



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

O EFEITO DO HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO SOBRE AS VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR
DE HIPOCAMPOS E HEMISFÉRIOS CEREBRAIS DE RATOS NEONATOS.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal
Co-Orientadora: Profa. Dr^a. Andréa Gonçalves Trentin

Giordano Vosgrau Calloni
Departamento de Bioquímica – CCB – UFSC
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética (BEG) – CCB-UFSC
Fevereiro de 2003



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

O EFEITO DO HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO SOBRE AS VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR
DE HIPOCAMPOS E HEMISFÉRIOS CEREBRAIS DE RATOS NEONATOS.

Trabalho apresentado como requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal
Co-Orientadora: Profa. Dr^a. Andréa Gonçalves Trentin

Giordano Wosgrau Calloni
Departamento de Bioquímica – CCB – UFSC
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética (BEG) – CCB-UFSC
Fevereiro de 2003

O EFEITO DO HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO SOBRE AS VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR
DE HIPOCAMPOS E HEMISFÉRIOS CEREBRAIS DE RATOS NEONATOS.

GIORDANO WOSGRAU CALLONI

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM NEUROCIÊNCIAS

na área de Neurofisiologia.

Orientador

Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal

Coordenadora do Curso

Profa. Dra. Yara Maria Rauh Müller

Banca examinadora:

Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal (Presidente)
Departamento de Bioquímica – CCB – UFSC

Prof. Dr. Carlos Alberto Gonçalves
Departamento de Bioquímica – UFRGs

Prof. Dr^a Carla Inês Tasca
Departamento de Bioquímica – CCB – UFSC

AGRADECIMENTOS

Ao grande mestre, amigo e orientador, Rodrigo Bainy Leal, por sua dedicação e atenção para comigo durante todo este ano. Agradeço-lhe sobretudo pelo grande aprendizado e por toda sua ajuda em diversas situações. Sua seriedade e profissionalismo aliados ao seu bom humor e humildade foram cruciais para solidificar minha formação científica.

À minha grande amiga e orientadora Andréa Gonçalves Trentin e ao Prof. Márcio, pela confiança depositada em mim ao longo destes quase 6 anos de convívio. Espero de coração que estes seis anos sejam multiplicados por 10 e que possamos contar sempre um com o outro, como a família que sempre fomos.

Ao grande amigo Fabiano Cordova, por toda sua ajuda, principalmente no início do trabalho. Sem seu auxílio, com certeza tudo teria sido muito mais difícil para mim. Seu bom humor e tranquilidade foram fundamentais para que este trabalho fosse bem realizado.

As meninas do Lab. Patricia Batista, Ana Paula e Karine pela grande ajuda e pelos momentos de descontração no decorrer de todo o ano.

Aos professores Nelson Gabilan e Carla Tasca e aos alunos Tiago, Simone, Sheila, Daniela, Carla e Rossana, pela simpatia e amizade sempre presente e por me receberem sempre muito bem.

À colega de curso, Michela Mantovani, pela simpatia e pela troca de conhecimentos.

À minha grande amiga e agora madrinha, Cláudia Nedel, por ajudar a segurar todas as barras e complicações do ano, mas principalmente pela confiança, companheirismo e amizade que independentemente da situação sempre estiveram presentes. Ao seu esposo Lúcio, meu grande amigo e agora padrinho, por ser: o cara mais gente boa que já conheci. Obrigado pelos churrascos maravilhosos, pelo som e pelas conversas peculiarmente interessantes. Aos seus 3 filhos, por me trazerem coragem de às vezes pensar em tê-los de tão bem educados e lindos que são. A Dona Aide, por ser uma segunda mãe para mim, com um espírito tão jovem e alegre que nós os mais “novinhos” ficamos com inveja.

Aos amigos das antigas, Ricardo Garcez e Marco Stimamiglio, por toda ajuda e colaboração no cuidar do laboratório, pela amizade e pelos muitos momentos de descontração. Depois do Lúcio, vocês, são os dois caras mais gente boa que já conheci.

Ao grande amigo Evaldo, pela filosofia, por toda a sua ajuda e acolhida quando estive no Rio e pela troca de experiências e de percepção em relação ao mundo e a vida. Que possamos de alguma forma ter ajudado um ao outro no caminho de busca da felicidade.

Ao grande amigo Carlos Penno, pela sua dedicação ao trabalho nos últimos anos, por suas conquistas e pela ansiedade de conhecimento e sabedoria.

Ao amigo Thales Tréz, que acompanha minha consciência e me cobra a responsabilidade da vida dos animais que sacrifico. Sua coragem e o que você representa estarão sempre me acompanhando e me lembrando do respeito que devo às vidas que retiro. Sei que no futuro devolverei não apenas aos seres humanos, mas aos animais a vitalidade de que me aproprio no momento. É uma promessa!!!

Aos amigos da Graduação: Luis Guilherme, Jonice e Mirna, que mesmo bastante afastados sei que lembram de mim como eu lembro deles, ou seja, com carinho e admiração.

À amiga Cidônea Vituri, por sua ajuda em várias das questões burocráticas ao longo do ano e auxiliando o pessoal do laboratório.

Aos “mais novinhos” do laboratório, Aloísio, Marco dos Anjos, Ezequiel, Bruno, Fabíola e Laudete, pela dedicação, por toda ajuda, sendo realmente pessoas muito especiais e cada um ao seu jeito, acabaram por conquistar um lugar especial no lab, tornando-se parte da grande família.

Ao secretário Nivaldo, da Pós-Graduação em Neurociências, e ao secretário Anselmo do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, por serem verdadeiros exemplos de dedicação, estando absolutamente sempre dispostos a ajudar e tornando a vida de todos mais fácil. Além disso, são pessoas incríveis, de um bom humor e simpatia contagiantes.

À Prof. Yara, coordenadora da Pós-Graduação, pela confiança sempre depositada e por esforçar-se em tornar nosso curso sempre melhor.

À amiga e vizinha de lab, Prof. Marguerita, pela ajuda em diversas situações, pelo incentivo sempre presente e pela amizade. Toda minha produção me trará sua lembrança, pois foi quem me encaminhou para o lab. da Prof. Andréa, seis anos atrás. Serei eternamente grato à você.

Ao amigo Prof. Kay, pelas novidades sempre trazidas, pela filosofia, conhecimentos e sabedoria compartilhada, sempre regadas a muita cafeína.

Ao Prof. Vivaldo Moura Neto, por ter me recebido de braços abertos e sempre com muita atenção e cuidados em seu laboratório. Agradeço-lhe pelas oportunidades oferecidas e pela confiança depositada, prometo tentar corresponder às suas expectativas.

A todas as pessoas maravilhosas que encontrei no lab. do Prof. Vivaldo: Dona Ivone, Luciana, Rose e Marcos, Jane, Sheila, Prof. Sandra, Arquimedes, Fábio e Maria, Nilton. Sem vocês nada teria dado certo, cada um ocupa um lugar muito especial no meu coração e não há como esquecer de vocês, mesmo que estejamos afastados.

Ao Prof. Roberto Lent, também por ter aberto completamente as portas do seu laboratório, pela dedicação absoluta que teve comigo, pelo grande tempo que lhe roubei, pelos ensinamentos, enfim, por me servir de exemplo de cientista e principalmente de ser humano. Sua humildade foi talvez o maior ensinamento que pude obter e estará para sempre marcada na minha memória e em meu coração.

A todas as pessoas do lab do Prof. Roberto igualmente maravilhosas que colaboraram de alguma forma ou de outra para facilitar meu trabalho: Danilo, Dudu, Alexandra, Anderson, Antônia, Suzana, Prof. Daniela, Prof. Jean-Cristophe, Prof. João Menezes, Prof. Cecília e especialmente Beth e Mônica que sem dúvida foram meus pontos de apoio no Rio nos momentos de fraqueza, vocês são maravilhosas. Ao grande amigo Adiel, pela simpatia e bom humor constantes, pela troca de informações e por tentar sempre facilitar minha vida. Ao Marcelo Santiago da Biofísica por também me auxiliar muito e que futuramente possamos desenvolver algo juntos.

Aos meus pais, pelo carinho e dedicação, por acreditarem e confiarem em mim. Devo absolutamente tudo a vocês, vocês são o máximo. E, por favor, não se preocupem demais, a vida se encarrega de nos colocar no caminho certo. Parece que vocês sabem disto na teoria, mas na prática é diferente.

A minha esposa, Eloisa, pelo companheirismo, pela paciência, pela alegria e amizade, sem você nada disto teria sentido, pois, onde meu cérebro inquietante e por vezes confuso poderia sempre arranjar um local sereno para se tranqüilizar? Obrigado, por me apoiar sempre em absolutamente tudo.

Aos meus primos Fátima, Osmar, Mariana, Rafael, César, Rita, Júlia e meu afilhado João Pedro, por serem tão queridos e amados. Ao meu primo Cleyton por ter sido sempre um grande companheiro e amigo, o melhor sujeito para se tomar uma boa cerveja.

Ao amigo e padrinho Zanetti e ao amigo e padrinho Fernando, por serem simplesmente, os melhores amigos que alguém pode desejar ter neste mundo.

À minha madrinha Terezinha, pela doçura e diplomacia inigualáveis. Por ter sempre me dado apoio incondicional.

À minha madrinha e cunhada Eva, pelo seu coração maravilhoso, por ter cuidado sempre da nossa querida Eloisa e de mim.

A todos da família da Eloisa: Dona Angelina, Luis e Rose, Tiago, Pedro, Éte e Lelo, Nei, Gil, Lurdinha, Sérgio, Inga e Mariana, Ica e Jairo, Ângela, Débora, Maria Clara e Ana Paula, Juliano, Ana e o bebê da família Ana Júlia, por terem me recebido sempre de braços abertos desde nosso primeiro encontro e por todo amor e carinho que vocês sempre tem me dado nos últimos anos.

À fundação Capes, que através de minha Bolsa e do PROCAD permitiu que este trabalho fosse realizado. Ao CNPq, que auxiliou este trabalho, bem como toda minha Iniciação Científica.

A todos que sentem que deveriam estar de alguma forma incluídos aqui, mas que por diversas razões, (não excludo meu esquecimento, que pode ser momentâneo, mas não eterno, lhes garanto) não estão. A estes já peço desculpas antecipadamente e podem me cobrar mais tarde, apenas suplico-lhes que não fiquem magoados!!! Na verdade todos que passaram pela minha vida se não estão aqui, estão em meu coração, pois a todos sou grato, mesmo os que me machucaram, todos me deram a oportunidade de aprender, de conhecer melhor o mundo, a mim mesmo e aos seres humanos, enfim de viver, que é o que todos em última análise buscamos.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E FIGURAS.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
RESUMO.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV
1 - INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - OS HORMÔNIOS TIREOIDEANOS.....	1
1.2 - ASPECTOS CELULARES DA AÇÃO DE T3.....	5
1.3- ASPECTOS MOLECULARES DA AÇÃO DE T3.....	7
1.4- PRINCÍPIOS GERAIS DA SINALIZAÇÃO CELULAR.....	10
1.5 - PROTEÍNAS CINASES E FOSFATASES.....	13
1.6 - AS PROTEÍNAS CINASES ATIVADAS POR MITÓGENOS (MAPKS).....	14
1.7 - PROTEÍNAS CINASES REGULADAS POR SINAIS EXTRACELULARES (ERKS).....	15
1.8 - AS PROTEÍNAS CINASES P38.....	17
1.9 - AS PROTEÍNAS CINASES JNK.....	19
1.9.1 - PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO ("HEAT SHOCK PROTEINS- HSPS").....	21
2.0 - JUSTIFICATIVA.....	22
3.0 - OBJETIVOS.....	23
3.1 - OBJETIVO GERAL.....	23
3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
4.0 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1 - MATERIAIS UTILIZADOS.....	24
4.2 - EQUIPAMENTOS.....	24
4.3 - ANIMAIS E TRATAMENTO.....	25
4.4 - OBTENÇÃO DO SORO E DAS ESTRUTURAS CEREBRAIS.....	25
4.5 - DOSAGEM DOS NÍVEIS DE TSH E T4.....	26
4.6 - PREPARO DOS HOMOGENATOS.....	26
4.7 - DOSAGEM DO CONTEÚDO PROTÉICO TOTAL.....	27

4.8 - ELETROFORESE EM GÉIS DE POLIACRILAMIDA (SDS/PAGE).....	28
4.9 - ELETROTRANSFERÊNCIA.....	29
4.9.1 - IMUNODETECÇÃO.....	30
4.9.2 - ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
4.9.3 - FLUXOGRAMA ESQUEMÁTICO DA METODOLOGIA.....	32
5.0 - RESULTADOS.....	33
5.1-FOSFORILAÇÃO DE ERK-2 EM HIPOCAMPOS E HEMISFÉRIOS CEREBRAIS DE RATOS HIPOTIROIDEOS.....	34
5.2-FOSFORILAÇÃO DE p38 ^{MAPK} EM HIPOCAMPOS E HEMISFÉRIOS CEREBRAIS DE RATOS HIPOTIROIDEOS.....	36
5.3-IMUNOCONTEÚDO DE HSP-70 EM HIPOCAMPOS E HEMISFÉRIOS CEREBRAIS DE RATOS HIPOTIROIDEOS.....	38
5.4-IMUNOCONTEÚDO DE PP1C EM HIPOCAMPOS E HEMISFÉRIOS CEREBRAIS DE RATOS HIPOTIROIDEOS.....	40
5.5-IMUNOCONTEÚDO DE PP2AC EM HIPOCAMPOS E HEMISFÉRIOS CEREBRAIS DE RATOS HIPOTIROIDEOS.....	42
6.0 -DISCUSSÃO.....	44
7.0 - CONCLUSÕES.....	57
8.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 01 - Mecanismo de Ação dos Hormônios Tiroideanos.....	1
Figura 02 - Fonte dos Hormônios Tiroideanos durante o desenvolvimento do Sistema Nervoso Central (<i>Adaptado de Porterfiel & Hendrich, 1993</i>).....	4
Tabela 01 - Genes regulados positivamente e negativamente por T ₃ (<i>Adaptado de Jameson & DeGroot, 1994</i>).....	9
Figura 03 - Os principais eventos que ocorrem durante a Sinalização Celular.....	12
Figura 04 - Ativação de ERK (<i>Adaptado de Sweatt, 2001 e Huskey, 2002</i>).....	16
Figura 05 - Ativação de P38 ^{MAPK}	18
Figura 06 - SDS-PAGE 10% realizado em nosso laboratório.....	28
Figura 07 - Membrana de Nitrocelulose após eletrotransferência.....	29
Figura 08 - Dosagem de TSH e T ₄ no soro de ratos neonatos controles e hipotiroideos.....	33
Figura 09 - Fosforilação de ERK-2 em hipocampos de ratos neonatos hipotiroideos.....	34
Figura 10 - Fosforilação de ERK-2 em hemisférios cerebrais de ratos neonatos hipotiroideos.....	35
Figura 11 - Fosforilação de P38 ^{MAPK} em hipocampos de ratos neonatos hipotiroideos.....	36
Figura 12 - Fosforilação de P38 ^{MAPK} em hemisférios cerebrais de ratos neonatos hipotiroideos.....	37
Figura 13 - Efeito do hipotireoidismo congênito sobre o Imunoconteúdo de Hsp-70 em hipocampos de ratos neonatos.....	38
Figura 14 - Imunoconteúdo da proteína Hsp-70 em hemisférios cerebrais de ratos neonatos hipotiroideos.....	39
Figura 15 - Imunoconteúdo da subunidade catalítica da proteína PP1(PP1c) em hipocampos de ratos neonatos hipotiroideos.....	40
Figura 16 - Imunoconteúdo da subunidade catalítica da proteína PP1(PP1c) em hemisférios cerebrais de ratos neonatos hipotiroideos.....	41

Figura 17 - Imunoconteúdo da subunidade catalítica da proteína PP2A(PP2Ac) em hipocampos de ratos neonatos hipotiroideos.....	42
Figura 18 - Imunoconteúdo da subunidade catalítica da proteína PP2A(PP2Ac) em hemisférios cerebrais de ratos neonatos hipotiroideos.....	43
Figura 19 - Ativação de ERK por T ₄ (<i>Adaptado de Lin, 1999</i>).....	47
Figura 20 - Possível mecanismo pelo qual o aumento nos níveis de TRH poderiam aumentar a fosforilação de ERK-2.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

1. AMP: adenosina de monofosfato
2. AMPc: adenosina de monofosfato cíclico
3. AP-1: proteína ativadora 1
4. ATP: adenosina de trifosfato
5. BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
6. BSA: albumina sérica bovina
7. CaMK: proteína cinase cálcio/calmodulina dependente
8. DMSO: dimetil sulfóxido
9. DTT: ditioneitol
10. ECL: quimiluminescência amplificada
11. EDTA: ácido etileno-dinitrilo-tetra-acético
12. ERK: cinase regulada por sinal extracelular
13. GEF: fatores de troca de nucleotídeos da guanina
14. Gly: glicina
15. GMP: guanosina de monofosfato
16. GMPc: guanosina de monofosfato cíclico
17. Grb2: proteína ligante de receptor de fator de crescimento 2
18. GTP: guanosina trifosfato
19. HO-1: heme-oxigenase 1
20. HSF: fator de choque térmico
21. HSP: proteína de choque térmico
22. JNK: proteína cinase c-Jun NH₂-terminal
23. LTP: potenciação de longa duração
24. MAPK: proteína cinase ativada por mitógeno
25. MAPKAPK2: proteína cinase 2 ativada por proteína cinase ativada por mitógeno
26. MAPKK: cinase da proteína cinase ativada por mitógeno
27. MEK: cinase da proteína cinase regulada por sinal extracelular

28. MEKK: cinase da cinase da proteína cinase regulada por sinal extracelular
29. MKK: cinase da proteína cinase ativada por mitógeno
30. MMI: Methimazole [1-methylimidazole-2-thiol]
31. NBT: “nitro blue tetrazolium”
32. NF κ B: fator de transcrição nuclear kappa B
33. p38^{MAPK}: proteína cinase ativada por mitógeno de 38 kDa
34. PKC: proteína cinase C
35. PP1: proteína fosfatase 1
36. PP2A: proteína fosfatase 2A
37. Raf: cinase serina/treonina de 74 kDa
38. Ras: proteína G de 21kDa
39. SAPK: proteína cinase ativada por estresse
40. SDS: dodecil sulfato de sódio
41. SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
42. Ser: serina
43. SNC: sistema nervoso central
44. SOS: “son of sevenless”
45. TBS: tampão tris-salina
46. TBS-T: tampão tris-salina com Tween-20
47. TEMED: N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina
48. Thr: treonina
49. TNF α : fator de necrose tumoral α
50. Tyr: tirosina

RESUMO

“O EFEITO DO HIPOTIREOIDISMO CONGÊNITO SOBRE AS VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR DE HIPOCAMPOS E HEMISFÉRIOS CEREBRAIS DE RATOS NEONATOS”

A deficiência dos hormônios tireoideanos durante o desenvolvimento neural produz alterações permanentes e severas na anatomia e função do Sistema Nervoso Central. O hipotireoidismo experimental em ratos neonatos produz deficiências em eventos como proliferação, migração, crescimento axodendrítico e mielinização das células nervosas. Proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) são ativadas por fosforilação e controlam diversos processos celulares, como a embriogênese, diferenciação, proliferação e morte celular. O principal objetivo deste trabalho foi verificar se a deficiência dos hormônios tireoideanos poderia alterar a fosforilação das MAPKs, ERK e p38^{MAPK} em hipocampos e hemisférios cerebrais de ratos neonatos hipotiroideos congênitos. Nós também procuramos por alterações no imunocontéudo da Proteína de Choque Térmico (Hsp-70) e Proteínas Fosfatases (PP1 e PP2A) em ratos hipotiroideos. Ratas fêmeas *Wistar* foram tratadas com uma droga antitireoideana (Methimazole –MMI-0,02%) do 10-13º dia de gestação até o nascimento de seus filhotes. Os ratos neonatos foram mortos por decapitação e os níveis de TSH e T₄ foram dosados no soro. Os hipocampos e hemisférios cerebrais foram removidos e homogeneizados e após foram submetidos à SDS-PAGE. A fosforilação de ERK-2 e p38^{MAPK} e o conteúdo de Hsp70, PP1 e PP2A foram analisados por imunoblotting. O modelo utilizado foi eficiente na produção de ratos hipotiroideos, uma vez que observamos um aumento de 313% nos níveis de TSH e uma diminuição de 86% nos níveis de T₄ no soro de ratos neonatos tratados com MMI-0,02%. Houve um aumento de 50% na fosforilação de ERK-2 e uma diminuição de 50% na fosforilação de p38^{MAPK} em hipocampos de ratos hipotiroideos. Os hemisférios cerebrais não mostraram estas alterações. Os imunocontéudos de Hsp-70, PP1 e PP2A não exibiram alterações tanto em hipocampos quanto em hemisférios cerebrais de ratos hipotiroideos. Nós propomos que o aumento nos níveis de TRH poderia ser o principal responsável pelo significativo aumento na fosforilação de ERK-2 e diminuição na fosforilação de p38^{MAPK} em hipocampos de ratos hipotiroideos. Estas alterações poderiam ser responsáveis por alguns dos efeitos deletérios observados durante o desenvolvimento do SNC de ratos com hipotireoidismo congênito. Financiado por CAPES/PROCAD e CNPq.

ABSTRACT

“THE EFFECT OF CONGENITAL HYPOTHYROIDISM UPON THE CELLULAR SIGNALING PATHWAYS ON HIPPOCAMPI AND CEREBRAL HEMISPHERES OF NEONATAL RATS”.

Thyroid hormone deficiency during the critical period of neural differentiation, produces permanent and severe alterations in the anatomy and function of the nervous system (cretinism). Experimental neonatal hypothyroidism in rats produces deficiency in events like proliferation, migration, axodendritic outgrowth and myelination of nerve cells. Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are activated by phosphorylation and regulate many cellular processes such as embryogenesis, cell differentiation, proliferation and death. The main aim of this work was to verify if the deficiency of thyroid hormones could alter the phosphorylation of MAPKs, ERK and p38^{MAPK} in hippocampi and cerebral hemispheres of congenital neonatal hypothyroid rats. We also look for alterations in the immunocontent of Heat Shock Protein (Hsp-70) and for protein Phosphatases (PP1 and PP2A) in hypothyroid rats. Females *Wistar* rats were treated with an antithyroid drug (Methimazole –MMI-0,02%) from the 10-13th day of gestation until the birth of the rats. The neonatal rats were killed by decapitation and TSH and T₄ levels were measured in serum. The hippocampi and cerebral hemispheres were removed, homogenated and the proteins were separated by SDS-PAGE. The phosphorylation of ERK1/2 and p38^{MAPK}, and the content of Hsp70, PP1 and PP2A were analyzed by immunoblotting. Our model was efficient to produce hypothyroid rats since it was observed an increase of 313% in TSH levels and a decrease of 86% in T₄ levels in the serum of hypothyroid neonatal rats. We verify an increase of 50% in ERK-2 phosphorylation and a decrease in 50% in p38^{MAPK} phosphorylation in hippocampi of hypothyroid rats. The cerebral hemispheres do not show these alterations. The immunocontent of Hsp-70, PP1 and PP2A do not exhibit alterations in both hippocampi and cerebral hemispheres of hypothyroid rats. We propose that the increase in TRH levels could be the major responsible for the significant increase in ERK phosphorylation and decrease in p38^{MAPK} phosphorylation in hippocampi of hypothyroid rats. These alterations could be responsible for some of the deleterious effects observed during the brain development of hypothyroid rats. Supported by CAPES/PROCAD and CNPq.

1. INTRODUÇÃO

1.1 – OS HORMÔNIOS TIREOIDEANOS

A tireóide é uma glândula endócrina que se localiza na parte ínfero-anterior do pescoço. Ela é composta de dois lobos - direito e esquerdo - que se ligam através de uma camada fina de tecido denominada istmo.

