

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E ESTRESSE
OXIDATIVO ASSOCIADOS AO HIPOTIREOIDISMO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Adriana Santi

**Santa Maria, RS, Brasil
2010**

ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E ESTRESSE OXIDATIVO ASSOCIADOS AO HIPOTIREOIDISMO

por

Adriana Santi

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia.**

Orientadora: Vania Lucia Loro
Co - orientador: Rafael Noal Moresco

SANTA MARIA, RS, BRASIL

2010

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E ESTRESSE OXIDATIVO
ASSOCIADOS AO HIPOTIREOIDISMO**

elaborada por

Adriana Santi

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

Comissão examinadora:

Prof^a. Dra. Vania Lucia Loro
(Presidente/Orientador)

Prof^a. Dra. Tatiana Emanuelli /UFSM

Prof^a. Dra. Roselei Fachinetto/UFSM

Santa Maria, 18 de março de 2010.

“Tenho em mim todos os sonhos do mundo”.

Fernando Pessoa

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais: Elido e M.Clotilde
Ao meu irmão: Éverton
Ao meu namorado: Tiago*

*Pelo incentivo, auxílio, compreensão e acima de tudo pelo amor
dedicado.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pelo dom da vida.

A minha família pelo carinho e principalmente pelo incentivo.

À professora Vania, pela acolhida em seu laboratório, por todos os ensinamentos; a minha gratidão.

Ao meu co-orientador, professor Rafael, pela disponibilidade, dedicação e entusiasmo pela pesquisa; os meus sinceros agradecimentos.

A professora e colega Marta Duarte, pela oportunidade, disponibilidade e auxílio na realização desta pesquisa; os meus sinceros agradecimentos.

As amigas e colegas de laboratório, Roberta, Bárbara, Charlene e Cândida, pela sincera amizade construída ao longo deste período.

A CAPES, pela bolsa concedida.

Aos demais amigos e familiares que sempre me apoiaram e estiveram sempre comigo, gostaria de expressar minha profunda gratidão.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria

ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E ESTRESSE OXIDATIVO ASSOCIADOS AO HIPOTIREOIDISMO

Autora: ADRIANA SANTI

Orientadora: VANIA LUCIA LORO

Co-Orientador: RAFAEL NOAL MORESCO

Data e local de Defesa: Santa Maria, 18 de março de 2010.

O hipotireoidismo clínico é caracterizado pela diminuição na síntese dos hormônios tireoideanos, com elevação dos níveis do hormônio tireoestimulante (TSH). É uma desordem comum na população com maior incidência no sexo feminino e com a progressão da idade. Frequentemente está associado a alterações no metabolismo lipídico, representadas pela elevação nos parâmetros lipídicos e conseqüentemente com o desenvolvimento de aterosclerose. A associação entre hipercolesterolemia e estresse oxidativo já é bem estabelecida, entretanto a presença de estresse oxidativo no hipotireoidismo é controversa. O estresse oxidativo é caracterizado por um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) ou deficiência do sistema antioxidante. Neste trabalho determinaram-se marcadores bioquímicos e de estresse oxidativo em pacientes com hipotireoidismo clínico. Os marcadores bioquímicos, colesterol total (CT), colesterol-LDL (LDL-C), colesterol HDL (HDL-C) e triglicerídeos (TG) foram medidos em soro dos pacientes. A peroxidação lipídica foi medida através dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A avaliação do sistema antioxidante enzimático foi realizada através da medida da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) e os níveis de antioxidantes não-enzimáticos através dos níveis de tióis totais (SH) e vitamina E (VIT E). Os resultados demonstraram um aumento dos marcadores bioquímicos (CT, LDL-C e TG) no grupo hipotireóideo, com relação ao grupo controle. Em relação a peroxidação lipídica, observou-se um aumento dos níveis séricos de TBARS de pacientes com hipotireoidismo quando comparados com o grupo controle. Esse aumento também foi observado para as defesas antioxidantes enzimáticas, SOD e CAT. Com relação aos antioxidantes não-enzimáticos, ocorreu um aumento nos níveis séricos de VIT E no grupo hipotireóideo com relação ao grupo controle, enquanto que para SH não foi observada diferença entre os grupos estudados. Estes resultados sugerem a associação do hipotireoidismo clínico com hipercolesterolemia e estresse oxidativo. Os altos níveis de colesterol apresentados pelos pacientes com hipotireoidismo, exercem forte influência sobre a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e por conseqüência sobre o estresse oxidativo. Os aumentos das enzimas SOD e CAT, sugerem a indução do sistema antioxidante enzimático, na tentativa de combater a formação de ERO e a elevada peroxidação lipídica. Concluí-se então, que o hipotireoidismo clínico, está associado à hipercolesterolemia e ao aumento dos biomarcadores de estresse oxidativo.

