

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL

ESCOLA DE ENFERMAGEM - EENF

CARMELITA BASTOS MENDES

**Modulação da Expressão da AQUAPORINA-4 Cerebral pelo Hormônio da
Tireoide (T3) durante o período de desenvolvimento do Sistema Nervoso
Central de Camundongos Swiss**

.

Maceió, AL

2019

CARMELITA BASTOS MENDES

Modulação da Expressão da AQUAPORINA-4 Cerebral pelo Hormônio da Tireoide (T3) durante o período de desenvolvimento do Sistema Nervoso Central de Camundongos Swiss

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para graduação no curso de Enfermagem da Universidade Federal de Alagoas-UFAL.

Orientadora: Prof^a Dr^a Adriana Ximenes da Silva

Maceió, AL

2019

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale CRB4 - 661

M538m Mendes, Carmelita Bastos.

Modulação da expressão da aquaporina-4 cerebral pelo hormônio da tireoide (T3) durante o período de desenvolvimento do sistema nervoso central de camundongos Swiss / Carmelita Bastos Mendes. – 2019.
44 f. : il.

Orientadora: Adriana Ximenes da Silva.

Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Enfermagem) – Universidade Federal de Alagoas. Escola de Enfermagem. Maceió, 2019.

Bibliografia: f. 37-40.

Anexos: f. 41-43.

1. Aquaporina-4. 2. Hormônio T3 da tireoide. 3. Astrócitos. 4. Sistema nervoso central. 54. Desenvolvimento cerebral. I. Título.

CDU: 616-83:612.44

Folha de Aprovação

AUTORA: CARMELITA BASTOS MENDES

(Modulação da Expressão da AQUAPORINA-4 Cerebral pelo Hormônio da Tireoide (T3) durante o período de desenvolvimento do Sistema Nervoso Central de Camundongos Swiss/ Trabalho de Conclusão de Curso em Enfermagem, da Universidade Federal de Alagoas, na forma normatizada e de uso obrigatório).

Trabalho de Conclusão de Curso
submetido ao corpo docente da Escola de
Enfermagem da Universidade Federal de
Alagoas e aprovado em
16/08/2019.

Adriana Ximenes

Profª Drª Adriana Ximenes da Silva

Banca Examinadora:

Ana Carolina Santana Vieira

Profª Drª Ana Carolina Santana Vieira

Lanni Sarmiento da Rocha

Msc. Lanni Sarmiento da Rocha

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pelo dom da vida e por ter me permitido encontrar com pessoas tão especiais durante minha jornada acadêmica;

À minha mãe, Olga, por tudo: por ser quem é, por ter acolhido minhas escolhas e entendido minhas inquietações, pelo carinho e dedicação incondicionais a mim dedicados. Se eu conseguir ser metade do que a senhora é, serei grande. Todas as minhas vitórias são suas! Sempre.

Às minhas tias Ana Bastos e Genilma, pela torcida fiel, pelos livros e por escutarem minhas inquietações há tanto tempo. Vocês me inspiram!

Ao meu irmão Matheus, à minha cunhada Karoline e à minha sobrinha, Marina (minha orientadora particular), pelas caronas, alegrias e momentos de leveza;

Aos meus avós maternos, Carmelita e Paulo, pela torcida e preocupação de sempre;

À minha orientadora Professora Adriana Ximenes da Silva, por ter me acolhido na sua equipe, pela orientação, confiança, por ter me dado tantas oportunidades incríveis e, principalmente, por ter me ensinado muito mais do que ciência durante esses três anos de convivência, pois em seu laboratório também aprendi sobre humanidade. A senhora é e sempre será uma referência. Neuro é 10 por culpa sua;

À professora Ana Carolina Santana Vieira e à Lanni Sarmiento da Rocha (também companheira de laboratório) por terem aceitado o convite e por todas as sugestões, correções e atenção dispensadas a este Trabalho de Conclusão de Curso;

Ao meu grande amigo, José Clementino Neto (Zecation), pela força, orientações, torcida e pela enorme paciência. Tenho muito orgulho da amizade que construímos. Você é um ser humano admirável. Encontrá-lo no LEMC foi uma grata surpresa;

Às colegas de turma pelo companheirismo e todo aprendizado durante esses anos de curso;

Às amigas que a Enfermagem me deu, Débora Ferreira (gêmea), Gabriella Keren, Raphaella Moreira e Laryssa Palmeira, por me aturarem durante esses cinco anos de graduação e pela torcida de sempre;

Aos amigos que fiz no Laboratório de Eletrofisiologia e Metabolismo Cerebral (LEMC): Lucas Costa (o cara mais gente boa e desenrolada que conheço: engraçado!), Eduardo Costa (parceiro de viagem, de muito trabalho, mas também de muitas risadas e aprendizado!), Guilherme Malta (meu malvado favorito), Lanni Sarmiento, Dayane Lemos, Giselda Alcântara, Máisa de Araújo, Cibelle Bastos e Lucas Chagas, muito obrigada! Vocês são muito importantes para mim. Nossos momentos de confraternização ficaram na memória. Contem comigo e vamos em frente!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), instituições de fomento que financiaram esse projeto e, também, pela concessão da bolsa de Iniciação Científica durante os dois anos de trabalho.

Tás a Ver?

(Gabriel, o Pensador, 2005)

*“(...) A vida é feita de pequenos nada
Que agente saboreia, mas não dá valor
Um pensamento, uma palavra, uma risada
Uma noite enluarada ou um sol a se pôr
Um bom dia, um boa tarde, um, por favor.
Simpatia é quase amor.
Uma luz acendendo, uma barriga crescendo
Uma criança nascendo, obrigado senhor.
Seja lá quem for o senhor
Seja lá quem for a senhora
A quem quiser me ouvir e a mim mesmo
Eu preciso dizer tudo o que eu estou dizendo agora
Preciso acreditar na comunicação.
Não há melhor antídoto pra solidão.
E é por isso que eu não fico satisfeito em sentir o que eu sinto
Se o que sinto fica só no meu peito
Por mais que eu seja egoísta
Aprendi a dividir minhas derrotas e minhas conquistas
Nada disso me pertence
É tudo temporário no tapete voador do calendário
Já que temos forças pra somar e dividir
Enquanto estivermos aqui
Se me ouvires cantando, canta comigo
Se me vires chorando, sorria.
Tás a ver a vida como ela é?
Tás a ver a vida como tem que ser?
Tás a ver a vida como a gente quer?
Tás a ver? A vida é pra gente viver.”*

RESUMO

Introdução: Os hormônios da glândula tireoide (HT) L-3,5,3',5'-Tetraiodotironina (Tiroxina/T4) e L-3,5,3'-Triiodotironina (T3) são classicamente reconhecidos por seus papéis na homeostase geral, maturação e diferenciação celular durante o desenvolvimento embrionário. Em astrócitos, o T3 regula a expressão de proteínas da matriz extracelular (MEC) durante o desenvolvimento cerebral e a secreção de fatores de crescimento. As Aquaporinas (AQP's) são uma família de pequenas proteínas integrais de membrana que exercem papel crucial no transporte bidirecional de água através de membranas plasmáticas. A AQP4, principal canal de água no cérebro, é predominantemente expressa nos prolongamentos astrogliais da Barreira Hematoencefálica (BHE), e ganhou visibilidade como potencial alvo terapêutico depois da descoberta de seu papel na fisiopatologia de doenças como Neuromielite Óptica, Astrocitomas e Acidente Vascular Encefálico (AVE). **Objetivo:** No presente trabalho, buscou-se avaliar se a expressão da AQP4 cerebral pode ser modulada pela ação do T3 durante o desenvolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC) de camundongos Swiss. **Método:** Fêmeas no 18º dia de gestação ou machos jovens com 27 e 57 dias de vida receberam, por via intraperitoneal (I.P), 1µg/g do hormônio T3 diluído em solução de NaOH 0.02N ou somente NaOH 0.02N durante três dias consecutivos. A reação imunohistoquímica foi efetuada para a AQP4 e foi utilizada igualmente a marcação com GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) para identificar a localização da AQP4 com maior especificidade em astrócitos. **Resultados:** Quando comparado ao grupo controle, o tratamento com T3 (1µg/g) reduziu de forma significativa a expressão da AQP4 no córtex cerebral dos animais no início da vida, P0 ($p < 0.02$). Durante a fase adulta, no entanto, o tratamento com T3 proporcionou um aumento da expressão da AQP4 ($p < 0.0001$) e evidenciou um padrão de expressão discretamente maior, mas sem significância, com tendência à estabilidade nos animais com 60 dias de vida (P60). **Conclusão:** A expressão da AQP4 no cérebro varia de acordo com a fase de desenvolvimento do sistema nervoso e é modulada, em diferentes fases, pelo hormônio da tireoide T3. Logo, nossos achados indicam o T3 como um potencial agente modulador da expressão da AQP4 em diferentes fases de desenvolvimento do sistema nervoso.

Palavras-chave: aquaporina-4, hormônio da tireoide, astrócitos, desenvolvimento cerebral

ABSTRACT

Introduction: The thyroid hormones (TH) L-3,5,3', 5'-Tetraiodothyronine (Thyroxine/ T4) and L-3,5,3'-Triiodothyronine (T3) are classically known for their roles in homeostasis, cell maturation and differentiation during embryonic development. In astrocytes, T3 regulates extracellular matrix (ECM) proteins expression and secretion of growth factors during brain development. Aquaporins (AQP's) are a family of small integrated membrane proteins that play a crucial role in bidirectional water transport across plasma membranes. AQP4 is the main brain water channel predominantly expressed in the Blood-Brain Barrier (BBB) astrocytes end-feet encircling endothelial cells and has been pointed out as a therapeutic target in pathological conditions as neuromyelitis optica, astrocytomas, and stroke. **Objective:** In the present study, we aimed to investigate if AQP4 expression during Central Nervous System (CNS) development in Swiss mice was on the modulation of T3 thyroid hormone. **Method:** Females on the 18th day of pregnancy or young males 27 and 57 days old, received intraperitoneally 1µg/g of T3 hormone diluted in 0.02N NaOH solution or vehicle only for three consecutive days. Immunohistochemical assay for AQP4 and GFAP (Glial Fibrillar Acid Protein) were performed to distribution and localization of AQP4 in brain astrocytes. **Results:** When compared to control group, treatment with T3 (1µg / g) significantly decreased AQP4 expression in the cerebral cortex of newborn P0 animals ($p < 0.02$). During adulthood, however, treatment with T3 increased AQP4 expression ($p < 0.0001$) and showed a slightly no statistically significant higher immunoreactivity than untreated group in 60-day-old animals. **Conclusion:** The expression of AQP4 varies according to the CNS stage of development and is modulated in different phases by the thyroid hormone T3. Therefore, our findings indicate T3 as a potential modulator of AQP4 expression during different stages of central nervous system development.