Essa glândula é responsável pela produção de triiodotironina (T_3), tiroxina (T_4) e calcitonina. T_4 é o principal produto secretado pela tireóide, sendo transportado por proteínas específicas pela corrente sanguínea até atingir os tecidos alvos. A estrutura lipofílica de T_4 lhe permite atravessar as membranas celulares. Dentro das células do SNC, T_4 é convertido, através da enzima Desiodase II, na forma biologicamente ativa do hormônio (T_3). T_3 liga-se a receptores nucleares e dessa forma atua sobre a expressão gênica, ativando ou inibindo a síntese de proteínas. A fig. 1 ilustra resumidamente este processo:

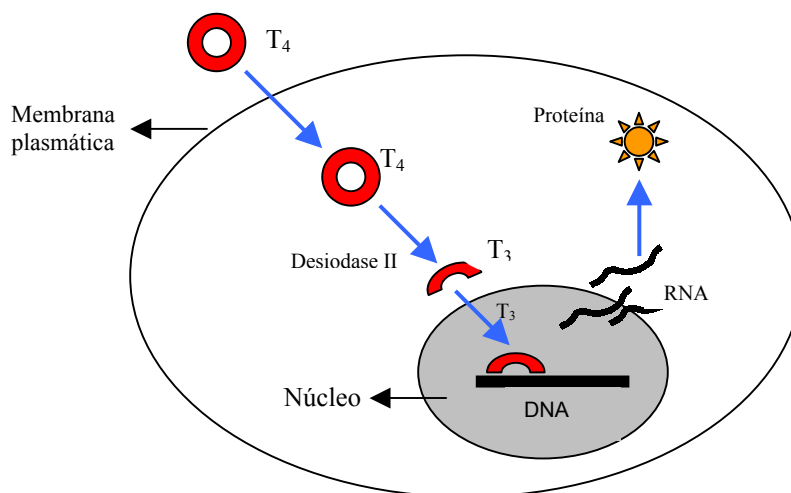


Fig.1 - Mecanismo de ação dos Hormônios Tireoideanos

Há duas isoformas de receptores nucleares tireoideanos (TRs): TR α e TR β . T₃ liga-se com alta afinidade à estes receptores. Os TRs, localizam-se na cromatina interagindo com seqüências específicas de DNA, denominadas de Elementos Responsivos ao Hormônio Tireoideano (TREs). Os TREs geralmente estão localizadas próximos às regiões promotoras de genes responsivos à T₃. Os TR podem se ligar aos TREs como homodímeros ou como heterodímeros com o receptor do ácido retinóico. Além disso, os TR podem se ligar aos TREs na presença ou ausência de T₃. Na ausência de T₃ os receptores interagem com um grupo de proteínas nucleares conhecidas como corepressoras. Na presença de T₃, os receptores interagem com proteínas coativadoras. Portanto, T₃ determina se proteínas corepressoras ou coativadoras estarão localizadas próximas aos sítios de inicialização da transcrição gênica (Chin & Yen, 1997; Koenig, 1998; McKenna et al., 1999).

A biossíntese e a liberação de T₃ e T₄ são controladas por mecanismos reguladores do tipo retroalimentação, os quais mantêm constante a síntese, o estoque e os níveis dos hormônios no sangue. Quando há uma diminuição nos níveis de T₃ e T₄ na circulação sangüínea, estímulos vagais sobre o hipotálamo causam a liberação do TRH (hormônio liberador de tireotrofina). O TRH estimula a hipófise na síntese e liberação do TSH, este por sua vez se liga ao seu receptor, acoplado à proteína Gs, na membrana da célula tireoideana, ativando praticamente todas as etapas da biossíntese de T₃ e T₄. Por sua vez, o aumento nos níveis de T₃ e T₄ circulantes, inibem a síntese e a liberação de TRH e TSH (Dahl, et al., 1994).

O hipotireoidismo é mais comumente causado por problemas na glândula tireóide (hipotireoidismo primário), entretanto, pode também ser causado por problemas na hipófise ou hipotálamo (hipotireoidismo secundário) (Bernal & Nunez, 1995).

O hipotireoidismo congênito é considerado um hipotireoidismo primário, pois pode ocorrer devido à defeitos na glândula tireoideana da mãe e/ou do filho (agenesia, disgenesia, defeito nas

enzimas de síntese de T_3 e/ou T_4). O hipotireoidismo congênito primário também pode ocorrer devido à ausência de iodo na dieta da mãe, sendo denominado de hipotireoidismo congênito endêmico (Bernal & Nunez, 1995).

Independentemente de ser endêmico ou não, o hipotireoidismo congênito, caso não seja tratado dentro de um determinado período, provocará profundas mudanças anatômicas e funcionais no SNC, resultando em retardo mental irreversível (cretinismo) e deficiências no desenvolvimento motor e alterações metabólicas (Porterfield & Hendrich, 1993; Bernal & Nunez, 1995).

No passado, foi proposto que T_3 e T_4 não contribuiriam para o desenvolvimento do SNC (Hamburg, 1964). Entretanto, trabalhos posteriores comprovaram a importância dos hormônios da tireóide no desenvolvimento do SNC, tendo sido demonstrado inclusive que eles podem atravessar a barreira placentária e atenuar os sintomas deletérios ocasionados pelo hipotireoidismo congênito fetal (Vulsma, 1989).

Tanto em seres humanos quanto em ratos, a fonte dos hormônios tireoideanos durante o desenvolvimento neural pode ser dividida em três fases: 1ª fase, o feto é totalmente dependente dos hormônios tireoideanos maternos, 2ª fase, o feto recebe parte dos hormônios da mãe, mas já é capaz de produzir seus próprios hormônios e 3ª fase, a partir do nascimento, o neonato passa a ser o produtor exclusivo desses hormônios.

A figura 2 correlaciona essas 3 fases de síntese dos hormônios tireoideanos, com os principais eventos de desenvolvimento do SNC. Este esquema é de extrema importância para compreensão do papel do hormônio biologicamente ativo (T_3) sobre o desenvolvimento do SNC.

Em humanos, o período entre o segundo trimestre de gestação e os 6 meses após o nascimento é marcado por uma ativa neurogênese e migração neuronal. De maneira aproximada, um rato neonato pode ser comparado à um feto humano no segundo trimestre de gestação (Dussault &

Ruel, 1987). Desta forma, as pesquisas realizadas com o cérebro de ratos neonatos constituem excelentes modelos para uma aproximação dos eventos que ocorrem no SNC de fetos humanos.

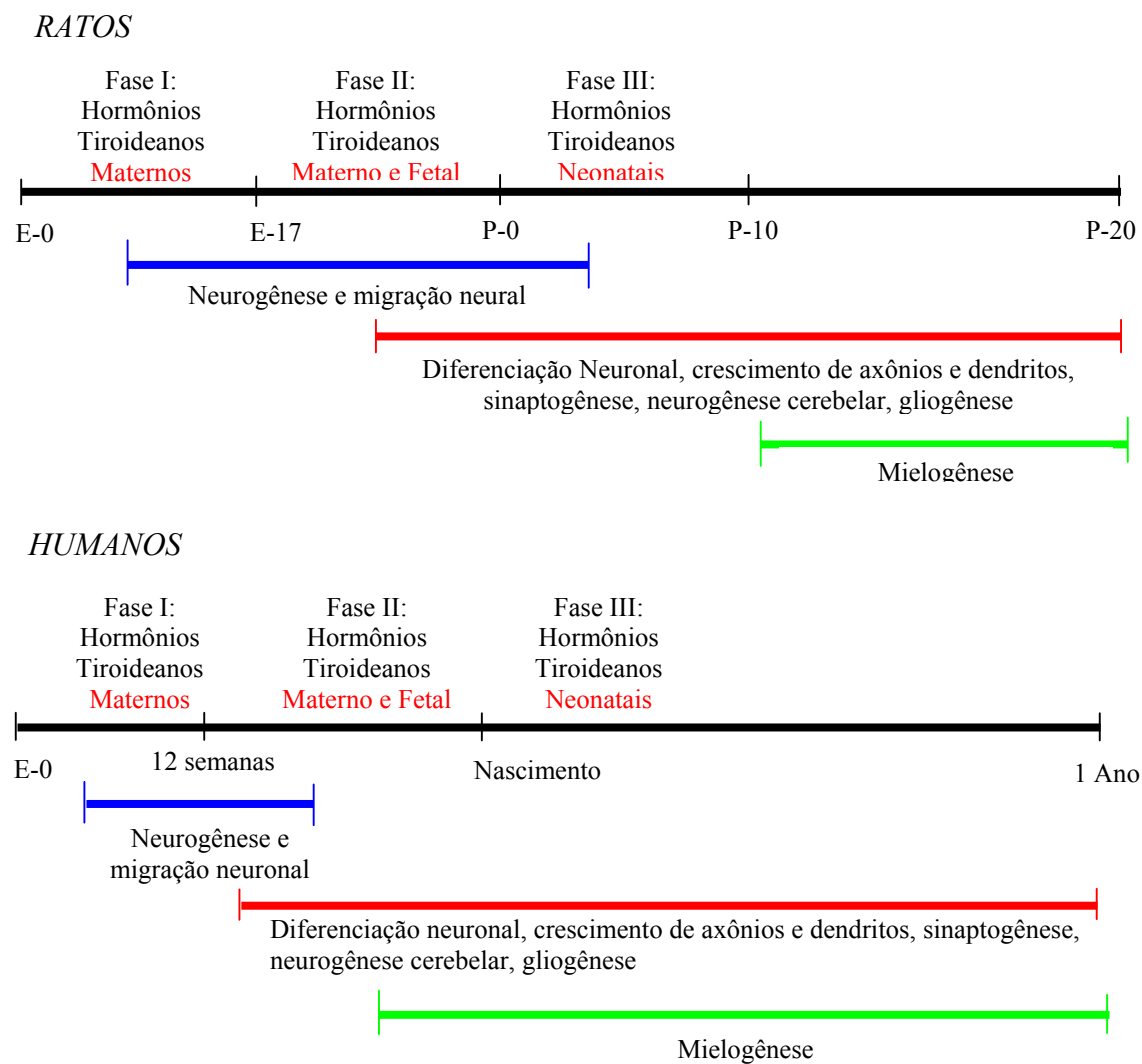


Fig. 2 - Fonte dos Hormônios Tiroideanos durante o Desenvolvimento do SNC.
(Adaptado de Porterfield & Hendrich 1993)

Com base nessa figura, surge uma questão: Que aspectos celulares e moleculares são regulados por T_3 , de forma a coordenar e influenciar de maneira tão crucial os diversos eventos de desenvolvimento do sistema nervoso central?

Os próximos tópicos tentarão aprofundar alguns desses aspectos.

1.2 - ASPECTOS CELULARES DA AÇÃO DE T_3

Processos, como o crescimento axonal e dendrítico, formação de sinapses, mielinização, migração celular e proliferação de populações específicas são regulados direta ou indiretamente pelos hormônios tireoideanos. Análises morfológicas tem identificado o cerebelo, o hipocampo e o córtex cerebral como regiões específicas do cérebro que são afetadas pela deficiência de T_3 (Anderson, 2001).

No cerebelo, a deficiência de T_3 promove atraso de migração das células granulares da camada granular externa (EGL) para a camada granular interna (IGL) e aumento de apoptose neste tipo celular (Legrand, 1967; Pesetsky, 1973). Além disso, prejuízos na formação sináptica e arborização das células de Purkinje, parecem estar relacionados com este aumento na morte das células granulares (Lauder, 1978, 1979; Xiao & Nikodem, 1998). No que diz respeito a glia, a deficiência de T_3 atrasa a maturação dos astrócitos da glia de Bergmann no cerebelo (Pesetsky, 1973).

Em hipocampos, a deficiência de T_3 provoca danos na maturação das células da glia radial na região CA₁ do hipocampo (Martínez-Galán et al., 1997), diminuição no número de células granulares do giro dentado (Rami et al., 1986) e diminuição no volume de fibras e número de sinapses entre fibras muginosas e piramidais (Madeira & Paula Barbosa, 1993). Não foi observada diferença no número de células piramidais hipocampais da região CA3. Entretanto, essas células

exibem atraso no desenvolvimento da árvore dendrítica e uma redução no volume da camada CA3 (Madeira et al., 1992; Rami et al., 1986). O hipotireoidismo neonatal provoca ainda diminuição de células CA1 piramidais (Rami et al., 1986).

No córtex, a deficiência de T_3 resulta em redução do crescimento dendrítico e sinaptogênese (Eayrs, 1955). As células em um cérebro hipotireoideo são, portanto, arranjadas de maneira muito próxima, levando a uma diminuição geral no tamanho do cérebro (Balazs, 1973). O T_3 influencia no tempo de formação e crescimento da camada IV do córtex sensorial primário (Calikoglu, 1996). O corpo caloso de ratos hipotireoideos apresenta números normais de projeções axonais; mas a topografia dos campos de projeção é anormal. Essa topografia anormal parece refletir a imaturidade nas projeções do corpo caloso (Gravel & Rawkes, 1990).

Alguns estudos tem avaliado o efeito de T_3 sobre tipos celulares específicos. Em oligodendrócitos, a deficiência de T_3 promove a proliferação indefinida de células precursoras de oligodendrócitos, denominadas O-2A (Durand & Raff, 2000), diminuição da produção de componentes da mielina (Bhat et al., 1979) e diminuição de oligodendrócitos maduros nos nervos ópticos de ratos e camundongos (Ahlgren et al., 1997; Ibarrola et al, 1996).

Em astrócitos, estudos *in vitro* demonstram que os hormônios da tireóide regulam a polimerização de actina e a organização extracelular de laminina, exercendo funções importantes na migração neural (Farwell et al., 1995). Além disso, tem sido demonstrado que o T_3 pode induzir proliferação de astrócitos *in vitro* (Trentin et al, 1995).

1.3 - ASPECTOS MOLECULARES DA AÇÃO DE T₃

Os processos celulares regulados por T₃ durante o desenvolvimento do SNC são o resultado da modulação gênica controlando a expressão de proteínas.

Em cerebelos vários genes expressos nas células de Purkinje e responsivos à T₃ têm sido identificados, entre eles: PCP-2, calbindina e o receptor de inositoltrifosfato (IP3) (Strait et al., 1992). Outros genes regulados por T₃ no cerebelo são: Reelina, Molécula de Adesão Celular (N-CAM), Tenascina-C e Srg-1. Reelina e N-CAM são moléculas que estão envolvidas em processos de migração neuronal. Tenascina-C é uma molécula da matriz-extracelular envolvida no crescimento neurítico e migração celular. Srg-1 é uma proteína que parece estar relacionada à sinaptotagmina, que é uma proteína ligada à liberação de neurotransmissores (Alvarez-Dolado, et al., 1998, 1999; Iglesias et al., 1996; Thompson & Bottcher, 1997). Tem sido demonstrado ainda que T₃ promove a expressão de *BCL-2* em neurônios granulares cerebelares recém-formados. Entretanto estudos tem demonstrado haver um aumento de apoptose na camada granular interna de animais hipotireoideos (Müller et al., 1995; Xiao & Nikodem, 1998). Através de técnicas de Northern Blot, foi demonstrado que os níveis de RNAm para o genes de actina, α -tubulina e β -tubulina estão reduzidos em cerebelos de ratos neonatos com hipotireoidismo congênito (Poddar et al., 1995). Além disso, a proteína associada aos microtúbulos, (MAP-2), específica para neurônios e exclusivamente localizada nos dendritos, é expressa de forma anormal durante o desenvolvimento do cerebelo de animais com deficiência de T₃ (Silva & Rudas, 1990).

Em hipocampos de ratos neonatos, a deficiência de T₃ promove uma redução na expressão de GFAP nos processos gliais (Martínez-Galán et al, 1997). Os níveis das proteínas Sinapsina I e Sinaptotagmina, ambas envolvidas com a liberação de neurotransmissores estão aumentados em hipocampos de ratos com hipotireoidismo congênito (Vara et al., 2002).

Em hipocampo e córtex já foi demonstrado que o hipotireoidismo congênito diminui os níveis de RNAm e de conteúdo protéico de um fator de transcrição denominado NGFI-A. Este fator é rapidamente ativado quando células quiescentes são estimuladas por mitógenos ou quando neurônios pós-mitóticos são despolarizados (Mellström et al., 1991).

O hipotireoidismo congênito afeta a mielinização em todo o SNC, pois reduz as enzimas envolvidas na síntese dos lipídios da mielina em oligodendrócitos (Bhat et al., 1979; Koibuchi & Chin, 2000). Ocorre também uma diminuição dos níveis de RNA mensageiro das seguintes proteínas: proteína básica mielinica (MBP), proteína proteolipídica (PLP) e glicoproteína associada à mielina (MAG) (Munoz et al., 1991; Strait et al., 1992 e Tosic et al., 1992).

Outros estudos, principalmente em astrócitos, propõem uma ação indireta de T_3 , através da regulação da síntese de fatores de crescimento, que por sua vez atuam diretamente sobre as células. Algumas dessas moléculas são: neurotrofina 3 (NT-3), fator de crescimento do nervo (NGF), fator neurotrófico derivado de cérebro (BDNF) e neurotrofina 4/5 (Giordano et al., 1992; Koibuchi et al., 1999; Neveu et al., 1996).

A tabela 1 (Jameson & DeGroot, 1994) mostra mais alguns genes que são regulados positiva e negativamente por T_3 .

Genes Regulados <i>Positivamente</i> por T₃	Genes Regulados <i>Negativamente</i> por T₃
Hormônio de crescimento (Rato) *	TSH α *
Ocitocina *	TSH β *
Angiotensinogênio	TRH
Somatomamotropina coriônica	Hormônio de crescimento humano*
NGF	Receptor trk β *
EGF	Receptor para EGF *
Receptor adrenérgico β_1	Receptor β_2 para hormônio tireoideano
Fibronectina	Cadeia pesada da miosina β *
Glicoproteína RC3 cerebral	N-CAM
Proteína básica mielínica *	Proteína G - β
Cadeia pesada da miosina α *	
Apo A1	
Enzima málica *	
fosfoenolpiruvato carboxicinase *	
Acetil CoA carboxilase	
HGM-CoA redutase	
Piruvato cinase M1	
Complexo enzimático ácido graxo sintetase	
6-Fosfogluconato desidrogenase	
6-Fosfofruto-2-cinase	
Ca ⁺² -ATPase	
ATPase mitocondrial β FI	
Citocromo C oxidase	
Na ⁺ , K ⁺ ATPase	
Transportador de glicose	

* Regulados diretamente por T₃, uma vez que possuem seqüências *TREs*.

Tabela 1 - Genes regulados positivamente e negativamente por T₃.
(Adaptado de Jameson & DeGroot, 1994).

Podemos observar que o hipocampo, o córtex cerebral e o cerebelo são regiões específicas do encéfalo que são afetadas pela deficiência de T_3 . Cada uma dessas regiões contribuem de alguma forma para os processos cognitivos. Portanto, as alterações moleculares e celulares ocasionadas pela deficiência de T_3 nestas regiões, parecem ser as principais responsáveis pelos déficits cognitivos e motores que são observados nos casos de hipotireoidismo congênito. Como constatamos, muitos dos aspectos celulares e moleculares já foram elucidados nas últimas décadas a respeito dessa deficiência. Tais aspectos não apenas auxiliam no entendimento da patologia do cretinismo, como também fornecem novas pistas a respeito da importância dos hormônios tireoideanos durante o desenvolvimento cerebral.

Entretanto, apesar dos esforços, aspectos tais como o envolvimento de algumas vias de sinalização celular, não foram ainda investigados. Algumas dessas vias exercem papel fundamental nos processos de cognição.

Faz-se, portanto, oportuno pensarmos em pesquisar como estão se comportando essas vias diante de um quadro tão severo de atraso de desenvolvimento neural, cognitivo e motor como o encontrado no hipotireoidismo congênito. Com o objetivo de tornar um pouco mais tênue a linha que separa as ações dos hormônios tireoideanos dessas vias de sinalização, é que vamos explorá-las com mais detalhes a partir de agora.

1.4 – PRINCÍPIOS GERAIS DA SINALIZAÇÃO CELULAR

A sinalização celular é um evento onde um sinal externo é capaz de produzir uma resposta específica na célula. As células respondem a sinais extracelulares através de vários mecanismos, pela transdução de sinais iniciados pela interação de ligantes extracelulares (hormônios, citocinas, neurotransmissores, fatores de crescimento e outras moléculas de sinalização) com receptores

específicos ancorados na membrana plasmática, citoplasma ou núcleo. Esta última categoria pode ser exemplificada pela ligação de T_3 aos seus receptores nucleares, como já discutido anteriormente.

No caso dos receptores ancorados na membrana plasmática, os sinais são transduzidos da superfície celular para o interior da célula através de basicamente dois processos: 1º) pela geração de segundos mensageiros (ativação de receptores acoplados à Proteína G e/ou de canais iônicos) como o cálcio, diacilglicerol, inositol 1,4,5-trisfosfato, AMP cíclico e GMP cíclico, que levam à ativação de proteínas cinases específicas e/ou 2º) pela interação proteína-proteína (por exemplo, através de receptores tirosina cinase).

O resultado final da ativação de uma via de sinalização é a fosforilação de proteínas específicas. Um sistema fosforilante é formado por uma proteína cinase, uma proteína substrato e uma proteína fosfatase.

As cinases são fosfotransferases que catalisam a transferência do fosfato (γ) do ATP para um grupamento hidroxila de resíduos serina; treonina ou tirosina de uma proteína substrato. A defosforilação é catalisada por proteínas fosfatases através da clivagem dessa ligação por hidrólise (Cohen, 1989; Nestler & Greengard, 1999).

Como os grupos fosfatos são carregados negativamente, a fosforilação de uma proteína altera sua carga, a qual pode então alterar a sua conformação e subsequente sua atividade. Dessa forma, a fosforilação/defosforilação de proteínas pode regular a atividade catalítica de enzimas, abertura/fechamento de canais iônicos, atividade de receptores, atividade de fatores de transcrição, localização subcelular de proteínas, dinâmica do citoesqueleto (Nestler & Greengard, 1999).

A figura 3 resume de maneira bastante simplificada os principais eventos que ocorrem durante a sinalização celular:

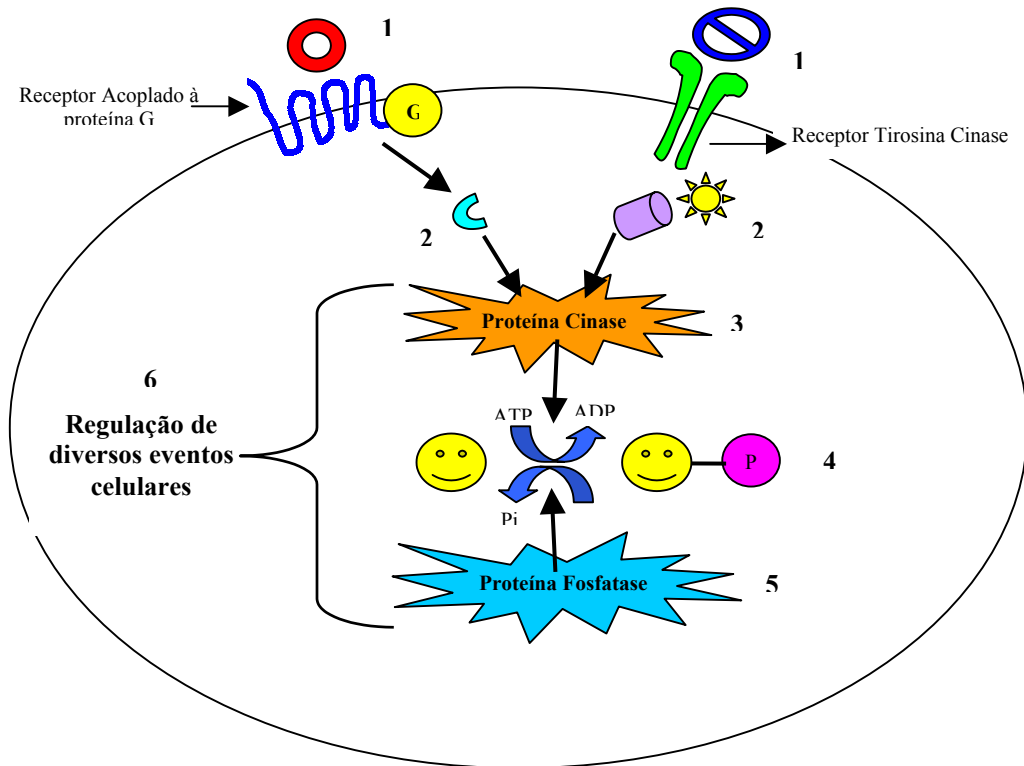


Fig. 3 - Os principais eventos que ocorrem durante a sinalização celular.

1º) Ligação de moléculas (e) com seus respectivos receptores: e), ambos inseridos na membrana plasmática.

2º) A ativação dos receptores tirosina cinase são transduzidos da superfície celular para o interior da célula através de interações proteína-proteína (). Já, a ativação dos receptores acoplados à Proteína G, promovem a geração de segundos mensageiros ().

