Student. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle.

Figura 17. Efeitos do hipertireoidismo sobre a atividade da Glutaciona Peroxidase (GPx).



Fatias de hipocampus foram homogeneizadas e a atividade da GPx foi avaliada através da reação de velocidade de decomposição do NADPH, que é proporcional à velocidade da produção da GSSG. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M de 10 animais. Análise estatística: Teste “t” de Student. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle.

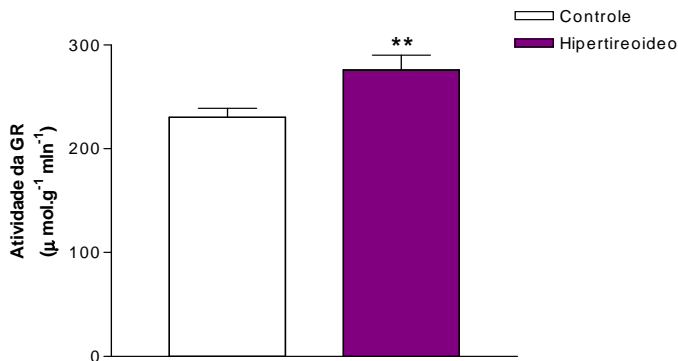
Figura 18. Efeitos do hipertireoidismo sobre o conteúdo da GSH



As amostras de hipocampos homogeneizados foram transferidas para uma cubeta (50 μL) seguida da adição de 100μL uma solução contendo DTNB (2,5 M), após 2 min ocorreu a formação do TNB. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M de 10 animais. Análise estatística: Teste “t” de Student. ***p<0,001 comparado com o grupo controle.

A reação de regeneração da GSSG em GSH pela GR requer uma molécula de NADPH, a qual é disponibilizada pela G6PD, o que garante que a GSH esteja na maior parte em sua forma reduzida, que é essencial para sua ação redutora sobre outras moléculas biológicas. Contudo quando avaliada a atividade da G6PD, não houve diferença significativa quando comparado ao grupo controle (Figura 20).

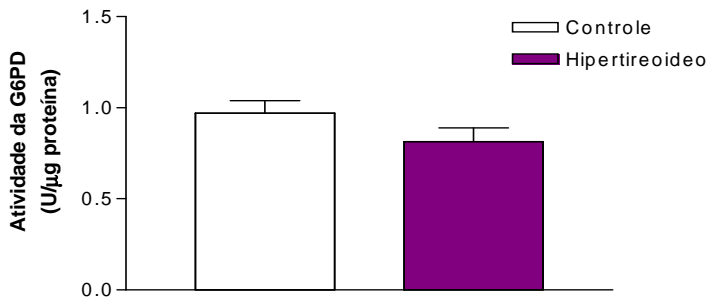
Figura 19. Efeitos do hipertireoidismo sobre a atividade da glutatona redutase (GR)



Fatias de hipocampos foram homogeneizadas e a atividade da GR foi avaliada através da reação que verifica a taxa de oxidação do NADPH. Os resultados

foram expressos como média \pm E.P.M de 10 animais. Análise estatística: Teste “t” de Student. * $p < 0,01$ comparado com o grupo controle.

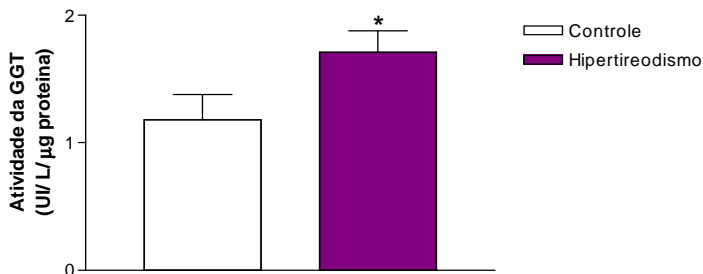
Figura 20. Efeitos do hipertireodismo sobre a atividade da Glicose 6-Fosfato desidrogenase (G6PD)



Fatias de hipocampus foram homogeneizadas e a atividade da G6PD foi avaliada através da reação com a presença de NAD⁺ que catalisou a oxidação da G6P a 6-fosfogliconato, produzindo NADPH. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M de 10 animais.

Por fim, avaliamos a atividade da GGT, que participa da reciclagem de aminoácidos da GHS e conjugados de GSH secretados para o meio extracelular, e permite que esses aminoácidos sejam reintroduzidos para o meio intracelular participando da síntese *de novo* de GSH e regeneração da cisteína. Sua atividade apresentou-se aumentada no hipocampo dos animais hipertireoideos (Figura 21).

Figura 21. Efeitos do hipertireodismo sobre a atividade da Gama-glutamilttransferase (GGT)



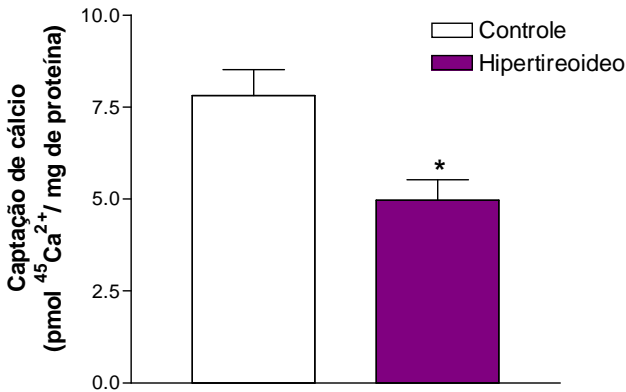
Fatias de hipocampus foram homogeneizadas e a atividade da GGT foi avaliada através da reação onde o substrato gama-glutamil-p-nitroanilida é transferido pela GGT para a molécula aceptor glicilglicina, com liberação de p-nitroanilina. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M de 10 animais.

Análise estatística: Teste “t” de Student. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle.

5.2 ALTERAÇÃO NO INFLUXO DE Ca^{++} EM HIPOCAMPO DE RATOS IMATUROS SUBMETIDOS AO HIPERTIREOIDISMO

O Ca^{2+} regula muitos processos celulares, incluindo secreção de hormônios, de neurotransmissores e de proteínas. No entanto, processos patológicos também podem ser instalados quando o influxo de cálcio via receptores de glutamato, desencadeia toxicidade neural. Para investigar possíveis alterações no influxo de cálcio em hipocampo de ratos imaturos hipertireoideos, fatias de tecido foram incubadas com $^{45}Ca^{2+}$ e a captação foi determinada. Os resultados demonstraram que o aumento do T_3 diminuiu o influxo de $^{45}Ca^{2+}$ em hipocampo de ratos quando comparado ao controle.

Figura 22. Efeitos do hipertireodismo na captação de $^{45}Ca^{2+}$ em hipocampo de ratos imaturos.

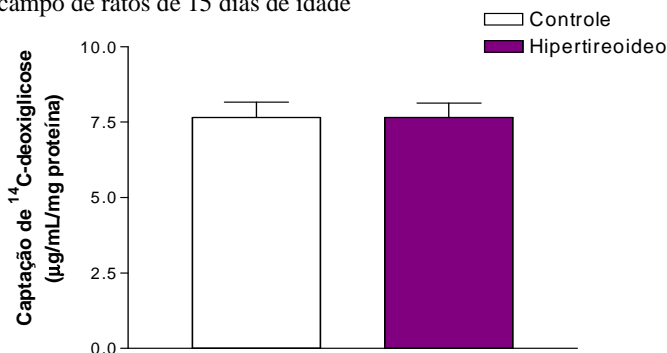


Fatias de hipocampo foram incubadas por 30 min com $0,1 \mu Ci/mL$ de $^{45}Ca^{2+}$. Os resultados foram reportados como a média \pm E.P.M. de 10 animais e expressos em pmol $^{45}Ca^{2+}$ /mg de proteína. Diferenças estatisticamente significativa a partir do controle, foram determinadas através do teste “t” de Student: * $p < 0,05$.

5.3 EFEITO DO HIPERTIREOIDISMO INDUZIDO SOBRE A CAPTAÇÃO DE GLICOSE E NA ATIVIDADE DAS AMINOTRANSFERASES

É sabido que a barreira hematoencefálica impede a entrada do glutamato proveniente da circulação sanguínea. Assim, grande parte do glutamato sintetizado no cérebro é dependente da glicose plasmática. Dentro desse contexto, foram investigadas possíveis alterações causadas pelo hipertireoidismo na captação da desoxiglicose. A figura 23 demonstra que o aumento do T_3 não alterou a captação da desoxiglicose, sendo a glicose mantida nos níveis basais.

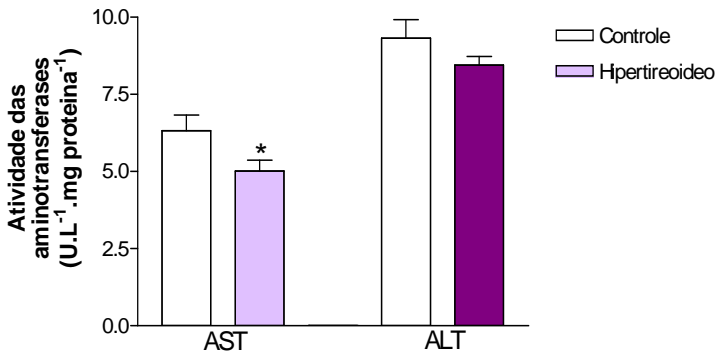
Figura 23. Efeitos do hipertireoidismo na captação de ^{14}C -desoxiglicose em hipocampo de ratos de 15 dias de idade



As fatias de hipocampo foram pré-incubadas com Krebs durante 15 min. Posteriormente a captação foi iniciada com a adição de Krebs fresco contendo D-glicose 2mM e ^{14}C -desoxiglicose 0,2 $\mu\text{Ci/mL}$. Os resultados foram reportados como a média \pm E.P.M. de 10 animais e expressos em μg ^{14}C -desoxiglicose/mL/mgproteína.

Uma vez dentro dos astrócitos a glicose pode seguir várias rotas metabólicas, inclusive entrar no ciclo de Krebs como acetil-Coa via piruvato desidrogenase. Quando disponibilizado o intermediário do ciclo de kbres, o α -KG, este pode dar origem ao glutamato por ação da glutamato desidrogenase, ou através de reações de transaminação catalizadas pela aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). Assim, nós investigamos o efeito do aumento de T_3 na atividade das aminotransferases. A figura 24 indica que a atividade da AST estava diminuída em relação ao controle e que a ALT não foi altera pelo hipertireodismo no hipocampo dos animais.

Figura 24. Efeitos do hipertireoidismo sobre a atividade das aminotransferases (AST e ALT) em hipocampo de ratos imaturos.



A atividade das aminotransferases foi mensurada no homogenizado de hipocampo dos animais controle e tratado com 15 dias de idade. Os resultados foram reportados como média \pm E.P.M. de 10 animais. Análise estatística: Teste “t” de Student. * $p < 0,05$.

5.4 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA GLUTAMATÉRGICO NO EFEITO DO HIPERTIREOIDISMO INDUZIDO

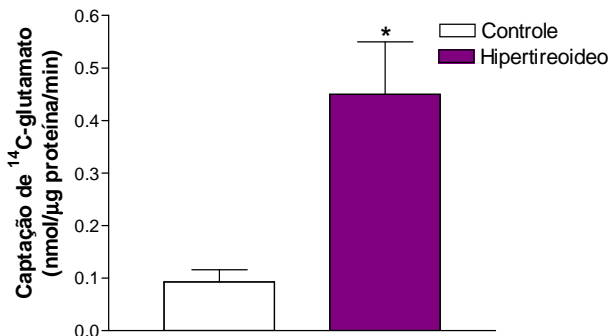
Quando disponível o glutamato, apresenta suas diversas funções metabólicas além de ser o principal neurotransmissor excitatório. Após a interação com seus receptores na fenda sináptica, o glutamato é removido das sinapses através de transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs) que estão localizados sobre as células gliais vizinhas (EAAT1 e 2) e, em menor grau, em neurônios (EAAT 3-5).

Nesse contexto, são descritos na literatura que ações não genômicas dos HT estimulam a captação de glutamato pelos astrócitos. Em conjunto com a diminuição do influxo de Ca^{2+} (Figura 22), esses mecanismos podem proteger células gliais, bem como os neurônios da excitotoxicidade glutamatérgica. Assim, nós investigamos o efeito do aumento do T_3 sobre a captação de glutamato. Os resultados demonstraram que o hipertireoidismo foi capaz de aumentar a captação de glutamato (Figura 25).

Uma vez dentro dos astrócitos, o glutamato pode ser convertido em glutamina, por ação da enzima glutamina sintetase. Corroborando os resultados anteriores, nós demonstramos que o hipertireoidismo

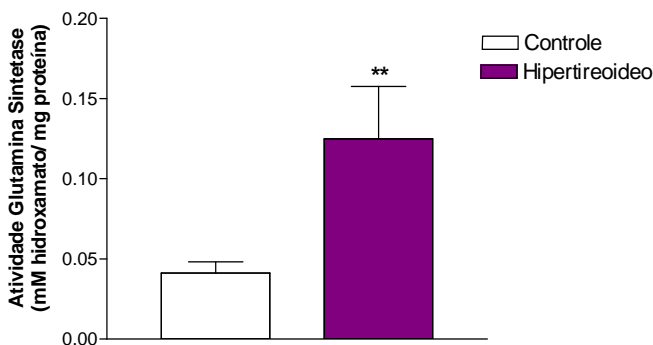
aumentou a atividade da glutamina sintetase no hipocampo dos animais (Figura 26).

Figura 25. Efeitos do hipertireoidismo na captação de L-[14 C] Glutamato em hipocampo de ratos de 15 dias de idade.



A captação foi iniciada com a adição de $0,2 \mu\text{Ci } ^{14}\text{C}$ -glutamato ao meio de incubação (10 min) e foi corrigida para a união não-específica em ensaios realizados na ausência de íons sódio, sendo este sal substituído por cloreto de colina. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. de 10 animais. Diferenças estatisticamente significativa a partir do controle, foram determinadas através do teste “t” de Student: * $p < 0,05$.

Figura 26. Efeitos do hipertireoidismo sobre a atividade da Glutamina Sintetase em hipocampo de ratos imaturos.



Fatias de hipocampo de animais controles e tratados foram homogeneizadas e a atividade da glutamina sintetase foi mensurada. Os resultados foram reportados como a média \pm E.P.M. de 10 animais e expressos como mM hidroxamato/mg de proteína. Diferenças estatisticamente significativa a partir do controle, foram determinadas através do teste “t” de Student: ** $p < 0,01$.

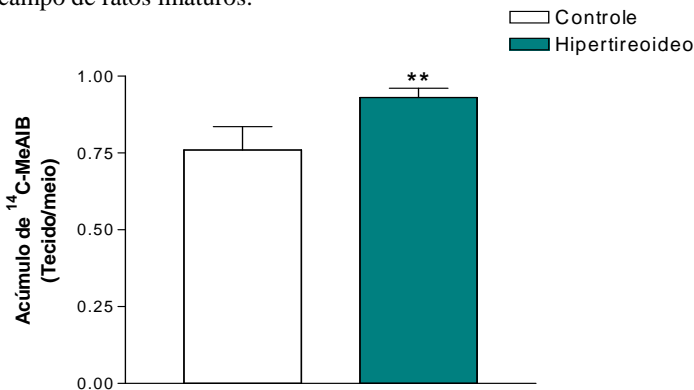
Após sua síntese a glutamina é liberada através do sistema de transportadores de N e captada por neurônios através de um sistema A de transportadores de aminoácidos para completar o ciclo de glutamato-glutamina.