Keywords: aquaporin-4, thyroid hormone, astrocytes, brain development

LISTA DE FIGURAS

Descrição da Lista de Figuras	Páginas
Figura 1 – Representação esquemática das duas principais vias de regulação de secreção e metabolismo dos hormônios da tireoide (T3 e T4).....	11
Figura 2 – Modelo de subunidade de AQP's.....	16
Figura 3 – Representação esquemática do delineamento experimental.....	23
Figura 4 – Etapas experimentais referentes ao procedimento de perfusão transcárdica.....	25
Figura 5 – Localização da AQP4 na região cortical próxima à superfície pial em animais P30 do grupo CTRL.....	28
Figura 6 – Distribuição (AQP4) no córtex cerebral de camundongos nos dias pós-natais 0, 30 e 60 do grupo controle (CTRL) e do grupo tratado (T3).....	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AQP1- Aquaporina-1

AQP4 – Aquaporina-4

AQP9 - Aquaporina-9

AVE – Acidente Vascular Encefálico

BHE – Barreira Hematoencefálica

BHL – Barreira Hematoliquórica

BSA – *Bovine Serum Albumin*

CTRL – Controle

DA – Doença de Alzheimer

D2 – Isoforma 2 da Desiodase

D3 – Isoforma 3 da Desiodase

GBM – Glioblastoma Multiforme

GFAP- *Glial Fibrillary Acidic Protein*

HT's – Hormônios Tireoidianos

IG – Idade gestacional

IgG – Imunoglobulina G

IP – Intraperitoneal

LCS – Líquido Cerebrospinal

MAPK - *Mitogen Activated Protein Kinases*

MCT8 – *Monocarboxylate Transporter*

MEC – Matriz Extracelular

MIWC – *Mercurial-Insensitive Water Channel*

NGS – *Normal Goat Serum*

PBS – *Phosphate-Buffered Saline*

PFA – Paraformaldeído

PIC – Pressão Intracraniana

PKC – *Protein Kinase C*

SNC- Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

TGI – Trato Gastrintestinal

TSH - *Thyroide-stimulating hormone*

TRH - *TSH realeasing hormone*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVO	21
3. METODOLOGIA	22
3.1 – Animais.....	22
3.2 – Delineamento Experimental.....	22
3.3 – Lista de Substâncias	23
3.4 – Perfusão Transcardíaca	24
3.5 – Imunohistoquímica por fluorescência para AQP4 e GFAP cerebrais	25
3.6 – Análise de Fluorescência.....	26
3.7 – Análise Estatística	26
4. RESULTADOS.....	27
4.1 – Análise do nível de fluorescência para AQP4 cerebral de animais P0 do grupo CTRL e submetidos ao tratamento com T3.....	27
4.2 – Análise do nível de fluorescência para AQP4 cerebral de animais P30 e P60 dos grupos CTRL e submetidos ao tratamento com T3.	27
4.3 - Análise do nível de fluorescência para AQP4 cerebral de animais P0, P30 e P60 do grupo CTRL.	27
5. DISCUSSÃO	30
6. CONCLUSÃO	34
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
REFERÊNCIA DIGITAL.....	40
ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA).....	41
ANEXO B - Artigo publicado	42

1. INTRODUÇÃO

Os hormônios da glândula tireoide (HT) L-3,5,3',5'-Tetraiodotironina (Tiroxina/T4) e L-3,5,3'-Triiodotironina (T3) são classicamente reconhecidos por atuarem sobre a homeostase geral, energia corporal e também, de maneira crítica, na maturação e diferenciação celular durante o desenvolvimento embrionário, síntese e secreção de fatores de crescimento, sendo primordiais no consumo de oxigênio e no metabolismo celular (NUNES, 2003).

Apesar de serem sintetizados na glândula tireoide e estarem sob ação de uma via autorregulatória, os HT's têm sua secreção modulada, também, por uma via neuroendócrina representada pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-tireoide (**figura 1A**).

Os HT's, T4 e T3, são produzidos nas células foliculares da glândula tireoide através de um processo de desiodação. O T3 é cerca de 3-5 vezes mais biologicamente ativo que o T4. Ambos agem, basicamente, por duas vias de ação de mecanismo molecular: **1)** pela ligação do T3 aos receptores nucleares do HT, que resulta na modificação da expressão gênica de diversos genes nas células-alvos (ação genômica) e **2)** pela ação direta do T3 e T4 em vias de sinalização em alvos extra-nucleares (ação não-genômica) (**figura 1B**) sendo ambas as formas de ação mediadas pela ligação entre o HT e seus receptores, com a diferença de localização desses receptores: no segundo caso, estão localizados na membrana plasmática e no citoplasma (NUNES, 2003; KIMURA, 2015, p.1060 e CHENG *et.al.*, 2010).

O metabolismo e a síntese destes hormônios se dão, na maioria das vezes, *in locu* por meio da ação de enzimas específicas, as selenioproteínas desiodases e dependem, também, da disponibilidade de iodo no organismo. Aproximadamente 85% do T3 ativo são biotransformados a partir do T4 nas células alvo. (ARMSTRONG *et.al.*, 2014, p.450).

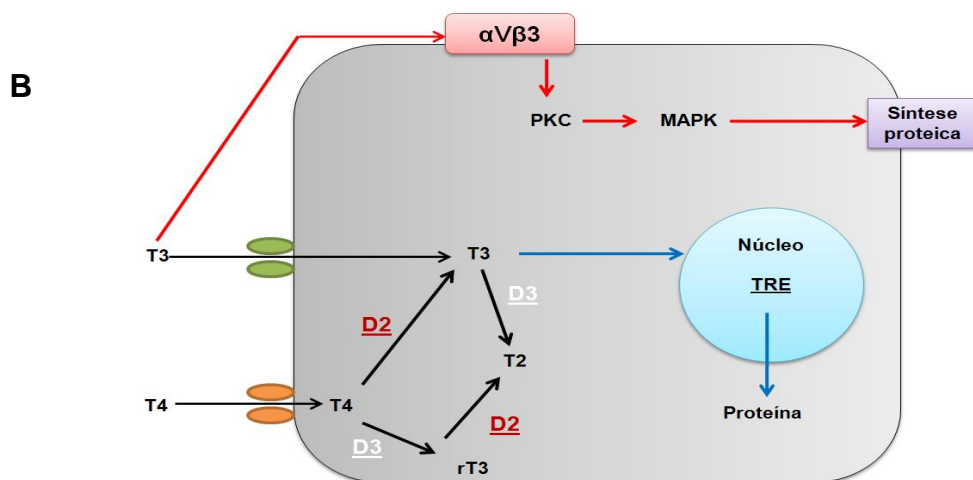
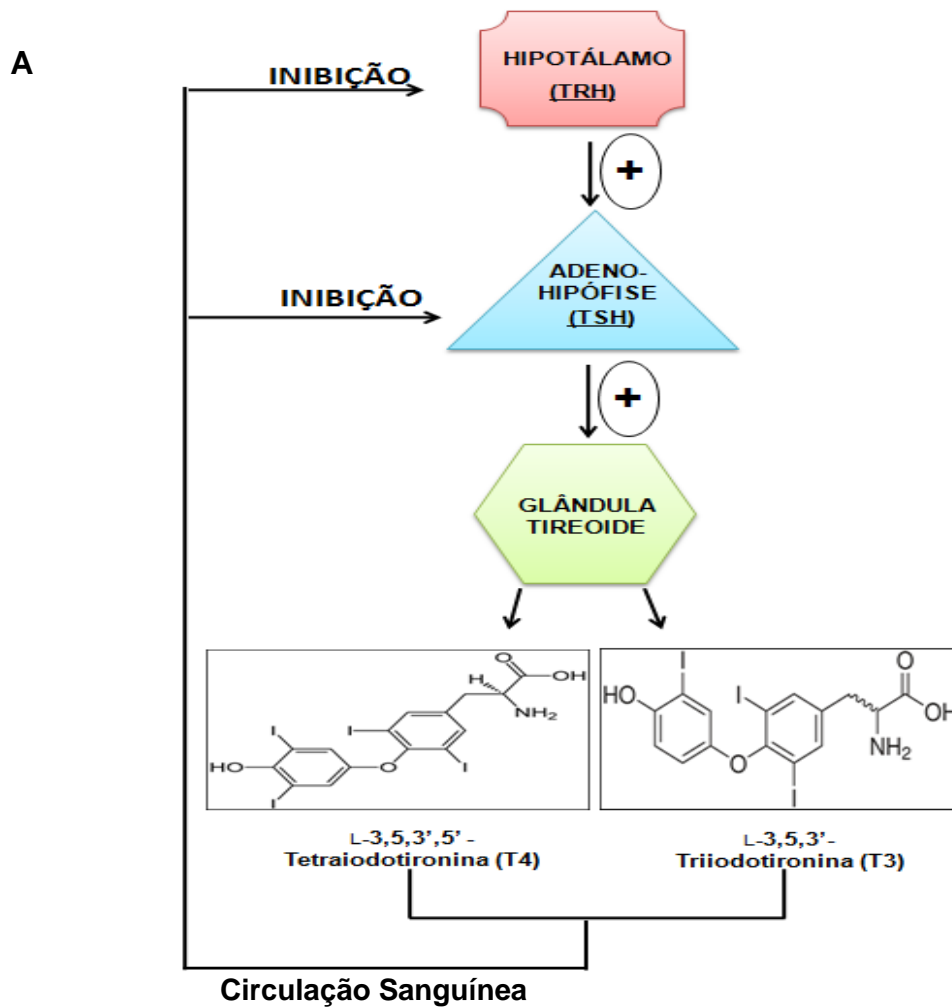


Figura 1 – Representação esquemática das duas principais vias de regulação de secreção e metabolismo dos hormônios da tireoide (T3 e T4). **A)** Alça de *feedback* negativo formada pelo eixo hipotálamo-hipófise-tireoide; **B)** Representação sumarizada das duas vias de ação dos hormônios T3 e T4. O fluxo representado por setas azuis indica a via de ação genômica; o fluxo identificado por setas vermelhas indica a via de ação não-genômica. **TSH**, *Thyroid-stimulating hormone*; **TRH**, *TSH releasing hormone*; **PKC**, *Protein Kinase C*; **MAPK**, *Mitogen Activated Protein Kinases* **TRE**, *Thyroid Response Element*; **D2**, Isoforma 2 da Desiodase; **D3**, Isoforma 3 da Desiodase (Adaptada de KIMURA, 2015 e TONI, et.al., 2009).

Por muito tempo as células gliais, os astrócitos – as células mais abundantes do Sistema Nervoso Central (SNC) - de maneira especial, foram considerados agentes passivos em meio às outras células do SNC e Sistema Nervoso Periférico (SNP); no entanto, cada vez mais se tem evidenciado a participação dessas células como sendo chaves em diversos processos cerebrais por suas capacidades de enviar e receber sinais, regulando concentrações extracelulares de íons, metabólitos e neurotransmissores para coordenar a diferenciação, metabolismo e excitabilidade dos neurônios e modular a transmissão sináptica, além de participarem da regulação hormonal, exercendo grande impacto no metabolismo energético cerebral (GARCIA-SEGURA, *et.al.*, 2004; ROUACH *et.al.*, 2008 *apud* GOMES, *et.al.*, 2013 e VERKMAN, 2008).

No SNC, os hormônios têm ação crítica na interação glia-neurônio exercendo ações neuromoduladoras e neurotróficas sob condições fisiológicas ou patológicas. Esse contato mediado pela sinalização hormonal de células gliais acontece de duas maneiras: **1)** quando o hormônio age diretamente na glia e esta, por sua vez, envia sinais ao neurônio para modular sua função; ou **2)** a ação hormonal acontece primeiro sobre o neurônio, fazendo com que ele libere substâncias de sinalização para glia. Esta, então, encaminha o sinal de volta ao primeiro neurônio ou a outros adjacentes. Células da glia também sintetizam metabólitos hormonais ativos que afetam a função neuronal. Um exemplo de associação entre processos de síntese e metabolismo é o caso do T3. (GARCIA-SEGURA, *et.al.*, 2004 e GOMES, *et.al.*, 2013).

