

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**Hipo- e Hipertireoidismo Afetam a Atividade de Ecto-
Nucleotidases de Fatias Hipocampais e Corticais de
Ratos Adultos**

Felipe Klein Ricachenevsky

Orientador: Prof. Dr. João José Freitas Sarkis

Trabalho apresentado como um
dos requisitos para obtenção do
grau de Bacharel no Curso de
Ciências Biológicas - Ênfase
Molecular

Porto Alegre
2004

Agradecimentos

Ao professor Sarkis, pela oportunidade de desenvolver este trabalho em seu laboratório e pela orientação dada na realização do mesmo.

À Alessandra Nejar Bruno (grande Gabiru!), pela paciência em ensinar, pela enorme vontade de ver o trabalho realizado e por estar sempre disponível para um desabafo, mesmo em meio aos experimentos. Com certeza nossa amizade ultrapassa a relação profissional.

Às pessoas do Laboratório de Enzimologia, em especial à Dani (que também teve que me agüentar, junto com a Alessandra, durante os experimentos desse trabalho), ao Jean (pelas explicações sobre enzimas e por ser parceiro de festa, truço e conversa em Caxambú), à Giana, Japinha, Vanessinha, Rafa, Émerson, Eliz., enfim, à todos com quem tive uma conversa, dei uma boa risada ou tomei um café, coisas que afinal também fazem parte do trabalho. Ao pessoal do laboratório 26, principalmente à Renata e ao Marcelo Paulista, parcerias de Caxambú.

Aos amigos que nada tiveram com a realização desse trabalho, mas que sem eles seria impossível me manter de pé: Mathias, Rafa, Tiago, Daniel, Luiza, Andréa, Paula, Fabiano, Luis, meus amigos de Cruz Alta (são muitos, e eles sabem quem são) e da faculdade (idem). Obrigado pela força, é bom saber que existem pessoas como vocês.

Às pessoas dos laboratórios de Biologia Molecular de Cestódeos (principalmente ao Cris, valeu por tudo que me ensinou), Imunogenética e Drosophila (me sinto me casa por lá!), Centro de Memória, à Valesca do Laboratório de Genética do Desenvolvimento e mais alguns perdidos por aí, valeu por me acolherem algumas vezes no ambiente de trabalho de vocês, mesmo que fosse para atrapalhar ao invés de ajudar.

À minha família, que sempre me apoiou em tudo. Por serem uma família de certa forma à moda antiga, que se ama, gosta de passar as datas festivas reunida e fazer churrasco aos domingos! Principalmente à minha avó, por estar sempre preocupada com todos e ao meu avô, simplesmente por ser quem ele é. Aos meus tios, principalmente o Tio Maneco, um grande cientista dentro de uma área que não valoriza a ciência.

Ao meu pai, meu pilar central, meu maior e insubstituível amigo! Por ter sempre dado força para que eu seguisse em frente, por me amar tanto e por me ensinar os valores que me

ensinou; por ser um homem correto, de ética forte e caráter reto. Pai, você será sempre meu grande ídolo! Te amo!

À minha mãe, por todo amor que me deu, por ser tão carinhosa e por nunca ter deixado de me ajudar. Pelo enorme incentivo, pela energia e entusiasmo que sempre me passou. Eu sei que você estaria hoje com um grande sorriso no rosto, se estivesse aqui. Você é a razão de eu ser o que sou e a razão de eu querer continuar. Te amo muito!

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica, sem eles este trabalho não seria realizado. À todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização dele.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

Sumário

| | |
|--|----|
| 1. Introdução..... | 4 |
| 1.1. Hormônios Tireoidianos e sua Ação..... | 4 |
| 1.2. Hipotireoidismo e Hipertireoidismo..... | 6 |
| 1.3. Ação dos Hormônios Tireoidianos no Sistema Nervoso Central..... | 9 |
| 1.4. ATP e Transmissão Purinérgica..... | 10 |
| 1.5. Adenosina..... | 11 |
| 1.6. NTPDases..... | 12 |
| 1.7. 5'-nucleotidase..... | 14 |
| 2. Objetivos..... | 16 |
| 3. Materiais e Métodos..... | 17 |
| 3.1. Animais e tratamentos..... | 17 |
| 3.1.1. Indução do Hipotireoidismo..... | 17 |
| 3.1.2. Indução do Hipertireoidismo..... | 17 |
| 3.1.3. Reposição Hormonal..... | 18 |
| 3.2. Fatias hipocampais e corticais..... | 18 |
| 3.3. Ensaio enzimático..... | 18 |
| 3.4. Determinação da quantidade de Proteína..... | 19 |
| 3.5. Análise estatística..... | 19 |
| 4. Resultados..... | 20 |
| 5. Discussão..... | 25 |
| 6. Bibliografia..... | 29 |

1. Introdução

1.1. Hormônios Tireoidianos e sua Ação

Tiroxina (T4), Triiodotironina (T3) e Triiodotironina reverso (rT3), constituem as três principais formas de hormônios tireoidianos (HT) conhecidos, sendo os únicos compostos do organismo que contêm iodo em sua estrutura. Estes hormônios modulam a atividade metabólica de praticamente todos os tecidos do organismo através de alterações na taxa de consumo de oxigênio e no metabolismo de proteínas, lipídeos e vitaminas. Além disso, os HT modulam a taxa de degradação e síntese de outros hormônios e fatores de crescimento, alterando a expressão gênica dos mesmos ou das enzimas responsáveis por estas vias (Smith 2002).

Os HT são sintetizados a partir de resíduos de tirosina presentes na proteína tiroglobulina, localizada no colóide da tireóide. Os átomos de iodo são oxidados e ligados aos resíduos de tirosina seqüencialmente pela ação da enzima tireóide peroxidase (Ganong, 1995). Esta reação dá origem à monoiodotirosina (MIT) e diiodotirosina (DIT). A reação de ligação entre MIT e DIT dá origem ao T3, enquanto que o T4 é originado a partir de dois DITs acoplados. Estas moléculas são então clivadas da tiroglobulina e liberadas na circulação (Guyton, 1995).

Os HT normalmente circulam no sangue ligados a proteínas plasmáticas, como a globulina fixadora de tiroxina (uma glicoproteína que apresenta alta afinidade por tiroxina) a pré-albumina fixadora de tiroxina e a própria albumina (Guyton, 1995). Estima-se que 50% do T4 seja liberado das proteínas fixadoras para as células teciduais em seis dias, enquanto que 50% do T3 é liberado em apenas 1,3 dias. A relação T4:T3 na circulação de humanos é de 14:1 (Adams & Rosman, 1971; Ingbar, 1978) e 5:1 na de ratos adultos machos (Schroder-Van Der Elst, 1990).

Uma vez dentro da célula, os hormônios têm atividades distintas. O T3 é cerca de quatro vezes mais potente em sua ação do que o T4, embora o T4 possua uma ação mais duradoura (Guyton, 1995). Apesar de estar presente em maior quantidade na circulação, cerca de um terço do T4 é convertida em T3 nos tecidos periféricos, principalmente no fígado e no rim. Somente 13% do T3 circulante é produzido na tireóide, sendo 87%

resultante da deiodinação feita nos outros tecidos (Ganong, 1995). Essa reação ocorre através de uma 5'-deiodinase. A maior quantidade de T4 na circulação é importante para que todos os tecidos recebam um aporte de hormônios tireoidianos adequado, uma vez que se apenas T3 fosse produzido, ele seria rapidamente captado por células e tecidos próximos à tireóide, devido a sua maior atividade, prejudicando a regulação exercida pelos TH.

A liberação dos HT é controlada pelo hormônio estimulante da tireóide (TSH) ou tirotropina, uma glicoproteína produzida pela hipófise e que é análoga às gonadotropinas que fazem a liberação de hormônios sexuais. O TSH é secretado seguindo um padrão circadiano sendo sua secreção também controlada pelos níveis de HT no sangue. Esta regulação por parte dos HT se dá através da inibição da expressão do gene de TSH, diminuindo a produção de hormônio na hipófise e levando a uma menor concentração do mesmo na circulação. Com a redução das concentrações de TSH, os HT são liberados em menor quantidade da tireóide, levando a um novo aumento da produção de TSH (Farwell e Braverman, 2001). Esta regulação caracteriza um *feedback* negativo clássico (Fig. 1). Adicionalmente, o Hormônio Liberador da Tirotropina (TRH) produzido pelo hipotálamo estimula a liberação de TSH e também tem sua produção inibida por altos níveis plasmáticos de HT. Além disso, o TSH tem sua secreção inibida por outros fatores, como o estresse e o calor, e aumentada por fatores como o frio (Ganong, 1995).

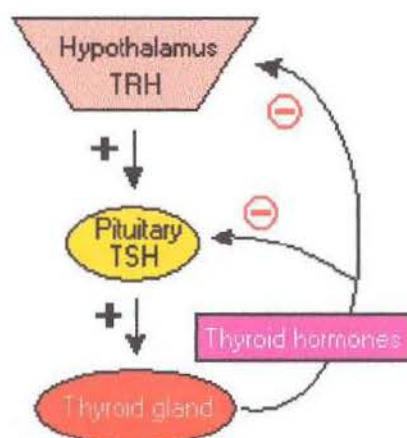


Figura 1: Regulação hormonal da liberação dos hormônios da tireóide. Adaptado de <http://arbl.cvmb.colostate.edu/hbooks/pathphys/endocrine/hypopit/tsh.html>.

