

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**Instituto de Ciências Básicas da Saúde**

**Departamento de Fisiologia**

**Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia**

**INFLUÊNCIA DO HIPOTIREOIDISMO NO DANO OXIDATIVO E NAS  
DEFESAS ANTIOXIDANTES**

Dissertação de Mestrado

ALEX SANDER DA ROSA ARAUJO

Porto Alegre, 2002

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**Instituto de Ciências Básicas da Saúde**  
**Departamento de Fisiologia**

**INFLUÊNCIA DO HIPOTIREOIDISMO NO DANO OXIDATIVO E NAS  
DEFESAS ANTIOXIDANTES**

ALEX SANDER DA ROSA ARAUJO

Orientadora: Dra. Adriane Belló Klein

Dissertação apresentada ao curso de pós graduação em Ciências  
Biológicas: Fisiologia, do Instituto de Ciências Básica da Saúde da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para  
obtenção do título de mestre.

Porto Alegre, dezembro de 2002

Dedico este trabalho ao meu pai Valdir e a minha mãe Mariza com  
todo meu amor, carinho e admiração.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me carregar nos braços durante todos os momentos da minha vida.

A minha orientadora Adriane Belló-Klein por confiar no meu trabalho.

À professora Susana Llesuy pela dedicação.

À Tânia Regina Gatteli pela ajuda na realização dos experimentos.

A todos os demais colegas do laboratório pelo incentivo ao trabalho.

Ao Laboratório de Análises Clínicas Weimann pela colaboração e pelo empenho em prol da ciência.

A minha namorada amada Fernanda pelo auxílio, compreensão e paciência.

Aos meus pais por todo amor e carinho.

Ao Dr. Cláudio Seibel e esposa por todo auxílio dispensado.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1. ESPÉCIES ATIVAS DE OXIGÊNIO.....</b>	<b>13</b>
<b>1.2. REATIVIDADE DAS EAO EM SISTEMAS BIOLÓGICOS.....</b>	<b>17</b>
<b>1.3. DEFESAS CONTRA AS EAO.....</b>	<b>19</b>
<b>1.3.1. Defesas Enzimáticas.....</b>	<b>21</b>
<b>1.3.2. Defesas Não-Enzimáticas.....</b>	<b>25</b>
<b>1.4. HORMÔNIOS DA TIREÓIDE.....</b>	<b>26</b>
<b>1.4.1. Síntese, armazenamento e secreção.....</b>	<b>26</b>
<b>1.4.2. Regulação da função tireoidiana.....</b>	<b>27</b>
<b>1.4.3. Mecanismo de ação.....</b>	<b>28</b>
<b>1.4.4. Transporte e metabolismo.....</b>	<b>28</b>
<b>1.4.5. Ações dos hormônios tireoidianos.....</b>	<b>29</b>
<b>1.5. HIPOTIREOIDISMO.....</b>	<b>30</b>
<b>1.5.1. Mudanças Metabólicas no Hipotireoidismo.....</b>	<b>31</b>
<b>1.5.2. Mudanças Hematológicas no Hipotireoidismo.....</b>	<b>32</b>
<b>1.5.3. Sistema Cardiovascular no Hipotireoidismo.....</b>	<b>33</b>
<b>1.5.4. Fígado no Hipotireoidismo.....</b>	<b>33</b>
<b>1.6. RELAÇÃO ENTRE HORMÔNIOS DA TIREÓIDE E ESTRESSE OXIDATIVO .....</b>	<b>34</b>
<b>2. HIPÓTESE.....</b>	<b>38</b>
<b>3 .OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>41</b>
<b>4.1. ANIMAIS.....</b>	<b>41</b>
<b>4.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS.....</b>	<b>41</b>
<b>4.3. PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS.....</b>	<b>42</b>
<b>4.4. COLETA DE SANGUE.....</b>	<b>43</b>
<b>4.5. SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E PREPARO DOS HOMOGENEIZADOS.....</b>	<b>43</b>
<b>4.5.1. Homogeneizados para LPO e Atividade das Enzimas.....</b>	<b>44</b>
<b>4.5.2. Homogeneizados para o Western Blot.....</b>	<b>44</b>

4.6. DOSAGEM HORMONAL.....	45
4.7. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	46
4.8. DOSAGEM DE HEMOGLOBINA .....	47
4.9. SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBA-RS) .....	48
4.10. QUIMILUMINESCÊNCIA.....	49
4.11. DOSAGEM DE CARBONILAS.....	50
4.12. CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (TRAP).....	51
4.13. CATALASE.....	52
4.14. SUPERÓXIDO DISMUTASE.....	53
4.15. GLUTATIONA PEROXIDASE.....	54
4.16. GLUTATIONA -S- TRANSFERASE.....	56
4.17. WESTERN BLOT.....	57
4.18. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	58
5. RESULTADOS.....	59
5.1. RESULTADO DA MEDIDA DE HORMÔNIOS DA TIREÓIDE.....	60
5.2. MEDIDA DO PESO CORPORAL DOS ANIMAIS.....	60
5.3. RESULTADOS DAS MEDIDAS NO CORAÇÃO.....	61
5.3.1. Biometria do Coração.....	61
5.3.2. TBA-RS .....	62
5.3.3 – QUIMILUMINESCÊNCIA.....	63
5.3.4 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (TRAP).....	64
5.3.5. ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	65
5.3.6. CONCENTRAÇÃO DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	66
5.4. RESULTADOS DAS MEDIDAS NO FÍGADO.....	68
5.4.1. TBA-RS.....	68
5.4.2 QUIMILUMINESCÊNCIA.....	69
5.4.3 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (TRAP).....	70
5.4.4. ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	71
5.4.5 CONCENTRAÇÃO DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	72

<b>5.5. RESULTADOS DAS MEDIDAS NO SANGUE.....</b>	<b>74</b>
<b>5.5.1 QUIMILUMINESCÊNCIA.....</b>	<b>74</b>
<b>5.5.2. DOSAGEM DE CARBONILAS.....</b>	<b>75</b>
<b>5.5.3 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (TRAP).....</b>	<b>76</b>
<b>5.5.4. ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....</b>	<b>77</b>
<b>5.5.5. CONCENTRAÇÃO DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....</b>	<b>78</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>80</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>96</b>
<b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>98</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>99</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Formação das EAO, a partir da redução do  $O_2$ .....14
- Figura 2.** Distribuição eletrônica da molécula de oxigênio e alguns de seus derivados.....16
- Figura 3.** Representação esquemática da reação da LPO.....20
- Figura 4.** Demonstração do procedimento cirúrgico da tireoidectomia.....42
- Figura 5.** Medida dos níveis de lipoperoxidação no coração, obtidos através da técnica de TBA-RS ( $\mu\text{mol/mgprot}$ ).....62
- Figura 6.** Medida dos níveis de lipoperoxidação por quimiluminescência (cpm/mgprot) em homogeneizado cardíaco.....63
- Figura 7.** Medida capacidade antioxidante total (mM trolox) em homogeneizado cardíaco.....64
- Figura 8.** Medida da concentração da enzima superóxido dismutase (em valor de percentagem do controle) em homogeneizado cardíaco.....66
- Figura 9.** Medida concentração da enzima glutathione S transferase (em valor de percentagem do controle) em homogeneizado cardíaco.....67
- Figura 10.** Medida da concentração da enzima superóxido dismutase (em valor de percentagem do controle) em homogeneizado hepático....72
- Figura 11.** Medida concentração da enzima glutathione S transferase (em valor de percentagem do controle) em homogeneizado hepático .....73.
- Figura 12.** Medida dos níveis de lipoperoxidação por quimiluminescência (cpm/mgprot) em eritrócitos.....74
- Figura 13 .** Medida da oxidação das proteínas através das carbonilas (nmol/mg prot.) em plasma sanguíneo.....75
- Figura 14.** Medida capacidade antioxidante total (mM de trolox ) em plasma sanguíneo.....76
- Figura 15.** Medida da concentração da enzima superóxido dismutase (em valor de percentagem do controle) nos eritrócitos.....78
- Figura 16.** Medida concentração da enzima glutathione S transferase (em valor de percentagem do controle) nos eritrócltos.....79

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Medida dos níveis plasmáticos de T3 e T4 nos grupos experimentais.....	60
<b>Tabela 2.</b> Medida do ganho de peso corporal (em gramas) dos animais durante quatro semanas.....	61
<b>Tabela 3.</b> Peso absoluto do coração (em gramas) e relativo ao peso corporal (em gramas) nos grupos experimentais.....	61
<b>Tabela 4.</b> Medida atividade das enzimas antioxidantes em homogeneizado cardíaco.....	65
<b>Tabela 5.</b> Medida dos níveis de lipoperoxidação hepática obtidos através da técnica de TBA-RS ( $\mu\text{mol/mg prot}$ ).....	68
<b>Tabela 6.</b> Medida dos níveis de lipoperoxidação no fígado obtidos através de quimiluminescência ( $\text{cpm/mg prot}$ ).....	69
<b>Tabela 7.</b> Medida capacidade antioxidante total (mM de trolox) em homogeneizado hepático.....	70
<b>Tabela 8.</b> Medida atividade das enzimas antioxidantes em homogeneizado cardíaco.....	71
<b>Tabela 9.</b> Medida atividade das enzimas antioxidantes em homogeneizado hepático.....	77

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ATP:** trifosfato de adenosina

**CAT:** catalase

**DNA:** ácido desoxirribonucléico

**EAO:** espécies ativas de oxigênio

**EUTI:** eutireoideo

**GPx:** glutaciona peroxidase

**GRx:** glutaciona redutase

**GSH:** glutaciona

**GSSG:** dissulfeto glutaciona

**HIPO:** hipotireoideo

**HDL:** lipoproteína de alta densidade

**LDL:** lipoproteína de baixa densidade

**LPO:** lipoperoxidação

**PUFA:** ácido graxo poliinsaturado

**SH:** grupo tiol

**SOD:** superóxido dismutase

**TBA:** ácido tiobarbitúrico

**TBA-RS:** substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

**TCA:** ácido tricloroacético

**T3:** triiodotironina

**T4:** tiroxina

## RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

### **INFLUÊNCIA DO HIPOTIREOIDISMO NO DANO OXIDATIVO E NAS DEFESAS ANTIOXIDANTES**

Autor: Alex Sander da Rosa Araújo

Orientador: Adriane Belló-Klein

O hipotireoidismo é uma doença que tem grande impacto sobre o metabolismo basal dos tecidos, reduzindo o consumo de O<sub>2</sub> e geração de energia. Por essa razão, a sua relação com a produção de espécies ativas de oxigênio (EAO) é extremamente importante, uma vez que com a diminuição da utilização de O<sub>2</sub>, possivelmente, ocorra uma redução na geração das EAO. Portanto, trabalhamos com a hipótese de que havendo decréscimo na síntese de radicais livres, o dano oxidativo ficaria menos evidente nos diferentes tecidos de hipotireoideos.

Foram utilizados ratos Wistar, pesando cerca de 170 g divididos em dois grupos distintos: hipotireoideos e eutireoideos. O hipotireoidismo foi induzido pelo procedimento cirúrgico denominado de tireoidectomia. Cabe salientar, que os animais eutireoideos foram submetidos somente à simulação da cirurgia (*sham operated*). Transcorridas quatro semanas da tireoidectomia, os ratos tiveram seu sangue coletado e seus órgãos (coração e fígado) removidos. Foram feitas análises bioquímicas do dano oxidativo através da medida da lipoperoxidação (TBA-RS e Quimiluminescência) e da oxidação das proteínas (dosagem das carbonilas). Medidas de defesas antioxidantes enzimáticas (atividade e concentração das enzimas catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase e glutathione-S-transferase) e não

enzimáticas (através da medida da capacidade antioxidante total -TRAP) também foram realizadas.

Os resultados, da quantificação da lipoperoxidação, demonstraram a diminuição das cifras de TBA-RS e Quimiluminescência no sangue e tecido cardíaco dos ratos tireoidectomizados em relação ao grupo eutireoideo. No entanto, no tecido hepático não houve alteração deste parâmetro. A oxidação das proteínas também foi menor no plasma dos animais hipotireoideos. Por outro lado, o TRAP e a atividade das enzimas antioxidantes se apresentaram em declínio no grupo hipotireoideo em relação ao grupo eutireoideo, no miocárdio e nos eritrócitos. Todavia, no tecido hepático, somente a catalase demonstrou decréscimo da atividade catalítica nos hipotireoideos. As concentrações das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e glutathione-S-transferase, medidas por Western Blott, foram menores no coração e sangue, e inalteradas no fígado.

Esses resultados sugerem que o estado hipometabólico, causado pela deficiência dos hormônios da tireóide, pode levar à redução dos danos oxidativos aos lipídeos e às proteínas. Entretanto, não podemos afirmar que o estresse oxidativo dos animais hipotireoideos seja inferior aos eutireoideos, porque as defesas antioxidantes também estão reduzidas nestes animais.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 - ESPÉCIES ATIVAS DE OXIGÊNIO

As espécies ativas de oxigênio (EAO) estão envolvidas numa série de processos degenerativos, devido à propriedade de serem ou gerarem radicais livres (MENEHINI, 1987; YU, 1994).

Os radicais livres são definidos como qualquer espécie química capaz de existência independente que contenha um ou mais elétrons desemparelhados, sendo assim, altamente reativos e capazes de atacar qualquer biomolécula (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

A formação destes compostos é estabelecida pela perda ou ganho de um elétron, como por exemplo, na fissão homolítica de uma ligação covalente, em que cada um dos átomos fica com um elétron desemparelhado. Cabe ressaltar, que o oxigênio molecular é um birradical, muito embora sua reatividade seja baixa porque seus dois elétrons desemparelhados têm spins paralelos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; YU, 1994).

A geração das EAO ocorre durante os processos de oxidação biológica. Dentre os quais, podemos destacar a respiração celular acoplada à fosforilação oxidativa, para formação de ATP na mitocôndria. A princípio, o oxigênio ( $O_2$ ) é reduzido até água ( $H_2O$ ), recebendo quatro elétrons de uma só vez pela citocromo oxidase. Entretanto, em razão de sua configuração eletrônica, o oxigênio tem uma forte tendência a receber um elétron de cada

vez, gerando compostos intermediários altamente reativos, como visto na figura 1. Destes compostos intermediários, pode-se destacar: o ânion radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ). A formação destas moléculas ocorre em aproximadamente 5% de todo processo de redução do oxigênio até água. Algumas das EAO são fortemente oxidantes e apresentam pelo menos um elétron desemparelhado, geralmente, no orbital mais externo, sendo denominadas de radicais livres. Ainda deve-se relatar o estado excitado do oxigênio denominado de oxigênio “singlet”, que também pode causar danos à célula (DEL MAESTRO, 1980; MENECHINI, 1987; YU, 1994).

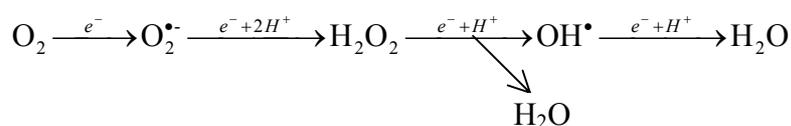
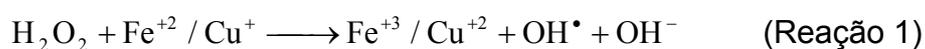


Figura 2: Formação das EAO, a partir da redução do  $O_2$ .

O ânion radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) é o primeiro intermediário da redução monovalente do oxigênio à água e a partir do mesmo serão formadas as demais EAO. A sua dismutação é catalisada pela enzima superóxido dismutase (YU, 1994). O peróxido de hidrogênio é o segundo intermediário do processo oxidativo, podendo ser produzido indiretamente, pela redução univalente do oxigênio, seguida da dismutação do ânion radical superóxido e/ou diretamente, pela redução bivalente do oxigênio molecular. Apesar de não ser um radical livre, esta espécie ativa pode originar o radical hidroxil

(OH<sup>•</sup>), o que seria bastante prejudicial à célula (DEL MAESTRO, 1980). O radical hidroxil (OH<sup>•</sup>), por sua vez, é um dos mais potentes oxidantes em sistemas biológicos. Este radical livre possui a capacidade de atravessar as membranas e pode reagir com biomoléculas, como lipídios insaturados e DNA, apesar de seu baixo tempo de meia vida (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). Sua formação pode se dar de acordo com a reação de Fenton (1894) (Reação 1), reação do peróxido de hidrogênio com íons de ferro ou de cobre, e a reação de Haber-Weiss (1934) (Reação 2), reação do peróxido de hidrogênio com o ânion radical superóxido na presença de íons metálicos (YU, 1994).



Cada EAO tem suas próprias características, mostrando diferentes reatividades e tempos de meia-vida (DEL MAESTRO, 1980; YU, 1994). Na figura 2, podemos observar que a molécula diatômica de oxigênio é um radical livre, mas possui spins paralelos, o que dificulta a reação química com outras moléculas e torna o oxigênio mais estável quimicamente. As formas de oxigênio mais reativas são os oxigênios “singlets”  $\Delta$  e  $\Sigma$ , que não possuem restrição de “spin” e por isso são muito mais reativas que o oxigênio molecular no estado fundamental (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

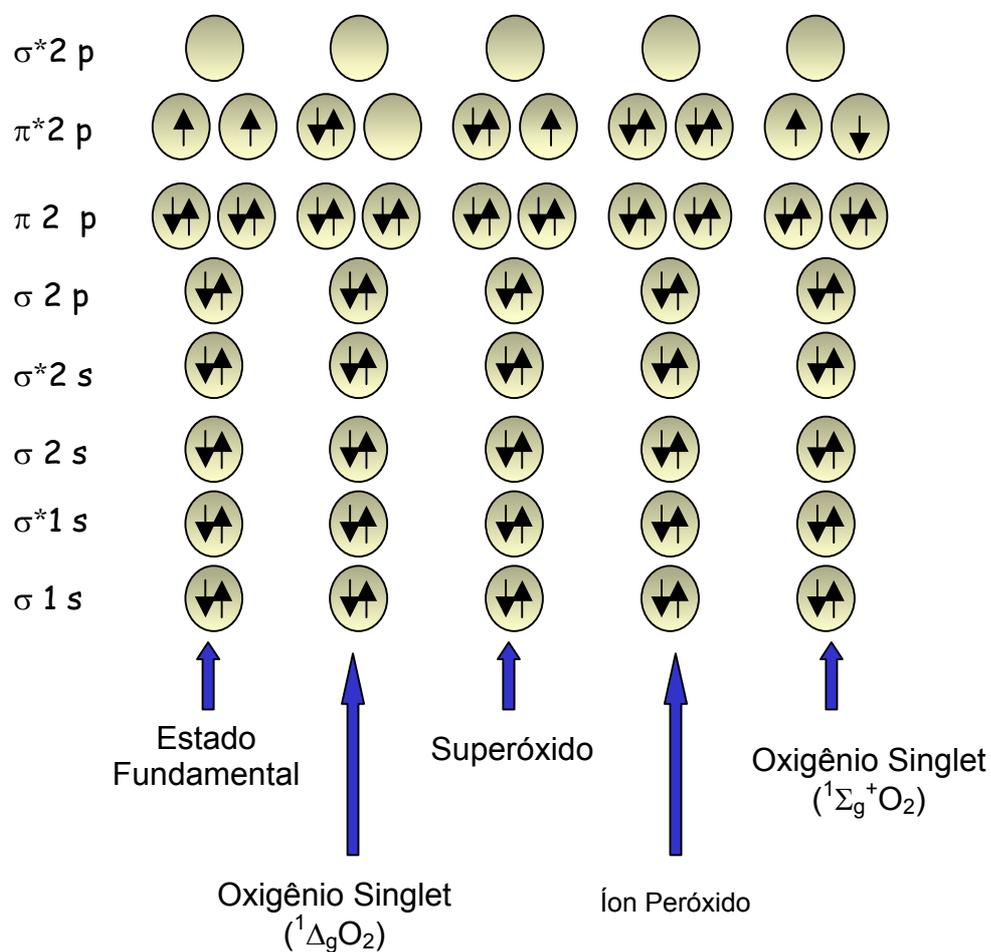


Figura 2: Distribuição eletrônica da molécula de oxigênio e alguns de seus derivados (modificado de HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Outras fontes de EAO compreendem não só as ações enzimáticas da ciclooxigenase, lipooxigenase, xantina oxidase, aldeído oxidase, mas também a autooxidação das catecolaminas, das flavinas e ferridoxinas, além das reações catalisadas por metais de transição, como ferro e cobre (DEL MAESTRO, 1980; MC CORD, 1987; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

## 1.2 - REATIVIDADE DAS EAO EM SISTEMAS BIOLÓGICOS

A magnitude da reatividade das EAO está relacionada com seus elétrons desemparelhados que lhes conferem a instabilidade característica. As reações com os radicais são muito rápidas e ocorrem em cadeia, já que os elétrons desemparelhados favorecem as colisões moleculares. Desta forma, as reações são propagadas rapidamente (SOUTHORN & POWIS, 1988).

O potencial reativo das EAO é bem ilustrado na lipoperoxidação (LPO) dos lipídios de membrana. A lipoperoxidação é um processo sucessivo e fisiológico que envolve não somente a renovação das membranas celulares, como também a biossíntese das prostaglandinas e leucotrienos (MENEHINI, 1987). As membranas celulares são preferencialmente atacadas, porque são formadas por lipídios de cadeias insaturadas e por proteínas com grupos tióis (SH) (MENEHINI, 1987; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). As reações de lipoperoxidação ocorrem numa série de etapas, das quais se destacam as seguintes: iniciação, propagação e terminação.