De acordo com TRENTIN (2006), os astrócitos têm papel central no metabolismo dos HT's funcionando como principal via de acesso do T4 sérico ao cérebro, sendo responsável por sua conversão em T3 e, por consequência, pelo suprimento dos tecidos neurais da forma biologicamente ativa do hormônio, atribuindo aos astrócitos a função mediadora entre o T3 e os processos de desenvolvimento neural.

Especificamente em astrócitos, o T3 regula a expressão da matriz extracelular (MEC) durante o desenvolvimento cerebral e a secreção de fatores de crescimento que, no cerebelo, como demonstrado por TRENTIN *et.al.* (2001), age de maneira

autócrina, induzindo a proliferação astrocitária, reorganização da MEC e a proliferação de neuroblastos cerebelares.

O aporte adequado destes hormônios durante o período de desenvolvimento cerebral é de extrema importância, pois até mesmo déficits considerados discretos podem desencadear consequências neurológicas graves para o feto, como, por exemplo, o cretinismo, estado patológico caracterizado por redução abrupta das concentrações séricas do hormônio tireoidiano durante o período de desenvolvimento (POTERFIELD, 1994; GOODMAN & GILBERT, 2007).

Também foi demonstrado por GOODMAN & GILBERT (2007), ao inibirem em ratas, de forma gradativa a disponibilidade do T4 durante o período gestacional, que níveis reduzidos do T4 promovem disposição celular/neuronal aberrante, uma heterotopia, dentro da substância cinzenta do corpo caloso. ALVAREZ-DOLADO *et.al.* (1999) também demonstraram que o hipotireoidismo gestacional altera a viabilidade de células da glia radial, que são necessárias para formação do neocórtex. O T3 também está diretamente envolvido no desenvolvimento de neurônios granulares, pois afeta sua viabilidade, capacidade de diferenciação, além de prevenir processos apoptóticos (TRENTIN, 2006).

Níveis reduzidos do T3 também têm sido correlacionados a uma maior predisposição ao surgimento de algumas condições patológicas que afetam de maneira grave o SNC. O Acidente Vascular Encefálico (AVE) (JIANG, *et.al.*, 2017) e alguns tipos de tumores astrocitários, como o Glioblastoma Multiforme (GBM) (XIONG, *et.al.* 2018) são exemplos dessas condições. O GBM é um tipo de tumor cerebral de alto grau de malignidade por sua capacidade de invadir tecidos adjacentes e de migração, tornando-se então, de difícil tratamento e de prognóstico desfavorável: pacientes recém-diagnosticados têm expectativa de sobrevivência de apenas 12 a 14 meses após o diagnóstico (LACROIX *et.al.*, 2001).

Nosso grupo de pesquisa demonstrou (COSTA *et.al.*, 2019) que o T3 pode desempenhar ação importante sobre a expressão da AQP4, reduzindo-a em células do tipo GBM-95, apontando para uma potencial ação terapêutica desse hormônio em glioblastomas.

A concentração intracelular dos HT's é modulada por um grupo de enzimas conhecidas como desidases, citadas anteriormente, sendo representado por três isoformas (1, 2 e 3), e que são responsáveis por catalisar a desidatação do pró-hormônio T4 em T3 ou gerar seus produtos biologicamente inativos, como rT3 e T2, a depender do tecido no qual estas enzimas são expressas e dos níveis de HTs circulantes. Portanto, são responsáveis pela ativação ou inativação desses hormônios. A particularidade do SNC, no que diz respeito à síntese e metabolismo dos HT's, é expressar ambas as isoformas D2 e D3 em astrócitos e neurônios, respectivamente, com perfil de maior expressão durante o período de desenvolvimento (NUNES, 2003).

A isoforma D2 – metabolismo do T4 em T3 - é significativamente expressa em tecido placentário e no SNC, tendo sua atividade elevada no hipotireoidismo e diminuída no hipertireoidismo. A D3, por sua vez, tem papel inativador, gerando por meio de sua ação somente produtos biologicamente inativos: rT3 e T2, a partir do T4 e T3, respectivamente. Portanto, o padrão de atividade desta é diminuído no hipotireoidismo e aumentado no hipertireoidismo (KIMURA, 2015, p.1070; NUNES, 2003, HERNANDEZ *et.al.*, 2012).

O SNC apresenta muitas peculiaridades no que diz respeito à sua homeostase hídrica e energética. Todo líquido direcionado ao parênquima encefálico (interstício) e aos espaços intraventricular e subaracnóideo (que contêm Líquido cefalorraquiano (LCR)) são regulados pela Barreira Hematoencefálica (BHE) e Hematoliquórica (BHL), respectivamente. (LATERRA & GOLDSTEIN, 2014, p.1370; KIMELBERG, 2004). Nas doenças relacionadas ao SNC como, por exemplo, meningite bacteriana, trauma cerebral, tumores cerebrais e hidrocefalia, as taxas de fluxo de entrada e saída de água sobem, resultando no aumento da Pressão Intracraniana (PIC) pelo acúmulo excessivo de água nos compartimentos intracranianos. Esse aumento, por sua vez, tem efeitos deletérios ao SNC, com desfechos clínicos desfavoráveis como isquemia, herniação e, por fim, morte cerebral (PAPADOPOULOS & VERKMAN, 2005; PAPADOPOULOS & VERKMAN, 2013).

Nesse contexto, surgem as aquaporinas (AQP's), uma família de pequenas proteínas integrais de membrana (WALZ *et.al.*, 2009) que exercem efeito regulatório no transporte bidirecional de água através de membranas, a favor de um gradiente

osmótico nas células. Atualmente, 14 membros desta família (AQP0 – AQP13) são conhecidos e caracterizados em mamíferos, entre humanos e roedores (VERKMAN, *et.al.*, 2014). Dados das últimas décadas sustentam que essa família de proteínas - amplamente expressa em diversos sistemas biológicos – influencia, também, na secreção de fluidos epiteliais, migração celular, formação e resolução de edema, neurotoxicidade, dentre outras condições (PAPADOPOULOS & VERKMAN, 2013; SADANA *et.al.*, 2015 e XIMENES-DA-SILVA, 2016).

O primeiro canal de água integrante dessa família a ser caracterizado foi o CHIP28, posteriormente denominado como Aquaporina-1 (AQP1) (PRESTON & AGREE, 1991) que pode ser encontrado no SNC, mais especificamente, no plexo coroide, com aparente função na secreção de Líquido Cerebrospinal (LCS); em vários órgãos do Trato Gastrointestinal (TGI), além do endotélio da córnea, em eritrócitos e nos rins, com destaque para o túbulo contorcido proximal (CHEIDDE & SCHOR, 1999).

Partindo de uma perspectiva estrutural, as AQP's estão organizadas em tetrâmeros, onde cada monômero funciona como poro seletivamente permeável à água (**figura 2**) e também a alguns outros pequenos solutos como o glicerol (aquagliceroporinas), além do transporte de gases (CO₂, NH₃, NO e O₂) e íons K⁺ e Cl⁻ (PAPADOPOULOS & VERKMAN, 2013). A permeabilidade à água é determinada por cada subunidade de maneira individual, pois as AQP's estão inseridas na membrana plasmática de forma cristalina, de maneira que nem sua lateralidade e nenhum tipo de mobilidade rotacional interferem no exercício de suas funções. Dentre os membros dessa família de proteínas, dois deles, além da AQP1, são comprovadamente expressos no SNC: Aquaporina-4 (AQP4) e Aquaporina-9 (AQP9) (CHEIDDE & SCHOR, 1999).

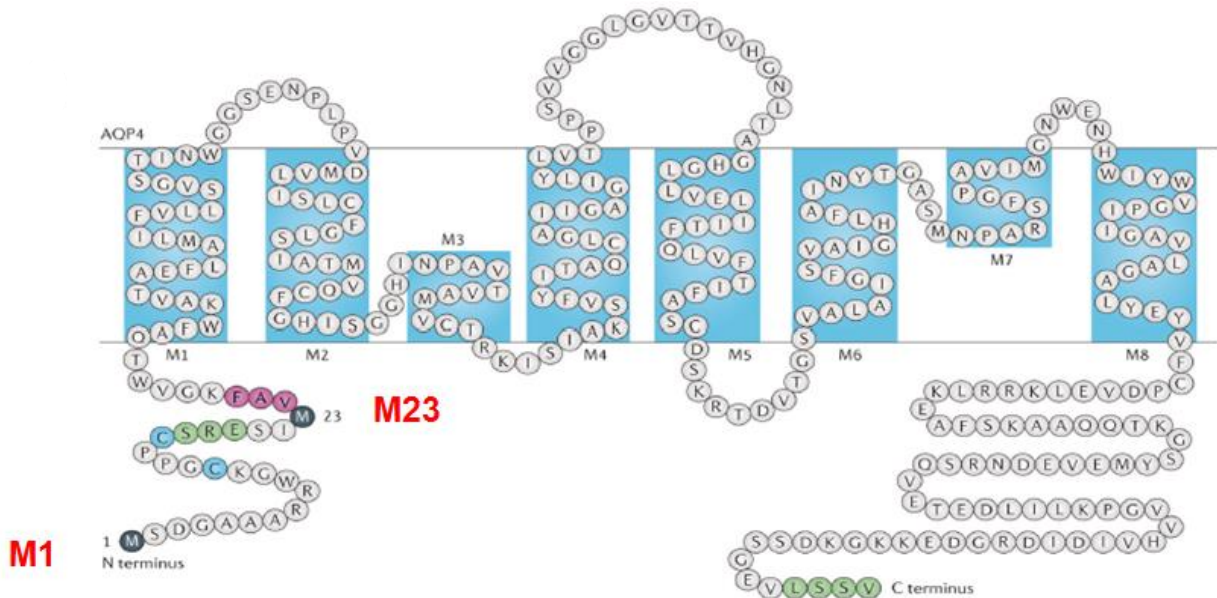
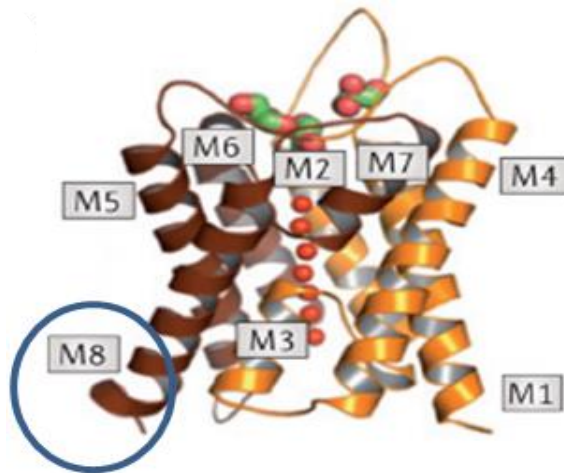
A**B**

Figura –2 A) Sequência primária de aminoácidos e a topologia de membrana da aquaporina 4 (AQP4) com oito segmentos helicoidais inseridos na membrana, M1-M8 e dois locais de iniciação de tradução - Met1 e Met23 (vermelho) o que corresponde às duas isoformas da AQP4, M1 e M23, respectivamente. **B)** Estrutura cristalina de raios-X da AQP4 em humanos (RCSB Protein Data Bank ID: 3GD8) mostrando os oito segmentos helicoidais incorporados na membrana (PAPADOPOULOS & VERKMAN, 2013).