Para atingirem o núcleo, os HT são transportados por difusão facilitada (DeGroot et al., 1984; Lazar, 1993) e exercem sua função através de receptores nucleares específicos de HT (THR). THR são fatores de transcrição pertencentes à uma superfamília de receptores que inclui os receptores nucleares de estrogênio, ácido retinóico, glicocorticóides e vitamina D. Os genes *c-erbA α* e *c-erbA β* codificam THR (Sap et al., 1986; Weinberger et al., 1986) podem gerar várias isoformas através de splicing alternativo (Lazar, 1993; Mitsuhashi et al., 1988). Os THR se ligam a elementos responsivos a hormônios tireoidianos (TRE) presentes na região promotora de genes responsivos, podendo fazê-lo como um monômero, um homodímero ou um heterodímero ligado a outra proteína (Glass, 1994). Existe ainda uma isoforma de receptor nuclear de HT codificada pelo gene *c-erbA α 2*, que não possui os domínios de transativação de genes responsivos nem os de ligação a HT, mas possui domínio de ligação a TRE, sendo portanto um regulador negativo da transcrição mediada por HT (Kamei et al., 1996). Os receptores nucleares de HT também interagem com co-ativadores e co-repressores, o que mostra a grande variedade de respostas que podem ser provocadas por estes hormônios.

1.2. Hipotireoidismo e Hipertireoidismo

Hipotireoidismo é a disfunção da tireóide de maior incidência, atingindo 2% da população mundial (Griffin, 2004). Existem alguns tipos de hipotireoidismo, relacionados a diferentes causas. O mais comum, que se deve a uma deficiência de iodo na dieta alimentar, recebe o nome de Mixedema, devido a lesões epidérmicas que surgem no paciente. Em certas regiões, o solo é bastante pobre em iodo, não permitindo que os alimentos contenham quantidade suficiente para suprir a necessidade de iodo de 50 mg anuais por indivíduo para que ocorra uma síntese adequada de HT. Nesses locais, o hipotireoidismo era muito comum até a introdução do consumo do sal de cozinha iodado (Guyton, 1995).

O paciente hipotireoideo apresenta fadiga extrema, sonolência, atividade muscular extremamente lenta, baixa frequência cardíaca, redução do débito cardíaco e do volume sanguíneo, aumento de peso devido a um metabolismo muito lento, constipação, lentidão mental, muitas vezes apresentando quadro de depressão, voz rouca e áspera, redução do crescimento de pêlos e pele escamosa, bastante seca e amarelada, caracterizando uma

carotenemia. A face pode apresentar intumescimento e inchaço sob os olhos, devido a um acúmulo de ácido hialurônico de causa ainda desconhecida, que termina por acumular líquido na região (Guyton, 1995). Assim, o rosto normalmente é pouco expressivo e muito pálido. Os cabelos tornam-se ralos, esparsos e grossos, os dedos das mãos tornam-se frágeis e finos. A atividade gastrointestinal é bastante reduzida, com baixo apetite, a bexiga perde a tonicidade (assim como outros músculos lisos, que tem suas contrações diminuídas). Apresentam também anemia normocítica, podendo haver desregulação do ciclo menstrual em mulheres, e intolerância ao frio (Farwell e Braverman, 2001). Ocorre também um acúmulo de LDL e triglicérides no sistema vascular, aumentando o risco de aterosclerose, arterioesclerose e problemas cardíacos (Guyton, 1995).

Além do hipotireoidismo devido à deficiência de iodo, existem ainda aqueles referentes a falhas na regulação exercida pelo TSH e pelo TRH, conhecidas como hipotireoidismo hipofisário e hipotalâmico, respectivamente. Normalmente, a tireóide se mantém funcional, sendo possível o tratamento com hormônio exógeno (Ganong, 1995). Nos tipos de hipotireoidismo citados acima, há o desenvolvimento de bócio coloidal, um aumento considerável no volume da glândula tireoidiana. Isso se deve, no caso da falta de iodo, a um acúmulo de tiroglobulina no folículo tireoidiano. O mecanismo de captação por bombeamento de iodeto é prejudicado, bem como a enzima tireóide peroxidase, a ligação do iodo aos resíduos de tirosina e a atividade da deiodinase. No caso de falha na regulação por TSH e TRH, o próprio hormônio acumula-se no colóide, levando ao aumento da glândula. Esse sintoma também é conhecido como tireodite. Há ainda um tipo mais comum, o hipotireoidismo auto-imune, no qual anticorpos são produzidos contra antígenos presentes nas células da tireóide, levando à sua destruição (Guyton, 1995).

Existe ainda o hipotireoidismo que ocorre na vida fetal, neonatal e na primeira infância, levando a um quadro conhecido como cretinismo. O hipotireoidismo congênito, como também é conhecido, é a principal causa de retardo mental no mundo (Farwell e Braverman, 2001). O cretinismo caracteriza-se pela deficiência da tireóide em produzir os HT, podendo ser de origem genética ou devido a uma deficiência de iodo durante o período gestacional (Guyton, 1995) ou na dieta da mãe (Ganong, 1995). A criança tende a ser pequena (devido a inibição do crescimento esquelético), sofrer profundo retardo mental e ter atividade motora extremamente lenta. O tratamento com hormônio, se iniciado

precocemente, pode reverter, total ou parcialmente, o quadro clínico de cretinismo (Guyton, 1995).

O hipertireoidismo, cujas manifestações incluem o bócio tóxico, doença de Graves e tireotoxicose, consiste em um aumento na secreção de hormônios por parte da tireóide. A glândula normalmente aparece hiperplásica, apresentando de duas a três vezes seu tamanho normal, além de suas células aumentarem o volume de secreção em até 15 vezes. Essa grande atividade é fisiologicamente semelhante a uma super-estimulação com TSH. No entanto, os níveis desse hormônio estão bastante diminuídos no hipertireoidismo, uma vez que os HT inibem a produção do mesmo (Guyton, 1995). Este processo está associado com a produção de anticorpos contra o tecido tireoidiano, caracterizando uma doença auto-imune, de dois tipos: (a) a que resulta em um ataque citotóxico de células T contra a glândula, e (b) outro que é capaz de ativar o receptor de TSH, aumentando os níveis internos de AMP cíclico e estimulando a secreção dos HT (Ganong, 1995). O hipertireoidismo também pode ser dar devido à formação de um adenoma no tecido glandular, que passa então a secretar grandes quantidades de HT. Assim, o TSH passa a ter sua síntese inibida, não havendo liberação de hormônio do restante da tireóide, apenas do tecido tumoral (Guyton, 1995).

Dentre os sintomas gerais do hipertireoidismo estão a intolerância ao calor, sudorese aumentada, perda de peso, hiperfagia, diarreia, fraqueza muscular, nervosismo, fadiga extrema, insônia, tremor nas mãos (Guyton, 1995), aumento da atividade locomotora, batimentos cardíacos elevados com arritmias e angina em pacientes mais idosos, aumento da pressão sanguínea, aumento de apetite e ansiedade (Farwell e Braverman, 2001). A forma mais comum de hipertireoidismo é a doença de Graves, caracterizada principalmente pela exoftalmia, ou seja, a protrusão dos globos oculares. Alguns chegam a lesar o nervo óptico ou, devido a impossibilidade de fechar as pálpebras completamente, ocorre uma irritação no epitélio do olhos, podendo levar inclusive a ulceração da córnea (Guyton, 1995).

Assim como outras doenças da tireóide, o hipertireoidismo tem maior incidência em mulheres, com uma proporção de 5:1 até 7:1. A doença é mais comum entre os 20 e 50 anos de idade, mas existem registros em praticamente todas as idades. Assim como o

hipotireoidismo, hipertireoidismo é relativamente comum na população mundial, sendo 2% a frequência em mulheres e 0.1% em homens (Griffin, 2004).

1.3. Ação dos Hormônios Tireoidianos no Sistema Nervoso Central

Os HT têm um papel bastante importante e bem conhecido no desenvolvimento de diferentes animais, desde a metamorfose de insetos até na maturação do sistema nervoso central (SNC) de humanos (Glass & Holloway, 1990). Os TH estão envolvidos em processos básicos da maturação do SNC, como a proliferação de alguns tipos celulares, migração, alongação de axônios e formação de fibras nervosas (Anderson, 2001). A maior parte dos estudos sobre os efeitos dos TH no desenvolvimento do cérebro teve, como modelo experimental, ratos neonatos. Eayrs e seus colaboradores foram os primeiros a demonstrar efeitos do hipotireoidismo, como a formação retardada do neuropilo, o menor tamanho e maior compactação do corpos celulares de neurônios, algumas desordens de sinaptogênese que resultam de um menor crescimento axonal e dendrítico e menor distribuição, alongação e ramificação dendrítica. (Oppenheimer & Schwartz, 1997). No cerebelo, ocorre uma menor arborização dendrítica das células de Purkinje e uma mielinização axonal diminuída (Oppenheimer & Schwartz, 1997). Existem também trabalhos que demonstram que a deficiência de TH durante o período pré-natal resultam em um déficit cognitivo retardo mental (Dussault & Ruel, 1987) em decorrência da deficiência na conectividade sináptica, mielinização (Figuieredo et al, 1993a; Figuieredo et al, 1993b) e alterações nos níveis de neurotransmissores (Patel, 1987).

No entanto, pouco se sabe sobre a função dos TH no SNC adulto. Disfunções da tireóide iniciadas na vida adulta estão relacionadas com anormalidades neurológicas e comportamentais (DeGroot, 1984) como ataxia cerebelar, alucinações, comportamento psicótico, sonolência, dificuldade de cognição e memória (associados ao hipotireoidismo), irritabilidade, nervosismo, ansiedade, tremores e em casos mais severos, delírios e coma (associados ao hipertireoidismo). O hipotireoidismo também está associado com depressão, sendo o T3 inclusive proposto como um adjuvante no tratamento clínico da doença (Anderson, 2001). Hipotireoidismo é considerado por alguns autores como fator de risco para Doença de Alzheimer (AD) (Breteler et al, 1991; Heyman, 1983), havendo uma

redução nos níveis de mRNA de THR no hipocampo de pacientes acometidos (Kung et al., 1992). Tratamentos com HT em animais adultos levam a uma modulação da densidade de espinhos dendríticos nas células piramidais da região CA1 hipocampal (Gould et al., 1990), enquanto que o hipotireoidismo leva a uma diminuição densidade de neurônios (Lin & Akera, 1978).