3º-4º-5º) A interação proteica e a geração de segundos mensageiros podem levar à ativação de proteínas cinases () que fosforilam proteínas alvo (). A defosforilação é realizada por proteínas fosfatases ().

6º) O resultado de todo esse processo é a regulação de diversos eventos celulares.

1.5 - PROTEÍNAS CINASES E PROTEÍNAS FOSFATASES

As proteínas cinases são classificadas como proteínas serina-treonina cinases porque fosforilam os substratos protéicos nos resíduos de aminoácidos serina e treonina, ou também como proteínas tirosinas cinases, as quais fosforilam os substratos protéicos nos resíduos de tirosina. Um pequeno número de proteínas cinases é chamado de cinases de função dupla, pois fosforilam substratos protéicos de resíduos serina-treonina e também de tirosina. Mais de 95% da fosforilação protéica ocorre nos resíduos de serina, 3-4% nos resíduos de treonina e menos de 1% nos resíduos de tirosina.

As proteínas cinases diferem na sua distribuição celular, especificidade de substrato e regulação por mensageiros celulares. Entre as principais cinases do cérebro estão aquelas ativadas por: AMPc (proteína cinase A), GMPc (proteína cinase G), cálcio/calmodulina (proteínas cinase Ca^{2+} -calmodulina dependente) e por cálcio-diacilglicerol (proteína cinase C) e proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) (Sweatt, 2001).

As proteínas fosfatases (serina/treonina) mais bem caracterizadas são: Proteína Fosfatase 1 (PP1), Proteína Fosfatase 2A (PP2A) e calcineurina (PP2B). Cada uma dessas três fosfatases está presente no sistema nervoso central como um todo bem como em neurônios hipocampais. Estruturalmente, PP1 e PP2A são constituídas de uma subunidade catalítica, uma subunidade regulatória e uma subunidade para ancoramento. Os mecanismos que regulam a atividade de PP1 e PP2B podem ser agrupados em 3 grandes categorias: fosforilação das subunidades regulatórias, regulação por cálcio e regulação pela mudança da localização subcelular da proteína fosfatase ou de seu substrato. A regulação de PP2A ainda não é bem caracterizada (Winder & Sweatt, 2001).

Como nosso trabalho está centrado na ação das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs), focalizaremos os próximos tópicos em suas principais características, especialmente envolvendo as proteínas cinases ERK e p38^{MAPK}.

1.6 – AS PROTEÍNAS CINASES ATIVADAS POR MITÓGENOS (MAPKS)

As MAPKs foram primeiramente descritas como “proteínas cinases ativadas por mitógenos” e mostraram exercer um importante papel no crescimento celular. As mesmas enzimas foram descritas no cérebro como “proteínas cinases associadas a microtúbulos” por fosforilarem proteínas associadas aos microtúbulos e outras proteínas do citoesqueleto neural. Entretanto, os mecanismos através dos quais essas enzimas eram controladas por sinais extracelulares permaneciam obscuros até meados dos anos de 1990 (Hunter, 1995; Kortenjann & Shaw, 1995).

Atualmente, é reconhecido que as MAPKs são uma das principais vias pela qual sinais da superfície celular chegam ao núcleo. As MAPKs representam uma família de enzimas subdivididas em três grandes grupos: 1º) proteínas cinases reguladas por sinais extracelulares (ERKs) 2º) proteínas cinases c-Jun NH₂-terminal (JNK, SAPK1) 3º) proteínas cinases p38^{MAPK} (SAPK2). As duas últimas proteínas cinases são ativadas por estresse (Graves et al., 1996; Robinson & Cobb, 1997). As MAPKs fosforilam e regulam um amplo espectro de substratos, incluindo fatores de transcrição, elementos do citoesqueleto e outras proteínas cinases (Lewis et al., 1998). Desta forma, atuam controlando processos complexos, como a embriogênese, diferenciação, proliferação e morte celular, além de fenômenos de plasticidade neural (Pearson & Prozialeck, 2001)

1.7 – PROTEÍNAS CINASES REGULADAS POR SINAIS EXTRACELULARES – ERKS

A cascata das ERKs1/2 está presente em todos os eucariontes e é amplamente utilizada na regulação celular (Robinson & Cobb, 1997; Chang & Karin, 2001). ERKs 1/2 foram os primeiros membros da superfamília das MAPKs cujos c-DNAs foram clonados e as cascatas de sinalização de sua ativação melhor caracterizadas até o momento (Nestler & Greengard, 1999).

Atualmente sabe-se que as MAPKs ERK 1/2 podem ser ativadas através de Receptores Tirosina Kinases (RTKs). Dentre as moléculas que promovem a ativação das ERKs encontramos classicamente os fatores neurotróficos e de crescimento, por exemplo, BDNF e EGF (Hunter et al., 1995; Kortenjann & Shaw, 1995; Seger & Krebs, 1995; Abe et al., 2001). Entretanto essas MAPKs podem ser ativadas também por hormônios, como o estrogênio (Ivanova et al., 2001); choque térmico (Schiaffonati et al., 2001), citocinas (NG & Bogoyevitch., 2000), isquemia (Irving et al., 2000; Gu et al., 2001), estresse oxidativo (Rao, 1996; Aikawa et al., 1997; Bhat & Zhang, 1999; Almazan et al., 2000), metais pesados (Demoor & Koropatnick, 2000) e a proteína S100 β (Gonçalves et al., 2000).

A figura 4 representa o clássico modelo de ativação das ERKs (Davis, 1993). Este modelo de ativação das ERKs por fatores de crescimento nos fará compreender de maneira bastante simplificada os principais mecanismos e componentes envolvidos no processo de transdução dessas MAPKs:

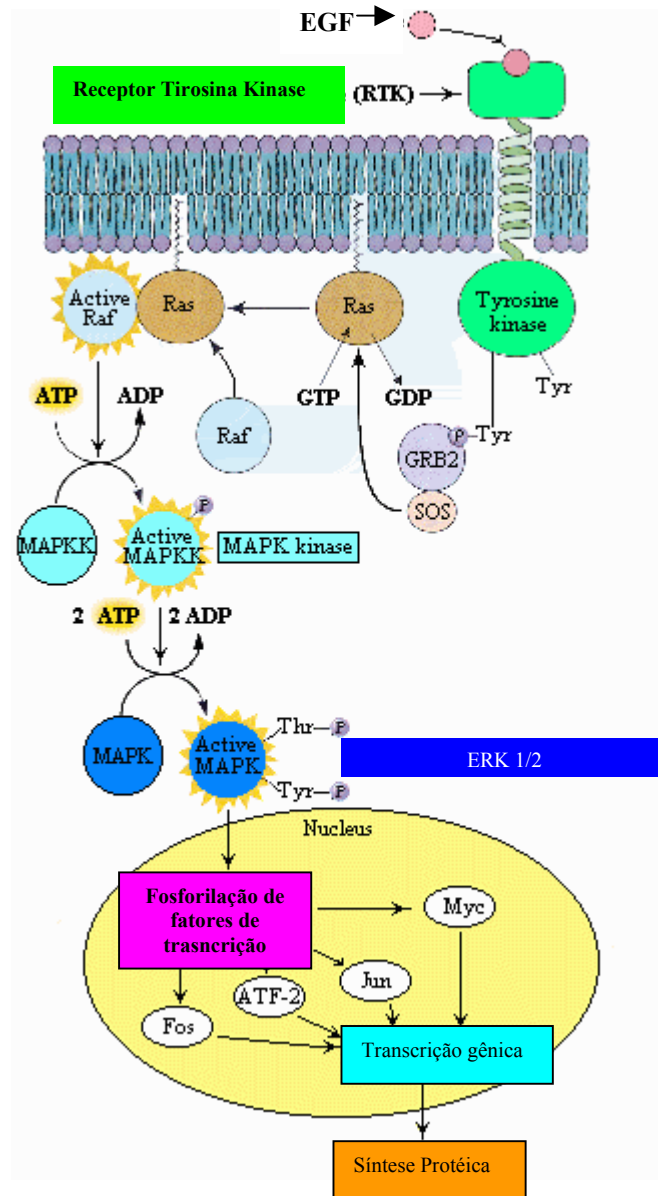


Fig. 4 - Ativação de ERK
 (Adaptado de Sweatt, 2001 e Huskey, 2002)

Inicialmente, temos o acoplamento de um ligante (representado pelo fator de crescimento epidermal - EGF) a receptores transmembrana denominados de Receptores Tirosina Kinase (RTKs). O acoplamento do ligante geralmente resulta em dimerização de domínios intracelulares dos receptores. Esta dimerização permite a ocorrência de autofosforilação sobre resíduos de tirosina dos

receptores. Grb2 é uma proteína adaptadora, que liga-se através de seu único domínio SH2, aos resíduos de tirosina fosforilados dos receptores. Grb2 possui também, dois domínios SH3, os quais interagem com SOS, uma proteína trocadora de nucleotídeos da guanina. SOS age estimulando e promovendo a ligação de GTP sobre a proteína Ras. Ras é uma proteína G solúvel de 21 kDa que ligada ao GTP interage com Raf (chamada MAPKKK), propiciando a translocação desta cinase para membrana plasmática, tornando-a ativa. Raf possui várias isoformas, incluindo C-Raf-1, B-Raf e A-Raf. Raf ativada, fosforila proteínas cinases denominadas MEKs ou MAPKK (MEK1 e MEK2), as quais fosforilam as enzimas MAPK- ERK 1 e ERK 2 (44 e 42 kDa, respectivamente). A fosforilação de ERK 2, por exemplo, ocorre nos resíduos de Thr¹⁸³ e Tyr¹⁸⁵. Esse processo aumenta sua atividade enzimática por aproximadamente 1.000 vezes acima dos níveis basais. As ERKs ativadas translocam-se agora para o núcleo onde participarão da ativação de vários fatores de transcrição, como: Elk 1 (Gille et al., 1992; Marais et al., 1993); CREB (Xing et al., 1996) e c-Myc. Esses fatores de transcrição ativados podem ativar a transcrição de determinados genes, como *c-fos* e *c-jun* (Sweatt, 2001).

1.8 – AS PROTEÍNAS CINASES p38^{MAPK}

As proteínas cinases p38^{MAPK} são altamente conservadas durante a evolução. Por exemplo, a p38^{MAPK} humana é 99% idêntica à de camundongos. Há 5 isoformas de p38^{MAPK} descritas: p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ e p38 β 2 (Han et al., 1994; Jiang et al., 1996; Li et al., 1996; Wang et al., 1997; Kumar et al., 1997). As isoformas p38 α e p38 β são ubiqüitariamente expressas em altos níveis no encéfalo. Essas duas isoformas são na realidade as únicas encontradas no encéfalo (Jiang et al., 1996). A principal isoforma do encéfalo humano é a p38 β 2 (Enslin et al., 1998). Tem sido especulado que cada isoforma é responsável por diferentes funções, particularmente considerando-se

a especificidade a seus substratos (Jiang et al., 1996; Li et al., 1996; Jiang et al., 1997; Wang et al., 1997).

As proteínas cinases $p38^{\text{MAPK}}$ são ativadas pela fosforilação dos resíduos de Thr¹⁸⁰ e Tyr¹⁸². Essa fosforilação é mediada por uma cascata sinalizadora (Whitmarsh & Davis, 1996). A figura 5 ilustra os principais passos e características dessa cascata:

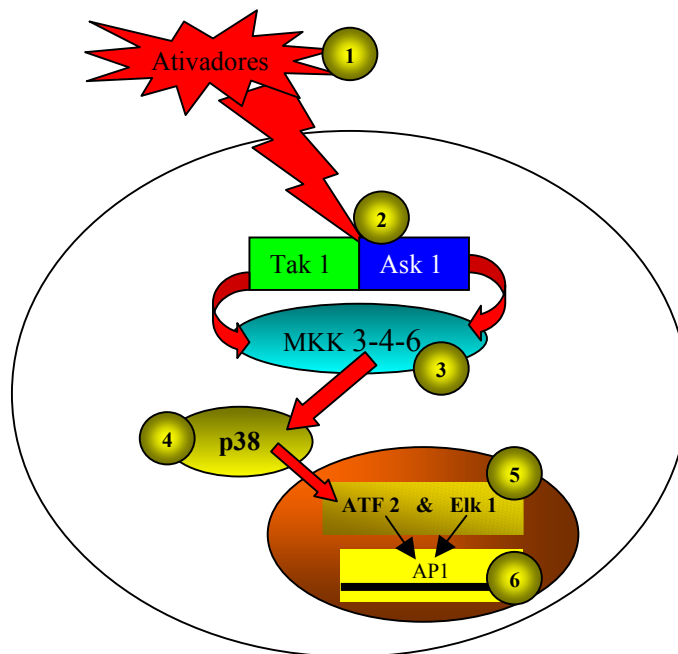


Fig. 5 - Ativação de $p38^{\text{MAPK}}$

1-2) Representa os possíveis ativadores da cascata da $p38^{\text{MAPK}}$, por exemplo, choque térmico, luz ultravioleta, drogas quimioterápicas, anisomicina, sorbitol, radiação gama, citocinas inflamatórias (TNF e IL-1), atuando sobre determinadas Proteínas Cinases, como Tak 1 e Ask 1.

2-3) Tak 1 e Ask 1, por sua vez, ativam as MKK (MAP Kinase Kinase), as quais podem ser MKK 3,4 ou 6.

3-4) As MKK 3, 4 ou 6 ativadas promovem a ativação de $p38^{\text{MAPK}}$ através da fosforilação dos resíduos de Thr¹⁸⁰ e Tyr¹⁸² (Derijard et al., 1995).

4-5-6) A p38^{MAPK}, agora ativada, fosforila determinados substratos, como os fatores de transcrição: ATF2, Elk1, PHAS-I, CHOP-I e outras proteínas cinases, como MAPKAP2, MAPKAP3, MAPKAP5 e Mnk1. A ativação destes fatores de transcrição e proteínas cinases, por sua vez, promove a ativação de genes, como c-fos e c-jun, os quais formam o complexo AP-1. Além disso MAPKAP2 pode fosforilar e regular a atividade da proteína de choque térmico Hsp27 (Sharp et al., 1999).

Devido a essa cascata de ativação, os membros da família das proteínas cinases p38^{MAPK} estão envolvidos na regulação de diversas funções celulares desde o controle da morte celular até a proliferação e diferenciação celular (Xia et al., 1995; Martin-Blanco, 2000; Tadlock & Patel, 2001). Estudos sugerem que essa enzima possui também um importante papel na regulação da resposta imune (Takenaka et al., 1998). A ativação de p38^{MAPK} está sendo correlacionada ainda com o controle do ciclo celular (Lavoie et al., 1996; Molnar et al., 1997; Diehl et al., 2000; Kurata, 2000; Bulavin et al., 2001). No SNC, a ativação de p38^{MAPK} sob estresse pode tanto induzir quanto proteger neurônios da morte celular (Heindenreich & Kummer, 1996; Kawasaki et al., 1997; Kikuchi et al., 2000; Mielke et al., 1999). A alta atividade basal de p38^{MAPK} no SNC está em contradição com a hipótese de que p38^{MAPK} atue unicamente como uma cinase de estresse envolvida em apoptose (Mielke & Herdegen, 2000). Há ainda pouca informação sobre o papel de p38^{MAPK} no tecido nervoso em condições fisiológicas (Campos et al., 2002). Segundo, Mielke e Herdegen, 2000, a estabilização da diferenciação pós-mitótica dos neurônios é um provável papel fisiológico da p38.

1.9 – AS PROTEÍNAS CINASES JNK

Cerca de dez isoformas de JNK são expressas no cérebro humano adulto. Essas dez isoformas são expressas por 3 genes: jnk1, jnk2 e jnk3. JNK 3 é o único membro da família que é

expresso exclusivamente no SNC (Harper & LoGrasso, 2001). As JNKs são ativadas por um grande número de estímulos extracelulares, como: citocinas (TNF α e Il-1), estresse celular (luz UV, ciclohexamida, anisomicina e choque térmico) (Mindén, 1994; Kallunki et al., 1994; Sluss et al., 1994; Derijard et al., 1994; Kyriakis & Avruch, 1996).

Muitos substratos são fosforilados pelas JNKs, incluindo fatores de transcrição, como: c-jun, ATF2, Elk-1, NFAT, (Derijard et al., 1994; Van Dam et al., 1995; Whitmarsh et al., 1995; Chow et al., 1997; Hu et al., 1997). As JNKs podem ainda fosforilar uma variada classe de substratos citoplasmáticos, como: proteínas do citoesqueleto (Reynolds et al., 1997; Giasson & Mushynsky, 1997), p53 (Fuchs et al., 1998), Bcl-2 (Park et al., 1997) e o receptor para glicocorticóides (Rogatsky et al., 1998).

Pouco se conhece sobre a função da ativação das JNKs sob condições fisiológicas. Entretanto a expressão e atividade de JNK sob condições basais, principalmente na ausência de estímulos ambientais nocivos, corrobora para um papel fisiológico das JNKs no SNC. Possíveis papéis fisiológicos para as JNKs seriam a regeneração neuronal, a neuroplasticidade e a modulação apoptótica (Mielke & Herdegen, 2000).

É interessante salientar, entretanto, que já é bem caracterizada a participação das JNKs como mediadoras da morte celular neuronal e da degeneração na excitotoxicidade, isquemia, lesões de fibras nervosas, retirada de fatores tróficos e na toxicidade por metais pesados (Irio et al., 2000; Mielke & Herdegen, 2000). A natureza dupla dessas respostas (morte celular ou regeneração) não é completamente entendida.

1.9.1 – PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO – ("HEAT SHOCK PROTEINS" - HSPS)

Nos tecidos normais são expressas constitutivamente diversos tipos de Hsps: ubiquitina, Hsp110, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp47, Hsp32, Hsp27, HO-1 e GRP78. Estas proteínas exercem funções básicas e indispensáveis, tais como o controle e regulação da conformação de outras proteínas, bem como o movimento dessas proteínas através de membranas ou organelas. Atuam também no controle da disponibilidade de receptores ou atividade de enzimas. Atualmente, as Hsps tem sido envolvidas inclusive nos mecanismos de plasticidade sináptica, como a LTP (Ohtsuka & Suzuki, 2000). As Hsps não são induzidas apenas pelo choque térmico, mas por vários outros tipos de estresses, exercendo em geral um efeito protetor nas células (Rogalla et al., 1999).

A resposta das Hsps ao estresse depende da ativação de fatores ("heat shock factors"; HSFs) que estimulam a transcrição de Hsps (Sharp et al., 1999). A ativação do fator HSF1, por exemplo, envolve sua fosforilação por p38^{MAPK} e/ou ERK1/2 (Hung et al., 1998). A Hsp27 pode ser regulada diretamente por fosforilação dependente da ativação da cascata da p38^{MAPK} (Mielke & Herdegen, 2000). Evidências sugerem que algumas HSPs podem regular negativamente o programa apoptótico, exercendo este efeito de maneira similar à proteína anti-apoptótica Bcl-2, modulando a liberação de citocromo *c* ou o estado redox da célula (Samali & Orrenius, 1998).

2. JUSTIFICATIVA

As proteínas cinases ERK e p38^{MAPK} são fundamentais na regulação e modulação de um amplo espectro de eventos, como proliferação, diferenciação celular e apoptose. Todos estes eventos também são regulados e modulados através dos hormônios tireoideanos, particularmente T₃ (pois é o hormônio biologicamente ativo). O T₃ controla a proliferação e diferenciação de células neurais e gliais, por vários mecanismos que envolvem desde a regulação do citoesqueleto de actina, até a liberação de neurotransmissores. Para muitos destes eventos ocorrerem, a correta ativação de MAPKs também é necessária. Além disso, a ERK-2 está envolvida em mecanismos de memória, tais como a Potenciação de Longa Duração (LTP). O hipotireoidismo congênito por sua vez causa drásticos déficits cognitivos e comportamentais. Curiosamente, os receptores tirosina cinase, principais ativadores de ERK, têm sua expressão aumentada pela diminuição de T₃ como mostra a Tabela I na página 9.

Nos últimos anos, houve um grande progresso no entendimento dos mecanismos moleculares e celulares de T₃. O conhecimento destes mecanismos tem permitido uma melhor compreensão dos aspectos envolvidos não apenas na síndrome do cretinismo, mas também na importância dos hormônios tireoideanos para o desenvolvimento do SNC. Apesar dos esforços, muitos aspectos permanecem obscuros, ou não foram ainda especulados. Nesta última categoria, enquadra-se o nosso trabalho, o qual tentará compreender se os mecanismos de transdução de sinal, particularmente, a fosforilação de ERK-2 e p38^{MAPK}, podem estar alterados nos quadros de deficiência dos hormônios tireoideanos e neste caso, contribuir para as alterações neurais, comportamentais e cognitivas já bem documentadas nos quadros de hipotireoidismo congênito.

3. OBJETIVOS

3.1 - OBJETIVO GERAL:

Investigar os efeitos da deficiência dos hormônios tireoideanos sobre a modulação da fosforilação de proteínas no hipocampo e hemisférios cerebrais, com ênfase nas vias de sinalização das MAPKs.

3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Caracterizar a ativação das proteínas cinases ERK-2 e p38^{MAPK} frente à deficiência dos hormônios tireoideanos em hipocampos e hemisférios cerebrais de ratos neonatos, em modelo de hipotireoidismo congênito.
- Verificar o imunocnteúdo da proteína de estresse Hsp-70 e das subunidades catalíticas das proteínas fosfatases PP1 e PP2A em hipocampos e hemisférios cerebrais de ratos neonatos hipotiroideos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - MATERIAS UTILIZADOS

Coomassie Blue R-250, Tris, Bis-acrilamida, Persulfato de Amônia, TEMED, EDTA, PMSF, Benzamidina, Aprotinina e Padrão de Peso Molecular - GIBCO[®]. SDS e Acrilamida - BIO-RAD[®]. Na₃VO₄, NAF e β-Mercaptoetanol - Riedel-de-Haën[®]. Glicina, Papéis de filtro, esponjas suporte, membrana de Nitrocelulose, Ponceau, kit ECL e anticorpos secundários (mouse e rabbit) conjugados a peroxidase – AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH[®]. Fosfato de Sódio e Fosfato de Potássio - BIOTEC[®]. Ácido Acético e Metanol - NUCLEAR[®]. Cloreto de Potássio - QUIMIDROL[®]. Hidróxido de Sódio - MERCK[®]. Tween 20 e Glicerol - REAGEN[®]. Cloreto de Sódio e Gelatina - VETEC[®]. Soluções Fixadora e Reveladora - KODAK[®]. Albumina de soro bovino, Bromofenol Blue, Methimazole, Anticorpo anti-fosfo-ERK mouse, Anticorpo secundário anti-rabbit conjugado à fosfatase alcalina - SIGMA[®]. Filmes autoradiográficos - BIOMAX[®]. Os anticorpos anti-ERK rabbit, anti-fosfo-p38^{MAPK} rabbit, anti-Hsp70 rabbit, anti-p38^{MAPK} rabbit e os anticorpos secundários anti-mouse ou anti-rabbit conjugados à fosfatase alcalina ou à peroxidase foram obtidos da CALBIOCHEM[®]. Os Anticorpos anti-PP1 rabbit e anti-PP2A rabbit foram gentilmente cedidos pelo Dr. Alistair Sim (The University of Newcastle – Austrália).

4.2 - EQUIPAMENTOS

Agitadores Orbitais - 255-B-FANEN[®] e MOS-1-BIOMIXER[®]. Vortex - AP56-PHOENIX[®]. Poter e Pistilo de Vidro - UNIFORM[®]. Balança Analítica - AB 204 -METTLER TOLEDO[®]. Microcentrífuga - 5415 D - EPPENDORF[®]. Sistema de Eletroforese e Eletrotransferência HOEFER *mini VE* – AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH[®]. Espectrofotômetro - ULTROSPEC 300 – AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH[®]. pHmetro - TM 38 - Sensortechnik Meinsberg GmbH[®].