Na fase de iniciação, o radical hidroxil ou o oxigênio "singlet" ataca a molécula orgânica, abstraindo-lhe um átomo de hidrogênio, gerando um radical centrado no carbono, cuja estabilidade se faz pelo rearranjo das ligas duplas, formando o dieno conjugado. Este, por sua vez, combina-se com o oxigênio e produz o radical peroxil. Com o radical peroxil, inicia-se a fase de propagação da LPO, uma vez que este remove um átomo de hidrogênio de um lipídio adjacente, gerando um lipoperóxido e um outro radical centrado

no carbono (que poderá reagir com o oxigênio e propagar a reação). A reação acaba quando dois radicais reagirem entre si e formarem um tetróxido. Este último pode se degradar em oxigênio “singlet” e em carbonilas excitadas, devido a sua alta instabilidade. Esta é a etapa denominada de terminação (Figura 3) (RUSSEL, 1957).

Essas espécies quando voltam ao seu estado fundamental emitem luz no comprimento de onda do visível, caracterizando o fenômeno de quimiluminescência, que se constitui num importante método para análise e quantificação da LPO (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; THOMAS, 1997).

Os efeitos da lipoperoxidação podem ser observados pela mudança não somente no ambiente lipídico das membranas biológicas (modificações na fluidez e na seletividade), mas também pelas alterações de suas proteínas (receptores e canais iônicos) (YU, 1994).

As proteínas também sofrem reações oxidativas iniciadas pelas EAO, que levam a alterações nas suas estruturas e nos seus estados conformacionais. Processos como fragmentação, agregação, além da maior susceptibilidade a proteases, exemplificam algumas das ações dos radicais livres sobre as proteínas (YU, 1994). Pode haver, também, um ataque ao DNA nuclear, sobretudo pelo radical hidroxil, formando a 8-hidroxideoxiguanosina que pode ser detectada experimentalmente. O DNA mitocondrial também é bastante atingido, uma vez que a mitocôndria é a grande fonte de EAO (YU, 1994).

Muitas são as evidências de que as EAO provocam ou influenciam

inúmeros processos orgânicos degenerativos como a catarata, o enfisema, a artrite, a doença de Parkinson, a porfiria aguda intermitente, a lesão isquêmica, o diabetes experimental (induzida por aloxano ou por estreptozotocina) e até mesmo a mutação, o câncer e o envelhecimento (MENEHINI, 1987; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Além disso, diversas enzimas têm sua atividade modulada por radicais livres como a aconitase, diversas hidratases e desidratases (GARDNER *et al.*, 1995).

### **1.3 - DEFESAS CONTRA AS EAO**

Há substâncias que possuem o potencial de neutralizar as ações dos radicais livres, prevenindo, desta forma, os danos oxidativos. Tal grupo é chamado de antioxidantes. Quando presentes em baixa concentração, comparada ao substrato oxidável, os antioxidantes retardam ou previnem a oxidação deste substrato, que pode ser lipídio, proteína, DNA ou outras moléculas. O sistema antioxidante é responsável pela proteção celular contra o estresse oxidativo. E seus mecanismos de ação são diversos, e podem incluir remoção do oxigênio presente no meio, varredura das EAO ou seus precursores, inibição da formação das EAO, quelação de metais que catalisam sua formação, indução de aumento da geração de antioxidantes endógenos, entre outros mecanismos, envolvendo muitas vezes integração funcional de vários destes componentes (HALLIWELL, 1997). Os antioxidantes minimizam os distúrbios no meio interno e preservam a ótima atividade celular além de estarem estrategicamente compartimentalizados

nas organelas celulares para gerarem proteção máxima (YU, 1994).

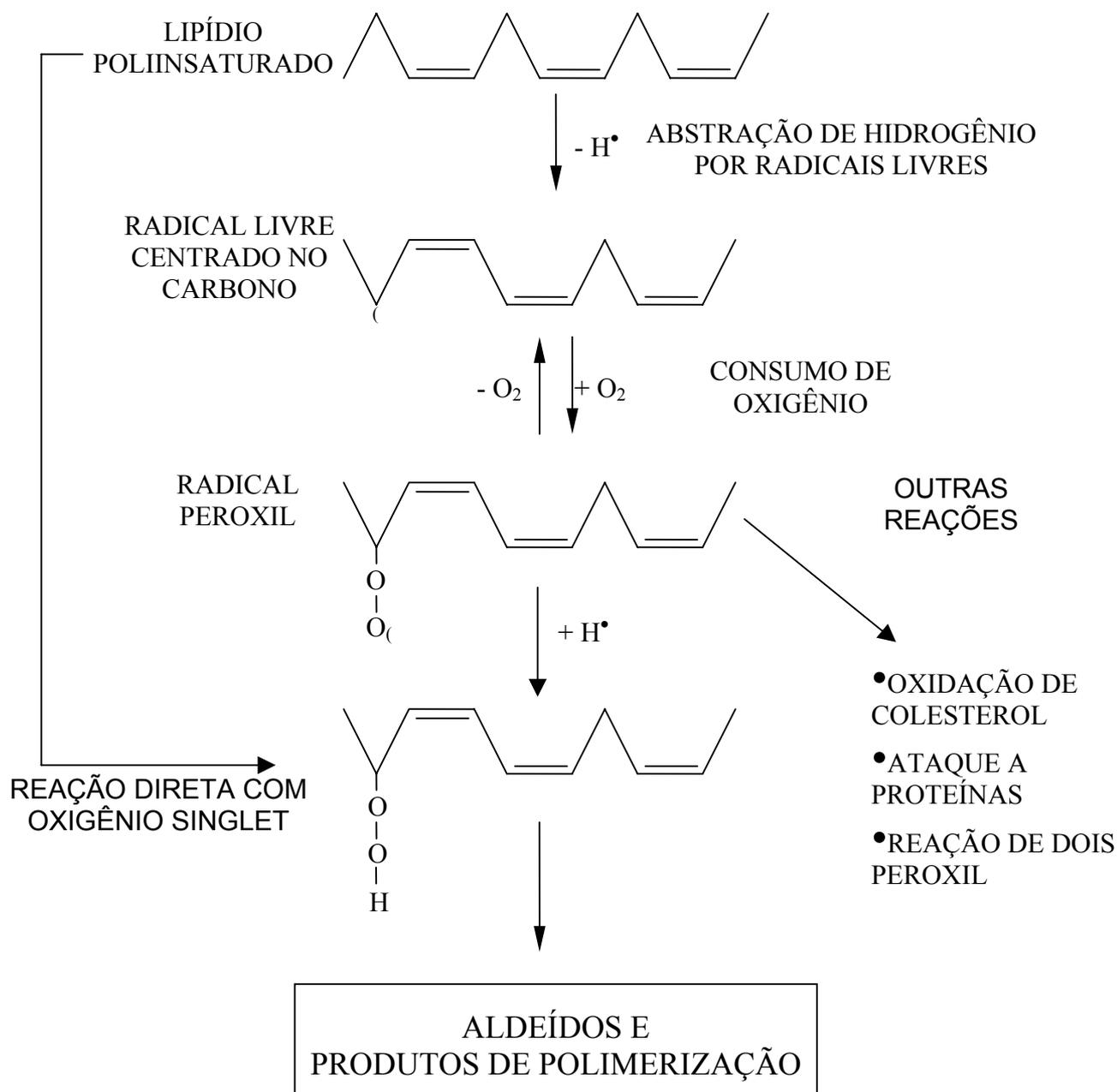


Figura 3: Representação esquemática da reação da LPO (modificado de Halliwell & Gutteridge, 1999).

O sistema antioxidante é constituído por componentes enzimáticos e não enzimáticos, que atuam conjuntamente na proteção celular. O sistema enzimático é considerado a linha de defesa primária, uma vez que evita o acúmulo do ânion radical superóxido e do peróxido de hidrogênio. Existem, também, as defesas secundárias que impedem a propagação da LPO e as terciárias, enzimas de reparo de danos já instalados (YU, 1994).

Quando a substância age neutralizando as EAO na fase de iniciação ou propagação da LPO, levando à formação de um composto menos reativo, é chamada de “scavenger”. Ao passo que, se a substância antioxidante tiver a propriedade de absorver a energia de excitação dos radicais, neutralizando-os, é denominada de “quencher” (SIES & MURPHY, 1991; HALLIWELL, 1997).

### **1.3.1 - Defesas Enzimáticas**

A distribuição das enzimas antioxidantes está intimamente relacionada com as fontes de espécies ativas de oxigênio (EAO), sendo assim podemos notar a importância da existência das defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas. Sem elas o equilíbrio celular seria alterado e facilitaria o surgimento de várias disfunções que poderiam levar a processos patológicos.

A regulação das enzimas antioxidantes, necessária para manutenção da homeostase celular em condições adversas ao organismo, depende de vários fatores, como especificidade do órgão, idade, estágio de

desenvolvimento, perfil hormonal e disponibilidade de cofatores (HARRIS, 1992).

O sistema enzimático encarregado da detoxificação das EAO é formado por várias enzimas, das quais pode-se destacar: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx).

A reação catalítica, realizada pela superóxido dismutase (SOD), visa transformar dois ânions radicais superóxidos em peróxido de hidrogênio (Reação 3). Essa dismutação ocorre naturalmente em pH fisiológico, porém, em uma velocidade bem menor em relação àquela catalisada pela enzima (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989; YU, 1994).

O mecanismo de catálise da dismutação do superóxido pela SOD e miméticos tem sido sugerido como “mecanismo de ping-pong”, no qual o catalisador oscila entre dois estados de oxidação (GOLDSTEIN & CZAPSKI, 1996).

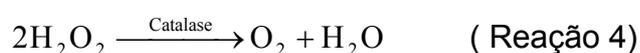


A SOD é classificada em três tipos distintos: SOD cobre e zinco, presente no citoplasma das células de eucariontes; SOD manganês, localizada na matriz mitocondrial e SOD ferro que ocorre em bactérias (YU, 1994).

Estas enzimas, presentes em quase todos os organismos vivos, são um sistema de defesa essencial para a sobrevivência em condições aeróbias. O

papel deletério do superóxido durante a isquemia, que ocorre em transplante de órgãos, muitas intervenções cirúrgicas e durante acidentes vasculares no cérebro e coração, sugerem que a SOD pode ter um uso clínico potencial. Isto levou à pesquisa pela SOD, uma vez que, a SOD humana tem curto tempo de meia-vida (menor que 10 minutos), e não penetra nas células (GOLDSTEIN & CZAPSKI, 1996). Além disso, a modulação da atividade da SOD extracelular pode ser utilizada no tratamento de doenças vasculares, como a arteriosclerose (LUOMA *et al*, 1998).

Uma outra enzima importante é a catalase (CAT). O peróxido de hidrogênio, formado na dismutação do ânion radical superóxido, é transformado em água e oxigênio por ação desta enzima (Reação 4). Essa, por sua vez, tem uma ação bastante específica, já que atua apenas em reações com peróxidos de hidrogênio, metila e etila (CHANCE *et al.*, 1979). A catalase se distribui em todos os órgãos, tendo níveis de atividade que podem variar em diferentes tecidos (fígado, rins, hemácias) e dentro de uma mesma célula (YU, 1994). Essa enzima aparece, preferencialmente, compartimentalizada nos peroxissomas. Órgãos como coração, pulmão e cérebro são mais susceptíveis aos danos oxidativos, já que estes tecidos possuem poucos peroxissomas e, portanto, menor concentração desta enzima. Cabe salientar, que nesses órgãos o peróxido de hidrogênio pode atravessar as membranas celulares e se difundir no sangue, onde poderá sofrer a ação da catalase eritrocitária (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).



A glutathione peroxidase (GPx) é outra enzima antioxidante localizada no citosol e na matriz mitocondrial. Essa catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e de hidroperóxidos orgânicos, através da oxidação da glutathione reduzida (GSH), que será, por sua vez, regenerada por ação da glutathione reductase com consumo de NADPH (Reações 5 e 6). Neste processo de oxirredução, os grupamentos sulfidrilas doam dois hidrogênios para os peróxidos, transformando-os em álcool e/ou água e formando glutathione dissulfeto (GSSG) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; YU, 1994).

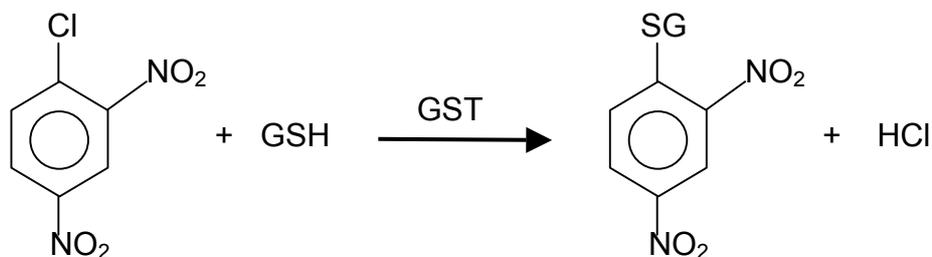


Existem dois tipos de glutathione peroxidase: a selênio dependente e a selênio independente, encontrada em diferentes proporções no citosol e matriz mitocondrial (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989; YU, 1994).

A glutathione peroxidase tem alta atividade no fígado e eritrócitos, onde ela foi descoberta. Tem moderada atividade no coração e nos pulmões e baixa atividade no músculo (MILLS; 1960).

Outro grupo de enzimas que possuem um importante papel fisiológico na detoxificação são as enzimas chamadas glutathione-S-transferases (GSTs). Estas enzimas agem na detoxificação de potentes agentes alquilantes, incluindo compostos farmacologicamente ativos como herbicidas, pesticidas e xenobióticos. As GSTs catalisam a reação destes compostos com o grupamento SH da glutathione, neutralizando assim seus sítios eletrofílicos e

transformando-os em produtos mais hidrossolúveis, que são mais facilmente metabolizáveis (Reação 7) (HABIG, 1974).



(Reação7)

### 1.3.2 - Defesas Não-Enzimáticas

Por outro lado, têm-se as defesas não enzimáticas que podem ser divididas da seguinte forma: antioxidantes hidrofílicos (por exemplo: glutathione, vitamina C, indóis, catecóis) e lipofílicos (como: bioflavonas, carotenóides, tocoferóis) (SIES & MURPHY, 1991; SIES, 1997). Dentre os hidrofílicos, a vitamina C tem papel relevante como antioxidante, sobretudo, como “scavengers” e regenerador dos tocoferóis. Devido a sua característica hidrossolúvel possui alta capacidade de proteção do plasma sanguíneo contra a LPO (YU, 1994). A propriedade lipossolúvel dos tocoferóis favorece sua ação nas membranas celulares, protegendo-as dos danos mais sérios da LPO. Ainda, pode-se destacar o potencial antioxidante dos estrógenos, agindo como “scavenger” de radicais livres, inibindo a oxidação lipídica das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) iniciada pelas EAO (KHUL, 1994).

## **1.4 - HORMÔNIOS DA TIREÓIDE**

A glândula tireóide, que está localizada logo abaixo da laringe, à frente e de ambos os lados da traquéia, secreta dois hormônios significativos, a tiroxina (T4) e a triiodotireonina (T3), que exercem grande efeito sobre a atividade metabólica do organismo. Secreta, também, a calcitonina, um importante hormônio para o metabolismo do cálcio (GUYTON & HALL, 2002).

### **1.4.1 - Síntese, armazenamento e secreção**

A unidade funcional da tireóide é o folículo ou ácino. Cada folículo consiste em uma única camada de células epiteliais ao redor de uma cavidade à luz folicular, que está cheia com um colóide espesso contendo principalmente tireoglobulina (GUYTON & HALL, 2002).

A tireoglobulina é uma grande glicoproteína contendo, cada molécula, cerca de 115 resíduos de tirosina. É sintetizada, glicosilada e, a seguir, secretada para dentro da luz do folículo, onde ocorre a iodetação dos resíduos de tirosina. Circundando os folículos, existe uma rica rede capilar, e a velocidade do fluxo sanguíneo através da glândula é muito alta em comparação com os outros tecidos (RANG *et al.*, 1997).

A tireoglobulina é o sítio de armazenamento dos hormônios tireoidianos. O iodeto é ativamente captado pelas células da tireóide; a iodetação de resíduos de tirosina na tireoglobulina resulta na formação da

monoiodotirosina (MIT) e da diiodotirosina (DIT). Quando dois resíduos DIT acoplam, é formada a tiroxina (T4). Quando um resíduo DIT acopla com um resíduo MIT, é formada a triiodotironina (T3). Ambas são clivadas da tireoglobulina antes de serem secretadas da glândula tireóide (HENRY, 1999).

Cerca de 90% do hormônio secretado pela glândula tireóide são tiroxina (T4) e 10% são triiodotironina (T3). Contudo, considerável porção de T4 é convertida em T3, nos tecidos periféricos, de forma que ambos são muito importantes, funcionalmente. As funções desses dois hormônios são, qualitativamente, as mesmas, porém diferem quanto à rapidez e a intensidade da ação. O T3 é cerca de quatro vezes mais potente que T4, porém está presente no sangue em quantidades muito menor e persiste durante tempo muito mais curto que o T4 (GUYTON & HALL, 2002).

#### **1.4.2 – Regulação da função tireoidiana**

A biossíntese e a liberação de hormônios tireoidianos da tireoglobulina são controladas pela tireotrofina ou hormônio estimulante da tireóide (TSH), um hormônio glicoprotéico sintetizado e secretado pela hipófise anterior. Por sua vez, a secreção de TSH é regulada pelo hipotálamo através do hormônio liberador de tireotrofina (TRH) e, possivelmente, pela somatostatina bem como pelo feedback negativo dos hormônios tireoidianos (HENRY, 1999).

### **1.4.3 – Mecanismo de ação**

Os hormônios da tireóide agem por um mecanismo bastante semelhante ao dos esteróides. Depois de penetrarem na célula, T4 é convertida em T3, que se liga com alta afinidade a uma proteína receptora específica associada com o DNA no núcleo. A ligação induz uma modificação na conformação da proteína receptora, e isto resulta em síntese de RNA mensageiro e proteínas específicas, dependendo os efeitos produzidos do tipo de célula (RANG *et al.*, 1997).

### **1.4.4.- Transporte e metabolismo**

Praticamente toda a quantidade de T4 e T3 na circulação se liga à proteína plasmática, sendo a proteína principal a globulina ligadora de tiroxina (TGB). Pequenas quantidades dos hormônios estão ligadas à albumina.

Os hormônios tireoidianos acabam sendo degradados por desiodação, desaminação e conjugação com os ácidos glicurônico e sulfúrico. Isso ocorre principalmente no fígado, e as formas livres e conjugadas são excretadas em parte na bile e em parte na urina. A depuração metabólica de T3 é vinte vezes mais rápida que aquela de T4 (que é de aproximadamente seis dias).

Existe uma grande reserva de T4 no corpo, esta apresenta uma taxa de

renovação lenta e é encontrada principalmente na circulação, enquanto que, existe uma pequena reserva de T3 que apresenta uma taxa de renovação rápida e é encontrada principalmente dentro das células (RANG *et al.*, 1997).

#### **1.4.5. Ações dos hormônios tireoidianos**

As ações fisiológicas dos hormônios tireoidianos enquadram-se em duas categorias: aquelas que afetam o metabolismo e aquelas que afetam o crescimento e o desenvolvimento (GANONG, 1995).

##### Efeitos sobre o metabolismo

Os hormônios são reguladores do metabolismo da maioria dos tecidos. Eles produzem um aumento geral no metabolismo dos carboidratos, das gorduras e das proteínas. A maioria desses efeitos envolve a modulação das ações de outros hormônios, tais como insulina, glucagon, os glicocorticóides e as catecolaminas, porém os hormônios tireoidianos controlam também, diretamente, a atividade de algumas das enzimas do metabolismo dos carboidratos. Ocorre um aumento no consumo de O<sub>2</sub> e na produção de calor que se manifesta por uma elevação na taxa metabólica basal. Isso reflete a ação sobre alguns tecidos, tais como coração, rim, fígado e músculo, mas não sobre outros, como as gônadas, o cérebro e o baço. A ação calorígenica é uma parte importante da resposta a um meio ambiente frio. A administração do hormônio tireoidiano resulta em aceleração da frequência

cardíaca e aumento do débito cardíaco, assim como em maior tendência para as arritmias, como fibrilação atrial (RANG *et al.*, 1997).

### Efeitos sobre o crescimento e o desenvolvimento

Os hormônios tireoidianos exercem um efeito proeminente sobre o crescimento, em parte por uma ação direta sobre as células e em parte, indiretamente, influenciando a produção do hormônio do crescimento e potencializando seus efeitos. Estes hormônios são importantes também para uma resposta normal ao paratormônio e a calcitonina e para o desenvolvimento esquelético; são particularmente necessários para o crescimento normal e maturação do SNC (RANG *et al.*, 1997).

## **1.5 - HIPOTIREOIDISMO**

O hipotireoidismo é resultante de uma falta de ação dos hormônios tireoidianos sobre os tecidos. Os sinais e sintomas incluem bradicardia, rouquidão, sensibilidade ao frio, pele seca e fraqueza muscular. A falha da tireóide por si só em secretar uma quantidade adequada de hormônio tireoidiano é denominada de hipotireoidismo primário e é, mais comumente, decorrente da destruição ou ablação da glândula.