Considerado o principal canal transportador de água no cérebro, a AQP4, proteína de maior interesse neste trabalho, foi isolada primariamente em regiões bastante específicas e estratégicas do tecido cerebral: revestindo os ventrículos cerebrais e espaço subaracnoide e, principalmente, nos prolongamentos astrocitários constituintes da BHE; também são encontradas em células endoteliais que revestem os espaços subventriculares onde exercem um papel

facilitador no movimento de água entre o LCS e o parênquima encefálico (LATERRA & GOLDSTEIN, 2014 e VERKMAN, 2009).

Inicialmente denominada *Mercurial-Insensitive Water Channel* (MIWC) devido a uma característica particular de insensibilidade ao mercúrio (JUNG *et. al.*, 1994), essa proteína vem ganhando grande visibilidade do ponto de vista clínico depois da descoberta de seu papel como antígeno para doenças inflamatórias autoimunes ligadas aos distúrbios do espectro da Neuromielite Óptica, doenças de caráter degenerativo do SNC que atinge, principalmente, o nervo óptico e a medula espinal (MADER & BRIMBERG, 2019).

Sua expressão pode ser regulada de acordo com alterações nas funções metabólicas, o volume do fluido extracelular e o processo de tumorigênese, por exemplo, e em distúrbios que produzem disfunções da BHE e edema encefálico (DENG *et.al.*, 2014; SAADAUN *et.al.*, 2002 e NOELL *et.al.*, 2012).

Muitos estudos corroboram quanto à atuação da AQP4 na determinação da permeabilidade à água da BHE. A deleção da AQP4 está associada a uma redução em sete vezes a permeabilidade à água em cultura celular de astrócitos (*in vitro*) e dez vezes no que diz respeito à BHE no cérebro de camundongos (*in vivo*) (PAPADOPOULOS & VERKMAN, 2005). Outros estudos descritivos demonstram que as mudanças na expressão da AQP4 no encéfalo estão correlacionadas com a extensão do edema cerebral em situações patológicas tanto em humanos quanto em roedores. No entanto, os padrões de expressão temporais e espaciais da AQP4 são complexos, de maneira que não é possível afirmar, com total segurança, se o aumento da expressão exacerba o edema ou potencializa sua resolução (DONALD, *et.al.*, 2004; MANLEY, *et. al.*, 2000).

MANLEY *et.al.* (2000) descrevem dois tipos de edema cerebral: citotóxico e vasogênico. O primeiro, resulta de um acúmulo de líquido intracelular em função de traumas ou isquemia que ocorre sem qualquer dano à BHE; e, o segundo, do escape do conteúdo plasmático capilar; ou seja, com danos à BHE. Ambos podem representar um processo contínuo, sendo o edema vasogênio, a evolução clínica do citotóxico.

Nesses casos a AQP4 se comporta de maneira bifásica: no primeiro, edema citotóxico (fase clínica precoce), a ausência da proteína em questão facilita a resolução do edema, tornando o prognóstico clínico favorável. Isto acontece porque a taxa de entrada de água pela AQP4 compreende uma etapa limitante da taxa de fluxo de água do sangue para o SNC; ou seja, aqui a AQP4 faz parte da formação do edema. No segundo, edema vasogênico (fase clínica tardia) a presença da AQP4 é que tem efeito resolutivo, pois as forças hidrostáticas conduzem a água e solutos do sangue através da BHE danificada para o espaço extracelular independente da AQP4. Ou seja, a AQP4 não influencia na formação do edema, mas participa de sua absorção. (PAPADOPOULOS *et.al.*, 2004)

Há estudos que relatam mudanças no padrão de expressão ou de distribuição da AQP4 em função de variações glicêmicas (hiperglicemia ou hipoglicemia) com consequentes mudanças na permeabilidade da BHE.

DENG *et.al.* (2014) usando modelo de edema cerebral induzido por hipoglicemia severa em ratos, constataram um aumento (*upregulation*) da expressão da AQP4 (*in vivo*) e um novo padrão de distribuição da proteína ao longo da membrana plasmática (*in vitro*) associados a um discreto aumento da permeabilidade da BHE. Resultados demonstrados por ZHAO, *et.al.* (2018), no entanto, evidenciaram redução do edema e do colapso da BHE ocasionados pela hipoglicemia, com a diminuição da resposta inflamatória em função da deleção da AQP4 cerebral, utilizando camundongos *knockout*.

Em outra pesquisa, desta vez, avaliando a expressão da AQP4 na hemorragia cerebral associada ao estado hiperglicêmico, CHENG-DI, *et.al.* (2013) demonstraram exacerbação do estado hemorrágico com regulação negativa da AQP4 (*downregulation*), sugerindo essa baixa como via de ação da evolução da hemorragia.

Outras evidências do papel da AQP4 na formação e resolução do edema cerebral após evento isquêmico em modelos animais a partir da oclusão da artéria cerebral média (transitória ou permanente) ou por intoxicação hídrica (inchaço celular), também trazem à tona este potencial ao relacionar o efeito anti-edema do regime de tratamento com T3 à supressão da expressão gênica da AQP4 tanto no

momento pré-evento isquêmico como no momento pós-isquemia (SADANA *et. al.*, 2015 e VELLA *et.al.*, 2016).

SADANA *et.al.* (2015) confirmaram esse eixo de interação neuroendócrino como possível contexto de mecanismo de ação ao testar, em difetente modelos e tempos experimentais. As ações do T3 e também de seu metabólito T2, foram evidenciadas como neuroprotetoras, sugerindo que a ação efetiva encontrada do T3 talvez esteja relacionada, também, a sua desidiação em T2, pois a ação aqui sugerida é não-genômica e o T2 tem menor afinidade aos receptores tireoidianos nucleares.

Outras condições neuropatológicas estão associadas às alterações na expressão ou localização da AQP4 (destruição do padrão de expressão polarizado). Durante processos epileptogênicos, por exemplo, a deficiência de AQP4 está associada a uma taxa mais lenta de recaptção de potássio pelos astrócitos após episódios de neuroexcitação (MADER & BRIMBERG, 2019 e VERKMAN *et.al.*, 2014).

Estudos mais recentes estão de acordo em relação à participação desta proteína em processos cognitivos e mnemônicos muito importantes em algumas condições neurológicas como, por exemplo, a Doença de Alzheimer (DA), evidenciando a participação da AQP4 no chamado Sistema Glinfático, reiterando a hipótese de que a AQP4 pode estar envolvida no *clearance* da proteína β -Amiloide (RASMUSSEN *et. al.*, 2018; SCHARFMAN *et.al.*, 2013 e HUBBARD *et.al.*, 2018) e que sua ausência ou menor expressão poderia potencializar o processo neurodegenerativo característico da DA.

SAADOUN *et.al.*, 2005 e 2002, descrevem a atividade dessa proteína no processo de formação de cicatriz glial e sua interferência nos diversos graus de severidade de tumores cerebrais humanos edematosos, os astrocitomas, respectivamente. No primeiro exemplo, camundongos com déficit na expressão de AQP4 têm dificuldade no processo de formação da cicatriz glial em resposta a um processo inflamatório pós-lesão cerebral, o que pode estar relacionada à redução do processo migratório astrocitário, facilitando a regeneração neural após episódios de dano cerebral ou espinal. Já no segundo caso, demonstram que há uma forte

correlação entre o aumento da expressão da AQP4 e a presença de edema cerebral em tumores cerebrais.

Todas estas informações atribuem a esta proteína um papel importante como potencial alvo terapêutico na resolução destes problemas. É válido destacar que a maioria dos dados existentes que tratam da AQP4 como alvo para terapias é resultante de ensaios experimentais utilizando camundongos *knockout* para AQP4, com poucos potenciais moduladores sendo testados, e somente durante a fase adulta. O uso do T3 como potencial modulador também implica vantagens, já que esse hormônio, produzido de maneira endógena, é do ponto de vista farmacológico, já bem caracterizado. Assim sendo, o presente trabalho propôs-se a avaliar o padrão de expressão da AQP4 cerebral durante três estágios de desenvolvimento do SNC de camundongos Swiss submetidos ou não ao tratamento com T3.

2. OBJETIVO

- ❖ Avaliar se a expressão da AQP4 cerebral pode ser modulada pela ação do T3 durante o desenvolvimento do Sistema Nervoso Central.

3. METODOLOGIA

3.1 – Animais

Camundongas Swiss prenhes com aproximadamente 14 dias de gestação ou machos jovens com 24 e 54 dias de vida, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (BIOCEN-UFAL), foram mantidos em biotério setorial climatizado a 22°C e submetidos a um ciclo claro/escuro de 12h para aclimatação durante três dias até atingirem o tempo de vida para início do tratamento experimental: 18 dias gestacionais para as fêmeas e 27 e 57 dias de vida para os machos. Água e ração foram ofertados *ad libitum* durante todas as etapas experimentais. Este estudo foi realizado de acordo com as recomendações do guia brasileiro para o cuidado e uso de animais de laboratório e comitê de ética local. O protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (#CEUA 25/2013 – **ANEXO A**).

3.2 – Delineamento Experimental

Fêmeas no 18º dia de gestação ou machos jovens com 27 e 57 dias de vida receberam, por via intraperitoneal (I.P), 1µg/g de peso animal do hormônio T3 (Sigma Aldrich (P.A.)) diluído em solução de NaOH 0.02N (Hidróxido de Sódio), caracterizando o grupo tratado; ou somente NaOH 0.02N, grupo controle (CTRL), durante três dias consecutivos; ou seja, até o dia do parto ou até completarem 30 e 60 dias de vida, respectivamente (**figura 3**). Os animais foram anestesiados ao nascerem (P0), aos 30 (P30) e aos 60 dias de vida (P60) e só então depois perfundido com solução salina 0,9% seguido por solução fixadora, paraformaldeído a 4% (PFA 4%) por meio do procedimento de perfusão transcardíaca, e seus cérebros foram dissecados e pós-fixados em 4% paraformaldeído a 4°C. N= 03-04 animais/grupo.