4.3 – ANIMAIS E TRATAMENTO:

Fêmeas adultas de ratos da linhagem Wistar (*Ratus norvegicus*) com 10-13 dias de gestação foram fornecidas pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). A fim de obter ratos neonatos com hipotireoidismo congênito, essas fêmeas foram tratadas (via oral) até o nascimento de seus filhotes, com 0,02% de 1-methyl-2-mercaptoimidazole (Methimazole; MMI) dissolvido em água de beber *ad libitum*. Este tratamento é um dos mais utilizados para indução de hipotireoidismo congênito em ratos. Methimazole age inibindo a incorporação do iodeto na proteína tireoglobulina que por sua vez, é precursora dos hormônios tireoideanos (Cooper et al., 1984). Este composto bloqueia a atividade tireoideana materna e fetal, pois atravessa a barreira placentária (Marchant et al., 1977). O grupo controle consistiu de fêmeas prenhas que receberam água *ad libitum*. Desta forma cada experimento constava de um grupo de ratos neonatos controle e outro hipotiroideo.

Todos os animais receberam ração *ad libitum* e foram mantidos em ambiente com ciclo claro-escuro de 12 horas e temperatura entre 22 e 25°C, sendo manipulados e sacrificados de acordo com o código de ética de utilização de animais para pesquisa, conforme protocolo aprovado pela CEUA (número: 077/CEUA - 23080.001044/2001-07/UFSC).

4.4- OBTENÇÃO DO SORO E DAS ESTRUTURAS CEREBRAIS:

Ratos neonatos controles e hipotiroideos foram mortos por decapitação utilizando tesoura de aço inoxidável. O sangue destes animais foi coletado em microtubo de polietileno (8-10 animais/grupo; \pm 1 ml de sangue). Para obtenção do soro, foi realizada uma centrifugação de 800 x g por 15 min. O soro obtido foi congelado à -20°C até a realização das dosagens de TSH e T₄ livre.

Até a retirada dos cérebros, as cabeças foram mantidas à 4°C, em solução isosmolar de sacarose 0,32 M diluída em Tampão Fosfato (5 mM Na₂HPO₄, 1,7 mM KH₂PO₄, 2,6 mM KCl, pH 7,4). Os hipocampos e hemisférios cerebrais foram obtidos a partir de grupos distintos de animais.

Para a dissecação dos hipocampos, os cérebros foram seccionados longitudinalmente, sobre uma placa de Petri invertida (4°C), recoberta com papel filtro umedecido com tampão PBS (200 mM NaCl, 5 mM Na₂HPO₄, 1,7 mM KH₂PO₄, 2,6 mM KCl, pH 7,4). Os hipocampos foram retirados com o uso de pincéis finos de pêlo de marta e foram mantidos (cerca de 15 minutos) em Tampão PBS, pH 7,4 à 4°C até o momento da homogeneização.

Para obtenção dos hemisférios cerebrais, os cérebros foram mantidos imersos em PBS, pH 7,4 à 4°C, a meninge foi retirada e a seguir os hemisférios foram separados dos mesencéfalos e cerebelos.

4.5 – DOSAGEM DOS NÍVEIS DE TSH E T₄:

Os soros obtidos de ratos neonatos controles e hipotiroideos foram enviados para o Laboratório Médico de Análises Clínicas de São Paulo (CRIESP), onde foram realizadas as dosagens dos níveis de TSH e T₄. As dosagens foram realizadas pelo método de Imunofluorometria a tempo resolvido (Sensibilidade: 0,003 µU/mL).

4.6 – PREPARO DOS HOMOGENATOS:

Cada homogenato hipocampal foi preparado a partir de um grupo de 8 animais (16 hipocampos; ± 150 mg tecido/tratamento). No caso dos hemisférios cerebrais, cada homogenato foi preparado a partir de um grupo de 4-6 animais (8-12 hemisférios; ± 1 g tecido/tratamento).

Os hipocampos e hemisférios cerebrais foram homogeneizados através de poter e pistilo de vidro em tampão de homogeneização (50 mM de Tris, 1 mM de EDTA, 2 µg/ml de Aprotinina, 2 mM de Benzamidina, 0,1 mM de PMSF, 2 mM de Na₃VO₄, 100 mM de NAF, pH 7,0), na relação de 0,25 g de tecido/ml de tampão. O homogenato foi centrifugado à 1.000 X g, por 10 min, 4°C, usando microcentrífuga. O S1 foi coletado e o “pellet” descartado.

Alíquotas de 10 µl foram recolhidas para dosagem de proteína. A concentração de proteína no sobrenadante variou de 7-9 µg/µl. O S1 foi solubilizado em tampão de eletroforese relação (v/v) de 1/1 (concentração final - 4% de SDS, 50 mM de Tris, 100 mM de EDTA e 8% de β-mercaptoetanol, pH 6,8) e a seguir fervido por 3 minutos. Posteriormente foi adicionada uma solução de glicerol (40% de glicerol, 25 mM de Tris e Bromofenol Blue; pH 6,8) numa proporção de (v/v) 25 µl solução de glicerol/100 µl de solução de amostra. Estas amostras prontas para serem submetidas à eletroforese apresentavam uma concentração final de proteína que variava de 2,8-3,6 µg/µl.

4.7 – DOSAGEM DO CONTEÚDO PROTÉICO TOTAL:

O conteúdo protéico foi quantificado através do método de Bradford (1976), utilizando como padrão albumina sérica (5-40 µg/ml). As medidas de absorbância foram feitas em espectrofotômetro (λ 595nm).

4.8 – ELETROFORESE EM GÉIS DE POLIACRILAMIDA (SDS/PAGE):

Os géis eram preparados em placas de vidro de minigel (10,5 X 12 cm), na espessura de 1 mm, contendo 10 poços e apresentavam a seguinte composição: gel de separação: 10% Acrilamida/Bis-acrilamida (37,5:1; w/w), 375 mM de Tris, 0,1% de SDS, 0,05% de TEMED, 0,1% de persulfato de amônia, pH 8,8; gel de entrada: 4% de Acrilamida/Bis-acrilamida (37,5:1 w/w), 125 mM de Tris, 0,1% de SDS, 0,05% de TEMED, 0,1% de persulfato de amônia; pH 6,8.

Foram aplicados 40 ug de proteína por poço e a separação eletroforética foi realizada com corrente fixa de 20 mA por placa e voltagem livre. A corrida durava aproximadamente 2h e 30 min. Foram utilizados 250 ml de tampão superior (190 mM de glicina, 25 mM de Tris e 0,1% de SDS, pH 8,3) e 800 ml de tampão inferior (50 mM de Tris; pH 8,3) (Laemmli, 1970). Após a corrida, foi realizada eletrotransferência das proteínas para a nitrocelulose. A qualidade da separação das proteínas obtidas pela SDS-PAGE está mostrada na figura 6.

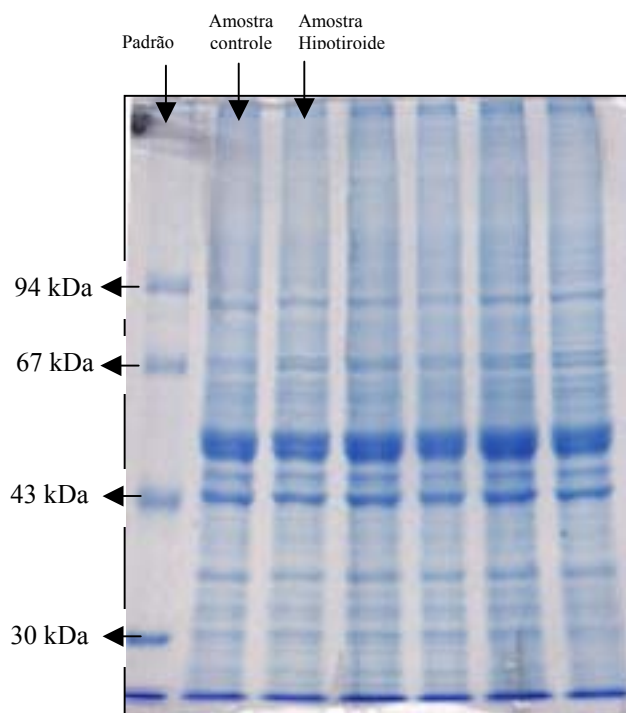


Fig. 6 - SDS-PAGE 10% realizado em nosso laboratório.

4.9 - ELETROTRANSFERÊNCIA

Para eletrotransferência, os géis foram equilibrados durante 15 minutos em tampão de transferência (24,8 mM de Tris, 192 mM de Glicina, 20% de metanol; pH 8,3). As membranas de nitrocelulose foram igualmente equilibradas, inicialmente em água deionizada (5 min) e posteriormente em tampão de transferência (10 min). As proteínas foram transferidas do gel para a membrana de nitrocelulose, conforme descrito originalmente por Towbin (1979). O “sanduíche” foi montado, no sentido do pólo negativo para o positivo, obedecendo a seguinte ordem: espuma de suporte, papel filtro, gel, nitrocelulose, novamente papel filtro e espuma de suporte. A transferência foi realizada durante 3 horas, em uma cuba de eletrotransferência contendo 300 ml de tampão (4°C), usando corrente fixa de 400 mA. Após as membranas foram coradas com solução de Ponceau (0,5% de Ponceau e 1% de ácido acético) para controle da transferência das proteínas. A figura 7 mostra uma nitrocelulose corada com Ponceau após a transferência.

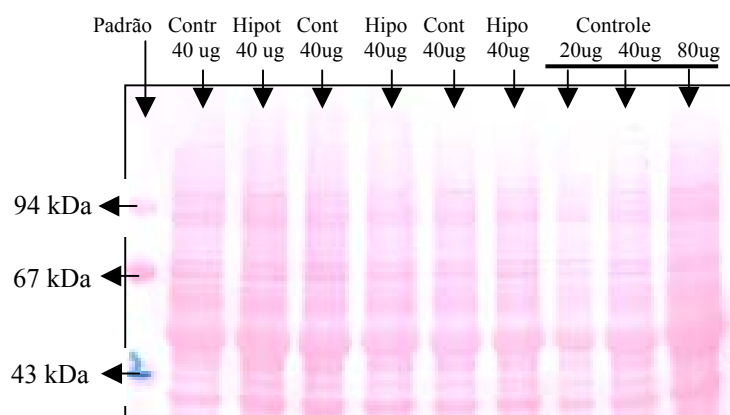


Fig. 7 - Membrana de nitrocelulose após eletrotransferência.

4.9.1 – IMUNODETECÇÃO:

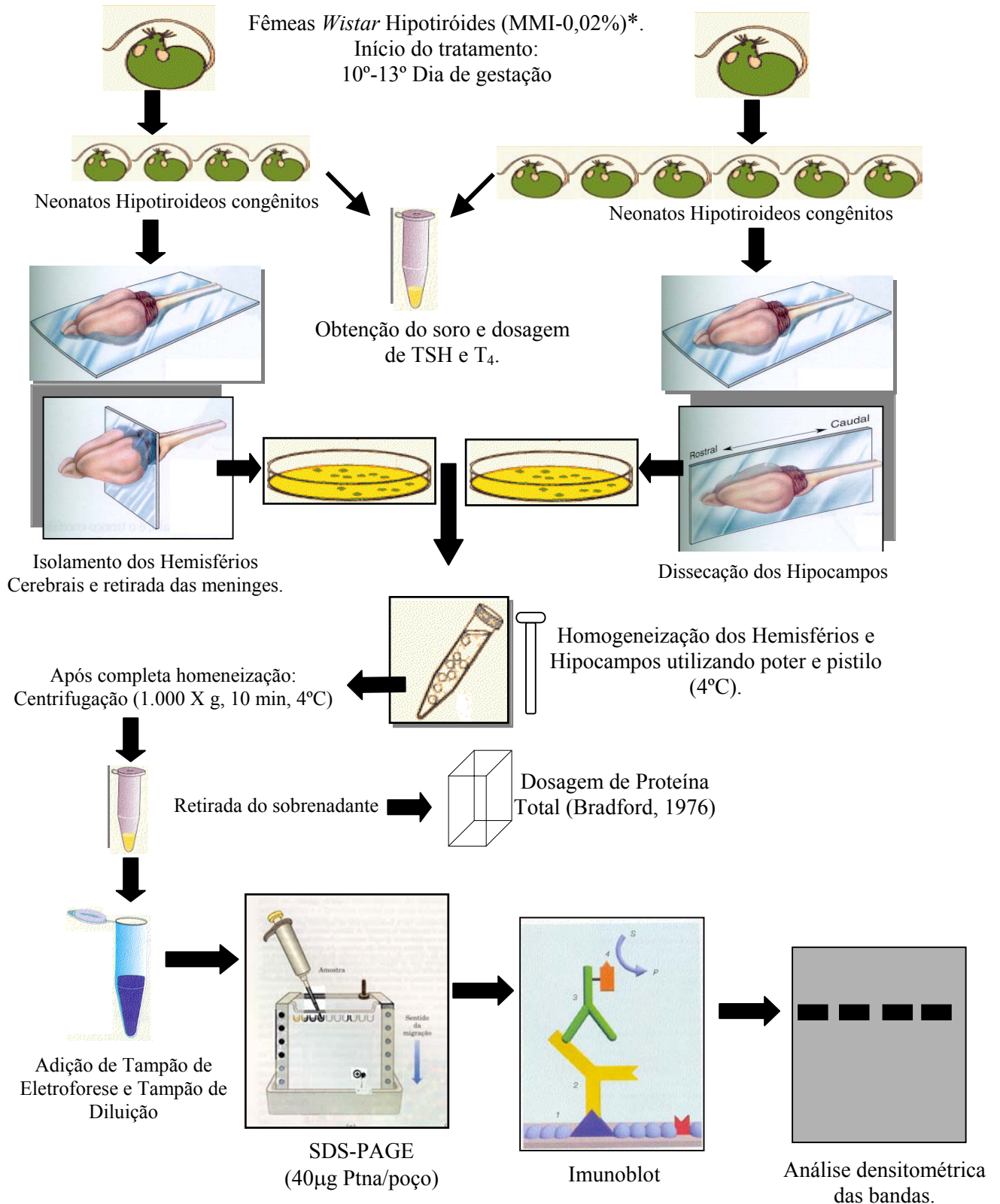
As membranas contendo as proteínas, foram lavadas com TBS (20 mM de Tris, 137 mM de NaCl, pH 7,6), para retirar o Ponceau e remanescentes da eletrotransferência. A seguir foram bloqueadas por 1h, (temperatura ambiente) com 5% de leite desnatado Molico[®], diluído em TBS. Após esse primeiro bloqueio, as membranas foram lavadas por 3 vezes de 5 min com TBS-T (Tween-20 0,05%, 20 mM de Tris, 137 mM de NaCl, pH 7,6) e submetidas a um segundo bloqueio de 1 h usando uma solução de 1,5% de gelatina também diluída em TBS (Collins & Sim, 1998; Bobrovskaya et al., 2001). As membranas foram novamente lavadas 3 vezes (5 min cada) com TBS-T, para finalmente serem incubadas com os anticorpos primários: anti-fosfo-ERK1/2, anti-ERK1/2 total, anti-p38^{MAPK} total, anti-Hsp70, anti-PP1 e anti-PP2A por um período de 2 horas a temperatura ambiente e com anti-fosfo-p38^{MAPK} durante 12 horas a 4°C. Após as incubações, as membranas foram novamente lavadas com TBS-T (3 vezes de 5 min) e incubadas por 1 hora em temperatura ambiente com anticorpos secundários específicos (ligados à fosfatase alcalina ou à peroxidase). Para a detecção dos complexos imunes, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS-T e 2 vezes com TBS (5 min cada lavagem), sendo que as bandas correspondentes às respectivas proteínas foram reveladas através de kit ECL (Amersham Pharmacia Biotech), conforme recomendações do fabricante. Neste processo, a peroxidase catalisa a oxidação do luminol em presença de peróxido de hidrogênio. Intensificadores químicos sustentam a emissão de luz do luminol que imprime as bandas correspondentes às proteínas em filmes autoradiográficos (Biomax). Alternativamente, foram realizadas revelações através do kit colorimétrico, utilizando NBT e BCIP como substratos. Neste procedimento soluções estoque de NBT (5%) em dimetil formamida 70% e BCIP (2,5%) em dimetil formamida, foram diluídos em tampão de fosfatase alcalina (100 mM de Tris, 100 mM de NaCl e 5 mM de MgCl₂; pH 9,5) até a concentração final de 0,03% e 0,015% respectivamente. As bandas

protéicas detectadas, seja através de substratos cromógenos ou através da quimioluminescência, foram medidas por densitometria óptica (D.Os) através do programa computacional Scion Image[®], (National Institutes of Health). Dependendo do tipo de anticorpo primário empregado, as D.Os correspondiam às medidas de fosforilação ou imunoconteúdo das bandas protéicas analisadas.

4.9.2 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como Média \pm Erro Padrão das D.Os e foram analisados através do *teste t de Student*, pareado, utilizando o programa computacional Prism[®] (versão 3.0). Os resultados foram considerados significativos quando $*p < 0,05$.

4.9.3 - FLUXOGRAMA ESQUEMÁTICO DA METODOLOGIA



*Obs: Os animais controle receberam apenas água e ração *ad libitum*, todos os demais procedimentos metodológicos foram idênticos aos realizados com os animais tratados.

5.0 RESULTADOS

Com o objetivo de verificar se o modelo, já classicamente estabelecido de indução de hipotireoidismo congênito (Cooper, 1984), estava sendo eficaz em nosso laboratório, foram realizadas dosagens dos hormônios Tiroxina (T_4) e Hormônio Estimulador da Tireóide (TSH) no soro de ratos neonatos controles e tratados com MMI-0,02%.

Ratos neonatos tratados com MMI - 0,02%, apresentaram um aumento de 313% nos níveis de TSH (Fig 8.A) e uma diminuição de 86% nos níveis de T_4 plasmáticos (Fig 8.B) em relação aos ratos controles. Estas diferenças foram estatisticamente significativas, confirmando que o nosso modelo experimental está de acordo com a literatura e que foi eficiente na indução do hipotireoidismo congênito.

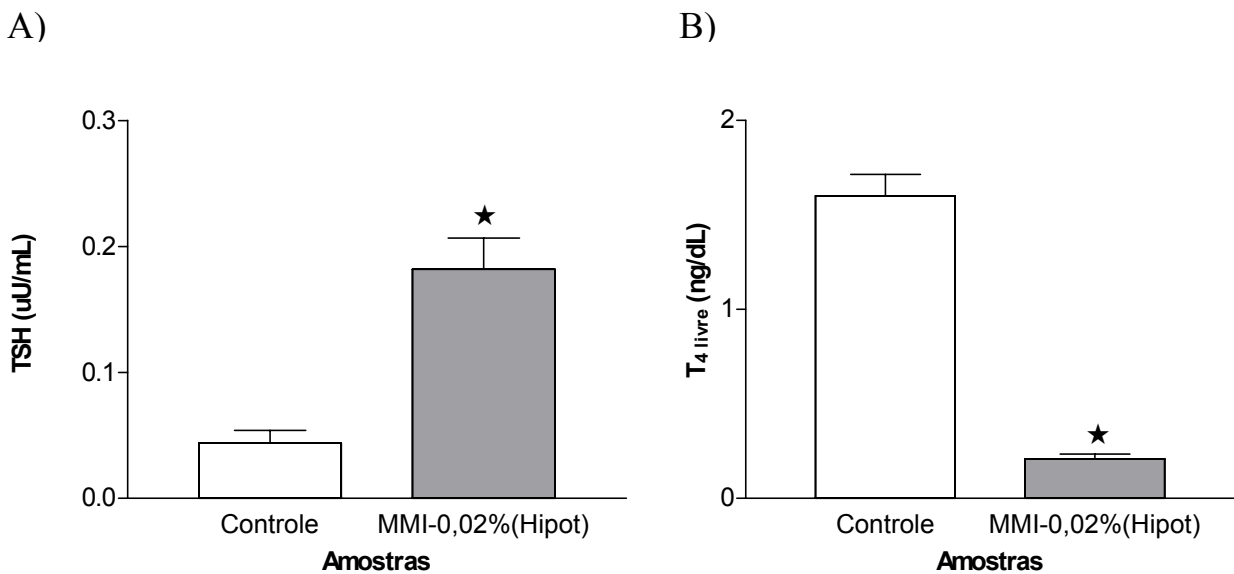


Fig. 8. Dosagem de TSH (A) e T_4 (B) no soro de ratos neonatos controles e tratados com MMI (0,02%). Cada amostra de soro foi obtida de um grupo de cerca de 10 animais. Os valores estão expressos como Média \pm Erro Padrão Médio. Análise estatística realizada através do teste t pareado, * $p < 0,05$. $n=5$.

5.1 - Fosforilação de ERK-2 em hipocampos e hemisférios cerebrais de ratos hipotiroideos:

O conteúdo total e a fosforilação de ERK-2 foram avaliados por Western Blot de homogenatos obtidos de hipocampos e hemisférios cerebrais de ratos neonatos controles e hipotiroideos. No hipocampo, o hipotireoidismo congênito causou um aumento significativo da fosforilação de ERK-2 (Fig. 9), este aumento não foi acompanhado por uma alteração do imunocontéudo da enzima. Nos hemisférios cerebrais, o hipotireoidismo congênito não causou alteração na fosforilação de ERK-2, bem como do imunocontéudo da enzima (Fig. 10).

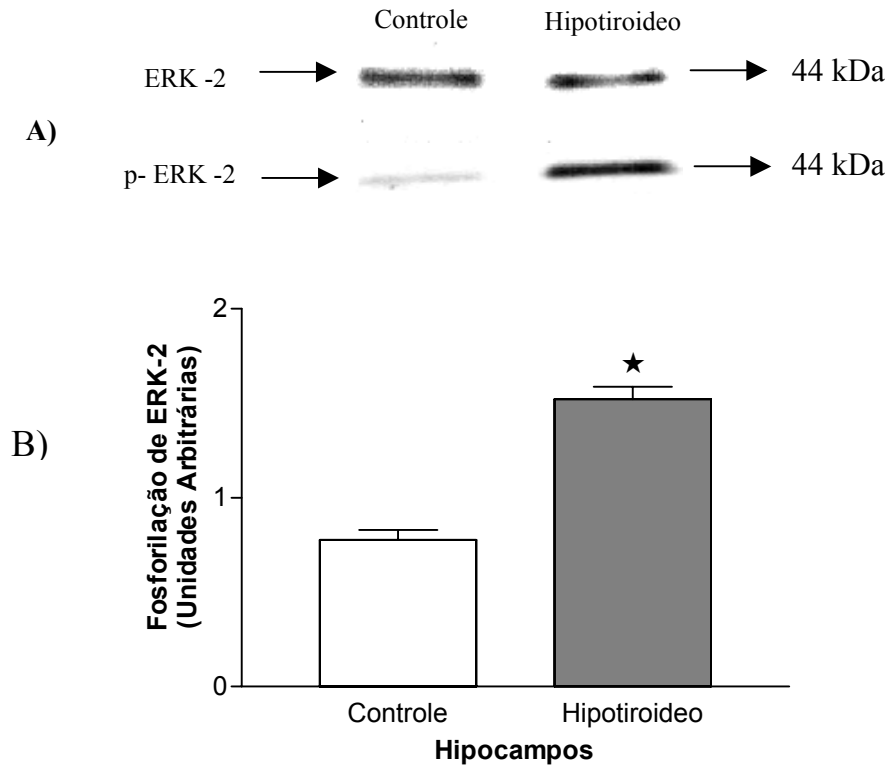


Fig. 9. Fosforilação de ERK-2 em hipocampos de ratos neonatos hipotiroideos. (A) Imunodeteccção representativa da proteína ERK-2 nas formas total (ERK-2) e fosforilada (p-ERK-2) em homogenatos de hipocampos obtidos de ratos neonatos controles e hipotiroideos. (B) Quantificação da fosforilação de ERK-2, expressa em unidades arbitrárias. Os valores das unidades arbitrárias foram obtidos através da razão entre as densidades ópticas (D.Os) das bandas fosforiladas de ERK-2 e as D.Os. das bandas de ERK-2 total. Os valores estão expressos como Média \pm Erro Padrão Médio. Análise estatística realizada através do teste t pareado, * $p < 0,05$. $n=11$.

