FERNANDA PRIETO DE ALMEIDA

**EFEITOS DO HORMÔNIO TIREOIDEANO T3 NO SISTEMA NERVOSO
CENTRAL ASSOCIADOS A DIABETES MELITO INDUZIDA POR ALOXANA**

Dissertação apresentada ao programa de
Pós Graduação em Fisiologia Humana do
Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da
Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2016

FERNANDA PRIETO DE ALMEIDA

**EFEITOS DO HORMÔNIO TIREOIDEANO T3 NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL
ASSOCIADOS A DIABETES MELITO INDUZIDA POR ALOXANA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Profa. Dra. Andréa da Silva Torrão

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses de Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Almeida, Fernanda Prieto de.

Efeitos do hormônio tireoidiano T3 no sistema nervoso central associados a diabetes melito induzida por aloxana / Fernanda Prieto de Almeida. – São Paulo, 2016.

Orientador: Profa. Dra. Andréa da Silva Torrão.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Comunicação celular no sistema nervoso: expressão e regulação de receptores.

Versão do título para o inglês: Effects of thyroid hormone T3 in the central nervous system associated with diabetes mellitus induced by alloxan.

1. Doença de Alzheimer 2. Diabetes melito 3. Hormônio tireoideano
4. Demência 5. Hipocampo 6. Insulina I. Torrão, Profa. Dra. Andréa da Silva II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB07/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Fernanda Prieto de Almeida.

Título da Dissertação: Efeitos do hormônio tireoideano T3 no sistema nervoso
central associados a diabetes melito induzida por aloxana.

Orientador(a): Profa. Dra. Andréa da Silva Torrão.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.088/2015

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado **148/2013/CEUA**, aprovado em 06/03/2014, informo que o título do projeto de pesquisa da aluna de mestrado **Fernanda Prieto de Almeida** foi alterado para "*Efeitos do hormônio tireoidiano T3 no sistema nervoso central associados a diabetes melito induzida por aloxana* " sem modificações de seu conteúdo.

São Paulo, 06 de outubro de 2015.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador da Comissão de
Ética no Uso de Animais - ICB/USP

AGRADECIMENTO

Gostaria de agradecer a minha família (Milton, Zelinda, Miltinho), pelo apoio incondicional aos meus estudos, paciência em momentos de angústia e ansiedade, definitivamente sem o apoio dessas três pessoas nada teria acontecido nada em minha vida. Agradecer também o resto da minha família, meus tios, primos e avós que tanto amo, em especial a tia Clarice, que tentava fazer o mínimo possível de barulho para não atrapalhar quando eu estava em casa estudando.

Agradeço a minha orientadora Andréa, que tanto gosto e admiro. Sempre que precisei estava pronta a ajudar e a ensinar. Sinceramente é a pessoa que eu gostaria enfaticamente de agradecer pelas oportunidades oferecidas, pelas broncas, conselhos e amizade. Entre uma lista de professores a escolher, fiz a escolha certa. OBRIGADA!

Claro que não deve faltar amigos e colegas que tanto me ajudaram e me aturaram tanto no laboratório como nas crises emocionais, falo de Aline, Jennifer, Anaca, Jáfia, Talita, Fernanda Crunfli, Andressa, Fernando, Cléo, Vilson, Zé Maria, Paloma, Eduardo, Belmiro, Mônica, Angélica, todos do laboratório do professor Britto e ao Centro A Caminho da Luz, onde encontrei pessoas maravilhosas, que me ajudam a tentar buscar o equilíbrio de todos os dias.

Agradeço a FAPESP (processo nº 2014/15966-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão da bolsa e o auxílio a pesquisa durante maior parte do meu mestrado.

Agradeço também a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa e financiamento durante a primeira parte do mestrado.

E por fim agradeço a Deus, por tudo que vem me proporcionando.

RESUMO

ALMEIDA, F.P. **Efeitos do hormônio tireoidiano T3 no sistema nervoso central associados a diabetes melito induzida por aloxana**. 2016. 69 f. (Mestrado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Nos últimos anos tem sido demonstrado que alterações do metabolismo de glicose e deficiência e/ou resistência à insulina no encéfalo podem estar relacionadas às doenças neurodegenerativas, sugerindo que a Diabetes Melito (DM) tenha uma relação com tais doenças, como a Doença de Alzheimer (DA). Além dessa relação vários estudos sugerem uma modulação dos hormônios tireoideanos (HT) sobre a sinalização de insulina e a função do sistema nervoso, e que sua falta ou seu excesso estão envolvidos em sintomas neurológicos. No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos dos HT na função do sistema nervoso adulto. O objetivo desse trabalho foi analisar a relação entre o hipertireoidismo e modificações proteicas no sistema nervoso central, associados a DM. Para isso, ratos Wistar adultos foram injetados com monoidratado de aloxana (ratos diabéticos) ou veículo (ratos euglicêmicos) e tratados com T3 durante 30 dias. Esses animais foram avaliados quanto à atividade motora, estado de ansiedade e desempenho cognitivo de memória em testes comportamentais e quanto às proteínas relacionadas à sinalização de insulina, BDNF e marcadoras de neurodegeneração avaliadas pelos métodos de *immunoblotting*, ELISA e PCR nas regiões do córtex e hipocampo. O tratamento crônico com T3 produziu um efeito ansiolítico e um atraso na aquisição de informações aprendidas, apesar da consolidação não ser modificada, nos animais euglicêmicos. Por outro lado, o T3 promoveu a melhora do processo neurodegenerativo e na via da sinalização da insulina no hipocampo dos animais diabéticos. Esses dados sugerem, de modo geral, um efeito benéfico do HT sobre a função encefálica de animais diabéticos e propõe que estudos mais aprofundados sobre a ação dos HTs no encéfalo adulto pode ser de grande relevância para futuras terapias no tratamento da resistência insulínica encefálica relacionada ao DM.

Palavras chave: Doença de Alzheimer. Diabetes melito. Hormônio tireoideano. Demência. Hipocampo. Insulina.

ABSTRACT

ALMEIDA, F.P. **Effects of thyroid hormone T3 in the central nervous system associated with diabetes mellitus induced by alloxan.** 2016 69 p. Masters thesis (Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

In recent years it has been shown that glucose metabolism disorders and disabilities and / or insulin resistance in the brain may be related to neurodegenerative diseases, suggesting that Diabetes Mellitus (DM) has a relationship with such diseases as Alzheimer's disease (AD). Moreover several studies suggest a modulation of thyroid hormones (TH) on insulin signaling and function of the nervous system, and that their lack or their excess are involved in neurological symptoms. However, little is known about the effects of TH function in the adult nervous system. The objective of this study was to analyze the relationship between hyperthyroidism and protein changes in the central nervous system associated with DM. For this, Wistar adult rats were injected with alloxan monohydrate (diabetic rats) or vehicle (euglycemic rats) and treated with T3 for 30 days. These animals were evaluated for motor activity, state of anxiety and cognitive memory performance in behavioral tests and the protein related signaling insulin, BDNF and markers of neurodegeneration, assessed by immunoblotting method, ELISA and PCR regions of the cortex and hippocampus. Chronic treatment with T3 produced an anxiolytic effect and a delay in the acquisition of learned information, although consolidation not be modified. Furthermore, T3 allowed improvement of the neurodegenerative process and the insulin signaling pathway in the hippocampus of diabetic animals. These data suggest, in general, a beneficial effect of TH on the the brain function of diabetic rats and suggests that depth investigations into the actions of THs in the adult brain can be of great relevance for future treatments for brain insulin resistance related to DM.

Keywords: Alzheimer's disease. Diabetes mellitus. Thyroid hormone. Dementia, Hippocampus. Insulin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Via de sinalização da insulina	15
Figura 2 - Via de sinalização do BDNF.....	18
Figura 3 - Fluxograma ilustrativo dos procedimentos e tratamentos dos animais.....	22
Figura 4 - Imagem do campo aberto.	23
Figura 5 - Imagem do reconhecimento de objeto.	25
Figura 6 - Exemplificação de Head dipping no labirinto em cruz elevado	26
Figura 7 - Glicemia e peso corpóreo dos animais euglicêmicos e diabéticos ao final do tratamento crônico com T3..	32
Figura 8 - Níveis de T3 e TSH dos animais euglicêmicos e diabéticos ao final do tratamento crônico com T3.	33
Figura 9 - Avaliação de emotividade e locomoção durante tratamento crônico com T3 em ratos euglicêmicos e diabéticos.	35
Figura 10 - Avaliação de comportamentos relacionado a memória durante tratamento crônico com T3 em ratos euglicêmicos e diabéticos.	36
Figura 11 - Avaliação de comportamentos relacionado a ansiedade durante tratamento crônico com T3 em ratos euglicêmicos e diabéticos..	37
Figura 12 - Avaliação de comportamentos relacionado a ansiedade durante tratamento crônico com T3 em ratos euglicêmicos e diabéticos..	38
Figura 13 - Efeito do tratamento crônico com T3 sobre a expressão de D2 e TRAP 220 no encéfalo de ratos euglicêmicos e diabéticos.	39
Figura 14 - Efeito do tratamento crônico com T3 sobre a expressão e níveis de BDNF no encéfalo de ratos euglicêmicos e diabéticos..	40
Figura 15 - Efeito do tratamento crônico com T3 sobre os níveis de TrKB no encéfalo de ratos euglicêmicos e diabéticos.	41
Figura 16 - Efeito do tratamento crônico com T3 sobre os níveis de TrKB no encéfalo de ratos diabéticos.....	41
Figura 17 - Efeito do tratamento crônico com T3 sobre a expressão de IR no encéfalo de ratos euglicêmicos e diabéticos.	42
Figura 18 - Efeito do tratamento crônico com T3 sobre os níveis de AKT e em sua fosforilação no hipocampo de ratos euglicêmicos e diabéticos.	43
Figura 19 - Efeito do tratamento crônico com T3 sobre a fosforilação de AKT no córtex de ratos euglicêmicos e diabéticos..	44
Figura 20 - Efeito do tratamento crônico com T3 sobre a fosforilação de GSK3 no encéfalo de ratos euglicêmicos e diabéticos..	45
Figura 21 - Efeito do tratamento crônico com T3 sobre a fosforilação de Tau no encéfalo de ratos euglicêmicos e diabéticos.	46
Figura 22 - Efeito do tratamento crônico com T3 sobre a expressão do peptídeo b amiloide no encéfalo de ratos euglicêmicos e diabéticos.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Cronograma experimental dos testes comportamentais.....	26
Tabela 2 - Resumo dos resultados de comportamento.	48
Tabela 3 - Resumo dos resultados da expressão genica e proteica analisados no hipocampo.....	49

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

AKT = PKB= proteína quinase B

AKT-p = PKB-p = proteína quinase B fosforilada

APP = Proteína precursora de amiloide

β A = Peptídeo beta amiloide

BHE = Barreira hemato encefalica

BDNF = Fator neurotrófico derivado do cérebro

CA = campo aberto

CEUA = Comissão de Ética no Uso de Animais

DA = Doença de Alzheimer

DM = diabetes mellitus

DNA = ácido desoxirribonucleico

DIO 1 = 5' desiodase do tipo 1

D1 = desiodase do tipo 1

D2 = desiodase do tipo 2

D3 = desiodase do tipo 3

dL= decilitros

ERK = Quinase regulada por sinais extracelulares

ERK-p = Quinase regulada por sinais extracelulares fosforilada

EUA = Estados Unidos da America

GLUT 4 = receptor de glicose do tipo 4

GSK3 = Glicogênio sintase quinase 3

GSK3-p = Glicogênio sintase quinase 3 fosforilada

HT = hormônio tireoidiano

ICB = Instituto de Ciencias Biomédicas

IR = receptor de insulina

IRS = substrato do receptor de insulina

Kg = Kilogramas

MAPKs = Proteína quinase ativada por mitógeno

MCD = memória de curta duração

mg = miligrama

MLD = memória de longa duração
NIS = cotransportador de sódio/iodo
PI3K = Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato-3-quinase
RNA = ácido ribonucleico
RNAm = ácido ribonucleico mensageiro
SBCAL = Sociedade Brasileira de Ciências de Laboratórios
Ser = serina
STZ = estreptozotocina
Thy = tirosina
TR = receptores tireoideanos
TRAP 220 = aos receptores do hormônio da tireóide com 220 kDa
TrKB = Tropomiosina receptor quinase B
TSH = Hormônio Estimulante da Tireóide
T3 = 3,5,3'-triiodo-L-tironina
T4 = L-tiroxina
USP = Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Diabetes melito e Demência	13
1.2 Hormônio tireoideano, sinalização de insulina e neurodegeneração	15
1.3 Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)	18
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	20
2.1 Objetivos específicos	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Indução do diabetes	21
3.2 Análise da Glicemia	21
3.3 Tratamento com T3	21
3.4 Análise de T3 e TSH no soro	22
3.5.1 Campo Aberto	23
3.5.2 Teste de Reconhecimento de Objetos	24
3.5.3 Labirinto em Cruz Elevado	25
3.6 Análises proteicas	26
3.6.1 Western blotting	26
3.6.2 ELISA	28
3.6.3 PCR	29
3.7 Análise estatística	29
4 RESULTADOS	30
4.1 Variação da glicemia e variação do peso total entre os grupos	30
4.2 Dosagem de T3 e TSH	32
4.3 Análises comportamentais	33
4.3.1 Campo aberto	33
4.3.2 Reconhecimento de objetos	36
4.4 Análise de expressão gênica e proteica	38
4.4.1 Efeito do tratamento Crônico com T3 sobre a expressão de D2 e níveis TRAP 220	38
4.4.3 Efeito do tratamento Crônico com T3 sobre a expressão de BDNF e seu receptor	39
4.4.2 Efeito do tratamento crônico com T3 sobre proteínas envolvidas na sinalização de IR ($R\beta$)	42
4.4.3 Efeito do tratamento Crônico com T3 sobre proteínas relacionadas a neurodegeneração	44
4.5 Resumo dos resultados	47
5 DISCUSSÃO	50
6 CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS*	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes melito e Demência

A manutenção da glicemia em níveis normais é atingida pelo equilíbrio entre a capacidade dos tecidos periféricos (músculo, tecido adiposo, fígado) de absorver glicose para dentro das células e a capacidade do pâncreas de secretar insulina, hormônio responsável pela absorção de glicose nos tecidos (DeFRONZO, 2000). A diabetes melito (DM) (normalmente referida apenas como diabetes) é uma desordem metabólica complexa caracterizada por hiperglicemia e é o resultado de defeitos relativos ou absolutos na secreção e/ou ação da insulina. Consequentemente, a glicose não é eficientemente transportada e metabolizada nos órgãos-alvo. A diabetes mellitus pode ser classificada em duas categorias: tipo 1 e tipo 2, sendo que a do tipo 2 responde nos Estados Unidos por cerca de 90-95% de todos os casos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013). Já no Brasil, segundo a Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia, baseada no censo IBGE 2010, o número oficial de pacientes com diabetes já chega a 12 milhões.