5.5 EFEITO DO HIPERTIREOIDISMO NO TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS NEUTROS

Para estudar a interação do T₃ com o sistema A de transporte de aminoácidos, um análogo denominado α -(metil-amino)-ácido isobutírico (¹⁴C-MeAIB) foi adicionado as amostras de hipocampo homogenizados.

O análogo α -(metil-amino)-ácido isobutírico (¹⁴C-MeAIB) é um substrato específico para este sistema, já que o mesmo não entra no núcleo e permanece no citosol sendo quantificado no estado basal e na presença de hormônios e bloqueadores. Portanto, esse análogo serve como marcador específico para eventos de membrana (GUIDOTTI; BORGHETTI; GAZZOLA, 1978). A Figura 27 mostra que o hipertireoidismo causou um efeito estimulador sobre a acumulação de aminoácidos neutros, quando comparado como grupo controle.

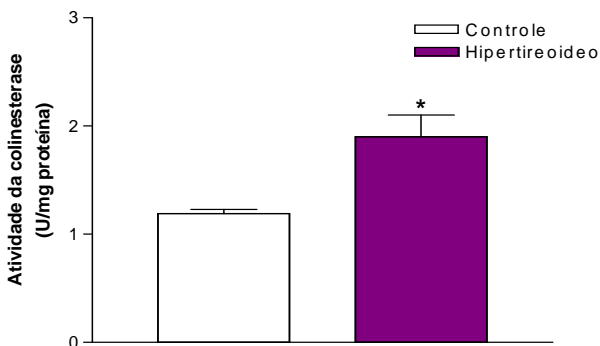
Figura 27. Efeitos do hipertireoidismo no acúmulo de ¹⁴C-MeAIB em hipocampo de ratos imaturos.



Fatias de hipocampo foram incubadas na presença ou ausência de ¹⁴C-MeAIB (3,7 kBq/ml) durante 60 min. Os resultados foram reportados como a média \pm E.P.M. de 10 animais. Diferenças estatisticamente significativa a partir do controle, foram determinadas através do teste “t” de Student: **p<0,01.

A atividade da acetilcolinesterase também foi avaliada, sendo que o hipertireoidismo causou o aumento da atividade desta enzima (Figura 28)

Figura 28. Efeitos do hipertireoidismo sobre a atividade da colinesterase em hipocampo de ratos com 15 dias de idade.

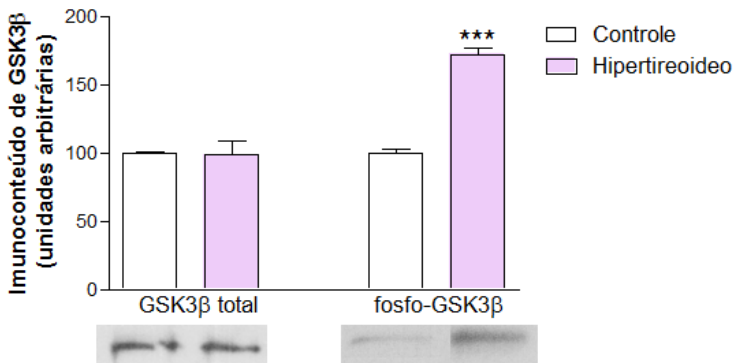


Fatias de hipocampo de animais controles e tratados foram homogeneizadas e a atividade da colinesterase foi mensurada. Os resultados foram reportados como a média \pm E.P.M. de 10 animais e expressos como U/mg de proteína. Diferenças estatisticamente significativa a partir do controle, foram determinadas através do teste “t” de Student: $*p < 0,05$.

5.6 PARTICIPAÇÃO DA GSK3B NO MECANISMO DE NEUROPROTEÇÃO DO HIPERTIREOIDISMO SOBRE O HIPOCAMPO DE RATOS IMATUROS

A atividade da GSK3 β modula diversos processos neurais, incluindo sobrevivência, a apoptose e a dinâmica do citoesqueleto. O lítio atua como um inibidor clássico desta via, apresentando benefícios para a doença de Alzheimer e para a isquemia cerebral (COLE; 2013). A participação desta enzima nos potenciais eventos neuroprotetores induzidos pelo hipertireoidismo sobre células neurais foi demonstrada uma vez que os níveis de GSK3 β fosforilada, e consequentemente inativada, apresentaram-se aumentados em hipocampo de ratos imaturos (Figura29).

Figura 29. Efeitos do hipertireoidismo sobre o imunoconteúdo da GSK3 β total e fosforilada em hipocampo de ratos imaturos



O hipocampo de animais controle e tratado foi lisado e os níveis total e fosforilado de GSK3 β foram determinados por Western blot. Os resultados foram expressos em % do controle como a média \pm E.P.M. (n=10). Diferenças estatisticamente significativas foram determinadas por ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas Bonferroni. ***p<0,001 comparado ao grupo controle. “Immunoblots” representativos estão representados na figura.

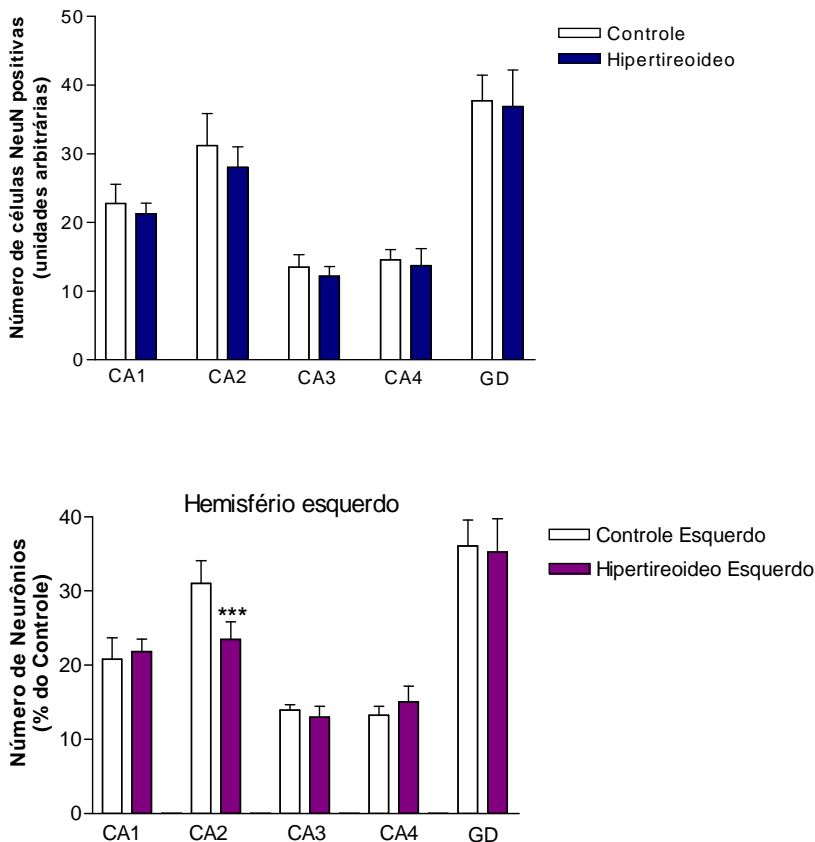
5.7 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA NeuN e GFAP

A análise do número de neurônios e astrócitos nas subregiões do hipocampo de animais controles e hipertireoideos foi realizada através de imunohistoquímica utilizando-se marcação com a proteína NeuN e o anticorpo anti-GFAP, respectivamente.

5.7.1 Efeito do hipertireoidismo sobre o número de neurônios em hipocampo de ratos imaturos

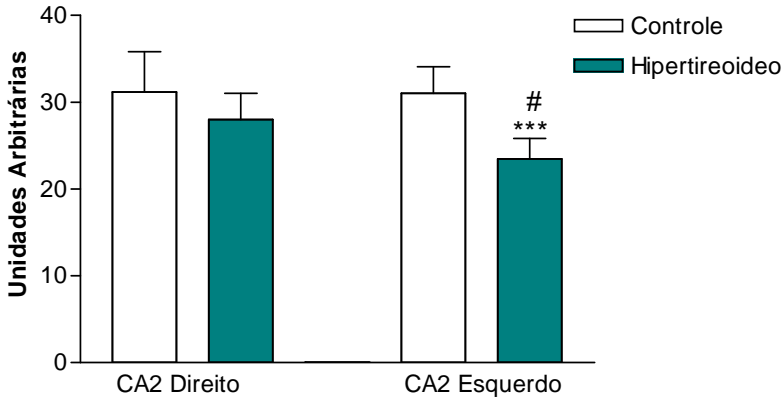
Cortes histológicos de ratos controles e hipertireoideos foram processados para imunohistoquímica, fotografados e contados conforme descrito em materiais e métodos. Os núcleos das células positivas para NeuN foram considerados como neurônios. Os resultados mostraram diminuição no número de neurônios no CA2 do hipocampo esquerdo de ratos hipertireoideos em relação aos controles (Figura 30). Além disso, observou-se que o número de células NeuN positivas na subregião CA2 do hipocampo esquerdo é menor que o do hipocampo direito (Figura 31).

Figura 30. Consequência do hipertireoidismo sobre o número de células neuronais em hipocampus de ratos imaturos



Imunohistoquímica para marcação das células NeuN positivas nas subregiões do hipocampo de ratos imaturos controles e hipertireoideos. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias como média \pm E.P.M de 8 animais. Análise estatística: Anova de uma via seguida do pós teste de Bonferroni. Diferenças significativas entre os grupos estão representadas como: *** $p < 0,001$ comparado com o grupo controle. As subregiões do hipocampo analisadas foram: Corno de Amnon (CA1, CA2, CA3, CA4) e Giro Denteado (GD).

Figura 31. Efeito de lateralidade induzido pelo hipertireoidismo sobre o número de neurônios na subregião CA2 do hipocampo de ratos imaturos.

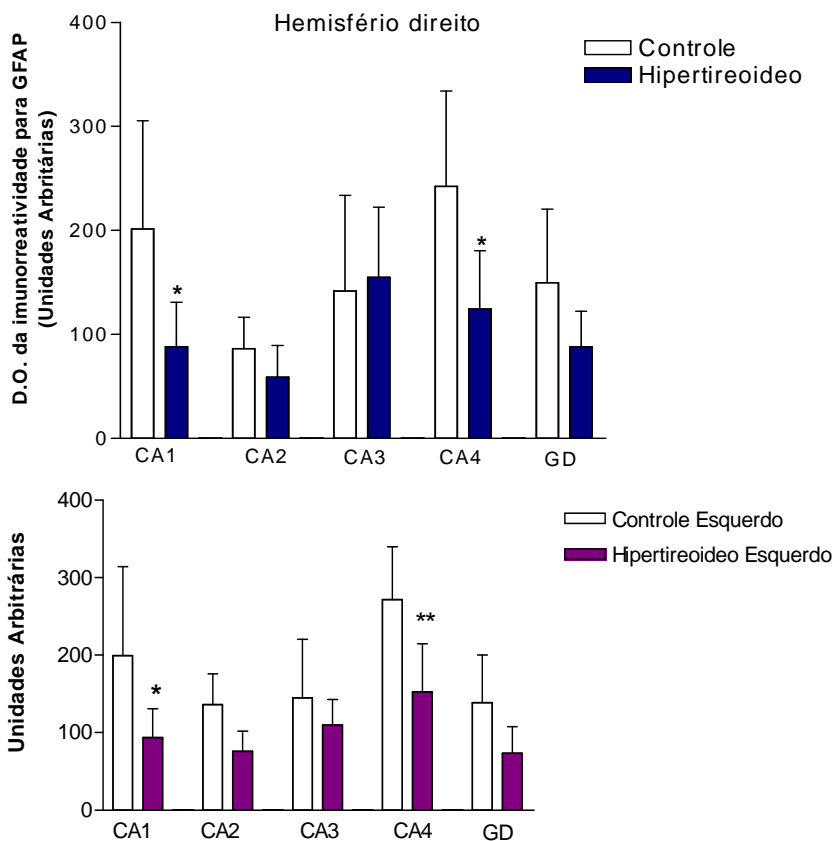


Imunohistoquímica para marcação das células NeuN positivas na subregião CA2 de hipocampus localizados nos hemisférios direito e esquerdo do cérebro de ratos imaturos controles e hipertireoideos. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias como média \pm E.P.M. Análise estatística: Anova de duas vias seguida do pos teste de Bonferroni. Diferenças significativas entre os grupos estão representadas como: *** $p < 0,001$ comparado com o grupo controle; # $p < 0,05$ comparando os hemisférios direito e esquerdo de ratos hipertireoideos. Corno de Ammon 2 (CA2).

5.7.2 Consequências do hipertireoidismo sobre o número de células astrocitárias em hipocampo de ratos imaturos

A imunohistoquímica para a GFAP, proteína própria de astrócitos, revelou diminuição na densidade desta proteína nas subregiões CA1 e CA4 do hipocampo de ratos hipertireoideos imaturos. Ao contrário dos resultados obtidos para neurônios (lateralidade), os dados indicam diminuição na positividade para GFAP nas subregiões supracitadas em ambos os hemisférios (Figura 32).

Figura 4. Efeito hipertireoidismo sobre a densidade da GFAP nas subregiões do hipocampo de ratos imaturos



Após os procedimentos de imunohistoquímica para GFAP, as subregiões do hipocampo de ratos imaturos controles e hipertireoideos foram fotografadas e a densidade óptica (D.O.) da imunoreatividade para GFAP foi determinada. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias como média \pm E.P.M. Análise estatística: Anova de uma via seguida do pós-teste de Bonferroni. Diferenças significativas entre os grupos estão representadas como: *** $p < 0,001$ comparado com o grupo controle. As subregiões do hipocampo analisadas foram: Corno de Ammon (CA1, CA2, CA3, CA4) e Giro Denteado (GD).

6. DISCUSSÃO

É bem estabelecido que o cérebro dos mamíferos é alvo direto dos HT, tanto durante o desenvolvimento quanto em indivíduos adultos (OPPENHEIMER; SCHWARTZ, 1997; LIMA, 1997; AHMED, 2008). Neste contexto, nós investigamos os efeitos do hipertireoidismo induzido sobre o hipocampo de ratos imaturos sob alguns parâmetros relacionados ao sistema glutamatérgico, ao metabolismo energético e ao estresse oxidativo.

Diversos estudos têm demonstrado que os efeitos metabólicos dos HT, por si só, estão diretamente ligados à produção de ERO e ao estresse oxidativo (VILLANUEVA *et al.*, 2013). Esses hormônios propiciam uma aceleração relativa do metabolismo basal, que inclui um aumento da taxa de ambas as reações catabólicas e anabólicas (SCHWARTZ; OPPENHEIMER, 1978). Isso resulta em aumento do gasto energético, na mobilização de combustível, na oxidação do combustível para a extração de energia, consumo de oxigênio, aumento da frequência respiratória e da produção e liberação de calor (DAUNCEY, 1990).

As ERO desempenham um papel essencial na regulação da proliferação celular, no âmbito do SNC e periférico, de maneira que podem iniciar e promover o estabelecimento de padrões neuronais e conseqüentemente, a neurogênese (VERITY, 1994). Embora as ERO estejam envolvidas em muitos processos fisiológicos, quando em excesso, podem causar danos oxidativos (KARBOWNIK; LEWINSKI, 2003).