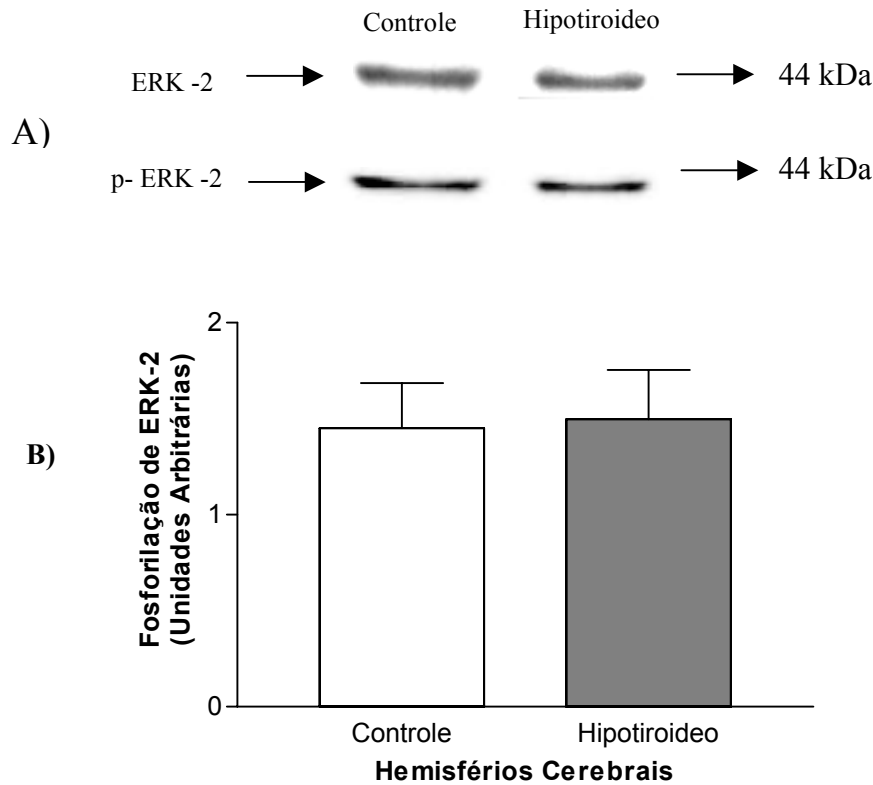


Fig. 10. Fosforilação de ERK-2 em hemisférios cerebrais de ratos neonatos hipotiroideos. (A) Imunodeteccção representativa da proteína ERK-2 nas formas total (ERK-2) e fosforilada (p-ERK-2) em homogenatos de hemisférios cerebrais obtidos de ratos neonatos controles e hipotiroideos. (B) Quantificação da fosforilação de ERK-2, expressa em unidades arbitrárias. Os valores das unidades arbitrárias foram obtidos através da razão entre as densidades ópticas (D.Os) das bandas fosforiladas de ERK-2 e as D.Os. das bandas de ERK-2 total. Os valores estão expressos como Média \pm Erro Padrão Médio. Análise estatística realizada através do teste t pareado, $p < 0,05$. $n=5$.

5.2 - Fosforilação de p38^{MAPK} em hipocampus e hemisférios cerebrais de ratos hipotiroideos:

O conteúdo total e a fosforilação de p38^{MAPK} foram avaliados por Western Blot de homogenatos obtidos de hipocampus e hemisférios cerebrais de ratos neonatos controles e hipotiroideos. No hipocampo, o hipotireoidismo congênito causou uma diminuição significativa da fosforilação de p38^{MAPK} (Fig. 11), este aumento não foi acompanhado por uma alteração do imunocontéudo da enzima. Nos hemisférios cerebrais, o hipotireoidismo congênito não causou alteração na fosforilação de p38^{MAPK}, bem como do imunocontéudo da enzima (Fig. 12).

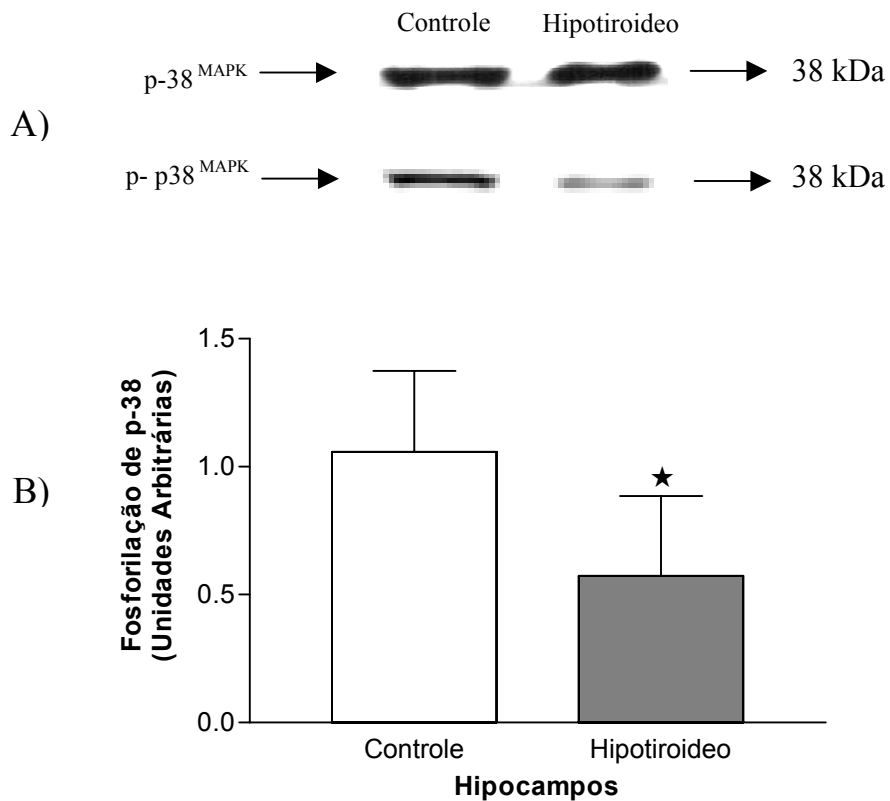


Fig. 11. Fosforilação de p38^{MAPK} em hipocampus de ratos neonatos hipotiroideos. (A) Imunodeteccção representativa da proteína p38^{MAPK} nas formas total(p38^{MAPK}) e fosforilada (p-p38^{MAPK}) em homogenatos de hipocampus obtidos de ratos neonatos controles e hipotiroideos. (B) Quantificação da fosforilação de p38^{MAPK}, expressa em unidades arbitrárias. Os valores das unidades arbitrárias foram obtidas através da razão entre as densidades ópticas (D.Os) das bandas fosforiladas de p38^{MAPK} e as D.Os. das bandas de p38^{MAPK} total. Os valores estão expressos como Média \pm Erro Padrão Médio. Análise estatística realizada através do teste t pareado, * p < 0,05. n=9.

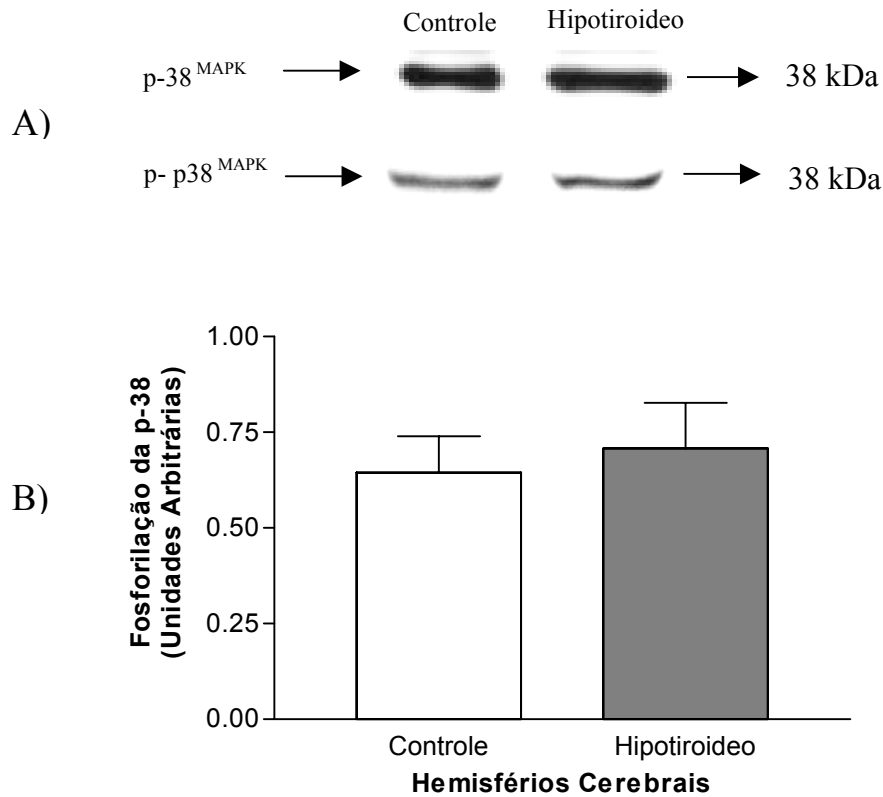


Fig. 12. Fosforilação de $p38^{MAPK}$ em hemisférios cerebrais de ratos neonatos hipotiroideos. (A) Imunodeteção representativa da proteína $p38^{MAPK}$ nas formas total ($p38^{MAPK}$) e fosforilada ($p-p38^{MAPK}$) em homogenatos de hemisférios cerebrais obtidos de ratos neonatos controles e hipotiroideos. (B) Quantificação da fosforilação de $p38^{MAPK}$, expressa em unidades arbitrárias. Os valores das unidades arbitrárias foram obtidas através da razão entre as densidades ópticas (D.Os) das bandas fosforiladas de $p38^{MAPK}$ e as D.Os. das bandas de $p38^{MAPK}$ total. Os valores estão expressos como Média \pm Erro Padrão Médio. Análise estatística realizada através do teste t pareado, $p < 0,05$. $n=6$.

5.3 - Imunoconteúdo de Hsp-70 em hipocampos e hemisférios cerebrais de ratos hipotiroideos:

Um dos importantes eventos durante os estados de estresse celular é o aumento da expressão de proteínas de choque térmico ("heat shock proteins"; HSPs), também chamadas proteínas de estresse (Ohtsuka & Suzuki, 2000). Este evento em alguns casos, pode ter a participação de MAPKs (Hung et al., 1998). O imunoconteúdo de Hsp-70, foi avaliado por Western Blot de homogenatos obtidos de hipocampos e hemisférios cerebrais de ratos neonatos controles e hipotiroideos. O hipotireoidismo congênito não provocou alteração do imunoconteúdo de Hsp-70 tanto em hipocampos (Fig. 13) quanto hemisférios (Fig 14).

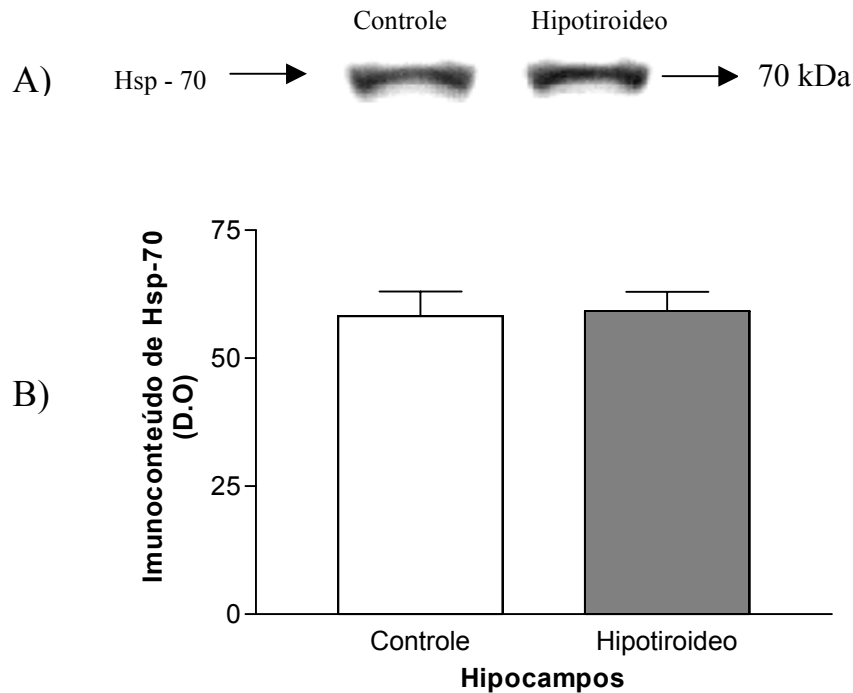


Fig. 13. Efeito do hipotireodismo congênito sobre o imunoconteúdo de Hsp-70 em hipocampos de ratos neonatos. (A) Imunodeteção representativa da proteína Hsp-70 em homogenatos de hipocampos obtidos de ratos neonatos controles e hipotiroideos. (B) Quantificação do imunoconteúdo de HSP-70, obtido através das densidades ópticas (D.Os) das bandas de Hsp-70. Os valores estão expressos como Média \pm Erro Padrão Médio. Análise estatística realizada através do teste t pareado, $p < 0,05$. $n=6$.

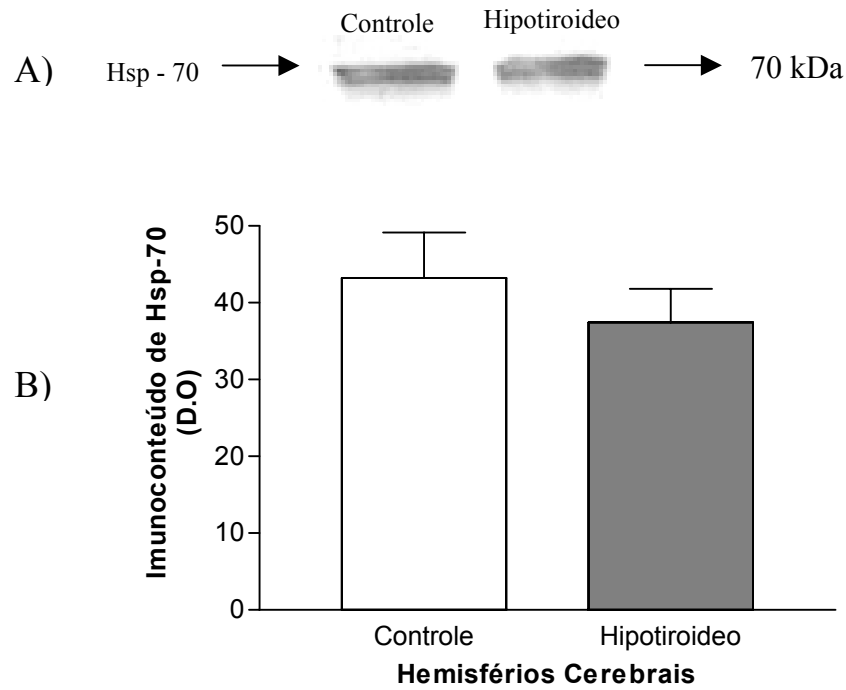


Fig. 14. Imunocontéudo da proteína Hsp-70 em hemisférios cerebrais de ratos neonatos hipotiroideos. (A) Imunodeteccção representativa da proteína Hsp-70 em homogenatos de hemisférios cerebrais obtidos de ratos neonatos controles e hipotiroideos. (B) Quantificação do imunocontéudo de HSP-70, obtido através das densidades ópticas (D.Os) das bandas de Hsp-70. Os valores estão expressos como Média \pm Erro Padrão Médio. Análise estatística realizada através do teste t pareado, $p < 0,05$. $n=6$.

5.4 - Imunoconteúdo de PP1c em hipocampus e hemisférios cerebrais de ratos hipotiroideos:

Algumas proteínas tem mostrado ter seu conteúdo alterado em face aos quadros de hipotireoidismo (Tabela I). PP1 e PP2A são enzimas fundamentais na regulação do estado de fosforilação de diversas fosfoproteínas essenciais para regulação sináptica e neuro-glial (Price & Mumby, 1999). Desta forma, considerando a importância das subunidades catalíticas das enzimas PP1 e PP2A, foi nosso interesse verificar possíveis modificações no conteúdo destas enzimas frente à deficiência dos hormônios tireoideanos. Os homogenatos de hipocampus e hemisférios cerebrais de ratos neonatos controles e com hipotireoidismo congênito foram avaliados, por Western Blot, quanto ao imunoconteúdo da subunidade catalítica de PP1 (PP1c). O hipotireoidismo congênito não provocou alteração do imunoconteúdo de PP1c tanto em hipocampus (Fig. 15) quanto hemisférios (Fig 16).

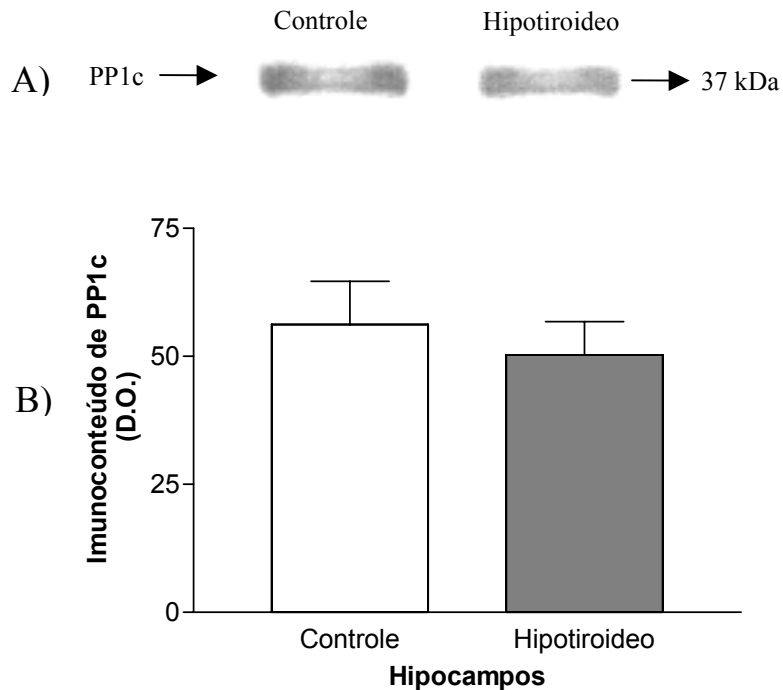


Fig. 15. Imunoconteúdo da subunidade catalítica de PP1 (PP1c) em hipocampus de ratos neonatos hipotiroideos. (A) Imunodeteccção representativa de PP1c em homogenatos de hipocampus obtidos de ratos neonatos controles e hipotiroideos. (B) Quantificação do imunoconteúdo de PP1c, obtido através das densidades ópticas (D.Os) das bandas. Os valores estão expressos como Média \pm Erro Padrão Médio. Análise estatística realizada através do teste t pareado, $p < 0,05$. $n=5$.

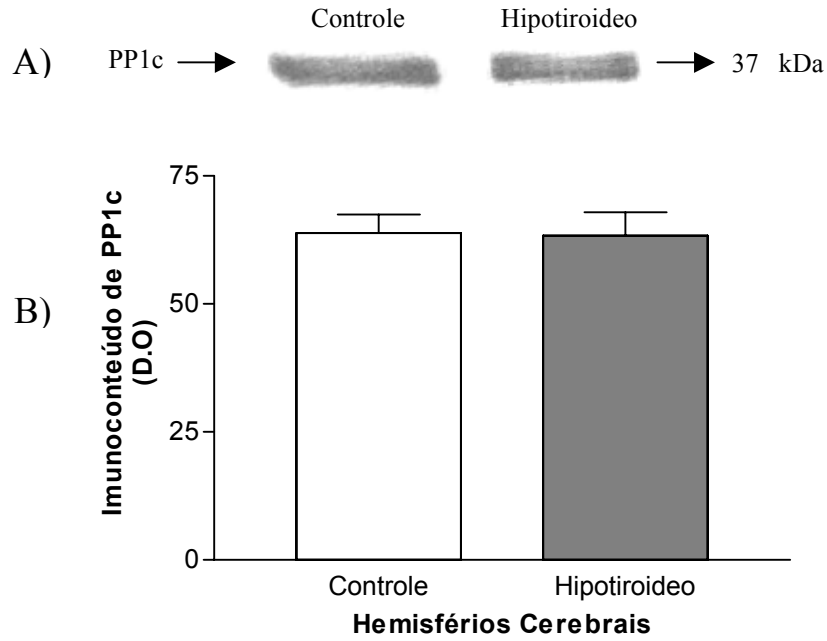


Fig. 16. Imunoconteúdo da subunidade catalítica de PP1 (PP1c) em hemisférios cerebrais de ratos neonatos hipotiroideos. (A) Imunodeteção representativa da subunidade catalítica da proteína PP1 (PP1c) em homogenatos de hemisférios cerebrais obtidos de ratos neonatos controles e hipotiroideos. (B) Quantificação do imunoconteúdo de PP1c, obtido através das densidades ópticas (D.Os) das bandas. Os valores estão expressos como Média \pm Erro Padrão Médio. Análise estatística realizada através do teste t pareado, $p < 0,05$. $n=6$.

5.5 - Imunoconteúdo de PP2Ac em hipocampus e hemisférios cerebrais de ratos hipotiroideos:

Os homogenatos de hipocampus e hemisférios cerebrais de ratos neonatos controles e com hipotireoidismo congênito foram avaliados, por Western Blot, quanto ao imunoconteúdo da subunidade catalítica de PP2A (PP2Ac). O hipotireoidismo congênito não provocou alteração do imunoconteúdo de PP2Ac tanto em hipocampus (Fig. 17) quanto hemisférios (Fig 18).

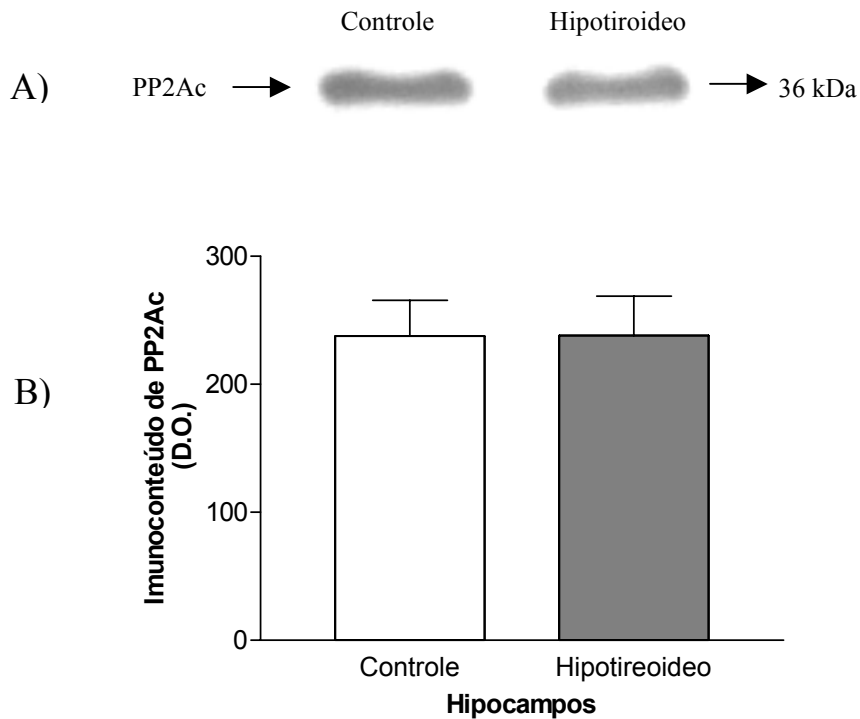


Fig. 17. Imunoconteúdo da subunidade catalítica da proteína PP2A (PP2Ac) em hipocampus de ratos neonatos hipotiroideos. (A) Imunodeteção representativa de PP2Ac em homogenatos de hipocampus obtidos de ratos neonatos controles e hipotiroideos. (B) Quantificação do imunoconteúdo de PP2Ac, obtido através das densidades ópticas (D.Os) das bandas. Os valores estão expressos como Média \pm Erro Padrão Médio. Análise estatística realizada através do teste t pareado, $p < 0,05$. $n=5$.