No encéfalo, a glicose carregada pela corrente sanguínea é transportada através da barreira hematoencefálica e posteriormente para o interior das células neurais. Vários estudos têm demonstrado o papel da glicose como principal nutriente do encéfalo, documentando seu metabolismo e controle, bem como mostrado que regiões cerebrais relacionadas com aprendizado e memória, tais como hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal, exibem aumento da utilização de glicose, evidenciada por estudos que utilizam técnicas de tomografia por emissão de pósitrons. Além disso, esses estudos têm indicado que a insulina afeta várias funções cerebrais incluindo cognição e memória (ALKIRE et. al., 1998; HOYER, 2002; KILPATRICK et. al., 2003; SWARTZ et. al., 1995; TALLEY et. al., 2002;).

Nos últimos anos, tem sido sugerido que alterações no metabolismo de glicose e a deficiência e a resistência à insulina no encéfalo podem estar relacionadas à Doença de Alzheimer (DA) (DE LA MONTE et. al., 2005; GASPARINI et al., 2002; HOYER et. al., 2004; SALKOVIC-PETRISIC et. al., 2006). Essa relação entre DA e alteração do metabolismo de glicose encefálico tem sido considerada em parte pelo fato de pacientes com DM apresentarem comprometimento cognitivo, especialmente pacientes idosos com DM tipo 2, onde o principal fator é a resistência à insulina (BIESSELS et. al., 2005). Neste contexto, vários trabalhos mostram, por exemplo,

que pacientes com DM tipo 1 apresentam prejuízos de aprendizagem e memória quando comparados à população geral saudável (revisado em DUARTE, 2015). Junto a esses déficits de função cerebral o diabetes também pode induzir alterações estruturais como perda neuronal, desmielinização e gliose. Além disso, algumas regiões do encéfalo que apresentam expressão mais abundante de insulina e de receptores de insulina, como, hipocampo, lobo temporal e diencéfalo, são os alvos mais vulneráveis aos processos neurodegenerativos da DA (DE LA MONTE et. al. 2005; GAMMELTOFT et. al. 1985). Assim, a DA pode ser considerada como uma forma de diabetes encefálico, que tem elementos de resistência à insulina e deficiência insulínica. Para consolidar esse conceito, foi proposto que a DA poderia se referida como “Diabetes tipo 3” (RIVERA et. al., 2005; STEEN et. al., 2005).

A sinalização da insulina na célula (**Figura 1**) é mediada por duas vias de transdução: a via da quinase fosfatidil-inositol3 (PI3 quinase) e a via de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) que controlam a captação de glicose pelas células (JOHNSTON et al., 2003). Essa sinalização inicia-se com a ativação do receptor de insulina (IR), que resulta na estimulação e fosforilação de seus substratos IRS (IRS1-IRS4) e Shc (BOURA-HALFON; ZICK, 2009; SUN ; LIU, 2009). As IRS servem como sítios para moléculas de sinalização com domínios SH2 tais como PI3K, que é crucial para a ativação da proteína AKT (BOURA-HALFON et. al., 2009). A insulina aumenta a atividade da proteína quinase AKT, que por sua vez, inibe a GSK3 por fosforilação do resíduo de Ser9 em GSK3 β ou de Ser21 em GSK3 α (FRAME et al. 2001). A inativação de GSK3, principalmente sua isoforma beta, pode ser mediada também pelas MAPKs (THORNTON et. al., 2008). Além da regulação de GSK3 por fosforilação em Serina, GSK3 β e GSK3 α podem ser reguladas por atividade em Tirosina (Tyr), fosforilando resíduos 216 ou 279, respectivamente. Sob condições fisiológicas, quando GSK3 é fosforilada nos resíduos Tyr 216 e Tyr 279 leva a um aumento na atividade desta proteína (BHAT et. al., 2000).

No contexto da DA, é interessante notar que a via da PI3 quinase está relacionada também com a regulação do peptídeo β Amilóide (β A) e com a fosforilação da proteína associada a microtúbulo Tau (ISHIGURO et. al., 1993; PHIEL et. al., 2003; SALKOVIC-PETRISIC et. al., 2006), os dois principais marcadores histopatológicos da DA. Assim, alterações no metabolismo do β A e na fosforilação balanceada da proteína Tau geradas por distúrbios das vias de

sinalização da insulina poderiam acarretar na DA. Deficiências na sinalização encefálica de insulina parecem contribuir para a neurodegeneração devido a: (i) ativação anormal de quinases que fosforilam a proteína Tau; (ii) expressão da proteína precursora do peptídeo amiloide (APP) e acúmulo de β A; (iii) oxidação e estresse de retículo endoplasmático; (iv) geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que causam danos a proteínas, RNA, DNA e a lipídeos; (v) disfunção mitocondrial; (vi) ativação pro-inflamatória e de cascata de morte celular programada; (vii) queda da regulação de genes que medeiam a homeostase colinérgica. Junto a esses efeitos da resistência à insulina, sistemas envolvidos em processos de plasticidade neural, memória e cognição, são significativamente comprometidos (ADOLFSSON et. al., 1980; CASELLI, et. al., 2008; FUJISAWA et. al., 1991; LANGBAUM et. al., 2010; MOSCONI et. al., 2008; 2009).

Figura 1 - Via de sinalização da insulina (HONG et. al., 1997)

1.2 Hormônio tireoideano, sinalização de insulina e neurodegeneração

Além da relação entre disfunções da sinalização de insulina e a DA, vários estudos sugerem uma modulação dos hormônios tireoideanos (HTs) sobre a sinalização de insulina e sobre a função do sistema nervoso (BRUNETTO et. al., 2012; JOHNSON, 2006; MIAO, et. al., 2011). Os HTs são importantes reguladores do crescimento, desenvolvimento e metabolismo. As ações da 3,5,3'-triiodo-L-tironina (T3) e da L-tiroxina (T4) podem ocorrer pela sua ligação ao receptor nuclear dos HTs regulando a expressão gênica (WU; KOENING, 2000; YEN et. al., 2006;

ZHANG; LAZAR, 2000). Apesar de T3 representar apenas 10% da produção da glândula tireóide e T4 representar 90%, T3 é a forma biologicamente ativa que se liga ao receptor, sendo o T4 considerado como um pró-hormônio (CATALDO et. al., 2001). Dessa forma, ocorre um processo de desiodação que converte T4 a T3 que é catalisado pelas desiodases do tipo I, II e III (D1, D2, D3, respectivamente), sendo D2 encontrada na tireóide, cérebro, hipófise anterior, tecido adiposo marrom, coração, músculo esquelético e placenta, e a principal responsável pelo T3 circulante (BIANCO; KIM, 2006). Estudos demonstram que existe uma alta densidade de receptores para T3 no encéfalo de ratos, e a sua distribuição espacial e regional foram descritas tanto durante o desenvolvimento como no encéfalo adulto (LUNARDELLI et. al., 2007; SMITH et. al., 2002;). Esses receptores foram encontrados, por exemplo, na região da amígdala, hipocampo, córtex e cerebelo (DUSSALT, 1987).

A transferência de T4 e T3 através da barreira hematoencefálica é mediada por transportadores do hormônio tireoideano como o transportador de monocarboxilato 8 (MCT8) e o polipeptídeo transportador de ânion orgânico 1 (OATP1). A atividade de D2 em astrócitos converte T4 para T3 de forma ativa, o que influencia a biodisponibilidade do HT para locais dentro do encéfalo (KAPOOR, et. al., 2015).

A relação entre alterações dos HTs e diabetes vem sendo investigada desde 1927, por Coller e Huggins, que apontaram uma associação do hipertireoidismo e o agravamento do diabetes. Eles mostraram que a remoção cirúrgica de partes da glândula tireóide resultava em restauração da tolerância à glicose em pacientes hipertireoideos que sofriam de diabetes. Os HTs estimulam a expressão, bem como a atividade das enzimas das vias glicolítica e oxidativa, mecanismo pelo qual aceleram o processo de metabolização da glicose, o que leva à redução do seu conteúdo intracelular e à geração de um gradiente que favorece sua entrada nas células (CHEN-ZION et. al., 1995). Um outro estudo mostrou que a expressão proteica e a porcentagem do transportador de glicose do tipo 4 (GLUT4) presente na membrana plasmática estão reduzidas no músculo esquelético e tecido adiposo de ratos hipotireoideos e que a administração de T3 aumenta rapidamente (30 min) o conteúdo de GLUT4 na fração correspondente à membrana plasmática desses tecidos (BRUNETTO et. al., 2012). Além disso, um trabalho recente enfatiza que a presença de auto-anticorpos de tiroperoxidase no DM tipo 1 é altamente preditivo para o desenvolvimento da disfunção tireoidiana, sendo que, nesse mesmo trabalho

verificaram uma maior frequência global de diagnósticos de hipotireoidismo em pacientes com DM tipo 1 em relação a DM tipo 2. Esse trabalho sugere, portanto, que o diabetes e o hipotireoidismo são condições mútuas, aplicando-se tanto aos pacientes com DM tipo 1 como DM tipo 2, embora os pacientes com DM tipo 1 sejam os mais predispostos (JOFFE; DISTILLER, 2014).

Em relação ao sistema nervoso, o papel dos HTs tem sido mais investigado nos períodos embrionário e pós-natal e pouco se sabe sobre seu papel no encéfalo adulto. No entanto, o hipotireoidismo em indivíduos adultos vem sendo associado a diversos sintomas neurológicos, incluindo anormalidades afetivas e déficit cognitivo, ataxia cerebelar, falta de coordenação dos movimentos, perda de memória, alucinação, confusão e comportamento psicótico que podem ser tão graves como em doenças neurodegenerativas (NASSIF; RIBEIRO, 2012; SMITH et. al., 2002). Buras e colaboradores (2014) mostraram que o hipotireoidismo no início da fase adulta de ratos machos pode produzir um efeito ansiogênico leve.

Já os sintomas do hipertireoidismo incluem nervosismo, tremor, estupor, taquicardia, ansiedade, paranoia, sintomas de mania e depressão afetiva (HALL, 1983; REUS, 1986). Alguns dados também sugerem que os HTs participam da modulação do metabolismo da glicose no encéfalo adulto, e alterações cerebrais induzidas pela tireotoxicose poderiam ser recuperadas quando os níveis de HTs são normalizados (MIAO et. al., 2011).

O hipotireoidismo tem sido considerado uma causa secundária reversível de demência (CUMMINGS, 1992; HORVATH et. al., 1989). O declínio cognitivo muitas vezes aparece concomitante ao envelhecimento e é particularmente associada a declínios hormonais, particularmente dos HTs (LOOSEN, 1992), juntamente com vários distúrbios psiquiátricos e desmielinizantes. Além disso, podemos destacar o importante fato de que a disfunção da tireóide tem sido citada como um possível fator de risco para a DA, sendo que já foi descrito uma redução na expressão do receptor de HTs no hipocampo de pacientes com DA (CALZÀ, 1997; KUNG et. al., 1992; LOOSEN, 1992;). Vale ressaltar que alguns trabalhos apontam para uma relação inversa entre os níveis de HTs e a proteína APP precursora do peptídeo β A (CONTRERAS-JURADO; PASCUAL, 2012; O'BARR et. al., 2006).

1.3 Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)

O BDNF é um membro da família dos fatores neurotróficos que desempenha um papel fundamental na regulação da sobrevivência, crescimento e manutenção dos neurônios (MATTSON et. al., 2004). Os dados sobre a expressão do BDNF e sua sinalização fisiológica ou significado fisiopatológico ainda estão sendo explorados. No entanto, dada a importância dos fatores neurotróficos no cérebro, o reconhecimento da participação do BDNF em doenças neurológicas e psiquiátricas vem aumentando (NOWACKA; OBUCHOWICZ, 2013; NUMAKAWA et. al., 2013; ZAGREBELSKY; KORTE, 2014). O BDNF apresenta alta afinidade pelo receptor tirosina quinase B (TrkB), e essa ligação está envolvida no desenvolvimento e maturação dos sistemas nervosos central e periférico (YOSHII; PATON, 2010). Membros intracelulares relacionados à cascata de sinalização de TrkB incluem ERK/MAPK e PI3K/PKB (**Figura 2**; ALMEIDA et. al., 2005; HETMAN et. al., 1999,). A diminuição da produção de BDNF parece ser um fator patogênico comum a DA e a depressão (TSAI, 2003). Amostras de hipocampo de doadores com DA apresentam diminuição da expressão de BDNF (CONNOR et. al., 1997). Além disso, outros estudos mostram redução nos níveis plasmáticos de BDNF em indivíduos com DA (GEZEN-AK et. al., 2013; LASKE et. al., 2006).

Figura 2 - Via de sinalização do BDNF (PRAKASH ; MARTIN, 2014)

No contexto do diabetes, é interessante notar que o BDNF reduz a ingestão de alimentos e reduz os níveis de glicose no sangue em ratos diabéticos obesos. O

efeito hipoglicemiante do BDNF não pode ser atribuído somente ao efeito hipofágico, porque a administração de BDNF tem efeitos benéficos na homeostase da glicose e melhora a resistência à insulina em camundongos (db/db), mesmo quando a ingestão de alimentos está controlada (NAKAGAWA et. al., 2000; ONO et. al., 1997; TONRA et. al., 1999,). Um estudo em humanos demonstrou que BDNF é inibido durante o estado hiperglicêmico, ou seja, BDNF é regulado negativamente por altos níveis de glicose no plasma, podendo assim explicar os baixos níveis circulantes de BDNF em indivíduos com diabetes tipo 2 (KRABBE et. al., 2007).

Parece existir também uma relação entre o BDNF e os HTs (ABEDELHAFFEZ; HASSAN, 2013; CORTÉS et. al., 2012; SUI; Li, 2009). Níveis basais de BDNF e de moléculas sinalizadoras envolvidas na plasticidade sináptica (por exemplo, a calcineurina, CREB, MAPK), são reduzidas em ratos após a remoção cirúrgica da glândula tireoide na idade adulta (GILBERT et. al., 2013). Por outro lado, outro estudo verificou que a quantidade de RNAm de BDNF foi maior no hipocampo de ratos com hipotireoidismo (CORTÉS et. al., 2012).