O hipotireoidismo secundário ocorre quando há uma diminuição da secreção de TSH como resultado de distúrbios hipofisários ou hipotalâmicos. Uma causa rara de hipotireoidismo é a deficiência familiar seletiva do TSH

(as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  falham na união por causa de um gene  $\delta$  do TSH anormal) (HENRY, 1999; ROBBINS *et al.*, 1996).

### **1.5.1. Mudanças Metabólicas no Hipotireoidismo**

No hipotireoidismo ocorre uma diminuição na taxa de consumo de oxigênio por unidade de área de superfície corporal e uma diminuição na taxa de produção de calor. As implicações clínicas dessas mudanças incluem uma queda na taxa metabólica basal, intolerância ao frio e algum ganho de peso, apesar da diminuição do apetite (BRAVERMANN & UTIGER, 1996).

A síntese e a degradação de lipídios e de proteínas estão diminuídas no hipotireoidismo. A biossíntese de ácidos graxos pelo tecido adiposo e pelo fígado está reduzida e as taxas de catabolismo de triglicerídeos e ácidos graxos são similarmente menores do que o normal. (BLENNEMANN *et al.*, 1992). No hipotireoidismo a absorção da glicose no trato gastrointestinal está mais lenta e a assimilação da glicose periférica está retardada. Essa redução pode ser causada pela menor concentração do transportador de glicose GLUT4 na membrana celular (SHEPHERD & KAHN, 1999).

As taxas de excreção de cálcio e fósforo na urina e fezes estão diminuídas em adultos com hipotireoidismo. Além disso, há uma redução característica na deposição de cálcio nos ossos. Pacientes com hipotireoidismo possuem grande risco de deficiência de ferro devido à diminuição da secreção de ácidos gástricos (hipocloridria) que ocorre nesses

pacientes. O meio ácido é necessário para a absorção de ferro. A reposição de ferro por terapia oral só surtirá efeito se concomitantemente for tratado o hipotireoidismo (BRAVERMANN & UTIGER, 1996). O distúrbio mais conhecido de metabolismo de vitaminas no hipotireoidismo é menor conversão do caroteno em vitamina A. As concentrações séricas de vitamina E podem estar elevadas em pacientes com hipotireoidismo, em parte como resultado de um aumento total na concentração das lipoproteínas séricas, especialmente o LDL. O hipotireoidismo pode levar a diminuição da utilização de vitamina B12 e ao aumento da proporção de tetrahydrofolato em relação ao metiltetrafolato no fígado. Ratos tireoidectomizados têm concentrações diminuídas de ácido ascórbico e ácido dehidroascórbico no fígado e nos rins (BRAVERMANN & UTIGER, 1996).

### **1.5.2. Mudanças Hematológicas no Hipotireoidismo**

Mudanças hematológicas, especialmente anemia, são comuns e bem caracterizadas no hipotireoidismo. A eritropoiese está diminuída, refletindo numa redução no volume total de sangue e na quantidade de eritrócitos. Essa diminuição na eritropoiese se deve a um efeito direto dos hormônios da tireóide nos precursores eritróides. Podemos encontrar casos de anemias por deficiência de ferro e anemias por deficiência de ácido fólico ou vitamina B12.

Alterações na contagem de linfócitos ou granulócitos são menos comuns no hipotireoidismo. Uma redução significativa na contagem de leucócitos

pode indicar um problema associado, como deficiência de vitamina B12 ou ácido fólico.

Poucas mudanças quantitativas na contagem de plaquetas são encontradas, ao passo que as mudanças qualitativas são mais comuns. A depressão de alguns dos fatores da coagulação é descrita e atribuída a uma diminuição generalizada na síntese de proteínas (BRAVERMAN & UTIGER, 1996).

### **1.5.3. Sistema Cardiovascular no Hipotireoidismo**

Muitos pacientes com hipotireoidismo têm aumento na resistência vascular sistêmica e uma diminuição na perfusão dos tecidos, bem como diminuição no consumo de oxigênio periférico. A massa cardíaca encontra-se menor do que o normal, juntamente com o volume sangüíneo. Pode ocorrer alteração na pressão sangüínea, onde a pressão sistólica pode estar diminuída ou normal e a diastólica pode estar aumentada ou normal (KLEIN, 1990).

### **1.5.4. Fígado no Hipotireoidismo**

Os hormônios da tireóide possuem significativo impacto na regulação do metabolismo mitocondrial hepático. No hipotireoidismo temos diminuição do consumo de oxigênio no hepatócito. Persistente hiperbilirrubinemia em recém nascidos pode sugerir o diagnóstico de hipotireoidismo congênito. A

tireoidectomia em ratos afeta várias enzimas chaves nas rotas de síntese de colesterol e da bile (BRAVERMAN & UTTIGER, 1996).

## **1.6 - RELAÇÃO ENTRE HORMÔNIOS DA TIREÓIDE E ESTRESSE OXIDATIVO**

Sabe-se que os hormônios da tireóide regulam o metabolismo de muitos tecidos, tais como o músculo esquelético e cardíaco, fígado, rim e cérebro (ASAYAMA & KATO, 1990). Entre as ações desses hormônios encontram-se o aumento do consumo de oxigênio, produção de calor, modulação da velocidade de reações específicas do metabolismo intermediário, o aumento da frequência e da força de contração cardíaca, bem como o aumento da pressão sistólica (BRAVERMAN & UTTIGER, 1996).

A aceleração do metabolismo basal e energético dos tecidos de várias espécies de mamíferos representam uma das mais importantes funções dos hormônios da tireóide (SCHWARTZ & OPPENHEIMER, 1978). De acordo com essa grande influência, sobretudo na função mitocondrial, incluindo o consumo de oxigênio e fosforilação oxidativa, os estados hipermetabólicos tornam a mitocôndria um dos principais sítios de produção das EAO (CHANCE *et al.*, 1979). Quando a tireoxina ou a triiodotironina é administrada a um animal a mitocôndria de quase todas as células do organismo aumenta de tamanho e número. Além disso, a superfície total da membrana da mitocôndria aumenta diretamente proporcional ao aumento do índice

metabólico, juntamente com a atividade das enzimas oxidantes e com os elementos do sistema de transporte de elétrons (GUYTON & HALL, 2002).

Alguns autores sugerem que o estado de hipertireoidismo está associado com um aumento na produção de radicais livres e com o aumento dos níveis de lipoperoxidação (FERNANDEZ *et al.*, 1985; ASAYAMA *et al.*, 1987). Ao passo que, o estado hipometabólico do hipotireoidismo leva a uma diminuição na produção das EAO e de seus conseqüentes danos a proteínas, lipídios e DNA (SWAROOP & RAMASARMA, 1985; PALLER, 1986; LOPEZ-TORRES *et al.*, 2000).

A capacidade total de peroxidação da mitocôndria é influenciada pela atividade da tireóide do corpo. Isso foi verificado pela menor produção de TBA-RS, (induzida por hidroperóxido terc-butil e sulfato de ferroso/ácido ascórbico) *in vitro* nas mitocôndrias de fígado de ratos hipotireoideos em relação aos eutireoideos (DAS & CHAINY, 2001). A quimiluminescência induzida por ferro no sangue de coelhos hipotireoideos apresentou-se menor em relação aos animais eutireoideos (MARZOEV *et al.*, 1985), bem como a quimiluminescência induzida por hidroperóxido terc-butil nos eritrócitos (VIDELA *et al.*, 1988).

As variações dos níveis hormonais tireoidianos modulam o estresse oxidativo celular, *in vivo*, principalmente, devido a sua ação mitocondrial (GUERRERO *et al.*, 1998). O consumo de oxigênio e a produção de radicais livres ocorrem preferencialmente nas membranas lipídicas da mitocôndria. Desta forma, a sensibilidade ao dano oxidativo das membranas celulares depende muito da concentração de ácidos graxos insaturados, sendo os

poliinsaturados os mais suscetíveis ao ataque das EAO. A mudança na composição lipídica das membranas celulares, em ratos, está intimamente relacionada com as concentrações plasmáticas dos hormônios tireoidianos (HOCH, 1988; FREAKE & OPPENHEIMER, 1995). Guerreiro *et al* em 1998, demonstrou a diminuição na concentração de ácido graxo insaturado nas frações lipídicas de animais hipotireoideos.

O dano oxidativo às proteínas verificado pelo aumento de malondialdeído – lisina indicam valores menores no hipotireoideo, isso se deve, possivelmente, à diminuição da formação de radicais livres e pelo aumento das defesas antioxidantes, como a glutathiona reduzida (PAMPLONA *et al.*, 1999).

As defesas antioxidantes não enzimáticas tais como o ácido úrico, carotenóides e a vitamina E, parecem estar aumentadas nos hipotireoideos (BRAVERMAN & UTIGER, 1996; HENRY, 1999). A concentração de substâncias antioxidantes lipo e hidrossolúveis apresentaram-se maiores nos animais hipotireoideos em relação aos eutireoideos e hipertireoideos (MARZOEV *et al.*, 1985).

A razão glutathiona reduzida (GSH) / glutathiona oxidada (GSSG) está aumentada nos hipotireoideos, bem como a glutathiona reduzida mitocondrial que tem seus níveis mais altos em relação aos animais controle. Essa situação é revertida pela administração de T3, que diminui a razão GSH/GSSG e restaura os valores da glutathiona reduzida mitocondrial aos níveis normais. Esse fato confirma o papel importante dos hormônios da tireóide na regulação do estresse oxidativo mitocondrial (DAS & CHAINY,

2001). Em animais tireoidectomizados, a concentração de GSH hepática apresentou-se mais elevada em relação aos animais controle. Além disso, apresentaram menores níveis de malondialdeído, sugerindo uma redução do estresse oxidativo nos animais hipotireoideos (TEARE *et al.*, 1993).

Há evidências experimentais indicando que a atividade das enzimas detoxificadoras diminui no hipotireoidismo. No entanto, a citocromo P450, em fígados de ratos hipotiroideos, tem sua atividade aumentada, e isso favorece a diminuição do tempo de meia vida de xenobióticos pró-oxidantes, reduzindo a probabilidade de danos oxidativos aos tecidos (VENDITTI *et al.*, 1997).

As enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e glutational peroxidase tiveram suas atividades aumentadas nos fígados de ratos hipotireoideos (VENNDITTI *et al.*, 1997; DAS & CHAINY, 2001). No entanto, a SOD mitocondrial no tecido cardíaco teve reduzida a sua atividade (ASAYAMA, 1987).

Os animais hipotireoideos podem apresentar uma anemia ferropriva, além da diminuição dos níveis de vitamina C (BAVERMAN & UTIGER, 1996). Com a diminuição de ferro e vitamina C a produção das espécies ativas de oxigênio pode diminuir, principalmente o radical hidroxil, que é altamente lesivo ao tecido (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Ratos tireoidectomizados submetidos à isquemia renal apresentaram proteção funcional e histológica contra os danos oxidativos, confirmada pela redução da LPO e aumento do GSH renal comparados com ratos eutiroideos com isquemia renal (PALLER, 1986).

Em suma, as referências encontradas sugerem que o estresse oxidativo pode ser influenciado de acordo com as concentrações séricas dos hormônios tireoideanos.

## **2 - HIPÓTESE**

O hipotireoidismo leva a uma queda da taxa metabólica basal, com a correspondente diminuição da produção das EAO. Com a redução de radicais livres, a probabilidade de dano oxidativo nos lipídios e proteínas deverá ser menor também. Por outro lado, a diminuição da oferta de EAO pode induzir os tecidos ao processo de adaptação, levando-os a minimizar suas defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas.

‘  
-

### **3 .OBJETIVOS**

#### Objetivo Geral

Avaliar o estresse oxidativo cardíaco, hepático e sistêmico de ratos hipotireoideos através de medidas de dano oxidativo e de defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas.

#### Objetivos Específicos

- ⇒ Induzir o hipotireoidismo experimental através da extirpação da glândula tireóide, processo denominado de tireoidectomia, verificando a efetividade deste procedimento através da dosagem dos hormônios tireoidianos e parâmetros biométricos.
- ⇒ Avaliar o efeito do hipotireoidismo na lipoperoxidação cardíaca, hepática e sistêmica.
- ⇒ Quantificar a oxidação de proteínas no plasma sangüíneo dos ratos tireoidectomizados.
- ⇒ Verificar a capacidade antioxidante no homogeneizado cardíaco e hepático e no plasma sangüíneo de ratos tireoidectomizados.

⇒ Medir a atividade das enzimas antioxidantes em homogeneizado cardíaco, hepático e sistêmico de ratos hipotireoideos.

⇒ Determinar a concentração das enzimas antioxidantes em homogeneizado cardíaco, hepático e sistêmico de ratos hipotireoideos.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. ANIMAIS**

Foram utilizados, no trabalho, ratos machos Wistar, com peso médio de  $170 \pm 20$  gramas. Os animais foram provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS, sendo mantidos em caixas plásticas de 270 x 260 x 310 mm, com três ratos cada, com o assoalho recoberto com serragem. Receberam ração e água à vontade e foram mantidos sob períodos de 12 horas na luz / 12 horas no escuro e sob temperatura de 22°C.

### **4.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS**

Foram utilizados dois grupos experimentais, sendo eles:

- Grupo hipotireoideo: animais tireoidectomizados pelo modelo proposto por Bouhnik *et al.* (1975) (n=25).
- Grupo eutireoideo: animais que sofreram apenas a simulação da cirurgia de tireoidectomia (n=25).

Ambos os grupos foram sacrificados após quatro semanas da realização da cirurgia de tireoidectomia e de sua simulação nos controles. Antes do sacrifício dos animais foi coletado sangue para as medidas hormonais.

### 4.3. PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

A indução ao hipotireoidismo nos animais, foi feita seguindo o modelo experimental de tireoidectomia, segundo a técnica de Bouhnik (BOUHNİK *et al.*, 1975). Os animais foram posicionados em decúbito dorsal, tricotomizados e sofreram uma incisão longitudinal abaixo da laringe, de aproximadamente 0,5 cm de comprimento na pele e no tecido subcutâneo. Em seguida, afastou-se a camada muscular, atingindo a glândula tireóide que foi removida completamente (Figura4). Nos animais controle, foi realizada a mesma cirurgia, no entanto não houve a remoção da glândula. Os animais foram anestesiados com quetamina (90mg/Kg de peso corporal) e xilazina (10mg/Kg de peso corporal).

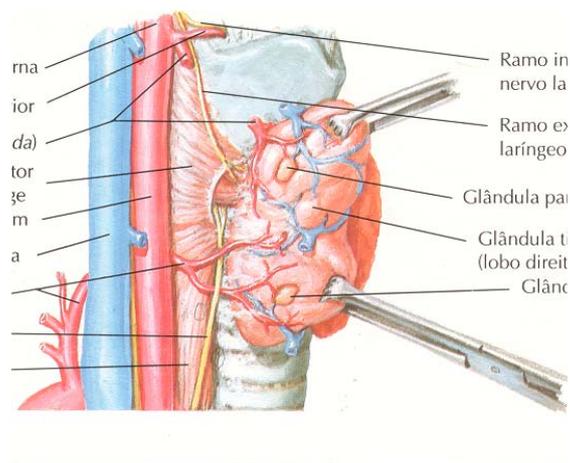
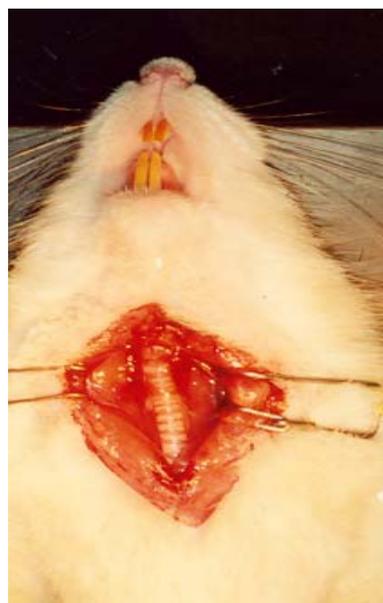


Figura 4. Demonstração do procedimento cirúrgico da tireoidectomia.

#### **4.4. COLETA DE SANGUE**

Realizou-se a coleta de 1,5mL de sangue, através de punção do plexo venoso retro-orbital com um capilar de vidro com uma das extremidades quebrada em bisel (HALPERN, 1951). Para isso, os animais foram previamente anestesiados com quetamina (90mg/Kg de peso corporal) e xilazina (10mg/Kg de peso corporal).

O sangue coletado foi centrifugado por 10 minutos a 1000 x g em centrífuga refrigerada (Sorvall RC 5B – Rotor SM 24), o plasma foi separado e congelado em freezer a -80°C para posteriores de dosagem de hormônios tireoidianos e da capacidade antioxidante total plasma. Os eritrócitos foram lavados com soro fisiológico (NaCl 0,9%) por três vezes e aliquotados.

Para a medida de lipoperoxidação, os eritrócitos foram ressuspensos em soro fisiológico (NaCl 0,9%) e analisados imediatamente. Para a verificação da atividade e concentração das enzimas antioxidantes foi adicionado aos eritrócitos solução de ácido acético 1mM e sulfato de magnésio 4mM, podendo ser armazenados em freezer a -80°C.

#### **4.5. SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E PREPARO DOS HOMOGENEIZADOS**

Os animais foram pesados e sacrificados após transcorridas as 4 semanas da intervenção cirúrgica (tireoidectomia) por deslocamento cervical.

#### **4.5.1 Homogeneizados para LPO e Atividade das Enzimas**

Os corações e os fígados foram rapidamente retirados, pesados e homogeneizados por 30 segundos em Ultra-Turrax, na presença de KCl 1,15% (5mL/g de tecido) e de fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF), na concentração de 100mM em isopropanol (10µL/mL de KCl adicionado). O PMSF é um inibidor de proteases e foi utilizado para que não houvesse degradação das enzimas das quais a atividade foi medida.

Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados por 10 minutos a 1000 x g em centrífuga refrigerada (Sorvall RC 5B-Rotor SM 24) e o sobrenadante foi retirado e congelado em freezer a -80°C para as dosagens posteriores de LPO e atividade das enzimas antioxidantes (LLESUY *et al.*, 1985).

#### **4.5.2. Homogeneizados para o Western Blot**

Parte dos tecidos cardíacos, hepáticos foram rapidamente retirados e homogeneizados por 30 segundos em Ultra-Turrax, na presença do tampão de homogeneização para Western Blot (Tris-HCl 100mM, EDTA 5mM, PMSF 1mM, Aprotinina 5µg/mL). Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados por 20 minutos a 11000 x g em centrífuga refrigerada (Sorvall RC 5B-Rotor SM 24) e o sobrenadante foi retirado e congelado em freezer a -80°C.

#### 4.6. DOSAGEM HORMONAL

O método utilizado para dosar os hormônios T3 e T4 foi de quimiluminescência por imunoensaio competitivo. O aparelho utilizado para esta medida foi o IMMULITE 2000, com os seguintes reagentes: substrato quimiluminescente dioxietano (LSUBM), reagente T4 total Wedge (LT42) e reagente T3 total (LT32), que são constituídos pela combinação dos hormônios tireoidianos com fosfatase alcalina, e esferas recobertas com um anticorpo altamente específico para os hormônios. O método se baseia na competição pelo anticorpo específico para hormônios tireoidianos, das moléculas da amostra analisada com as moléculas do T3 ou T4 ligadas a fosfatase alcalina.

Inicialmente, a amostra sangüínea foi incubada com o reagente T3 ou T4 Wedge. Após o término desta incubação, fez-se a lavagem dos vias para remover o restante das moléculas não ligadas ao anticorpo. Imediatamente, adicionou-se o substrato quimiluminescente dioxietano que reage com a fosfatase alcalina presente no meio, emitindo energia quimiluminescente.

A concentração de locais de ligação, ou seja, a quantidade de anticorpos, é fixa e limitante. Por essa razão, o aumento progressivo do número de moléculas de T3 ou T4 da amostra vai deslocar do anticorpo as moléculas do reagente T3 ou T4 Wedge, levando à diminuição da quimiluminescência. Esse decaimento de energia se deve a menor concentração de fosfatase alcalina no meio.

A quantidade absoluta de hormônio na amostra é calculada através de curva padrão. Esta curva é obtida pela incubação de quantidades variadas de hormônio autêntico com quantidades idênticas de anticorpos e de hormônio marcado. Os níveis plasmáticos de T3 e T4 foram avaliados ao término de quatro semanas pós-cirurgia de tireoidectomia. Os resultados são expressos em ng por mL de plasma (FERREIRA & ÁVILA,2001; ROITT *et al.*,1997). As análises foram realizadas pelo Laboratório Weimann.

#### 4.7. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

As proteínas foram quantificadas pelo método descrito por Lowry e colaboradores, que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1mg/mL (LOWRY *et al.*, 1951). Para a realização das dosagens foram utilizados os seguintes reagentes:

- 1) Reativo de Folin Ciocalta diluído em água destilada na proporção de 1:3;
- 2) Reativo C, que é composto por 50mL do reativo A, 0,5mL do reativo B1 e 0,5mL do reativo B2, onde os reativos A, B1 e B2 são respectivamente:
  - ⇒  $\text{NaHCO}_3$  (bicarbonato de sódio) 2% em NaOH (hidróxido de sódio) 0,1N;
  - ⇒  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (sulfato de cobre) 1%;
  - ⇒  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (tartarato de sódio e potássio) 2%.