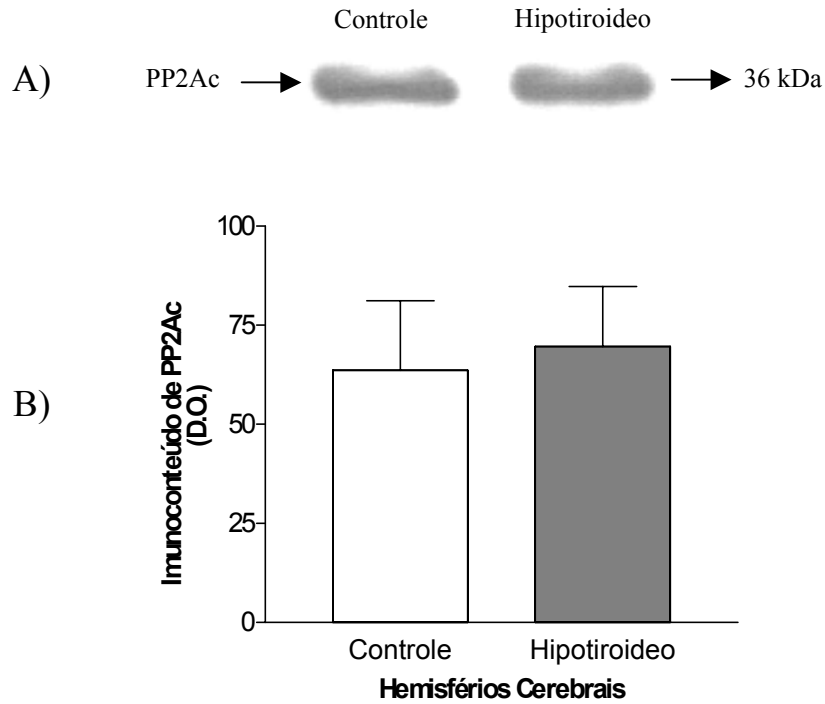


Fig. 18. Imunocnteúdo da subunidade catalítica da proteína PP2A (PP2Ac) em hemisférios cerebrais de ratos neonatos hipotiroideos. (A) Imunodeteção representativa da proteína PP2Ac em homogenatos de hemisférios cerebrais obtidos de ratos neonatos controles e hipotiroideos. (B) Quantificação do imunocnteúdo de PP2Ac, obtido através das densidades ópticas (D.Os) das bandas. Os valores estão expressos como Média \pm Erro Padrão Médio. Análise estatística realizada através do teste t pareado, $p < 0,05$. $n=4$.

6.0 - DISCUSSÃO

O Hormônio da Tireóide (T_3) exerce um papel crítico durante o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC). A falta de T_3 durante esse período resulta em déficit permanente das funções cerebrais, incluindo o desenvolvimento intelectual. Em humanos, esse período corresponde aproximadamente do 3º trimestre de gestação até o 3º mês após o nascimento. A administração de T_3 e/ou T_4 a neonatos dentro desse período resulta em recuperação do desenvolvimento intelectual. Entretanto, o atraso no tratamento resulta em danos severos e permanentes no desenvolvimento intelectual, ocasionando o que se denomina de cretinismo (Anderson, 2001).

O desenvolvimento do SNC, envolve uma série de ações celulares complexas que requerem uma regulação temporal e espacial precisa. Estas ações incluem o controle preciso da divisão, diferenciação e migração celular, bem como o crescimento e a diferenciação de neuritos em axônios e dendritos (Pearlman et al., 1998). Perturbações durante períodos críticos de desenvolvimento, que afetem estas ações, podem levar a conexões anormais e desordens comportamentais futuras. Um elemento essencial no desenvolvimento neuronal é o início da formação de processos ou crescimento de neuritos. Este é o primeiro evento que irá levar ao estabelecimento da estrutura tridimensional dos neurônios e a formação do intrincado sistema de conexões do cérebro, sendo uma base fundamental para o desenvolvimento da plasticidade neural e LTP (Maletic-Savatic et al., 1999). A formação de neuritos envolve a participação de hormônios tais como T_3 (Porterfield & Hendrich, 1993) e de mecanismos de sinalização celular, tais como os mediados pelas MAPKs e PKA (Vogt Weisenhorn et al., 2001). Em ratos, a atividade máxima de início de formação de neuritos ocorre no período neonatal. Nesta fase as vias MAPKs e PKA atuam independentemente, entretanto no 7º dia pós-natal (onde os contatos sinápticos já estão bem estabelecidos), estas vias parecem funcionar acopladas (Vogt Weisenhorn et al., 2001).

Devido à importância dos hormônios tireoideanos e das MAPKs no desenvolvimento do SNC, este trabalho teve como objetivo analisar a modulação de algumas MAPKs como ERK e p38^{MAPK} em hipocampos e hemisférios cerebrais de ratos neonatos com deficiência de hormônios tireoideanos, utilizando para isto um modelo clássico de hipotireoidismo congênito (Cooper, 1984).

Nossos resultados demonstram que nosso modelo foi eficiente na indução do hipotireoidismo congênito, pois houve um aumento de 313% nos níveis de TSH e uma redução de 86% nos níveis de T₄ no soro de animais tratados com MMI-0,02%. Em hipocampos de ratos neonatos hipotiroideos, observamos um aumento significativo de cerca de 50% na fosforilação de ERK-2 e uma redução de cerca de 50% na fosforilação de p38^{MAPK}. Em hemisférios cerebrais não foram verificadas tais alterações. Também não foram verificadas alterações nos imunocontêúdos das proteínas Hsp-70 e subunidades catalíticas de PP1 e PP2A, tanto em hipocampos quanto em hemisférios cerebrais de ratos neonatos hipotiroideos.

Análises morfológicas e bioquímicas têm identificado que regiões específicas do encéfalo: hipocampo, córtex e cerebelo, são afetadas pela deficiência dos hormônios tireoideanos. É importante perceber que essas regiões contribuem de maneira significativa para a memória e o aprendizado (Anderson, 2001).

Os efeitos do hipotireoidismo congênito sobre o aprendizado têm sido avaliados em modelos animais. Ratos com hipotireoidismo congênito tem demonstrado dificuldades na aprendizagem e habituação em testes de labirinto (Eayrs, et al.,1955; Essman et al., 1968; Morgan & Einon, 1976; Hendrich et al., 1984; Comer & Norton, 1985; Akaike et al., 1991; MacNabb et al., 2000). A potenciação de longa duração (LTP) é uma forma de plasticidade sináptica robusta e de longa duração, sendo considerada um dos mecanismos celulares e moleculares que participam na formação do aprendizado e memória. Recentemente, Gerges e colaboradores, (2001), demonstraram

que o hipotireoidismo congênito bloqueia parcialmente a potenciação de longo tempo inicial (E-LTP) na área CA1 do hipocampo. Ao combinarem o hipotireoidismo com situações de estresse foi observada a perda total da E-LTP na mesma área. Vários trabalhos têm demonstrado a participação de ERK-2, como um componente crítico, da cascata bioquímica que sustenta a LTP hipocampal (English & Sweatt, 1996; 1997; Orban et al., 1999; Sweatt, 2001). A apropriada execução e manutenção da LTP, requer uma correta intensidade, amplitude e momento de ativação das ERKs (Agell et al., 2002).

Desta forma, o drástico aumento na fosforilação de ERK-2 em hipocampos de animais hipotiroideos poderia contribuir para os danos bioquímicos e celulares que corroboram com o atraso e deficiência no desenvolvimento neuronal desses animais.

Recentemente, foi demonstrado um aumento na liberação de neurotransmissores nas sinapses hipocampais de ratos (com 14 e 21 dias pós-natais), com hipotireoidismo congênito. Este aumento mostrou estar associado com o aumento no nível das proteínas Sinapsina I e Sinaptotagmina I, as quais são essenciais para exocitose de neurotransmissores (Vara et al., 2002). A Sinapsina prende pequenas vesículas sinápticas ao citoesqueleto de actina e possui sítios que podem ser fosforilados pelas ERKs. Esta fosforilação pode regular a interação de sinapsina com o citoesqueleto de actina e a liberação de neurotransmissores (Greengard et al., 1993; Jovanovic et al., 1995; Hilfiker et al., 1998). O aumento na fosforilação de ERK-2, observado neste trabalho em hipocampos de ratos neonatos hipotiroideos, eventualmente poderia estar influenciando este mecanismo.

Entretanto, o contexto que estamos estudando é complexo, principalmente porque as ações de T_3 ocorrem em vários níveis. Por exemplo, já está bem estabelecido que T_3 regula os níveis protéicos de actina e sua polimerização, bem como a expressão de seu RNAm. Além disso, essa

regulação pode ser aumentada ou diminuída por T_3 dependendo do estágio de desenvolvimento neuronal (Poddar et al., 1996).

Tão complexa quanto a questão dos efeitos da deficiência de T_3 e T_4 e o aumento da fosforilação de ERK-2 sobre o desenvolvimento hipocampal e seus danos cognitivos é o modo como essa ativação pode ocorrer. Surge então uma importante questão: o aumento de fosforilação de ERK-2 seria devido à deficiência de T_3 e/ou T_4 diretamente ou a algum outro mecanismo indireto afetado pela diminuição dos níveis de T_3 e T_4 ?

O hormônio T_4 , executa um papel modulador nos mecanismos de transdução de sinal, através da ativação de MAPKs, principalmente ERK-2 (Lin et al., 1999), ver figura 19:

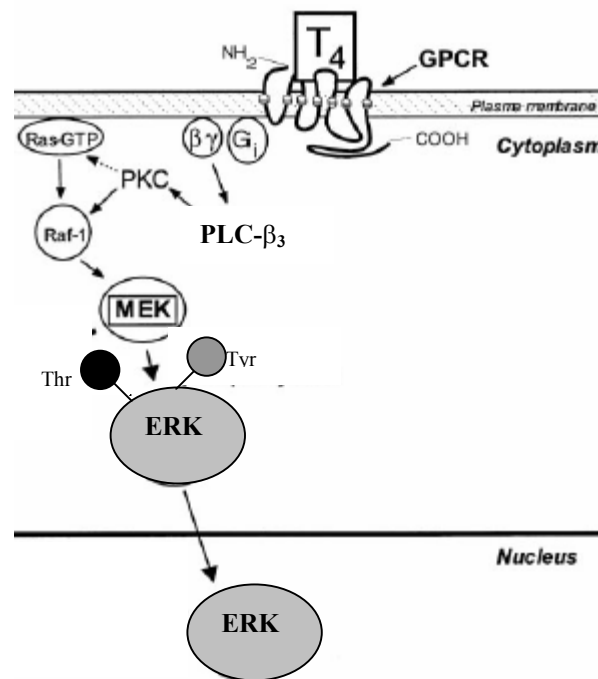


Fig. 19 – Ativação de ERK por T_4 .
Adaptado de Lin et al., 1999.

O primeiro passo nesta ativação é a ligação de T_4 sobre receptores acoplados à proteína G_i da superfície celular. Esta ligação promove a liberação das subunidades α e $\beta\gamma$ da proteína G_i . A

subunidade $\beta\gamma$ promove a ativação da enzima Fosfolipase C (PLC- β_3), que hidrólisa PI (4,5) P_2 , produzindo diacilglicerol (DAG), que ativa a proteína cinase C (PKC). PKC por sua vez pode fosforilar Raf-1 diretamente. Raf-1 ativa MEK e esta por sua vez ERK 1 e 2 (Lin, et al., 1999). Adicionalmente foi demonstrado que a ativação de MAPKs, promovida por T_4 , promove a fosforilação do receptor para hormônio tireoideano TR β 1, resultando na dissociação do receptor de proteínas co-repressoras da transcrição protéica (Davis, et al., 2000).

Nossos resultados aparentemente contrariam as ações de T_4 , pois os hipocampos de animais hipotiroideos, apresentam significativa diminuição dos níveis de T_4 e exibem aumento na fosforilação de ERK-2. Por isso, propomos um mecanismo indireto, onde a falta de T_3 e/ou T_4 é que poderia promover aumento na fosforilação de ERK-2.

Praticamente todos os trabalhos científicos atribuíam um papel pequeno, senão insignificante aos hormônios tireoideanos sobre o controle central na síntese e liberação do TRH. Entretanto, foi demonstrado, através de metodologias mais eficientes que a diminuição dos níveis de T_3 e T_4 por tireodectomia promovia um significativo aumento nos níveis de TRH e TSH (Gerendai et al., 1985; Mori & Yamada, 1987; Bruhn et al., 1991). Por fim, foi comprovado que os hormônios tireoideanos exercem diretamente um controle central por retroalimentação negativa na síntese e liberação de TRH e TSH (Dahl et al., 1994).

Em nosso trabalho, esta retroalimentação negativa foi evidenciada através do aumento substancial dos níveis de TSH e diminuição dos níveis de T_4 em animais hipotiroideos. É importante ressaltar, que o aumento nos níveis de TRH é que promove o aumento nos níveis de TSH, entretanto, clinicamente são medidos apenas os níveis de TSH.

Propomos portanto, que o aumento de fosforilação de ERK-2 em hipocampos de animais hipotiroideos pode estar ocorrendo devido ao aumento dos níveis de TSH e TRH. Desta forma, T_3 e

T₄ estariam modulando indiretamente a ativação de ERK-2, através do aumento dos níveis de TSH e TRH pelo mecanismo de retroalimentação negativa. Surge então uma importante questão: TSH e TRH poderiam ativar as MAPKs tal como já demonstrado com T₄?

O TSH é considerado um dos principais reguladores da produção dos hormônios tireoideanos. Além da tireóide, seu receptor (TSH-R) está presente em neurônios dos córtices piriforme e pós-cingulado, plexo coróide, cerebelo e hipocampo (corno de Ammon e principalmente giro denteado) e em astrócitos nas zonas endoventricular e subventricular. Em hipocampus de ratos neonatos sua expressão é baixa, atinge um pico em ratos com 7 dias pós-natais e então começa a decair novamente. Devido a esta localização espacial e temporal de expressão, especula-se que o TSH desempenhe papéis fisiológicos importantes durante o desenvolvimento neuronal, tais como a regulação homeostática dos hormônios tireoideanos e a diferenciação de células tronco e/ou progenitoras em neurônios ou astrócitos (Crisanti et al., 2001).

O TSH-R pertence à família dos receptores acoplados à Proteína G, incluindo G_s, G_{i/o}, G₁₂ e G_{q/11} (Hara et al., 1999). Vários trabalhos tem demonstrado que os receptores acoplados a determinados tipos de proteína G podem ativar Ras e a cascata das MAPKs, através da ativação de PKC (Van Biesen et al., 1996; Luttrell et al., 1996; Della Rocca et al., 1997; Luttrell et al., 1997). Em células gliais de ratos, o TSH liga-se a seus receptores acoplados a proteína G, promovendo a liberação de ácido araquidônico e estimulando a fosforilação das ERKs 1 e 2 (Tournier et al., 1995). Entretanto este mecanismo ainda não se encontra bem elucidado.

A descoberta da presença do RNAm de TRH, de seus receptores e enzimas fora da hipófise, rapidamente forneceu pistas da significância do TRH em outras funções que não apenas as endócrinas (Burt & Snyder, 1975; Kubek et al., 1977; Nillni & Sevarino, 1999). Acredita-se que o TRH extrahipofisário atue modulando certos neurotransmissores e/ou neuromoduladores

(Serotonina, Substância P, Dopamina, Histamina, Neuropeptídeo Y, Encefalinas e Glutamato) ou que desempenhe por si só o papel de neurotransmissor (Nillni & Sevarino, 1999). O TRH e seus receptores podem ser encontrados em estruturas diversas do cérebro tais como: amígdala, córtex piriforme, córtex entorrinal, neocórtex e hipocampo (Kubek et al., 1989).

Até o momento, 2 receptores de alta-afinidade ao TRH foram clonados: TRH-R1 e TRH-R2. TRH-R1 é altamente expresso em estruturas límbicas, enquanto TRH-R2 é primariamente expresso em regiões de processamento sensorial. De qualquer forma, ambos são membros da superfamília de receptores acoplados à proteína G, a qual utiliza a subunidade $G\alpha_{q/11}$ como efetora no acoplamento à fosfolipase $C\beta$ (Kubek & Garg, 2002).

Foi demonstrado em células GH_3 (células clonais de um tumor hipofisário de rato) que TRH e EGF são capazes de ativar as MAPKs. Esta ativação pode ocorrer por dois caminhos distintos e concomitantes, sendo um deles dependente e o outro independente da ativação de PKC (Ohmichi et al., 1994).

Os dois mecanismos ocorrem através da ligação de TRH ao seu receptor acoplado à proteína G_q , sendo que esta ligação promove a liberação das subunidades α_q e $\beta\gamma$ da proteína G_q . No mecanismo dependente de PKC, a subunidade α_q promove a ativação da enzima fosfolipase C (PLC- β_1), a qual por sua vez, através da hidrólise de $PI(4,5)P_2$, produção de Diacilglicerol (DAG) e mobilização de Ca^{2+} intracelular, ativa a Proteína Kinase C (PKC). PKC por sua vez ativa Raf-1. Raf-1 ativaria a MEK e esta por sua vez ERK 1 e 2. Este caminho não tem a participação de $p21^{ras}$. Já no mecanismo independente da ativação de PKC, a subunidade α_q ativa uma proteína tirosina cinase ainda desconhecida, que fosforila os resíduos tirosina da proteína adaptadora Shc de 52 kDa. Esta fosforilação promove a ligação de Shc com a proteína Grb2 e ativa todos os passos subsequentes da via clássica de ativação das ERKs. Este caminho teria a participação da

p21^{ras} (Ohmichi et al., 1994). Posteriormente, também foi demonstrado que a ativação de MAPKs por TRH em células GH3 é responsável pela diferenciação celular e aumento da síntese de prolactina (Kanasaki et al., 2000).

TRH também promove a fosforilação dos resíduos de tirosina do receptor de EGF (EGFR). Esta fosforilação é fundamental para a completa ativação das ERKs. TRH mostrou ainda ser responsável por induzir a associação entre o EGFR e a proteína Grb2; pela fosforilação sobre os resíduos de tirosina da proteína Shc e estimular a fosforilação do receptor relacionado a tirosina cinase - HER2. HER2 pode aumentar o tempo de duração da fosforilação do EGFR por retardar sua rápida endocitose, contribuindo portanto para manutenção da ativação das ERKs (Wang et al., 2000).

Os eventos moleculares que levam a indução da fosforilação do EGFR por TRH são obscuros, entretanto, parecem depender de PKC e envolver a clivagem do fator de crescimento – “heparin-binding EGFG-like growth factor” (Suzuki et al., 1997; Izumi et al., 1998; Prenzel et al., 1999; Wang et al., 2000).

A figura 20, resume de maneira esquemática como o aumento nos níveis de TRH poderiam explicar o aumento na fosforilação de ERK-2 em hipocampos de animais hipotiroideos. O hipotireoidismo aumenta a expressão do RNAm do TRH-R1 (representado pela seta vermelha) o que também pode estar colaborando para o aumento na fosforilação de ERK-2 (Koller et al., 1987).

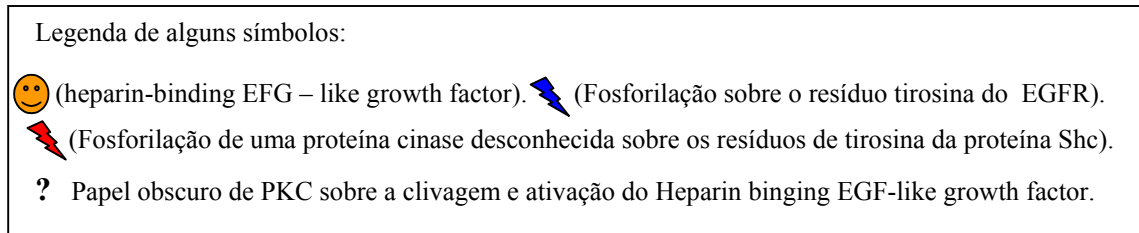
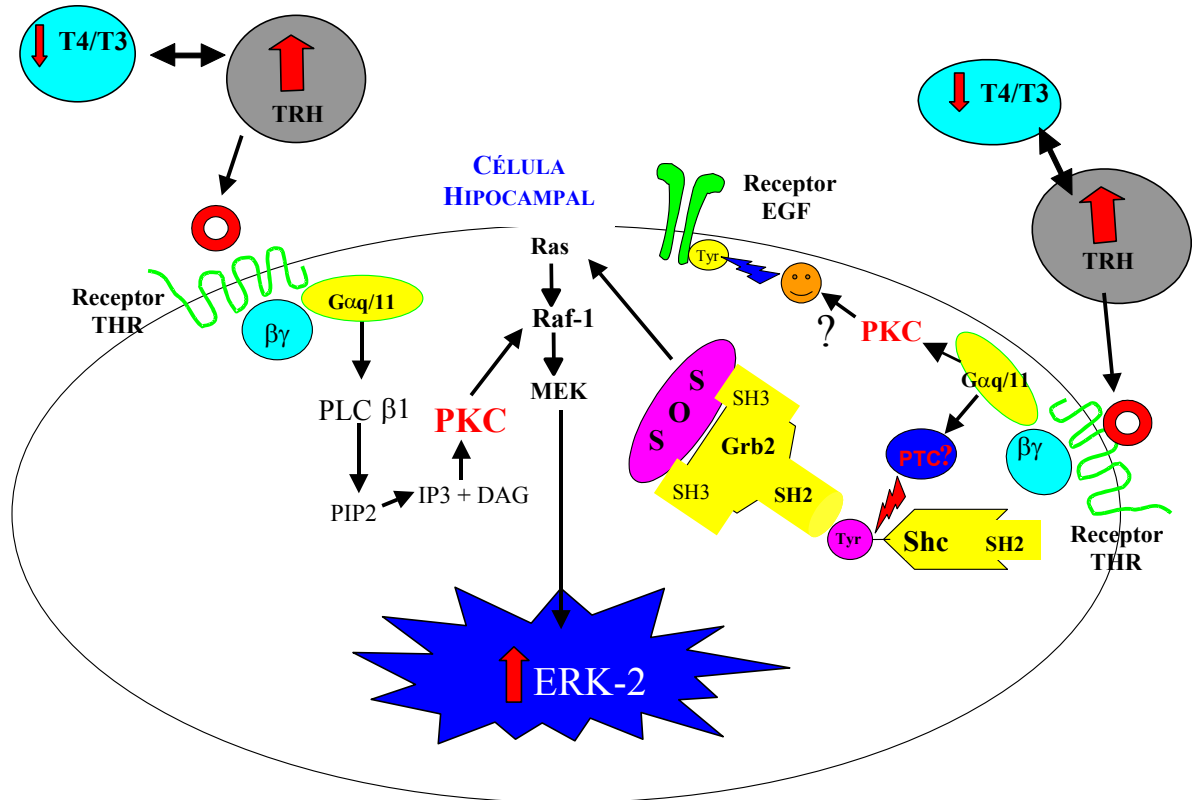


Fig. 20 - Possível mecanismo pelo qual o aumento nos níveis de TRH poderiam aumentar a fosforilação de ERK-2.

Concomitantemente, o aumento na expressão de receptores tirosina cinase, poderia estar colaborando para este significativo aumento na fosforilação de ERK-2 em hipocampus de ratos hipotiroideos. Em 1991, Kesavan e colaboradores, demonstraram *in vitro*, que T₃ diminui a expressão dos níveis de RNAm e protéicos de receptores para EGF. Entretanto, *in vivo*, não foi observada alteração na ligação de EGF com seu receptor no córtex cerebral de ratos com hipotireoidismo congênito contando com 20, 30 e 40 dias de idade (Scott & Fisher., 1986). Foi

demonstrado através do mesmo modelo utilizado por nós, que o hipotireoidismo congênito em ratos neonatos promove o aumento na expressão do receptor tirosina cinase ($\text{trk}\beta$) para o fator neurotrófico derivado de cérebro (BDNF) tanto no córtex cerebral como em estruturas subcorticais. O aumento na expressão de $\text{trk}\beta$ encontrado em animais com hipotireoidismo congênito é devido a um aumento na taxa transcripcional, indicando que T_3 suprime a transcrição desse gene *in vivo* (Pombo et al., 2000). Tal diferença na expressão desse receptor não foi observada em cerebelos de ratos hipotiroideos (Neveu & Arenas., 1996).

Nossos resultados mostram ainda, que houve uma drástica redução, de cerca de 50%, na fosforilação de p38^{MAPK} em hipocampos de animais hipotiroideos. Estes dados levantam uma importante questão: será que o TRH poderia ser o responsável pela diminuição na fosforilação de p38^{MAPK} , assim como parece ser o principal responsável pelo aumento de fosforilação de ERK-2?

Neste sentido, já foi demonstrado que sob condições basais, o tratamento de células GH3 com TRH diminui significativamente a fosforilação de p38^{MAPK} . A droga bromocriptina (um agonista dos receptores dopaminérgicos D_2 , utilizado como agente terapêutico em pacientes com prolactinomas e hiperprolactinemia) é responsável por induzir a ativação de p38^{MAPK} com concomitante indução de apoptose das células da linhagem GH3. Surpreendentemente, a ativação de p38^{MAPK} proporcionada pela Bromocriptina foi abolida completamente pela incubação das células com EGF e parcialmente inibida pela incubação com TRH. Consistente com estes resultados, o tratamento com EGF e TRH diminuíram significativamente também o número de células apoptóticas (Kanasaki et al., 2000).