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Dados da literatura sugerem que a prevalência do hipotireoidismo aumenta com a idade, quando alterações nos processos cognitivos são mais frequentes, e que, ao contrário do que ocorre no período embrionário e neonatal, as ações dos HTs sobre o sistema nervoso adulto, embora de extrema relevância, são muito pouco exploradas (NASSIF; RIBEIRO, 2012; SMITH, et. al., 2002). Deste modo, considerando que pouco se sabe sobre o papel dos HTs no encéfalo adulto e que sua falta parece estar relacionada a sintomas de demência e déficits cognitivos, e ainda, que deficiências na via de sinalização de insulina e da via das MAPKs no encéfalo podem estar relacionadas à DA, os objetivos desse trabalho foram avaliar a relação entre o hipertireoidismo e modificações proteicas no sistema nervoso central associadas ao DM e a DA, investigando os efeitos do HT sobre cascatas relacionadas à sinalização de insulina, manutenção, crescimento celular no sistema nervoso e alterações comportamentais de ratos diabéticos adultos.

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do T3 em ratos adultos sobre a expressão de proteínas relacionadas à sinalização de insulina e marcadoras de degeneração nas regiões do córtex e hipocampo;
- Avaliar o efeito do T3 em ratos adultos diabéticos sobre a expressão de proteínas relacionadas à sinalização de insulina e marcadoras de degeneração nas regiões do córtex e hipocampo;
- Avaliar o efeito do T3 em ratos adultos sobre os comportamentos motor, cognitivo e relacionado à ansiedade;
- Avaliar o efeito do T3 em ratos adultos diabéticos sobre os comportamentos motor, cognitivo e relacionado à ansiedade.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados nesse estudo 175 ratos Wistar machos adultos (300-350 gramas de peso corpóreo), obtidos do Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. O protocolo empregado está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do ICB/USP (Protocolo nº 148, folha 14 do livro 03 de 2014). O protocolo de tratamento dos animais com a droga diabetogênica e com o HT está representado na **Figura 3**.

3.1 Indução do diabetes

Os animais receberam uma única administração intraperitoneal de monidrato de aloxana (150 mg/Kg de peso corpóreo) ou o mesmo volume de salina após 16 horas de jejum.

3.2 Análise da Glicemia

No 15º dia após a injeção de monidrato de aloxana uma gota de sangue foi obtida através da perfuração da ponta da cauda dos animais. Essa amostra de sangue foi aplicada sobre a fita teste e colocada para leitura no glicosímetro (Accu-Chek Active, Roche), sendo os resultados obtidos em mg/dL. Após o teste foram considerados diabéticos e aptos para o tratamento com o T3 os animais que apresentaram glicemia superior a 250 mg/dL.

3.3 Tratamento com T3

Os animais que receberam salina (euglicêmicos) e aloxana (diabéticos) foram então subdivididos nos seguintes grupos:

- Grupo euglicêmico tratado com salina (C = controle);
- Grupo diabético tratado com salina (D);
- Grupo euglicêmico tratado com doses suprafisiológicas de T3 – 1,5 µg/100 g de peso corporal (T3);

- Grupo diabético tratado com doses suprafisiológicas de T3 – 1,5 µg/100 g de peso corporal (DT3).

Figura 3 - Fluxograma ilustrativo dos procedimentos e tratamentos dos animais.

3.4 Análise de T3 e TSH no soro

Após a eutanásia dos animais o sangue foi coletado e centrifugado (3500rpm, por 15 minutos em temperatura ambiente). O soro coletado do sobrenadante foi enviado para análises hormonais (Instituto de Gênese de Análises Científicas), com a colaboração do laboratório de Fisiologia Endócrina: Regulação Hormonal e Expressão Gênica de nosso departamento e coordenado pela Profa. Maria Tereza Nunes. Somos colaboradores da Profa. Maria Tereza no seu projeto Temático FAPESP (Processo 2013/05629-4): “AÇÕES GENÔMICAS VS NÃO GENÔMICAS DOS HORMÔNIOS TIREOIDEANOS: MUDANÇAS DE PARADIGMAS, IMPLICAÇÕES FISIOLÓGICAS E PERSPECTIVAS TERAPÊUTICAS”.

3.5 Testes comportamentais

O cronograma experimental dos testes comportamentais está especificado na Tabela 1.

3.5.1 Campo Aberto

Campo aberto foi originalmente descrito por Hall (1934) como sendo um teste para o estudo da emotividade em ratos que avalia a atividade exploratória do animal. O procedimento consiste em submeter um animal, normalmente um roedor, a um ambiente desconhecido a partir dos quais a fuga é impedida por paredes circunvizinhas (WALSH; CUMMINS, 1976).

Após 24 dias de início do tratamento com o HT, a atividade motora geral e emocionalidade dos ratos foi observada em uma arena de campo aberto (CA) **(Figura 4)**. O aparato utilizado consiste de uma arena circular de acrílico (60 cm de diâmetro e 50 cm de altura), subdividida em 12 quadrantes. A arena se encontra em uma sala isolada do observador, com iluminação adequada e sem ruídos, contendo uma filmadora acoplado a um tripé. Os filmes foram então analisados utilizando-se contadores manuais para estabelecer os escores do parâmetro comportamental de ambulação (número de quadrantes invadidos na periferia; número de quadrantes invadidos na periferia + invadidos no centro; número de levantadas (número de vezes que o animal fica apoiado apenas com as patas traseiras), emocionalidade (número de quadrantes invadidos no centro; defecação).

Figura 4 - Imagem do campo aberto.

3.5.2 Teste de Reconhecimento de Objetos

A formação da memória é um processo complexo que exige diferentes sistemas cerebrais que atuam em concordância, tendo algumas estruturas como hipocampo, córtex entorrinal, regiões do córtex e da amígdala envolvidos nessa formação (IZQUIERDO et. al., 2006). A tarefa de reconhecimento de objetos é um paradigma de aprendizagem de um julgamento semelhante à tarefa de esQUIVA passiva, permitindo a avaliação da aquisição, consolidação ou recuperação de informações separadamente (objetos) (BERNABEU et. al., 1995, 1996). A formação da memória de longo prazo leva várias horas, durante o qual tempo das memórias dependem de sistemas de curto prazo (IZQUIERDO et. al., 1998).

Na tentativa de avaliar possíveis alterações cognitivas, especialmente relacionadas à memória, nos animais diabéticos e naqueles tratados com o HT, realizamos um teste comportamental simples que se baseia no reconhecimento de objetos.

O procedimento foi realizado na mesma arena do CA (**Figura 5**), iniciando a habituação 6 dias antes (39º dia) da eutanásia. Nos três dias anteriores ao teste os animais passaram por 3 sessões de habituação na arena, por 10 minutos. Na sessão de treinamento são apresentados dois objetos semelhantes (A e B), aguardando-se a exploração dos objetos por 5 minutos. A memória de curta duração (MCD) foi verificada após 1 hora e 30 minutos da sessão de treinamento, quando se apresenta ao animal um dos objetos do treino (A) e um objeto diferente (C). A memória de longa duração (MLD) foi verificada após 24 horas da sessão de treinamento, quando se apresenta ao animal um dos objetos do treino (A) e um novo objeto (D). Foram considerados como parâmetros de avaliação o tempo de exploração e o número de vezes em que o animal alterna entre os objetos, observados durante 5 minutos. O índice de reconhecimento foi estabelecido pelo tempo gasto em explorar o novo objeto dividido pela soma dos tempos gastos para explorar o novo objeto e o objeto familiar.

Figura 5 - Imagem do reconhecimento de objeto.

3.5.3 Labirinto em Cruz Elevado

Labirintos Elevados são métodos amplamente utilizados para explorar as bases neurobiológicas da ansiedade (PINTO et. al. 2012, SHEPHERD et. al., 1994), principalmente o labirinto em “X” e o labirinto em cruz elevado (PINHEIRO et. al 2007). Tanto o labirinto em “X” elevado (HANDLEY; MITHANI, 1984) como o labirinto em cruz elevado (PELLOW et. al., 1985) consistem em dois braços fechados por paredes opostas, exceto na extremidade central. Estes braços fechados são perpendiculares a dois braços abertos de dimensões iguais, as quais estão desprovidas de qualquer parede.

Após 29 dias de início do tratamento com HT, o estado de ansiedade dos animais foi avaliado no teste do Labirinto em Cruz Elevado. O aparato consiste de uma estrutura com quatro braços, elevados 40 cm do chão e conectados por uma área central. Dos quatro braços, dois são fechados (paredes acrílicas) e dois são abertos. Os animais foram colocados individualmente na área central do aparato, e avaliados quanto: aos tempos que permaneciam nos braços fechados e abertos; tempo na plataforma central; número de entradas no braço aberto e fechado; número de cruzamentos entre os braços; *head dipping* no braço aberto (número de vezes que o animal coloca a cabeça abaixo da altura do braço, **figura 6**).

Figura 6 - Exemplificação de Head dipping no labirinto em cruz elevado

Início dos testes	TESTE
39° dia	Campo aberto + habituação na arena
40° dia	Habituação na arena
41° dia	Habituação na arena
42° dia	Reconhecimento de objeto (curta duração)
43° dia	Reconhecimento de objeto (longa duração)
44° dia	Labirinto em cruz elevado
45° dia	Eutanásia

Tabela 1 - Cronograma experimental dos testes comportamentais

3.6 Análises proteicas

3.6.1 Western blotting

Após 30 dias de início do tratamento com o HT, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (diabéticos: 4 mg / 100 g de peso corporal; não diabéticos: 9 mg /100 g de peso corporal), decapitados e as regiões do hipocampo e do córtex foram coletadas e homogenizadas em tampão de extração (Tris 1M, EDTA 200 mM, SDS 10%, Fluoreto de sódio, Pirofosfato de sódio, Ortovanadato de sódio) com um

homogenizador do tipo Polytron. Os homogeneizados foram centrifugados a 12.000 rpm por 30 minutos a 4 °C em uma centrífuga modelo 5804R (Eppendorf;, Alemanha, Hamburgo) e as concentrações proteicas do sobrenadante foram avaliadas usando uma solução para ensaio colorimétrico (método de Bradford, Dye Reagent Concentrate, Bio-Rad). Amostras dos sobrenadantes contendo 30-40 µg de proteínas total foram tratadas com tampão Laemmli contendo ditioneitol (DTT) 100 mM e submetidas à eletroforese em géis de acrilamida a 6,5 – 15% contendo dodecil sulfato de sódio utilizando uma cuba para mini-gel (Mini-Protean 3; Bio-Rad). Após a separação eletroforética, as proteínas foram eletro-transferidas para membranas de nitrocelulose (0,45 µm de diâmetro) utilizando-se um sistema de transferência (Trans-Blot cell system; Bio-Rad), em tampão contendo SDS. Após a transferência, as membranas foram incubadas em solução de bloqueio contendo 5% de leite desnatado em pó em salina tamponada contendo Tween 20 (TTBS; 0,01M de Tris-HCl, pH 7,4 0,15 M de NaCl, 0,05% de Tween 20) durante pelo menos duas horas sob agitação leve. Após esse período, as membranas foram lavadas três vezes de 10 minutos com TTBS e incubadas à 4 °C, sob leve agitação “overnight” com os seguintes anticorpos primários: um anticorpo policlonal de coelho anti-βA (H-43; Santa Cruz Technology, Santa Cruz, CA, USA), um anticorpo policlonal de cabra anti-Tau fosforilada (pSer199/202; Sigma), um anticorpo policlonal de coelho anti-IR), um anticorpo monoclonal de camundongo anti-GSK3 α/β, um anticorpo monoclonal de camundongo anti-GSK3 α/β fosforilada, um anticorpo policlonal de coelho anti-AKT, um anticorpo policlonal de coelho anti-AKT 1/2/3 (sito) fosforilada, um anticorpo policlonal de coelho anti-TrKB, um anticorpo policlonal de cabra anti-TRAP 220, um anticorpo monoclonal de camundongo anti-GAPDH como controle interno (Santa Cruz Technology, Santa Cruz, CA, USA), no geral diluídos 1:1000. Usamos também preto de amido nas membranas para uso do numero total de proteína como controle interno adicional. Em seguida, as membranas foram lavadas 3 vezes de 10 minutos em TTBS e incubadas por 2 horas com anticorpos secundários anti-camundongo, anti-coelho ou anti-cabra, conjugados com peroxidase (Santa Cruz Technology, Santa Cruz, CA, USA), diluídos 1:10.000 em solução para incubação contendo 1% de leite desnatado e TTBS. Novamente as membranas foram lavadas 3 vezes de 10 minutos e a ligação específica do anticorpo com a proteína foi revelada utilizando o método quimioluminescente (Luminol 2,5 mM, Ácido p-cumárico 400µM, Tris pH 8,5 1M, H₂O₂ 30%). Após revelação, as

bandas foram analisadas quanto à densidade óptica da imunorreatividade usando-se o programa Image J 1.46r (Wayne Rasband – National Institute of Health/USA).

3.6.2 ELISA

A detecção dos níveis de BDNF foi realizada utilizando o Kit BDNF Emax® ImmunoAssay System (Promega, Madison, WI, EUA) seguindo as especificações do fabricante. Resumidamente, microplacas de 96 poços foram incubadas com 100 µL de anticorpo monoclonal anti-BDNF diluído 1:1000 em tampão carbonato (NaHCO_3 25 mM, Na_2CO_3 25 mM, pH 9,7). A placa foi selada e incubada overnight a 4 °C e lavada com salina tamponada com Tris contendo Tween (TBST; Trizma 20 mM (pH 7,6), 150 mM NaCl, 0,05% de Tween 20) e então foram adicionados 200 µL/poço de tampão de bloqueio e amostra. A placa foi selada novamente e incubada à temperatura ambiente durante 1 hora. A placa foi lavada três vezes e 100 µL das amostras (diluídas 1:4 e 1:8 para o córtex e hipocampo, respectivamente) ou do padrão de BDNF (diluições seriadas 1:2 de 500 a 0 pg de BDNF/mL) foram adicionados a cada poço em duplicata. A placa foi selada e incubada durante 2 horas à temperatura ambiente com agitação. Após esse período a placa foi então lavada cinco vezes com TBST. Um anticorpo policlonal anti-BDNF diluído a 1:500 em tampão de bloqueio e amostra foi adicionado (100 µL por poço) e a placa incubada por 4 horas a temperatura ambiente com agitação. A placa foi lavada cinco vezes e a ligação específica detectada pela subsequente incubação com 100 µL/poço de anti-IgY conjugado a peroxidase (diluído a 1:200 em tampão de bloqueio e de amostra) por 1 hora à temperatura ambiente com agitação e protegida da luz. A placa foi lavada mais cinco vezes e incubada por 10 minutos em agitação a temperatura ambiente com 100 µL/poço de TMB One Solution. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de HCl 1 N por poço. Finalmente, a absorbância foi obtida em um espectrofotômetro a 450 nm.