Além disso, receptores nucleares de HT (THR) possuem ampla distribuição por todo o SNC, o que explica a grande quantidade de respostas resultantes da ação deste hormônio. O metabolismo do acetato, a atividade respiratória mitocondrial e o transporte de glicose pelos astrócitos são exemplo de respostas metabólicas aos HT (Smith et al., 2002). Observa-se, portanto, uma clara dependência do SNC em relação aos TH para exercer sua função fisiológica normal.

1.4. ATP e Transmissão Purinérgica

O trifosfato de adenosina (ATP) é a fonte de energia para praticamente toda a atividade celular em todas as formas de vida. Devido à grande abundância de ATP, os sistemas biológicos tiveram uma tendência a utilizar essa molécula em processos de sinalização intra e extracelular. Assim, o ATP é hoje reconhecido como um importante neurotransmissor em sistema nervoso central e periférico (Edwards & Gibb, 1993).

O ATP é co-liberado para o meio extracelular juntamente com outros neurotransmissores, sendo por isso considerado um co-transmissor. Trabalho anteriores demonstraram a liberação de ATP juntamente com acetilcolina (Vizi et al., 1997), noradrenalina (Kennedy, 1996) e serotonina (Potter & White, 1980). Uma vez liberado, o ATP pode atuar sobre receptores do tipo P2 na membrana pós-sináptica ou ser degradado até adenosina através de uma cascata enzimática de ecto-nucleotidases (Zimmerman et al., 1996).

Os receptores do tipo P2 se dividem em P2X, os quais atuam como receptores ionotrópicos e apresentam 7 subtipos (P2X₁₋₇), e P2Y, receptores metabotrópicos acoplados à proteína G, apresentando 6 subtipos (P2Y_{1,2,4,6,11,12}) (Burnstock & Williams, 2000). Além de ATP, os receptores P2 também respondem a ADP, UTP e UDP, estando envolvidos em ações como aumento da neurotransmissão excitatória, desenvolvimento cerebral,

nocicepção, função ocular e auditiva, função das células astrogliais, formação de metástase, apoptose, função pulmonar, além de doenças de ossos e cartilagem e de agregação plaquetária e hemostasia (Burnstock, 2000, Williams & Jarvis, 2000).

O ATP é normalmente encontrado em concentrações extracelulares baixas. No entanto, situações de hipóxia ou isquemia, estresse, injúria, e situações de morte celular induzem altas concentrações de ATP em preparações de plaquetas, células endoteliais e células vasculares musculares lisas (Gordon, 1986). Um estudo demonstrou que essa alta concentração de ATP leva à ativação do receptor P2X₇, desencadeando um processo de morte celular (Harada et al., 2000). Assim, Harada propôs que o ATP pode ter tanto um papel de estimulador da proliferação celular, ativando receptores P2X₄, como ativando morte celular via P2X₇.

1.5. Adenosina

A adenosina é um nucleosídeo com importante papel em muitas situações fisiológicas, principalmente em tecidos excitáveis como o coração e o cérebro (Dunwiddie e Masino, 2001). No sistema nervoso central, a adenosina é descrita como moduladora da atividade neuronal e neuroprotetora (Phillips e Wu, 1981). Apesar desses efeitos, ela não é considerada um neurotransmissor, pois não é armazenada em vesículas e também não é liberada da mesma forma que os neurotransmissores convencionais (Brundege e Dunwiddie, 1997).

Existem quatro subtipos de receptores P1 que interagem com adenosina: A₁ e A_{2A} (receptores de alta afinidade) e A_{2B} e A₃ (receptores de baixa afinidade) (Brundege e Dunwiddie, 1997). Os receptores do tipo A₁ apresentam a maior abundância no cérebro e estão relacionados com a ativação de canais de K⁺ (Trussel e Jackson, 1985) e a inibição dos canais de Ca²⁺ (Macdonald et al., 1986), ambos levando à inibição da atividade neuronal. Estudos mostram que o receptor A₁ inibe a liberação de alguns neurotransmissores, como acetilcolina, glutamato, dopamina e noradrenalina e inclusive de ácido gamma-amino butírico. (Ribeiro e Sebastião, 1986; Dolphin e Archer, 1983; Brundege e Dunwiddie, 1997). Esses efeitos inibitórios ocorrem devido à diminuição da adenilato ciclase e à conseqüente redução nos níveis de AMP cíclico (Brundege e Dunwiddie, 1997).

Já os receptores do tipo A_{2A} levam a uma estimulação da adenilato ciclase e ao aumento dos níveis de AMP cíclico (Londos et al., 1980). Além disso, foi demonstrado que a transmissão sináptica em hipocampo de ratos é facilitada pelos receptores A_2 via proteína quinase C (Cunha e Ribeiro, 2000). Devido a esses efeitos, os receptores do tipo A_2 são considerados moduladores da neurotransmissão e também chamados de facilitadores.

O papel neuroprotetor da adenosina aparece em situações como a isquemia, na qual ela atua na manutenção da homeostase intracelular do cálcio, na diminuição da liberação de aminoácidos excitatórios, manutenção do potencial de membrana e impedimento de despolarização excessiva da pré e pós-sinapse (Rudolphi et al., 1992). Também está envolvida em citoproteção neuronal, pois ativa enzimas como catalase, a superóxido dismutase e a glutatona peroxidase, as quais fazem parte da defesa celular contra espécies reativas de oxigênio (Maggirwar et al., 1994)

1.6. NTPDases

A família de enzimas denominada E-NTPDase (ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase) possui seis membros clonados e caracterizados: NTPDase 1 (CD39), NTPDase 2 (CD39L1), NTPDase 3 (CD39L3), NTPDase 4 (UDPase), NTPDase 5 (CD39L4) e NTPDase 6 (CD39L2). (Zimmermann, 2001). As NTPDases 1, 2 e 3 compartilham semelhanças estruturais, como o ancoramento na membrana celular através dos domínios NH_2 e $COOH$ terminais e um extenso “loop” transmembrana onde estão localizadas cinco domínios altamente conservadas entre as enzimas dessa família, as cinco regiões conservadas da apirase. Esses três membros da família hidrolizam purinas e pirimidinas, porém diferem em relação à razão de hidrólise dos seus substratos (Zimmermann, 2001).

A NTPDase1 (CD39, ecto-apirase, ecto-ATPdifosfohidrolase) hidrolisa ATP e ADP igualmente bem, sendo a proporção de hidrólise destes dois substratos de 1:1 (Heine et al., 1999). A enzima NTPDase 2 (CD39L1, ecto-ATPase) possui uma preferência 30 vezes maior pela hidrólise do ATP que pela hidrólise do ADP (Kirley, 1997). A NTPDase 3 (CD39L3) é considerada um intermediário funcional entre a NTPDase 1 e NTPDase 2, pois hidrolisa o ATP e o ADP em uma razão de 3:1.

As NTPDases 4 (UDPases), embora possuam a mesma estrutura geral das NTPDases 1 a 3, diferem principalmente em relação à localização celular. As duas formas de NTPDases 4 de humanos estão localizadas no Complexo de Golgi (NTPDase 4 β) e vacúolos lisossomais (NTPDase 4 α) (Wang e Guidotti, 1998). Ambas enzimas hidrolisam nucleotídeos di e trifosfatados; entretanto, NTPDase 4 α possui preferência por UTP e TTP, enquanto que a NTPDase 4 β hidrolisa preferencialmente CTP e UDP.

Já as NTPDases 5 (CD39L4) e NTPDases 6 (CD39L2), também compartilham as regiões conservadas da apirase, todavia, apresentam propriedades estruturais e funcionais distintas em relação as demais NTPDses. Estas enzimas encontram-se ancoradas na membrana celular somente pela porção NH₂ terminal e possuem uma larga região COOH terminal extracelular. Ambas enzimas são ativadas por cátions divalentes e apresentam uma maior preferência por nucleotídeos difosfatados. A NTPDase 5 tem maior preferência para hidrolizar GDP e UDP, enquanto a NTPDase 6, hidrolisa preferencialmente GDP e IDP, ainda que hidrolisem também outros nucleotídeos púricos. Acredita-se que estas enzimas sejam liberadas da membrana e então secretadas para o meio extracelular, passando a se tratar de enzimas na forma solúvel. A NTPDase 5 está localizada no retículo endoplasmático, enquanto a NTPDase 6, encontra-se no complexo de golgi.

Estudos sobre a localização e mecanismos de catálise das NTPDases, indicam o envolvimento destas enzimas na regulação dos níveis de nucleotídeos, seus produtos de hidrólise e portanto, dos diferentes papéis fisiológicos desempenhados por estas enzimas dependendo da fração biológicas em que se encontram. Em sistema nervoso, as NTPDases possuem um importante papel na inativação da ação do neurotransmissor ATP através de sua hidrólise sequencial até o neuromodulador adenosina (Battastini et al., 1991; Sarkis e Saltó, 1991; Edwards e Gibb, 1993; Zimmermann, 1996). O envolvimento de NTPDases também tem sido descrito em diferentes situações patológicas. Alterações significativas na atividade apirásica foram demonstradas em ratos submetidos a episódios isquêmicos (Braun et al., 1998; Schetinger et al., 1998).

Em fatias de sistema nervoso central, uma NTPDase 1 foi descrita em nosso laboratório (Bruno et al., 2002). NTPDases 1 também são denominadas ATP difosfohidrolase ou apirase (EC 3.6.1.5), sendo primeiramente descritas por Meyerhof em 1945. Estas enzimas hidrolisam todos os nucleotídeos di e trifosfatados até os seus

respectivos nucleosídeos monofosfatados e fosfato inorgânico, liberando 2 mol de Pi (fosfato inorgânico) por mol de nucleosídeo trifosfatado e 1 mol de Pi por mol de nucleosídeo difosfatado. Caracterizam-se principalmente por serem dependentes de cálcio ou magnésio, insensíveis inibidores específicos de ATPases intracelulares tipo-P, tipo-F e tipo-V, e hidrolisarem todos nucleotídeos di e trifosfatados, mas não nucleotídeos monofosfatados (Plesner, 1995).