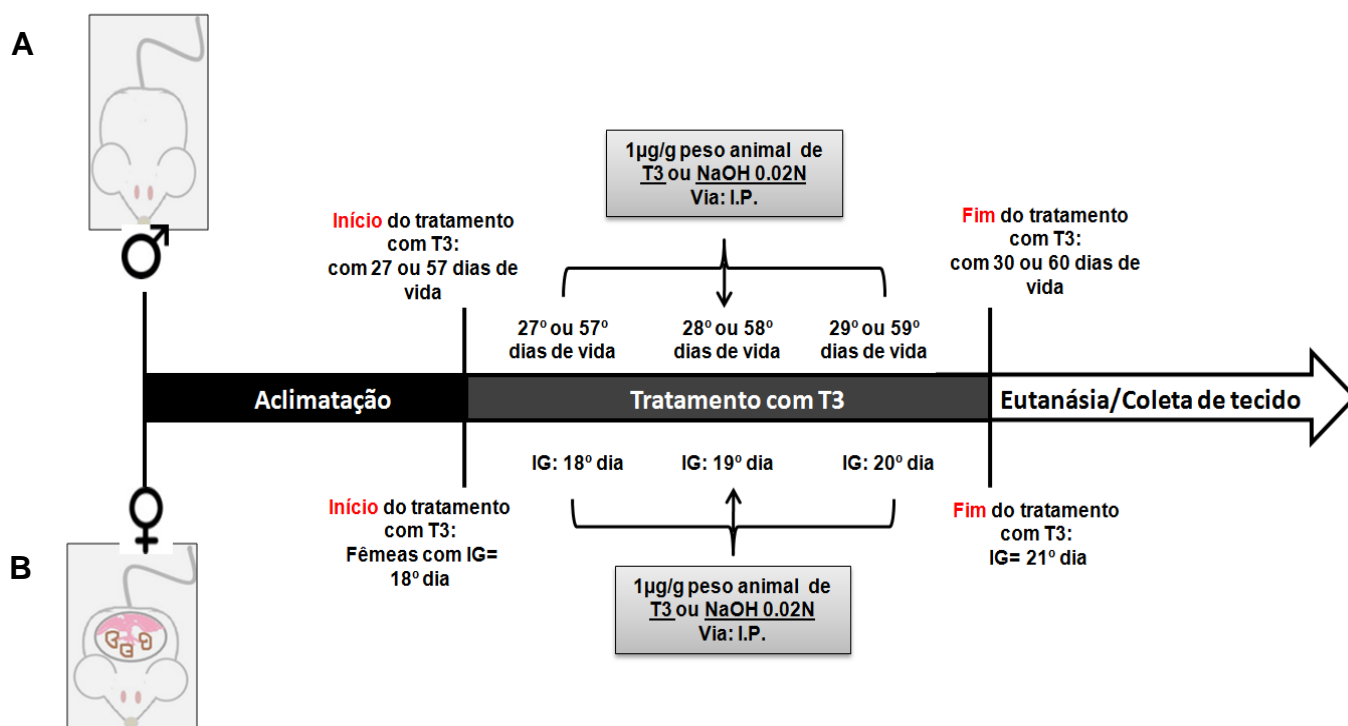


Figura 3 – Representação esquemática do delineamento experimental. **A)** para camundongos jovens (P30) ou adultos (P60) e **B)** para obtenção dos animais no período perinatal imediato (P0). **T3:** Triiodotironina; **NaOH 0.02N:** solução de Hidróxido de Sódio; **I.P.:** Intraperitoneal; **IG:** Idade gestacional. **Fonte:** Autora, 2019.

3.3 – Lista de Substâncias

- Solução estoque de Paraformaldeído 4%, pH 7,4;
- Solução Estoque de Cloreto de Sódio 0,9%;
- Alíquotas do hormônio T3 com 0,1mg diluído em 1mL de solução de Hidróxiho de Sódio (NaOH) 0.02N;
- Solução estoque de NaOH 0.02N (Sigma-Aldrich®, 98%);
- Solução estoque de Sacarose (C₁₂H₂₂O₁₁, Vetec®) 30%;
- Solução de Gelatina preparada a partir da adição de Sulfato de Potássio Crômico (Kcr(SO₄)) e água destilada à gelatina obtida pela Vetec® como pó;
- Alíquotas de Albumina Sérica Bovina (Bovine Serum Albumin – BSA) 5% a partir da adição de água destilada ao BSA obtido pelo Sigma-Aldrich® como pó;
- Solução de Soro de Cabra (Normal Goat Serum – NGS) 100% a partir de adição de água destilada ao NGS obtido pela Sigma-Aldrich® como pó;
- Solução de Anticorpo Primário Policlonal Rabbit (Dako®) anti-GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein);

- Solução de Anticorpo Primário Policlonal Rabbit (Merk®) anti-AQP4 (Aquaporin-4);
- Solução estoque de Anticorpo Secundário Alexa Fluor™488 Invitrogen® goat anti-rabbit IgG 2mg/mL(1:500);
- Solução estoque de Anticorpo Secundário Alexa Fluor™568 Invitrogen® goat anti-mouse IgG 2mg/mL(1:500);
- Solução estoque de PBS, pH 7,4 (Phosphat-Buffered Saline) 0,2M;

As massas dos reagentes utilizados neste trabalho foram medidas em balança analítica (Shimadzu AUW220D). Os volumes dos reagentes foram medidos em micropipetas volumétricas de acordo com cada volume necessário. As soluções foram preparadas em provetas ou balões volumétricos. Se volumes muito pequenos, as soluções eram preparadas diretamente no *Eppendorf* (2mL).

3.4 – Perfusão Transcardíaca

Segundo GAGE et.al. (2012), a perfusão transcardíaca é um procedimento amplamente utilizado em pesquisas experimentais com roedores e tem como principal objetivo fixar e preservar de forma rápida e uniforme o tecido em um estado semelhante à vida usando a rede vascular do próprio animal.

Inicialmente, os animais foram anestesiados com solução de Xilazina (15mg/Kg) mais Cetamina (150mg/kg) por via intraperitoneal (I.P). Confirmada a sedação por meio da observação da resposta de retirada ao estímulo nocivo leve (pinçamento caudal), o animal foi fixado em uma placa de isopor (16cm de comprimento x 16cm largura) em decúbito dorsal; a partir disso, uma incisão manúbrio-xifo-pubiana foi realizada, de modo que as cavidades torácica e abdominal fossem expostas proporcionando completa visualização e manipulação da bomba cardíaca; em sequência, iniciou-se o procedimento de perfusão propriamente dito a partir da punção – agulha 13x4,5mm – do ventrículo esquerdo para infusão de solução salina 0,9% seguida de paraformaldeído 4% (PFA 4%) com auxílio de bomba dosadora peristáltica (Milan®), realizando-se de maneira simultânea um corte no átrio direito (abertura do sistema circulatório) para escape do sangue e soluções infundidas (**figura 4A**)

A coleta/dissecção dos cérebros foi feita por meio de incisão na linha média ao longo do tegumento do pescoço até o focinho do animal, expondo a calota craniana, seguida de outra incisão bilateral a partir da porção distal posterior para a extremidade frontal do crânio, possibilitando, dessa maneira, a retirada do tecido cerebral íntegro e por completo. Posteriormente à dissecção, os órgãos coletados foram destinados à imersão em PFA 4% a 4°C por 24h, seguida da solução crioprotetora de sacarose 30% e só então, realizado o processamento histológico em criostato a -20°C. (figura 4B).

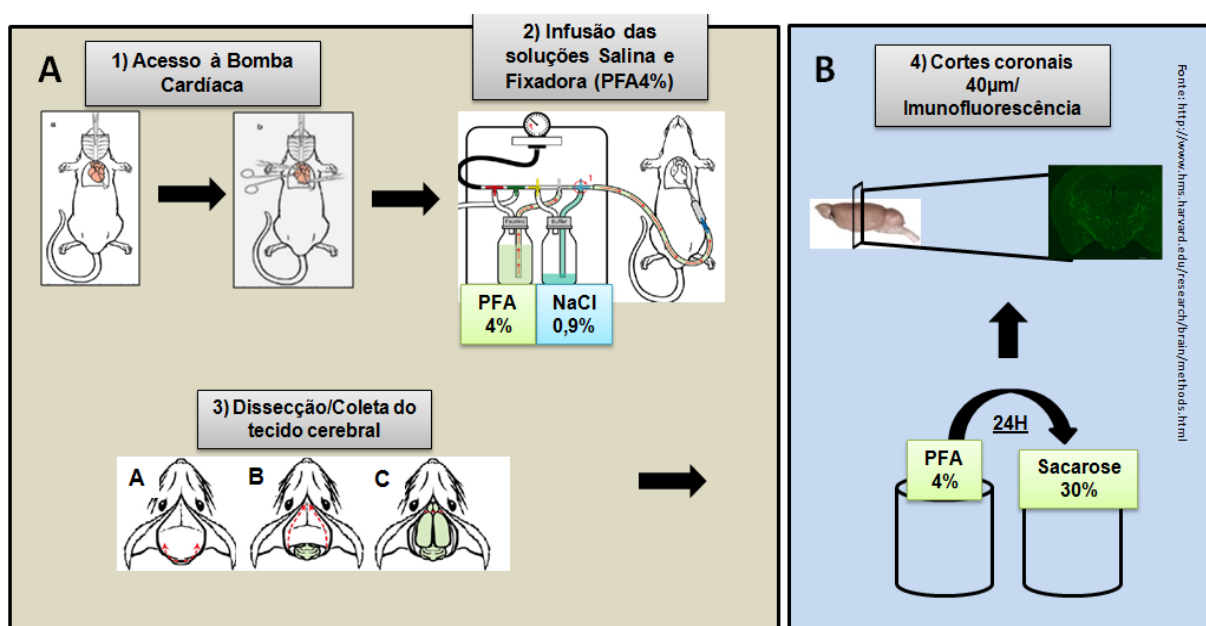


Figura 4 – Etapas experimentais referente ao procedimento de perfusão cardíaca. Ver texto.

Fonte: GAGE, *et.al.* (2012)

3.5 – Imunohistoquímica por fluorescência para AQP4 e GFAP cerebrais

Fatias coronais de 40 µm foram dispostas em lâminas gelatinizadas. A reação imunohistoquímica foi efetuada para a AQP4 e foi utilizada igualmente a marcação com GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) para identificar a localização da AQP4 com maior especificidade em astrócitos. Para isto, os cortes foram lavados com PBS 5 min (3 vezes), imersos em solução de Triton 0,5% (30 min), enxaguados com PBS 5 min (3 vezes), e em seguida foi feito o bloqueio com BSA 5% (90-120 min). Após, os cortes foram expostos aos anticorpos primários. Estes foram diluídos em BSA 1%

(anti-AQP4 1:200; anti-GFAP 1:200). Os cortes foram incubados *overnight* a 4°C. Após lavagem dos cortes com PBS 5 min (3 vezes) eles foram incubados com anticorpos secundários (Alexa flúor 488 e 568 1:1000) diluídos em NGS 5% (1 h temperatura ambiente), enxaguados com PBS 5 min (3 vezes) e, por fim, montados em lâminas com solução de PBS 0,1M + glicerol (1:2).

Os cortes foram observados em microscópio óptico de fluorescência (Nikon®) para avaliação da distribuição da AQP4 e GFAP no cérebro dos camundongos tratados ou não com o T3. Células imunorreativas à AQP4 foram quantificadas através do programa de processamento de imagens Image J®

3.6 – Análise de Fluorescência

Para quantificação da intensidade de fluorescência, secções de cérebros de camundongos foram analisadas em um aumento de 10X utilizando microscópio óptico de fluorescência (Nikon®). As imagens capturadas por câmera acoplada ao microscópio foram salvas no formato .jpeg e quantificadas usando o programa ImageJ®. Uma média de 6 a 10 seções por animal foi analisada, correspondendo às coordenadas AP(ântero-posterior): -2,1 e -2,5 mm a partir do Bregma. Às imagens capturadas um "limiar" para avaliação da imunofluorescência foi estabelecido. Depois de colocar um fundo escuro (*background*), as áreas fluorescentes para AQP4 foram selecionadas e medidas. As intensidades de fluorescência do córtex cerebral total foram calculadas para cada seção e por grupo experimental.

3.7 – Análise Estatística

A quantificação da fluorescência foi realizada pela média das densidades integradas das áreas selecionadas, através do programa ImageJ® e a análise da significância das diferenças entre as condições foi realizada através da Anova- *one way*. O pós-teste de Bonferroni foi utilizado para comparar as densidades integradas entre diferentes tratamentos do mesmo tipo celular.