3.6.3 PCR

Após 30 dias de início do tratamento com o HT, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (diabéticos: 4 mg/100 g de peso corporal; não diabéticos: 9 mg/100 g de peso corporal), decapitados e o hipocampo foi coletado em TRIzol (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e o RNA total foi extraído de acordo com as instruções do fabricante. A integridade do RNA, a reação de transcrição reversa (RT) e a reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa em tempo real foram obtidas conforme descrito previamente (SERRANO-NASCIMENTO et. al., 2010). O PCR em tempo real foi realizado com *Platinum SYBER Green quantitative PCR SuperMix UDG* e primers específicos para BDNF (*sense*: AAGTGCCTTTGGAGCCTCCT; *anti-sense*: GCTAATACTGTCACACACGC), *Desiodade 2* (*sense*: GGACCGATGTGCTGCAGCCC; *antisense*: TTCAAAGGCTACCCCATAAG), IGF-1 (*sense*: AAGCCTACAAAGTCAGC; *antisense*: GGTCTTGTTTCCTGCACT) e ciclofilina, usado como controle interno (*sense*: CTGTCTCTTTTCGCCGCTTG; *anti-sense*: TCTGCAAACAGCTCGAAGCA). Esses experimentos foram realizados junto ao laboratório de Fisiologia Endócrina: Regulação Hormonal e Expressão Gênica do Instituto de Ciências Biomédicas – USP.

3.7 Análise estatística

Os valores obtidos em nossas metodologias foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média (S.E.M.) e submetidos à análise de variância ANOVA de duas vias com pós teste de Newman Keuls para comparações de mais de um tratamento, quando comparados mais de dois grupos, com exceção dos resultados glicêmicos, que usamos na análise o teste t-student. O nível de significância adotado em todas as análises foi de $p < 0,05$.

Marcações de resultados significativos serão apresentadas nos próprios gráficos apenas para os resultados do pós-teste, sendo que os resultados da análise de variância ANOVA de duas vias serão apresentados em tabelas abaixo de cada gráfico.

4 RESULTADOS

4.1 Variação da glicemia e variação do peso total entre os grupos

A **Figura 7** mostra as variações dos níveis glicêmicos (medidas realizadas em jejum de 6 horas) e do peso corpóreo desses animais durante o período de tratamento com HT. Segundo as análises, os valores glicêmicos dos animais diabéticos (grupo D) apresentaram um aumento em seus níveis ao final do tratamento com o T3 (44º dia) quando comparados ao início do tratamento (14º dia) (**Figura 7(A)**; $p=0,0105$, $n=14$). Já o grupo DT3 teve uma relação inversa, apresentando uma queda em seus níveis glicêmicos ao final do tratamento, quando comparados ao início do tratamento (**Figura 7(B)**; $p=0,0343$, $n=16$). Quando comparamos os valores iniciais, no 14º dia, entre os grupos D e DT3, não obtivemos diferenças significativas (**Figura 7(C)**), mas quando comparamos ao final do tratamento (44º dia), observamos uma queda nos níveis glicêmicos do grupo DT3 em relação ao grupo D (**Figura 7 (D)**; $p=0,001$; $n=16$). Curiosamente observamos um aumento glicêmico no 44º dia nos grupos T3 quando comprado ao 14º dia (**Figura 7 (F)**; $p= 0,045$; $n=5$), não existindo diferenças glicêmicas nos grupos controles (**Figura 7 (E)**; $n=5$), Já o peso corporal dos animais diabéticos apresentou uma redução de 32,22% em relação aos animais euglicêmicos (**Figura 7 (G)**; $p < 0,0001$, $n= 20$ a 25).

Figura 7 - Glicemia e peso corpóreo dos animais euglicêmicos e diabéticos ao final do tratamento crônico com T3. Em (A) são mostrados a comparação entre os animais do grupo D no 14° e 44° dia de tratamentos, os dados foram expressos pela média $\pm$ SEM obtidos utilizando-se a análise de t-student * $p=0,0105$, em (B) são mostrados a comparação entre os animais do grupo DT3 no 14° e 44° dia de tratamentos, os dados foram expressos pela média $\pm$ SEM obtidos utilizando-se a análise de t-student * $p=0,0343$, (C) comparação de níveis glicêmicos entre os grupo D e o grupo DT3 no 14° dia os dados foram expressos pela média $\pm$ SEM obtidos utilizando-se a análise de t-student $p<0,05$. (D) comparação de níveis glicêmicos entre os grupos D e DT3 no 44° dia os dados foram expressos pela média $\pm$ SEM obtidos utilizando-se a análise de t-student ** $p=0,01$, (E) são mostrados a comparação entre os animais do grupo C no 14° e 44° dia de tratamentos, os dados foram expressos pela média $\pm$ SEM obtidos utilizando-se a análise de t-student, (F) são mostrados a comparação entre os animais do grupo T3 no 14° e 44° dia de tratamentos, os dados foram expressos pela média $\pm$ SEM obtidos utilizando-se a análise de t-student * $p<0,05$, (G) média dos valores dos pesos dos animais ao longo do tratamento, os dados foram expressos pela média $\pm$ SEM obtidos utilizando-se a análise de variância ANOVA de duas vias seguida pelo teste de comparações múltiplas Newman-Keuls (euglicêmicos vs diabéticos*** $p<0,0001$).

4.2 Dosagem de T3 e TSH

A **Figura 8** mostra os resultados da dosagem de T3 e TSH. Os níveis de T3 apresentaram um aumento de 18,50 % nos animais diabéticos quando comparados aos euglicêmicos (**Figura 8 (A)**; $p=0,0288$; $F=5,7$; $n=3$ a 8). Já os níveis de TSH apresentaram uma diminuição de aproximadamente 95,08 % nos grupos tratados com T3 em relação aos não tratados com o hormônio (**Figura 8 (B)**; $p=0,0003$; $F=20,69$; $n=3$ a 8 animais). Já os níveis séricos de T4 nos grupos T3 e D estiveram reduzidos em relação ao grupo controle (**Figura 8 (C)**; $n=3$ a 8 animais).

Figura 8 - Níveis de T3 e TSH dos animais euglicêmicos e diabéticos ao final do tratamento crônico com T3. Dados expressos pela média $\pm$ SEM e obtidos utilizando-se a análise de variância ANOVA de duas vias seguida pelo teste de comparações múltiplas Newman-Keuls; $p < 0,05$. Em **(A)** dosagem dos níveis séricos de T3, euglicêmicos vs diabéticos ** $p = 0,0288$, **(B)** dosagem dos níveis séricos TSH, tratados com T3 vs não tratados com T3 * $p = 0,0003$, **(C)** dosagem dos níveis séricos de T4, C vs T3 *** $p < 0,001$, C vs D * $p < 0,05$.

4.3 Análises comportamentais

4.3.1 Campo aberto

A **Figura 9** apresenta os resultados de avaliação de locomoção e emotividade no teste de campo aberto em um intervalo de 5 minutos. Não observamos diferenças nos comportamentos motores horizontais totais e motores verticais entre os grupos

analizados (**Figura 9 (A, B, E)**; $n = 7$ a 15 animais), mas quando olhamos individualmente para o número de quadrantes percorridos no centro da arena observamos uma diminuição de 44,89% do grupo T3 em relação ao grupo C e 35,71 % do grupo D em relação ao grupo C (**Figura 9 (D)**; C vs T3 $p < 0,01$; C vs D $p < 0,05$; $n = 7$ a 15 animais).

Figura 9 - Avaliação de emotividade e locomoção durante tratamento crônico com T3 em ratos euglicêmicos e diabéticos. Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM e foram obtidos utilizando-se a análise de variância ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de comparações múltiplas Newman-

Keuls $p < 0,05$, com exceção dos gráficos em (D) que utilizamos o teste t-student $p < 0,05$. Em (A) Números de quadrantes percorridos na periferia da arena do campo aberto, (B) número de vezes que o animal fica apenas apoiado com as patas traseiras (levantar), (C) números de quadrantes percorridos no centro da arena do campo aberto, (D) números de quadrantes percorridos no centro da arena do campo aberto, C vs T3 ** $p < 0,01$, C vs D * $p < 0,05$, (E) número total de quadrantes percorridos na arena do campo aberto, (F) número de defecações após 5 minutos de testes na arena.

4.3.2 Reconhecimento de objetos

A **Figuras 10** apresenta os resultados do teste de reconhecimento de objetos. Os valores do grupo C foram considerados como 100%. Nós observamos uma diminuição de 17,79 % no tempo de permanência no objeto novo após 1 hora e 30 do treinamento nos grupos de animais tratados com T3 (**Figura 10 (A)**; $p = 0,0388$; $F = 4,71$; $n = 7$ a 11 animais). Já após 24 horas do treinamento não observamos diferenças entre os grupos (**Figura 10 (B)**).

Figura 10 - Avaliação de comportamentos relacionado a memória durante tratamento crônico com T3 em ratos euglicêmicos e diabéticos. Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM e foram obtidos utilizando-se a análise de variância ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de comparações múltiplas Newman-Keuls $p < 0,05$. (A) % de tempo do animal no objeto novo (curta duração) (B) % de tempo do animal no objeto novo (longa duração).

4.3.3 Labirinto em cruz elevado

As **Figuras 11** e **12** apresentam os resultados de avaliação do estado de ansiedade realizada no teste de labirinto em cruz elevado em um intervalo de 5

minutos. Nós observamos diferenças quanto a porcentagem tempo de permanência dos animais tratados com T3 em relação ao demais nos braços abertos do aparato, existindo um aumento de 58,78% (**Figura 11 (A)**; $p = 0,433$; $F = 4,33$; $n = 11$ a 18 animais). Porém, quando olhamos para a porcentagem de números de entradas nos braços abertos, observamos uma redução de 26,5% nos animais tratados com T3 em relação aos animais não tratados com o hormônio (**Figura 12 (A)**; $p = 0,0062$; $F = 8,22$; $n = 11$ a 18 animais).

Figura 11 - Avaliação de comportamentos relacionado a ansiedade durante tratamento crônico com T3 em ratos euglicêmicos e diabéticos. Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM e foram obtidos utilizando-se a análise de variância ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de comparações múltiplas Newman-Keuls $p < 0,05$. (A) % de tempo nos braços abertos, (B) % de tempo nos braços fechados, (C) Tempo na plataforma central.

Figura 12 - Avaliação de comportamentos relacionado a ansiedade durante tratamento crônico com T3 em ratos euglicêmicos e diabéticos. Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM e foram obtidos utilizando-se a análise de variância ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de comparações múltiplas Newman-Keuls $p < 0,05$. (A) % de número de entradas nos braços abertos (B) % de número de entradas nos braços fechados, (C) número de entradas totais nos braços.

4.4 Análise de expressão gênica e proteica

Não observamos diferenças estatísticas relacionadas ao tratamento com T3 no córtex, portanto nos focamos mais nas análises proteicas no hipocampo. Consideramos em nossas análises o grupo C como sendo 100%.

4.4.1 Efeito do tratamento Crônico com T3 sobre a expressão de D2 e níveis TRAP 220

A **Figura 13** apresenta os resultados da expressão de RNAm D2 e os níveis proteicos de TRAP220 (proteína associada aos receptores do hormônio da tireóide

com 220 kDa) no hipocampo. Nossos resultados mostram uma diminuição de 15,9% na expressão de RNAm de D2 nos grupos de animais diabéticos em relação aos animais euglicêmicos (**Figura 13 (B)**; $p = 0,0456$; $F = 4,39$; $n = 7$ a 8 animais). Além disso, observamos uma diminuição de 49,97% nos níveis de TRAP 220 nos grupos T3 em relação ao grupo (**Figura 13 (A)**; $p = 0,0019$; $n = 3$).

Figura 13 - Efeito do tratamento crônico com T3 sobre a expressão de D2 e TRAP 220 no encéfalo de ratos euglicêmicos e diabéticos. Em (A) os resultados de TRAP220 estão expressos pela média $\pm$ SEM e foram obtidos utilizando-se a variância de t-student para $p < 0,05$, (B) os resultados de D2 estão expressos pela média $\pm$ SEM e foram obtidos utilizando-se a análise de variância ANOVA de duas vias seguida pelo teste de comparações múltiplas Newman-Keuls.

4.4.3 Efeito do tratamento Crônico com T3 sobre a expressão de BDNF e seu receptor

- **Expressão e níveis proteicos de BDNF**

A **Figura 14** apresenta os resultados da expressão de RNAm de BDNF no hipocampo e níveis proteicos de BDNF no hipocampo e no córtex. Observamos no hipocampo uma diminuição de 23,70% de RNAm de BDNF nos grupos hiperglicêmicos em relação aos animais euglicêmicos (**Figura14 (A)**; $p = 0,0001$; $F = 20,86$; $n = 7$ a 8 animais). Já quanto aos níveis proteicos de BDNF maduro tanto no hipocampo (**Figura 14 (B)**; $n = 9$ a 12 animais) como no córtex (**Figura 14 (C)**; $n = 11$ a 12 animais), não observamos diferenças entre os grupos analisados.

Figura 14 - Efeito do tratamento crônico com T3 sobre a expressão e níveis de BDNF no encéfalo de ratos euglicêmicos e diabéticos.. Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM e foram obtidos utilizando-se a análise de variância ANOVA de duas vias seguida pelo teste de comparações múltiplas Newman-Keuls; Em (A) Hipocampo (PCR real- time) T3 vs DT3 **** $p < 0,0001$, D vs DT3 ** $p < 0,05$, e (B) Hipocampo (ELISA), (C) Córtex (ELISA).

• Níveis proteicos de TrKB

As **Figuras 15 e 16** apresentam os resultados da expressão proteica de TrKB no hipocampo e no córtex. Segundo as análises realizadas não houve diferenças na expressão proteica de TrKB no córtex entre os grupos de tratamento (**Figura 16 (B)**; $n = 2$ a 3). Já no hipocampo observamos uma queda de 52,84% (**Figura 16 (A)**; $p = 0,0063$; $F = 12,53$; $n = 3$ a 4) na expressão proteica de TrKB nos grupos diabéticos em relação aos grupos euglicêmicos. A figura 14 mostra o grupo D em relação ao grupo DT3, existindo um aumento nos níveis de TrKB nos grupos DT3.

Figura 15 - Efeito do tratamento crônico com T3 sobre os níveis de TrKB no encéfalo de ratos euglicêmicos e diabéticos. Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM e foram obtidos utilizando-se a análise de variância ANOVA de duas vias seguida pelo teste de comparações múltiplas Newman-Keuls; Em **(A)** Hipocampo, C vs D** $p < 0,01$, T3 vs DT3 & $p < 0,05$, D vs DT3 % $p < 0,05$, e **(B)** Córtex.