No presente estudo, o hipertireoidismo induzido foi capaz de gerar danos oxidativos como a peroxidação lipídica (Figuras 14). Isso poderia estar relacionado com o fato de que o aumento nos níveis dos HT pode modificar a composição de fosfolipídios de membrana acarretando aumento do grau de instauração, particularmente nas membranas mitocondriais. Esta insaturação em ácidos graxos torna-os mais suscetíveis ao ataque de radicais livres, o que resulta em peroxidação lipídica aumentada na mitocôndria (KANNER *et al.*, 1987; FERNANDEZ; VIDELA, 1993; BANGUR, 1995; TAPIA *et al.*, 1999; GREDILLA *et al.*, 2001). Além disso, os HT também podem promover a produção de ERO extra-mitocondrial por modificação da expressão de genes que codificam para enzimas envolvidas na produção e eliminação dessas espécies reativas (FERNANDEZ *et al.*, 1985).

Embora a peroxidação lipídica tenha sido frequentemente utilizada como um indicador do estresse oxidativo nos tecidos expostos ao hipertireoidismo, dado que os ácidos graxos poliinsaturados são especialmente suscetíveis ao ataque das ERO, e subprodutos de peroxidação lipídica são facilmente mensuráveis, a dependência de processos peroxidativos é influenciada por vários fatores, tais como tipo de tecido, espécie, a iodotironina utilizada e a duração do tratamento (VENDITTI; DI MEO, 2006).

Adamo e colaboradores (1989) já haviam apontado efeitos peroxidativos induzidos pelos HT em fatias de cérebro de ratos Wistar recém-nascidos tratados com T_3 . Semelhante aos resultados que obtivemos para o hipocampo de ratos, Huh *et al.* (1998) demonstraram em homogeneizado de fígado de ratos, que o hipertireoidismo induzido por T_3 estava associado com níveis elevados de TBARS.

Quando observados os efeitos do hipertireoidismo sob outros tecidos, Pereira e colaboradores (1994) encontraram um aumento da peroxidação de lípidos em órgãos linfoides, tais como linfonodos mesentéricos e timo, mas sem grandes efeitos no baço. Aumento nos níveis de TBARS nos testículos de ratos com hipertireoidismo, induzido por T_3 também foram descritos previamente (CHOUDHURY *et al.*, 2003; ZAMONER *et al.*, 2007).

Outro importante dano observado em nosso modelo de estudo, foi o aumento da PC (Figura 15). É sabido que a oxidação de proteínas tem efeitos importantes sobre as funções celulares, tais como metabolismo, regulação redox, sinalização e citoesqueleto (POON *et al.*, 2004).

A carbonilação de proteínas é amplamente usada como biomarcador para o dano oxidativo e reflete o dano celular induzido por várias formas de ERO (STADTMAN; LEVINE, 2003; DALLE DONNE *et al.*, 2005; LEVINE; STADTMAN, 2006). Existem, portanto, vários mecanismos para oxidação de proteínas e, bem como muitas substâncias passíveis de tal modificação. As ERO podem oxidar diretamente lisina, arginina, prolina e treonina fornecendo derivados carbonílicos. Além disso, grupos carbonilas podem ser introduzidos em proteínas via reação com aldeídos derivados da peroxidação lipídica (por exemplo, malondialdeído e 4-hidroxinonal) ou gerados a partir da reação de redução de açúcares ou produtos de sua oxidação com resíduos de lisina (BERNETTI; STADTMAN, 1997; AKAIKE, 2000; DALLE DONNE *et al.*, 2006).

Semelhante aos resultados encontrados em nossos experimentos, Tapia e colaboradores (1999) injetaram T_3 em ratos por 3 dias

consecutivos (doses de 0,1 mg de T₃/kg de peso corporal) e observaram aumento dos níveis de TBARS no fígado dos animais após o primeiro dia de tratamento. A oxidação de proteínas também ocorreu no terceiro dia de tratamento. Komosinska Vassevet *et al.*(2000) observaram em humanos hipertireoideos um aumento significativo nos índices de peroxidação lipídica e modificações em proteínas.

Como mencionado anteriormente, as ERO são capazes de oxidar muitas biomoléculas incluindo DNA, RNA, lipídios de membrana e proteínas, levando a danos celulares. Entretanto, como uma forma de defesa primária contra ERO, tanto procariontes como eucariontes têm desenvolvido sistemas de defesa antioxidante para proteger as células contra esses danos.

A atividade enzimática da SOD, CAT, GPx e GR, bem como o conteúdo de GSH, exercem um papel fundamental na detoxificação de ERO, protegendo a célula de efeitos deletérios de radicais livres (JUNQUEIRA *et al.*, 1986; CHHABRA *et al.*,1993; BANERJEE *et al.*, 1999; MENEZES *et al.*, 2011). Entretanto, a eficácia das enzimas antioxidantes pode variar de acordo com o estágio de desenvolvimento, o tipo celular, além de outros aspectos fisiológicos do organismo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; LIVINGSTONE, 2001; AHMED *et al.*, 2004; 2005).

Vários estudos têm demonstrado que alterações nos níveis dos HT podem modular o sistema de defesas antioxidantes em diferentes tecidos (VENDITTI *et al.*, 1997; PAMPLONA *et al.*, 1999; TAPIA *et al.*, 1999; ZAMONER *et al.*, 2008a; CATTANI *et al.*, 2013). Neste contexto, no presente estudo observamos aumento nos níveis do antioxidante não enzimático GSH (Figura 18), acompanhado de um aumento na atividade da GGT e GR (Figura 21 e 19). A CAT e GPx tiveram suas atividades diminuídas e a G6PD não foi alterada pelo hipertireoidismo (Figuras 16, 17e 20, respectivamente).

Nesse contexto, quando comparado a outros órgãos, o cérebro tem algumas desvantagens em relação à geração e à detoxificação de ERO. Primeiramente, as células do cérebro humano utilizam 20% do oxigênio consumido pelo corpo, mas constitui apenas 2% do peso corporal (CLARKE; SOKOLOFF, 1999), indicando o potencial de geração de uma grande quantidade de ERRO na cadeia respiratória. Além do mais, um elevado conteúdo de ferro tem sido relatado para algumas áreas do cérebro (GERLACH *et al.*, 1994), o que pode catalisar a produção de espécies reativas. O cérebro é rico em lipídios como ácidos graxos insaturados, os quais são alvos para a peroxidação lipídica

(PORTER, 1984; HALLIWELL, 1992). O cérebro também contém baixa atividade de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) em relação ao fígado e rim (HO *et al.*, 1997), o que o torna mais vulnerável ao estresse oxidativo.

É sabido que a GR, cuja atividade estava aumentada em nossos experimentos, não age diretamente na remoção de espécies radicalares, mas é responsável pela regeneração da glutatona à sua forma reduzida (GSH) na presença de fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADPH), tendo como objetivo impedir a paralisação do ciclo metabólico da GSH (HUBER *et al.*, 2008). A GGT, também com atividade aumentada em nosso modelo de estudo, é a única enzima da membrana plasmática capaz de iniciar a metabolização da GSH extracelular através da remoção do seu grupo gama-glutamil. Assim, ocorre à formação de um sulfidrildipeptídeo, a cisteinil-glicina (cys-gly). Esta 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 interior celular, onde juntamente com os aminoácidos são usados para a síntese *de novo* de GSH ou de proteínas (DROZDZ *et al.*, 1988; KUMAR *et al.*, 2000). Assim, o aumento da atividade da GGT e GR encontrados em nosso trabalho são consistentes com a elevação na concentração de GSH, em consequência da manutenção da homeostase redox das células.

Azizi *et al.* (1982) avaliaram a associação entre a atividade da GGT sérica e da função da tireóide em pacientes com hipertireoidismo, hipotireoidismo e em indivíduos eutireoideos. Dez dos 16 pacientes com hipertireoidismo tiveram elevações da atividade GGT. Por outro lado, Drozd e colaboradores (1998) estudaram a possibilidade da geração de ERO pela combinação da reação GGT/GSH, utilizando a transferrina como fonte de ferro. O trabalho mostrou que a reação GGT/GSH pode gerar ERO na presença de uma fonte de ferro, via formação de cisteinil-glicina (cys-gly), metabólito da GSH. Vários agentes redutores, como por exemplo, os tióis, podem facilitar a redução de Fe^{3+} ligado a transferrina levando a formação do Fe^{2+} , que então livre, pode via reação de Fenton, levar a produção de ERO. Contudo, é válido salientar que, a GGT desempenha um importante papel na ressíntese da GSH.

O sistema de GSH é fundamental para a defesa celular. A GSH reage diretamente com radicais em reações não enzimáticas (WINTERBOURN; METODIEWA, 1994), além de ser um doador de elétrons para a redução de peróxidos, que é catalisada pela GPx (CHANCE *et al.*, 1979). Entretanto deve-se considerar que o aumento

no estresse oxidativo pode ser uma razão para a diminuição e esgotamento do sistema de defesa antioxidante, como um resultado do aumento da produção endógena de radicais livres (Ahmed *et al.*, 2004).

Tsai e colaboradores (2011) observaram uma diminuição da relação GSH/GSSG e da atividade da GPx em fibroblastos orbitais na oftalmopatia de Graves (GO), evidenciando assim, um desequilíbrio redox grave nestas células, que por sua vez ocasionou em acúmulo de H₂O₂ endógeno nos fibroblastos orbitais. Por outro lado, estudos apontam que um aumento dos níveis de GSH pode ocorrer em resposta ao estresse oxidativo (DESAGHER *et al.*, 1996; DRINGEN, 1997; KUSSMAUL *et al.*, 1999; DRINGEN, 1999).

Desagher *et al.*, (1996) em experimentos com cultura de astrócitos, utilizando um inibidor da CAT [3-amino-,2,4-triazol (3-at)], apontaram que esta enzima foi responsável apenas de forma diminuída pelo desaparecimento de H₂O₂ no tampão de incubação, e o sistema da GSH astroglial não foi comprometido. Em contraste, quando utilizado o inibidor da CAT junto com mercapto succinato, inibidor da GPx, a capacidade das células astrogliais eliminar H₂O₂ foi fortemente reduzida. Em cultura de neurônios, a aplicação de H₂O₂ provocou a oxidação rápida de GSH. A remoção do peróxido foi seguida de uma regeneração quase completa da GSH (DESAGHER *et al.*, 1996; DRINGEN, 1999). No entanto, para a rápida eliminação do H₂O₂ pelos neurônios tanto GPx quanto CAT demonstraram ser essenciais, em contraste com a situação em culturas astrogliais (DRINGEN, 1997). Ou seja, o sistema de GSH nos neurônios não foi capaz de compensar a perda funcional da reação da CAT.

Dasgupta *et al.* (2007) propuseram através de experimentos com homogenizado de cérebro bem como com culturas de astrócitos, que os HT 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 dos HT tiveram quedas na atividade da GCL o que acarretou diminuição dos níveis da GSH, sendo esta resposta dependente da idade do animal. Por outro lado a administração de T₃ nos animais reverteu esse efeito. Além disso, em cultura de astrócitos os níveis de GSH foram regulados em resposta a adição de T₃, sendo que este efeito foi totalmente reduzido quando utilizado um inibidor específico da GCL. Essa condição (aumento da GSH) foi associada à citoproteção durante o estresse oxidativo induzido por H₂O₂ na dose máxima tolerável para esse tipo de

células. Estes achados corroboram nossos resultados demonstrando aumento no conteúdo de GSH em hipocampo de ratos tratados com T₃.

As atividades da GPx no citosol e mitocôndria e da CAT nos peroxissomos poderiam desempenhar um papel importante na detoxificação do H₂O₂ na cultura celular. Embora experimentos avaliando a atividade das enzimas que degradam H₂O₂ não tenham sido demonstrados neste estudo, o conteúdo de GSH foi aumentado em 30% durante o tratamento de 24 horas com HT, sugerindo que, pelo menos em parte, a capacidade de eliminação de H₂O₂ é decorrente do aumento nos níveis de GSH nos astrócitos (DASGUPTA *et al.*, 2007). Em conjunto, esses resultados propõem possíveis mecanismos envolvidos na regulação da GSH, e respaldam nossos experimentos que em resposta ao aumento do T₃, ocasionaram o aumento do conteúdo de GSH e diminuição da GPx e CAT no homogeneizado de hipocampo de animais neonatos.

Nós também demonstramos que os animais com hipertireoidismo tiveram níveis elevados de fosfo-GSK-3 β em relação aos controles (Figura 29). A desregulação da GSK3 tem sido observada em várias doenças do SNC, tais como doença de Alzheimer, transtornos de humor e esquizofrenia (BEAULIEU *et al.*, 2008; HUR; ZHOU, 2010). A GSK-3 β é uma serina/treonina cinase (Ser/Thr-cinase) citoplasmática que está envolvida em vários processos biológicos, incluindo sinalização, coordenação do citoesqueleto, vias de sinalização da insulina, Wnt/ β -cateína, dentre outros. Sua atividade é diminuída pela fosforilação da Ser9 (TAKAHASKI; SASAGURI, 2009; SEIRA; RÍO, 2013).

Uruga e colaboradores (2013) mostraram que a síntese de GSH em condições de estresse oxidativo é regulada pela atividade da Akt. A ativação da via PI3K/Akt durante a neurotoxicidade induzida pelo ferro regula alvos múltiplos, tais como GSK-3 β e o metabolismo da GSH. Assim, o aumento significativo nos níveis de GSH (Figura 18), observado em nosso estudo em resposta ao estresse oxidativo (Figura 14 e 15) pode ser regulado pela Akt ativada, que consequentemente pode estar fosforilando a Ser9 da GSK3-B e, assim modulando a resposta neuronal ao estresse oxidativo.

Estudos anteriores já haviam relatado que, as modificações induzidas diretamente por radicais livres podem desativar as enzimas glutamina sintetase, creatina cinase e tirosina hidroxilase (POON *et al.*, 2004). Assim, nós investimos possíveis alterações causadas pelo hipertireoidismo e estresse oxidativo no sistema glutamatérgico. Os

resultados apontaram que o aumento de T_3 foi capaz de induzir o aumento da captação de glutamato (Figura 25), bem como a atividade da GS (Figura 26), além da diminuição da captação de cálcio (Figura 22), sem alterar a captação da desoxiglicose (Figura 23).

O sistema glutamatergico, principal sistema de neurotransmissão excitatória do SNC, é essencial para o desenvolvimento cerebral, interações entre estruturas e comunicação celular. (DANBOLT, 2001). A regulação da neurotransmissão glutamatergica envolve a remoção do glutamato na fenda sináptica por transportadores específicos, modulando o equilíbrio fisiológico e/ou tóxico na sinapse glutamatergica. Os sistemas de captação rápida e eficiente de glutamato para dentro das células são transportadores de membrana de alta afinidade e dependentes de Na^+ , que contribuem para manter os níveis de glutamato extracelulares abaixo dos níveis tóxicos (DUAN *et al.*, 1999; HUANG *et al.*, 2004; SWANSON *et al.*, 2004; TSUKADA *et al.*, 2005). Além disso, os astrócitos possuem a enzima específica glutamina sintetase (GS) que catalisa a reação de amidação do glutamato para formar glutamina. A captação de glutamato astroglial e a atividade de GS são respectivamente, responsáveis pela remoção do glutamato na fenda sináptica e fornecimento de glutamina para os neurônios (DANBOLT, 2000; HERTZ, 2006).