4. RESULTADOS

4.1 – Análise do nível de fluorescência para AQP4 cerebral de animais P0 do grupo CTRL e submetidos ao tratamento com T3.

Os resultados demonstram que quando comparado ao grupo controle, o tratamento com T3 (1µg/g) (E18-E120) reduziu de forma significativa a expressão da AQP4 no córtex cerebral dos animais no início da vida, P0 ($p < 0.02$) (**figura 6**).

4.2 – Análise do nível de fluorescência para AQP4 cerebral de animais P30 e P60 dos grupos CTRL e submetidos ao tratamento com T3.

Durante a fase adulta, no entanto, o tratamento com T3 proporcionou um aumento da expressão da AQP4 ($p < 0.0001$) (**figura 6**), evidenciando um padrão de expressão discretamente maior, mas sem significância e com tendência à estabilidade nos animais com 60 dias de vida (P60).

4.3 - Análise do nível de fluorescência para AQP4 cerebral de animais P0, P30 e P60 do grupo CTRL.

Ao avaliar os resultados referentes ao grupo controle de maneira isolada, foi possível constatar uma variação progressiva na distribuição da AQP4 durante os três estágios de desenvolvimento avaliados neste trabalho: P0, P30 e P60 (**figura 6**)

Estes resultados foram publicados na revista *Frontiers in Neuroscience* no mês abril do corrente ano em edição especial intitulada *Neuroenergetics, Nutrition and Brain Health* com o seguinte título: ***Evidence of Aquaporin 4 Regulation by Thyroid Hormone During Mouse Brain Development and in Cultured Human Glioblastoma Multiforme Cells*** (ANEXO B).

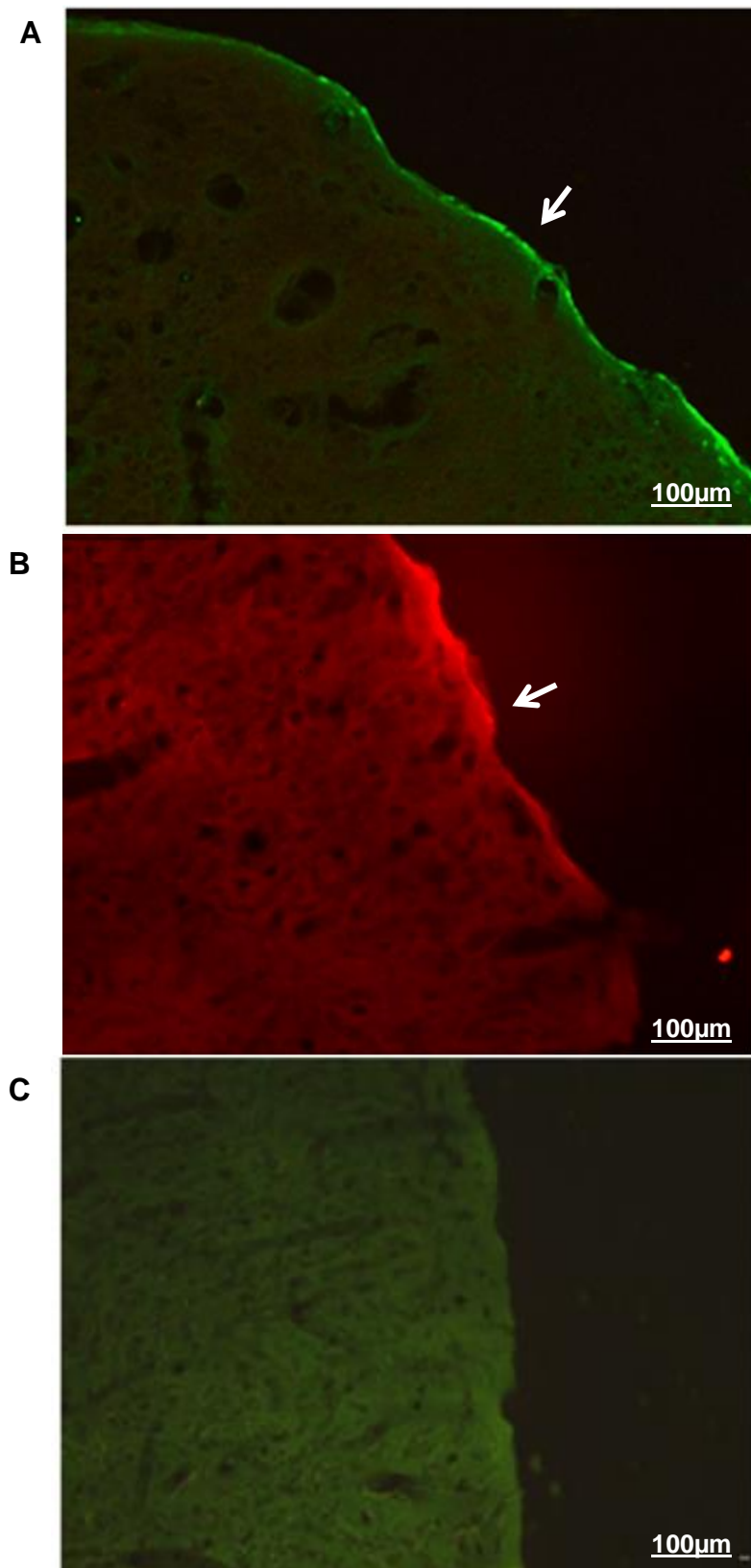


Figura 5 - Localização da AQP4 na região cortical próxima à superfície pial em animais P30 do grupo CTRL. **A)** Células AQP4+ visualizadas no córtex cerebral ao longo da superfície pial do córtex somatossensorial (seta branca). **B)** A marcação com GFAP confirma a localização astrocitária da AQP4 (seta branca). **C)** Não foi observada marcação quando da omissão do anticorpo anti-AQP4.

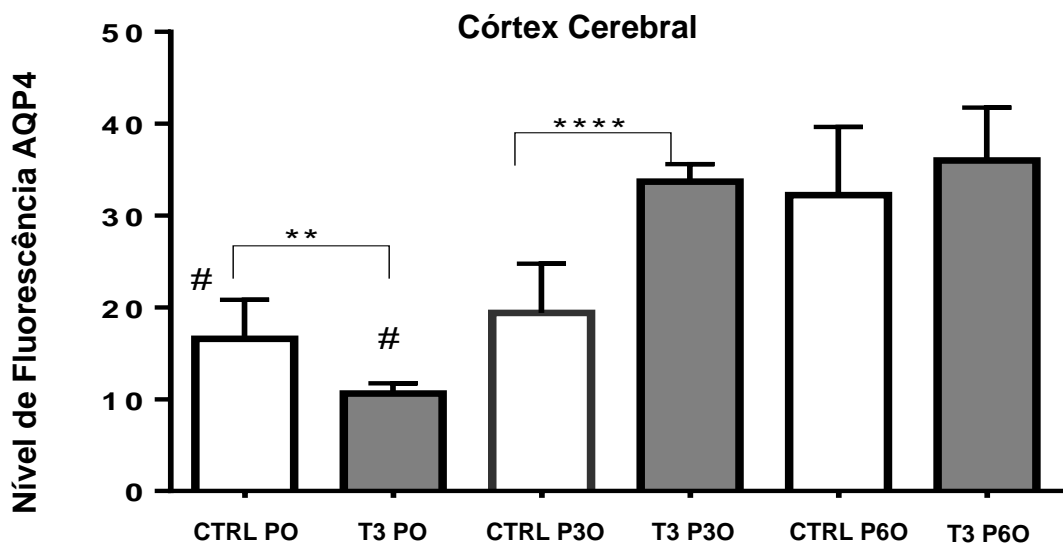
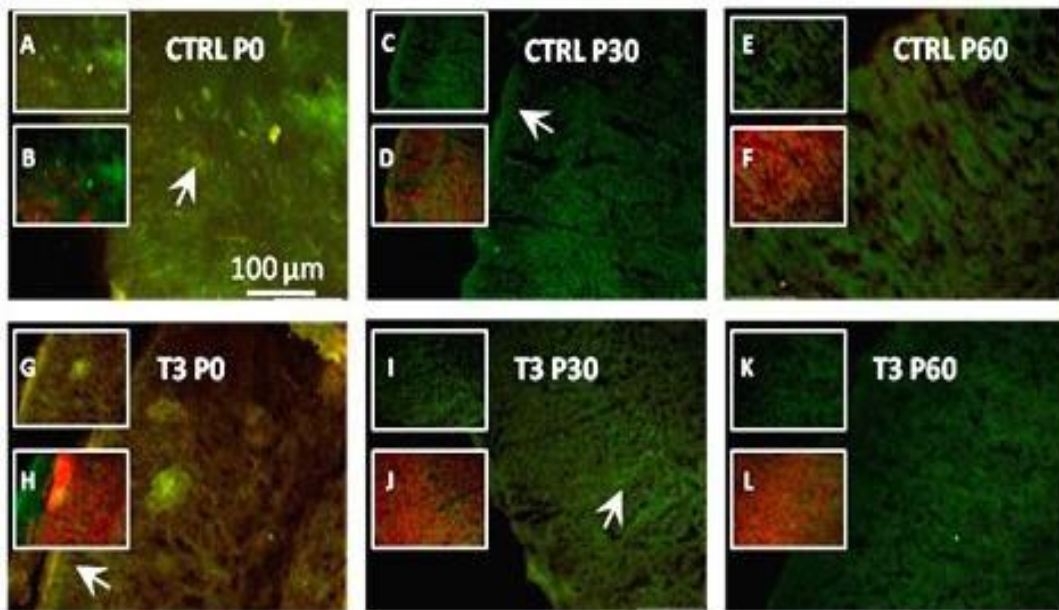


Figura 6 - Distribuição (AQP4) no córtex cerebral de camundongos nos dias pós-natais 0, 30 e 60 do grupo controle (CTRL) e do grupo tratado (T3). (**Superior**): As inserções exibem a imunorreatividade da AQP4 (verde: A, C, E, G, I e K) ou sua colocalização a partir da sobreposição de imagens (merge) de AQP4 com GFAP (vermelha: B, D, F, H, J e L). (**Inferior**): Nos animais tratados com T3 no dia pós-natal P0 o nível de AQP4 é significativamente inferior em relação ao grupo controle, aumentando significativamente aos 30 dias de vida. Teste-t Student; $P < 0,01$; $P < 0,0001$; # $P < 0,0001$ one-way ANOVA seguida do teste de Tukey (CTRL P0 vs. CTRL P60; T3 P0 vs. T3 P30 e T3 P60).

5. DISCUSSÃO

Os resultados confirmam a localização dessa proteína e evidenciam importante expressão de AQP4 nos prolongamentos das células astrocíticas perivasculares presentes na região cortical próxima à pia-máter (**figura 5**) corroborando com dados já existentes na literatura quanto ao padrão de distribuição polarizado da AQP4 no cérebro. Também indicam que o tratamento com T3 contribui para o aumento da distribuição de AQP4 no córtex cerebral.

O tratamento com o hormônio resulta em uma expressão bifásica da AQP4 no córtex cerebral de camundongos com uma modulação negativa da proteína sendo observada no início da vida (P0), seguido de um aumento dessa expressão nos animais adultos jovens com trinta dias de vida (P30), quando comparado ao grupo controle.