Palavras chaves: Hipotireoidismo clínico, Estresse oxidativo, Colesterol, Antioxidantes enzimáticos, Antioxidantes não-enzimáticos.

ABSTRACT

Master Dissertation

Post-Graduate Program in Pharmacology

Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

BIOCHEMICAL ALTERATIONS AND OXIDATIVE STRESS ASSOCIATED WITH HYPOTHYROIDISM

Author: ADRIANA SANTI

Adviser: VANIA LUCIA LORO

Co-adviser: RAFAEL NOAL MORESCO

Date and place of the defense: Santa Maria, March 18th, 2010.

Overt hypothyroidism is characterized by decreased of thyroid hormones synthesis, with elevation of thyroid-stimulating hormone (TSH). It's a common disorder in population with highest prevalence in women and with aging. Frequently is associated with lipid metabolism alterations, represented by lipid parameters elevation and consequently with atherosclerosis development. The association between hypercholesterolemia and oxidative stress already well established, however oxidative stress presence in hypothyroidism is controversy. The oxidative stress is characterized by an increase in oxygen reactive species (ROS) generation or antioxidant system deficiency. In the present study were determined biochemical and oxidative stress biomarkers in overt hypothyroidism patients. The biochemical markers, total cholesterol (TC), LDL-cholesterol(C-LDL), cholesterol HDL (C-HDL) and trycerides (TG) were measured in serum samples in these patients. Lipid peroxidation was measured by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels. Antioxidant system evaluation was performed by superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities and non-enzymatic antioxidants levels were evaluated by reduced glutathione (GSH) and vitamin E (VIT E) levels. The results demonstrated an increase in biochemical markers (TC, C-LDL and TG) in hypothyroid group, when compared to control group. In relation to lipid peroxidation, was observed an increased in TBARS levels in patients with hypothyroidism when compared to control group. The same was observed for antioxidants defenses SOD and CAT. Non-enzymatic antioxidants, such vitamin E, were higher in hypothyroid group in relation to controls, while GSH levels remained unchanged with hypothyroidism. These results suggest the association between overt hypothyroidism and hypercholesterolemia and oxidative stress. The high levels of cholesterol presented by hypothyroidism patients, has a stronger influence under oxygen reactive species (ROS) generation and in consequence under the oxidative stress. The increase in SOD and CAT activities, suggest antioxidant system induction as a mechanism to combat the ROS generation and high lipid peroxidation. In conclusion, overt hypothyroidism has association with hypercholesterolemia and oxidative stress biomarkers increase.

Key words: Overt hypothyroidism, Oxidative Stress, Cholesterol, Enzymatic antioxidants, Non-enzymatic antioxidants.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA 01 - A glândula tireóide.....	5
FIGURA 02 - Aparência microscópica da glândula tireóidea.....	6
FIGURA 03 - Estrutura dos hormônios tireoideanos.....	7
FIGURA 04 - O eixo hipotálamo-hipófise-tireóide.....	10
FIGURA 05 - Espécies reativas de oxigênio.....	16
FIGURA 06 - Mecanismo enzimático antioxidante.....	19

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

TABLE 1 - Baseline characteristics of study participants.....41

TABLE 2 - Correlations of serum TSH, T3 and fT4 with oxidative stress biomarkers in overt hypothyroidism patients before and after controlling for total cholesterol levels.....42

LISTA DE ABREVIações

ATP – Adenosina Trifosfato

cAMP – Monosfosfato cíclico de adenosina

CAT- Catalase

CT- Colesterol total

DAC- Doença arterial coronariana

DIT – Diiodotirosina

ERO – Espécies reativas de oxigênio

GSH- Glutathiona reduzida

HDL – Lipoproteína de alta densidade

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

MIT – Monoiodotirosina

MDA-Malondialdeído

SOD-Superóxido dismutase

SH-Tióis não-protéicos

TBARS-Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TBG – Globulina fixadora de tiroxina