Em tubos de ensaio, foram adicionados 20 $\mu\text{L}$  da amostra (homogeneizado de tecido ou de sangue) em 0,8mL de água destilada e

2mL de reativo C preparado a fresco, aguardando-se 10 minutos. Depois, adicionava-se 0,2mL do reativo de Folin Ciocalta, aguardando-se mais 30 minutos. Após isso, a solução adquiria uma coloração azulada que era medida a 625nm em espectrofotômetro marca Varian modelo Cary.

O cálculo foi feito utilizando-se um fator de correção médio calculado a partir da solução padrão de albumina bovina e os resultados expressos em miligrama (mg) por mililitros (mL).

#### **4.8. DOSAGEM DE HEMOGLOBINA**

A hemoglobina foi dosada nas amostras de sangue preparadas para a medida de lipoperoxidação, ou seja, eritrócito diluído em soro fisiológico. Esta análise foi feita utilizando-se uma mistura de cianetos para se obter o reativo de Drabkin, este reativo reage com a hemoglobina formando cianometahemoglobina, que foi medida, em espectrofotômetro marca Varian modelo Cary, a 546 nm e os resultados expressos em miligrama (mg) por mililitros (mL).

##### **SOLUÇÃO DE DRABKIN:**

⇒ 0,85mL de KCN 9mM

⇒ 6,6mL de K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 0,9mM

⇒ q.s.p. 10mL de água destilada

#### 4.9. SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBA-RS)

Esta técnica é bastante utilizada para medir a lipoperoxidação, pois o ácido tiobarbitúrico reage com os produtos da lipoperoxidação, dentre os quais está o malondialdeído e outros aldeídos.

A técnica consiste em aquecer o material biológico a ser testado na presença de ácido tiobarbitúrico em meio ácido, para medir espectrofotometricamente a formação de um composto corado (base de Schiff). Para que ocorra a reação, adicionou-se à 0,25mL de homogeneizado 0,5mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% (P/V) (que tem a função de desnaturar as proteínas presentes e acidificar o meio de reação) e 0,75mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% (P/V), que reage com os produtos da lipoperoxidação formando um composto de coloração rosada. A mistura foi, então, incubada por 15 minutos a 100°C e em seguida resfriada no gelo. Subseqüente a isso, foram adicionados 1,5mL de n-butanol e agitados os tubos vigorosamente, em agitador de tubos por 40 segundos, com o objetivo de extrair o pigmento formado. O material foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos, sendo então utilizado o sobrenadante (fase com o n-butanol), para a leitura da absorbância a 535nm.

Os resultados são expressos em  $\mu$ moles de TBA-RS por mg de proteína a partir da curva padrão com tetrametoxipropano (BUEGE & AUST, 1978).

#### 4.10. QUIMILUMINESCÊNCIA

O método consiste na adição de um hidroperóxido orgânico de origem sintética ao homogeneizado de tecido, para avaliação da capacidade de resposta produzida pela amostra. A realização deste tipo de teste consiste no fato de que os hidroperóxidos são espécies químicas bastante instáveis, reagindo com lipídios por um mecanismo radicalar que gera produtos que emitem luz pela amostra em estudo. Este método é um dos mais sensíveis para a medida de LPO. A QL foi medida em um contador beta (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer-1215; LKB Produkter AB, Brommma, Sweden) com o circuito de coincidência desconectado e utilizando o canal de trítio. As determinações foram realizadas em sala escura, com frascos de vidro mantidos na penumbra, afim de evitar a ativação da fosforescência pela luz fluorescente. O meio de reação no qual foi realizado o ensaio consistiu em 3,5mL de uma solução reguladora (KCl 140mM e fosfatos 20mM) em pH 7,4, na qual foi adicionado 0,5mL de homogeneizado. Já para a amostra de sangue utilizou-se 4mL do mesmo tampão e 10 $\mu$ L do preparado de eritrócitos (conforme explicado no item 3.4). Após, foi realizada uma leitura inicial, considerando a emissão de luz basal pelo homogeneizado. O hidroperóxido orgânico utilizado foi o hidroperóxido de terc-butila a 400mM, sendo adicionados 30 $\mu$ L no meio de reação, para uma concentração final de 3mM. Foi medida a emissão de luz e, desta, foi descontada a emissão basal para fins de cálculos. Os resultados foram expressos em contagens por segundo (cps) por miligrama (mg) de proteína,

para o homogeneizado, e cps por miligrama de hemoglobina, para as amostras de sangue (GONZALEZ FLECHA *et al.*, 1991).

#### 4.11. DOSAGEM DE CARBONILAS

O ensaio para detecção das carbonilas é uma das técnicas utilizadas para a determinação de proteínas modificadas oxidativamente (REZNICK & PACKER, 1994). A técnica se baseia na reação das proteínas oxidadas do plasma sangüíneo com 2,4 dinitro fenil hidrazina (DNPH) em meio ácido, seguido de sucessivas lavagens com ácidos e solventes orgânicos e incubação final com guanidina. Desta forma, a absorbância das carbonilas foi medida em um espectrofotômetro da marca Varian, modelo Cary a 360nm, num meio de reação contendo os seguintes reagentes:

- ⇒ Guanidina (6M) em HCl (2,5M) pH= 2,5
- ⇒ 2,4 dinitro fenil hidrazina (DNPH)em HCl (2,5M)
- ⇒ TCA 20%
- ⇒ TCA 10%
- ⇒ Etanol - acetato de etila 1:1 (V/V)

Paralelamente foi realizada a curva padrão de proteína, com albumina, com a absorbância lida em 280nm no espectrofotômetro da marca Varian, modelo Cary. Os resultados foram expressos em nmoles por mg de proteína.

#### 4.12. CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (TRAP)

A técnica utilizada para medir a capacidade antioxidante total é baseada na formação de um radical que emite luz, e que vai ser detectado em um contador beta (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer-1215; LKB Produkter AB, Brommma, Sweden) com o circuito de coincidência desconectado e utilizando o canal de trítio, como descrito por Lissi e colaboradores em 1992. As determinações foram realizadas em sala escura, em frascos de vidro mantidos na penumbra para evitar a fosforescência ativada pela luz fluorescente.

Esta técnica é dependente da temperatura. Em baixas temperaturas é muito mais lenta. Isto porque esta técnica é baseada na decomposição do 2,2' Azo-bis (2-amidino-propano) diidrocloreto que gera radicais livres. Esta substância tem uma ligação dupla entre dois nitrogênios, bastante instável e que com o aumento da temperatura há termólise, gerando dois radicais livres.

Estes radicais livres por sua vez vão reagir com o luminol e gerar um outro radical livre mais energético e com maior emissão de luz e, assim, mais facilmente detectado pelo contador. No entanto se tivermos presente no meio de reação um antioxidante, ele irá neutralizar os radicais livres e assim diminuir a emissão de luz. Como padrão utiliza-se o antioxidante trolox (vitamina E hidrossolúvel) que forma um radical estável. Quando todo o antioxidante tiver reagido, o luminol reage novamente com o Azo radical e, novamente, há um aumento na emissão de luz.

Para medir a capacidade antioxidante da amostra, coloca-se a amostra no vial contendo Azo e luminol e observa-se por quanto tempo esta amostra inibe a formação dos radicais do luminol (tempo de indução). Esta análise foi feita utilizando-se os seguintes reagentes:

- ⇒ Tampão fosfato 50mM, pH 7,4;
- ⇒ 2,2' Azo-bis (2-amidino-propano) diidrocloreto 0,5% em tampão fosfato;
- ⇒ Luminol 1mg/mL em NaOH 0,1N;
- ⇒ Trolox 319  $\mu$ M em tampão fosfato.

O meio de reação no qual foi realizado o ensaio consistiu em 3,0mL de uma solução de Azo, na qual foi adicionado 10 $\mu$ L de luminol e fez-se uma leitura que tem que ser maior que 50000. Após adicionava-se amostra (50 $\mu$ L de plasma ou 5 $\mu$ L de homogeneizado de fígado ou 10 $\mu$ L de homogeneizado de coração). Foram feitas também duas leituras utilizando-se trolox nas quantidades de 5 $\mu$ L e 10 $\mu$ L, para fazer a curva padrão, sendo os resultados expressos em milimolar (mM) de Trolox (LISSI, 1992; EVELSON, 2001).

#### **4.13. CATALASE**

A atividade da enzima catalase é diretamente proporcional à taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio, obedecendo a uma cinética de pseudo-primeira ordem. Sendo assim, a atividade da catalase pode ser medida através da avaliação do consumo do peróxido de hidrogênio. O

método consiste em avaliar a diminuição da absorbância no comprimento de onda de 240 nm, sendo este o comprimento de onda onde há maior absorção do peróxido de hidrogênio. Para realização deste ensaio foram utilizados os seguintes reagentes:

- ⇒ Solução tampão constituída de fosfatos a 50mM e pH 7,4;
- ⇒ Peróxido de hidrogênio 0,3M.

Em cubeta de quartzo, foram adicionados 955 $\mu$ L do tampão fosfato e 10 $\mu$ L de amostra do tecido ou 30 $\mu$ L de amostra de sangue, esta cubeta foi colocada em espectrofotômetro e descontada contra um branco de tampão fosfato. Feito isso, foram adicionados 35 $\mu$ L do peróxido de hidrogênio para o tecido e 15 $\mu$ L para amostra de sangue e se observou a diminuição da absorbância no comprimento de onda selecionado. Os resultados foram expressos em pmoles por mg de proteína (AEBI, 1984).

#### **4.14. SUPERÓXIDO DISMUTASE**

A superóxido dismutase (SOD) catalisa a dismutação do ânion radical superóxido em peróxido de hidrogênio. A técnica, utilizada neste estudo, para medir sua atividade, baseia-se na capacidade de inibição da autooxidação do pirogalol pela SOD. Portanto, quanto maior a concentração de SOD na amostra, menor a autooxidação do pirogalol. Utilizou-se uma solução tampão (Tris-base na concentração de 50 mM; EDTA a 1mM, e HCl

para atingir o pH 8,2), pirogalol 24mM (em ácido clorídrico a 10mM) e catalase a 30 $\mu$ M. Para que os valores de inibição, dados em percentagem, fossem transformados em unidade de SOD, necessitou-se de um fator de calibração. Por isso, fez-se necessário a construção de uma curva padrão com uma solução de SOD de concentração conhecida. Desta forma, calculou-se o fator de calibração necessário para converter a percentagem de inibição da autooxidação em unidades de enzima. No ensaio, adicionou-se à cubeta 988 $\mu$ L de tampão Tris-base, 4 $\mu$ L de catalase. Zerou-se o espectrofotômetro a 420nm e adicionou-se 8 $\mu$ L de pirogalol, observando-se a autooxidação do mesmo. Desta forma, obtivemos o máximo (100%) de oxidação desta substância, para calcular a percentagem de inibição causada pela SOD da amostra. Com a amostra, procedeu-se da mesma forma, apenas com o ajuste do volume de tampão de acordo com a quantidade de amostra adicionada, para se ter um volume final de 1mL (MARKLUND, 1985).

#### **4.15. GLUTATIONA PEROXIDASE**

A enzima glutatona peroxidase (GPx) catalisa a reação de hidroperóxidos com a glutatona reduzida (GSH), formando glutatona oxidada (GSSG) e o produto da redução do hidroperóxido. A sua atividade pode ser determinada medindo-se o consumo de NADPH na reação de redução da GSSG à GSH.

A amostra era previamente preparada adicionando-se uma mistura de cianetos para inibir a atividade pseudo-peroxidativa da hemoglobina, transformando-a em cianometahemoglobina. Desta forma, a atividade da GPx foi medida em um espectrofotômetro da marca Varian, modelo Cary. Foi observada diminuição de absorbância do NADPH a 340nm, num meio de reação contendo os seguintes reagentes:

- ⇒ Solução tampão de fosfatos 140mM e EDTA 1mM, com pH 7,5;
- ⇒ NADPH 0,24mM;
- ⇒ Azida sódica 1mM, utilizada para inibir a atividade da catalase;
- ⇒ GSH 5mM;
- ⇒ Glutathione redutase (GR) 0,25U/mL;
- ⇒ Hidroperóxido de terc-butyl 0,5mM.

Na cubeta do espectrofotômetro, foram adicionados 330 $\mu$ L de tampão, 50 $\mu$ L de amostra (homogeneizado de tecido ou sangue), 500 $\mu$ L de NADPH, 10 $\mu$ L de azida sódica, 50 $\mu$ L de GSH e 10 $\mu$ L de GR. A absorbância foi registrada por um período de aproximadamente 3 minutos, até ocorrer uma certa estabilização da linha base. Depois, foram adicionados 50 $\mu$ L de hidroperóxido de tert-butyl e observou-se a diminuição da absorbância devido ao consumo de NADPH, por aproximadamente 5 minutos. Os resultados foram expressos em nmoles por minuto por mg de proteína (FLOHÉ & GUNZLER, 1984).

#### 4.16. GLUTATIONA -S- TRANSFERASE

A glutationa-S-transferase (GST) é uma enzima que catalisa a reação de combinação da glutationa reduzida (GSH) com outras substâncias tóxicas, que possam vir a prejudicar o funcionamento celular. Essa combinação forma os conjugados de glutationa que serão exportados para fora do meio interno da célula. Deste modo, esta enzima desempenha um papel importante na detoxificação celular.

Este ensaio está baseado na capacidade da GST de combinar o 1-cloro-2,4-dinitro-benzeno (CDNB) com a GSH formando 2,4-dinitro-fenil-glutationa (DNP-SG). A formação do DNP-SG pode ser observada espectrofotometricamente no comprimento de onda de 340 nm, utilizando os seguintes reagentes:

- ⇒ Tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 6,5;
- ⇒ GSH 20 mM;
- ⇒ CDNB 20 mM

Na cubeta de 1 mL foram adicionados 850  $\mu$ L de tampão, 50  $\mu$ L de homogeneizado de tecido, mais 50  $\mu$ L de GSH (de concentração final de 1mM), zerou-se o espectrofotômetro a 340 nm, e, por fim, adicionou 50  $\mu$ L de CDNB e observou-se a formação do DNP-SG. O resultado é dado em  $\mu$ mol por mg de proteína (MANNERVIK & GLUTHENBERG, 1981).

#### 4.17. WESTERN BLOT

As amostras homogeneizadas foram diluídas (1:4) em tampão para amostra (Tampão Laemmli) e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio 15% (SDS-PAGE), seguida da transferência para a membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, Richmond-CA-USA) e bloqueadas para imunodeteção.

As membranas com as proteínas transferidas foram incubadas por 16 horas a 4 °C com o primeiro anticorpo para SOD (Anti Cu/Zn SOD sheep polyclonal IgG) ou para GST (anti GST rabbit polyclonal IgG) na diluição 1:1000 (primeiro anticorpo) em tampão de lavagem (NET).

A seguir, foram lavadas por cinco vezes com NET, e incubadas com o segundo anticorpo para SOD (rabbit anti-sheep IgG HRP conjugate) ou para GST (goat anti rabbit IgG, HRP) na diluição de 1:10000 em NET.

A reação de quimiluminescência ocorreu através do uso do sistema de detecção Kit-ECL (Amersham, IL, USA) e expondo as membranas ao filme radiográfico Kodak Omat por quatro minutos.

A autorradiografia gerada foi analisada por meio do densitômetro, para determinar a concentração das enzimas antioxidantes Cu/Zn SOD e GST. O peso molecular das proteínas estudadas foi verificado através da utilização do marcador padrão de peso molecular ( RPN 800 rainbow-Full range-Bio-rad, Richmond-CA-USA).

#### Reagentes:

- ⇒ Tampão para amostra (Glicerina 30%, Tris-HCl 0,5 M; SDS 10%; 2-mercaptoetanol; Azul de bromofenol 0,05%).
- ⇒ Gel de poliacrilamida (15%).
- ⇒ Tampão de corrida de eletroforese (Glicina 192 mM; Tris 25 mM; SDS 0,1%; pH=8,3).
- ⇒ Tampão de transferência (Glicina 192 mM; Tris 25 mM; Metanol 10%; pH=8,3).
- ⇒ Tampão para lavagem da membrana – NET (NaCl 150 mM; EDTA 5mM; Tris 50mM; Triton 0,05%; Gelatina 0,25%; pH 7,4)
- ⇒ Solução para bloqueio da membrana (5% de leite em pó em NET).

#### **4.18. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Após efetuados todos os testes, foram calculadas as médias e os desvios padrões para cada uma das medidas realizadas e para cada um dos grupos estudados. Para a análise estatística dos dados, foi realizado o teste t de Student, sendo as diferenças consideradas significativas para  $p < 0,05$  (nível de significância de, pelo menos, 5%). A análise estatística foi efetuada com o auxílio do programa computacional Graph Pad.

## 5. RESULTADOS

Os resultados apresentados neste trabalho são relativos à média  $\pm$  desvio padrão da média de cada parâmetro avaliado nos distintos grupos experimentais.

Realizou-se a quantificação dos hormônios que indicam a funcionalidade da tireóide (T3 e T4) no plasma sanguíneo, além da variação do peso corporal dos animais.

No coração e no fígado, foram determinados a lipoperoxidação, através da medida do TBA-RS e da Quimiluminescência, juntamente com as defesas antioxidantes enzimáticas (atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase e glutathione-S-transferase) e não enzimáticas avaliadas pela capacidade antioxidante total (TRAP). A concentração da superóxido dismutase e da glutathione-S-transferase foram medidas nestes tecidos através da técnica de Western Blot.

No sangue, a lipoperoxidação foi quantificada somente através da Quimiluminescência. O dano às proteínas foi avaliado pela dosagem das carbonilas. As defesas antioxidantes foram verificadas pela determinação da atividade das enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase) além da avaliação da capacidade antioxidante total (TRAP) não enzimática. A concentração da superóxido dismutase e da glutathione-S-transferase foram medidas nos eritrócitos através da técnica de Western Blot. A medida da atividade da glutathione -S- transferase não foi

possível de ser realizada por dificuldades de padronização da técnica para as amostras de sangue.

### 5.1. RESULTADO DA MEDIDA DE HORMÔNIOS DA TIREÓIDE

Houve diferença significativa entre os grupos hipotireoideo e eutireoideo ( $p < 0,05$ ), nas medidas de hormônios tireoidianos. Os resultados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Medida dos níveis plasmáticos de T3 e T4 nos grupos experimentais.

GRUPOS	T3 (ng/mL)	(n)	T4 (ng/mL)	(n)
Eutireoideo	0,67 ± 0,07	(16)	57,2 ± 2,18	(16)
Hipotireoideo	0,10 ± 0,02 *	(18)	8,2 ± 1,4 *	(18)

Valores representam média ± desvio padrão. \* diferença significativa do grupo hipotireoideo em relação ao grupo eutireoideo ( $p < 0,05$ ).

### 5.2. MEDIDA DO PESO CORPORAL DOS ANIMAIS

Foi feita a medida do peso corporal dos animais antes e após as cirurgias. O ganho de peso dos animais do grupo eutireoideo foi maior do que dos animais hipotireoideos ( $p < 0,05$ ). Os resultados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Medida do ganho de peso corporal (em gramas) dos animais durante quatro semanas.

GRUPOS	g/semana	(n)
Eutireoideo	16,7 ± 4,1	(10)
Hipotireoideo	4,7 ± 1,2 *	(12)

Valores representam média ± desvio padrão. \* diferença significativa do grupo hipotireoideo em relação ao grupo eutireoideo ( $p < 0,05$ )

### 5.3. RESULTADOS DAS MEDIDAS NO CORAÇÃO

#### 5.3.1. Biometria do Coração

O peso dos corações dos animais do grupo eutireoideo foi maior do que dos animais hipotireoideos, bem como a relação peso do coração pela massa corporal ( $p < 0,05$ ). Os resultados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Peso absoluto do coração (em gramas) e relativo ao peso corporal (em gramas) nos grupos experimentais.

GRUPOS	Coração (g)	(n)	coração/corpo $\times 10^3$	(n)
Eutireoideo	0,79 ± 0,07	(10)	3,0 ± 0,1	(10)
Hipotireoideo	0,45 ± 0,05 *	(12)	2,5 ± 0,3 *	(10)

Valores representam média ± desvio padrão. \* diferença significativa do grupo hipotireoideo em relação ao grupo eutireoideo ( $p < 0,05$ )

### 5.3.2. TBA-RS

A lipoperoxidação medida através da técnica do TBA-RS, em homogeneizado cardíaco, apresentou-se menor no grupo hipotireoideo em relação ao grupo eutireoideo. Os resultados são apresentados na Figura 5.