A ação de nucleotídeos purinérgicos no sistema nervoso é inativada por uma cascata enzimática que envolve as enzimas ATP difosfohidrolase (Sarkis & Saltó, 1991; Battastini et al., 1991) e 5'-nucleotidase (Zimmerman, 1996), levando o ATP até adenosina.

1.7. 5'-nucleotidase

A ecto-5'-nucleotidase (CD73, EC 3.1.3.5), é uma enzima com peso molecular de 62 a 74 kDa, apresentando-se dois monômeros unidos por uma ponte dissulfeto (Zimmermann, 1996). Esta enzima encontra-se ancorada à membrana por glicosilfosfatidilinositol (GPI). Este ancoramento pode ser clivado pela ação de uma fosfolipase C específica para GPI, liberando a enzima e dando origem às formas solúveis da enzima (Zimmermann, 1992).

A ecto-5'-nucleotidase é a principal enzima responsável pela formação de nucleosídeos extracelulares a partir de nucleotídeos monofosfatados. Apesar de possuir habilidade para hidrolizar nucleotídeos como GMP e UMP, o AMP geralmente é o nucleotídeo hidrolisado com maior eficiência (Zimmermann, 1996). Resultados anteriores demonstraram a presença de diferentes isoformas da ecto-5'-nucleotidase em terminais nervosos de todas as regiões de hipocampo de mamíferos, com uma predominância na região CA3 (Cunha et al., 2000). Em sistema nervoso central, a ecto-5'-nucleotidase foi descrita tanto em neurônios, como em células gliais, incluindo astrócitos, oligodentrócitos e microglia (Maienschein e Zimmermann, 1996; Zimmermann, 1996).

Estudos têm demonstrado a expressão da ecto-5'-nucleotidase na superfície de células neuronais e em sinapses durante o desenvolvimento neuronal (Schoen e Kreutzberg, 1994). Outros trabalhos ainda mostram, que esta enzima desempenha um papel essencial

para a diferenciação e sobrevivência das células neuronais durante seu desenvolvimento (Heilbronn et al., 1995).

O principal papel fisiológico atribuído a ecto-5'-nucleotidase, é a formação de adenosina a partir do AMP extracelular e a subsequente ativação dos receptores P1, que em sistema nervoso, resulta principalmente na inibição da liberação de neurotransmissores excitatórios, enquanto que em sistema vascular, resulta na inibição da agregação plaquetária e vasodilatação.

Assim, tem sido demonstradas alterações na atividade da 5'-nucleotidase em resposta à diferentes situações patológicas (Bonan et al., 2000; Bruno et al., 2002; Bruno et al., 2003; Schetinger et al., 1998). Além disto, Mazurkiewicz (Mazurkiewicz & Saggerson, 1989) mostrou que o hipotireoidismo é capaz de aumentar a atividade da 5'-nucleotidase em sinaptossomas de córtex e hipocampo, sugerindo que os níveis de HT podem alterar a atividade desta enzima em SNC. Outros estudos também demonstraram uma inibição na atividade das enzimas responsáveis pelo metabolismo de adenosina e uma redução de seu transporte em SNC de ratos submetidos ao hipotireoidismo (Fideu et al., 1994; Mazurkiewicz & Saggerson, 1989).

2. Objetivos

Considerando os seguintes aspectos:

(a) A relação existente entre os hormônios tireoidianos e o sistema nervoso central como um todo, seu desenvolvimento, sua fisiologia normal, bem como os sintomas clínicos do hipertireoidismo e do hipotireoidismo;

(b) Estruturas cerebrais como hipocampo e córtex cerebral, são de grande importância em processos relacionados com o controle de processos cognitivos como o aprendizado e memória, sendo portanto, susceptíveis à alterações provocadas por situações patológicas.

(c) A importância do ATP e da adenosina para a neurotransmissão e neuromodulação; e a regulação que as enzimas ATP difosfohidrolase (NTPDase 1) e 5'-Nucleotidase exercem sobre as concentrações extracelulares dessas moléculas.

(d) Trabalhos anteriores atribuíram alguns efeitos inibitórios descritos em hipotireoidismo, com as concentrações extracelulares de adenosina em SNC (Marzukiewicz et al, 1989). Todavia, nada se conhece sobre os efeitos das principais disfunções tireoidianas sobre a cascata enzimática responsável pela completa hidrólise de ATP até adenosina em SNC.

Assim, este trabalho visa avaliar, em modelos experimentais de hipotireoidismo com e sem reposição hormonal e hipertireoidismo, as alterações causadas nas atividades ectonucleotídicas em fatias de hipocampo e de córtex. Pretendemos assim, relacionar alguns efeitos até então pobremente compreendidos, a respeito da influência dos nucleotídeos da adenina e seu produto de ação adenosina, bem como, o papel das enzimas que metabolizam os mesmos, na patofisiologia das principais doenças tireoidianas em SNC de animais adultos.

3. Materiais e Métodos

3.1 Animais e tratamentos

3.1.1. Indução do Hipotireoidismo

Foram utilizados ratos macho Wistar adultos, pesando de 200 a 280 g. O animais foram mantidos em gaiolas em um fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, em uma temperatura de 22°C, com água e alimento disponível.

Os ratos foram divididos em cinco grupos: controle, sham operados, hipotireoideos, hipertireoideos e hipotireoideos que receberam o tratamento de reposição hormonal. Para a indução do hipotireoidismo, foi realizada a remoção da glândula tireoidiana ou tireodectomia. O grupo sham operado foi submetido ao mesmo procedimento cirúrgico que os ratos hipotireoideos, porém sem a remoção da glândula. Este grupo foi preparado para excluir os efeitos da cirurgia sobre a hidrólise dos nucleotídeos testados. Para a realização do procedimento cirúrgico, os ratos foram anestesiados com ketamina e xilazina. Os ratos tireodectomizados foram então tratados com metilmazol (0.05%) durante 14 dias, a fim de evitar que pequenas porções da glândula tireoidiana não removidas pela tireodectomia possam vir a produzir hormônio. Metilmazol foi usado devido ao seu efeito em bloquear a iodetação dos resíduos de tirosina da tiroglobulina, impedindo assim a síntese de HT. O tratamento durou 14 dias.

3.1.2. Indução do Hipertireoidismo

Para a indução de hipertireoidismo, foram utilizados ratos macho Wistar adultos, pesando de 200 a 280 g. Estes ratos receberam injeções diárias de L-tiroxina (T4) 25µ/100g de peso corporal, durante 14 dias (Pantos et al 2000). O T4 foi dissolvido em 0,04 M de NaOH, sendo o volume final da solução a ser injetada acertada com solução salina. O grupo controle recebeu injeções diárias de solução salina, a fim de excluir os possíveis efeitos da injeção sobre os parâmetros analisados.

3.1.3 Reposição Hormonal

O tratamento de reposição hormonal foi iniciado em ratos tireodectomizados no 40º dia após a cirurgia através de injeções diárias de L-tiroxina (T4) 25µ/100g de peso corporal, durante 5 dias (Calzá, 1997). De acordo com a literatura, após o 5º de injeção, os níveis plasmáticos de HT começam a subir além dos níveis normais, começando a induzir hipertireoidismo. Por essa razão, somente 5 doses de hormônio foram administradas. A utilização dos animais se deu 24 horas após a última injeção, em todos os grupo acima mencionados.

3.2. Fatias hipocampais e corticais

Todos os animais foram mortos através de decapitação. Após, o cérebro do animais foi rapidamente removido e colocado em solução Krebs Ringer contendo 115 mM NaCl, 3.0 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 25 mM NaHCO₃, glicose 10 mM, 2.0 mM CaCl₂, com um pH de 7.4, gaseificada com uma mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂. Os dois hemisférios cerebrais foram separados e os hipocampos e córtex cerebral de cada um deles foram destacados. As estruturas foram então cortadas transversalmente em fatias de 400 µm de espessura, com o auxílio de um McIlwain Tissue Chopper.

3.3. Ensaio enzimático

Foram utilizadas duas fatias de cada estrutura por tubo, cerca de 0,16 mg de proteína para hipocampo e 0,22 mg de proteína para córtex. Para cada amostra, foi feito um controle, contendo duas fatias da estrutura correspondente, o qual não irá receber o substrato. Esse controle tem por finalidade excluir o fosfato endógeno presente nas fatias utilizadas. Também foi feito um controle contendo apenas o nucleotídeo usado como substrato, a fim de descontar a hidrólise espontânea do substrato. Estes dois valores são descontados do valor das amostras ao final do experimento.

As amostras contendo as fatias e 500 μ l do meio Krebs-Ringer foram pré-incubados a 37°C por 10 minutos. A reação foi iniciada com a adição do substrato, ATP, ADP ou AMP, em uma concentração final de 2mM. Após 20 minutos de incubação, a reação é interrompida com a adição de ácido tricloroacético (TCA) a 10%. A liberação de Pi foi medida de acordo com o método descrito por Chan et al. (1986) e a atividade enzimática foi expressa como nmol de Pi liberado por minuto por miligrama de proteína. Todas as condições enzimáticas para essa preparação foram previamente padronizadas em nosso laboratório (Bruno et al., 2002) para garantir a linearidade da reação.

3.4. Determinação da quantidade de Proteína

As fatias hipocâmpais e corticais foram homogeneizadas com o auxílio de homogeneizador de Teflon e um tubo de vidro, e alíquotas foram retiradas para determinar a quantidade de proteína presente nas fatias. A quantidade de proteína foi determinada através do método do Coomassie Blue, descrito por Bradford (Bradford 1976).

3.5. Análise estatística

Os dados foram expressos na forma de média \pm desvia padrão, obtidos de pelo menos seis experimentos com fatias provenientes de animais diferentes. Os dados do grupo hipertireoidismo e do grupo hipotireoidismo com reposição hormonal foram analisados com teste t de Student, enquanto que o grupo hipotireoidismo foi analisado com Análise de Variância (ANOVA) de Uma Via. Os valores cujo $p < 0.05$ foram considerados significantes.