A menor expressão de AQP4 no período imediato ao nascimento observada nos animais do grupo controle em relação aos animais adultos pode estar relacionada a uma redução do volume de água no cérebro que ocorre durante o desenvolvimento. Em camundongos, a diminuição do volume de água no cérebro é mais acentuada entre o 14º e o 21º dia de vida, correspondendo a 84 e 79% do conteúdo de água no cérebro adulto, respectivamente. LI *et. al.* (2013) demonstraram que animais *knockout* para AQP4 apresentaram redução do volume de água cerebral mais tardiamente, o que significa dizer que a presença da AQP4 facilita o efluxo de água na fase pós-natal precoce.

Estudos realizados por WEN *et. al.* (1999) e HSU *et.al.* (2011) associaram uma acentuada redução do volume de água no cérebro de camundongos normais (selvagens) à presença ou aumento da expressão de AQP4 entre o 7º e o 14º dia de vida.

FELLIER-BECKER *et. al.* (2014) demonstraram que no período de desenvolvimento do SNC, do primeiro ao terceiro dia de vida (P1-P3), a presença da AQP4 está altamente restrita aos prolongamentos de astrócitos que circundam vasos sanguíneos e os que estão presentes na superfície pial, ambas as condições também responsáveis pelo perfil de expressão polarizado da proteína. O surgimento

de células astrocitárias também se dá de forma mais precocemente detectável nessas regiões, como citado por MADER & BRIMBER *et. al.* (2019).

Assim, os resultados expressos que dizem respeito ao menor nível de AQP4 no grupo CTRL de animais P0 em relação aos animais adultos corroboram com dados pré-existentes da literatura. A diferença entre os diferentes estágios foi acentuada pelo tratamento com o T3, exibindo uma redução significativa da AQP4 no cérebro de animais no primeiro dia de vida pós-natal (P0), seguido de um aumento da expressão desta proteína em animais P30 e P60.

Durante o período gestacional, existe um transporte de T3 limitado pela placenta, e o T4 produzido na placenta é a principal fonte de T3 para o desenvolvimento cerebral do feto. No cérebro, o T4 é convertido em T3 pela ação da enzima D2 (altamente expressa em astrócitos). Experimentos realizados por BÁREZ-LÓPEZ e GUADAÑO-FERRAZ (2017) E BÁREZ-LÓPEZ *et.al.* (2018) usando camundongos cujas mães receberam o hormônio T4 junto com a oferta hídrica entre os 12^o e 18^o dias de gestação (E12-E18 da fase embrionária), revelaram um aumento dos níveis séricos do T3 e redução do T4 das matrizes, enquanto os filhotes na fase perinatal (1^o de vida completo) mostraram menores níveis de T4 sem alteração do T3 no sangue e no cérebro.

Recentemente foi demonstrado em camundongos que o T4, principalmente de origem materna, é transportado via LCS, alcançando o cérebro fetal onde é convertido em T3 através da D2 astrocitária presente na BHE (meninges e plexo coroide) e ventrículos laterais (BÁREZ-LÓPEZ *et.al.*, 2018). A partir do LCS, o T3 então produzido pode ser distribuído ao longo do cérebro e ter acesso às células para exercer suas funções. A D2 tem sua atividade reduzida por volta do 3^o dia de vida e não foi encontrada nas meninges, plexo coroide ou ventrículos laterais de roedores adultos.

No presente trabalho, fêmeas gestantes receberam T3, por administração intraperitoneal, por três dias consecutivos (E18-E20), e apesar dos níveis hormonais não terem sido mensurados, pode-se assumir que uma alteração similar nos níveis desses hormônios ocorreu nos animais P0, já que o transporte de T3, através da placenta, em condições fisiológicas normais, é limitado desde a vida intrauterina.

Dessa maneira, é possível concluir que a ação do T4 nos animais do grupo P0 poderia estar diminuída, tendo como consequência uma hiperatividade da D2 no cérebro fetal para compensar a queda do T4, assegurando assim, o aporte adequado do T3 no cérebro neonatal.

Assumindo que a administração de T3 nas mães resultou em uma redução do T4 sérico dos filhotes (P0) estudados neste trabalho, haveria um aumento da atividade da enzima D2 nos astrócitos para compensar a queda do T4 e assim garantir manutenção de níveis adequados de T3 no cérebro. Ao mesmo tempo, há uma redução da ação da D3 em neurônios para garantir, ainda, uma queda no metabolismo do T3 em rT3 e T2, formas inativas do hormônio.

Já é sabido que o T3 tem papel na redução de expressão da AQP4 por uma via não-genômica através da ativação da PKC (Proteína C quinase) (SADANA *et.al.*, 2015). Essa via, quando ativada, leva a fosforilação do resíduo serina 180 da AQP4, resultando na redução da expressão deste canal de água (ZELENINA, *et.al.*, 2002)

A expressão reduzida da AQP4 encontrada no cérebro de animais P0 do grupo tratado, neste estudo, pode ter sido mediada pela conversão do T4 circulante em T3 nos astrócitos, promovendo uma redução da AQP4 pela ativação da via PKC.

O tratamento com T3 em animais jovens e adultos pode promover um aumento do aporte de T3 ao cérebro, via MCT8 (monocarboxylate transporter), um transportador presente na BHE aumentado a atividade da D3 (neuronal) para regular os níveis de T3 (ROBERTS *et.al.*, 2001). Uma redução da ação do T3 em astrócitos, poderia reduzir a fosforilação da AQP4, aumentando, assim, a expressão desta proteína no cérebro de camundongos jovens (P30). Estudos têm demonstrado que camundongos adultos nulos para D3 (DIO3KO) exibem T3 em concentrações elevadas, levando a um estado de hipotireoidismo central e diminuição de genes regulados pelo T3 (HERNANDEZ *et. al.*, 2010 e 2012), o que condiz com os dados obtidos para os animais adultos deste estudo (P60) já que não foi constada diferença significativa na expressão da AQP4 entre os grupos CTRL e tratado (T3).

É importante ressaltar que os efeitos da administração de T3 na expressão da AQP4 observada no presente trabalho não equivalem aos possíveis efeitos tóxicos do T3 na tireóide (tireoidite), já que os protocolos experimentais utilizados para

induzir hipertireoidismo em animais envolvem a administração deste hormônio por 14 dias consecutivos e em uma dose de 250 µg/ kg (DROVER & AGELLON, 2004), o que é consideravelmente superior ao utilizado no presente estudo.

Estando as variações do padrão de expressão da AQP4 ligadas a vários estados patológicos, tais como AVE, hidrocefalia e astrocitomas, a partir de nossos achados, podemos reiterar a potencialidade do T3 como agente terapêutico, bem como a AQP4 como alvo; além disso, a caracterização da expressão da AQP4 durante os três estágios de desenvolvimento em condições normais (CTRL) pode implicar em estratégias terapêuticas futuras, por termos, a partir de agora, padrões fisiológicos melhor caracterizados e, portanto, mais direcionados para posterior comparação. Assim como a necessidade de modulação da AQP4 varia de acordo com o estágio clínico do edema cerebral, por exemplo, o estágio de desenvolvimento também deverá ser considerado dentro de futuras propostas terapêuticas. Outros ensaios experimentais como, por exemplo, Western Blotting e a quantificação do conteúdo hídrico nos cérebros precisam ser realizados.

6. CONCLUSÃO

A expressão da AQP4 no cérebro de camundongos Swiss varia de acordo com a fase de desenvolvimento do sistema nervoso e é modulada, nas diferentes fases, pelo hormônio da tireóide T3.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARMSTRONG, E.J., TASHJIAN, A.H., CHIN, W.W. Gândula Tiroide. In: **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia.** – [3. ed.] – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014, p. 448-457;

ALVAREZ-DOLADO, M.; RUIZ, M.; DEL RIO, J.A.; ALCANTARA, S.; BURGAYA, F.; SHELDON, M.; NAKAJIMA, K.; BERNAL, J.; HOWELL, B.W.; CURRAN T.; SORIANO E.; MUNOZ, A. Thyroid hormone regulates reelin and dab1 expression during brain development. **J Neurosci**, v.19, n. 16, p. 6979-93, Aug 1999;

BÁREZ-LÓPEZ, S., GUADAÑO-FERRAZ, A. Thyroid hormone availability and action during brain development in rodents. **Front. Cell. Neurosci**, v.9, n. 265, p. 1-11, May 2018;

CHENG, S-Y.; LEONARD, J.L.; DAVIS, P.J. Molecular Aspects of Thyroid Hormone Actions. **Endocr Rev**, v. 32, n.2, p. 139-170, Apr 2010;

CHEIDDE, L., SCHOR, N. Revisão: Transportadores de água. **Rev Ass Med Brasil**, v. 45(1), p.71-8, 1999;

COSTA, L.E.S., CLEMENTINO-NETO, J., MENDES, C.B., FRANZON, N.H., COSTA, E.D.O., MOURA-NETO, V.; XIMENES-DA-SILVA, A. Evidence of Aquaporin 4 Regulation by Thyroid Hormone During Mouse Brain Development and in Cultured Human Glioblastoma Multiforme Cells. **Front. Neurosci**. v. 13 n.317, Apr 2019;

BÁREZ-LÓPEZ, S., OBREGON, M. J., BERNAL, J., AND GUADAÑO-FERRAZ, A. Thyroid hormone economy in the perinatal mouse brain: implications for cerebral cortex development. **Cereb. Cortex**, v. 28, p. 1783–1793, May 2018;

DENG, J., ZHAO, F., YU, X., ZHAO, Y., LI, D., SHI, H., et al. Expression of aquaporin 4 and breakdown of the blood-brain barrier after hypoglycemia induced brain edema in rats. **PLoS One**, v. 9, n.9, p. 107-122, 2014;

DROVER, V. A., AGELLON, L. B. Regulation of the human cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A1) by thyroid hormone in transgenic mice.

Endocrinology, v.145, p. 574–581, 2004;

FALLIER-BECKER, P., VOLLMER, J. P., BAUER, H. C., NOELL, S., WOLBURG, H., AND MACK, A. F. (2014). Onset of aquaporin-4 expression in the developing mouse brain. **Int. J. Dev. Neurosci.**, v. 36, p. 81–89, 2014;

GAGE, G.J., KIPKE, D.R., SHAIN, W. Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents. **J. Vis. Exp.**, v. 65, Jul 2012;

GARCIA-SEGURA, L.M., MCCARTHY, M.M. Minireview: Role of Glia in Neuroendocrine Function. **Endocrinology**., v.145, n.3, p. 1082–1086, Mar 2004;

GOMES, F.C.A., TORTELLI, V.P., DINIZ, L. Glia: dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. **Estudos Avançados**, v. 27, n.77, 2013;

GOODMAN, J. H., GILBERT, M. E. Modest thyroid hormone insufficiency during development induces acellular malformation in the corpus callosum: a model of cortical dysplasia. **Endocrinology**, v.148 (6), p. 2593–2597, Jun 2007;

HERNANDEZ, A., MORTE, B., BELINCHÓN, M. M., CEBALLOS, A., and BERNAL, J. Critical role of types 2 and 3 deiodinases in the negative regulation of gene expression by T3 in the mouse cerebral cortex. **Endocrinology**, v.153, p.2919–2928, 2012;

HUBBARD, J. A., SZU, J. I., BINDER, D. K. The role of aquaporin-4 in synaptic plasticity, memory and disease. **Brain Research Bulletin**, v. 136, p.118–129, 2018;

HO, J. D., YEH, R., SANDSTROM, A., CHORNY, I., HARRIES, W. E., ROBBINS, R. A., *et al.* Crystal structure of human aquaporin 4 at 1.8 Å and its mechanism of conductance. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.106, p.7437–7442, 2009;

HSU, M. S., SELDIN, M., LEE, D. J., SEIFERT, G., STEINHÄUSER, C.; BINDER, D. K. Laminar-specific and developmental expression of aquaporin-4 in the mouse hippocampus. **Neuroscience.**, v.178, p.21–32, 2011;

JIANG, X., XING, H., WU, J., DU, R., LIU, H., CHEN, J., *et al.* Prognostic value of thyroid hormones in acute ischemic stroke - a meta analysis. **Sci. Rep.**, v. 7 (16256), 2017.