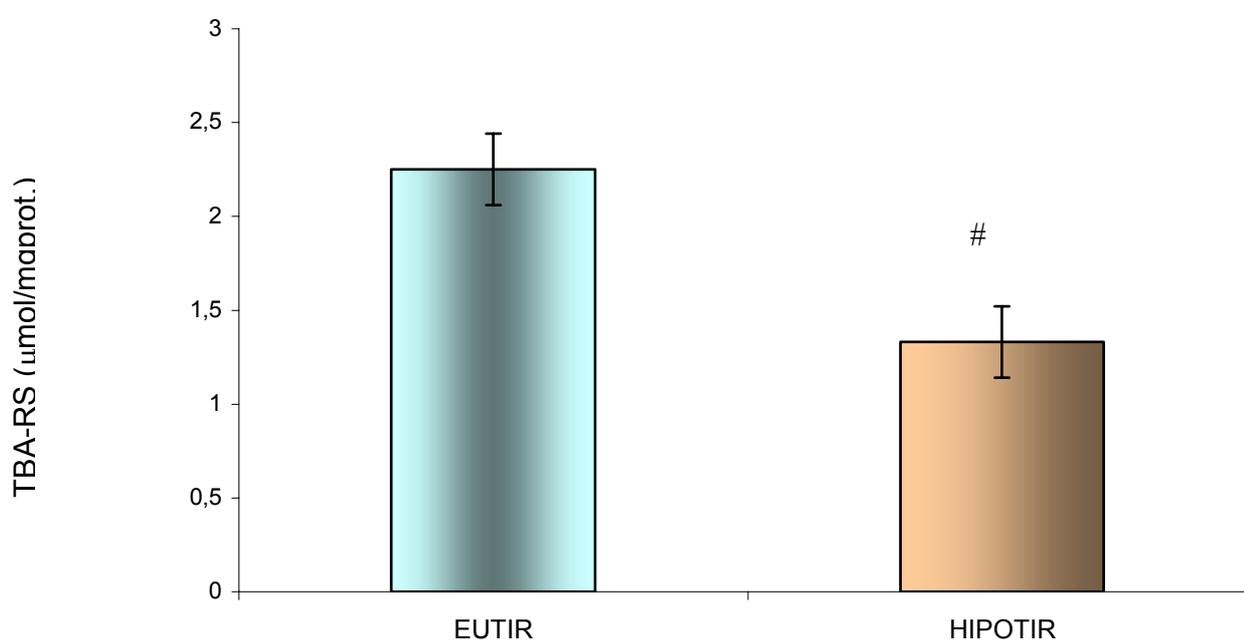


Figura 5. Medida dos níveis de lipoperoxidação no coração, obtidos através da técnica de TBA-RS (μmol/mgprot).

Valores representam média ± desvio padrão de 17 animais. # diferença significativa em relação ao grupo eutireoideo (p<0,05).

### 5.3.3 - QUIMILUMINESCÊNCIA

A LPO medida através da quimiluminescência, no homogeneizado cardíaco, mostrou-se significativamente menor nos animais hipotireoideos em relação aos eutireoideos ( $p < 0,05$ ). Os resultados são apresentados na Figura 6.

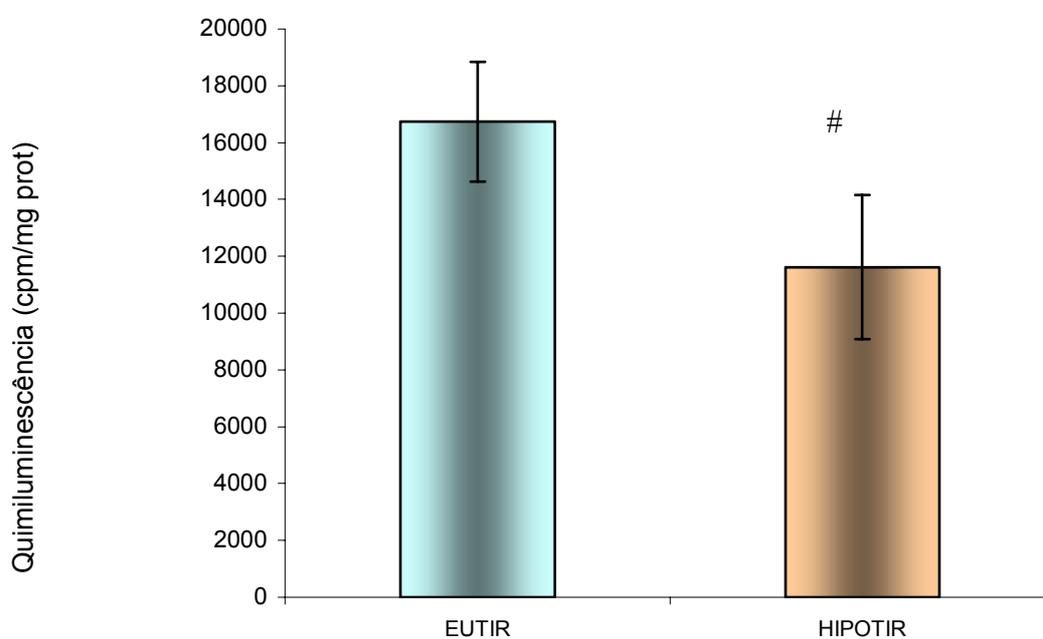


Figura 6. Medida dos níveis de lipoperoxidação por quimiluminescência (cpm/mgprot) em homogeneizado cardíaco.

Valores representam média  $\pm$  desvio padrão de 17 animais. # diferença significativa em relação ao grupo eutireoideo ( $p < 0,05$ ).

### 5.3.4 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (TRAP)

A capacidade antioxidante total, no homogeneizado cardíaco, apresentou-se reduzida nos animais hipotireoideos em relação aos eutireoideos. Os resultados são apresentados na Figura 7.

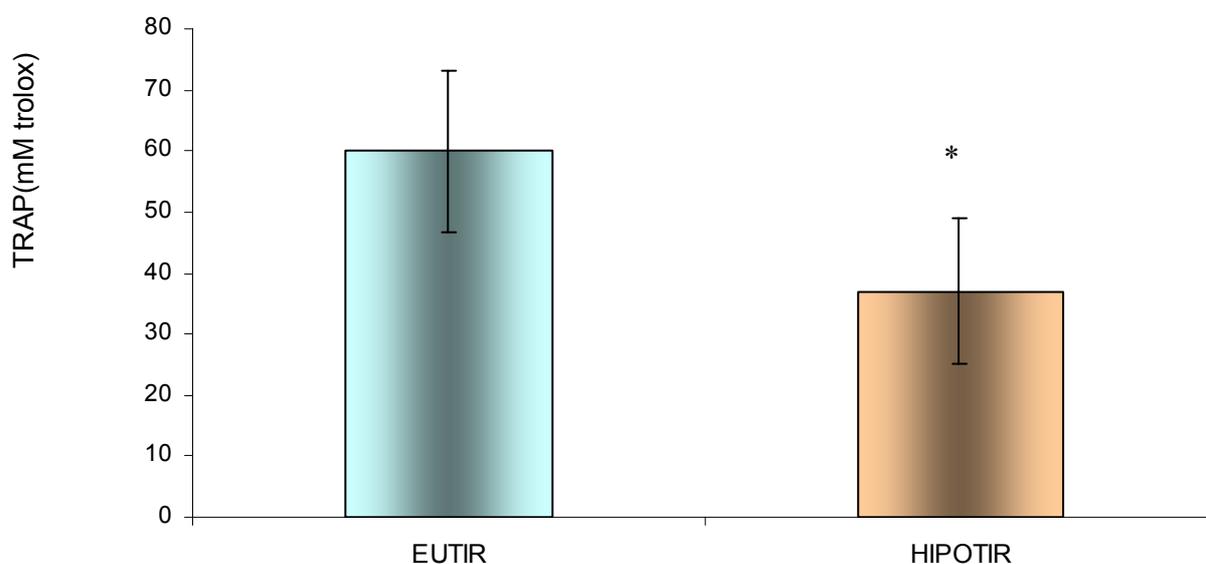


Figura 7. Medida capacidade antioxidante total (mM trolox) em homogeneizado cardíaco.

Valores representam média  $\pm$  desvio padrão de 10 animais. \* diferença significativa em relação ao grupo eutireoideo ( $p < 0,05$ ).

### 5.3.5. ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Avaliou-se a atividade das enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase, glutaciona peroxidase e glutaciona-S-transferase) em homogeneizado cardíaco, observando diminuição significativa destas no grupo hipotireoideo em relação ao grupo eutireoideo ( $p < 0,05$ ). Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Medida atividade das enzimas antioxidantes em homogeneizado cardíaco.

Enzimas	Eutireoideo	Hipotireoideo
Catalase ( <i>pmol/mg prot</i> )	635,00 ± 60	535,00 ± 64 *
Superóxido Dismutase ( <i>U/mg prot</i> )	6,48 ± 0,7	4,51 ± 0,8 *
Glutaciona Peroxidase ( <i>nmol/mg prot</i> )	46,60 ± 7,8	34,80 ± 5,0 *
Glutaciona-S-Transferase ( <i>nmol/mg prot</i> )	0,024 ± 0,003	0,013 ± 0,004*

Valores representam média ± desvio padrão de 17 animais. \* diferença significativa em relação ao grupo eutireoideo ( $p < 0,05$ ).

### 5.3.6. CONCENTRAÇÃO DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

A concentração da superóxido dismutase (Cu/Zn-SOD) medida em homogeneizado cardíaco, entre os grupos experimentais apresentou diferença significativa. Os resultados são apresentados na Figura 8.

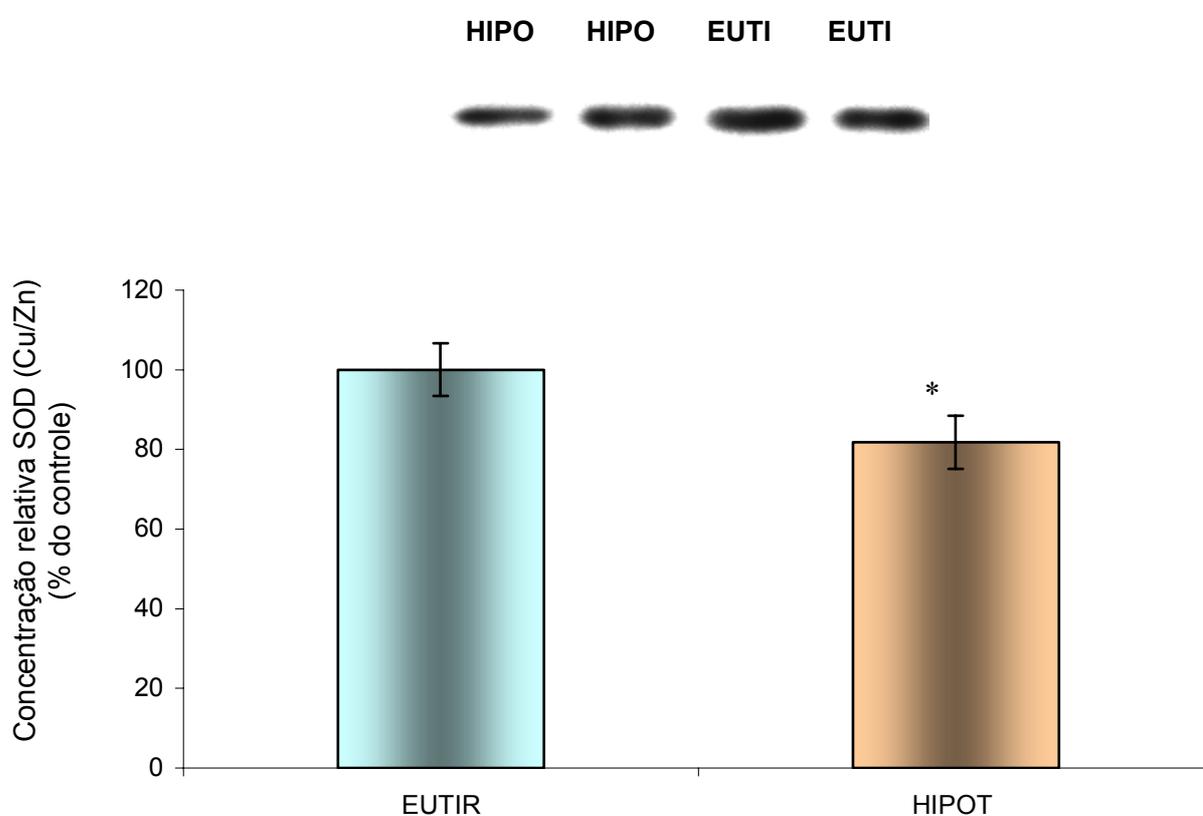


Figura 8. Medida da concentração da enzima superóxido dismutase (em valor de percentagem do controle) em homogeneizado cardíaco

Valores representam média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos, expressos em relação a percentagem do controle (100% ou 49969 pixes). \* diferença significativa em relação ao grupo eutireoideo ( $p < 0,05$ ).

A concentração da glutathione S transferase (GST), no homogeneizado cardíaco, apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ). O grupo hipotireoideo apresentou valores menores do que os eutireoideos. Os resultados são apresentados na Figura 9.

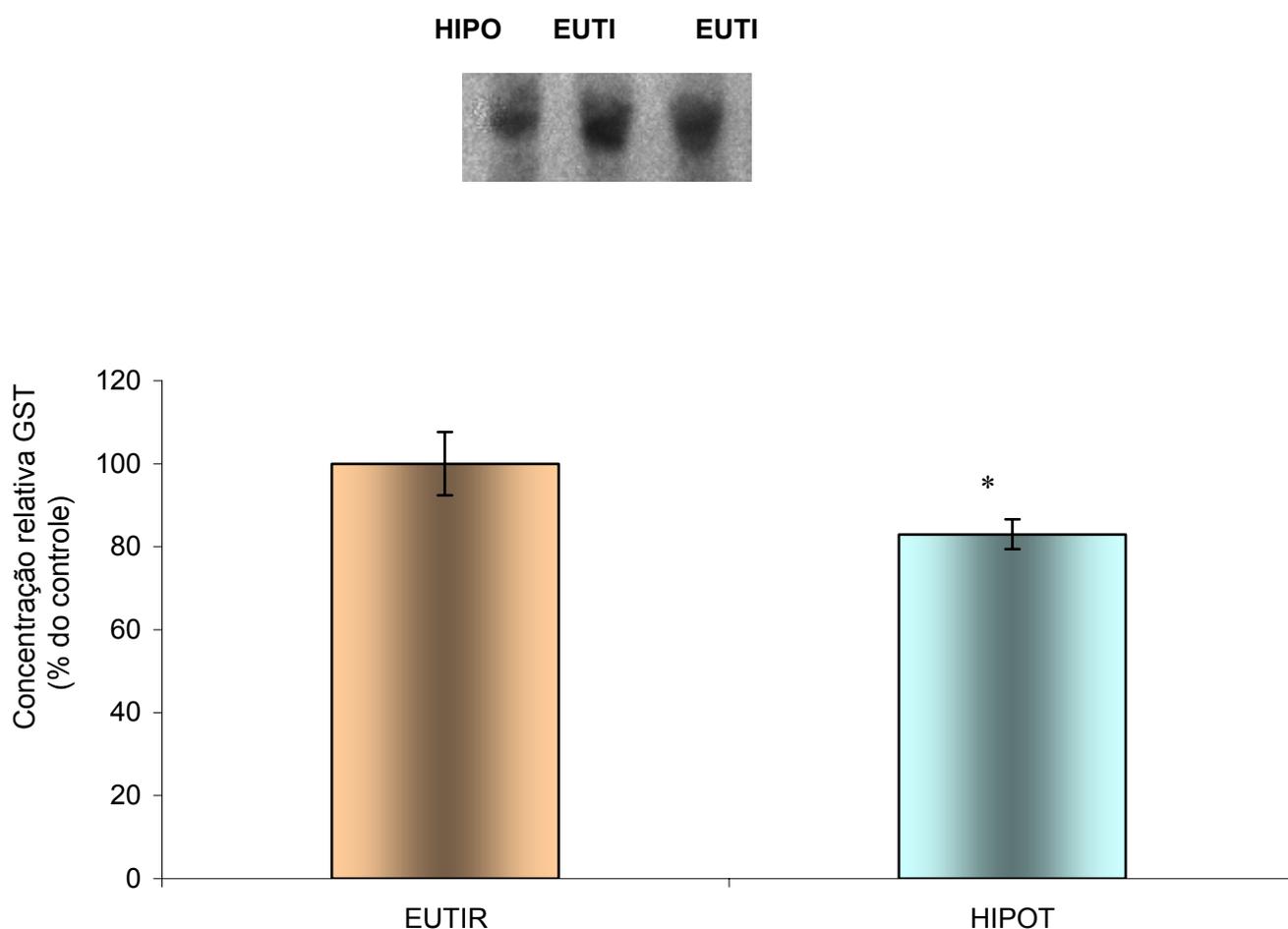


Figura 9. Medida concentração da enzima glutathione S transferase (em valor de percentagem do controle) em homogeneizado cardíaco.

Valores representam média  $\pm$  desvio padrão de 2 experimentos, expressos em relação a percentagem do controle (100% ou 22737 pixes). \* diferença significativa em relação ao grupo eutireoideo ( $p < 0,05$ ).

## 5.4. RESULTADOS DAS MEDIDAS NO FÍGADO

### 5.4.1. TBA-RS

A lipoperoxidação medida através da técnica do TBA-RS, em homogeneizado hepático, não apresentou diferença significativa no grupo hipotireoideo em relação ao grupo eutireoideo ( $p>0,05$ ). Os resultados são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Medida dos níveis de lipoperoxidação hepática obtidos através da técnica de TBA-RS ( $\mu\text{mol/mg prot}$ ).

GRUPO	( $\mu\text{mol/mg prot}$ )	(n)
Eutireoideo	$3,14 \pm 0,71$	(19)
Hipotireoideo	$3,34 \pm 0,38$	(19)

Valores representam média  $\pm$  desvio padrão. Não houve diferença significativa do grupo hipotireoideo em relação ao eutireoideo ( $p>0,05$ ).

#### 5.4.2 QUIMILUMINESCÊNCIA

A LPO medida através da quimiluminescência, no homogeneizado hepático, não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os grupos hipotireoideos em relação eutireoideos. Os resultados são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Medida dos níveis de lipoperoxidação no fígado obtidos através de quimiluminescência (cpm/mg prot).

GRUPO	(cpm/mg prot)	(n)
Eutireoideo	6504 ± 2142	(16)
Hipotireoideo	6116 ± 2107	(19)

Valores representam média ± desvio padrão. Não houve diferença significativa do grupo controle em relação ao hipotireoideo ( $p > 0,05$ )

### 5.4.3 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (TRAP)

A capacidade antioxidante total, no homogeneizado hepático, não apresentou diferença significativa ( $p>0,05$ ) nos grupos hipotireoideo em relação eutireoideo. Os resultados são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7.. Medida capacidade antioxidante total (mM de trolox) em homogeneizado hepático.

GRUPO	TRAP (mM de trolox )	(n)
Eutireoideo	216 ± 30,9	(9)
Hipotireoideo	206 ± 30,3	(9)

Valores representam média ± desvio padrão. Não houve diferença significativa do grupo controle em relação ao hipotireoideo ( $p> 0,05$ )

#### 5.4.4. ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Avaliou-se a atividade das enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase, glutatona peroxidase e glutatona-S-transferase) em homogeneizado hepático. Não houve diferença significativa na atividade enzimática do grupo hipotireoideo em relação ao grupo eutireoideo. Com exceção da catalase cuja atividade esteve significativamente diminuída no grupo hipotireoideo ( $p > 0,05$ ). Os resultados estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 8. Medida atividade das enzimas antioxidantes em homogeneizado hepático.

Enzimas		Eutireoideo	Hipotireoideo
Catalase		8464 ± 1708	6240 ± 917*
<i>(pmol/mg prot)</i>			
Superóxido	Dismutase	7,02 ± 1,18	6,58 ± 1,05
<i>(U/mg prot)</i>			
Glutaciona	Peroxidase	93,8 ± 37,3	86,5 ± 14,3
<i>(nmol/mg prot)</i>			
Glutaciona-S-Transferase		0,0346 ± 0,003	0,0348 ± 0,004
<i>(nmol/mg prot)</i>			

Valores representam média ± desvio padrão de 16 animais. \* diferença significativa em relação ao grupo eutireoideo ( $p < 0,05$ ).

#### 5.4.5 CONCENTRAÇÃO DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

A concentração da superóxido dismutase (SOD Cu/Zn) medida em homogeneizados hepáticos, não apresentou diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p > 0,05$ ). Os resultados são apresentados na Figura 9.