O mecanismo pelo qual TRH promoveria a diminuição da ativação de p38^{MAPK} é desconhecido. Sugere-se apenas que tanto o EGF quanto o TRH ao ativarem ERK, promoveriam a inibição da ativação de p38^{MAPK} (Kanasaki et al., 2000). Talvez estes dados justifiquem o fato de

que a morte celular não é aumentada na formação hipocampal de ratos hipotiroideos (Rami et al., 1986).

Concomitante com os níveis elevados de TRH, não podemos deixar de mencionar outro mecanismo muito importante que pode estar contribuindo para a diminuição da ativação da p38^{MAPK} em hipocampos de animais hipotiroideos: o consumo de oxigênio. Alguns pesquisadores demonstram que o aumento nos níveis de T₃ e/ou T₄ aumentam o estresse oxidativo. Oppenheimer et al. (1974), demonstraram que o cérebro, fígado, coração e músculos de pacientes com hipertireoidismo apresentam aumento no consumo de oxigênio e peroxidação lipídica o que poderia levar os tecidos a uma condição de estresse oxidativo. O tratamento com T₃ provoca aumento de estresse oxidativo no fígado de pacientes (Fernandes & Videla, 1989). A peroxidação lipídica encontrada em humanos com hipertireoidismo é suprimida a partir do tratamento com propylthiouracil – PTU (uma droga antitireoideana análoga ao MMI) (Videla & Wolff, 1988). A longevidade é aumentada em animais induzidos a um quadro de hipotireoidismo no período neonatal (Ooka et al., 1983) e a administração de T₄ significativamente encurta o tempo de vida (Timiras, 1986). Por fim, Adamo et al., 1989, observaram um aumento na atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase no cérebro de animais neonatos hipertiroideos, que eles supõem ser um mecanismo compensatório para o marcante estresse oxidativo. Contrariamente a esses dados, Rahaman et al. (2001), observaram aumento nos níveis de SOD, catalase, OH, oxidação protéica e peroxidação lipídica no cérebro de ratos com hipotireoidismo congênito de 15 e 25 dias pós-natais. Paralelamente, observaram um declínio nos níveis de glutathione e citocromo c mitocondrial. Entretanto, em animais com hipotireoidismo congênito contando com 1 e 5 dias pós-natais, apenas os níveis de catalase estavam aumentados. Apesar dos dados serem contraditórios, há a possibilidade de que a diminuição nos níveis de estresse oxidativo nos quadros de hipotireoidismo,

(observada em alguns estudos), podem de alguma forma estar colaborando para a diminuição na fosforilação de p38^{MAPK}.

O aumento na fosforilação de ERK-2 e a diminuição da fosforilação de p38^{MAPK} não foram observados em hemisférios cerebrais de animais hipotiroideos. Isto parece evidenciar que as alterações observadas podem estar restritas à tipos celulares homogêneos e/ou específicos, provavelmente células que possuam receptores para TRH.

Nossos resultados mostram que também não houve aumento do imunocontéudo de Hsp-70 tanto em hipocampos quanto em hemisférios cerebrais de ratos hipotiroideos. Um dos importantes eventos durante os estados de estresse celular é o aumento da expressão das Hsps, sendo elas inclusive chamadas de proteínas de estresse (Ohtsuka & Suzuki, 2000). Esse tipo de resposta depende da ativação de fatores ("heat shock factors"; HSFs) que estimulam a transcrição de HSPs (Morimoto et al., 1997). A ativação de HSF1, por sua vez, envolve sua fosforilação por p38^{MAPK} e/ou ERK 1/2 (Hung et al., 1998). A não alteração do imunocontéudo de Hsp-70 em hipocampos de animais hipotiroideos, fortalece os trabalhos que observam uma diminuição do estresse oxidativo em animais hipotiroideos e conseqüentemente, fortalece o nosso próprio trabalho na medida em que a principal MAPK ativada por estresse, ou seja, a p38^{MAPK}, apresenta diminuição de sua atividade em hipocampos de ratos hipotireoideos.

Finalmente, não foram observadas modificações no imunocontéudo das subunidades catalíticas de PP1 e de PP2A tanto em hipocampos quanto em hemisférios cerebrais hipotiroideos. Entretanto, apesar da não alteração de conteúdo das subunidades catalíticas de PP1 e PP2A, não pode ser descartada a possibilidade de modificação das subunidades reguladoras e da atividade e localização subcelular dessas enzimas pelo hipotireoidismo congênito. Ações desta natureza

poderiam contribuir para um desequilíbrio fosforilação/defosforilação. Entretanto, esses aspectos não foram avaliados por nós.

Nossos resultados estão demonstrando haver uma forte e importante conexão entre o modelo do hipotireoidismo congênito e a regulação de MAPKs. Essa conexão, até o momento, aparentemente nunca havia sido identificada. Nossos resultados são de grande importância para o fornecimento das bases moleculares dos mecanismos envolvidos nos danos neurológicos associados ao cretinismo. Além disso, tornam menos obscuro o papel dos hormônios tireoideanos durante o desenvolvimento do SNC. Sugerimos que pelo menos parte dos danos neurais e cognitivos ocasionados pela deficiência de T₃ e T₄ podem estar sendo influenciados por alterações nos mecanismos de transdução de sinal, particularmente aumento na fosforilação de ERK-2 e diminuição na fosforilação de p38^{MAPK} hipocampal. Finalmente, sugerimos a hipótese de que estas alterações nos mecanismos de transdução de sinal podem ocorrer pela deficiência de T₃/T₄ indiretamente, através do aumento dos níveis de TRH e/ou TSH, os quais então poderiam influenciar diretamente a atividade e/ou inibição das MAPKs.

7.0 – CONCLUSÕES

- O modelo de hipotireoidismo congênito utilizado se mostrou muito eficiente, uma vez que foi observado um aumento de 313% nos níveis de TSH e uma diminuição de 86% nos níveis de T₄ no soro de ratos neonatos cujas mães foram tratadas com MMI-0,02%.
- Houve um aumento de cerca da 50% na fosforilação de ERK-2 e uma diminuição de cerca de 50% na fosforilação de p38^{MAPK} em hipocampos de ratos neonatos com hipotireoidismo congênito. Esta diferença não foi observada em hemisférios cerebrais de ratos neonatos hipotiroideos.
- O imunoconteúdo da proteína de choque térmico (Hsp-70), e da subunidade catalítica das proteínas fosfatases (PP1 e PP2A) não foi alterado tanto em hipocampos quanto em hemisférios cerebrais de ratos neonatos hipotiroideos.
- Propomos que um mecanismo indireto, através da diminuição dos níveis de T₃ e T₄ e conseqüente aumento dos níveis de TSH e/ou TRH, seja o responsável tanto pelo aumento na fosforilação de ERK-2 quanto pela diminuição na fosforilação de p38^{MAPK} em hipocampos de ratos neonatos hipotiroideos.

8.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abe, K.; Aoyagi, A.; Saito, H. Sustained phosphorylation of mitogen-activated protein kinase is required for basic fibroblast growth factor-mediated axonal branch formation in cultured rat hippocampal neurons. **Neurochemistry International**. v.38, p.309-315, 2001.
2. Adamo, A. M.; Llesuy, S. F.; Pasquini, J. M.; Boveris, A. A. Brain chemiluminescence and oxidative stress in hyperthyroid rats. **Biochemical Journal**. v.263, p.273-277, 1989.
3. Agell, N.; Bachs, O.; Rocamora, N.; Villalonga, P. Modulation of the Ras-Raf-MEK-ERK pathway by Ca²⁺, and Calmodulin. **Cellular Signalling**. v.14, p.649-654, 2002.
4. Ahlgren, S.C.; Wallace, H.; Bishop, J.; Neophytou, C.; Raff, M.C. Effects of thyroid hormone on embryonic oligodendrocyte precursor cell development in vivo and in vitro. **Molecular and Cellular Neuroscience**. v.9, p. 420-432, 1997.
5. Aikawa, R.; Komuro, I.; Yamazaki, T.; Zou, Y.; Kudoh, S.; Tanaka, M.; Shiojima, I.; Hiroi, Y.; Yazaki, Y. Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through Src and Ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. **Journal of Clinical Investigation**. v.100, p.1813-1821, 1997.
6. Akaike, M.; Kato, N.; Ohno, H.; Kobayashi, T. Hyperactivity and spatial maze learning impairment of adult rats with temporary neonatal hypothyroidism. **Neurotoxicology and Teratology**. v.13, p.317-322, 1991.
7. Alm, J.; Scott, S.; Fisher, D. A. Epidermal growth factor receptor ontogeny in mice with congenital hypothyroidism. **Developmental Physiology**. v.8, p.377-385, 1986.
8. Almazan, G.; Liu, H.N.; Khorchid, A.; Sundarajan, S.; Martinez-Bermudez, A. K.; Chemtob, S. Exposure of developing oligodendrocytes to cadmium causes HSP72 induction, free radical generation, reduction in glutathione levels, and cell death. **Free Radical Biology and Medicine**. v.29, p.858-869, 2000.
9. Alvarez-Dolado, M.; Gonzalez-Sancho, J.M.; Bernal, J.; Munoz, A. Developmental expression of the tenascin-C is altered by hypothyroidism in the rat brain. **Neuroscience**. v.84, p.309-322, 1998.
10. Alvarez-Dolado, M.; Ruiz, M.; Del Rio, J.A.; Alcantara, S.; Bugaya, F. Thyroid Hormone regulates reelin and dab1 expression during brain development. **Journal of Neuroscience**. v.19, p. 6979-6993, 1999.
11. Anderson, G. Thyroid Hormones and the Brain. **Frontiers in Neuroendocrinology**. v.22, p.1-17, 2001.

12. Balazs, R. Hormonal influences on brain development. In: Michael, R. P. **Biochemistry of the Developing Brain**. New York: Dekker, 1973, p.39-63.
13. Bernal, J. & Nunez, J. Thyroid hormones and brain development. **European Journal of Endocrinology**. v.133, p. 390-398, 1995.
14. Bhat, V.R.; Sarlieve, L.L.; Rao, G.S.; Pieringer, R.A. Investigations on myelination in vitro: Regulation by thyroid hormone in cultures of dissociated brain cells from embryonic mice. **Journal of Biological Chemistry**. v.254, p. 9342-9344, 1979.
15. Bhat, N.R. & Zhang, P. Hydrogen peroxide activation of multiple mitogen-activated protein kinases in an oligodendrocyte cell line: role of extracellular signal-regulated kinase in hydrogen peroxide-induced cell death. **Journal of Neurochemistry**. v.72, p.112-119, 1999.
16. Bobrovskaya, L.; Odell, A.; Leal, R.B.; Dunkley, P.R. Tyrosine hydroxylase phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells: the role of MAPKs after angiotensin II stimulation. **Journal of Neurochemistry**. v.78, p.490-498, 2001.
17. Boulton, T.G.; Nye, S.H.; Robbins, D.J.; Ip, N.Y.; Radziejewska, E.; Morgenbesser, S.D.; DePinho, R.A.; Panayotatos, N.; Cobb, M.H.; Yancopoulos, G.D. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. **Cell**. v.65, p.663-675, 1991.
18. Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v.72, p. 248-254, 1976.
19. Bruhn, T.O.; Taplin, J.H. Jackson, I.M.D. Hypothyroidism reduces content and increases *in vitro* release of pro-thyrotropin-releasing hormone peptides from the median eminence. **Neuroendocrinology**. v.53, p.511-515, 1991.
20. Bulavin, D.V.; Higashimoto, Y.; Popoff, I.J.; Gaarde, W.A.; Basrur, V.; Potapova, O.; Apella, E.; Fornace, A. J. Jr. Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase. **Nature**. v.411, p.102-107, 2001.
21. Burt, D.R & Snyder, S.H. Thyrotropin Releasing Hormone (TRH): Apparent receptor binding in rat brain membranes. **Brain Research**. v.93, p.309-328, 1975.
22. Calikoglu, A.S.; Gutierrez-Ospina, G.; D'Ercole, A. J. Congenital hypothyroidism delays the formation and retards the growth of the mouse primary somatic sensory cortex (S1). **Neuroscience Letters**. v.213, p.132-136, 1996.
23. Campos, C.B.L.; Bédard, P.A.; Linden, R. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase during normal mitosis in the developing retina. **Neuroscience**. v.112, p.583-591, 2002.

24. Chang, L. & Karin, M. Mammalian MAP kinase signaling cascades. **Nature**. v.410, n.1, p.37-40, 2001.
25. Chin, W.W. & Yen, P.M. Molecular mechanisms of nuclear thyroid hormone action. In: Le Braverman. **Diseases of the Thyroid**. New Jersey: Humana Press, 1997, p.1-15.
26. Chow, C.W.; Rincon, M.; Cavanagh, J. Dickens, M., Davis, R.J. Nuclear Accumulation of NFAT4 Opposed by the JNK Signal Transduction Pathway. **Science**. v.278, p.1638-1641, 1997.
27. Cobb, M.H. & Robinson, M.J. Mitogen-activated protein kinase pathways. **Current Opinion in Cell Biology**. v.9, p.180-186, 1997.
28. Cohen, P. The structure and regulation of protein phosphatases. **Annual Review of Biochemistry**. v.58, p.453-508, 1989.
29. Collins, E. & Sim, A.T.R. Regulation of neuronal PP1 and PP2A during development. **Methods in Molecular Biology**. v.93, p.79-102, 1998.
30. Comer, C.P & Norton, S. Behavioral consequences of perinatal hypothyroidism in postnatal and adult rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** v.22, p.605-611, 1985.
31. Cooper, D.S.; Kieffer, J.D.; Saxe, V.; Mover, H.; Maloof, F.; Ridgway, E.C. Methimazole Pharmacology in the rat: studies using a newly developed radioimmunoassay for Methimazole. **Endocrinology**. v.114, p.786-793, 1984.
32. Crisanti, P.; Omri, B.; Hughes, E.; Meduri, G.; Hery, C.; Clauser, E.; Jacquemin, C.; Saunier, B. The expression of Tyrotropin Receptor in the brain. **Endocrinology**. v.142, p.812-822, 2001.
33. Dahl, G.R.; Evans, N.P.; Thrun, L.A.; Karsch. A central negative feedback action of thyroid hormones on thyrotropin-releasing hormone secretion. **Endocrinology**. v.135, p.2392-2397, 1994.
34. Davis, R.J. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. **Journal of Biological Chemistry**. v.268, p.14553-14556, 1993.
35. Davis, P.J. Shih, A.; Lin, H-Y.; Martino, L.J.; Davis, F.B. Thyroxine promotes association of mitogen-activated protein kinase and nuclear thyroid hormone receptor (TR) and causes serine phosphorylation of TR. **Journal of Biological Chemistry**. v.275, p.38032-38039, 2000.
36. Della Rocca, G.J.; Van Biesen, T.; Daaka, Y.; Luttrell, D.K.; Luttrell, L.M.T.; Lansing, T.J.; Lefkowitz, R.J. Ras-dependent mitogen activated protein kinase activation by G protein-coupled receptors: convergence of G1 and Gq mediated pathways on calcium/calmodulin Pyk2, and Src kinase. **Journal of Biological Chemistry**. v.272, p.19125-19132, 1997.
37. Demoor, J.M. & Koropatnick, D.J. Metals and cellular signalling in mammalian cells. **Cellular and Molecular Biology**. v.46, p.367-381, 2000.

38. Dérjard, B.; Hibi, M.; Wu, I-H.; Barret, T.; Su, B.; Deng, T.; Karin, M.; Davis, R.J. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. **Cell**. v.76, p.1025-1037, 1994.
39. Dérjard, B.; Raingeaud, J.; Barret, T.; Wu, I.H.; Han, J.; Ulevitch, R.J.; Davis, R.J. Independent human MAP kinase signal-transduction pathway defined by MEK and MKK isoforms. **Science**. v.267, p.682-685, 1995.
40. Diehl, N.L.; Enslin, H.; Fortner, K.A.; Merritt, C.; Stetson, N.; Charland, C.; Flavell, R. A.; Davis, R. J.; Rincon, M. Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway arrests cell cycle progression and differentiation of immature thymocytes in vivo. **Journal of Experimental Medicine**. v.191, p.321-334, 2000.
41. Durand, B.; Raff, M. A cell-intrinsic timer that operates during oligodendrocyte development. **BioEssays**. v.22, p.64-71, 2000.
42. Dussault, J.H & Ruel, J. Thyroid hormones and brain development. **Annual Review of Physiology**. v.49, p.321-334, 1987.
43. Eayrs, J.T; Lishman, W.A. The maturation of behaviour in hypothyroidism and starvation. **British Journal of Animal Behavior**. v.3, p.17-24, 1955.
44. English, J.D. & Sweatt, J.D. Activation of p42 Mitogen-Activated Protein Kinase in Hippocampal Long Term Potentiation. **Journal of Biological Chemistry**. v.271, p.24329-24332, 1996.
45. English, J.D. & Sweatt, J.D. A requirement for the Mitogen-Activated Protein Kinase cascade in hippocampal long term potentiation. **Journal of Biological Chemistry**. v.272, p.19103-19106, 1997.
46. Enslin, H.; Tokumitsu, H.; Stork, P.J.S.; Davis, R.J.; Soderling, T.R. Regulation of mitogen-activated protein kinase by a calcium/calmodulin-dependent protein kinase cascade. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.93, p.10803-10808, 1998.
47. Essman, W.B.; Mendoza, L.A.; Hamburgh, M. Critical periods of maze acquisition development in euthyroid and hypothyroid rodents. **Psychological Reports** v.23, p.795-800, 1968.
48. Farwell, A.P.; Tranter, M.P.; Leonard, J.L. Thyroxine-dependent regulation of integrin-laminin interactions in astrocytes. **Endocrinology**. v. 136, p.3909-3915, 1995.
49. Fernandez, V. & Videla, L.A. **Thyroid hormone, active oxygen and lipid peroxidation**. In: Niquel J.; Quintanilha, A.T.; Weber, H. Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1989, vol 1, p.105-113.

50. Fuchs, S.Y.; Adler, V.; Pincus, M.R.; Ronai, Z. MEKK1/JNK signaling stabilizes and activates p53. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.95, p.10541-10546, 1998.
51. Gerges, N.Z.; Stringer, J.L.; Alkadhi, K.A. Combination of hypothyroidism and stress abolishes early LTP in the CA1 but not dentate gyrus of hippocampus of adult rats. **Brain Research**. v.922, p.250-260, 2001.
52. Gerendai, I.; Nemeskeri, A.; Faivre-Bauman, A.; Grouselle, D.; Tixier-Vidal, A. Effect of unilateral or bilateral thyroidectomy on TRH content in hypothalamus halves. **Journal of Endocrinology Investigation**. v.8, p.321-323, 1985.
53. Giasson, B.I. & Mushynski, W.E. Study of proline-directed protein kinases involved in phosphorylation of the heavy neurofilament subunit. **Journal of Neuroscience**. v.17, p.9466-9472, 1997.
54. Gille, H.; Sharrochs, A.D.; Shaw, P.E. Phosphorylation of transcription factor p62TCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promoter. **Nature**. v.358, p.414-417, 1992.
55. Giordano, T.; Pan, J.B.; Casuto, D.; Watanabe, S.; Arneric, S.P. Thyroid hormone regulation of NGF, NT-3 and BDNF RNA in the adult rat brain. **Molecular Brain Research**. v.16, p.239-245, 1992.
56. Gonçalves, D.S.; Lenz, G.; Karl, J.; Gonçalves, C.A.; Rodnigt, R. Extracellular S100B protein modulates ERK in astrocyte cultures. **Neuroreport**. v.11, p.807-809, 2000.
57. Gravel, C. & Rawkes, R. Maturation of the corpus callosum of the rat: I-Influence of thyroid hormones on the topography of callosal projections. **Journal of Comparative Neurology**. v. 291, p. 128-146, 1990.
58. Graves, L.M.; Bornfeldt, K.E.; Sidhu, J.S.; Argast, G.M.; Raines, E.W.; Ross, R.; Leslie C.C.; Krebs, E.G. Platelet-derived growth factor stimulates protein kinase A through a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway in human arterial smooth muscle cells. **Journal of Biological Chemistry**. v.271, p.505-511, 1996.
59. Greengard, P.; Valtorta, F.; Czernik, A.J. Benfenati, F. Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. **Science**. v.259, p.780-785, 1993.
60. Gu, Z.; Jiang, Q.; Zhang, G. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in hippocampus after cerebral ischemia may not interfere with postischemic cell death. **Brain Research**. v.901, p.79-84, 2001.
61. Hamburg, M.; Lynn, E.; Weiss, E.P. Analysis of the influence of thyroid hormone on prenatal and postnatal maturation of the rat. **The Anatomical Record**. v.150, p. 147-162, 1964.

62. Han, J.; Lee, J.D.; Bibs, L.; Ulevitch, R.J. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. **Science**. v.265, p.808-811, 1994.
63. Hara, T.; Namba, H.; Yang, T-T.; Nagayama, Y.; Fukata, S.; Kuma, K.; Ishikawa, N.; Ito, K.; Yamashita, S. Thyrotropin regulates c-Jun N-Terminal Kinase (JNK) activity through two distinct signal pathways in human thyroid cells. **Endocrinology**. v.140, n.4, p1721-1730, 1999.
64. Harper, S.J & LoGrasso. Signalling for survival and death in neurones: The role of stress-activated kinases, JNK and p-38. **Cellular Signalling**. v.13, p.299-310, 2001.
65. Heidenreich, K.A.& Kummer, J.L. Inhibition of p-38 mitogen-activated protein kinase by insulin in cultured fetal neurons. **Journal of Biological Chemistry**.v.271, p.9891-9894, 1996.
66. Hendrich, C.E.; Jackson, W.J.; Porterfield, S.P. Behavioral testing of progenies of Tx (hipothyroid) and growth hormone treated Tx rats: an animal model for mental retardation. **Neuroendocrinology**. v.38, p.429-437, 1984.
67. Hilfiker, S.; Schweizer, F.E.; Kao, H-T.K.; Czernik, A.J.; Greengard, P.; Augustine, G.J. Two sites of action for synapsin domain B in regulating neurotransmitter release. *Nature Neuroscience*. v.1, p.29-35, 1998.
68. Houde, M.; Laprise, P.; Jean, D.; Blais, M.; Asselin, C.; Rivard, N. Intestinal epithelial cell differentiation involves activation of p38 Mitogen-activated protein kinase that regulates the homeobox transcription factor CDX2. **Journal of Biological Chemistry**. v.276, p.21885-21894, 2001.
69. Hu, J.; Ferreira, A.; Van Eldik, L.J. S100beta induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes. **Journal of Neurochemistry**. v.69, p.2294-2301, 1997.
70. Hung, J.; Cheng, T.; Chang, M.D.; Chen, K.; Huang, H.; Lai, Y. Involvement of heat shock elements and basal transcription elements in the differential induction of the 70-kDa heat shock protein and its cognate by cadmium chloride in 9L brain tumour cells. **Journal of Cellular Biochemistry**. v.71, p.21-35, 1998.
71. Hunter, T. Protein kinases and phosphatases: the Yin and Yang of protein phosphorylation and signalling. **Cell**. v.80, p.225-236, 1995.
72. Huskey, R.J. Tyrosine Kinase Pathway. Disponível em: <http://www.people.virginia.edu/~rjh9u/IntroBio/rtksignl.html>. Acesso em: 15/11/2002.
73. Ibarrola, V.; Mayer-Proschel, M.; Rodriguez-Pena, A.; Noble, M. Evidence for the existence of at least two timing mechanisms that contribute to oligodendrocyte generation in vitro. **Developmental Biology**. v.180, p. 1-21, 1996.