4. Resultados

Os dados obtidos a partir dos ratos do grupo sham operados foram primeiramente comparados com o grupo controle absoluto, a fim de verificar os efeitos da cirurgia sobre a hidrólise dos nucleotídeos. A hidrólise de ATP, ADP e AMP, medida em fatias hipocâmpais e corticais do grupo sham operados não apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle, mostrando que a cirurgia não alterou a hidrólise dos nucleotídeos da adenina nas mesmas. Podemos, então, considerar que as diferenças na hidrólise apresentadas entre os grupos sham operados e hipotireoidismo são devidas ao hipotireoidismo, e não à cirurgia.

A figura 1 mostra os resultados obtidos para a hidrólise de ATP (Fig.2A), ADP (Fig. 2B) e AMP (Fig. 2C) em fatias hipocâmpais após a indução de hipertireoidismo, hipotireoidismo e hipotireoidismo com reposição de T4. A atividade de hidrólise de ATP nas fatias hipocâmpais de ratos hipertireóides ($17,13 \pm 3,73$ nmol Pi. min⁻¹. mg⁻¹, $P < 0.05$) foi inibida 29% em relação ao valor de atividade enzimática do grupo controle ($23,87 \pm 2,12$ nmol Pi. min⁻¹. mg⁻¹). Ao contrário, a atividade enzimática nas fatias hipocâmpais dos ratos hipotireóides ($52,5 \pm 10,2$ nmol Pi. min⁻¹. mg⁻¹, $P < 0.05$) foi aumentada em 95% quando comparada com os ratos sham operados ($26,82 \pm 2,13$ nmol Pi. min⁻¹. mg⁻¹). O efeito causado pelo hipotireoidismo foi abolido pelo tratamento com T4 em ratos tireodectomizados, que apresentaram atividade enzimática de $23,13 \pm 1,59$ nmol Pi. min⁻¹. mg⁻¹. Esta atividade é estatisticamente igual à de ratos controle e sham operados e diferente de ratos hipotireóides, com $P < 0.05$.

A hidrólise de ADP em fatias hipocâmpais teve uma inibição de 28% em ratos hipertireóides ($8,86 \pm 2,54$ nmol Pi. min⁻¹. mg⁻¹, $P < 0.05$) quando comparadas com o respectivo grupo controle ($12,3 \pm 1,14$ nmol Pi. min⁻¹. mg⁻¹). É importante observar que o hipertireoidismo causou uma inibição semelhante em ATP (29%, Fig.1A) e ADP (28%, Fig.1B). Esse paralelismo em relação a ambos os substratos é descrito como sendo o padrão de hidrólise da NTPDase tipo 1 encontrado em fatias hipocâmpais (Bruno et al, 2002). Em contraste, o grupo de ratos hipotireóides teve uma atividade enzimática ($17,22 \pm 1,18$ nmol Pi. min⁻¹. mg⁻¹, $P < 0.05$) 53% aumentada quando comparada com ratos sham operados

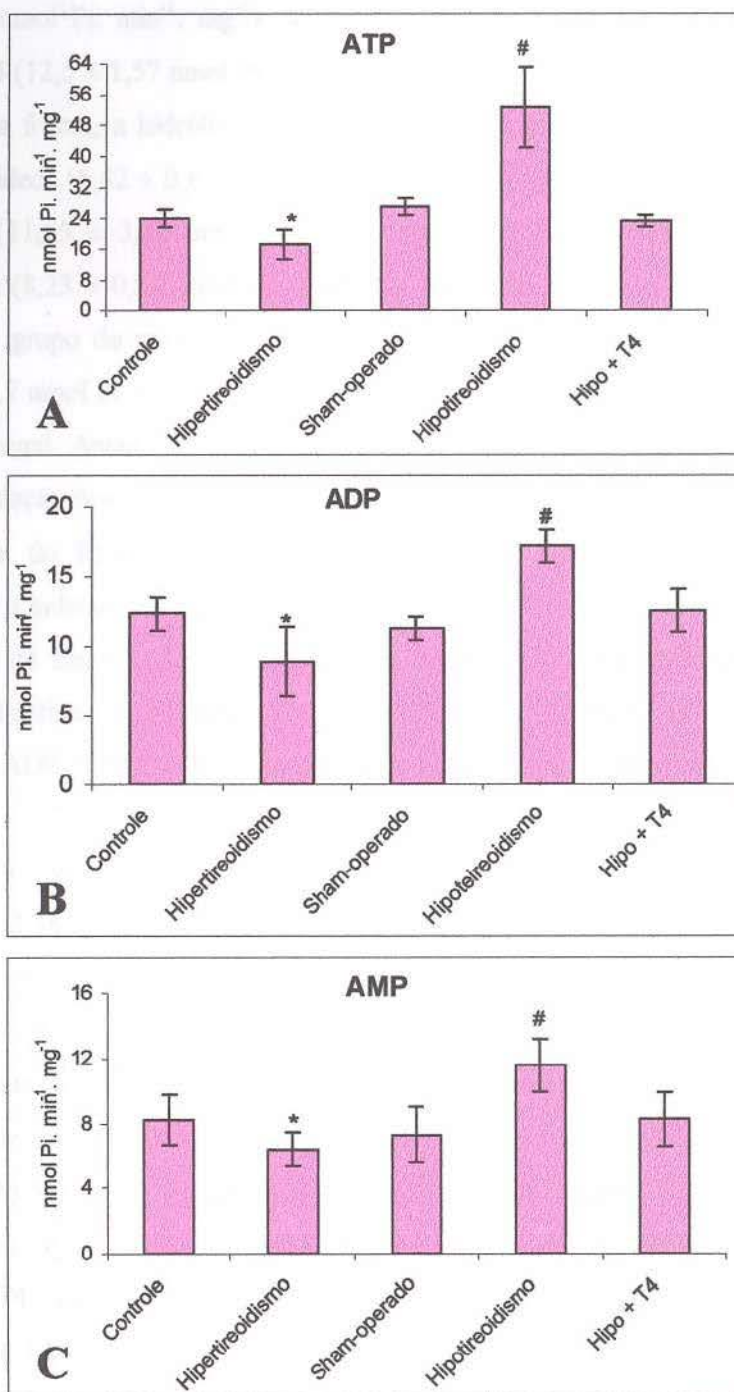


Figura 2: Efeitos do hipertireoidismo e hipotireoidismo com e sem o tratamento de reposição hormonal com T4, sobre a hidrólise de ATP (A), ADP (B) e AMP (C) em fatias de hipocampo de ratos adultos. A atividade enzimática é expressa em nmol de Pi/min/mg de proteína. * Significativamente diferente do grupo controle; # significativamente diferente do grupo sham-operado para um $p < 0,05$.

($11,24 \pm 0,81$ nmol Pi. min^{-1} . mg^{-1}). Essa ativação foi revertida nos ratos hipotireóides tratados com T4 ($12,5 \pm 1,57$ nmol Pi. min^{-1} . mg^{-1} , $P < 0,05$).

Da mesma forma, a hidrólise de AMP foi diminuída 23% em fatias hipocâmpais de ratos hipertireóides ($6,42 \pm 0,67$ nmol Pi. min^{-1} . mg^{-1} , $P < 0,05$) e aumentada 58 % em ratos hipotireóides ($11,55 \pm 3,32$ nmol Pi. min^{-1} . mg^{-1} , $P < 0,05$) quando comparadas com os grupos controle ($8,23 \pm 0,89$ nmol Pi. min^{-1} . mg^{-1}) e sham operados ($7,29 \pm 0,57$ nmol Pi. min^{-1} . mg^{-1}). O grupo de ratos hipotireóides voltou a ter níveis normais de hidrólise de AMP ($8,25 \pm 0,7$ nmol Pi. min^{-1} . mg^{-1} , $P < 0,05$) em fatias hipocâmpais após o tratamento de reposição hormonal. Assim, foi demonstrado que tanto o hiper- quanto o hipotireoidismo alteram a degradação dos nucleotídeos da adenina, indo de ATP até adenosina.

Os efeitos do hipertireoidismo, hipotireoidismo e hipotireoidismo com reposição hormonal sobre a hidrólise do ATP (Fig. 3A), ADP (Fig. 3B) e AMP (Fig. 3C) em fatias de córtex cerebral de ratos estão apresentados na figura 2. O hipertireoidismo não induziu mudanças significativas na hidrólise do ATP ($25,29 \pm 3,95$ nmol Pi. min^{-1} . mg^{-1} , $P > 0,05$) e na hidrólise do ADP ($15,02 \pm 4,29$ nmol Pi. min^{-1} . mg^{-1} , $P > 0,05$) em comparação ao grupo controle ($28,03 \pm 3,51$ nmol Pi. min^{-1} . mg^{-1}) e ao grupo sham operados ($16,58 \pm 1,64$ nmol Pi. min^{-1} . mg^{-1}). No entanto, a hidrólise do AMP foi inibida em 21% nos ratos hipertireóides ($8,38 \pm 1,07$ nmol Pi. min^{-1} . mg^{-1} , $P < 0,05$) em relação aos ratos controles ($10,60 \pm 1,52$ nmol Pi. min^{-1} . mg^{-1}). Isso indica que o hipertireoidismo afeta apenas a 5'-nucleotidase no córtex cerebral.

Em contraste, foi observado um aumento da atividade de hidrólise de ATP e ADP em fatias corticais de 33% e 34% de ratos hipotireóides ($36,33 \pm 3,22$ e $22,19 \pm 2,18$ nmol Pi. min^{-1} . mg^{-1} , $P < 0,05$) quando comparados com ratos sham operados ($27,31 \pm 1,03$ and $16,51 \pm 2,06$ nmol Pi. min^{-1} . mg^{-1} , respectivamente). No grupo hipotireóide que recebeu reposição com T4, foi observada uma reversão aos níveis normais, com atividades de $28,2 \pm 1,3$ e $15,84 \pm 1,89$ nmol Pi. min^{-1} . mg^{-1} , $P < 0,05$. O aumento observado na hidrólise de ATP e ADP em ratos hipotireóides é bastante semelhante, indicando um padrão paralelo, assim como em fatias hipocâmpais.