Corroborando, Aguiar *et al.* (2008) mostraram que em cultura de astrócitos cerebelares tratadas com T_3 , houve um aumento significativa na captação de glutamato pelos astrócitos. O tratamento com o hormônio também aumentou ambos os níveis de RNA mensageiro e expressão de proteínas de GLAST e GLT -1. Além do mais, o efeito gliotóxico de glutamato em astrócitos cerebelares foi abolido pelo tratamento T_3 e proporciona a melhora da viabilidade neuronal. Isso representa que os HT estão envolvidos em importantes mecanismos capazes de melhorar o microambiente astrociatário, podendo promover o desenvolvimento neuronal e neuroproteção.

Quanto ao influxo de Ca^{2+} , este pode estar envolvido em diversas funções celulares e ser regulado por vários mecanismos, incluindo a atividade de proteínas cinases, neurotransmissores, hormônios, nucleotídeos e fatores de crescimento. Contudo, o aumento de cálcio intracelular leva à ativação de enzimas como proteases, fosfolipases, óxido nítrico sintases e endonucleases que contribuem para a morte celular através de diversos mecanismos (MELDRUM, 2000). Além disso, o excesso de cálcio intracelular pode induzir o fenômeno de excitotoxicidade glutamatergica. A diminuição na captação de Ca^{2+}

observada neste estudo corrobora o aumento na captação de glutamato e na atividade da GS observadas no hipocampo dos animais hipertireoideos, uma vez que estes eventos induzem diminuição na disponibilidade de glutamato na fenda sináptica, e conseqüentemente em menor ativação de receptores glutamatérgicos.

Em conjunto nossos resultados sugerem que o aumento dos HT, embora tenham ocasionado danos oxidativo, não acarretam excitotoxicidade glutamatérgica no modelo estudado.

Paradoxalmente, o hipertireoidismo foi capaz de diminuir a atividade da AST (Figura 24). As enzimas AST e ALT estão presentes no citosol e na mitocôndria, sendo que a ALT, está envolvida na síntese do neurotransmissor glutamato em neurônios glutamatérgicos (DESAI; DESAI, 2008). Zigmond e colaboradores (1999) descrevem que mudanças na atividade de enzimas que convertem α -CG em glutamato ou succinil-CoA podem afetar a eficácia do ciclo de Krebs ou os níveis de glutamato intracelulares.

A função dos HT depende somente do sistema "A" de transporte de aminoácidos e o análogo ácido α -(metil-amino)-isobutírico ($[^{14}\text{C}]$ -MeAIB) é um substrato específico para este sistema, já que o mesmo não entra no núcleo e permanece no citosol da célula, servindo dessa forma como marcador específico para eventos de membrana, principalmente por não possuir um RNA transportador que o reconheça (GUIDOTTI; BORGHETTI; GAZZOLA, 1978).

A atividade dos transportadores de aminoácidos do sistema A pode ser modulada a partir de diferentes estímulos, como adaptação à disponibilidade de aminoácidos, fatores de crescimento, choque osmótico, estímulos hormonais e estresse celular (HAUSSINGER; SCHLISS, 2002; HYDE *et al.*, 2002). Cabe salientar que o transporte de aminoácidos neutros utilizando o MeAIB como modelo é essencial para investigar sistemas de entrada de aminoácidos como a alanina e a glutamina.

Em células neurais, a principal direção do fluxo de glutamina é a partir dos astrócitos, onde ocorre a sua síntese, para os neurônios, onde é convertido ao neurotransmissor aminoácido L-glutamato ou GABA (DOLINSKA *et al.*, 2004). Neste contexto, o aumento na captação de ^{14}C -MeAIB, em conjunto com outros resultados (aumento da captação de glutamato e na atividade da GS - figuras 25 e 26, respectivamente) demonstram que possivelmente, o hipertireoidismo aumenta o transporte de glutamina para o interior dos neurônios, e conseqüentemente sua disponibilidade para gerar glutamina.

Nossos resultados também demonstraram que o T₃ levou ao aumento da atividade da colinesterase (Figura 28). Outros estudos já descreviam que disfunções da tireoide são apontadas por influenciarem a atividade da AChE em ratos; entretanto, os mecanismos não estão esclarecidos (SALVATI *et al.*, 1994; CARAGEORGIOU *et al.*, 2007).

O sistema colinérgico desempenha um papel essencial nos processos de aprendizado e memória (WINKLER *et al.*, 1995). A síntese de acetilcolina ocorre nos terminais nervosos a partir dos precursores, colina e a acetil-coenzima A, fornecidas pela clivagem de fosfolípidos e a partir do metabolismo oxidativo na mitocôndria. A colina acetiltransferase catalisa a síntese de acetilcolina que, por sua vez, pode interagir com receptores colinérgicos pré e pós-sinápticos. A acetilcolinesterase, localizada na fenda sináptica, hidroliza a acetilcolina e colina e acetato (TAYLOR; BROWN, 2006). O neurotransmissor acetilcolina (ACh) liga-se a duas classes de receptores: os receptores colinérgicos nicotínicos, de ação ionotrópica, e os receptores colinérgicos muscarínicos, de ação metabotrópica.

Assim, estudos anteriores mostraram que o uso simultâneo de antagonistas nicotínicos e de receptores glutamatérgicos do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) foram capazes de atenuar ataques epilépticos induzidos em ratos e camundongos, o que sugere uma íntima relação entre os sistemas de neurotransmissão colinérgica e de NMDA na atividade excitatória do SNC.

Quanto às células astrocitárias, é descrito na literatura que a maturação dessas células é modulada de forma precisa pelos HT (ADACHI *et al.*, 2002). Os astrócitos desempenham um papel fundamental em diversas etapas do desenvolvimento do cérebro, tais como a proliferação de precursores neuronais, migração e diferenciação neuronal, crescimento axonal e a sinaptogênese. No presente trabalho observamos através da imunohistoquímica para GFAP, que os animais com hipertireoidismo tiveram diminuição na densidade desta proteína nas subregiões CA1 e CA4 do hipocampo em ambos os hemisférios (Figura 32). Semelhante a esses resultados Andres-Branquin e colaboradores, (1994) demonstraram em cultura primária astrogliar, que a adição de T₃ foi capaz de reduzir a expressão de GFAP sem, no entanto alterar a atividade da GS. Interessantemente, essa redução na expressão de GFAP foi significativa na fase de proliferação, mas não em astrócitos maduros e, o efeito do T₃ em astrócitos foi maior no cerebelo do que em comparação com outras regiões como o neocórtex. Isso sugere que as subpopulações astrogliais diferem quanto a sua

sensibilidade ao T_3 . Outros autores propõem ainda que a resposta astrogliar específica aos HT corresponde a uma adaptação precisa, direcionada e regulada pela célula e que fatores microambientais podem modular essa resposta astrogliar específica *in vivo*.

Nesse contexto, Kunz e colaboradores (2011) estudaram o efeito do Bisfenol A (BPA) sobre GFAP e a concentração de glutamato e demonstraram aumento na densidade da GFAP na prole tratada com BPA bem como variações na relação Glu/Asp no hipocampo desses animais. Estudos recentes mostram que o BPA se liga aos receptores de hormônios tireoidianos (TRs), e tem efeitos seletivos sobre a função da tireoide (BINDHUMOL *et al.*, 2003; ZOELLER, 2007). Assim, o autor propõe que o aumento na expressão de GFAP observada em seu estudo, pode refletir na capacidade do BPA de influenciar a sinalização dos HT, que por sua vez influenciam no desenvolvimento cerebral. Salienta-se que esses efeitos foram observados em animais neonatos, sendo necessária uma avaliação mais precisa desta exposição em longo prazo.

No presente trabalho observamos que tanto para células gliais como neurônios, as subregiões do hipocampo (CA1, CA2, CA3, CA4 e GD) respondem de forma distinta ao aumento do T_3 . Ainda outro efeito observado para os neurônios, mas não para gliais, foi que o número de células NeuN positivas da região CA2 do hipocampo esquerdo menor que o do hipocampo direito (Figuras 30 e 31), ou seja, um efeito de “lateralidade”. MCCARTHY *et al.* (2002) avaliaram a expressão de várias proteínas no hipocampo de ratos adultos jovens, e demonstraram que 68 % das proteínas expressas analisadas, como GFAP, se apresentaram em maior quantidade no hemisfério direito. Esses autores propuseram que essas alterações podem estar associadas a um aumento na proliferação de células no hemisfério direito, ou algumas mudanças na plasticidade sináptica (WINKELMANN-DUARTE *et al.*, 2011).

Cattani *et al.* (2013) também observaram que a diminuição nos níveis dos HT é capaz de alterar o número de células neuronais, semelhante aos nossos resultados com o modelo de hipertireoidismo induzido em ratos imaturos.

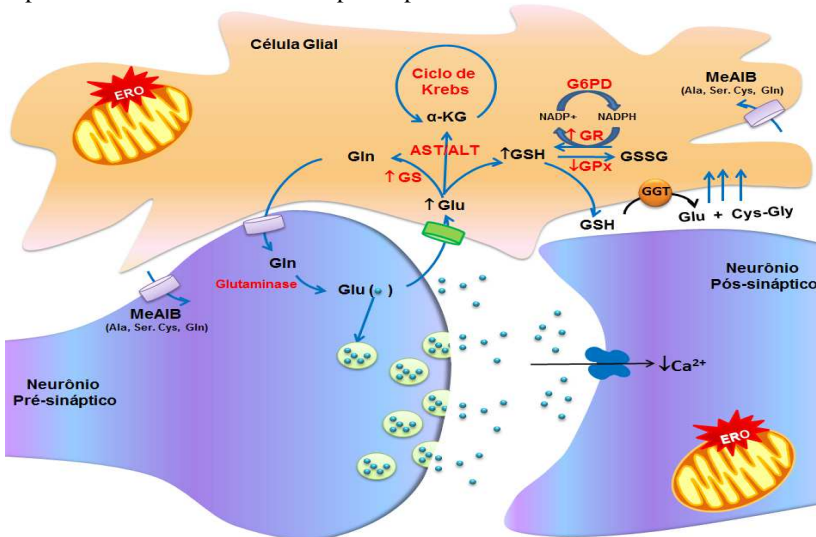
Embora os mecanismos precisos pelos quais o hipertireoidismo altera a captação e metabolismo de glutamato, bem como modula o sistema de defesas antioxidantes em hipocampo de ratos imaturos ainda não sejam conhecidos, este estudo sugere que além de alterações neuroquímicas, esta disfunção tireoidiana também interfere com a citoarquitetura hipocampal. Os resultados apontaram para diminuição na densidade de GFAP (em CA1 e CA4) bem como no número de

neurônios em CA2, o que pode ser consequência tanto de morte celular quanto de inibição da proliferação de neurônios e astrócitos em regiões específicas do hipocampo, apontando inúmeras perspectivas de estudo.

Por fim, com base nesses efeitos, observamos que a estimulação metabólica provocada pelo hipertireoidismo implica em aumento na produção de EROs, levando ao aumento da peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas, diminuição da densidade de GFAP e do número de neurônios. Entretanto, novos experimentos são necessários para esclarecer os mecanismos envolvidos nestes processos.

Os resultados também evidenciam que o hipertireoidismo leva ao aumento dos níveis de GSH em hipocampo de ratos imaturos, provavelmente via mecanismos envolvendo a ativação de vias envolvidas na regeneração de sua forma reduzida (via GR) ou maior “turnover” da GSH (via GGT), estimulando a síntese *de novo* deste antioxidante. Neste sentido, propõe-se que os HT possam desempenhar um papel “duplo”, atuando como protetores frente aos insultos oxidativos e prevenindo a excitotoxicidade glutamatérgica em hipocampo de ratos imaturos, bem como podem estar de alguma forma, induzindo danos oxidativos e morte celular. Estes efeitos podem desempenhar um importante papel na modulação das funções cerebrais desses hormônios tanto em situações patológicas quanto fisiológicas. Sendo assim, apoiados nos resultados obtidos neste estudo, propomos os possíveis mecanismos de proteção e/ou de toxicidade induzidos pelo hipertireoidismo sobre o hipocampo de ratos imaturos (Figura 33).

Figura 33. Mecanismos de neurotoxicidade e/ou neuroproteção induzidos pelo hipertireoidismo sobre células hipocâmpais de ratos em desenvolvimento.



O hipertireoidismo devido ao excesso de T_3 induz aumento na captação de glutamato, bem como de sua metabolização a glutamina, por ação da glutamina sintetase, em astrócitos de ratos imaturos. Este evento diminui a concentração de glutamato na fenda sináptica, levando ao menor influxo de Ca^{2+} , corroborando o T_3 como um possível agente neuroprotetor. Uma vez nos astrócitos, o glutamato pode ser ainda convertido, por transaminação, a alfa-cetoglutarato (α -KG), e este ser oxidado no ciclo de Krebs, ou ainda, ser utilizado para a síntese de GSH ou proteínas, dentre outras funções. Os dados obtidos neste estudo demonstraram ainda que o hipertireoidismo causou elevação nos níveis de GSH, bem como na atividade da GR e da GGT, envolvidas respectivamente na redução da GSSG em GSH e no “turnover” de GSH, reforçando o papel protetor do T_3 no cérebro. Por outro lado, aumento na peroxidação lipídica e na carbonilação de proteínas sugere a presença de dano oxidativo, reforçando a hipótese proposta de que o T_3 possui um efeito “duplo” protegendo o cérebro da excitotoxicidade glutamatérgica e aumentando os níveis de GSH, enquanto aumenta o dano oxidativo e pode estar envolvido na indução de morte celular.

Fonte: Autor

7. CONCLUSÃO

- ✓ A captação de glutamato e a sua metabolização a glutamina, pela atividade da glutamina sintetase, foram aumentadas pelo hipertireoidismo em hipocampo de ratos imaturos.
- ✓ A captação de aminoácidos neutros, principal sistema de transporte de glutamina para o interior dos neurônios, foi aumentada pelo hipertireoidismo, sugerindo maior disponibilidade deste aminoácido para a síntese de glutamato nos neurônios de ratos hipertireoideos.
- ✓ O hipertireoidismo induzido com T₃ diminuiu o influxo de Ca²⁺ no hipocampo de ratos imaturos.
- ✓ Os níveis de GSH foram aumentados pelo hipertireoidismo, sugerindo aumento das defesas frente ao estresse oxidativo em hipocampo de ratos imaturos.
- ✓ O hipertireoidismo induziu a peroxidação lipídica e a oxidação de proteínas em hipocampo de ratos imaturos, como demonstrado pelo aumento nos níveis de TBARS e proteína carbonilada.
- ✓ As atividades das enzimas envolvidas no sistema de defesas antioxidantes foram alteradas pelo hipertireoidismo, levando a aumento na atividade da GR e da GGT; bem como diminuição na atividade da CAT e GPx.
- ✓ A atividade da G6PD e da ALT não foi alterada pelo hipertireoidismo, enquanto a atividade da AST foi diminuída.
- ✓ O hipertireoidismo não altera a captação de [¹⁴C]-2-desoxiglicose em hipocampo de ratos imaturos.
- ✓ O mecanismo de proteção e/ou toxicidade induzido pelo hipertireoidismo envolve a modulação da via da GSK3-beta;
- ✓ O hipertireoidismo diminui o número de células NeuN positivas no CA2 do hipocampo esquerdo de ratos imaturos, indicando efeito de lateralidade.
- ✓ As subregiões CA1 e CA4 do hipocampo de ratos hipertireoideos apresentaram diminuição na imunorreatividade para GFAP, sugerindo redução na população astrocitária ocasionada por esta disfunção da tireoide.

8. PERSPECTIVAS

Este trabalho representa a continuidade dos estudos do grupo investigando o mecanismo de ação dos HT em diferentes tecidos. Inúmeras perspectivas são apontadas com o intuito de esclarecer o papel desses hormônios no SNC durante o desenvolvimento.