JUNG, J.S., BHAT, R.V., PRESTON, G.M., GUGGINO, W.B. BARABAN, J.M., AGRE, P. Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: Candidate osmoreceptor and regulator of water balance. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v. 91, p. 13052-13056, 1994;

KIMELBERG, H.K. Water Homeostasis in the brain: basic concepts. **Neuroscience**, v.129, p. 851-860, 2004.

KIMURA, Edna. T. Glândula Tireoide. In: **Fisiologia/Margarida de Mello Aires.** – 4ed. – [Reimp.]. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015, p.1056-1977;

LACROIX, M., ABI-SAID, D., FOURNEY, D. R., GOKASLAN, Z. L., SHI, W., DEMONTE, F.A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. **J. Neurosurg.**, v. 95, p.190–198, 2001;

LATERRA, J.J.,GOLDSTEIN, G..W. A barreira hematoencefálica, o plexo coróide e o líquido cerebrospinal. In: **Princípios de Neurociências.** -5.ed. – Porto Alegre: AMGH, 2014. p.1365-1377;

LI, X., GAO, J., DING, J., HU, G., and XIAO, M. Aquaporin-4 expression contributes to decreases in brain water content during mouse postnatal development. **Brain Res. Bull.**, v. 94, p. 49–55, 2013;

MADER, S., BRIMBERG, L. Aquaporin-4 Water Channel in the Brain and Its Implication for Health and Disease. **Cells**, v. 8, n.90, 2019;

NOELL, S., RITZ, R., WOLBURG-BUCHHOLZ, K., WOLBURG, H., AND FALLIER-BECKER, P. An allograft glioma model reveals the dependence of aquaporin-4 expression on the brain microenvironment. **PLoS One.**, v. 7(5), 2012;

PAPADOPOULOS, M.C., VERKMAN, A.S. Aquaporin-4 gene disruption in mice reduces brain swelling and mortality in pneumococcal meningitis. **J Biol Chem.**, v.280(14), p.13906-13912, 2005;

PAPADOPOULOS, M. C.; VERKMAN, A. S. Aquaporin water channels in the nervous system. **Nat Rev Neurosci.**, v. 14(4), p. 265–277, 2013;

PRESTON GM, AGREE P. Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 Kd: Member of an ancient channel family. **Proc Natl Acad Sci**, v. 88(11), p.110-14, 1991;

PORTERFIELD, SUSAN. P. Vulnerability of the Developing Brain to Thyroid Abnormalities: Environmental Insults to the Thyroid System. **Environ Health Perspect.**, v. 102(2), p.125-130, 1994;

RASMUSSEN, M.K.; MESTRE, H.;NEDERGAARD,M. The glymphatic pathway in neurological disorders. **Lancet Neurol.**, v. 17(11) p. 1016–1024, 2018;

ROBERTS, L. M., WOODFORD, K., ZHOU, M., BLACK, D. S., HAGGERTY, J. E., TATE, E. H., ET AL. Expression of the thyroid hormone transporters monocarboxylate transporter-8 (SLC16A2) and organic ion transporter-14 (SLCO1C1) at the blood-brain barrier. **Endocrinology**, v.149, p.6251–6261, 2008;

ROUACH, N. et al. Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. **Science**, v.5, 322, n.5907, p.1551-5, 2008;

SAADOUN, S., PAPADOPOULOS, M. C., DAVIES, D. C., KRISHNA, S., AND BELL, B. A. Aquaporin-4 expression is increased in oedematous human brain tumours. **J. Neurol. Neurosurg.**, v.72, p. 262–265, 2002;

SAADOUN, S.; PAPADOPOULOS, M. C.; WATANABE, H.; YAN, D.; MANLEY, G. T.; VERKMAN, A. S. Involvement of aquaporin-4 in astroglial cell migration and glial scar formation. **J. Cell Sci.**, v.118, p.5691–5698, 2005;

SADANA, P., COUGHLIN, L., BURKE, J., WOODS, R., AND MDZINARISHVILI, A. Anti-edema action of thyroid hormone in MCAO model of ischemic brain stroke: possible association with AQP4 modulation. **J. Neurol. Sci.**, v.354, p.37–45, 2015;

SCHARFMAN, H.E.; BINDER, D. K. . Aquaporin-4 water channels and synaptic plasticity in the hippocampus. **Neurochemistry International**, v. 63, p. 702–711, 2013;

TONI, M. et al. Trastornos tiroideos por amiodarona. **Anales Sis San Navarra**, Pamplona , v. 32, n. 3, p. 363-370, 2009;

TRENTIN, A.G. et. al. Thyroid hormone and astrocytes morphogenesis. **J. Endocrinol.**, v.189, n. 2, p.189-197, May 2006.

VERKMAN, A.S., ANDERSON, M.O., PAPADOPOULOS, M.C. Aquaporins: important but elusive drug targets. **Nat Rev Drug Discov.**, v. 13, n.4, p. 259–277, 2014.

XIMENES-DA-SILVA, A. Metal Ion Toxins and Brain Aquaporin-4 Expression: An Overview. **Front. Neurosci.**, v. 10, n. 233, 2016;

WALZ, T.; FUJIYOSHI, Y.; ENGEL, A. The AQP structure and functional implications. **Handb. Exp. Pharmacol.** n.190, p.31–56, 2009;

WEN, H., NAGELHUS, E. A., AMIRY-MOGHADDAM, M., AGRE, P., OTTERSEN, O. P., and NIELSEN, S. Ontogeny of water transport in rat brain: postnatal

expression of the aquaporin-4 water channel. **Eur. J. Neurosci.**, v.11, p.935–945, 1999;

YANG, B., VAN HOEK, A.N., VERKMAN, A.S. Very high single channel water permeability of aquaporin-4 in baculovirus-infected insect cells and liposomes reconstituted with purified aquaporin-4. **Biochemistry**. v. 36, p.7625–7632, 1997;

ZHAO, F., DENG, J., XU, X., CAO, F., LU, K., LIZ, D., CHENG, X., WANG, X., ZHAO, Y. Aquaporin-4 deletion ameliorates hypoglycemia-induced BBB permeability by inhibiting inflammatory responses. **Journal of Neuroinflammation.**, v.15, n.157, 2018;

ZELENINA, M., ZELENIN, S., BONDAR, A. A., BRISMAR, H., APERIA, A. Water permeability of aquaporin-4 is decreased by protein kinase C and dopamine. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.** v.283, n.2, p.309–318, 2002.

REFERÊNCIA DIGITAL

1. <http://www.hms.harvard.edu/research/brain/methods.html>. Acesso em 18 de agosto de 2018.

ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA)

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

PARECER CONSUBSTANCIADO

Projeto n. 025/2013

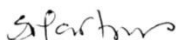
TÍTULO: A influência do T3 sobre a AQP4, ao longo do desenvolvimento do Sistema Nervoso Central, na saúde e na tumorigênese

RESPONSÁVEL: Adriana Ximenes da Silva

OBJETIVO: Determinar a influência do T3 sobre a expressão da AQP4, ao longo do desenvolvimento do Sistema Nervoso Central, particularmente em astrócitos e células tumorais

SITUAÇÃO: Aprovado

Maceió, 27 de novembro de 2013.



Silvana Ayres Martins

Coordenadora da CEUA/UFAL



Evidence of Aquaporin 4 Regulation by Thyroid Hormone During Mouse Brain Development and in Cultured Human Glioblastoma Multiforme Cells

Lucas E. S. Costa¹, José Clementino-Neto¹, Carmelita B. Mendes¹, Nayara H. Franzon¹, Eduardo de Oliveira Costa¹, Vivaldo Moura-Neto² and Adriana Ximenes-da-Silva^{1*}

¹ Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Brazil, ² Instituto do Cérebro and Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Sebastian Cerdan,
Spanish National Research Council
(CSIC), Spain

Reviewed by:

Susanna Scafidi,
Johns Hopkins University,
United States
Sung Ung Kang,
Johns Hopkins University,
United States

*Correspondence:

Adriana Ximenes-da-Silva
ximenes.adri@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Neuroenergetics, Nutrition and Brain
Health,
a section of the journal
Frontiers in Neuroscience

Received: 27 November 2018

Accepted: 20 March 2019

Published: 04 April 2019

Citation:

Costa LES, Clementino-Neto J,
Mendes CB, Franzon NH, Costa EdO,
Moura-Neto V and
Ximenes-da-Silva A (2019) Evidence
of Aquaporin 4 Regulation by Thyroid
Hormone During Mouse Brain
Development and in Cultured Human
Glioblastoma Multiforme Cells.
Front. Neurosci. 13:317.
doi: 10.3389/fnins.2019.00317

Accumulating evidence indicates that thyroid function and the thyroid hormones L-thyroxine (T4) and L-triiodothyronine (T3) are important factors contributing to the improvement of various pathologies of the central nervous system, including stroke, and various types of cancer, including glioblastoma multiforme (GBM). Low levels of T3 are correlated with the poorest outcome of post-stroke brain function, as well as an increased migration and proliferation of GBM tumor cells. Thyroid hormones are known to stimulate maturation and brain development. Aquaporin 4 (AQP4) is a key factor mediating the cell swelling and edema that occurs during ischemic stroke, and plays a potential role in the migration and proliferation of GBM tumor cells. In this study, as a possible therapeutic target for GBM, we investigated the potential role of T3 in the expression of AQP4 during different stages of mouse brain development. Pregnant mice at gestational day 18, or young animals at postnatal days 27 and 57, received injection of T3 (1 $\mu\text{g/g}$) or NaOH (0.02 N vehicle). The brains of mice sacrificed on postnatal days 0, 30, and 60 were perfused with 4% paraformaldehyde and sections were prepared for immunohistochemistry of AQP4. AQP4 immunofluorescence was measured in the mouse brains and human GBM cell lines. We found that distribution of AQP4 was localized in astrocytes of the periventricular, subpial, and cerebral parenchyma. Newborn mice treated with T3 showed a significant decrease in AQP4 immunoreactivity followed by an increased expression at P30 and a subsequent stabilization of aquaporin levels in adulthood. All GBM cell lines examined exhibited significantly lower AQP4 expression than cultured astrocytes. T3 treatment significantly downregulated AQP4 in GBM-95 cells but did not influence the rate of GBM cell migration measured 24 h after treatment initiation. Collectively, our results showed that AQP4 expression is developmentally regulated by T3 in astrocytes of the cerebral cortex of newborn and young mice, and is discretely downregulated in GBM cells. These findings indicate that higher concentrations of T3 thyroid hormone would be more suitable for reducing AQP4 in GBM tumorigenic cells, thereby resulting in better outcomes regarding the reduction of brain tumor cell migration and proliferation.

Keywords: aquaporin 4, thyroid hormone, brain development, GBM, brain tumor