A hidrólise de AMP em fatias corticais foi aumentada 38% pelo hipotireoidismo ($13,26 \pm 1,63$ nmol Pi. min^{-1} . mg^{-1} , $P < 0,05$) em comparação com os ratos sham operados ($9,55 \pm 1,70$ nmol Pi. min^{-1} . mg^{-1}). Esse efeito foi revertido com a reposição hormonal

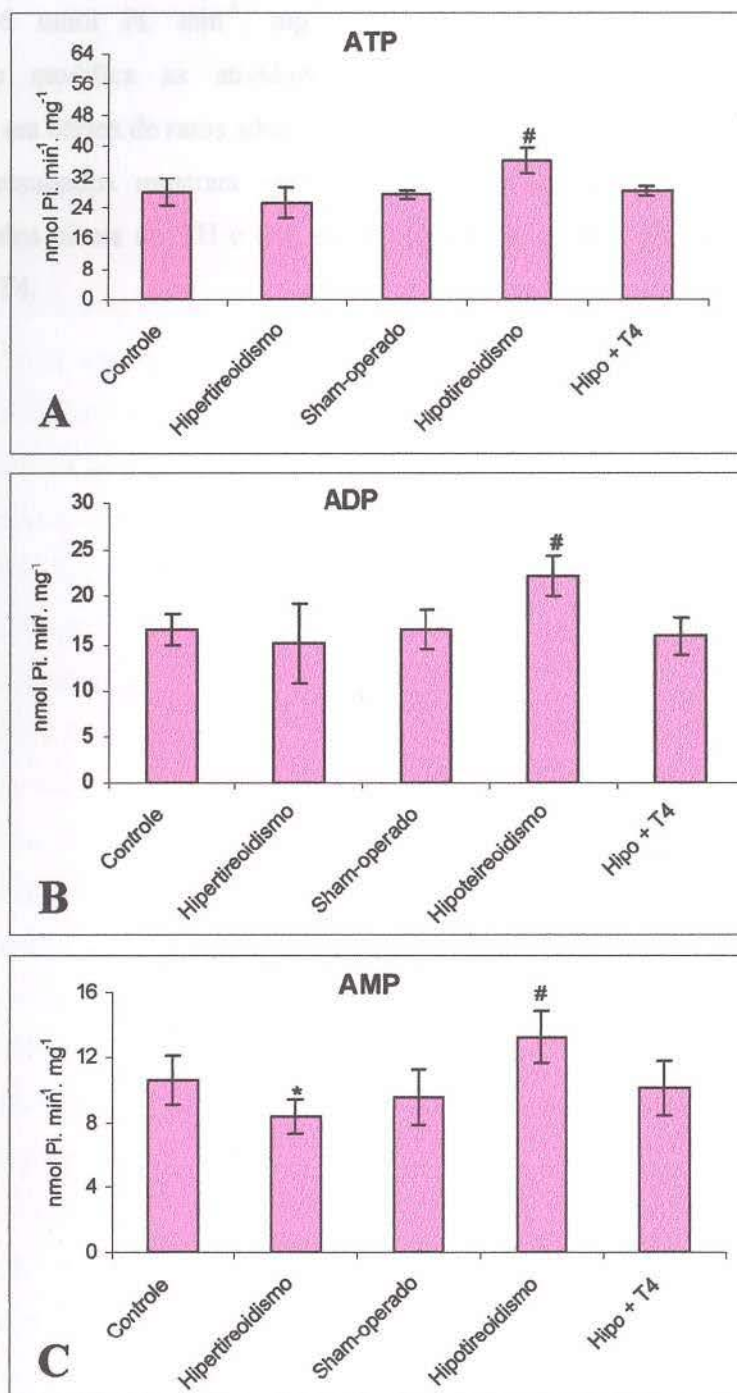


Figura 3: Efeitos do hipertireoidismo e hipotireoidismo com e sem o tratamento de reposição hormonal com T4, sobre a hidrólise de ATP (A), ADP (B) e AMP (C) em fatias de córtex cerebral de ratos adultos. A atividade enzimática é expressa em nmol de Pi/min/mg de proteína. * Significativamente diferente do grupo controle; # significativamente diferente do grupo sham-operado para um $p < 0,05$.

($10,12 \pm 1,66$ nmol Pi. min^{-1} . mg^{-1} , $P < 0,05$). Esse resultado demonstra que o hipotireoidismo modifica as atividades tanto da 5'-nucleotidase quanto da ATP difosfoidrolase em córtex de ratos adultos.

Estes resultados mostram que a degradação dos nucleotídeos da adenina é influenciada pelos níveis de TH e que esses efeitos são reversíveis através de reposição hormonal com T4.

5. Discussão

A forte relação entre o sistema nervoso central e os hormônios tireoidianos é conhecida não apenas nos neurônios, mas também nas células gliais. Neste estudo, nós investigamos a influência das doenças da tireóide sobre a hidrólise de nucleotídeos da adenina em fatias de hipocampo de córtex cerebral de ratos adultos. As fatias mantêm uma organização semelhante à do tecido intacto, apresentando células neuronais, astrócitos, microglia e os demais tipos celulares que ocorrem no tecido *in vivo*.

Os resultados obtidos demonstram que os níveis de HT são capazes de modificar a atividade de hidrólise de nucleotídeos da adenina, possivelmente alterando o balanço normal entre as concentrações de ATP, ADP, AMP e adenosina nas preparações.

O hipertireoidismo inibiu de maneira significativa a hidrólise do ATP e do ADP de maneira similar em fatias hipocâmpais (29% e 28%, respectivamente). Isso sugere que a alteração ocorreu sobre uma ATP difosfohidrolase (NTPDase 1), uma vez que o nosso grupo já descreveu essa enzima na mesma preparação (Bruno et al., 2002) e mostrou que a atividade de hidrólise é semelhante para ambos os nucleotídeos.

Diferentemente das fatias hipocâmpais, a hidrólise de ATP e ADP não foi alterada pelo hipertireoidismo em fatias corticais. Alguns estudos mostram que a maior parte da atividade de ATP difosfohidrolase no cérebro é relacionada à glia (Braun et al., 2000). Recentemente foi demonstrado em nosso laboratório que a hidrólise de ATP e ADP, em preparações sinaptossomais de córtex, é inibida pelo hipertireoidismo (Bruno et al., 2003). Como essa preparação é predominantemente composta de membranas proveniente de células neuronais, talvez a presença de células gliais nas fatias de córtex esteja mascarando o resultado. Assim, a alteração causada no córtex pelo hipertireoidismo pode ser em decorrência das alterações na atividade da ATP difosfohidrolase neuronal. Todavia, são necessários outros estudos para determinar a origem exata da alteração observada em ambas as preparações mencionadas.

O ATP é um importante neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central (Di Iorio et al., 1998). A inibição da hidrólise desse nucleotídeo observada nas fatias hipocâmpais de ratos hipotireóides pode alterar alguns processos relacionados com a

excitabilidade celular no SNC. A liberação massiva de ATP para o meio extracelular pode levar à excitotoxicidade e à morte celular através da ativação de receptores P2X, tanto em neurônios quanto em células gliais. Por isso, alguns estudos incluíram esse nucleotídeo nas causas de alguns eventos neuropatológicos (Amadio et al., 2002; Ryu et al., 2002; Volonté et al., 1999). Além disso, a inibição da hidrólise do ATP em cérebros de ratos adultos pode ter conseqüências mais graves, uma vez que os efeitos do ATP como um mediador de morte celular são mais pronunciados em cérebro maduro (Amadio et al., 2002). O ATP também pode atuar estimulando a proliferação de astrócitos, contribuindo para a astrogliose, uma resposta hipertrófica associada com algumas doenças neurodegenerativas (Burnstock and Williams, 2000).

Inversamente à inibição observada no hipertireoidismo, a deficiência dos HT aumentou a hidrólise dos nucleotídeos da adenina em fatias hipocâmpais e corticais de ratos hipotireóides. Além disso, esse aumento foi revertido com o tratamento de reposição hormonal utilizando T4. Diferentemente do hipertireoidismo, a hidrólise de ATP e ADP foi alterada pelo hipotireoidismo em fatias de córtex cerebral, sofrendo um aumento de 33% 34% respectivamente, indicando o mesmo padrão paralelo mencionado acima. Isso sugere que o hipotireoidismo induzido pela tireodectomia pode afetar a ATP difosfohidrolase tanto em fatias hipocâmpais quanto corticais, sendo essas alterações reversíveis mediante reposição com T4. Além disso, o efeito observado na hidrólise dos nucleotídeos em hipocampo de ratos submetidos ao hipotireoidismo foi maior do que o observado em córtex. Esse resultado pode ser atribuído à maior vulnerabilidade do hipocampo ao hipotireoidismo (Madeira et al., 1992). O hipocampo está principalmente envolvido em processos cognitivos como o aprendizado e a memória e é bastante sensível à eventos tóxicos, como liberação massiva de glutamato e à moléculas de sinalização, como os próprios hormônios (Calzá et al., 1997). Então, surge como hipótese o fato de as ectonucleotidases hipocâmpais apresentarem maior vulnerabilidade às variações hormonais ou aos danos provocados por essas variações.

Nossos resultados também mostraram que o hiper- e o hipotireoidismo modificaram a hidrólise do AMP em fatias hipocâmpais e cerebrais, indicando um efeito sobre a 5'-nucleotidase (a enzima chave na produção de adenosina extracelular) nessas patologias.

Além disso, os efeitos dos HT sobre a atividade dessa enzima e sobre a sua expressão já foram demonstrados em outros tecidos (Carneiro-Ramos, In Press).

A inibição da neurotransmissão excitatória mediada pela adenosina é associada com processo com neuroproteção, diminuição da atividade motora, sedação, ação anticonvulsivante, regulação do sono e modulação da ansiedade (Dunwiddie and Masino, 2001; Brundage and Dunwiddie, 1997; Florio et al., 1998). Partindo desse pressuposto, a inibição da atividade da 5'-nucleotidase encontrada no hipertireoidismo e a possível diminuição dos níveis de adenosina extracelular em fatias hipocâmpais e corticais podem estar relacionados com algumas das características excitatórias observados em ratos hipertireóides.