Considerando-se que os HT têm sido propostos como terapia adjuvante para tumores cerebrais, pretende-se avaliar os mecanismos de sobrevivência/ou morte neuronal induzidos pelo hipertireoidismo, bem como possíveis alterações na morfologia das células neurais.

As alterações no transporte e metabolismo de aminoácidos (glutamato e aminoácidos neutros) sugerem que o hipertireoidismo pode proteger o cérebro frente à excitotoxicidade glutamatérgica. Por outro lado, baixos níveis de glutamato poderiam comprometer processos de memória e aprendizagem. Sendo assim, pretende-se investigar o papel do hipertireoidismo na síntese de glutamato e GABA, bem como na liberação de glutamato.

9. REFERÊNCIAS

ADALI, M.; INAL-ERDEN, M.; AKALIN, A.; EFE, B. Effects of propylthiouracil, propranolol, and vitamin E on lipid peroxidation and antioxidant status in hyperthyroid patients. **Clin Biochem.**, v. 32(5), p.363-7, 1999.

ADAM, R. C.; Regulation of Cell Fate in the Brain by GSK3, Trends in Cell Signaling Pathways in Neuronal Fate Decision. Dr. Sabine Wislet-Gendebien (Ed.), 2013. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/trends-in-cell-signaling-pathways-in-neuronal-fate-decision/regulation-of-cell-fate-in-the-brain-by-gsk3>. Acesso em: 08 de janeiro de 2014.

ADAMO, A.M.; LLESUY, S.F.; PASQUINI, J.M.; BOVERIS, A. Brain chemiluminescence and oxidative stress in hyperthyroid rats. **Biochem J.**, v. 263 (1), p. 273-7, 1989.

ADACHI, T.; TAKANAGA, H.; SAKURAI, Y.; ISHIDO, M.; KUNIMOTO, M.; ASOU, H. Influence of cell density and thyroid hormones on glial cell development in primary cultures of embryonic rat cerebral hemisphere. **J. Neurosci Res.**, v. 69 (1), p. 61-71, 2002.

AHMED, OM; EL-GAREIB, AW, EL-BAKRY, AM, ABD EL-TAWAB, SM; AHMED, RG. Thyroid hormones states and brain development interactions. **Int J Devl Neurosci**, v. 26, p. 147-209, 2008.

AIZENMAN, Y.; DE VELLIS, J. Synergistic action of thyroid hormone, insulin and hydrocortisone on astrocyte differentiation. **Brain Res.**, v. 414(2), p. 301-308, 1987.

ALMEIDA, R.F.; THOMAZI, A.P.; GODINHO, G.F.; SAUTE, J.A.; WOFCHUK, S.T.; SOUZA, DO.; GANZELLA, M. Effects of depressive-like behavior of rats on brain glutamate uptake. **Neurochem Res.**, v. 35(8), p. n1164-71, 2010.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. 4 ed. New York, 2002.

ANDRYSKOWSKI, G.; OWCZAREK, T. The evaluation of selected oxidative stress parameters in patients with hyperthyroidism. **Pol Arch Med Wewn.**, v.117 (7), p.285-9, 2007.

ANDERSON, G.W. Thyroid hormones and the brain. **Frontiers Neuroendocr.**, v.22, p. 1-17, 2001.

ANDRES, BARQUIN, P.J.; FAGES, C.; LE PRINCE, G.; ROLLAND, B.; TARDY, M. Thyroid hormones influence the astroglial plasticity: changes in the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and of its encoding message. **Neurochem Res.**, v. 19(1), p. 65-9, 1994.

AKAIKE, T. Mechanisms of biological S-nitrosation and its measurement. **Free Radic Res.**, v. 33(5), p. 461-9, 2000.

APPLEYARD, M.E. Acetylcholinesterase induces long-term potentiation in CA1 pyramidal cells by a mechanism dependent on metabotropic glutamate receptors. **Neurosci Lett.**, v. 190(1), p. 25-28, 1995.

ASAYAMA, K.; DOBASHI, K.; HAYASHIBE, H.; MEGATA, Y.; KATO, K. Lipid peroxidation and free radical scavengers in thyroid dysfunction in the rat: a possible mechanism of injury to heart and skeletal muscle in hyperthyroidism. **Endocrinology.**, v. 121(6), p. 2112-8, 1987.

ASLAN, D.; ANDERSEN, M.D.; GEDE, L.B.; DE FRANCA, T.K.; JØRGENSEN, S.R.; SCHWARZ, P.; JØRGENSEN, N.R. Mechanisms for the bone anabolic effect of parathyroid hormone treatment in humans. **Scand J Clin Lab Invest.** v. 72(1), p.14-22, 2012.

AZIZI, F. Gamma-Glutamyl transpeptidase levels in thyroid disease. **Arch Intern Med.**, v. 142 (1), p. 79-81, 1982.

BAKER, D.G.; DON, H. F.; BROWN, J. K. Alpha-adrenergic and muscarinic cholinergic inhibition of ACh release in guinea pig trachea: role of neuronal K⁺ channels. **Am J Physiol.**, v. 266 (6 Pt 1), p. 698-704, 1994.

BANERJEE, B.D.; SETH, V.; BHATTACHARYA, A.; PASHA, S.T.; CHAKRABORTY, A.K. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free radical scavengers. **Toxicol Lett.** v. 107, p. 33-47, 1999.

BANGUR, C.S.; HOWLAND, J.L.; KATYARE, S.S. Thyroid hormone treatment alters phospholipid composition and membrane fluidity of rat brain mitochondria. **Biochem J.**, v. 305 (1), p.29-32, 1995.

BAQUI, M.M.; GEREBEN, B.; HARNEY, J.W.; LARSEN, P.R.; BIANCO, A.C. Distinct subcellular localization of transiently expressed types 1 and 2 iodothyronine deiodinases as determined by immunofluorescence confocal microscopy. **Endocrinology**, v. 141, p. 4309–4312, 2000.

BAQUI, M.; BOTERO, D.; GEREBEN, B.; CURCIO, C.; HARNEY, J.W.; SALVATORE, D.; SORIMACHI, K.; LARSEN, P.R.; BIANCO, A. C. Human type 3 iodothyronine selenodeiodinase is located in the plasma membrane and undergoes rapid internalization to endosomes. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 1206–1211, 2003.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo **Quim. Nova**, v. 29, n.1, p. 113-123, 2006.

BARLOW, C.H.; HARDEN, W.R.; HARKEN, A.H.; SIMSON, M.B.; HASELGROVE, J.C.; CHANCE, B.; O'CONNOR, M.; AUSTIN, G. Fluorescence mapping of mitochondrial redox changes in heart and brain. **Crit Care Med.**, v. 7(9), p.402-6, 1979.

BARE, B.; SMELTZER, S.; **Tratado de enfermagem médico-cirúrgico**.10ª ed., v. 2, Guaranaíba Koogan, 2005.

BEAULIEU, J. M.; DEL'GUIDICE, T. Messing up with traffic: different effects of antipsychotic agents on glutamate receptor complexes in vivo. **Mol Pharmacol.**, v. 73(5), p. 1339-42, 2008.

BERNAL, J. Action of thyroid hormone in brain. **J Endocrinol Invest.**, v. 25, p. 268-288, 2002.

BERRIDGE, M.J.; BOOTMAN, M. D.; RODERICK, H. L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 4 (7), p. 517-529, 2003.

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

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev Nutr.**, v. 12 (12), p.123-30, 1999.

BINDHUMOL, V.; CHITRA,K.C.; MARTHUR, P.; Bisfenol A induces reactive oxygen species generation in the liver of male rats. **Toxicology.**, v 188, p. 117-124, 2003.

BIRD, G.S., & PUTNEY JR, J.W. CALCIUM, IN: G.J. SIEGEL, R.W. ALBERS, S.T. BRADY, D.L. PRICE (Eds), Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects, **Elsevier Academic Press.**, San Diego, p. 379 -390, 2006.

BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, V.; Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Ann Bot.**,v. 91, p. 179-94, 2003.

BRAVERMAN, L.E.;BECKER, D.V.; DELANGE, F.; DUNN, J.T.; FRANKLYN, J.A.; HOLLOWELL, J.G.; LAMM, S.H.; MITCHELL, M.L.; PEARCE, E.; ROBBINS, J.; ROVET, J. F. Iodine supplementation for pregnancy and lactation-United States and Canada: recommendations of the American Thyroid Association. **Thyroid.**,v. 16(10), p. 949-51,2006.

BRITTON, G.; Structure and properties of carotenoids in relation to function.**FASEB J.**,v. 9 (15), p. 1551-8, 1995.

CAFFREY, T. Transient hyperthyroidism of hyperemesis gravidarum: a sheep in wolf's clothing.**JAm Board Fam Pract.**, v.13, p. 35-8, 2000.

CALAZA, KDA C.; GARDINO, P.F. Neurochemical phenotype and birthdating of specific cell populations in the chick retina. **An Acad Bras Cienc.**, v. 82(3), p. 595-608, 2010.

CARAFOLI, E. The Symposia on Calcium Binding Proteins and Calcium Function in Health and Disease: an historical account, and an appraisal of their role in spreading the calcium message. **Cell Calcium**, v. 37(4), p. 279-81, 2005.

CARMIGNOTO, G. Astrocyte-neurone crosstalk: variants of the same language? **Trends Pharmacol Sci.**, v. 21(10), p. 373-5, 2000.

CARAGEORGIOU, H.; PANTOS, C.; ZARROS, A.; STOLAKIS, V.; MOUROUZIS, I.; COKKINOS, D.; TSAKIRIS, S. Changes in acetylcholinesterase, Na⁺,K⁺-ATPase, and Mg²⁺-ATPase activities in the frontal cortex and the hippocampus of hyper- and hypothyroid adult rats. **Metabolism**, v. 56(8), p. 1104-10, 2007.

CASSIM, L. Melatonin and anticancer therapy: Interactions with 5-Fluourouracil. 2007. Disponível em: <http://eprints.ru.ac.az/1323/>. Acesso em: 9 de dezembro de 2013.

CATTANI, D.; GOULART, P.; CAVALLI, V.L.O.; WINKELMANN-DUARTE, E.; SANTOS, A.; PIEROZAN, P.; SOUZA, D.; WOEHL, V.; FERNANDES, M.; SILVA, F.R.M.B.; GONÇALVES, C.; PUREUR-PESSOA, R.; ZAMONER, A. Congenital hypothyroidism alters the oxidative status, enzyme activities and morphological parameters in the hippocampus of developing rats. **Molecular and Cellular Endocrinology**. V (375), p. 14-26, 2013.

CHAO, X.D; FEI, F.; FEI, Z. The role of excitatory amino acid transporters in cerebral ischemia. **Neurochem Res.**, v. 35(8), p. 1224-30, 2010.

CHHABRA, S.K.; HASHIM, S.; RAO, A.R. Modulation of hepatic glutathione system of enzymes in suckling mouse pups exposed translocationally to malathion. **J. Appl. Toxicol.**, v. 13, p. 411-416, 1993.

CHAMPION, B.R.; RAYNER, D.C.; BYFIELD, P.G.; PAGE K.R.; CHAN C.T.; ROITT, I.M. Critical role of iodination for T cell recognition of thyroglobulin in experimental murine thyroid autoimmunity. **J Immunol.**, v. 139(11), p. 3665-3670, 1987.

CHIARELLO, P.G.; IGLESIAS, A.C.; ZUCOLOTO, S.; MORENO, F.; JORDAO, A.A. JR.; VANNUCCHI, H. Effect of a necrogenic dose of diethylnitrosamine on vitamin E-deficient and vitamin E-supplemented rats. **Food Chem Toxicol.**, v. 36(11), p. 929-35, 1998.

CHOUDHURY, S.; CHAINY, G.B.; MISHRO, M.M. Experimentally induced hypo- and hyper-thyroidism influence on the antioxidant defence system in adult rat testis. **Andrologia.**, V.35(3), p. 131-40, 2003.

CIVELEK, S.; SEYMEN, O.; SEVEN, A.; YIGIT, G.; HATEMI, H.; BURÇAK, G. Oxidative stress in heart tissue of hyperthyroid and iron supplemented rats. **J Toxicol Environ Health A.**, v. 64(6), p. 499-506, 2001.

CLARKE, D. D.; SOKOLOFF, L. Circulation and energy metabolism of the brain. **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects.**, p. 637- 669. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1999.

COULTER, D.A.; EID, T. Astrocytic regulation of glutamate homeostasis in epilepsy. **Glia.**, v. 60 (8), p. 1215-26, 2012.

COSTA, A. P.; TRAMONTINA, A. C.; BIASIBETTI, R.; BATASSINI, C.; LOPES, M. W.; WARTCHOW, K. M.; BERNARDI, C. TORTORELLI, L. S.; LEAL, R. B.; GONÇALVES, C. A. Neuroglial alterations in rats submitted to the okadaic acid-induced model of dementia. **Behav Brain Res.**, v. 226, p. 420-427, 2012

CURCIO, C.; BAQUI, M.M.; SALVATORE, D.; RIHN, B.H.; MOHR, S.; HARNEY, J. W.; LARSEN, P. R; BIANCO, A. C. The human type 2 iodothyronine deiodinase is a selenoprotein highly expressed in a mesothelioma cell line. **J Biol Chem.**, v. 276(32), p. 30183-7, 2001.

DALLE-DONNE, I.; SCALONI, A.; GIUSTARINI, D.; CAVARRA, E.; TELL, G.; LUNGARELLA, G.; COLOMBO, R.; ROSSI,

R.; MILZANI, A. Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics. **Mass Spectrom Rev.**, v. 24 (1), p.55-99, 2005.

DALLE-DONNE, I.; ALDINI, G.; CARINI, M.; COLOMBO, R.; ROSSI, R.; MILZANI, A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. **J Cell Mol Med.**, v.10 (2), p. 389-406, 2006.

DASGUPTA, A.; DAS, SUMATRA.; SARKAR, P.K.; Thyroid hormone promotes glutathione synthesis in astrocytes by up regulation of glutamate cysteine ligase through differential stimulation of its catalytic and modulator subunit mRNA. **Free Radical Biology and Medicine.**,v. 42 (5), p. 617-626,2007.

DAUNCEY, M.J. Thyroid hormones and thermogenesis. **Proc Nutr Soc.** , v. 49(2), p. 203-15,1990.

DAVIS, P.J., DAVIS, F.B. Nongenomic actions of thyroid hormone. **Thyroid.**,v. 6(5), p. 497-504, 1999.

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

DAVIS, P.J., DAVIS, F.B., CODY, V. Membrane receptor mediating thyroid hormone action. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 16, p. 429-435, 2005.

DAVIS, P.J.; ZHOU, M.; DAVIS, F.B.; LANSING, L.; MOUSA, S.A.; LIN, H.Y. Mini-review: cell surface receptor for thyroid hormone and nongenomic regulation of ion fluxes in excitable cells. **Physiol Behav**, v. 99, p. 237–239, 2010.

DESAGHER S, GLOWINSKI J, PREMONT J. Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity. **J Neurosci.**, v.16 (8), p.2553-62,1996.

DINIZ, B.S.; TALIB, L.L.; JOAQUIM, H.P.; DE PAULA, V.R.; GATTAZ, W. F.; FORLENZA, O. V. Platelet GSK3B activity in patients with late-life depression: marker of depressive episode severity

and cognitive impairment? **World J Biol Psychiatry.**, v.12 (3), p. 216-22, 2011.