Figura 16 - Efeito do tratamento crônico com T3 sobre os níveis de TrKB no encéfalo de ratos diabéticos. Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM e foram obtidos utilizando-se a a variância de t-student para $p < 0,05$

4.4.2 Efeito do tratamento crônico com T3 sobre proteínas envolvidas na sinalização de IR ($R\beta$)

- **Níveis proteicos de IR**

A **Figura 17** apresenta os resultados da expressão proteica de IR no hipocampo. Observamos uma diminuição de 38,31% (**Figura 17**; $p = 0,0181$; $F = 6,4$; $n = 7$ a 8 animais) nos níveis proteicos de IR nos grupos tratados com T3 em relação aos animais não tratados com o hormônio.

Figura 17 - Efeito do tratamento crônico com T3 sobre a expressão de IR no encéfalo de ratos euglicêmicos e diabéticos. Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM e foram obtidos utilizando-se a análise de variância ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de comparações múltiplas Newman-Keuls $p < 0,05$.

- **Níveis proteicos de fosforilação da proteína AKT (Ser 473)**

As **Figuras 18 e 19** apresentam os resultados de AKT fosforilada em serina (Ser 473) no hipocampo e no córtex, respectivamente. Os resultados mostram no hipocampo uma interação entre os tratamentos (hiperglicemia e T3), ou seja, um aumento nos níveis proteicos de AKT-p nos grupos DT3 em relação aos grupos com tratamentos isolados (**Figura 18 (C)**; $p = 0,0027$; $F = 11$; $n = 6$ a 9 animais) (análise da razão entre AKT-p e AKT total). Quando olhamos apenas para AKT-p no hipocampo observamos uma diminuição em seus níveis de 50,46% nos grupos T3 em relação ao grupo C (**figura 18 (B)**, $n = 7$ a 9 animais), enquanto a proteína total

apresentou uma diminuição de 35,88 % em seus níveis proteicos em animais tratados com HT em relação aos não tratados (**figura 18 (A)**, $p=0,0027$, $n= 6$ a 9 animais). Já no córtex, não observamos diferenças nos níveis de AKT fosforilada (**Figura 19**, $n= 4$ a 5 animais) entre os grupos.

Figura 18 - Efeito do tratamento crônico com T3 sobre os níveis de AKT e em sua fosforilação no hipocampo de ratos euglicêmicos e diabéticos. Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM e foram obtidos utilizando-se a análise de variância ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de comparações múltiplas Newman-Keuls. (A) AKT, C vs T3 * $p < 0,05$; (B) AKT-p, C vs T3 * $p < 0,05$; (C) Razão entre AKT e sua fosforilação, T3 vs DT3 * e D vs DT3, $p < 0,05$.

Figura 19 - Efeito do tratamento crônico com T3 sobre a fosforilação de AKT no córtex de ratos euglicêmicos e diabéticos. Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM e foram obtidos utilizando-se a análise de variância ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de comparações múltiplas Newman-Keuls.

4.4.3 Efeito do tratamento Crônico com T3 sobre proteínas relacionadas a neurodegeneração.

- **Níveis proteicos de fosforilação da proteína GSK3 (Tyr 279 e Tyr 216)**

A **Figura 20** apresenta os resultados da expressão proteica da fosforilação de GSK3 (Tyr 279/Tyr 216) no hipocampo e no córtex. Nossos resultados mostram no hipocampo uma interação entre os tratamentos (hiperglicemia e T3), ou seja, uma diminuição dos níveis proteicos de GSK3-p no grupo DT3 em relação aos grupos com tratamentos isolados (**Figura 20 (A)**; $p=0,0003$; $F= 17,06$; $n=7$ a 9). Já no córtex não houve diferenças nos níveis de GSK3 fosforilada entre os grupos de tratamentos (**Figura 20 (B)**; $n= 2$ a 3).

Figura 20 - Efeito do tratamento crônico com T3 sobre a fosforilação de GSK3 no encéfalo de ratos euglicêmicos e diabéticos. Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM e foram obtidos utilizando-se a análise de variância ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de comparações múltiplas Newman-Keuls. (A) Hipocampo, : C vs T3 ** $p < 0,01$, DT3 vs T3 ** $p < 0,01$, D vs DT3 * $p < 0,05$ e em (B) córtex.

- **Níveis proteicos de fosforilação da proteína Tau (Ser 473)**

A **Figura 21** apresenta os resultados da Tau fosforilada no hipocampo e córtex. Nossos resultados mostram que no hipocampo existe uma interação entre os tratamentos (**Figura 21 (A)**; hiperglicemia e T3), ou seja, uma diminuição nos níveis de Tau-p nos grupos DT3 em relação aos grupos com tratamentos isolados ($p=0,0006$; $F = 15,97$; $n = 6$ a 7 animais). Já no córtex não observamos diferenças entre os grupos (**Figura 21 (B)**; $n = 3$ a 6).

Figura 21 - Efeito do tratamento crônico com T3 sobre a fosforilação de Tau no encéfalo de ratos euglicêmicos e diabéticos. Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM e foram obtidos utilizando-se a análise de variância ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de comparações múltiplas Newman-Keuls. C. Em (A) hipocampo, C vs D **, $p < 0,01$, DT3 vs D %, $p < 0,05$, em (B) córtex, diabéticos vs euglicêmicos ** $p = 0,0087$.

- **Níveis proteicos do peptídeo β -Amiloide**

A **Figura 22** apresenta os resultados da expressão proteica de b-Amiloide no hipocampo. Não houve diferenças nos níveis de b-amiloide entre os grupos de tratamentos (n= 4 a 7 animais).

Figura 22 - Efeito do tratamento crônico com T3 sobre a expressão do peptídeo b amiloide no encéfalo de ratos euglicêmicos e diabéticos. Os dados estão expressos pela média $\pm$ SEM e foram obtidos utilizando-se a análise de variância ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de comparações múltiplas Newman-Keuls $p < 0,05$

4.5 Resumo dos resultados

As Tabelas 2 e 3 mostram os quadros gerais dos resultados apresentados neste trabalho.

MODELO	C	T3	D	DT3
<i>Campo aberto</i>				
Quadrantes percorridos na periferia				
Quadrantes percorridos no centro		↓	↓	
Quadrantes totais percorridos				
Rearing				
Defecação				
<i>Labirinto em Cruz Elevado</i>				
% de tempo no braço aberto		↑		↑
% de tempo no braço fechado				
% de tempo na plataforma central				
% de número de entradas no braço aberto		↓		↓
% de número de entradas no braço fechado		↑		↑
Número de cruzamentos				
Head dipping no braço aberto			↓	↓
Espreitas para o braço aberto			↓	↓
<i>Reconhecimento de objetos</i>				
Curta duração			↓	↓
Longa duração				

Tabela 2 - Resumo dos resultados de comportamento. ↓ = diminuição ↑ = aumento em relação aos grupos não tratados com T3. ↓ = diminuição ↑ = aumento em relação aos euglicêmicos. ↓ = diminuição ↑ = aumento em relação ao grupo controle.

<i>RNA_m</i>				
D2				
BDNF	Euglicêmicos X diabéticos	↓	D x DT3	↓
Proteínas				
BDNF maduro				
TrkB	Euglicêmicos X diabéticos	↓	D x DT3	↓
IR	(C + D) x (T3 + DT3)			
		↓		
AKT-p	C x T3	↓	D x DT3*	↑
			T3 x DT3*	↑
GSK3-p	C x T3	↑	D x DT3*	↓
			T3 x DT3*	↓
Tau-p	C x T3	↑	D x DT3*	↓
			C x D	↑
b-amiloide				

Tabela 3 - Resumo dos resultados da expressão genica e proteica analisados no hipocampo. ↓ = diminuição ↑ = aumento

5 DISCUSSÃO

De modo geral, nossos resultados indicam um efeito ansiolítico e indícios de uma resistência insulínica no hipocampo de ratos tratados cronicamente com o HT, principalmente dos animais euglicêmicos, existindo uma melhora no quadro nos animais diabéticos que foram tratados com o hormônio. Além disso, a fosforilação das proteínas marcadoras de neurodegeneração (GSK3 e Tau) apresentou uma diminuição nos animais diabéticos também tratados com o hormônio. Sendo assim, parece existir uma diferença na ação do hormônio em animais diabéticos.

Os níveis plasmáticos de TSH confirmam a eficácia de nosso tratamento, pois no hipertireoidismo a interação de T3 na hipófise inibe a expressão do gene que codifica a expressão de TSH e sua secreção. Ainda, o T3 inibe o TRH que por sua vez, acarretará na inibição da síntese e secreção de TSH via hipotálamo (NUNES, 2012). Por outro lado, nossos colaboradores (Laboratório de Regulação Hormonal e Expressão Gênica) usando o mesmo modelo experimental observaram um aumento de TSH nos grupos D. Essa diferença pode estar relacionada ao pequeno número de animais analisados por nós no grupo D. Desta forma, pode ser que o diabetes estaria induzindo um hipotireoidismo primário (PANVELOSKI-COSTA, et. al., 2015). Em estudos clínicos também se observou que pacientes diabéticos possuíam maiores níveis séricos de TSH (UMPIERREZ et. al., 2003).

Apesar dos níveis de TSH corresponderem as nossas expectativas, não observamos alteração nos níveis de concentração sérica de T3 em ratos euglicêmicos, o que poderia estar relacionado ao fato de T3 levar a um aumento na expressão de RNAm da 5' desiodase tipo 1 (DIO1) (BERRY et. al., 1990). Assim podemos assumir um aumento na conversão de T3 a T2 o qual iria manter os animais eutiroideus com concentração sérica de T3 nos mesmos valores dos animais controle, mesmo com administração de doses suprafisiológicas de T3 (PANVELOSKI-COSTA et. al., 2015). Por outro lado, observamos um aumento nos níveis séricos de T3 nos animais diabéticos. Esse fato pode estar relacionado ao fato do diabetes levar a uma redução do cotransportador de sódio/iodo (NIS) na tireoide (PANVELOSKI-COSTA et. al., 2015), com uma consequente deficiência de iodo levando a um aumento na relação T3/T4 (GREER et. al., 1968) e, portanto, a tireoide estaria preferencialmente liberando mais T3. Já quanto ao T4 observamos uma diminuição de seus níveis nos grupos de animais diabéticos e no grupo T3.

Essa diminuição dos níveis séricos de T4 já havia sido levantada por Gavin e colaboradores em 1981 em que mostram uma redução nos níveis de T4 em ratos hiperglicêmicos em um período de até 96 horas após a injeção de estreptozotocina.

Um ponto a se mencionar foi a escolha do tempo de 30 dias de tratamento com o T3. Essa escolha se baseou em dados anteriores dos nossos colaboradores, que observaram uma diminuição da glicemia em animais diabéticos, quando esses eram tratados com T3 no período de aproximadamente 28 a 30 dias, evidenciando uma relação entre T3 e hiperglicemia diferente do que apenas o tratamento com T3 em euglicêmicos (PANVELOSKI-COSTA et. al., 2015). O excesso do HT é conhecido por causar intolerância à glicose, uma vez que aumenta a produção de glicose hepática e promove a lipólise, os quais são conhecidos por reduzir a sensibilidade à insulina (PANVELOSKI-COSTA et. al., 2015).

Apesar do HT atravessar a barreira hematoencefálica ele apresenta uma meia-vida curta e não sabemos, pelo menos em nossas abordagens, quanto desse hormônio atinge o tecido cerebral. Assim, na tentativa de confirmar, ainda que de forma indireta, a entrada de T3 no encéfalo, decidimos olhar para o RNAm da desidrase tipo 2 (D2) no hipocampo, mas não observamos diferenças nos níveis de RNAm de D2 entre os grupos de tratamentos com o T3, corroborando de certa forma o que foi observado por Guataño - Ferraz e colaboradores (1999) que sugerem que T3 não teria efeitos diretos sobre o gene D2 e, portanto, a regulação dos níveis de D2 seria controlada por concentrações de T4. Por outro lado, nossos resultados mostraram uma diminuição dos níveis de T4 nos grupos T3 e não observamos diferenças no RNAm de D2 nestes mesmos grupos. Vale ressaltar, no entanto, que analisamos apenas a expressão gênica dessa enzima e não avaliamos seus níveis proteicos ou sua atividade. Por outro lado, observamos uma diminuição na expressão de D2 nos animais diabéticos em relação aos animais euglicêmicos, sugerindo uma relação entre a redução da atividade de D2 com a resistência à insulina, como já descrito na literatura no sistema periférico de camundongos e humanos (MARSILI et. al., 2011; MENTUCCIA et.al., 2002;).

Outra tentativa de avaliar a entrada de T3 no encéfalo foi analisar alguma proteína que estivesse ligada a transcrição gênica junto aos receptores de T3. Sendo assim, escolhemos a proteína associada aos receptores do hormônio da tireóide com 220 kDa (TRAP 220). O complexo TRAP está relacionado a muitas ativações transcricionais, tais como a do receptor do hormônio da tireóide (TR), que

tem como alvo a subunidade TRAP 220 (MALIK et. al., 2004). O complexo TRAP melhora significativamente a transcrição mediada por TRs, por ativarem a transcrição se ligando à RNA polimerase II facilitando assim seu recrutamento (FONDELL et. al., 1999). Observamos uma diminuição nos níveis proteicos de TRAP 220 no grupo T3 em relação ao grupo C, apontando mudanças transcricionais no hipocampo desses animais e, portanto, sugerindo que o T3 injetado via intraperitoneal durante o tratamento tenha passado a barreira hematoencefálica.

Dessa forma, decidimos observar primeiramente os efeitos do HT sobre o comportamento animal, dado que dentro da clínica médica observa-se características comportamentais em pacientes hipertireoideos, como ansiedade, paranoia, sintomas de mania e depressão afetiva como já mencionado anteriormente (HALL, 1983; REUS, 1986).

A ansiedade é um estado emocional com componentes psicológicos e fisiológicos, que faz parte do espectro normal das experiências humanas, sendo propulsora do desempenho. Ela passa a ser patológica quando é desproporcional à situação que a desencadeia, ou quando não existe um objeto específico ao qual se direcione (ANDRADE; GORENSTEIN, 1998). Os primeiros modelos animais de ansiedade foram desenvolvidos em base a tomada de paradigmas envolvendo a psicologia experimental antes da classificação moderna de transtornos psiquiátricos que dividiu os transtornos de ansiedade em diferentes categorias de diagnósticos. Como consequência, estes modelos animais referem-se à ansiedade normal e patológica (PINHEIRO et. al., 2007).