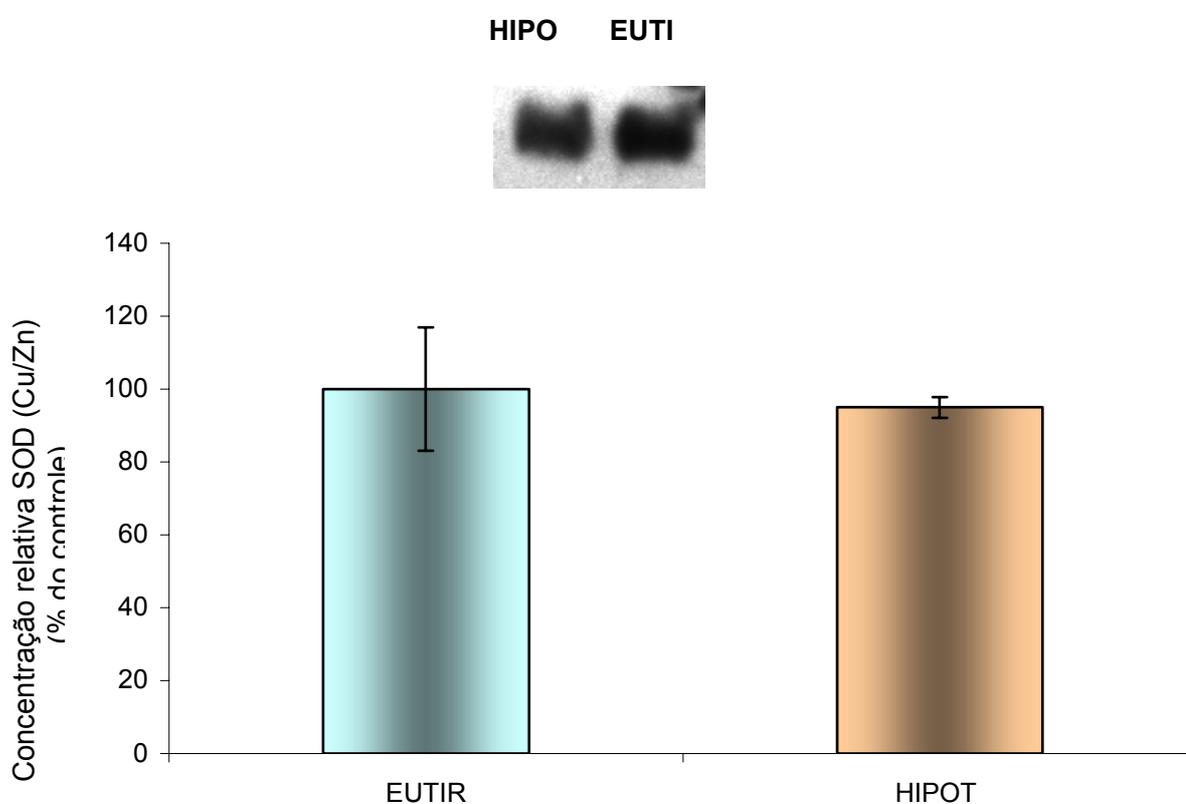


Figura 9. Medida da concentração da enzima superóxido dismutase (em valor de percentagem do controle) em homogeneizado hepático.

Valores representam média  $\pm$  desvio padrão de 2 experimentos, expressos em relação a percentagem do controle (100% ou 116887 pixes). Não houve diferença significativa em relação ao grupo eutireoideo ( $p > 0,05$ ).

A concentração da glutathiona S transferase (GST), no homogeneizado hepático, não apresentou diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre os grupos experimentais. Os resultados são apresentados na Figura 10.

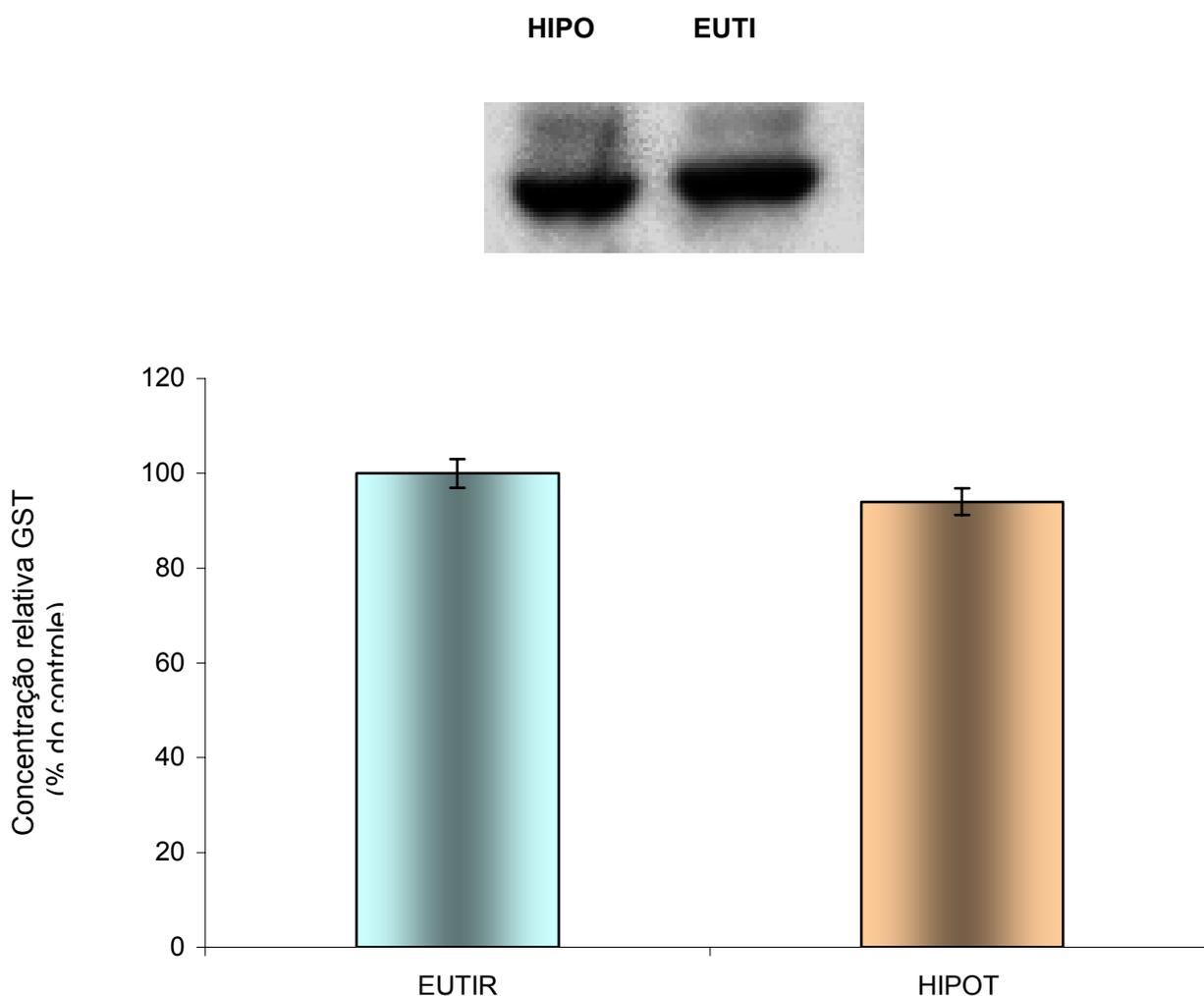


Figura 10. Medida concentração da enzima glutathiona S transferase (em valor de percentagem do controle) em homogeneizado hepático.

Valores representam média  $\pm$  desvio padrão de 2 experimentos, expressos em relação a percentagem do controle (100% ou 44290 pixes). Não houve diferença significativa em relação ao grupo eutireoideo ( $p>0,05$ ).

## 5.5. RESULTADOS DAS MEDIDAS NO SANGUE

### 5.5.1 QUIMILUMINESCÊNCIA

A LPO medida através da quimiluminescência nos eritrócitos se apresentou significativa diminuída no grupo: hipotireoideo em relação ao eutireoideos ( $p < 0,05$ ). Os resultados são apresentados na Figura 11.

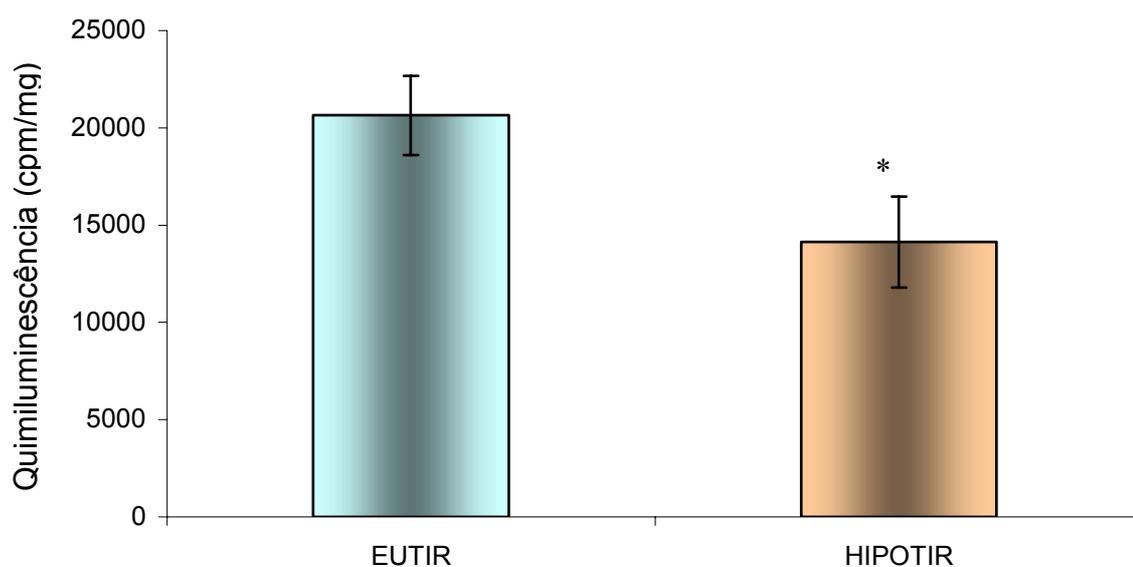


Figura 11. Medida dos níveis de lipoperoxidação por quimiluminescência (cpm/mgprot) em eritrócitos.

Valores representam média  $\pm$  desvio padrão de 19 animais. \* diferença significativa em relação ao grupo eutireoideo ( $p < 0,05$ ).

### 5.5.2. DOSAGEM DE CARBONILAS

A oxidação das proteínas medida através das carbonilas, no plasma sangüíneo, apresentou significativamente reduzida nos animais do grupo hipotireoideos em relação aos do eutireoideo ( $p < 0,05$ ). Os resultados são apresentados na Figura 12.

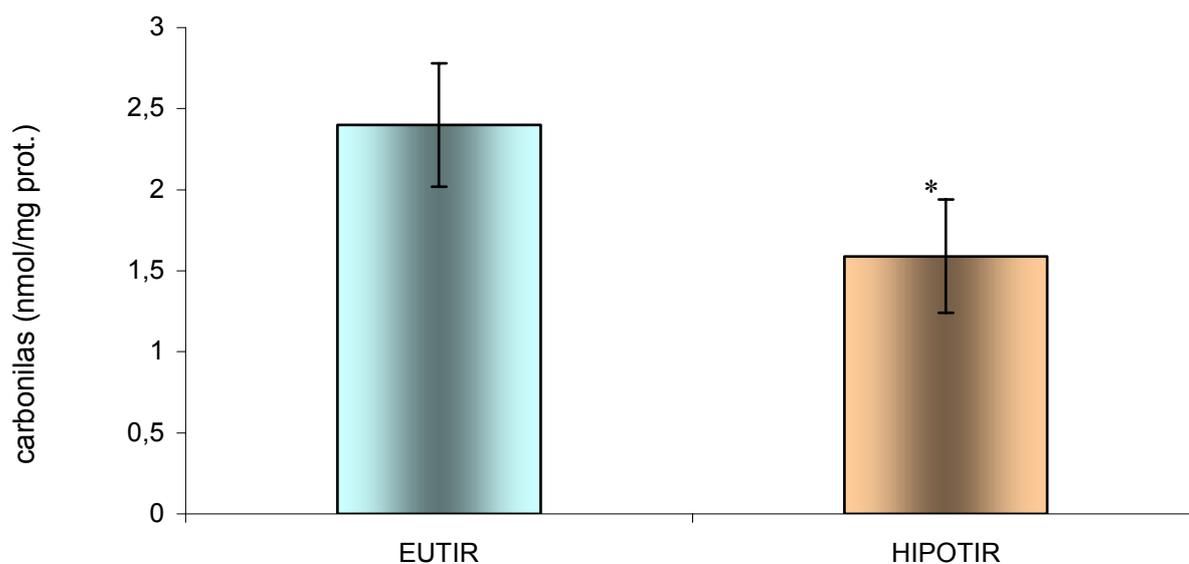


Figura 12 . Medida da oxidação das proteínas através das carbonilas (nmol/mg prot.) em plasma sangüíneo.

Valores representam média  $\pm$  desvio padrão de 7 animais. \* diferença significativa em relação ao grupo eutireoideo ( $p < 0,05$ ).

### 5.5.3 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (TRAP)

A capacidade antioxidante total, no plasma, apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no grupo hipotireoideos, sendo os valores menores do que nos eutireoideos. Os resultados são apresentados na Figura 13.

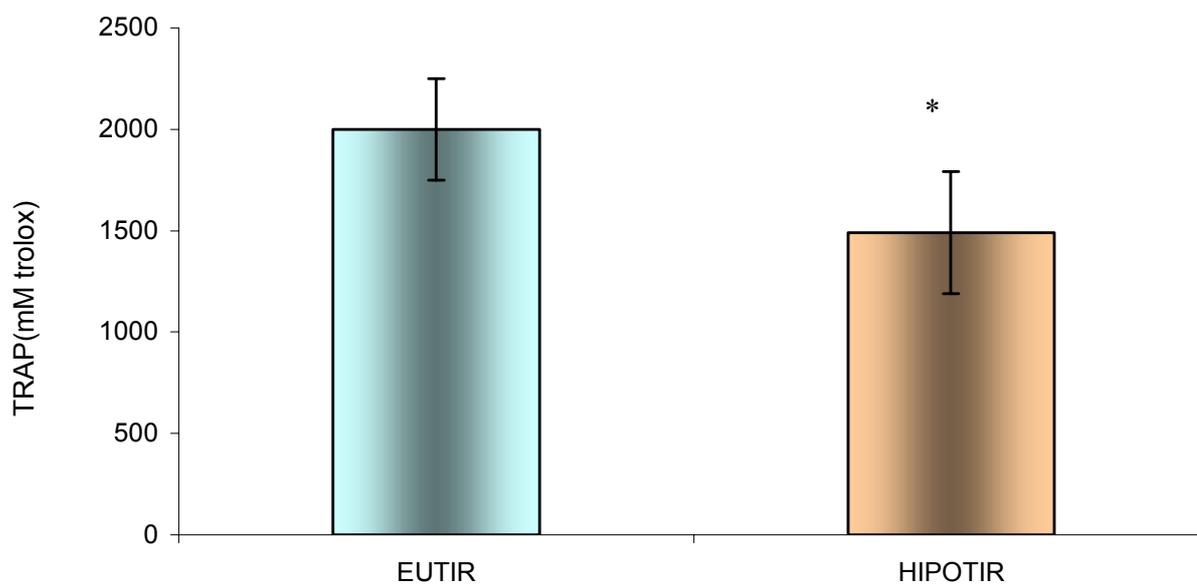


Figura 13. Medida capacidade antioxidante total (mM de trolox ) em plasma sanguíneo.

Valores representam média  $\pm$  desvio padrão de 11 animais. \* diferença significativa em relação ao grupo eutireoideo ( $p < 0,05$ ).

#### 5.5.4. ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Avaliou-se a atividade das enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase e glutathiona peroxidase) nos eritrócitos. Observou-se a diminuição significativa da atividade enzimática no grupo hipotireoideo em relação ao grupo eutireoideo ( $p < 0,05$ ). Com exceção da glutathiona peroxidase que não apresentou diferença significativa entres os grupos. Os resultados estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Medida atividade das enzimas antioxidantes em eritrócitos.

Enzimas		Eutireoideo	Hipotireoideo
Catalase		42116 ± 2795	31373 ± 4173 *
<i>(pmol/mg prot)</i>			
Superóxido	Dismutase	6,40 ± 1,85	4,20 ± 0,88 *
<i>(U/mg prot)</i>			
Glutathiona	Peroxidase	55,0 ± 7,4	48,7 ± 11,9
<i>(nmol/mg prot)</i>			

Valores representam média ± desvio padrão de 16 animais. \* diferença significativa em relação ao grupo eutireoideo ( $p < 0,05$ ).

### 5.5.5. CONCENTRAÇÃO DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

A concentração da superóxido dismutase (SOD Cu/Zn) medida nos eritrócitos, apresentou-se menor no grupo hipotireoideo em relação ao eutireoideo significativamente ( $p < 0,05$ ). Os resultados são apresentados no Figura 14.

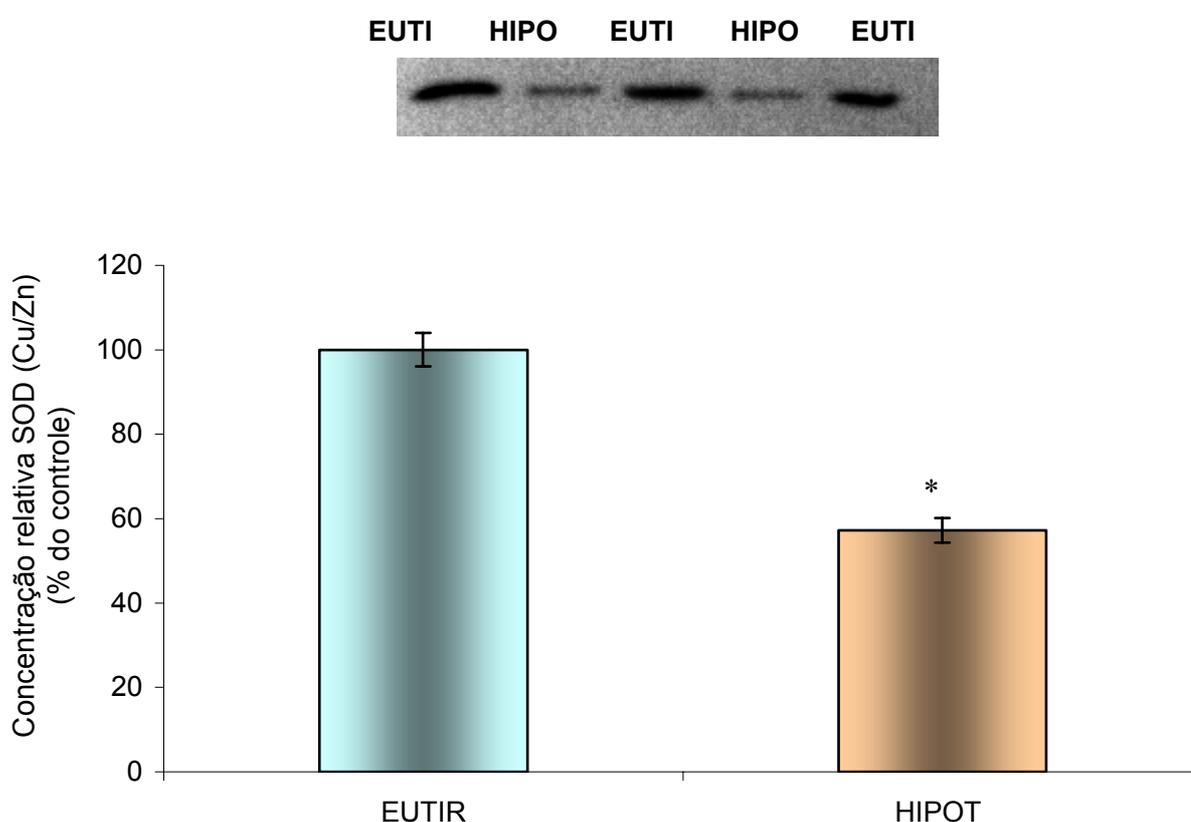


Figura 14. Medida da concentração da enzima superóxido dismutase (em valor de percentagem do controle) nos eritrócitos.

Valores representam média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos, expressos em relação a percentagem do controle (100% ou 24087 pixes). \* diferença significativa em relação ao grupo eutireoideo ( $p < 0,05$ ).

A concentração da glutathiona S transferase, no nos eritrócitos, apresentou –se reduzida significativamente no grupo hipotireoideo em relação ao eutireoideos. Os resultados são apresentados na Figura 15.

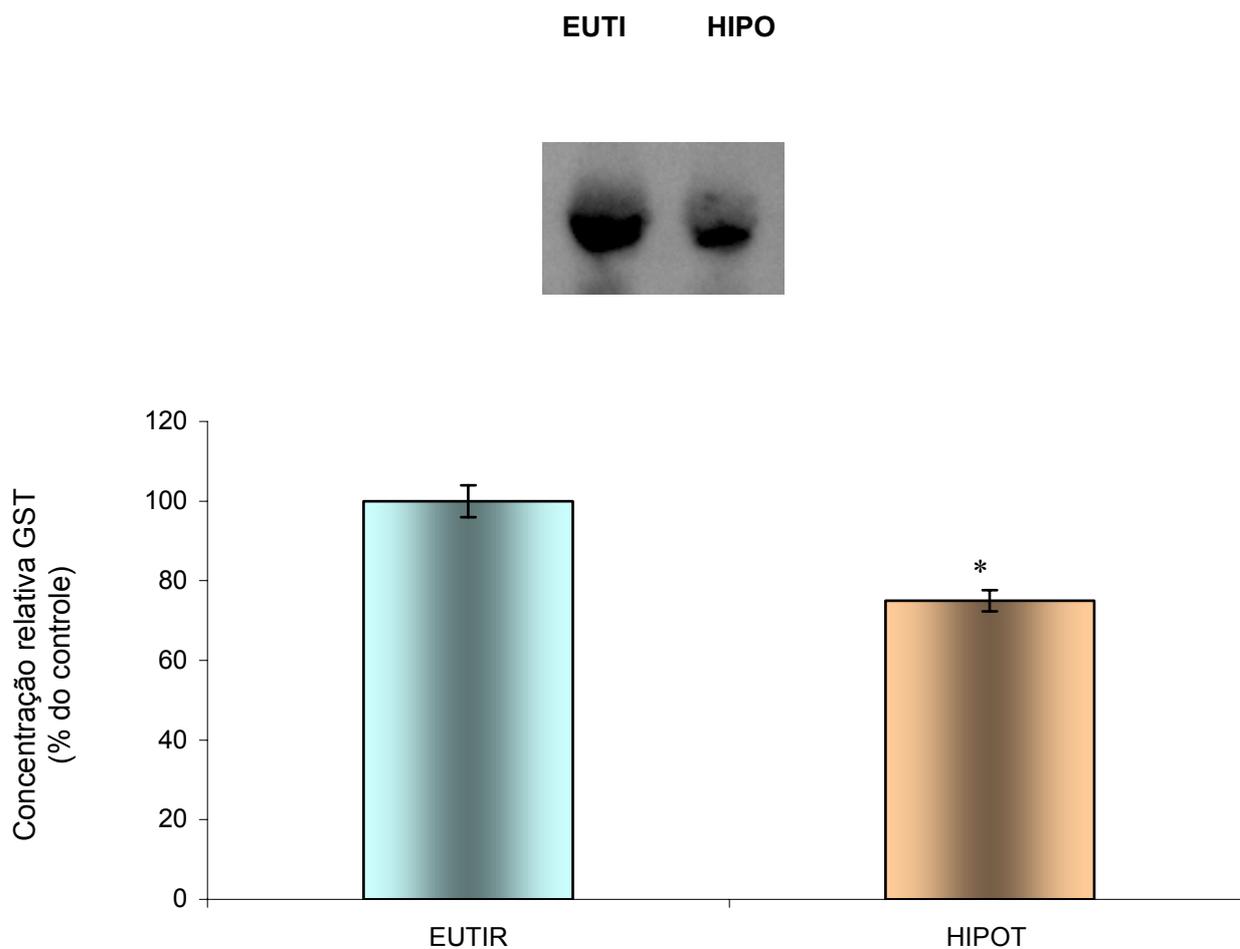


Figura 15. Medida concentração da enzima glutathiona S transferase (em valor de percentagem do controle) nos eritrócictos.