Por outro lado, a ativação observada na atividade de hidrólise de AMP causada pelo hipotireoidismo em fatias de hipocampo e de córtex, provavelmente devido a uma 5'-Nucleotidase, levaria a um aumento na neuromodulação mediada pela adenosina nessa duas importante regiões cerebrais. Esse aumento pode estar contribuindo para a gênese de aspectos clínicos associados com a irregularidade da neurotransmissão previamente descritos em cérebro hipotireóide (Slotkin and Slepatis, 1984; Shuaib et al., 1994). A reposição com T4 foi eficiente em reverter o aumento da hidrólise do AMP nos ratos hipotireóides, enfatizando a reversibilidade de alguns dos efeitos da doença que poderiam ser atribuídos a um desbalanço nos níveis de adenosina no SNC. Além disso, a proteção aos efeitos da isquemia no hipocampo e córtex cerebral durante o hipotireoidismo foi associada à redução da liberação de glutamato (Shuaib et al., 1994). Desta forma, os resultados apresentados aqui, que demonstram um possível aumento nas concentrações extracelulares de adenosina em hipotireoidismo, está de acordo com efeitos neuroprotetores descritos durante esta patologia, já que adenosina é capaz de inibir a liberação de neurotransmissores excitatórios como o glutamato (Brundage and Dunwiddie, 1997).

Concluindo, as ações induzidas pelo hipertireoidismo e hipotireoidismo sobre a hidrólise de nucleotídeos da adenina em hipocampo e córtex provêm forte evidências de que as enzimas envolvidas na degradação do ATP até adenosina estão relacionadas com as doenças da tireóide e provavelmente com os sintomas clínicos observados nas mesmas. Assim, este trabalho pode ajudar a entender alguns dos aspectos envolvidos nestas patologias, além de mostrar que a reversão dos efeitos observados mediante reposição

hormonal em ratos hipotireoideos, é compatível com a reversibilidade de alguns sintomas da doença após um tratamento baseado em T4.

6. Bibliografia

- Adams, R.D.; Rosman, N.P. Hypothyroidism: neuromuscular system. In: Werner S.C. & Ingbar S.H., editores. *The thyroid*. New York: Academic Press, 1971. p 901-10
- Amadio S.; D'Ambrosi N.; Cavaliere F.; Murra B.; Sancesario G.; Bernardi G.; Burnstock G.; Volonte C. P2 receptor modulation and cytotoxic function in cultured CNS neurons. *Neuropharmacology* 42: 489-501, 2002
- Anderson, G.W. Thyroid hormones and the brain. *Frontiers of Neuroendocrinology* 22(1): 1-17, 2001.
- Battastini, A.M.O.; Rocha, J.B.T.; Barcelos, C.K.; Dias, R.D.; Sarkis, J.J.F. characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. *Neurochemistry Research* 16:1303-1310, 1991.
- Bonan, C.D.; Walz, R.; Pereira, G.S.; Worm, P.V., Battastini, A.M.O.; Cavalheiro, E.A.; Izquierdo, I.; Sarkis, J.J.F. Changes in synaptosomal ectonucleotidases activities in two rat models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research* 39:229-238, 2000.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* 72:218-541, 1976.
- Braun, N.; Zhu, Y.; Kriegstein, J.; Culmsee, C.; Zimmerman, H. Upregulation of the enzyme chain hydrolyzing extracellular ATP after transient forebrain ischaemia in the rat. *Journal of Neuroscience* 18(13): 4891-4900, 1998.
- Braun, N.; Sevigny, J.; Robson, S.C.; Enjvoji. K.; Guckelberger, O.; Hammer, K.; Di Virgilio, F.; Zimmermann H. Assignment of ecto-nucleoside triphosphate

diphosphohydrolase-1/cd39 expression to microglia and vasculature of the brain. *European Journal of Neuroscience* 12(12):4357-4366, 2000

Breteler, M.M.B.; Van Duijin, C.M.; Chandra, V.; Fratiglioni, L.; Graves, A.B.; Heyman, A.; Jorm, A.F.; Kokmen, E.; Kondo, K.; Mortimer, J.A.; Rocca, W.A.; Shalat, S.L.; Soininen, H.; Hofman, A. Medical history and the risk of Alzheimer's Disease; a collaborative re-analysis of case-control studies. *International Journal of Epidemiology* 20:36-42, 1991.

Brundage, J.M.; Dunwiddie, T.V. Role of adenosine as a modulator of synaptic activity in the central nervous system. *Advanced Pharmacology* 39: 353-359, 1997.

Bruno, A.N.; Bonan, C.D.; Wofchuk, S.T.; Sarkis, J.J.F.; Battastini, A.M.O. ATP diphosphohydrolase (NTPDase I) in rat hippocampal slices and effect of glutamate on enzyme activity in different phases of development. *Life Science* 71:215-225. 2002.

Bruno, A.N.; Da Silva, R.S.; Bonan, C.D.; Battastini, A.M.O.; Barreto-Chaves, M.L.; Sarkis, J.J.; Hyperthyroidism modifies ecto-nucleotidase activities in synaptosomes from hippocampus and cerebral cortex of rats in different phases of development. *International Journal Developmental Neuroscience* 21(7):401-8, 2003.

Burnstock, G. P2X receptors in sensory neurons. *British Journal of Anaesthesia* 84:476-488, 2000.

Burnstock, G.; Williams, M. P2 purinergic receptors: modulation of cell function and therapeutic potential. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 295(3):862-869, 2000.

Calzá, L.; Aloe, L.; Giardino, L. Thyroid hormone-induced plasticity in the adult rat brain. *Brain Research Bulletin* 44:549-557, 1997.

Carneiro-Ramos, M.S.; Silva, V.B.; Coutinho-Jr, M.B.; Battastini, A.M.O.; Sarkis, J.J.F.; Barreto-Chaves, M.L.M. Thyroid Hormone stimulates 5'-ecto-nucleotidase of neonatal rat ventricular myocytes. *Molecular Cellular Biochemistry*, In Press.

Chan, K.; Delfert, D.; Junger, K.D. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-ATPase activity. *Analytical Biochemistry* 157:375-380,1986.

Cunha, R.; Ribeiro, J.A. Adenosine A2 Receptor facilitation of synaptic transmission in the CA1 area of the hippocampus requires protein kinase C but not protein kinase A activation. *Neuroscience Letters* 289:127-130, 2000.

Cunha, R.; Brendel, P.; Zimmerman, H.; Ribeiro, J.A. Immunologically distinct terminals of different areas of the rat hippocampus. *Journal of Neurochemistry* 74:334-338, 2000.

DeGroot, L.J.; Larsen, P.R.; Refetoff, S.; Stanburry, J.B. The thyroid and its diseases. John Wiley, Brisbane, 1984.

Di Iorio, P.; Ballerini, P.; Caciagli, F.; Cicarelli, R. Purinoceptor-mediated modulation of purine and neurotransmitter release from nervous tissue. *Pharmacology. Research* 37:169-178, 1998.

Dolphin, A.C.; Archer, E.R. An adenosine agonist inhibits and a cyclic AMP analogue enhances the release of glutamate, but not GABA from slices of rat dentate gyrus. *Neuroscience Letters* 43:49, 1983.

Dunwiddie, T.V.; Masino, S.A. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annual Reviews in Neuroscience* 24:31-55, 2001

Dussault, J.H.; Ruel, J. Thyroid hormones and brain development. *Annual Review of Physiology* 49:321-324, 1987.

Edwards, F.A.; Gibbs, A.J. ATP – a fast neurotransmitter. *FEBS Letters* 28:86-89, 1993.

Farwell, A.P.; Braverman, L.E. Thyroid and antithyroid drugs. In: Hardman, J.G.; Limbird, L.E.; Gilman, A.G. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 10^a ed. McGraw-Hill Professional, 2001.

Fideu, D.M.; Arce, A.; Esquifino, A.I.; Miras-Portugal, M.T. Thyroid hormones modulate both adenosine transport and adenosine A1 receptors in rat brain. *American Journal of Physiology* 267(6):1651-6, 1994

Figueredo, B.C.; Alamazan, G.; Ma, Y.; Tetzlaff, W.; Miller, F.D.; Cuello, A.C. Gene expresión in developing cerebellum during perinatal hypo- and hyperthyroidism. *Molecular Brain Research* 17:258-268, 1993.

Figueredo, B.C.; Otten, U.; Strauss, S.; Volk, B.; Maysinger, B. Effects of perinatal hypo- and hyperthyroidism on the levels of nerve growth factor and its low affinity receptor in cerebellum. *Developmental Brain Research* 72:237-244, 1993.

Florio, C.; Prezioso, A.; Papaioannou, A.; Bertua, R. Adenosine A1 receptors modulate anxiety in CD1 mice. *Psychopharmacology* 136:311-319, 1998.

Ganong, W.F. *Review of Medical Physiology*. 7a ed. San Francisco: Prentice-Hall International Inc. p290-305. 1995.

Glass, C.K. Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimmers and heterodimers. *Endocrinology Reviews* 15:391-407, 1994.

Glass, C.K.; Holloway, J.M. Regulation of gene expression by the thyroid hormone receptor. *Biochimica et Biophysica Acta* 1032:157-176, 1990.