Apesar de pesquisadores mostrarem que o excesso de hormônio tiroideano (hipertiroidismo) pode levar a um quadro de hiperatividade (ALVAREZ et. al., 1996, MATOCHIK et. al., 1996), nossos resultados das análises comportamentais de atividade locomotora dos animais no campo aberto não mostraram diferenças nas taxas de ambulação entre os grupos de tratamentos. Além disso, com esse resultado descartamos possíveis efeitos comportamentais dado a disfunções da musculatura esquelética reportada na clínica em pacientes com hipertireoidismo (RAMSAY et. al., 1966; SANTOS et. al., 2002).

Já quando olhamos para o número de quadrantes percorridos no centro da arena no teste de campo aberto, observamos que tanto os animais tratados com o T3 como os animais diabéticos tiveram uma redução da ambulação em relação ao grupo controle mostrando um efeito ansiogênico para os grupos de tratamentos,

dado que o número de ambulação no centro da arena pode estar relacionado ao estado de ansiedade em ratos machos (FILE et. al., 1993; LISTER, 1990;). Sendo esse comportamento no campo aberto relacionado a uma ansiedade normal, envolto a confrontos com situações de estresse ou de risco, mas não com as características de ansiedade patológica (PRUT; BELZUNG, 2002).

Perfis de comportamento provocados no labirinto em cruz elevado parecem incluir elementos de neofobia, exploração e conflito. Assim, o aparelho é muitas vezes referido como um modelo comportamental espontâneo de conflito não condicionado. O labirinto em cruz é amplamente utilizado com base na aversão natural dos roedores à altura e espaços abertos e é sensível tanto à ansiolíticos como ansiogênicos, sendo validado para ratos como também para camundongos (KUMAR et. al., 2013). Considerando que para menores índices de ansiedade, maior seria a porcentagem de entradas ou tempo gasto pelos animais nos braços abertos (PELLOW; FILE, 1986).

Embora a ansiedade ser um dos sintomas característicos do hipertireoidismo (STERN et. al., 1996), nossos resultados mostram uma diminuição nas entradas no braço aberto em grupos de animais tratados com T3, apesar de também observamos um aumento na porcentagem de tempo gasto pelos animais dos grupos tratados com T3 nos braços abertos, indicando efeito ansiolítico do HT, mais especificamente de T3, dado que alguns trabalhos na literatura mostram não haver diferenças comportamentais entre os animais hipertireoideos (tratados com T4) quando avaliados no labirinto em cruz elevado quanto ao tempo de permanência neste aparato (REIS-LUNARDELLI et. al., 2007; SALA-ROCA et. al., 2002). Em resumo, apesar de se locomover menos para regiões de braços abertos, os animais tratados com T3 permaneceram mais tempo neste local.

Quando olhamos para os nossos resultados referentes tanto ao campo aberto como ao Labirinto em cruz, observamos fatores relacionados a ansiedade. Existindo uma outra aparente contradição entre o que observamos no campo aberto na avaliação no número de locomoção nos quadrantes centrais nos grupos tratados com T3 e o que observamos na porcentagem de tempo de permanência no braço aberto no teste de labirinto em cruz. Mas apesar de ambos os testes estarem relacionados a estados de ansiedade, isso não quer dizer que seja o mesmo modelo de ansiedade observado, a contradição é apenas aparente, ou seja, como já mencionado, temos modelos de testes animais relacionados a uma ansiedade

normal e a uma ansiedade patológica (PINHEIRO et. al., 2007), estando o teste de campo aberto principalmente relacionado a ansiedade normal que se relaciona a situações de risco e stress (PRUT; BELZUNG, 2002).

Quando olhamos o teste de reconhecimento de objeto, nossos resultados indicaram um déficit de memória de curta duração nos animais tratados com T3, mas não observamos essa diferença entre os grupos nos testes de memória de longa duração, ou seja, apesar da memória de curta duração possuir déficits nos animais tratados com T3 em relação aos não tratados, essa diferença não é observada 24 horas depois do treinamento. Aparentemente também não se observou efeito negativo em pacientes hipertireoideos em função cognitiva de longo prazo (LILLEVANG - JOHANSEN et. al., 2014). Nesse contexto, Izquierdo e colaboradores (1998) propuseram que a memória de curto prazo envolve mecanismos essencialmente distintos do que a memória de longo prazo. Dessa forma, poderia-se bloquear a memória de curto prazo, deixando memória de longo prazo intacta. Sendo assim, apesar do HT estar influenciando na aquisição da informação, curiosamente não influenciou na consolidação desta informação e por consequência na memória ao longo prazo.

Nossos dados apontam para respostas comportamentais diferentes em grupos tratados com T3. Esses mesmos efeitos também são observados nas alterações moleculares estudadas na via da sinalização da insulina e na expressão de BDNF. O Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) é uma proteína em sua forma madura de aproximadamente 12,4 kDa, isolada originalmente a partir de cérebro de porco (BARDE et al 1992). Muitos dos efeitos biológicos de BDNF são mediados pelo receptor de elevada afinidade TrkB (MARIGHI et al 2008). Aparentemente parece existir concentrações de BDNF séricos mais baixos e funções cognitivas em pacientes diabéticos quando comparados aos controles. Além disso, uma relação positiva entre os níveis séricos de BDNF e atraso na memória surgiram em pacientes diabéticos, sugerindo um papel de BDNF no déficit cognitivo associado com DM do tipo 2 (PASSARO et. al., 2015; ZHEN et. al., 2013).

Apesar da maioria dos trabalhos encontrados na literatura mostrarem uma diminuição de BDNF em diabéticos, tanto em artigos clínicos como também em artigos com modelos animais (HE; WANG, 2014; KRABBE et. al., 2007; ONO, et. al., 1997; PASSARO et. al., 2015), nós não observamos tal diminuição nos níveis da proteína de BDNF em sua forma ativa tanto no hipocampo como no córtex e sim

uma diminuição nos níveis de RNAm de BDNF no hipocampo de animais diabéticos. Além disso, não observamos diferenças na expressão de RNAm de BDNF como também em sua proteína nos grupos T3, indo em desacordo com o que observamos em artigos publicados, como por exemplo de SUI e colaboradores (2010) em que observaram um aumento de RNAm de BDNF no hipocampo de ratos Sprague - Dawley tratados com T3 por via intraperitoneal e intrahipocampal de forma aguda. Vale ressaltar, no entanto, que muitos dos trabalhos encontrados na literatura relacionados ao BDNF e diabetes como também ao BDNF e HTs, não descrevem detalhadamente qual tipo de análise foi realizada, se do BDNF total ou do BDNF maduro.

O receptor de BDNF, o TrkB, exerce seus efeitos por ativar vias como Ras/ERK, vias PLC e PI3-K/Akt. Apesar de já descrito na literatura a relação inversa entre o HT e a expressão do receptor TrkB durante o desenvolvimento do cérebro de ratos (POMBO et. al., 2000), nossos resultados não evidenciaram tal relação. Mas observamos uma diminuição dos níveis proteicos deste receptor no hipocampo de animais diabéticos quando comparado a animais euglicêmicos, evidenciando tal diminuição principalmente nos grupos D em relação ao grupo C. Apesar de promissores os resultados nos grupos DT3 os níveis de TrkB observados não corresponde a mesma trajetória observada para o BDNF maduro. Isso pode estar relacionado ao fato de TrkB ser também responsivo a outros fatores neurotróficos como a neurotrofina 4 (NT4) e Neurotrofina-3 (NT3) (REICHAEDT, 2006).

Embora a resistência à insulina seja uma patologia encontrada no diabetes tipo 2, ela também é observada em ratos tratados com aloxana ou estreptozotocina (STZ) (BLONDEL; PORTHA, 1989; OKAMOTO et. al., 2011;). A resistência à insulina periférica pode promover comprometimento cognitivo e neurodegeneração devido à hiperglicemia crônica associada, hiperinsulinemia, estresse oxidativo, aumento da expressão e ativação de enzimas degradantes da insulina, aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e doenças microvasculares cerebrais (KORF et.al., 2006). Nesse contexto, decidimos analisar os níveis proteicos de IR ($R\beta$) e observamos, em particular no hipocampo, uma influência do HT nessa estrutura, existindo uma queda nos níveis proteicos nos grupos de animais tratados com o hormônio, o que corrobora a informação de que há uma modulação do HT no metabolismo da glicose cerebral, que já vem sendo discutido na pesquisa clínica. Por exemplo, foi observado que pacientes com hipertireoidismo tiveram uma

melhora no metabolismo de glicose após o uso de terapia com drogas que bloqueiam a formação do HT pela própria tireoide (MIAO et. al. 2011).

Como já mencionado a insulina através da PI3K e AKT, induz a inibição pela fosforilação de GSK3 β (serina 9) e de GSK3 α (serina 21). Quando GSK3 é inativada acontece uma redução na fosforilação da proteína Tau com consequente aumento da ligação de Tau aos microtúbulos (CROSS et. al., 1995, HONG et. al., 1997). Além de regular a fosforilação por Serina, GSK3 β e GSK3 α podem ter suas atividades reguladas em tirosina (Tyr) por fosforilação dos resíduos 216 ou 279, respectivamente. Sob condições fisiológicas, a GSK3 é fosforilada nestes locais e aumentos na fosforilação em Tyr levam a um aumento na atividade da GSK3 (BHAT et. al., 2000). Dessa forma, analisando algumas proteínas desta via, mas lembrando que existe uma interação de BDNF sobre a mesma, observamos no hipocampo interação entre os tratamentos (hiperglicemia e T3) com um aumento nos níveis de AKT-p quando normalizada com seu total em relação aos grupos com tratamentos isolados. Além disso, observamos uma diminuição nos níveis proteicos de AKT-p no grupo de animais tratados com HT isoladamente (grupo T3), o que nos leva a indícios de uma possível resistência insulínica relacionada ao HT.

Na continuação da via de sinalização relacionada aos processos neurodegenerativos, observamos que tanto a GSK3-p como a Tau-p apresentaram um aumento nos seus níveis no grupo diabético tratado com T3 em relação aos grupos com tratamentos isolados. Já no córtex obtivemos resultados que mostram uma diminuição nos níveis de Tau-p nos animais diabéticos em relação aos euglicêmicos, o que difere do resultado encontrado quando a droga diabetogênica estreptozotocina é injetada diretamente no ventrículo, em que há um aumento dos níveis de Tau-p no córtex de ratos (SANTOS et. al., 2012).

Os resultados encontrados nos níveis proteicos de Akt-p, GSK3-p e Tau-p no hipocampo, mostram uma diferença na ação do HT em animais diabéticos, sugerindo que os níveis dessas proteínas nos animais do grupo DT3 tende a acompanhar os níveis basais, ou seja, semelhante ao grupo C. Curiosamente a doença da tireóide é comumente encontrada na maioria das formas de diabetes, associando-se com a idade, ou mesmo a diabetes tipo 1 (JOHNSON, 2006). Por outro lado, essa diferença da ação do HT em ratos diabéticos foi pouco notada nos testes comportamentais, sendo observada apenas na porcentagem de tempo passado pelos animais dos Grupos DT3 nos braços fechados.

Em relação à proteína marcadora de neurodegeneração beta-amiloide no hipocampo nossos resultados mostram não haver diferenças significativas em relação aos tratamentos empregados, diferente do que foi mostrado em alguns trabalhos que demonstram a influência do HT na expressão gênica e nos níveis proteicos da APP, em estrutura como hipocampo de ratos e em linhagem de neuroblastoma (N2-aB) (BELAKAVADI et. al., 2011; CONTERASJURADO et. al., 2012; LATASA et. al., 1998). Nos nossos estudos, no entanto, avaliamos apenas a expressão de b-amiloide e não das isoformas da APP.

Vale ressaltar que as principais mudanças proteicas após o tratamento com T3 foram observadas no hipocampo, havendo singularidades para esta estrutura, pois além do córtex e hipocampo analisados neste trabalho nosso grupo analisou anteriormente essas mesmas proteínas no hipotálamo e não notamos diferenças nos grupos de tratamento com o HT.

6 CONCLUSÃO

Nossos dados sugerem, de modo geral, que o tratamento crônico com T3 produziu um efeito ansiolítico e um atraso na aquisição de informações aprendidas, apesar da consolidação não ser modificada. Além disso, o T3 promoveu a melhora do processo neurodegenerativo e na via da sinalização da insulina no hipocampo dos animais diabéticos. Deste modo, estudos mais aprofundados sobre a ação dos HTs no encéfalo adulto podem ser de grande relevância para futuras terapias no tratamento da resistência insulínica encefálica ou mesmo para tratamentos relacionados ao DM tipo 1 em que o hipotireoidismo é diagnosticado.

REFERÊNCIAS*

ALKIRE, M. T.; HAIR, R. J.; FALLON, J. H.; CAHILL, L. Hippocampal, but not amygdala, activity at encoding correlates with long-term, free recall of non emotional information. **Proc. Natl. Sci.**, v. 95, p. 14506 -14516, 1998.

American Diabetes Association, Fast Facts, data and statistics about diabetes (2013) Available from <http://professional.diabetes.org/admin/UserFiles/0%20-%20Sean/FastFacts%20March%202013.pdf>.

ABEDELHAFES, A. S.; HASSAN, A. Brain derived neurotrophic factor and oxidative stress index in pups with developmental hypothyroidism: neuroprotective effects of selenium. **Acta. Physiol. Hung.**, v. 100, p. 197-210, 2013.

ADOLFSSON, R.; BUCHT, G.; LITHNER, F.; WINBLAD, B. Hypoglycemia in Alzheimer's disease. **Acta. Med. Scand.**, v. 208, p. 387-380, 1980.

ALMEIDA, R. D.; MANADAS, B. J.; MELO, C. V.; GOMES, J. R.; MENDES, C. S.; GRÃOS, M. M.; CARVALHO, R. F.; CARVALHO, A. P.; DUARTE C.B. Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways. **Cell. Death. Differ.**, v. 12, p. 329–1343, 2005.

ALVAREZ, M.; GUELL, R.; CHONG, D.; ROVET, J. Attentional processing in hyperthyroid children before and after treatment. **J. Pediatr. Endocrinol. Metab.**, v. 9, p. 248 – 255, 1996.

ANDRADE, L. A. H. S. G.; GORENSTEIN, C. Aspectos gerais das escalas de avaliação de ansiedade. **Rev. Pesq. Clín.**, v. 25, versão internet, 1998.

BARDE, Y. A.; EDGAR, D.; THOENEN, H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian. **The EMBO J.**, v. 5, p. 549 – 553, 1982.

BERNABEU, R.; DE STEIN, M. L.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Role of hippocampal no in the acquisition and consolidation of inhibitory avoid- ance learning. **Neuroreport.**, v. 6, p. 1498–1500, 1995

BERNABEU, R.; SCHITZ, P.; FAILLACE, M. P.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Schmitz P, Faillace MP, Izquierdo I, Medina JH. Hippocampal cGMP and cAMP are differently involved in memory pro- cessing of inhibitory avoidance learning. **Neuroreport.**, v. 7, p. 585–588, 1996.