Valores representam média  $\pm$  desvio padrão de 2 experimentos, expressos em relação a percentagem do controle (100% ou 58738 pixes). \* diferença significativa em relação ao grupo eutireoideo ( $p < 0,05$ ).

## 6. DISCUSSÃO

Os animais foram induzidos ao hipotireoidismo através da técnica cirúrgica de tireoidectomia. Esse procedimento foi escolhido a fim de minimizar os efeitos adversos da utilização de fármacos, como por exemplo propiltiouracil (PTU). Tal substância possui grupos tióis (SH) que podem interferir nas medidas da lipoperoxidação (LPO) e da capacidade antioxidante total (TRAP). No entanto, muitos autores induzem o hipotireoidismo usando o PTU e desconsideram o seu potencial antioxidante (ASAYAMA *et al.*; 1987; VENDITTI *et al.*,1997). Deste modo, quando comparamos a redução hormonal dos animais tireoidectomizados com aquela obtida pela utilização de fármacos indutores de hipotireoidismo, podemos evidenciar diferenças significativas entre os dois métodos. Na maioria das vezes, obtemos concentrações de hormônios da tireóide menores nos animais tireoidectomizados do que nos tratados por drogas. Isso poderá se refletir, em alguns casos, em distintos resultados no que diz respeito ao metabolismo basal do animal, no metabolismo do oxigênio, na apreciação do estresse oxidativo, na perda ou ganho de peso dos animais, entre outros. Cabe salientar, que o processo de tireoidectomia induz ao hipotireoidismo severo e extremo, de conseqüências fisiopatológicas de mesma magnitude, ao passo que a utilização de PTU leva ao hipotireoidismo cuja severidade das manifestações orgânicas são proporcionais à dose do fármaco aplicada aos grupos experimentais.

Após quatro semanas da cirurgia de tireoidectomia, as concentrações séricas de triiodotironina (T3) e tiroxina (T4), medidas pelo método imunológico de quimiluminescência, foram extremamente reduzidas em relação ao grupo eutireoideo, caracterizando, dessa forma, a condição hormonal de hipotireoidismo em ratos Wistar. Essa diminuição foi de 75% de T3 e de 75,6% de T4 em relação ao grupo controle. Esses resultados hormonais comparados com os de outros autores que lançaram mão da tireoidectomia se correlacionam perfeitamente (TEARE *et al.*, 1993; BILGILAN *et al.*, 1996).

Foi feita a verificação do peso corporal dos animais envolvidos no experimento, enfatizando o ganho de peso desses animais, após quatro semanas de tireoidectomia. Os animais contidos no grupo de hipotireoideos tiveram menor ganho de peso ao longo desse tempo quando comparados ao grupo eutireoideo. O valor observado foi cerca de 71% menor do que nos animais não tireoidectomizados. Outros pesquisadores também verificaram este mesmo resultado. Nos dados da literatura os animais hipotireoideos tiveram não somente menor acréscimo de peso, mas também peso final menor que os animais controle num período de 3-4 semanas (ASAYAMA *et al.*, 1987; VENDITTI *et al.*, 1997; PAMPLONA *et al.*, 1999; DAS & CHAINY, 2001). Em humanos cerca de 45 a 50% dos pacientes hipotireoideos aumentam de peso em função da diminuição da exigência metabólica basal. Entretanto 45% desses pacientes possuem diminuição drástica do apetite, o que pode levá-los ao acréscimo menor de peso do que realmente esperado (BRAVERMAN & UTIGER, 1996). Podemos creditar a diminuição de peso

dos animais hipotireoideos à quebra do balanço entre a síntese e a degradação das proteínas, levando então a diminuição da massa corpórea desses animais, principalmente pela diminuição da síntese de proteínas (PAMPLONA *et al*, 1999). Por outro lado, o próprio estado de hipotireoidismo pode induzir ao catabolismo protéico moderado que, somado com a menor síntese de proteínas, gera perda de peso em ratos Wistar (ASAYAMA *et al*, 1987; PAMPLONA *et al*, 1999; LOPEZ-TORRES *et al*, 2000). Devemos considerar também a deficiência de absorção de nutrientes como ferro, vitaminas e glicose pela mucosa do trato gastrointestinal nos animais hipotireoideos. Além disso, o metabolismo no hipotireoideo está consideravelmente desacelerado e isso leva a um menor consumo de oxigênio, menor geração de energia e, portanto, menor necessidade de substratos energéticos. A utilização da glicose, por exemplo, pelo tecido muscular esquelético está extremamente afetada, uma vez que sua captação se apresenta diminuída nessas células, conseqüentemente alterando seu padrão metabólico nos músculos dos ratos hipotireoideos (BRAVERMAN & UTIGER, 1996). Essa redução da captação e utilização da glicose é devida a menor concentração do transportador GLUT4 nas membranas celulares dos animais (SHEPHERD & KAHM, 1999). Outras rotas metabólicas passam a ser utilizadas por esses animais, como a via do catabolismo das proteínas, aumentando a sua degradação (PAMPLONA *et al*, 1999).

A massa cardíaca é um relevante parâmetro avaliado nesse trabalho. Os animais do grupo hipotireoideo apresentaram decréscimo da massa do

miocárdio em relação ao grupo eutireoideo. A magnitude dessa diminuição foi de 43% nos corações dos animais hipotireoideos. Outros autores também encontraram essa diminuição, evidentemente com cifras um pouco diferentes da encontrada neste estudo (ASAYAMA *et al.*, 1987; LOPEZ-TORRES *et al.*, 2000). As razões para essa diminuição da massa miocárdica baseiam-se no decréscimo da expressão de proteínas muito importantes, não somente estruturais do tecido muscular cardíaco, como também essenciais ao seu funcionamento adequado. Podem exemplificar essa situação as seguintes proteínas:  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPase,  $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase, enzima málica e receptores beta adrenérgicos. O decréscimo na síntese de proteínas induz o coração a exercer de forma deficiente a sua função de bomba, porque pode prejudicar, por exemplo, a contração muscular cardíaca e a sensibilidade dos cardiomiócitos às catecolaminas. Desta forma, isso promove o quadro de bradicardia e de diminuição do débito cardíaco. Tais disfunções podem acarretar a diminuição da massa cardíaca, uma vez que o coração trabalha menos e tende a sofrer uma atrofia muscular (Braverman & Utiger, 1996). O que reforça essa situação, paradoxalmente, é o quadro de hipertireoidismo em que temos o processo de taquicardia e o aumento do débito cardíaco com uma conseqüente hipertrofia cardíaca (BRAVERMAN & UTIGER, 1996; GUYTON & HALL, 2002). Existe também uma intensa relação entre os hormônios da tireóide e os receptores tirosina quinase (RTK), como os da insulina e dos fatores de crescimento. Uma situação que exemplifica bem esta relação é o crescimento do tecido cartilaginoso que ocorre através do sinergismo entre o T3 e o fator de crescimento tipo

insulina (IGF-I). Neste caso, os hormônios da tireóide aumentam a sensibilidade das células do tecido cartilaginoso à ação do IGF-I, proporcionando um crescimento adequado (BRAVERMAN & UTIGER, 1996). Nos ratos tireoidectomizados há uma diminuição significativa dos receptores tirosina quinase no fígado e nas glândulas mamárias, conseqüentemente o desenvolvimento desses tecidos está comprometido (VAN DERHAAR *et al.*, 1986; MACKOWIAK *et al.*, 1999). O conjunto desses fatores pode contribuir para a explicação da perda de massa cardíaca nos animais hipotireoideos.

Dentro dos fenômenos de oxidações biológicas, o primeiro aspecto que verificamos foi a lipoperoxidação (LPO) tecidual e sistêmica. A medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) apresentou, no tecido cardíaco, dos animais do grupo hipotireoideo um decréscimo de 40% em relação ao grupo eutireoideo. Semelhantemente, concentrações diminuídas de TBA-RS foram observadas em músculo extensor digitório longo em animais hipotireoideos de acordo com a literatura (ASAYAMA *et al.*, 1987). Esses resultados se correlacionam com a menor concentração de proteínas modificadas pelo MDA (malondialdeído), subproduto do processo de lipoperoxidação e principal substância detectada na técnica de TBA-RS de acordo com Pamplona *et al.*, 1999. Diferentes autores obtiveram resultados que demonstraram uma menor lipoperoxidação nos ratos tireoidectomizados, assim como, obtivemos nesse trabalho (TEARE *et al.*, 1993; PEREIRA *et al.*, 1994). Isso, possivelmente, seja reflexo do estado hipometabólico causado pelo hipotireoidismo (ASAYAMA *et al.*, 1987). A

menor produção de radicais livres e das espécies ativas de oxigênio pela respiração celular “in vivo” também pode ser uma das causas para a menor lipoperoxidação encontrada (PAMPLONA *et al*, 1999). Já foi observado que o processo de indução de formação de malondialdeído, detectado pela técnica de TBA-RS, utilizando peróxido de hidrogênio, hidroperóxido de *tert*-butil e ferro, é minimizado pelo hipotireoidismo. Segue a essa constatação o fato de que os ratos hipotireoideos possuem ácidos graxos, constituintes das membranas biológicas com grau menor de insaturação do que os animais controle (DAS & CHAINY, 2001). É sabido que quanto maior for o grau de insaturação do ácido graxo, tanto maior será a sua susceptibilidade à ação de radicais livres desencadeando a sua oxidação (MARKS *et al.*, 1996). Portanto, possuindo uma quantidade menor de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA), os hipotireoideos são menos propensos a sofrer lipoperoxidação (DAS & CHAINY, 2001).

A lipoperoxidação também foi verificada pela técnica de Quimiluminescência. Essa medida confirmou o decréscimo da lipoperoxidação detectado anteriormente pelo método de TBA-RS. Os corações dos animais hipotireoideos (HPO) apresentaram uma queda de QL de 30% em relação ao grupo controle.

Através de duas técnicas de medidas de lipoperoxidação diferentes podemos observar diminuição da mesma no tecido cardíaco dos ratos hipotireoideos em relação aos animais do grupo controle. Refletindo o resultado obtido no tecido cardíaco, a análise da LPO sistêmica, através de medidas sangüíneas, demonstrou uma correlação positiva com as

modificações ocorridas no miocárdio. A QL dos eritrócitos também diminuiu sensivelmente (25%) em relação à do grupo eutireoideo. A diminuição da lipoperoxidação nos animais tireoidectomizados pode ser reflexo da constituição de ácidos graxos na membrana dos eritrócitos. A constituição dos ácidos graxos nas membranas celulares é altamente regulada pelos hormônios da tireóide (DAS & CHAINY, 2000). Como citado anteriormente, a sensibilidade das membranas à lipoperoxidação está na constituição de ácidos graxos da mesma, com a diminuição da insaturação destes ácidos menor será a lipoperoxidação dessas membranas, menor será a formação de MDA e de carbonilas excitáveis. No hipotireoidismo, ocorre, de fato, a diminuição dos PUFAs nos fosfolípidios da membrana celular e conseqüentemente temos menor lipoperoxidação (GUERRERO *et al.*, 1998). Essa diminuição na concentração de PUFAs se deve à ação dos hormônios tireóideos (ALICIGÜZEL *et al.*, 2001). Há a sugestão de que no hipotireoidismo exista diminuição da formação dos radicais livres celulares. Segundo Lopez-Torres *et al.*, 2000, a produção de peróxido de hidrogênio nas mitocôndrias cardíacas dos ratos hipotireoideos diminuiu 51% em relação ao grupo eutireoideo. Este fato é atribuído a menor geração de radicais livres pela mitocôndria, sobretudo pelos complexos 3 e 1, da cadeia respiratória, onde temos como conseqüência a diminuição da redução monovalente do oxigênio, gerando portanto menos EAO. Essa condição que desfavorece a produção de radicais livres é conseqüência do estado de hipotireoidismo (LOPEZ-TORRES *et al.*, 2000). De fato, com o hipotireoidismo ocorre a redução do consumo de oxigênio quando os

animais estão em dieta normal ou em tratamento com álcool etílico que comprovadamente aumenta o consumo de oxigênio (ROSS *et al.*, 1994). Mais um fator que comprova a correlação entre o consumo de oxigênio e a geração de radicais livres é o estado de hipertireoidismo em que há um aumento do metabolismo basal, do consumo de oxigênio e da geração de radicais ânion superóxido (ALICIGÜZEL *et al.*, 2001). A relação contrária, diminuição do metabolismo basal levando a diminuição da produção das EAO, já foi verificada e comprovada por diferentes autores (PEREIRA *et al.*, 1994; ASAYAMA & KATO, 1990). Tais autores demonstraram em diferentes momentos que o decréscimo do consumo de oxigênio tem como consequência direta à queda na geração de radicais livres, em experimentos feitos com os músculos gastrocnêmicos e soleos a partir das medidas de TBARS.

A redução do metabolismo basal associada com o decréscimo dos radicais livres também foi demonstrada pela queda da produção do radical ânion superóxido e da atividade da citocromo oxidase, citocromo P450 redutase e oxidase no hipotireoidismo. Isso leva ao decréscimo de lesões nas membranas celulares por ação da lipoperoxidação medidos pelo TBARS e QL (TEARE *et al.*, 1993). A redução da atividade das enzimas citocromo P450 redutase na fração microssomal dos hepatócitos de ratos hipotireoideos foi também detectada por Ross *et al.*, 1994. Além disso, a baixa concentração de T3 e T4 parece estar altamente correlacionada com a menor produção de radical hidroxil, quando se administra etanol aos animais hipotireoideos (ROSS *et al.*, 1994). Essas considerações têm por

conseqüência a diminuição das concentrações de MDA, ou seja, um menor índice de LPO. Mais uma vez, o estado oposto ao hipotireoidismo confirma esses resultados: no hipertireoidismo temos aumento das espécies ativas de oxigênio e da lipoperoxidação (MIHARA *et al.*, 1999). Já foi observado que os hormônios da tireóide estão aptos a estimular a atividade da citrato sintase favorecendo a formação de radicais livres em alguns tecidos (PEREIRA *et al.*, 1994). Além disso, no hipotireoidismo há um aumento da produção do ácido úrico que em grande quantidade pode ser um útil antioxidante e contribuir para o decréscimo da lipoperoxidação cardíaca e sistêmica.

Outro fato que deve ser considerado é que no hipotireoidismo ocorre o estado de anemia (BRAVERMAN & UTIGER, 1996). Os hormônios da tireóide atuam em sinergismo com a eritropoetina e favorecem a absorção do ferro, proporcionando a produção adequada dos eritrócitos (BRAVERMAN & UTIGER, 1996; GUYTON & HALL, 2002). Com isto, no estado de hipotireoidismo tem-se menor concentração de ferro circulante e conseqüentemente a anemia. Sabendo que o ferro é cofator importante para a geração de radicais livres, o que é demonstrado pelas Reações de Fenton e Haber Weiss, a sua diminuição, é um fator importante para explicar a menor lipoperoxidação nos animais hipotireoideos.

No tecido hepático dos animais hipotireoideos não houve diminuição da lipoperoxidação. Desta forma, para este tecido, a hipótese, formulada inicialmente, não foi provada. Este fato mostra que as respostas relacionadas com o estresse oxidativo são dependentes do tipo de tecido

estudado. Cada tecido tem uma suscetibilidade própria às variações oxidativas que pode estar associada com o nível de defesas antioxidantes, amplamente variável para cada estrutural tecidual.

Além deste fato, o processo de oxidação das proteínas do plasma, medido através das carbonilas oxidadas, também foi significativamente menor no grupo hipotireoideo (34%) em relação ao eutireoideo. Este resultado está de acordo com a redução da lipoperoxidação sangüínea, sugerindo um menor dano oxidativo sistêmico, que pode estar associado com a redução dos hormônios da tireóide.

Para se ter uma visão mais completa do fenômeno de estresse oxidativo, além de medidas de dano oxidativo, é importante analisar as defesas antioxidantes nos diferentes tecidos estudados.

As defesas antioxidantes não enzimáticas foram analisadas pela medida da capacidade antioxidante total (TRAP) no tecido cardíaco, hepático e sangüíneo. O TRAP no coração e no sangue foi menor no grupo hipotireoideo em relação ao controle. O tecido hepático não demonstrou diferença significativa. Esses resultados paradoxais demonstraram que mesmo tendo menor capacidade antioxidante, os ratos hipotireoideos possuem menor lipoperoxidação. A diminuição na capacidade antioxidante também tem sido observada em homogeneizado cardíaco de animais hipotireoideos, medida por técnicas quimiluminescentes (VENDITTI *et al.*, 1997). Segundo a literatura, pode haver redução significativa da coenzima Q9, um antioxidante não enzimático, no músculo cardíaco de ratos hipotireoideos comparados ao grupo controle, demonstrando um distúrbio no

metabolismo oxidativo nos animais com a disfunção tireoidiana. Os animais tireoidectomizados possuem alteração no metabolismo dos carotenóides, diminuindo sua conversão à vitamina A. Além disso, o hipotireoidismo também diminui a absorção dos carotenóides pelo trato gastrointestinal. No entanto há aumento da vitamina D (1,25 diidroxi vitamina D) o que leva ao aumento da absorção do íon cálcio. Há também a diminuição da absorção da vitamina B2 (riboflavina) que é cofator importantíssimo para a atividade da glutathione redutase. Além disso, os ratos tireoidectomizados possuem níveis baixos de vitamina C (BRAVERMAN & UTIGER, 1996; SHINORAH *et al*, 2000).

Uma das explicações para obtermos TRAP diminuído nos hipotireoideos é que de fato vitaminas hidrossolúveis, como a vitamina C, estão em menores concentrações. Como a técnica de TRAP, utilizada neste estudo, só mede os antioxidantes não enzimáticos hidrossolúveis, isso reforçou o achado de valores baixos do TRAP. No entanto, é sabido que o ácido úrico, que é hidrossolúvel está acentuado no hipotireoidismo e poderia dar valores de TRAP maiores ou no mínimo iguais, estatisticamente, ao dos controles, uma vez que compensaria a queda da vitamina C. Não obstante, segundo Evelson *et al.* (2001), foi demonstrado que o aumento de ácido úrico é significativo para os fins de antioxidante quando medido pela técnica de TRAP, apenas no tecido hepático. E de fato no tecido hepático os níveis de TRAP foram estatisticamente iguais ao controle, confirmando os resultados previamente encontrados na literatura. Outro aspecto importante é que a técnica de TRAP só detecta os antioxidantes hidrossolúveis (ácido úrico,

vitamina C, por exemplo), e não a vitamina E, que é altamente lipossolúvel. Por essa razão, não conseguimos detectar o aumento da vitamina E, evidenciado pelos dados da literatura. A elevação do alfa tocoferol seria mais um componente importante que explicaria a diminuição da lipoperoxidação nos animais tireoidectomizados (ARUOMA *et al.*, 1990).

No miocárdio, as enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase e glutathione-S-transferase apresentaram suas atividades diminuídas no grupo hipotireoideo em relação ao grupo controle. Novamente, a medida das enzimas antioxidantes nos eritrócitos foi ao encontro dos valores obtidos no tecido cardíaco. Nos eritrócitos, a catalase e a superóxido dismutase diminuíram no grupo hipotireoideo, não havendo, no entanto diferença na atividade da enzima glutathione peroxidase. No tecido hepático, apenas a catalase apresentou a sua atividade catalítica reduzida no grupo hipotireoideo, sem haver diminuição significativa nas demais enzimas antioxidantes. Pereira *et al.* (1994) também observaram decréscimo na atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (Cu/Zn) na ordem de 28% em relação aos animais controle em músculo sóleo. A catalase também apresentou sua atividade reduzida em órgão linfóide prematuro (timo) em função do estado de hipotireoidismo. A glutathione peroxidase também teve declínio de sua atividade enzimática nos músculos gastrocnêmico e sóleo, nos animais hipotireoideos. A catalase foi igualmente diminuída no experimento realizado com linfonodos e com hepatócitos (DAS & CHAINY, 2001), juntamente com redução da atividade da glutathione

redutase. Asayama *et al.* (1987) observaram em tecido hepático, cardíaco e sóleo o decréscimo da atividade da superóxido dismutase (Cu/Zn) nos animais hipotireoideos, enquanto que a catalase apresentou decréscimo apenas no fígado dos animais com deficiência de T3 e T4. Braverman e Utiger, em 1996, também observaram diminuição da glutathione redutase em animais hipotireoideos.