DOBLE, BW.; WOODGETT, JR. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. **J Cell Sci.**, v. 116(Pt 7), p. 1175-86, 2003.

DRATMAN, M. B. On the mechanism of action of thyroxine, an amino acid analog of tyrosine. **J Theor Biol.**, v. 46(1), p. 255-70, 1974.

DRATMAN, M.B; GORDON, J. T.Thyroid hormones as neurotransmitters. **Thyroid.**, v. 6(6), p. 639-47, 1996.

DRINGEN, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Prog Neurobiol.**, v. 62, p.649-71, 2000.

DRINGEN, R.; KUSSMAUL, L.; GUTTERER, J.M.; HIRRLINGER, J.; HAMPRECHT, B. The glutathione system of peroxide detoxification is less efficient in neurons than in astroglial cells. **J Neurochem.**, v. 72 (6), p. 2523-30. 1999.

DRINGEN, R.; HAMPRECHT, B. Involvement of glutathione peroxidase and catalase in the disposal of exogenous hydrogen peroxide by cultured astroglial cells. **Brain Res.**, v. 759(1), p. 67-75. 1997.

DROZDZ, R.; PARMENTIER, C.; HACHAD, H.; LEROY, P.; SIEST, G.; WELLMAN, M. Gamma-glutamyltransferase dependent generation of reactive oxygen species from a glutathione/transferrin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 25, n. 7, p. 786-792, 1998.

DOHAN. O.; DE LA VIEJA, A.; CARRASCO, N. Molecular study of the sodium-iodide symporter (NIS): a new field in thyroidology. **Trends Endocrinol Metab.**, v.11(3), p. 99-105, 2000.

DOLIŃSKA, M.; ZABŁOCKA, B.; SONNEWALD, U.; ALBRECHT, J. Glutamine uptake and expression of mRNA's of glutamine transporting proteins in mouse cerebellar and cerebral cortical astrocytes and neurons. **Neurochem Int.**, v. (2), p.75-81, 2004.

DOS REIS-LUNARDELLI, E.A.; CASTRO, C.C.; BAVARESCO, C.; COITINHO, A.S.; DA TRINDADE, L. S.; PERRENOUD, M. F.;

ROESLER, R.; SARKIS, J.J.; DE SOUZA WYSE, A.T.; IZQUIERDO, I. Effects of thyroid hormones on memory and on Na (+), K(+)-ATPase activity in rat brain. **Curr Neurovasc Res.**, v. 4(3), p. 184-93, 2007.

DUNN, R.T.; KLAASSEN, C.D. Thyroid hormone modulation of rat sulphotransferase mRNA expression. **Xenobiotica.**, v. 30(4), p. 345-357, 2000.

DUAN, S.M.; ANDERSON, C.M.; STEIN, B.A.; SWANSON, R.A. Glutamate induces rapid upregulation of astrocyte glutamate transport and cell-surface expression of GLAST. **J. Neurosci.**, v. 19, p. 10193-10200, 1999.

ECHTAY, K.S. Mitochondrial uncoupling proteins-what is their physiological role? **Free Radic Biol Med.**, v. 43 (10), p.1351-71, 2007.

ENGLER, D.; BURGER, A.G. The deiodination of the iodothyronines and of their derivatives in man. **Endocrine Review.**, v. 5:15, p. 1-184, 1984.

ERECIŃSKA, M.; SILVER, I.A. Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. **Prog Neurobiol.**, v. 35(4), p. 245-96, 1990.

ESCOTT, G. M.; ROSA, L. A.; LOSS, E. S. Hormonal regulation of glucose and amino acid transport and its relation with functions and development of Sertoli cells: a review. **Ciência em Movimento.**, n° 27, p. 85-98, 2011.

EULENBURG, V.; GOMEZA, J. Neurotransmitter transporters expressed in glial cells as regulators of synapse function. **Brain Res Rev.**, v. 63(1-2), p. 103-112, 2010.

FAN, M.M.; RAYMOND, L.A. N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function and excitotoxicity in Huntington's disease. **Prog Neurobiol.**, v.81, n.5-6, p.272-93, 2007.

FARWELL, A.P.; LEONARD, J.L. Nongenomic actions of thyroid hormone during fetal brain development. **Curr Opin Endocrinol Metab.**, v. 12, p. 17-22, 2005.

FARWELL, A.P., DUBORD-TOMASETTI, S.A., PIETRZYKOWSKI, A.Z., LEONARD, J.L. Dynamic nongenomic actions of thyroid hormone in the developing rat brain. **Endocrinology**, v. 147, p. 2567-2574, 2006.

FRAICHARD, A.; CHASSANDE, O.; PLATEROTI, M.; ROUX, J.P.; TROUILLAS, J.; DEHAY, C.; LEGRAND, C.; GAUTHIER, K.; KEDINGER, M.; MALAVAL, L.; ROUSSET, B.; SAMARUT, J. The T3R alpha gene encoding a thyroid hormone receptor is essential for post-natal development and thyroid hormone production. **Embo j.**, v. 16(14), p. 4412-20, 1997.

FERNÁNDEZ, V.; BARRIENTOS, X.; KIPREOS, K.; VALENZUELA, A.; VIDELA, L.A. Superoxide radical generation, NADPH oxidase activity, and cytochrome P-450 content of rat liver microsomal fractions in an experimental hyperthyroid state: relation to lipid peroxidation. **Endocrinology**, v.117 (2), p. 496-501, 1985.

FERNÁNDEZ, V.; VIDELA, L.A. 3,3',5-triiodothyronine-induced hepatic respiration: effects of desferrioxamine and allopurinol in the isolated perfused rat liver. **Toxicol Lett.**, v. 69(2), p.205-10, 1993.

FERNÁNDEZ, M. G.; Hipertiroidismo y embarazo. **Endocrinología y nutrición.**, v. 60(9), p. 535-543, 2013.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**, v. 43(1), p. 61-68, 1997.

FIGUEIREDO, M.D.; CARDOSO, L. C.; FERREIRA, A.C.; CAMPOS, D.V.; DA CRUZ DOMINGOS, M.; CORBO, R.; NASCIUTTI, L.E; VAISMAN, M.; CARVALHO, D.P.; Goiter and hypothyroidism in two siblings due to impaired Ca(+2)/NAD(P)H-dependent H(2)O(2)-generating activity. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 86(10), p. 4843-4848, 2001.

FRIESEMA, E.C.; KUIPER, G.G.; JANSEN, J.; VISSER, T.J.; KESTER, M.H. Thyroid hormone transport by the human

monocarboxylate transporter 8 and its rate-limiting role in intracellular metabolism. **Mol Endocrinol.**, v, 20(11), p. 2761-72, 2006.

FRIDOVICH, I.; Oxygen toxicity: a radical explanation. **J Exp Biol.**, v. 201(pt 8), p. 1203-9, 1998.

FONNUM, F. Regulation of the synthesis of the transmitter glutamate pool. **Prog Biophys Mol Biol.**, v. 60(1), p. 47-57, 1993.

GERLACH, M., BEN-SHACHAR, D., RIEDERER, P.; YODIM, M.B.H. Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases? **J. Neurochem.**, v. 63, p. 793- 807, 1994.

GEREBEN, B.; ZAVACKI, A.M.; RIBICH, S.; KIM, B.W; HUANG, S.A.; SIMONIDES, W.S.; ZEÖLD, A.; BIANCO, A. C. Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. **Endocr Rev.**, v. 29(7), p. 898-938, 2008.

GETHER, U.; ANDERSEN, P.H.; LARSSON, O.M.; SCHOUSBOE, A. Neurotransmitter transporters: molecular function of important drug targets. **Trends Pharmacol Sci.**, v. 27(7), p. 375-83, 2006.

GLIDDON, C. M.; SHAO, Z.; LEMAISTRE, J. L.; ANDERSON, C. M. Cellular distribution of the neutral amino acid transporter subtype ASCT2 in mouse brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 108, p. 372-382, 2009.

GREDILLA, R.; LÓPEZ, TORRES. M.; PORTERO-OTÍN, M.; PAMPLONA, R.; BARJA, G. Influence of hyper- and hypothyroidism on lipid peroxidation, unsaturation of phospholipids, glutathione system and oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mice skeletal muscle. **Mol Cell Biochem.**, v. 221(1-2), p. 41-8, 2001.

GRIENGLING, K.K.; FITZGERALD, G.A. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. **Circulation.**, v. 108(16), p.1912-6, 2003.

GUERRA, B.A.; BOLIN, A.P.; MORANDI, A.C.; OTTON, R. Glycolaldehyde impairs neutrophil biochemical parameters by an oxidative and calcium-dependent mechanism--protective role of antioxidants astaxanthin and vitamin C. **Diabetes Res Clin Pract.**, v. 98(1), p.108-18,2012.

GUERRERO, A.L.; DORADO-MARTÍNEZ, C.; RODRIGUEZ, A.; PEDROZA-RÍOS, K.; BORGONIO-PÉREZ, G.; RIVAS-ARANCIBIA, S. Effects of vitamin E on ozone-induced memory deficits and lipid peroxidation in rats. **Neuroreport.** v.10 (8), p.1689-92, 1999.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiología Médica**, 11 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 1152 p, 2006.

GUNDERSEN, H.J; Notes on the estimation on the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. **J Microsc.**, v. 111, p. 219-223,1981.

GUNDERSEN, H.J.; OSTERBY, R. Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology: or "do more less well". **J Microsc.**, v 121, p. 65-73, 1988.

HALLIWELL, B.; Reactive oxygen species and the central nervous system. **J Neurochem.** v. 59(5), p.1609-23, 1992.

HALLIWELL, B.; Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? **Lancet.**, v. 344(8924), p. 721-4, 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. **Free radicals in biology and medicine**, 3ed. Clarendon, Oxford, 2000.

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 (2), p. 231-55, 2004.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **J Neurochem** v. 97, p.1634-58, 2006.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4.ed. Oxford University Press. 2007.

HASSEL, B.; DINGLELINE, R. Glutamate and glutamate receptors. In: Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects, **Elsevier Academic Press.**, San Diego, p. 342 -361, 2006.

HERTZ, L.; Glutamate, a neurotransmitter -and so much more.A synopsis of Wierzba III.**Neurochem Int.**, v. 48 (6-7), p. 416-25, 2006.

HO, H.N.; WU, M.Y.; CHEN, S.U.; CHAO, K.H.; CHEN, C.D.; YANG, Y.S. Total antioxidant status and nitric oxide do not increase in peritoneal fluids from women with endometriosis. **Hum Reprod.**,v.12 (12), p.2810-5, 1997.

HOLLOWELL, J.G.; STAEHLING, N.W.; FLANDERS, W.D.; HANNON, W.H.; GUNTER, E. W.; SPENCER, C.A.; BRAVERMAN, L.E.; Serum TSH, T(4), and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III).**J Clin Endocrinol Metab.** , v. 87(2), p.489-99, 2002.

HOWARD,C.V.; REED, M.G.; Unbiased stereology:Three-dimensional measurement in microscopy, 2nd edn. **BIOS:Scientific Publication**, New York, 2005.

HUANG, S. A.; DORFMAN, D.M.; GENEST, D.R.; SALVATORE, D.; LARSEN, P. R. Type 3 iodothyronine deiodinase is highly expressed in the human uteroplacental unit and in fetal epithelium. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 88(3), p. 1384-8, 2003.

HUANG, Y. H.; SINHA, S. R.; TANAKA, K.; ROTHSTEIN, J. D.;BERGLES, D. E. Astrocyte glutamate transporters regulate metabotropic glutamate receptor-mediated excitation of hippocampal interneurons. **J Neurosci.**, v, 24 (19), p. 4551-9, 2004.

HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P.; FÁTIMA, A. glutationa e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, 1170-1179, 2008.

HUR, E.M.; ZHOU, F. Q. GSK3 signalling in neural development.**Nat Rev Neurosci.**, v.11 (8), p. 539-51, 2010.

HYDE, R.; PEYROLLIER, K.; HUNDAL, H.S. Insulin promotes the cell surface recruitment of the SAT2/ATA2 system A amino acid transporter from an endosomal compartment in skeletal muscle cells. **J Biol Chem.**, v. 277(16), p. 13628-34, 2002.

IGLESIAS, P.; LÁZARO, J.; VELASCO, G.; DÍEZ, J.J. Thyroid dysfunction in hospital worker population. **Rev Clin Esp.**, v. 210(10), p. 505-508, 2010.

INCERPI, S.; Thyroid hormones: rapid reply by surface delivery only. **Endocrinology.**, v. 146(7), p 2861-2863, 2005.

JIANG, E.; YAN, X.; WENG, H.R. Glial glutamate transporter and glutamine synthetase regulate GABAergic synaptic strength in the spinal dorsal horn. **J Neurochem.**, v. 121(4), p. 526-536, 2012.

JUNQUEIRA, V.B.C.; SIMIZU, K.; VIDELA, L.A.; BARROS, S.B.M. Dose-dependent study of the effects of acute lindane administration on rat liver superoxide anion production, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation. **Toxicol.** 41: 193-204, 1986.

KANNER, J.; GERMAN, J.B.; KINSELLA, J.E. Initiation of lipid peroxidation in biological systems. **Crit Rev Food Sci Nutr.**, v. 25(4), p. 317-64, 1987.

KARBOWNIK, M.; LEWIŃSKI, A. Melatonin reduces Fenton reaction-induced lipid peroxidation in porcine thyroid tissue. **J Cell Biochem.**, v. 90(4), p. 806-11, 2003.

KOMOSINSKA-VASSEV, K. ; OLCZYK, K.; KUCHARZ, E. J.; MARCISZ, C.; WINSZ-SZCZOTKA, K.; KOTULSKA, A. Free radical activity and antioxidant defense mechanisms in patients with hyperthyroidism due to Graves' disease during therapy. **Clin Chim Acta.**, v. 300 (1-2), p. 107-17, 2000.

KÖHRLE, J. Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 1514, p. 103-119, 1999.

KÖHRLE, J. Thyroid hormone transporters in health and disease: advances in thyroid hormone deiodination. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 21, p. 173-191, 2007.

KOOHESTANI, F.; BROWN, C. M.; MEISAMI, E. Differential effects of developmental hypo- and hyperthyroidism on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity in the spinal cord of developing postnatal rat pups. **Int J Dev Neurosci.**, v. 30(7), p. 570-577, 2012.

KOOP, RONALD. Combinatorial biomarkers: From early toxicology assays to patient population profiling. **Drug Discov Today.**, v.10(11), p. 781-788, 2005.

KUMAR, T.R.; WISEMAN, A.L.; KALA, G.; KALA, S.V.; MATZUK, M.M.; LIEBERMAN, M.W. Reproductive defects in gamma-glutamyl transpeptidase - deficient mice. **Endocrinology**, v.141, p. 4270-4277, 2000.

KUNZ, N.; CAMM, E.; SOMM.E.; LODYGENSKY, G.; DARBRE, S.; AUBERT, M.; HUPPI,P; SIZONENKO, S. GRUETTER, R.; Developmental and metabolic brain alterations in rats exposed to bisphenol A during gestation and lactation. **Int. J. Devl. Neuroscience.**, v 29, p. 37- 43, 2011.

KUSSMAUL, L.; HAMPRECHT, B.; DRINGEN, R. The detoxification of cumene hydroperoxide by the glutathione system of cultured astroglial cells hinges on hexose availability for the regeneration of NADPH. **J Neurochem.**, v,73(3), p.1246-53,1999.