BELAKAVADI, M.; DELL, J.; GROVER, G. J.; FONDELL, J. D. Thyroid hormone suppression of β -amyloid precursor protein gene expression in the brain involves multiple epigenetic regulatory events. **Mol Cell Endocrinol.**, v. 339, p. 72-80, 2011.

BHAT, R. V.; SHANLEY, J.; CORRELL, M. P.; FIERELES, W. E.; KEITH, R. A.; SCOTT, C. W.; LEE, C. M. Regulation and localization of tyrosine 216 phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 β in cellular and animal models of neuronal degeneration. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 11074–11079, 2000.

BIANCO, A. C.; KIM, B. W. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. **J. Clin. Invest.**, v. 116, p. 2571 - 2579, 2006.

BIESSELS, G. J.; KAPPELLE, L. J. Increased risk of Alzheimer's disease in Type II diabetes: insulin resistance of the brain or insulin-induced amyloid pathology? **Biochem. Soc. Trans.**, v. 33, p. 1041-1044, 2005.

BOURA-HALFON, S.; ZICK, Y. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 296, p. E581 – E591, 2009.

BLONDEL, O.; PORTHA, B. Early appearance of in vivo insulin resistance in adult streptozotocin-injected rats. **Diabete Metab.**, v. 15, p. 382 – 387, 1989

BRUNETTO, E. L.; *TEXEIRA, S. da; GIANNOCO, G.; MACHADO U. F.; NUNES, M. T. T3 rapidly increases SLC2A4 gene expression and GLUT4 trafficking to the plasma membrane in skeletal muscle of rat and improves glucose homeostasis. **Thyroid**, v. 22, p. 70 - 79, 2012.

BURAS, A.; BATTLE, L.; LANDERS, E.; NGUYEN, T.; VASUDEVAN, N. Thyroid hormones regulate anxiety in the male mouse. **Horm. Behav.**, v. 65, p. 88 – 96, 2014.

CALZÀ, L.; ALOE, L.; GIARDINO, L. Thyroid Hormone-Induced Plasticity in the Adult Rat Brain. **Brain Res. Bull.**, v. 44, p. 549-557, 1997.

CATALDO, M. L. S., et al. Desenvolvimento embrionário da glândula tireóide. In: CORONHO, V. et al. **Tratado de endocrinologia e cirurgia endócrina**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2001. p. 351-355.

CASELLI, R.J.; CHEN, K.; LEE, W., et. al. Correlating cerebral hypometabolism with future memory decline in subsequent converters to amnesic pre-mild cognitive impairment. **Arch. Neuro.**, v. 65, p. 1231-1236, 2008.

CHENG, S. Y.; LEONARD, J. L.; DAVIS, P. J. Molecular aspects of thyroid hormone actions. **Endocr. Rev.**, v. 31, p. 139 - 170, 2010.

CHEN-ZION, M.; BASSUKEVITZ, Y.; BEITNER, R. Rapid changes in carbohydrate metabolism in muscle induced by triiodothyronine; the role of glucose 1,6-bisphosphate. **Biochem. Mol. Med.**, v. 56, p.19 - 25, 1995.

CHOLEREIS, E.; THOMAS, A. W.; KAVALIERS, M.; PRATO, F.S. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 25, p. 235 – 260, 2001.

CHRISTMAS, A. J.; MAXWELL, D. R. A comparison of the effects of some benzodiazepines and other drugs on aggressive and exploratory behaviour in mice and rats. **Neuropharmacology**, v. 9, p. 17 - 29, 1970.

COLLER, F. A.; HUGGINS, C. B. "Effect of hyperthyroidism upon diabetes mellitus: striking improvement in diabetes mellitus from thyroidectomy". **Ann. Surg.**, v. 86, p. 877 – 884, 1927.

CONNOR, B.; YOUNG, D.; YAN, Q.; FAULL, R. L.; SYNEK, B.; DRAGUNOW, M. Brain-derived neurotrophic factor is reduced in Alzheimer's disease..**Mol. Brain Res.**, v. 49, p. 71 – 81,1997.

CONTRERAS-JURADO, C.; PASCUAL, A. Thyroid hormone regulation of APP (b-amyloid precursor protein) gene expression in brain and brain cultured cells. **Neurochem. Int.**, v. 60, p. 484 – 487, 2012.

CORTÉS, C.; EUGENIN, E.; ALIAGA, E.; CARREÑO, L. J.; BUENO, S. M.; GONZALEZ, P. A; GAYOL, S.; NARANJO, D.; NOCHES, V.; MARASSI, M. P.; ROSENTHAL, D.; JADUE, C.; IBARRA, P.; KEITEL, C.; WOHLCK, N.; COURT, F.; KALAERGIS, A. M.; RIEDEL, C.A. Hypothyroidism in the Adult Rat Causes Incremental Changes in Brain –Derived Neurotrophic Factor, Neuronal and Astrocyte Apoptosis, Gliosis and Deteration of Postsynaptic density. **Thyroid**, v. 22, p. 951 – 963, 2012.

CUMMINGS, J. L. Neuropsychiatric aspects of Alzheimer's disease and other dementing illnesses. In Yudofaty SC, Hales RE, (eds.). **Text-book of neuropsychiatry**, 2nd ed. Washington : American Psychiatric , 1992 p. 605-620,.

DeFRONZO, R. A. Pharmacologic therapy for types 2 diabetes mellitus. **Ann. Intern. Med.**, v. 133, p. 73 - 74, 2000.

DE LA MONTE, S. M.; WANDS, J. R. Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous system: relevance to Alzheimer's disease. **J. Alzheimers Dis.**, v. 7, p. 45 – 61, 2005.

DUARTE, J. M. N. Metabolic Alterations Associated to Brain Dysfunction in Diabetes. **Aging Dis.**, v. 6, p. 304 – 321, 2015.

DUSSAULT, J. H.; RUEL, J. Thyroid hormones and brain development. **Ann. Rev. Physiol.**, v. 49; p. 321 – 334,1987.

FILE, S.E.; ZANGROSSI, H. Jr.; VIANA, M.; GRAEFF, F. G. Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear? **Psychopharmacology**, v. 111, p. 491- 494, 1993.

FONDELL, J. D.; GUERMAH, M.; MALIK, S.; ROEDER, R. G. Thyroid hormone receptor-associated proteins and general positive cofactors mediate thyroid hormone receptor function in the absence of the TATA box-binding protein-associated factors of TFIIID. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 96, p. 1959 –1964, 1999.

FRAME, S.; COHEN, P.; BIONDI, R. M. A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation. **Mol. Cell.**, v. 7, p. 1321 – 1327, 2001.

FUJISAWA, Y.; SASAKI, K.; AKIYAMA, K. Increased insulin levels after OGTT load in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with dementia of Alzheimer type. **Biol. Psychiat.**, v. 30, p. 1219 - 1228, 1991.

GASPARINI, L.; NETZER, W. J.; GREENGARD, P.; XU, H. Does insulin dysfunction play a role in Alzheimer's disease? **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 23, p. 288 - 293, 2002.

GAMMELTOFT, S.; FEHLMANN, M.; YAN, O.E. Insulin receptors in the mammalian central nervous system: binding characteristic and subunit structure. **Biochimic.**, v. 67, p. 10-11, 1985.

GAVIN, L. A.; McMAHON, F. A.; MOELLER, M. The Mechanism of Impaired T₃ Production from T₄ in Diabetes. **Diabetes**, v. 30, p. 694 - 699, 1981.

GEZEN-AK, D.; DURSUN, E.; HANAGASI, H.; BILGIÇ, B.; LOHMAN, E.; ARAZ, O. S.; ATASOY, I. L.; ALAYLIOGLU, M.; ONAL, B.; GURVIT, H.; YILMAZER, S. BDNF, TNF α , HSP90, CFH, and IL-10 serum levels in patients with early or late onset Alzheimer's disease or mild cognitive impairment. **J Alzheimers Dis.**, v. 37, p. 185 - 195, 2013.

GILBERT, M. E.; LASLEY, S. M. Developmental thyroid hormone insufficiency and brain development: a role for brain-derived neurotrophic factor (BDNF)? **Neuroscience**, v. 239, p. 253 - 270, 2013.

GREER, M. A.; GRIMM, Y.; STUDER, H. Qualitative changes in the secretion of thyroid hormones induced by iodine deficiency. **Endocrinology**, v. 83, p. 1193-1198, 1968.

GUARDAÑO – FERRAZ, A.; ESCAMEZ, M. J.; RAUSELL, E.; BERNAL, J. Expression of Type 2 Iodothyronine Deiodinase in Hypothyroid Rat Brain Indicates an Important Role of Thyroid Hormone in the Development of Specific Primary Sensory Systems. **J. Neurosci.**, v. 19, p. 3430–3439, 1999.

HALL, R. C. W. Psychiatric effects of thyroid hormone disturbance: Psychosomatic illness review: No. 5 in a series. **Psychosomatics**, v. 24, p. 7- 11, p.15 – 18 , 1983.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **J. Comp. Psychol.**, v. 18, p. 385 – 403, 1934.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha- adrenoceptor agonists in a maze-exploration model of “fear”-motivated behaviour, **Archiv. Pharmacol.**, v. 327, p. 1 – 5, 1984.

HE, M.; WANG, J. Decreased serum brain-derived neurotrophic factor in Chinese patients with Type 2 diabetes mellitus. **Acta. Biochim. Biophys. Sin.**, v.46, p.1-2, 2014.

HETMAN, M.; KANNING, K.; CAVANAUGH, J. E.; XIA, Z. Neuroprotection by brain-derived neurotrophic factor is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3 kinase. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 22569 – 22580, 1999.

HONG, M.; LEE, M. Y. Insulin and insulin-like growth factor-1 regulate tau phosphorylation in cultured human neurons. **Biol. Chem.**, v. 272, p.19547 - 19553, 1997.

HORVATH, T. B.; SLEVER, L. J.; MOHS, R. C.; DAVIS, K. Organic mental syndromes and disorders. In: Kaplan HI, Sadock B.J., (eds.), 5. Ed., Philadelphia: Wilkins , 1989. p 599 – 641.

HOYER, S. The brain insulin signal transduction system and sporadic (type II) Alzheimer disease: an update. **J. Neural. Transm.**, v. 109, p. 341 - 360, 2002.

HOYER, S.; LANNERT, H.; LATTEIER, E.; MEISEL, T. Relationship between cerebral energy metabolism in parietotemporal cortex and hippocampus and mental activity during aging in rats. **J. Neural. Transm.** v. 111, p. 575 - 589, 2004.

ISHIGURO, K.; SHIRATSUCHI, A.; SATO, S.; OMORI, A.; ARIOKA, M.; KOBAYASHI, S.; UCHIDA, T.; IMAHORI, K. Glycogen synthase kinase 3 betas is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filaments. **FEBS Lett.**, v. 325, p. 167 - 172, 1993.

IZQUIERDO, I.; BEVILAQUA, L. R. M.; ROSSATO, J. I.; BONINI, J. S.; MEDINA, J. H.; CAMMAROTA, M. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. **Trends Neurosci.**, v.29, p. 496 - 515, 2006.

IZQUIERDO, I.; BARROS, D. M.; MELLO E SOUZA, T.; DE SOUZA, M. M.; IZQUIERDO, L. A.; MEDINA, J. H. Mechanisms for memory types differ. **Nature**, v. 393, p. 635 - 636, 1998.

JOFFE, B. I.; DISTILLER, L. A. Diabetes mellitus and hypothyroidism: Strange bedfellows or mutual companions? **World J. Diabetes**, v. 5, p. 901 - 904, 2014.

JOHNSON, J.L. Diabetes control in thyroid disease. **Diabetes Spectrum**, v. 19, p. 148 - 153, 2006.

JOHNSTON, A. M.; PIROLA, L.; VAN OBBERGHEN, E. Molecular mechanisms of insulin receptor substrate protein-mediated modulation of insulin signalling. **FEBS Lett.**, v. 546, p. 32 - 36, 2003.

KAAPOR, R.; FANIBUNDA, S. E.; DE SOUZA, L. A.; GUHA, S. K.; VAIDYA, V.A. Perspectives on thyroid hormone action in adult neurogenesis. **J. Neurochem.**, v. 133, p. 599-616, 2015.

KILPATRICK, L.; CAHILL, L. Amygdala modulation of parahippocampal and frontal regions during emotionally influenced memory storage. **Neuroimage**, v. 20, p. 2091 - 2099, 2003.

KORF, E. S.; WHITE, L. R.; SCHALTENS, P.; LAUNER, L. J. Brain aging in very old men with type 2 diabetes: the Honolulu-Asia Aging Study. **Diabetes Care.**, v. 29, p. 2268 – 2274, 2006.

KRABBE, K. S.; NIELSEN, A. R.; KROGH-MADSEN, R.; PLOMGAARD, P.; RASMUSSEN, P.; ERIKTRUP, C.; FISCHER, C. P.; LINDEGAARD, B.; PETERSEN, A. M.; TAUDORF, S.; SECHER, N. H.; PILEGGARD, H.; BRUUNSGAARD, H.; PEDERSEN, B.K. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 50, p. 431- 438, 2007.

KUMAR, V.; BHAT, Z. A.; KUMAR, D. Animal models of anxiety: A comprehensive review. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, v. 68, p. 175-183, 2013.

KUNG, Y.; SUTHERLAND, M.; WONG, L.; SOMERVILLE, M. J.; HANDLEY, P.; YOONG, L.; BERGERON, C.; MCLACHLAN, D. R. Reduction of thyroid hormone receptor c- ERB Aa m RNA levels in the hippocampus of Alzheimer as compared to Huntington brain. **Neurobiol. Aging**, v. 13, p. 301-312, 1992.

LANGBAUN, J. B.; CHEN, K.; CASELLI, R. J. et. al. Hypometabolism in Alzheimer-affected brain regions in cognitively healthy Latino individuals carrying the apolipoprotein E epsilon 4 allele. **Arch. Neurol.**, v. 67, p. 462 - 468, 2010.

LASKE C., STRANSKY E., LEYHE T., et. al. Stage-dependent BDNF serum concentrations in Alzheimer's disease. **J. Neural. Transm.**, 113, 1217–1224, 2006.

LATASA, M. J.; BELANDIA, B.; PASCUAL, A. Thyroid hormones regulate beta-amyloid gene splicing and protein secretion in neuroblastoma cells. **Endocrinology**, v. 139, p. 2692-2698, 1998.

LEAL, A. L.; ALBUQUERQUE, J. O.; MATOS, J. P.; FORTUNATO, R. S.; CARVALHO, D. P.; ROSENTHAL, D.; DA COSTA, V. M; Thyroid hormones regulate skeletal muscle regeneration after acute injury. **Endocrine.**, v.48, p. 233-240, 2015.