No que diz respeito à catalase, esta enzima tem como grupo principal para sua atividade catalítica uma hemoproteína, tipo hemoglobina, constituída de ferro. Como já sabemos que os hipotireoideos possuem anemia e absorvem menor quantidade de ferro que o normal, a constituição da hemoproteína para a síntese da catalase fica prejudicada, levando conseqüentemente à diminuição da sua atividade enzimática e síntese (VENDITTI *et al.*, 1997). Associada a esta falta, a diminuição da respiração celular, principalmente no estágio 4 (onde a taxa de produção de peróxido de hidrogênio e ânion superóxido seria maior), diminui a produção de peróxido de hidrogênio. Desta forma, temos um menor estímulo para síntese da catalase, bem como da superóxido dismutase e da glutathione peroxidase (DAS & CHAINY, 2001). Uma vez que a oferta de substrato para a catalase ( $H_2O_2$ ), para a SOD ( $O_2^{\bullet-}$ ) e GPx ( $H_2O_2$  e peróxidos orgânicos) está diminuída, poderíamos ter uma “down regulation” destas enzimas (ASAYAMA *et al.*, 1987; MANO *et al.*, 1995).

A absorção defeituosa de vitaminas, ferro, selênio, cobre e zinco nos animais hipotireoideos contribuem muito para a diminuição da atividade das enzimas antioxidantes. Além disso, a má absorção de vitamina B12 causa diminuição em conjunto da atividade do sistema glutathione peroxidase e

glutathione redutase (BRAVERMAN & UTIGER, 1996). A diminuição da atividade catalítica não é privilégio apenas das enzimas antioxidantes. No hipotireoidismo, temos decréscimo da atividade da citocromo oxidase, citocromo P450 e citrato sintase. Segundo Pereira *et al.*, (1994) deve haver concentração adequada dos hormônios da tireóide para manter a atividade catalítica das enzimas antioxidantes no nível ótimo, sem o qual essas enzimas acabam perdendo sua capacidade de participar adequadamente do metabolismo do oxigênio. De fato, a atividade catalítica da enzima superóxido dismutase aumenta com a elevação do ânion superóxido. Por outro lado, o aumento da superóxido dismutase relaciona-se com maiores concentrações séricas de T4, sugerindo além do controle pelo substrato oxigênio, um controle baseado na ação do T4 em eritrócitos (ALICIGÜZEL *et al.*, 2001). Também se observou que a ação da catalase e da glutathione peroxidase é vinculada aos produtos gerados pela superóxido dismutase: com o aumento do ânion superóxido, aumenta a atividade da SOD, aumenta a produção do peróxido de hidrogênio, desencadeando a atividade da catalase e da glutathione peroxidase (ALICIGÜZEL *et al.*, 2001). Mas também há relação positiva com T4, onde aumenta T4 também aumenta a atividade destas enzimas em eritrócitos (ALICIGÜZEL *et al.*, 2001). Alicigüzel *et al.* (2001) sugeriram uma correlação entre os hormônios da tireóide e a atividade das enzimas antioxidantes em ratos hipertireoideos, de forma que além do controle pelo substrato, há controle direto pelos hormônios T3 e T4. Usando esse mesmo raciocínio de controle enzimático para ratos hipotireoideos teremos, provavelmente, a diminuição na atividade das

enzimas antioxidantes (como observado nos eritrócitos e no coração dos ratos hipotireoideos neste trabalho).

Além da diminuição da oferta de substrato houve também diminuição da expressão gênica destas enzimas (ROSS *et al.*, 1994). A expressão e síntese de proteínas no hipotireoidismo estão diminuídas e podem provavelmente estar relacionadas com a redução da atividade enzimática, já que os hormônios da tireóide modulariam a expressão gênica protéica (PEREIRA *et al.*, 1994; GUYTON & HALL, 2002; BRAVERMAN & UTIGER, 1996). A partir desses achados, mediu-se a concentração das enzimas antioxidantes SOD e GST, pelo método de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE) e imunodeteccção em membrana de nitrocelulose (Western Blot). No coração, a SOD (Cu/Zn) de fato estava com a concentração diminuída nos hipotireoideos em relação ao grupo controle (18%), não alterou-se no fígado, mas manteve a correlação com o sangue apresentando imunocnteúdo extremamente reduzido no grupo hipotireoideo em relação ao controle (43%). A GST demonstrou imunocnteúdo diminuído nos eritrócitos dos animais hipotireoideos (25%) e também no coração (17%). A diminuição da concentração e expressão de enzimas pode ocorrer no hipotireoidismo como visto com as enzimas citocromo P450 e redutase (ROSS *et al.*, 1994). Isso confirma a possibilidade de ocorrer diminuição na síntese e na expressão de proteínas enzimáticas no hipotireoidismo. Essa diminuição na concentração destas duas enzimas antioxidantes observada principalmente no sangue, sugere que além do decréscimo da oferta de substrato enzimático (EAO) para ativar a enzima, há também um decréscimo na concentração desta

enzima intracelular (sobretudo da SOD) que pode, em parte, explicar a menor atividade destas enzimas nos animais hipotireoideos. Além disso, também pode sugerir que o controle da atividade das enzimas antioxidantes, por parte dos hormônios da tireóide, se dá pela regulação da expressão gênica destas proteínas.

Apesar da menor lipoperoxidação obtida nos animais hipotireoideos, não podemos afirmar que exista diminuição efetiva do estresse oxidativo, já que as defesas antioxidantes avaliadas também diminuíram. A redução dos níveis de LPO e de proteínas oxidadas apenas sugere um menor dano oxidativo nos animais tireoidectomizados. E não uma proteção antioxidante proporcionada pelas baixas concentrações dos hormônios da tireóide, uma vez que não submetemos estes animais a outros diferentes tipos de estresses para medir a sua resposta frente ao dano oxidativo ofertado.

## 7. CONCLUSÕES

7.1) A tireoidectomia foi eficiente na indução do hipotireoidismo, tendo em vista os resultados laboratoriais dos hormônios T3 e T4, cujas concentrações séricas apresentaram-se significativamente diminuídas nos animais tireoidectomizados.

7.2) A lipoperoxidação medida pelas técnicas de TBARS e quimiluminescência demonstrou-se diminuída nos tecidos cardíaco e sangüíneo de ratos hipotireoideos, sugerindo que no hipotireoidismo há uma diminuição na produção de EAO e no seu ataque às membranas. Esta hipótese não foi provada para o tecido hepático. A lipoperoxidação no fígado manteve-se inalterada em relação ao grupo eutireoideo, sugerindo uma menor sensibilidade desse órgão aos hormônios da tireóide.

7.3) As carbonilas, medidas no plasma, apresentaram-se diminuídas em relação aos eutireoideos, sugerindo um menor dano oxidativo às proteínas dos animais tireoidectomizados.

7.4) A capacidade antioxidante não enzimática medida pela técnica de TRAP demonstrou decréscimo nos animais hipotireoideos. Isso sugere uma carência na absorção e na metabolização destes antioxidantes hidrofílicos por parte do hipotireoideo.

7.5) A atividade das enzimas antioxidantes (CAT, GPx, SOD e GST) no coração e no sangue apresentaram-se diminuídas, possivelmente por decréscimo na sua síntese devido uma ação direta da diminuição dos hormônios da tireóide, por déficit de componentes importantes para a composição estrutural das enzimas ou também pela própria diminuição dos substratos (EAO) que ativam essas enzimas a atividade. Esta hipótese não foi provada para o tecido hepático, uma vez que a atividade das enzimas antioxidantes não se alterou.

7.6) A concentração das enzimas antioxidantes (SOD E GST) medidas pela técnica de Western Blot acompanhou o decréscimo de atividade enzimática, principalmente no tecido sangüíneo e cardíaco dos animais hipotireoideos, sugerindo uma regulação da atividade e da concentração enzimática das enzimas antioxidantes pelos hormônios da tireóide nestes tecidos. No tecido hepático, não houve modificações.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram a grande importância que possuem os hormônios da tireóide no metabolismo do oxigênio e na geração das espécies ativas de oxigênio. Além disso, mostra que a deficiência destes pode diminuir a produção de radicais livres e conseqüentemente os danos oxidativos em diferentes tecidos. No entanto, este fato não caracteriza uma forma de proteção, uma vez que parece haver uma diminuição da proteção antioxidante enzimática e não enzimática.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.** 105: 121-126; 1984.

ALICIGÜZEL, Y. ÖZDEM, S. N, ÖZDEM, S. S. *et al.* Erythrocyte, plasma, and serum antioxidant activities in untreated toxic multinodular goiter patients. **Free Radical Biology & Medicine.** 30 (6): 665-670; 2001.

ARUOMA, O.I.; EVANS, P.J.; KAUR, H.; SUTCLIFFE, L.; HALLIWELL, B. An evaluation of the antioxidant and potential pro – oxidant properties of food additives and trolox C, vitamin E and probucol. **Free Rad. Res. Comms.** 10(3):143-157, 1990.

ASAYAMA, K. *et al.* Lipid peroxidation and free radical scavengers in thyroid dysfunction in the rat: a possible mechanism of injury to heart and skeletal muscle in hyperthyroidism. **Endocrinology.** 121: 2112-2118, 1987.

ASAYAMA K. & KATO K. Oxidative muscular injury and its relevance to hyperthyroidism. **Free Radical Biology and Medicine.** 293-303, 1990.

BILGIHAN, K., BIGILHAN, A., DIKER, S. Effects of hyper and hypothyroidism on oxidative stress of the eye in experimental acute anterior uveitis. **Acta Ophthalmologica Scandinavica.** 74: 41-43; 1996.

BLENNEMANN et al. Tissue-specific regulation of fatty acid synthesis by thyroid hormone. **Endocrinology**. 130: 637-640, 1992.

BOUHNİK J, MICHEL O, FRANÇOIS D *et al.* Effects de la thyroïdectomie du rat sur la structure et les fonction des mitochondries des muscles squelettiques. **Biochimie**. 57: 779-786.

BRAVERMAN, L., E., UTIGER, R., D. **Werner and Ingbar's The Thyroid**. 7<sup>ed</sup>. Philadelphia. Ed. Lippincott-Raven, 1996.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal Lipid Peroxidation. **Meth. Enzymol**. 52:302–309, 1978.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol. Rev**. 59(3):527-625, 1979.

DAS K & CHAINY G. B. N. Modulation of rat liver mitochondrial antioxidant defence system by thyroid hormone. **Biochim. Biophys Acta**. 1537 (1): 1-13, Jul 2001.

DEL MAESTRO, R. F. An approach to free radicals in Medicine and Biology. **Acta Physiol Scand**. 40(7):153–168, 1980.

EVELSON, P.; TRAVACIO, M.; REPETTO, M.; ESCOBAR, J.;LLESUY, S.; LISSI, E.A. Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. **Arch. Biochem. Biophys.** 388(2):261-266, 2001.

FERNÁNDEZ V, BARRIENTOS X, KIPREOS K, *et al.* Superoxide radical generation, NADPH oxidase activity, and cytochrome P-450 content of rat liver microsomal fractions in an experimental hyperthyroid state: Relation to lipid peroxidation. **Endocrinology.** 117: 496-501, 1985.

FERREIRA, A. W, ÁVILA S. L. M. **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-imunes.** 2º ed. Ed. Guanabara Koogan S. A. Rio de Janeiro, 2001.

FLOHÉ, L.; GUNZLER, W. A. Assay of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol.** 105:14–121, 1984.

FREAKE, H. C; OPPENHEIMER, J. H. Thermogenesis and thyroid function. **Annu. Rev. Nutr.** 15: 263-291, 1995.

GANONG, W.F. **Fisiologia Médica.** 17ªed. Rio de Janeiro: editora Prentice – Hall do Brasil LTDA, 1995.

GARDNER, P.R.; RAINIERI, I.; EPSTEIN, L.B.; WHITE, C.W. Superoxide Radical and Iron Modulate Aconitase Activity in Mammalian Cells. **The Journal of Biological Chemistry**. vol.270 -n°22:13399-13405, 1995.

GOLDSTEIN, S; CZAPSKI, G. Superoxide Dismutase. In PUNCHARD, N.A. & KELLY, F.J. (ed) **Free Radicals: A Pratical Approach**. Oxford University Press, 1996.

GONZALEZ FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of liver, heart and muscle. **Free Rad. Biol. Med.** 10:41–47, 1991.

GUERRERO, A. et al. Effect of thyroid status on lipid composition and peroxidation in the mouse liver. **Free Rad. Biol. Med.** 26: 73-80, 1999.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 10°ed. Ed. Guanabra Koogan S.A. Rio de Janeiro, 2002.

HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JAKOBI, W.B. Glutathione S-Transferases. **The Journal of Biological Chemistry**. vol.249 - n°22:7130-7139, 1974.

HALLIWEL, B. Antioxidants: The Basis What They Are and How to Evaluate Them. In SIES, H. (ed) **Antioxidants in diseases: Mecanismos and**

**Therapy.** (Advances in Pharmacology vol. 38) Califórnia: Academic Press, 1997.

HALLIWEL, B.; GUTTERIDGE, J.C.M. **Free Radicals in Biology and Medicine.** 3th ed. Oxford University Press, 1999.

HALPERN, B.N.; PACAUD, A. Technique de prélèvement d'échantillons de sang chez les petits animaux de laboratoire par ponction du plexus ophtalmique. **Comptes Rendu de la Société du Biologie.** 145:1465-1466, 1951.

HARRIS, E.D. Regulation of Antioxidant Enzymes. **FASEB Journal.** 6:2675-2683, 1992.

HENRY, J. B. **Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods.** 19<sup>o</sup> ed. W. B. Sanders Company, 1999.

HOCH, F. L. Lipids and thyroid hormones. **Prog. Lipid Res.** 27: 199-270; 1988.

KLEIN, I. Thyroid hormone and the cardiovascular system. **Am. J. Med.** 88: 631-640, 1990.

KUHL, H. Cardiovascular effects and estrogen / gestagen substitution therapy. **Ther – Umsch.** 51(11):748-754, 1994.

LISSI, E.; PASCUAL, C.; DEL CASTILLO, M.D. Luminol luminescence induced by 2,2'-azobis (2-amidino-propane) thermolysis. **Free Rad. Res. Comms.** 17:299-311, 1992.

LLESUY, S. F.; MILEI, J.; MOLINA, H.; BOVERIS, A.; MILEI, S. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadrimicin in mice. **Tumor**, 71:241–249, 1985.

LOPEZ-TORRES, M., ROMERO M., BARJA, G. Effect of thyroid hormones on mitochondrial oxygen free radical production and DNA oxidative damage in the rat heart. **Mol. Cell. Endocrinol.** 168 (1-2): 127-34, 2000.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, A. L.; FARR, A. L.; RANDALL, R. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193:265–275, 1951.

LUOMA, J.S.; STRALIN, P.; MARKLUND, S.L.; HILTUNEN, T.P.; SARKIOJA, T.; YIÄ-HERTTUALA, S. Expression of Extracellular SOD and iNOS in Macrophages and Smooth Muscle Cells in Human and Rabbit Atherosclerotic Lesions. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 18:157-167, 1998.

MACKOWIAK, P. *et al.* The influence of hypo- and hyperthyreosis on insulin receptors and metabolism. **Arch. Physiol. Biochem.** 107(4):273-9. Oct.,1999.

MANNERVIK, B.; GLUTHENBERG, C. Glutathione Transferase. **Methods in Enzymology.** 77:231-235, 1981.

MANO, T., SINOHARA, R., SAWAI, Y. *et al.* Effects of thyroid hormone on coenzyme Q and other free radical scavengers in rat heart muscle. **Journal of Endocrinology.** 145: 131-136; 1995.

MARKLUND, S. Handbook of methods for oxygen radical research. **Boca Raton.** CRC. Press. 243-247, 1985.

MARKS, D.B., MARKS, A. D., COLLEEN, M. S. **Basic Medical Biochemistry – A clinical approach.** Ed. Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore, EUA. 1996.

MARZOEV, A. I.*et al.* Peroxidationn of blood serum lipids in rabbits with various thyroid functions. **Vopr. Med Khim.** 31 (2): 14-7, Mar-Apr, 1985. Medline. Abstract.

MC CORD, J. M. Oxygen–derived radicals: a link between reperfusion injury and inflamation. **Federation Proc.** 46:2402–2406, 1987.

MENEZHINI, R. A toxicidade do Oxigênio. **Ciência Hoje**. vol. 5 número 28, 1987.

MILLS, G.C. Glutathione peroxidase and the destruction of hydrogen peroxide in animal tissues. **Arch. Biochem. Biophys.** 86:1-5, 1960.

MIHARA, S., SUZUKI, N., WAKISAKA, S. *et al.* Effects of thyroid hormones on apoptotic cell death of human lymphocytes. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. 84(4):1378-1385; 1999.

PALLER, M. S. Hypothyroidism protects against free radical damage in ischemic acute renal failure. **Kidney Int.** 29 (6): 1162-6, Jun 1986.

PAMPLONA, R. *et al.* Thyroid status modulates glycoxidative and lipoxidative modification of tissue proteins. **Free Rad Biol Med.** 27 (7/8);901-910,1999.

PEREIRA B, COSTA ROSA, L. F. B. P, SAFI, D. A. *et al.* Control of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in rat lymphoid organs by thyroid hormones. **Journal of Endocrinology**. 140:73-77; 1994.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 3º ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1997.

REZNICK, A. Z., PACKER, L. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**. 233: 357-363; 1994.

ROBBINS, S. L. et al. **Patologia estrutural e funcional-Robbins**. 5 ed. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara Koogan S. A., 1996.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 4 ed. São Paulo. Ed. Manole LTDA, 1997.

ROSS, A. D, VARGHESE, G. OPORTO, B *et al.* Effect of propylthiouracil treatment on NADPH – cytochrome P450 reductase levels, oxygen consumption and hydroxyl radical formation in liver microsomes from rats fed ethanol or acetone chronically. **Biochemical Pharmacology**. 49 (7): 979-989; 1995.

RUSSEL, G.A. Deuterium – isotopo Effects in the Autoxidation of Aralkyl Hydrocarbons Mecanism of the Interaction of Peroxy Radicals, in: **J. Am. Chem. Soc.** 79:3871-3880, 1957.

SCHWARTZ H. L. & OPPENHEIMER J. H. Physiologic and biochemical actions of thyroid hormone. **Pharmacology and Therapeutics**. 3: 349-376, 1978.

SHEPHERD, P., R., KAHN, B., B. Glucose Transporters and insulin Action. **The New England Journal of Medicine.** (22):248-256. July, 1999

SHINORA, R., MANO, T. NAGASAKA, A. *et al.* Lipid peroxidation levels in rat cardiac muscle are affected by age and thyroid status. **Journal of Endocrinology.** 164: 97-102.

SIES, H. & MURPHY, M. E. Role of tocopherols in the protection of biological against oxidative damage. **J. Photochem Photobiol B. Biol.** 8:211–224, 1991.

SIES, H. **Antioxidants in Diseases: Mecanisms and Therapy.** (Advances in Pharmacology vol 38) Califórnia: Academic Press. 1997.

SOUTHORN, P. & POWIS, G. Free Radicals in Medicine. I. Chemical Nature and Biologic Reaction. **Clin. Proc,** (63):381–389, 1988.

SWAROOP. A. & RAMASARMA. T. Heat exposure and hypotthyroid conditions decrease hydrogen peroxide generation in liver mitochondria. **Biochemical Journal.** 226: 403-408; 1985.

TEARE, J. P, GREENFIELD, S. M, MARWAY, J.S. *et al.* Effect of thyroidectomy and adrenalectomy on changes in liver glutathione and malonaldehyde levels after acute ethanol injection. **Free Radical Biology & Medicine.** 14: 655-660, 1993.

THOMAS, C. E. Approaches and rationale for the design of synthetic antioxidants as therapeutic agents. In PACKER, L. (ed.) **Handbook of Synthetic Antioxidants**. New York: Marcel Dekker Inc., 1997.

VENDITTI, P. et al. Effect of thyroid state on lipid peroxidation, antioxidant defences, and susceptibility to oxidative stress in rat tissues. **Journal of Endocrinology**. 155: 151-157; 1997.

VIDELA L. A, SIR, T.,WOLFF, C. Increased lipid peroxidation in hyperthyroid patients: suppression by propylthiouracil treatment. **Free Radic. Res. Commun**. 5: 1-10; 1988.

VAN DERHAAR, B. K. *et al*. Thyroid hormone regulation of epidermal growth factor receptor levels in mouse mammary glands. **Endocrinology**. 119 (2): 580-585, 1986.

YU, P.B. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**. 74(1):139–162, 1994.