LAAKE, J.H.; SLYNGSTAD, T.A.; HAUG, F.M.; OTTERSEN, O.P. Glutamine from glial cells is essential for the maintenance of the nerve terminal pool of glutamate: immunogold evidence from hippocampal slice cultures. **J Neurochem.**,v. 65(2), p. 871-81, 1995.

LARSEN, P.R.; Thyroid physiology becomes more complicated. **Nat Clin Pract Endocrinol Metab.**, v. 3(7), p. 495, 2007.

LECHAN, R.M.; FEKETE, C. Central mechanisms for thyroid hormone regulation. **Am J Psychiatry.**, v. 163(9), p. 1492, 2006.

LEONARD, J.L.; EKENBARGER, D.M; FRANK, S.J; FARWELL, A.P.; KOEHRLE, J. Localization of type I iodothyronine 5'-deiodinase to the basolateral plasma membrane in renal cortical epithelial cells. **J Biol Chem.**, v. 266(17), p. 11262-9, 1991.

LIGUZ-LECZYNAR, M.; SKANGIEL-KRAMSKA, J.; Vesicular glutamate transporters (VGLUTs): the three musketeers of glutamatergic system. **Acta Neurobiol Exp (Wars)**., v. 67(3), p. 207-18, 2007.

LI, H.S.; CARAYANNIOTIS, G. Induction of goitrous hypothyroidism by dietary iodide in SJL mice. **Endocrinology**., v. 148(6), p. 2747-2752, 2007.

LIMA, F.R.; TRENTIN, A.G.; ROSENTHAL, D.; CHAGAS, C.; MOURA, NETO. V. Thyroid hormone induces protein secretion and morphological changes in astroglial cells with an increase in expression of glial fibrillary acidic protein. **J Endocrinol.**, v.154 (1), p.167-75. 1997.

LIVINGSTONE, D.R.; Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Mar Pollut Bull.**, v.42 (8), p. 656-66, 2001.

LOSI, G; GARZON, G; PUJA, G. Nongenomic regulation of glutamatergic neurotransmission in hippocampus by thyroid hormones. **Neuroscience**, v.151, p.155-63, 2008.

LÖSEL, R.; WEHLING, M. Nongenomic actions of steroid hormones. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 4(1), p. 46-56, 2003.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem**, 193; 265-267, 1951.

LUEGMAYR, E.; VARGA, F.; FRANK, T.; ROSCHGER, P.; KLAUSHOFER, K. Effects of triiodothyronine on morphology, growth behavior, and the actin cytoskeleton in mouse osteoblastic cells (MC3T3-E1). **Bone.**, v. 18(6), p. 591-9, 1996.

MAIA, A.L.; KIEFFER, J.D.; HARNEY, J.W.; LARSEN, P.R. Effect of 3,5,3'-Triiodothyronine (T₃) administration on diol gene expression and T₃ metabolism in normal and type 1 deiodinase-deficient mice. **Endocrinology**, v. 136(11), p. 4842-4849, 1995.

MAGNER, J.A. Thyroid-stimulating hormone: biosynthesis, cell biology, and bioactivity. **Endocr Rev.**, v. 11(2), p. 354-85, 1990.

MASON, G. A; WALKER, C.H; PRANGE A. J JUNIOR. Modulation of gamma-aminobutyric acid uptake of rat brain synaptosomes by thyroid hormones. **Neuropsychopharmacology**, v. 1, p. 63-70, 1987.

MAÇAO, L.B.; WILHELM, FILHO D.; PEDROSA, R.C; PEREIRA, A.; BACKES, P.; TORRES, M.A.; FRÖDE, T.S. Antioxidant therapy attenuates oxidative stress in chronic cardiopathy associated with Chagas' disease. **Int J Cardiol.**, v.123 (1), p.43-9, 2007.

MARTINEZ-HERNANDEZ, A.; BELL, KP.; NORENBERG, MD. Glutamine synthetase: glial localization in brain. **Science**, v. 195(4284), p. 1356-8, 1977.

MARTIN, J.V.; WILLIAMS, D.B; FITZGERALD, R.M; IM, H. K.; VONVOIGTLANDER, P. F. Thyroid hormonal modulation of the binding and activity of the GABAA receptor complex of brain. **Neuroscience**, v. 73(3), p. 705-13, 1996.

MATSUZAWA-NAGATA, N.; TAKAMURA, T.; ANDO, H.; NAKAMURA, S.; KURITA, S.; MISU, H.; OTA, T.; YOKOYAMA, M.; HONDA, M.; MIYAMOTO, K.; KANEKO, S. Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. **Metabolism**, v. 57(8), p.1071-7, 2008.

McKENNA, M. C.; DIENEL, G.A.; SONNEWALD, U.; WAAGEPETERSEN, S.H.; SHOUSBOE, A.; Energy metabolism of the brain. In: Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects, **Elsevier Academic Press**, San Diego, p.200-215, 2006.

McCARTHY, M.M.; AMATEAU, S.K.; MONG, J.A.; Steroid modulation of astrocytes in the neonatal brain: implications for adult reproductive function. **Biol Reprod.**, v. 67(3), p.691-698, 2002.

MELDRUM, B.S.; Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **J Nutr.**, v.130 (4S), p-1007S-15S, 2000.

MENEZES, C.C.; FONSECA, M.B.; LORO, V.L.; SANTI, A.; CATTANEO, R.; CLASEN, B.; PRETTO, A.; MORSCH, V.M. Roundup effects on oxidative stress parameters and recovery pattern of *Rhamdia quelen*, **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 60, p. 665–671, 2011.

MEYER, E.L.; WAGNER, M.S.; MAIA, A.L.; Iodothyronine deiodinases expression in thyroid neoplasias. **Arq Bras Endocrinol Metabol.**, v. 51(5), p. 690-700, 2007.

MOLZ, S.; DAL-CIM, T.; BUDNI, J.; MARTÍN-DE-SAAVEDRA, MD.; EGEA, J.; ROMERO A, DEL BARRIO L.; RODRIGUES, AL.; LÓPEZ, MG.; TASCIA, CI. Neuroprotective effect of guanosine against glutamate-induced cell death in rat hippocampal slices is mediated by the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt/ glycogen synthase kinase 3 β pathway activation and inducible nitric oxide synthase inhibition. **J Neurosci Res.**; v. 89(9), p. 1400-8, 2011.

MORENO, M.; LANGE, P.; LOMBARDI, A.; SILVESTRI, E.; LANNI, A.; GOGLIA, F. Metabolic effects of thyroid hormone derivatives. **Thyroid**, v. 18, p. 239-253, 2008.

NIWA, Y.; SUMI, H.; KAWAHIRA, K.; TERASHIMA, T.; NAKAMURA, T.; AKAMATSU, H. Protein oxidative damage in the stratum corneum: Evidence for a link between environmental oxidants and the changing prevalence and nature of atopic dermatitis in Japan. **Br J Dermatol.**, v.149(2), p. 248-54, 2003.

NORDEN, D. M.; GODBOUT, J.P. Review: microglia of the aged brain: primed to be activated and resistant to regulation. **Neuropathol Appl Neurobiol.**, v. 39(1), p. 19-34, 2013.

NUSSEY, S.; WHITEHEAD, S. Endocrinology: An Integrated Approach. **BIOS Scientific Publishers.**, 2001.

OPPELT, D.; RODNIGHT, R.; HORN, J.; FITARELLI, D.; KOMMERS, T.; OLIVEIRA, D.; WOFCHUK, S. Role of intracellular calcium stores on the effect of metabotropic glutamate receptors on phosphorylation of glial fibrillary acidic protein in hippocampal slices from immature rats. **Neurochem Res.**, v. 29(8), p. 1541-1545, 2004.

OPPENHEIMER, J.H.; SCHWARTZ, H.L. Molecular basis of thyroid hormone-dependent brain development. **Endocr Rev.**, v. 18(4), p. 462-75, 1997.

ORREGO, F.; VILLANUEVA, S.; The chemical nature of the main central excitatory transmitter: a critical appraisal based upon release studies and synaptic vesicle localization. **Neuroscience.**, v. 56(3), p. 539-55, 1993.

PAMPLONA, R.; PORTERO-OTÍN, M.; RUIZ, C.; BELLMUNT, M.J.; REQUENA, J.R.; THORPE, S.R.; BAYNES, J.W.; ROMERO, M.; LÓPEZ-TORRES, M.; BARJA, G. Thyroid status modulates glycooxidative and lipoxidative modification of tissue proteins. **Free Radic Biol Med.**, v. (7-8), p.901-10,1999.

PAP, M.; COOPER, G.M. Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway. **J Biol Chem.**, v. 273(32), p. 19929-32, 1998.

PATRICK, L. Thyroid Disruption: Mechanisms and Clinical Implications in Human Health. **Alt Med Rev**, v.14, p. 326-346, 2009.

PARPURA, V.; BASARSKY, T.A.; LIU, F.; JEFTINIJA, K.; JEFTINIJA, S.; HAYDON, PG.; Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. **Nature**. v. 369(6483), p. 744-747, 1994.

PASICHNA, E.P.; MOROZOVA, R.P.; DONCHENKO, H.V.; VINYCHUK, S.M.; KOPCHAK, O.O. Lipid peroxidation and antioxidant defence enzyme activity in multiple sclerosis. **Ukr Biokhim Zh.**, v. 79 (5), p. 165-74, 2007.

PASQUINI, J.M.; ADAMO, A.M. Thyroid hormones and the central nervous system. **Dev. Neurosci.** ; v.16 (1-2), p.1-8, 1994.

PASTI, L.; VOLTERRA, A.; POZZAN, T.; CARMIGNOTO, G. Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. **J Neurosci.**, v. 17(20), p. 7817-30, 1997.

PAXINOS, G.; WATSON, C.; **The rat brain in stereotaxic coordinates**, 6th end. Academic Press, San Diego, 2008.

PESSOA-PUREUR, R.; WAJNER, M. Cytoskeleton as a potential target in the neuropathology of maple syrup urine disease: insight from animal studies. **J Inherit Metab Dis.**, v. 30, p.664-72, 2007.

PIETRZYKOWSKI, A.Z.; STACHELEK, S.J.; LEONARD, J.L. Regulation of cerebellar neuronal migration and neurite outgrowth by thyroxine and 3,3',5'-triiodothyronine. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 154, p. 121-135, 2005.

POLAK, M. Hyperthyroidism in early infancy: pathogenesis, clinical features and diagnosis with a focus on neonatal hyperthyroidism. **Thyroid**, v. 8, p.1171-7, 1998.

POON, H.F.; CALABRESE, V.; SCAPAGNINI, G.; BUTTERFIELD, D.A.; Free radicals and brain aging. **Clin.Geriatr. Med.**v. 20 (2), p. 329-359, 2004.

POPOLI, M.; YAN, Z.; MCEWEN, B.S; SANACORA, G.The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. **Nat Rev Neurosci.**, v. 13(1), p. 22-37, 2011.

PORTER, T.G.; MARTIN, D.L; Evidence for feedback regulation of glutamate decarboxylase by gamma-aminobutyric acid.**J Neurochem.**, v. 43(5), p.1464-7, 1984.

RASIA-FILHO, A.A.; XAVIER, L.L.; dos SANTOS, P.; GEHLEN, G.; ACHAVAL, M. Glial fibrillary acidic protein immunodetection and immunoreactivity in the anterior and posterior medial amygdala of male and female rats. **Brain Res.**, v. 58, p. 67-75, 2002.

REIMER, R.J., CHAUDHRY, F.A., GRAY, A.I., EDWARDS, R.H. Amino acid transport system A resembles system N in sequence, but

differs in mechanism. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 97, p. 7715–7720, 2000.

RIVAS-ARANCIBIA, S.; GUEVERA-GUZMÁN, R.; LÓPEZ-VIDAL, Y.; RODRÍGUEZ, E.; ZARNADO, G.; ANGOA, P.M.; RAISMAN, V.R. Oxidative stress caused by ozone exposure induces loss of brain repair in the hippocampus of adult rats. **Toxicol.Sci.**, v. 113(1), p. 187-97, 2010.

SALVATI, S.; ATTORRI, L.; CAMPEGGI, L.M.; OLIVIERI, A.; SORCINI, M.; FORTUNA, S.; PINTOR, A. 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(9), p. 1181-6, 1994.

SÁNCHEZ, G.M. **Ambiente anti-oxidante/pro-oxidante su impacto medico.** 1ª ed .Aracne, 2012.

SAUR, L.; BAPTISTA, P.P.; DE SENNA, P.N.; PAIM, M.F.; NASCIMENTO, P.D.; ILHA, J.; BAGATINI, P.B.; ACHAVAL, M.; XAVIER, L.L. Physical exercise increases GFAP expression and induces morphological changes in hippocampal astrocytes. **Brain Struct Funct.**, v. 219(1), p. 293-302, 2014.

SARKAR, P.K.; In quest of thyroid hormone function in mature mammalian brain. **Indian J Exp Biol.**, v. 40(8), p. 865-73, 2002.

SASAKI, M.; YAMAMOTO, M.; ARISHIMA, K.; EGUSHI, Y. Effects of follicle-stimulating hormone on intermediate filaments and cell division of Sertoli cells of fetal rat testis in culture. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 60, p. 35–39, 1998.

SASAGURI, K.; KUBO, K.Y.; ONO, Y.; YAMAMOTO, T.; WATANABE, K.; KARASAWA, N.; ONOZUKA, M.; Chewing under restraint stress inhibits the stress-induced suppression of cell birth in the dentate gyrus of aged SAMP8 mice. **Neurosci Lett.**, v. 466 (3), p. 109-13, 2009.

SAWYER, D.B.; SIWIK, D.A.; XIAO, L.; PIMENTEL, D.R.; SINGH, K.; COLUCCI, W.S. Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. **J Mol Cell Cardiol.**, v. 34(4), p.379-88, 2002.

SCAPIN, S., LEONI, S., SPAGNUOLO, S., FIORE, A.M., INCERPI, S. Short-term effects of thyroid hormone on the Na, K-ATPase activity of chick embryo hepatocytes during development: focus on signal transduction. **Am J Physiol**, v. 296, p. C4-C12, 2009.

SCAPIN, S., LEONI, S., SPAGNUOLO, S., GNOCCHI, D., DE VITO, P., LULY, P., PEDERSEN, J.Z., INCERPI, S. Short-term effects of thyroid hormones during development: Focus on signal transduction. **Steroids**, v. 75, p. 576-584, 2010.

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **RBME**. 10(10):308-13, 2004.

SCHWARTZ, H.L.; OPPENHEIMER, J.H. Ontogenesis of 3,5,3'-triiodothyronine receptors in neonatal rat brain: dissociation between receptor concentration and stimulation of oxygen consumption by 3,5,3'-triiodothyronine. **Endocrinology**, v. 103(3), p.943-8, 1978.

SCHWARTZ, H.L.; LAZAR, M.A.; OPPENHEIMER, J. H. Widespread distribution of immunoreactive thyroid hormone beta 2 receptor (TR beta 2) in the nuclei of extrapituitary rat tissues. **J Biol Chem.**, v. 269(40), p. 24777-82, 1994.

SEIRA, O.; DEL RÍO, J. A.; Glycogen Synthase Kinase 3 Beta (GSK3 β) at the Tip of Neuronal Development and Regeneration. **Mol Neurobiol.**, 2013.

SEGAL, J.; HARDIMAN, J.; INGBAR, S. H. Stimulation of calcium-ATPase activity by 3,5,3'-tri-iodothyronine in rat thymocyte plasma membranes. A possible role in the modulation of cellular calcium concentration. **Biochem J.**, v. 261, p. 749-754, 1989.