LISTER, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacol. Ther.**, v. 46, p. 321 - 340, 1990.

LILLEVANG – JOHANSEN, M.; PETERSEN, I.; CHRISTENSEN, K.; HEGEDUS, L.; BRIX, T. H. Is previous hyperthyroidism associated with long-term cognitive dysfunction? A twin study. **Clin. Endocrinol.**, v. 80, p. 290 – 295, 2014.

LOOSEN, P. Effects of thyroid hormones on central nervous system in aging. IN., **Psychoneuroendocrinology**, v. 4, p. 355-374, 1992.

MALIK, S.; GUERMAH, M.; YUAN, C. Y.; WU, W.; YAMAMURA, S.; ROEDER, R. G. Structural and Functional Organization of TRAP220, the TRAP/Mediator Subunit That Is Targeted by Nuclear Receptors. **Mol. Cell. Biol.**, v.24, p. 8244 - 8254, 2004.

MARSILI, A.; AGUAYO – MAZZUCATO, C.; CHEN, T.; KUMAR, A.; CHUNG, M.; LUNSFORD, E.P., et al. Mice with a targeted deletion of the type 2 deiodinase are insulin resistant and susceptible to diet induced obesity. **Plos One**, v.6, p. e20832, 2011.

MATOCHIK, J. A.; ZAMETKIN, A. J.; COHEN, R. M.; HAUSER, P.; WINTRAUB, B. D. Abnormalities in sustained attention and anterior cingulate metabolism in subjects with resistance to thyroid hormone. **Brain. Res.**, v. 723, p. 23 – 28, 1996.

MATTSON, M. P.; MAUDSLEY, S.; MARTIN, B. BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. **Trends Neurosci.**, v. 27, p. 589 – 594, 2004.

MENTUCCIA, D.; PROLETTI - PANNUNZI, L.; TANNER, K.; BACCI, V.; POLLIN, T. I.; POEHLMAN, E. T, et al. Association between a novel variant of the human type 2 deiodinase gene Thr92Ala and insulin resistance: evidence of interaction with the Trp64Arg variant of the beta-3-adrenergic receptor. **Diabetes**, v.51, p. 880 - 883, 2002.

MERIGHI, A.; SALIO, S.; GHIRRI, A.; LOSSI, L.; FERINI, F.; BETELLI, C.; BARDONI, R. BDNF as a pain modulator. **Prog. Neurobiol.**, v.85, p. 297 - 317, 2008.

MINICHELLO, L. TrkB signalling pathways in LTP and learning. **Nat. Ver. Neurosci.**, v.10, p. 850 – 860, 2009.

MIAO, Q.; ZHANG, S.; GUAN, Y.H.; ZHANG, Z. Y.; ZHANG Q. Y.; XUE, R. D.; ZENG, M. F.; ZUO, C. T.; LI, Y. M. Reversible changes in brain glucose Metabolism following thyroid function normalization in hyperthyroidism. **Am. J. Neuroradiol.**, v. 32, p. 1034 -1042, 2011.

MOSCONI, L.; PUPI, A.; De LEON, M. J. Brain glucose hypometabolism and oxidative stress in preclinical Alzheimer's disease. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1147, p. 180 - 195, 2008.

MOSCONI, L.; MISTUR, R.; SWITALSKI, R. et. al. FDG-PET changes in brain glucoses metabolism from normal cognition to pathologically verified Alzheimer's disease. **Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging**, v. 36, p. 811 - 822, 2009.

NAKAGAWA, T.; TSUCHIDA, A.; ITAKURA, Y.; NONOMURA, T.; ONO. M.; HIROTTA, F.; INOUE, T.; NAKAYAMA, C.; TAIJI, M.; NOUGUCHI, H. Brain-derived neurotrophic factor regulates glucose metabolism by modulating energy balance in diabetic mice. **Diabetes**, v. 49, p. 436 – 444, 2000.

NASSIF, R. J.; RIBEIRO, M. O. **Possível relação entre ação da D3 na etiologia da Epilepsia e Sudep**. Cadernos de Pós-Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento, v. 12, p. 118-129, 2012.

NOWACKA, M.; OBUCHOWICZ, E. BDNF and VEGF in the pathogenesis of stress-induced affective diseases: an insight from experimental studies. **Pharmacol. Rep.**, v. 65, p. 535 - 546, 2013.

NUMAKAWA, T.; ADACHI, N.; RICHARDS, M.; CHILBA, S.; KUNUGI, H. Brain-derived neurotrophic factor and glucocorticoids: reciprocal influence on the central nervous system. **Neuroscience**, v. 239, p. 157 -172, 2013.

NUNES, M.T. Glândula hipófise. In: AIRES, M. M. et. al. **Fisiologia**.4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012 cap.65, p.997 – 1017.

O' BARR, A. S.; OH, J. S.; MA, C.; BRENT, G. A.; SCHULTZ, J. J. Thyroid Hormone Regulates Endogenous Amyloid- β Precursor Protein Gene Expression and Processing in Both In Vitro and In Vivo Models. **Thyroid**, v. 16, p. 1207-1213, 2006.

OKAMOTO, M. M.; ANHÊ, G. F.; SABINO-SILVA, R.; MARQUES, M. F.; FREITAS, H.S.; MORI, R. C.; MELO, K.F.; MACHADO, U. F. Intensive insulin treatment induces insulin resistance in diabetic rats by impairing glucose metabolism-related mechanisms in muscle and liver. **J. Endocrinol.**, v. 211, p. 55 – 64, 2011.

ONO, M.; ICHIHARA, J.; NOMOMURA, T. et. al. Brain-derived neurotrophic factor reduces blood glucose level in obese diabetic mice but not in normal mice. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 238, p. 633 – 637, 1997.

PANVELOSKI – COSTA, A. C.; TEXEIRA, S. S; RIBEIRO, I. M.; SERRANO-NASCIMENTO, C.; NEVES, R. X.; FAVARO, R. F.; SEELAENDER, M.; ANTUNES, V.R.; NUNES, M. T. THYROID Hormone reduces inflammatory cytokines improving glycemia control in alloxan-induced diabetic wistar rats. **Acta Physiol.**, 2016. {In press}

PASSARO, A.; NORA, E. D.; MORIERI, M. L.; SOAVI, C.; SANZ, J. M.; ZURLO, A.; FELLIN, R.; ZULIANI, G. Brain-Derived Neurotrophic Factor Plasma Levels: Relationship With Dementia and Diabetes in the Elderly Population. **J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.**, v. 70, p. 294 - 302, 2015.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in the elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neurosci. Meth.**, v. 14, p.149 – 167, 1985.

PELLOW, S.; File, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacol. Biochem. Be.**, v. 24, p. 525 - 529, 1986.

PHIEL, C. J.; WILSON, C. A.; LEE, V. M.; KLEIN, P. S. GSK-3 α regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. **Nature**, v. 423, p. 435 - 439, 2003.

PINHEIRO, S. H; ZANGROSSI, H. Jr.; DELL-BEM, C.; GRAEFF, F.G. Elevated mazes as animal models of anxiety: effects of serotonergic agents. **Ann. Braz. Acad. Sci.**, v. 79, p. 71 - 85, 2007.

PINTO, W. B. V. R.; KO, G. M.; VALERO-LAPCHIK, V. B.; ARIZA, C. B.; PORCIONATTO, M. Revisão: Teste de labirinto em cruz elevado: aplicações e contribuições no estudo de doenças. **RESBCAL**, v. 1, p. 102 – 120, 2012.

POMBO, P. M.; BARETTINO, D; ESPLIQUERO, G; METSIS, M.; IGLESIAS, T ; RODRIGUEZ-PEN, A. Transcriptional repression of neurotrophin receptor trkB by thyroid hormone in the developing rat brain. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 37570 - 37517, 2000.

PRAKASH, Y. S.; MARTIN, R. J. Brain-derived neurotrophic factor in the airways. **Pharmacol. Ther.**, v.143, p. 74 - 86, 2014.

PRUT, L.; BLZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **Eur. J. .Pharmacol.**, v. 463, p. 3-33, 2003.

RANSAY, I. D.; Muscle dysfunction in hyperthyroidism. **Lancet.**, v. 288, p. 931-935,1966.

REIS – LUNARDELLI, E. A.; CASTRO, C. C.; BAVARESCO, C.; COITINHO, A. S.; TRINDADE, L. S. S.; PERRENOUD, M.F.; ROESTER, R.; SARKIS, J.J.F.; WYSE, A.T.S.; IZQUIERDO, I. Effects of Thyroid Hormones on Memory and on Na⁺, K⁺-ATPase Activity in Rat Brain. **Curr. Neurovasc. Res.**, v. 4, p.184 - 193, 2007.

REICHAEDT, L. F. Neurotrophin-regulated signalling pathways. **Philos. TR. Soc. B.**, v. 361, p. 1545–1564, 2006.

REUS, V. I. Behavioral Disturbances Associated with Endocrine Disorders. **Ann. Rev. Med.**, v. 37, p. 205 – 214, 1986.

RIVEIRA, E. J.; GOLDIN. A.; FULMER, N.; et. al. Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease:

link to brain reductions in acetylcholine. **J. Alzheimers Dis.**, v. 8, p. 247-268, 2005.

SANTOS, K. B.; VAISMAN, M.; FILHO, R. A. C.; BARRETO, N. D. M.; SLAVADOR, B. A.; SOUZA, A. M. O.; NÓBREGA, A.C.L. Skeletal muscle dysfunction and body composition in hyperthyroidism. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 46, p. 626 - 631, 2002.

SANTOS, T. O.; MUZUCANTI, C. R. Y.; XAVIER, G. F.; SILVA, A. T. Early and late neurodegeneration and memory disruption after intracerebroventricular streptozotocin. **Physiol. Behav.**, v. 107, p. 401 - 413, 2012.

SALA-ROCA, J.; ASSUMPCIO, M.; CARBONELL, M.; GARAU, S.; DARBRA, S.; BALADA, F. Effects of dysthyroidism in plus maze and social interaction tests. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 72, p. 643 - 650, 2002.

SALKOVIC-PETRISIC, M.; TRIBL, F.; SCHMIDT, M.; HOYER, S.; RIEDERER, P. Alzheimer-like changes in protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 in rat frontal cortex and hippocampus after damage to the insulin signalling pathway. **J. Neurochem.**, v. 96, p. 1005 - 1015, 2006.

SERRANO-NASCIMENTO, C.; CALIL-SILVEIRA, J.; NUNES, M. T. Posttranscriptional regulation of sodium-iodide symporter mRNA expression in the rat thyroid gland by acute iodide administration. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v.298, p. C893 - C899, 2010.

SHEPHERD, J. K.; GREWAL, S. S.; FLETCHER, A.; BILL, D. J.; DOURISH, C.T. Behavioural and pharmacological characterisation of the elevated "zero-maze" as an animal model of anxiety. **Psychopharmacology**, v.116, p. 56 - 64, 1994.

SMITH, J. W, et. al. Thyroid hormones, brains functions and cognition: a brief review. **Neurosci. Behav. Rev.**, v. 26, p. 45 - 60, 2002.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA.
<http://www.endocrino.org.br/numeros-do-diabetes-no-brasil/>

STEEN, E.; TERRY, B. M.; RIVERA, E. J., et. al. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease: is this type 3 diabetes? **J Alzheimers Dis.**, v. 7, p. 63 - 80, 2005.

STERN, R. A.; ROBINSON, B.; THORNER, A. R; ARRUDA, J. E.; PROHASKA, M. L.; PRANGE, A. J. A survey study of neuropsychiatric complaints in patients with Graves' disease. **J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.**, v. 8, p. 181 - 185, 1996.

SUI, L., REN, W. W.; LI, B. M. Administration of thyroid hormone increases reelin and brain-derived neurotrophic factor expression in rat hippocampus in vivo. **Brain. Res.**, v.1313, p. 9 - 24, 2010.

SUN, X. J.; LIU, F. Phosphorylation of IRS proteins: yin–yang regulation of insulin signaling. **Vitam. Horm.**, v. 80, p. 351 - 387, 2009.

SWARTZ, B. E.; HALGREN, E.; FUSTER, J. M.; SIMPKINS, E.; GEE, M.; MANDELKERN, M. Cortical metabolic activation in humans during a visual memory task. **Cereb. Cortex**, v. 5, p. 205 - 214, 1995.

TALLEY, C. P.; CLAYBORN, H.; JEWEL, E.; MCCARTY, R.; GOLD, P. E. Vagotomy attenuates effects of L-glucose but not of D- glucose on spontaneous alternation performance. **Physiol. Behav.**, v. 77, p. 243-249, 2002.

THORNTON, T. M.; PEDRAZA-ALVA, G.; DENG, B.; WOOD, C. D.; ARONSHTAM, A.; CLEMENTS, J. L.; SABIO, G.; DAVIS, R. J.; MATTHEWS, D. E.; DOBLE, B. B.; RINCON, M. Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3 β inactivation. **Science**, v. 320, p. 667 - 670, 2008.

TONRA, J. R.; ONO, M.; LIU, X.; JACSON, C.; YANCOPOULOS, G. D.; WIEGAND, S. J.; WONG, V. Brain-derived neurotrophic factor improves blood glucose control and alleviates fasting hyperglycemia in C57BLKS-Lepr (db) /lepr (db) mice. **Diabetes**, v. 48, p. 588 - 594, 1999.

TSAL, S. J. Brain-derived neurotrophic factor: a bridge between major depression and Alzheimer's disease? **Med. Hypotheses**, v. 61, p. 110 - 113, 2003.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R.A. The open field test: a critical review. **Psychol. Bull.**, v. 83, p. 481 - 504, 1976.

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

YEN, P. M.; ANDO, S.; FENG, X.; LIU, Y.; MARUVADA, P.; XIA, X. Thyroidhormone action at the cellular, genomic and target gene level. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 246, p. 121 - 127, 2006.

YOSHII, A.; CONSTANTINE – PATON, M. BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity and disease. **Dev. Neurobiol.**, v. 70, p. 304 - 322, 2010.

ZAGREBELS M; KORTE M. Form follows function: BDNF and its involvement in sculpting the function and structure of synapses. **Neuropharmacology**, 76, 628-638,2014.

ZHEN, Y. F.; ZHANG, J.; LIU, X. Y, et. al. Low BDNF is associated with cognitive deficits in patients with type 2 diabetes. **Psychopharmacology**, v. 227, p. 93 - 100, 2013.

ZHANG, J.; LAZAR, M. A. The mechanism of action of thyroidhormones, **Annu. Rev. Physiol.**, v. 62, p. 439 - 466, 2000.