- Gordon, J.L. extracelular ATP: Effects, sources and fate. *Journal of Biochemistry* 233:309-319, 1986.
- Gould, E.; Allan, M.D.; McEwen, B.S. Dendritic spine density of adult hippocampal pyramidal cells is sensitive to thyroid hormone. *Brain Research* 252:327-329, 1990.
- Griffin J.E. The thyroid. In: Griffin J.E. & Ojeda S.R., editores. Textbook of Endocrine Physiology. New York: Oxford University Press Inc. p. 316, 2004.
- Guyton, A.C. Tratado de Fisiologia Médica. 7a ed. Rio de Janeiro: Saunders Company, p712-720.1995.
- Harada, H.; Chan, C.M.; Loesch, A.; Unwin, R.; Burnstock, G. Induction of proliferation and apoptotic cell death via P2Y and P2X receptors, respectively, in rat glomerular mesangial cells. *Kidney International* 57:949-958, 2000.
- Heine, P.; Braum, N.; Zimmerman, H. Functional characterization of rat ecto-ATPase an ecto ATP-diphosphohydrolase after heteologous expression in CHO cells. *European Journal of Biochemistry* 262:102:107, 1999.
- Heibronn, A.; Zimmerman, H. 5'-Nucleotidase activates and an inhibitory antibody prevents neuritic differentiation in PC12 cells. *European Journal of Neuroscience* 7:1172-1179, 1995.
- Heyman, A.; Wilinson, W.E.; Hurwith, B.J.; Schmechel, D.; Sigmon, A.H.; Wienberg, T.; Helms, M.J.; Swift, M. Alzheimer's disease: genetic aspects and associated clinical disorders. *Annals of Neurology* 14:507-515, 1983.
- Ingbar S.H. The influence of aging on the human thyroid hormone economy. In: Greenblatt R.B., editor. Geriatric endocrinology. New York: Raven Press, 1978. p 13-31

- Kamei, Y.; Xu, L.; Heinzl, T.; Torchia, J.; Kurokawa, R.; Gloss, C.; Lin, B.; Hetman, R.A.; Rose, D.W.; Glass, C.K.; Rosenfeld, M.G. A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptor. *Cell* 85:403-14, 1996.
- Kennedy, C. ATP as cotransmitter in perivascular sympatic nerves. *Journal of Autonomic Pharmacology* 16:337-340, 1996.
- Kirley, T.L. Complementary DNA cloning and sequencing of the chicken muscle ecto-ATPase homology with the lymphoid cell activation antigen CD39. *Journal of Biological Chemistry* 272:1076-1081, 1997.
- Kung, Y.; Sutherland, M.; Wong, L.; Somerville, M.J.; Handley, P.; Yoong, L.; Bergeron, C.; McLachlan, D.R. Reduction of thyroid hormone receptor c-ERB Aa mRNA levels in hippocampus of Alzheimer as compared to Huntington brain. *Neurobiology of Aging* 13:301-312, 1992.
- Lazar, M.A. Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocrinology Reviews* 14:184-93, 1993.
- Lin, M.H.; Akera, T. Increased (Na⁺/K⁺)-ATPase concentrations in various tissues of rats caused by thyroid hormone treatment. *Journal of Biological Chemistry* 253:732-726, 1978.
- Londos, C.; Cooper, D.M.F.; Wolff, J. Subclasses of external adenosine receptors. *Proceeding of The National Academy of Science of the USA* 77:2552-2254, 1980.
- Macdonald, R.L.; Skerritt, J.H.; Werz, M.A. Adenosine agonists reduce voltage-dependent calcium conductance of mouse sensory neurons in cell culture. *Journal of Physiology* 370:75-90, 1986.

- Madeira, M.D.; Sousa, N.; 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 Comportamental Neurology* 322(4):501-518, 1992.
- Maggirwar, S.B.; Dhanraj, D.N.; Somani, S.M.; Rankumar, V. Adenosine acts as an endogenous activator of the cellular antioxidant defense system. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 201:508-515, 1994.
- Maienschein, V.; Zimmermann, H. Immunocytochemical localization of 5'-Nucleotidase in cultures of cerebellar granule cells. *Neuroscience* 70(2):429-38, 1996.
- Mazurkiewick, D.; Saggerson, D. Changes in the activities of adenosine-metabolizing enzymes in six regions of the rat brain on chemical induction of hypothyroidism. *Biochemical Journal* 261:667-672, 1989.
- Meyerhof, O. The origin of the reaction of Harden and Young in the cell-free alcoholic fermentation. *Journal of Biological Chemistry* 157:105-119, 1945.
- Mitsuhashi, T.; Tennyson, G.E.; Nikodem, V.M. Alternative splicing generates messages encoding c-erb-A proteins that do not bind thyroid hormone. *Proceeding of The National Academy of Science of USA* 85:5804-8, 1988.
- Oppenheimer, J.H.; Schwartz, H.L. Molecular basis of thyroid hormone-dependent brain development. *Endocrinology Reviews* 18(4):462-75, 1997.
- Pantos, C.I.; Mourouzis, I.S.; Tzeis, S.M.; Malliopolou, V.; Cokkinos, D.D.; Asimacopoulos, P.; Carageorgiou, H.C.; Varonos, D.D.; Cokkinos, D.V. Propranolol diminishes cardiac hypertrophy but does not abolish acceleration of the ischemic contracture in hyperthyroid hearts. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 36(3):384-389, 2000.

- Patel, A.J.; Hayashi, M.; Hunt, A. Selective persistent reduction in choline acetyltransferase activity in basal forebrain of the rat after thyroid deficiency during early life. *Brain Research* 422:182-185, 1987.
- Phillis, J.W.; Wu, P.H. The role of adenosine and its nucleotides in central synaptic transmission. *Progress in Neurobiology* 16:187-239, 1981.
- Plesner, L; Ecto-ATPases: identities and functions. *International Reviews of Cytology* 158:141-214, 1995.
- Potter, P.; White, T.D. Release of adenosine and adenosine-5'triphosphate from synaptosomes from different regions of rat brain. *Neuroscience* 5:1351-1356, 1980.
- Ribeiro, J.M.C.; Sebastião, A.M. Adenosine receptors and calcium: basis for proposing a third (A3) adenosine receptor. *Progress in Neurobiology* 26:179-209, 1986.
- Rudolphi, K.A.; Schubert, P.; Parkinson, F.E.; Fredholm, B.B. Neuroprotective role of adenosine in cerebral ischemia. *TITS* 13:439-445, 1992.
- Ryu J.K.; Kim J.; Choi S.H.; Oh Y.J.; Lee Y.B.; Kim S.U.; Jin B.K. ATP-induced in vivo neurotoxicity in the rat striatum via P2 receptors. *Neuroreport* 13:1611-1615, 2002.
- Sarkis, J.J.F.; Saltó, C. Characterization of a synaptosomal ATP diphosphohydrolase from the electric organ of *Torpedo marmorata*. *Brain Research Bulletin* 26:871-876, 1991.
- Sap, J.; Munoz, A.; Damm, K.; Goldberg, Y.; Ghysdael, J.; Leutz, A.; Beug, H.; Vennstrom, B. The c-erb-A protein is a high affinity receptor for thyroid hormone. *Nature* 324:635-40, 1986.

- Schetinger, M.C.R.; Bonan, C.D.; Schierholt, R.C.; Webber, A.; Arteni, N.; Emanuelli, T.; Dias, R.D.; Sarkis, J.J.F.; Netto, C.A. Nucleotide hydrolysis, in rats submitted to global cerebral ischaemia: a possible link between preconditioning and adenosine production. *Journal of Stroke Cerebrovascular Diseases* 7(5):281:286, 1998.
- Schoen, S.W.; Kreutzberg, G.W. Synaptic 5'-nucleotidase activity reflects lesion-induced sprouting within the adult rat dentate gyrus. *Experimental Neurology* 127(1):106-18, 1994.
- Schroder-Van Der Elst, J.P.; Van Der Heide, D. Thyroxine, 3, 5, 3'-triiodothyronine, and 3, 3', 5-triiodothyronine concentrations in several tissues of rat: effects of amiodarone and desethylamiodarone on thyroid hormone metabolism. *Endocrinology* 127:1656-64, 1990.
- Shuaib, A.; Ijaz, S.; Hemmings, S.; Galazka, P.; Ishaqzay, R.; Liu, L.; Ravindran, J.; Miyashita, H. Decreased glutamate release during hypothyroidism may contribute to protection in cerebral ischemia. *Experimental Neurology* 128(2):260-5 1994.
- Slotkin, T.A.; Slepatis, R.J. Obligatory role of thyroid hormones in development of peripheral sympathetic and central nervous system catecholaminergic neurons: effects of propylthiouracil-induced hypothyroidism on transmitter levels, turnover and release. *Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics* 230:53-61, 1984.
- Smith, J.S.; Evans, A.T.; Costall, B. & Smythe, J.W. Thyroid hormones, brain function and cognition: a brief review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 26:45-60, 2002.
- Trussel, L.O.; Jackson, M.B. Adenosine-activated potassium conductance in cultured striatal neurons. *Proceeding of the National Academy of Sciences of USA* 82:4857-4861, 1985.

- Vizi, E.S.; Liang, S.D.; Sperlagh, L.B.; Kittel, A.; Juranyi, Z. Studies on the release and extracellular metabolism of endogenous ATP in the rat superior cervical ganglion: Support for neurotransmitter role of ATP. *Neuroscience* 79:893-903, 1997.
- Volonté C.; Ciotti M.T.; D'Ambrosi N.; Lockhart B.; Spedding M. Neuroprotective effects of modulators of P2 receptors in primary culture of CNS neurones. *Neuropharmacology* 38:1335-1342, 1999.
- Wang, T.F.; Guidotti, G. The transmembrane domains of ecto-apyrase (CD39) in the affect is enzymatic activity and quarternary structure. *Journal of Biological Chemistry* 273:24814-24821, 1998.
- Weinberger, C.; Thompson, C.C.; Ong, E.S.; Lebo, R.; Grul, D.L.; Evans, R.M. The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature* 324:641-6, 1986.
- Williams, M.; Jarvis, M.E. Purinergic and pirimidinergic receptors as potential drug targets. *Biochemical Pharmacology* 59:1173-1185, 2000.
- Zimmerman, H. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochemical Journal* 285:345-365, 1992.
- Zimmerman, H. Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Progress in Neurobiology* 49:587-618, 1996.
- Zimmerman, H. Ectonucleotidases, Some recent developments and note on nomenclature. *Drug Development Research* 52:44-56, 2001.