SELENKOW, HA. Therapeutic considerations for thyroxtocosis during pregnancy. In: Fisher, DA, Burrow GN (Eds.), **PerinatalThyroid Physiology and Disease**. Raven Press, New York, p. 145-61, 1975.

SHAPIRO, B. M.; STADTMAN, E. R.; The regulation of glutamine synthesis in microorganisms. **Annu Rev Microbiol.**, v. 24, p. 501-524, 1970.

SHI, Y.B.; RITCHIE, J.W.; TAYLOR, P. M. Complex regulation of thyroid hormone action: multiple opportunities for pharmacological intervention. **Pharmacol Ther.**, v. 94(3), p. 235-51, 2002.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radic Biol Med.**, v. 27(9-10), p.916-21,1999.

SILVA, E.C.; CAJUEIRO, J.F.; SILVA, S.V.; VIDAL, A.H.; SOARES, P.C.; GUERRA, M. M. In vitro evaluation of ram sperm frozen with glycerol, ethylene glycol or acetamide. **Anim Reprod Sci.**,v.132 (3-4), p.155-8, 2012.

SILVA, F.R.M.B.; LEITE, L.D.; BARRETO, K.P.; D'AGOSTINI, C.; ZAMONER, A. Effect of 3,5,3'-Triiodo-L-Thyronine on amino acid accumulation and membrane potential in Sertoli cells of the rat testis. **Life Science**, v. 69, p.977-986, 2001.

SILVA, S.A.; GOULART, E.M.; CHAGAS, A.J; SILVA, G.A.; MARÇAL, L.V.; GOMES, M.N; ALVES, V. M; Screening for congenital hypothyroidism in extreme premature and/or very low birth weight newborns: the importance of a specific protocol. **J Pediatr Endocrinol Metab.**, v. 23(1-2), p. 45-52, 2006.

SILVA, AF.; AGUIAR, M.S.; CARVALHO,O.S.; SANTANA, L.; FRANCO, E.C; LIMA R.R; FEIO, R.A.; FARO, L.R; GOMES-LEAL, W. Hippocampal neuronal loss, decreased GFAP immunoreactivity and cognitive impairment following experimental intoxication of rats with aluminum citrate. **Brain Res.**, v (1491), p. 23-33, 2013.

SIMÃO, A.N.C.; DICHI, J.B.; BARBOSA, D.S.; CECCHINI, R.; DICHI, I. Influence of uric acid and gamma-glutamyltransferase on total antioxidant capacity and oxidative stress in patients with metabolic syndrome. **Nutrition**, v.24, p. 675-681, 2008.

SLATER, T.F.; CHEESEMAN, K.H.; INGOLD, K.U.; Carbon tetrachloride toxicity as a model for studying free-radical mediated liver injury. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.**, v. 311(1152), p. 633-45, 1985.

SMITH, J.W.; EVANS, A.T.; COSTALL, B.; SMYTHE, J.W. Thyroid hormones, brain function and cognition: a brief review. **Neurosci Biobehav Rev.**, v. 26(1), p.45-60, 2002.

SOFRONIEW, M.V.; VINTERS, H.V. Astrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathol.**, v. 119(1), p. 7-35, 2010.

STARKOV, A. A.; POLSTER, B.M.; FISKUM, G.; Regulation of hydrogen peroxide production by brain mitochondria by calcium and Bax. **J Neurochem.** V. 83(1), p. 220-8, 2002 .

STADTAMN, E. R.; GINSBURG, A.; CIARDI, J. E.; YEH, J. HENNIG, S. B.; SHAPIRO, B. M. Multiple molecular forms of glutamine synthetase produced by enzyme catalyzed adenylation and deadenylation reactions. **Adv Enzyme Regul.**, v. 8, p. 99-118, 1970.

STADTMAN, E.R.; MOSKOVITZ, J.; LEVINE, R. L. Oxidation of methionine residues of proteins: biological consequences. **Antioxid Redox Signal.** v. (5), p. 577-82. 2003.

STEPHENSON, F.A.; Structure and trafficking of NMDA and GABAA receptors. **Biochem Soc Trans.**, v. 34(Pt 5), p.877-81, 2006.

SWANSON, R.A.; YING, W.; KAUPPINEN T. M. Astrocyte influences on ischemic neuronal death. **Curr Mol Med.** , v. 4 (2), p. 193-205, 2004.

TAPIA, G. ; GALETOVIC, A.; LEMP, E.; PINO, E.; LISSI, E. Singlet oxygen-mediated photobleaching of the prosthetic group in hemoglobins and c-phycocyanin. **Photochem Photobiol.**, v.70 (4), p. 499-504,1999.

TAYLOR, P.; BROWH J.H. Acetylcholine, in: Basic Neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects, **Elsevier Academic Press.**, San Diego, p. 231-260, 2006.

TSAI, C.C. ; WU, S.B.; CHENG, C.Y.; KAO, S.C.; KAU, H.C.; LEE, S.M.; WEI, Y. H. Increased response to oxidative stress challenge in Graves' ophthalmopathy orbital fibroblasts. **Mol Vis.**, v.17, p 2782-8, 2011.

THOMAS, D.; LIAKOS, V.; VASSILIOU, E.; HATZIMARKOU, F.; TSATSOULIS, A.; KALDRIMIDES, P. Possible reasons for different pattern disappearance of thyroglobulin and thyroidperoxidase autoantibodies in patients with differentiated thyroid carcinoma following total thyroidectomy and iodine-131 ablation. **J Endocrinol Invest.**, v. 30(3), p. 173-180, 2007.

TOYODA, N.; BERRY, M.J., HARNEY, J.W.; LARSEN, P.R. Topological analysis of the integral membrane protein, type 1 iodothyronine deiodinase (D1). **J. Biol. Chem.**, v. 270, p.12310–12318, 1995.

TURRENS, J.F.; Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. **Biosci Rep.**, v. 17(1), p. 3-8, 1997.

TSUKADA, S.; IINO, M.; TAKAYASU, Y.; SHIMAMOTO, K.; OZAWA, S.; Effects of a novel glutamate transporter blocker, (2S,3S)-3-[3-[4-(trifluoromethyl) benzoylamino] benzyloxy]aspartate (TFB-TBOA), on activities of hippocampal neurons. **Neuropharmacology.**, v. 48 (4), p. 479-91, 2005.

UTIGER, R.D; Thyrotropin-releasing hormone and thyrotropin secretion. **J Lab Clin Med.**, v. 109(3), p. 327-335, 1987.

VAN DER GEYTEN, S.; SEGERS, I.; GEREBEN, B.; BARTHA, T.; RUDAS, P.; LARSEN, P.R.; KUHN, E.R.; DARRAS, V.M. Transcriptional regulation of iodothyronine deiodinases during embryonic development. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 183, p. 1–9, 2001.

VAN DER GEYTEN, S.; VAN DEN EYNDE, I.; SEGERS, I.B.; KUHN, E.R.; DARRAS, V.M. Differential expression of iodothyronine deiodinases in chicken tissues during the last week of embryonic development. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 128, p. 65–73, 2002.

VAN HERLE, A.J.; VASSART, G.; DUMONT, J. E. Control of thyroglobulin synthesis and secretion (second of two parts). **N Engl J Med.**, v. 301(6), p. 307-314, 1979.

VAN STRIEN, N.M.; CAPPAERT, N.L.; WITTER, M.P. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. **Nat Rev Neurosci.**, v. 10(4), p. 272-82, 2009.

VAROQUI, H.; SCHÄFER, M.K.; ZHU, H.; WEIHE, E.; ERICKSON, J.D. Identification of the differentiation-associated Na⁺/PI transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses. **J Neurosci.**, v. 22(1), p. 142-55, 2002.

VASCONCELOS, V.M.; WIEGAND, C.; PFLUGMACHER, S. Dynamics of glutathione-S-transferases in *Mytilus galloprovincialis* exposed to toxic *Microcystis aeruginosa* cells, extracts and pure toxins. **Toxicol.**, v. 50(6), p. 740-5, 2007.

VENDITTI, P.; DI MEO, S. Effect of training on antioxidant capacity, tissue damage, and endurance of adult male rats. **Int J Sports Med.**, v. 18 (7), p 497-502, 1997.

VENDITTI, P. ; DE LEO, T. ; DI MEO, S. Antioxidant-sensitive shortening of ventricular action potential in hyperthyroid rats is independent of lipid peroxidation. **Mol Cell Endocrinol.**, v. 142(1-2), p. 15-23, 1998.

VENDITTI, P.; DI MEO, S. Thyroid hormone-induced oxidative stress. **Cell Mol Life Sci.**, v.63 (4), p.414-34, 2006.

VERITY, M.A.; Oxidative damage and repair in the developing nervous system. **Neurotoxicology**, v. 15(1), p.81-91, 1994.

VILLANUEVA, I. ; ALVA-SÁNCHEZ, C.; PACHECO-ROSADO, J. The role of thyroid hormones as inductors of oxidative stress and neurodegeneration. **Oxid Med Cell Longev.**, p. 0-15, 2013.

VOIGT, T. Development of glial cells in the cerebral wall of ferrets: direct tracing of their transformation from radial glia into astrocytes. **J Comp Neurol.**, v. 289(1), p. 74-88, 1989.

WANG, X. & MICHAELIS, E.K., Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. **Front Aging Neurosci.**, v. 2, p.12, 2010.

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

WILSON, L.M; BARRINGTON, S.F; MORRISON, I.D; KETTLE, A.G; O'DOHERTY, M.J; COAKLEY, A.J. Therapeutic implications of thymic uptake of radioiodine in thyroid carcinoma. **Eur J Nucl Med.**, v. 25(6), p. 622-628, 1998.

WING, DA; MILLER, LK; KOONINGS, PP. A comparison of propylthiouracil versus methimazole in the treatment of hyperthyroidism in pregnancy. **Am J Obstet Gynceol**, v. 170, p.90-5, 1994.

WINTERBOURN, C.C.; METODIEWA, D.; The reaction of superoxide with reduced glutathione. **Arch Biochem Biophys.**, v. 314(2), p. 284-90, 1994.

WINKELMANN-DUARTE, E.; TODESCHIN,A.S.; FERNANDES, M.C.; BITTENCOURT, L.C.; PERREIRA, G.A.; SAMIOS, V.; SCHUH A.F; ACHAVAL, M.E; XAVIER L.L, SANVITTO, G.L; MANDARIM-LACERDA,C.; LUCION, A.B. Plastic changes induced by neonatal handling in the hypothalamus of female rats. **Brain Res.** V. 19, p. 20-30, 2007.

WINKELMANN-DUARTE, E.; HOFFMANN, C.; MARTINS, D.; SCHUH, A.; FERNANDES, M.; SANTIN, R., MERLO,S.; SANVITTO,G.; LUCION,A. Early-life environmental intervention may increase the number of neurons, astrocytes, and cellular proliferation in hippocampus of rats. **Ex. Brain Res.** ,v. 215, p. 163-172, 2011.

WINKLER J.; SUHR S.T.; GADE F.H.; THAL L.J. Essential role of neocortical acetylcholine in spatial memory. **Nature.**,v.375, p. 484-487,1995.

WONG, CC; LEUNG, MS. 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, p.143-50, 2001.

WU, Y., KOENING, R.J. Gene regulation by thyroid hormone. **Trends Endocrinol Metabol**, v. 11, p. 207-211, 2000.

WU, S.Y.; GREEN, W.L.; HUANG, W.S.; HAYS MT; CHOPRA, I.J. Alternate pathways of thyroid hormone metabolism. **Thyroid**.v. 15(8), p. 943-58, 2005.

YAVUZ, B.B.; YAVUZ, B.; HALIL, M.; CANKURTARAN, M.; ULGER, Z.; CANKURTARAN, E.S.; AYTEMIR, K.; ARIOGUL, S. Serum elevated gamma glutamyltransferase levels may be a marker for oxidative stress in Alzheimer's disease. **Int Psychogeriatr.**, v. 20 (4), p.815-23, 2008.

YEN, P.M. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. **Physiol Rev.**, v. 81(3), p. 1097-142, 2001.

YUN-ZHONG, F.; SHENG, Y.; GUOYAO, W. Free radicals, antioxidants and nutrition. **Nutrition**, v. 18, p. 872-879, 2002.

XAVIER,L.L.; VIOLA, C.G.; FERRAZ, A.C.; CUNHA, C.; DEONIZIO, J.M.; NETTO, C.A.; ACHAVAL, M. A simple and fast densitometric method for the analysis of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmenta area. **Brain Res.**, v. 16, p.58-64, 2005.

ZAMONER, A; FUNCHAL, C; HEIMFARTH, L; SILVA, FRMB & PESSOA-PUREUR, R. 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, p. 209-24, 2006.

ZAMONER, A; ROYER, C; BARRETO, KP; PESSOA-PUREUR, R & SILVA, FRMB. Ionic involvement and kinase activity on the mechanism of nongenomic action of thyroid hormones on $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in cerebral cortex from young rats. **Neurosci Res.**, v. 57, p. 98-103, 2007a.

ZAMONER, A; FUNCHAL, SILVA, MCJ; GOTTFRIED, C; SILVA, FRMB & PESSOA-PUREUR, R. Thyroid hormones Reorganize the

Cytoskeleton of Glial Cells Through Gfap Phosphorylation and RhoA-Dependent Mechanisms. **Cell Mol Neurobiol.**, v. 27, p.845-65, 2007b.

ZAMONER, A; BARRETO, KP; FILHO, DW; SELL, F; WOEHLE, VM; GUMA, FC; PESSOA-PUREUR, R; SILVA, FR. Propylthiouracil-induced congenital hypothyroidism upregulates vimentin phosphorylation and depletes antioxidant defenses in immature rat testis. **J Mol Endocrinol.**, v. 40, p.125-35, 2008a.

ZAMONER, A; HEIMFARTH, L; LOUREIRO, SO; ROYER, C; SILVA FRMB, PESSOA-PUREUR R. Nongenomic actions of thyroxine modulate intermediate filament phosphorylation in cerebral cortex of rats. **Neuroscience**, v. 156, p.640-52, 2008b.

ZAMONER, A.; PESSOA-PUREUR, R.; Silva, F. R. Membrane-initiated actions of thyroid hormones on the male reproductive system. **Life Sci.**, v. 89 (15-16), p.507-514, 2011.

ZIGMOND, MJ; BLOOM, FE; LANDIES, SC; ROBERTS, JL; SQUIRE, LR. Brain Energy Metabolism. **Fundamental Neuroscience. Academic Press.** Capítulo 14, p. 389-409, 1999.

ZOELLER, R.T.; Environmental chemicals impacting the thyroid: targets and consequences. **Thyroid.**, v.17, p. 811-817, 2007.

ZHU, X.G., HANOVER, J.A., HAGER, G.L., CHENG, S.Y. Hormone-induced translocation of thyroid hormone receptors in living cells visualized using a receptor green fluorescent protein chimera. **J Biol Chem**, v. 273, p. 27058-27063, 1998.

ZINMAN, T.; SHNEYVAYS, V.; TRIBULOVA, N.; MANOACH, M.; SHAINBERG, A. Acute, nongenomic effect of thyroid hormones in preventing calcium overload in newborn rat cardiocytes. **J Cell Physiol.**, v. 207(1), p. 220-31, 2007.

ZWART, L.L.; MEERMAN, J.H.; COMMANDEUR, J.N.; VERMEULEN, N.P.; Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. **Free Radic Biol Med.**, v. 26 (1-2), p.202-26, 1999.