74. Iglesias, T.; Caubin, J.; Stunnenberg, H.G.; Zaballos, A.; Bernal, J.; Munoz, A. Thyroid hormone dependent transcriptional repression of neural cell adhesion molecule during brain maturation. **EMBO Journal**. v.15, p.4307-4316, 1996.
75. Irio, Y.; Matsuoka, M.; Wispriyono, B.; Sugiura, T.; Igisu, H. Involvement of the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) pathway in the induction of apoptosis by cadmium chloride in CCRF-CEM cells. **Biochemical Pharmacology**. v.60, n.12, p.1875-1882, 2000.
76. Irving, E.A.; Barone, F.C.; Reith, A.D.; Hadingham, S.J.; Parsons, A.A. Differential activation of MAPK/ERK and p38/SAPK in neurones and glia following focal cerebral ischaemia in the rat. **Molecular Brain Research**. v.77, p.65-75, 2000.
77. Ivanova, T.; Karolczak, M.; Beyer, C. Estrogen stimulates the mitogen-activated protein kinase pathway in midbrain astroglia. **Brain Research**. v.889, p.264-269, 2001.
78. Izumi, Y.; Hirata, M.; Hasuwa, H.; Iwamoto, R.; Umata, T.; Mlyado, K.; Tamai, Y.; Kuriasaki, T.; Sehara-Fujisawa, A.; Ohno, S.; Mekada, E. A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin- γ /ADAM9 and PKC δ are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. **EMBO Journal**. v.17, p.7260-7272, 1998.
79. Jameson, J. & DeGroot, L. **Mechanisms of thyroid hormone action**. In: DeGroot L.J. Endocrinology. 3^a ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1994, p.583-601.
80. Jiang, Y.; Chen, C.; Li, Z.; Guo, W.; Gegner, J.A.; Shengcai, L.; Han, J. Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38 β). **Journal of Biological Chemistry**. v.271, p.17920-17926, 1996.
81. Jiang, Y.; Gram, H.; Zhao, M.; New, L.; Gu, J.; Feng, L.; Di Padova, F.; Ulevitch, R.J.; Han, J. Characterization of the structure and function of the fourth member of the p38 group mitogen-activated protein kinases, p38 δ . **Journal of Biological Chemistry**. v.272, p.30122-30128, 1997.
82. Jovanovic, J.N.; Benfenati, F.; Siow, Y.L.; Sihra, T.S.; Sanghera, J.S.; Pelech, S.L, Greengard, P.; Czernik, A.J. Neurotrophins stimulate phosphorylation of synapsin I by MAP kinase and regulate synapsin I-actin interactions. **Neurobiology**. v.93, p.3679-3683, 1996.
83. Kallunki, T.; Su, B.; Tsigelny, I.; Sluss, H.K.; Dérijard, B.; Moore, G.; Davis R.; Karin, M. JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation. **Genes and Development**. v.8, p.2996-3007, 1994.
84. Kanasaki, H.; Fukunaga, K.; Takahashi, K.; Miyazaki, K.; Miyamoto, E. Involvement of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activation in Bromocriptine-Induced Apoptosis in Rat Pituitary GH3 Cells. **Biology of Reproduction**. v.62, p.1486-1494, 2000.
85. Kawasaki, H.; Morooka, T.; Shimohama, S.; Kimura, J.; Hirano, T.; Gotoh, Y.; Nishida, E. Activation and involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in glutamate-induced

- apoptosis in rat cerebellar granule cells. **Journal of Biological Chemistry**. v.272, p.18518-18521, 1997.
86. Kesavan, P.; Mukhopadhyay, S.; Murphy, S.; Rengaraju, M.; Lazar, M.A.; Das, M. Thyroid Hormone decreases the expression of epidermal growth factor receptor. The **Journal of Biological Chemistry**. v.266, p.10282-10286, 1991.
87. Kikuchi, M.; Tenneti, L.; Lipton, S.A. Role of p38 mitogen activated protein kinase in axotomy-induced apoptosis of rat retinal ganglion cells. **Journal of Neuroscience**. v.20, p.5037-5044, 2000.
88. Koenig, R.J. Thyroid hormone receptor coactivators and corepressors. **Thyroid**. v.8, p.703-713, 1998.
89. Koibuchi, V.; Fukuda, H.; Chin, W.W. Promoter-specific regulation of the brain-derived-neurotrophic factor gene by thyroid hormone in the developing rat cerebellum. **Endocrinology**. v.140, p. 3955-3661, 1999.
90. Koibuchi, V. & Chin, W.W. Thyroid hormone action and brain development. **Trends in Endocrinology Metabolism**. v.11, p. 123-128, 2000.
91. Koller, K.J.; Wolff, R.S.; Warden, M.K.; Zoeller, R.T. Thyroid hormones regulate levels of thyrotropin-releasing-hormone mRNA in the paraventricular nucleus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.84, p.7329-7333, 1987.
92. Kortenjann, M. & Shaw, P.E. Raf-1 kinase and ERK-2 uncoupled from mitogenic signals in rat fibroblasts. **Oncogene**. v.11, p.2105-2112, 1995.
93. Kubek, M.J.; Lorincz, M.A.; Wilber, J.F. The identification of thyrotropin releasing hormone (TRH) in hypothalamic and extrahypothalamic loci of the human nervous system. **Brain Research**. v.126, p.196-200, 1977.
94. Kubek, M.J.; Low, W.C.; Sattin, A.; Morzorati, S.L.; Meyerhoff, J.L.; Larsen, S.H. Role of TRH in seizure modulation. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.553, p.286-303, 1989.
95. Kubek, M.J.; Garg, B.P.; BS, M.B. Thyrotropin-Releasing Hormone in the treatment of intractable epilepsy. **Pediatric Neurology**. v.26, p.9-17, 2002.
96. Kumar, S.; McDonnell, P.C.; Gum, R.J.; Hand, A.T.; Lee, J.C.; Young, P.R. Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.235, p533-538, 1997.
97. Kurata, S.I. Selective activation of p38 MAP kinase cascade and mitotic arrest caused by low level oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**. v.275, p.23413-23416, 2000.

98. Kyriakis, J.M. & Avruch, J. Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. **Journal of Biological Chemistry**. v.271, p.24313-24316, 1996.
99. Laemmli, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v.227, p.680-685, 1970.
100. Lavoie, J.N.; L'Altemain, G.; Brunet, A.; Müller, R.; Pouyssegur, J. Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/44^{MAPK} and negatively by the p38/HOG^{MAPK} pathway. **Journal of Biological Chemistry**. v.271, p.20608-20616, 1996.
101. Lauder, J.M. The effects of early hypo- and hyperthyroidism on the development of rat cerebellar cortex III – Kinetics of cell proliferation in the external granular layer. **Brain Research**. v.126, p.31-51, 1978
102. Lauder, J.M. Granule cell migration in developing rat cerebellum: Influence of neonatal hypo- and hyperthyroidism. **Developmental Biology**. v.70, p.105-115, 1979.
103. Legrand, J. Variations en fonction de l'âge de la réponse du cervelet à l'action morphogénétique de la thyroïde chez le rat. **Archives d'anatomie microscopique et de morphologie expérimentale**. v.56, p.291-307, 1967.
104. Lewis, T.S.; Shapiro, P.S.; Ahn, N.G. Signal transduction through MAP kinases cascades. **Advances in Cancer Research**. v.74, p.49-139, 1998.
105. Li, W.; Whaley, C.D.; Mondino, A.; Mueller, D.L. Blocked signal transduction to the ERK and JNK protein kinases in anergic CD4⁺T cells. **Science**. v.271, p.1272-1276, 1996.
106. Lin, H-Y.; Davis, F.B.; Gordinier, J.K.; Martino, L.J.; Davis, P.J. Thyroid hormone induces activation of mitogen-activated protein kinase in cultured cells. **American Journal of Physiology**. v.276, p.C1014-C1024, 1999.
107. Luttrell, L.M.; Hawes, B.E.; Van Biesen, T.; Luttrell, D.K.; Lansing, T.J.; Lefkowitz, R.J. Role of c-Src tyrosine kinase in G protein-coupled receptor and Gβγ subunit-mediated activation of mitogen-activated protein kinase. **Journal of Biological Chemistry**. v.271, p.19443-19450, 1996.
108. Luttrell, L.M.; Della Rocca, G.J.; Van Biesen, T.; Luttrell, D.K.; Lefkowitz, R.J. Gβγ subunits mediate Src dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. A scaffold for G protein-coupled receptor-mediated Ras activation. **Journal of Biological Chemistry**. v.272, p.4637-4644, 1997.
109. MacNabb, C.; O'Hare, E.; Cleary, J.; Georgopoulos, A.P. Varied duration of congenital hypothyroidism potentiates perseveration in a response alternation discrimination task. **Neuroscience Research**. v.36, p.121-127, 2000.

110. Madeira, M.D.; Sousa, V.; Lima-Andrade, M.T.; Calheiros, F.; Cadete-Leite, A.; Paula Barbosa, M.M. Selective vulnerability of the hippocampal pyramidal neurons to hypothyroidism in male and female rats. **Journal of Comparative Neurology**. v.322, p.501-518, 1992.
111. Madeira, M.D & Paula-Barbosa, M.M. Reorganization of mossy fiber synapses in male and female hypothyroid rats: A stereological study. **Journal of Comparative Neurology**. v.337, p.334-352, 1993.
112. Maletic-Savatic, M.; Malinov, R.; Scovoda, K. Rapid dendrite morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. **Science**. v.283, p.1923-1927, 1999.
113. Marais, R.; Wynne, J.; Treisman, R.; The SRF accessory protein ELK-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. **Cell**. v.73, p.381-393, 1993.
114. Marchant, B.; Brownlie, B.E.W.; McKay, H.D.; Horton, P.W.; Alexander, W.D. The placental transfer of propylthiouracil, methimazole and carbimazole. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. v.45, p.1187-1193, 1977.
115. Martinez-Gálan, J.R.; Pedraza, P.; Santana, M.; Escobar Del Ray, F.; Morreale de Escobar, G.; Ruiz-Marcos, A. Early effects of iodine deficiency on radial glial cells of the hippocampus of the rat fetus. A model of neurological cretinism. **Journal of Clinical Investigation**. v.99, p.2701-2709, 1997.
116. Martin-Blanco, E. p38 MAPK signaling cascades: ancient roles and new functions. **BioEssays**. v.22, p.637-645, 2000.
117. McKenna, V.J.; Lanz, R.B.; O'Malley, B.W. Nuclear receptor coregulators: Cellular and molecular biology. **Endocrinology Reviews**. v. 20, p.321-344, 1999.
118. Mellström, A.; Naranjo, J.R.; Santos, A.; Gonzalez, A.M.; Bernal, J. Independent expression of the alpha and beta c-erbA genes in developing rat brain. **Molecular Endocrinology**. v.5, p.1339-1350, 1991.
119. Mielke, K.; Brecht, S.; Dorst, A.; Herdegen, T. Activation of JNK and p38 stress kinases, c-Jun phosphorylation and c-Jun/AP-1 DNA binding activity following kainic acid induced seizures. **Neuroscience**. v.91, p.471-483, 1999.
120. Mielke, K. & Herdegen, T. JNK and p38 stresskinases – degenerative effectors of signal transduction-cascades in the nervous system. **Progress in Neurobiology**. v.61, p.45-60, 2000.
121. Minden, A. Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. **Science**. v.366, p.1719-1723, 1994.
122. Molnar, A.; Theodoras, A.M.; Zon, L.I.; Kyriakis, J.M. Cdc42Hs, but not Rac1, inhibits serum-stimulated cell cycle progression at G1/S through a mechanism requiring p38/RK. **Journal of Biological Chemistry**. v.272, p.13229-13235, 1997.

123. Morgan, M.J. & Einon, D.F. Activity and exploration in thyroid-deficient and socially-isolated rats. **Physiology & Behaviour**. v.16, p.107-110, 1976.
124. Mori M & Yamada, M. Thyroid hormones regulate the amount of thyrotropin-releasing hormone in the hypothalamic median eminence of the rat. **Journal of Endocrinology**. v.114, p.443-448, 1987.
125. Morimoto, R. I.; Kline, M. P.; Bimston, D. N.; Cotto, J. J. The heat-shock response: Regulation and function of heat-shock proteins and molecular chaperones. **Essays in Biochemistry**. v.32, p.17-29, 1997.
126. Müller, Y.; Rocchi, E.; Lazaro, J.B.; Clos, J. Thyroid hormone promotes BCL-2 expression and prevents apoptosis of early differentiating cerebellar granule neurons. **International Journal of Developmental Neuroscience**. v.13, p.871-885, 1995.
127. Munoz, A.; Rodrigues-Pena, A.; Perez-Castillo, A.; Ferreira, B.; Sutcliffe, J.G.; Bernal, J. Effects of neonatal hypothyroidism on rat brain gene expression. **Molecular Endocrinology**. v.5, p.273-280, 1991.
128. Nestler, E.J. & Greengard, P. Serine and threonine phosphorylation. In: Nestler, E.J. & Greengard, P. **Basic Neurochemistry**. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1999, p. 472-495.
129. Neveu, I. & Arenas, E. Neurotrophins promote the survival and development of neurons in the cerebellum of hypothyroid rats *in vivo*. **Journal of Cell Biology**. v.133, p.631-646, 1996.
130. NG, D.C.H. & Bogoyevitch, M.A. The mechanism of heat shock activation of ERK mitogen-activated protein kinases in the interleukin 3-dependent ProB cell. **The Journal of Biological Chemistry**. v.275, p.40856-40866, 2000.
131. Nillni, E.A. & Sevarino, K.A. The biology of pro-TRH-derived peptides. **Endocrine Reviews**. v.20, p.599-648, 1999.
132. Ohmichi, M.; Sawada, T.; Kanda, Y.; Koike, K.; Hirota, K.; Miyake, A.; Saltiel, A.R. Thyrotropin-Releasing Hormone stimulates MAP Kinase activity in GH3 cells by divergent pathways. **Journal of Biological Chemistry**. v.269, p.3783-3788, 1994.
133. Ohtsuka, K. & Suzuki, T. Roles of molecular chaperones in the nervous system. **Brain Research Bulletin**. v.53, p.141-146, 2000.
134. Ooka, H.; Fujita, S.; Yoshimoto, E. Pituitary-thyroid activity and longevity in neonatally thyroxine-treated rats. **Mechanisms of Ageing and Development**. v.22, p.113-120, 1983.

135. Oppenheimer, J.H.; Schwartz, H.L.; Surks, M.I. Tissue differences in the concentration of triiodothyronine nuclear binding sites in the rat: Liver, kidney, pituitary, heart, brain, spleen and testis. **Endocrinology**. v.95, p.897-903, 1974.
136. Orban, P.C.; Chapman, P.F.; Brambilla, R. Is the Ras-MAPK signalling pathway necessary for long-term memory formation. **Trends in Neuroscience**. v.22, p.38-44, 1999.
137. Park, D.S.; Levine, B.; Ferrari, G.; Greene, L.A. Cyclin dependent kinase inhibitors and dominant negative cyclin dependent kinase 4 and 6 promote survival of NGF-deprived sympathetic neurons. **Journal of Neuroscience**. v.17, p.8975-8983, 1997.
138. Pearlman, A.; Faust, P.; Hatten, M.; Brunstrom, J. New directors for neuronal migration. **Current Opinion in Neurobiology**. v.8, p.45-54, 1998.
139. Pearson, C.A. & Prozialeck, W.C. E-Cadherin, beta-Catenin and cadmium carcinogenesis. **Medical Hypotheses**. v.56, p.573-581, 2001.
140. Pesetsky, I. The development of abnormal cerebellar astrocytes in young hypothyroid rats. **Brain Research**. v.63, p.456-460, 1973.
141. Poddar, R.; Paul, S.; Chadhury, S.; Sarkar, P.K. Regulation of actin and tubulin gene expression by thyroid hormone during rat brain development. **Molecular Brain Research**. v.35, p.111-118, 1996.
142. Pombo, P.M.G.; Baretino, D.; Espliguero, G.; Metsis, M.; Iglesias, T.; Rodrigues-Peña, A. **Journal of Biological Chemistry**. v. 274, p.37510-37517, 2000.
143. Porterfield, S.P & Hendrich, C.E. The role of thyroid hormones in prenatal and neonatal neurological development - current perspectives. **Endocrinology Reviews**. v.14, p.94-106, 1993.
144. Price, N.E & Mumby, M.C. Brain protein serine/threonine phosphatases. **Current Opinion in Neurobiology**. v.9, p.336-342, 1999.
145. Prenzel, N.; Zwick, E.; Daub, H.; Laserer, M.; Abraham, R.; Wallasch, C.; Ullrich, A. EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. **Nature**. v.402, p.884-888, 1999.
146. Rahaman, Sk. O.; Ghosh, S.; Mohanakumar, K.P.; Das, S.; Sarkar, P.K. Hypothyroidism in the developing rat brain is associated with marked oxidative stress and aberrant intraneuronal accumulation of neurofilaments. **Neuroscience Research**. v.40, p.273-279, 2001.
147. Rami, A.; Rabie, A.; Patel, A.J. Thyroid hormone and development of the rat hippocampus: cell acquisition in the dentate gyrus. **Neuroscience**. v.19, p.1207-1216, 1986.

- 148.Rao, G.N. Hydrogen peroxide induces complex formation of SHC-Grb2-SOS with receptor tyrosine kinase and activates Ras and extracellular signal-regulated protein kinases. **Oncogene**. v.13, p.713-719, 1996.
- 149.Reynolds, C.H.; Utton, M.A.; Gibb, G.M.; Yates, A.; Anderton, B.H. Stress-activated protein kinase/c-jun N-terminal kinase phosphorylates tau protein. **Journal of Neurochemistry**. v.68, p.1736-1744, 1997.
- 150.Robinson, M.J. & Cobb, M.H. Mitogen-activated protein kinase pathways. **Current Opinion in Cell Biology**. v.9, p.180-186, 1997.
- 151.Rogalla, T.; Ehrnsperger, M.; Preville, X.; Kotlyarov, A; Lutsch, G.; Ducasse, C.; Paul, C.; Wieske, M.; Arrigo, A.P.; Buchners, J.; Gaestel, M. Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor α by phosphorylation. **The Journal of Biological Chemistry**. v.274, p.18947-18956, 1999.
- 152.Rogatsky, I.; Logan, S.K.; Garabedian, M.J. Antagonism of glucocorticoid receptor transcriptional activation by the c-Jun N-Terminal kinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.95, p.2050-2055, 1998.
- 153.Samali, A. & Orrenius, S. Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. **Cell Stress & Chaperones**. v.3, n.4, p.228-236, 1998.
- 154.Schiaffonati, L.; Maroni, P.;Bandinelli, P.;Tiberio, L.;Piccoletti, R. Hiperthermia induces gene expression of heat shock protein 70 and phosphorylation of mitogen activated kinases in the rat cerebellum. **Neuroscience Letters**. v.312, p.75-78, 2001.
- 155.Scott, A.J & Fisher, D.A.Epidermal growth factor receptor ontogeny in mice with congenital hypothyroidism. *Developmental Physiology*. v.8, n.5, p.377-385, 1986.
- 156.Seger, R. & Krebs, E.G. The MAPK signalling cascade. **FASEB Journal**. v.9, p.726-735, 1995.
- 157.Sharp, F.R.; Massa, S.M.; Swanson, R.A. Heat-shock protein protection. **Research News**. v.22, n.3, p.97-99, 1999.
- 158.Silva, J.E. & Rudas, P. Effects of congenital hypothyroidism on Microtubule-Associated Protein-2 expression in the cerebellum of the rat. **Endocrinology**. v.2, p.1276-1282, 1990.
- 159.Sluss, H.K.; Barret, T.; Dérjard, B.; Davis, R.J. Signal transduction by tumour necrosis factor mediated by JNK protein kinases. **Molecular and Cellular Biology**. v.14, p.8376-8384, 1994.
- 160.Strait, K.A.; Zou, L.; Oppenheimer, J.H. Beta 1 isoform-specific regulation of a triiodothyronine induced gene during cerebellar development. **Molecular Endocrinology**. v.6, p. 1874-1880, 1992.

161. Suzuki, M, Y.; Raab, G.; Moses, M.A.; Fernandez, C.A.; Klagsbrun, M. Matrix metalloproteinase-3 active heparin-binding EGF-like growth factor by cleavage at a specific juxtamembrane site. **The Journal of Biological Chemistry**. v.272, p.31730-31737, 1997.
162. Sweatt, J.D. The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. **The Journal of Neurochemistry**. v.76, p.1-10, 2001.
163. Tadlock, L. & Patel, T. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signaling in transformed growth of a cholangiocarcinoma cell line. **Hepatology**. v.33, p.43-51, 2001.
164. Takenaka, K.; Moriguchi, T.; Nishida, E. Activation of the protein kinase p38 in the spindle assembly checkpoint and mitotic arrest. **Science**. v.280, p.599-602, 1998.
165. Thompson, C.C & Bottcher, M.C. The product of a thyroid hormone-responsive gene interacts with thyroid hormone receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 94, p.8527-8532, 1997.
166. Timiras, P. Thyroid hormones, brain monoamines and the aging brain. In: Vezzadini P.; Facchini, A.; Labo, G. **Neuroendocrine System and Aging**: Rijswijk, Eurage, 1986, p.51-57.
167. Tomic, M.; Torch, S.; Comte, V.; Dolivo, M.; Honegger, P.; Matthieu, J.M. Triiodothyronine has diverse and multiple stimulating effects on expression of the major myelin protein genes. **Journal of Neurochemistry**. v.59, p.1770-1777, 1992.
168. Tournier, C.; Gavaret, J.M.; Jacquemin, C.; Pierre, M.; Saunier, B. Stimulation of mitogen-activated protein kinase by thyrotropin in astrocytes. **European Journal of Biochemistry**. v.228, p.16-22, 1995.
169. Towbin, H.; Staeheli, T.; Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.455, p.68-78, 1979.
170. Trentin, A.G.; Rosenthal, D.; Moura Neto, V. Thyroid hormone and conditioned medium effects on astroglial cells from hypothyroid and normal rat brain: factor secretion, cell differentiation and proliferation. **Journal of Neuroscience Research**. v.41, p.409-417, 1995.
171. Van Biesen, T.; Luttrell, M.; Hawes, B.E. Mitogenic signalling via G Protein-Coupled receptors. **Endocrine Reviews**. v.17, p.698-714, 1996.
172. Van Dam, H.; Wilhelm D.; Herr, I.; Steffen, A.; Herrlich, P.; Angel, P. ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinase to mediated c-jun induction in response to genotoxic agents. **EMBO Journal**. v.14, p.1798-1811, 1995.
173. Vara, H.; Martínez, B.; Santos, A.; Colino, A. Thyroid Hormone regulates neurotransmitter release in neonatal rat hippocampus. **Neuroscience**. v.1, p.19-28, 2002

174. Videla, L.A. & Wolff, Sir. T. Increased lipid peroxidation in hyperthyroid patients: Suppression by propylthiouracil treatment. **Free Radicals Research Community**. v.5, p.1-8, 1988.
175. Vogt Weisnhorn, D.M.; Roback, L.J.; Kwon, J.H.; Wainer, B.H. Coupling of cAMP/PKA and MAPK signalling in neuronal cells is dependent on developmental stage. **Experimental Neurology**. v.169, p.44-45, 2001.
176. Vulmsa, T.; Gons M.H.; de Vijlder, J. Maternal-fetal transfer of thyroxine in congenital hypothyroidism due to a total organification defect of thyroid agenesis. **New England Journal of Medicine**. v.321, p.13-16, 1989.
177. Wang, K.L.; Khan, M.T.; Roufogalis, B.B. Identification and characterization of a calmodulin-binding domain in Ral-A, a Ras-related GTP-binding protein purified from human erythrocyte membrane. **Journal of Biological Chemistry**. v.272, p.16002-16009, 1997.
178. Wang, Y.Z. & Bonner, J.C. Mechanism of extracellular signal-regulated kinase ERK-1 and ERK-2 activation by vanadium pentoxide in rat pulmonary myofibroblasts. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**. v.22, p.590-596, 2000.
179. Wang, Y-H.; Jue, S.F.; Maurer, R.A. Thyrotropin-Releasing Hormone stimulates phosphorylation of the epidermal growth factor receptor in GH3 pituitary cells. **Molecular Endocrinology**. v.14, n.9, p.1328-1337, 2000.
180. Whitmarsh, A.J.; Shore, P.; Sharrocks, A.D.; Davis, R.J. Integration of the MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element. **Science**. v.269 p.403-407, 1995.
181. Whitmarsh, A.J. & Davis, R.J. Transcription factor AP-1: regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. **Journal of Molecular Medicine**. v.74, p.589-607, 1996.
182. Winder, D.G & Sweatt, J.D. Roles of serine/threonine phosphatases in hippocampal synaptic plasticity. **Nature Reviews Neuroscience**. v.2, p.461-474, 2001.
183. Xia, Z.; Dickens, M.; Raingeaud, J.; Davis, R.J.; Greenberg, M.E. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. **Science**. v.270, p.1326-1331, 1995.
184. Xiao, Q & Nikodem, V.M. Apoptosis in the developing cerebellum of the thyroid deficient rat. **Frontiers in Biosciences**. v.3, p.A52-A57, 1998.
185. Xing, J.; Ginty, D.D.; Greenberg, M.E. Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. **Science**. v.273, p.959-963, 1996.