TRH – Hormônio de liberação da tireotropina

TSH – Hormônio estimulador da tireóide

T3 - triiodotironina

T4 – tiroxina

TG-Triglicerídeos

VIT E-Vitamina E

VLDL-Lipoproteína de muito baixa densidade

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I – Carta de aprovação do Comitê de Ética.....	56
--	----

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIÇÕES	xi
LISTA DE ANEXOS	xii
SUMÁRIO	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVOS.....	4
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 A glândula tireóide	5
2.1.1 Síntese dos hormônios tireoideanos.....	7
2.1.2 Transporte dos hormônios tireoideanos.....	9
2.2 Regulação da função tireoideana	10
2.2.1 Eixo hipotálamo-hipófise-tireóide.....	10
2.3 Efeitos fisiológicos dos hormônios tireoideanos	12
2.3.1 Metabolismo de lipídeos.....	12
2.4 Hipotireoidismo	13
2.4.1 Dislepidemias no hipotireoidismo.....	14
2.5 Estresse Oxidativo	15
2.5.1 Biomarcadores de estresse oxidativo.....	17
2.5.1.1 Peroxidação lipídica	17
2.5.2 Antioxidantes enzimáticos	17
2.5.2.1 Superóxido dismutase	17
2.5.2.3 Catalase	18
2.5.3 Antioxidantes não-enzimáticos	19
2.5.3.1 Vitamina E	19
2.5.3.2 Tióis não-protéicos	20
3. MANUSCRITO	22
3.1 Manuscrito	23

4. DISCUSSÃO.....	43
5.CONCLUSÕES.....	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
7. ANEXOS.....	56

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma do manuscrito, o qual se encontra no item Manuscrito. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio manuscrito e representam a íntegra deste estudo.

Os itens Discussão e Conclusões, encontrados no final desta dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre o manuscrito contido neste trabalho.

As Referências Bibliográficas referem-se somente às citações que aparecem nos itens Introdução, Revisão de Literatura, Discussão e Conclusões desta dissertação.

O manuscrito está estruturado de acordo com as normas da revista científica a qual foi submetida:

Manuscrito – Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.

1. INTRODUÇÃO

O hipotireoidismo clínico é uma disfunção caracterizada por valor sérico aumentado do hormônio tireoestimulador (TSH) e com concentrações diminuídas de triiodotironina (T3) e tiroxina (T4), na presença de sintomas clínicos manifestos. A disfunção endócrina é de alta prevalência na população, com a incidência elevando-se com a idade e ocorrendo principalmente em mulheres (CESENAF et al., 2005).

Os hormônios tireoideanos são importantes reguladores fisiológicos das células. Modulam inúmeras atividades celulares, dentre elas atividade respiratória mitocondrial, metabolismo energético e atividade metabólica basal (DAS & CHAINY, 2004).

O metabolismo de lipídeos sofre alterações na deficiência de hormônios tireoideanos. O hipotireoidismo promove alterações no metabolismo lipídico, afetando principalmente o metabolismo das lipoproteínas. No caso da LDL, ocorre uma diminuição reversível da expressão de seus receptores no fígado e conseqüentemente diminuição do seu catabolismo (BERTI et al., 2001; BECERRA et al., 1999).

Assim, o hipotireoidismo é considerado um fator de risco cardiovascular em vários estudos, devido à associação com elevados níveis de colesterol total e LDL (AL-TONSI et al., 2003; MAYER et al., 2006). A hipercolesterolemia é um achado freqüente em pacientes com hipotireoidismo sendo um importante fator de risco para o desenvolvimento de aterosclerose, doença inflamatória associada à disfunção endotelial, agregação plaquetária, estresse oxidativo e acúmulo de leucócitos nas paredes das artérias (DUARTE et al., 2007). Em geral, os pacientes hipotireóides apresentam alto risco de desenvolvimento de doenças arteriais coronarianas (DAC), sendo que a ocorrência de infarto agudo do miocárdio é dependente da duração da disfunção endócrina (MEUWESE et al., 2007).

A associação entre estresse oxidativo e hipercolesterolemia já é bem estabelecida (PRASAD & KALRA, 1993; ZOU et al., 2005). Entretanto, no hipotireoidismo, a presença de estresse oxidativo é controversa, apesar dos elevados parâmetros aterogênicos (NORDBERG & ARNER, 2001). Alguns estudos demonstram diminuição dos marcadores de oxidação, fato que pode ser explicado

pelo estado hipometabólico gerado pela desordem que reduz a formação de radicais livres (MESSARAH ET AL., 2007).

O estresse oxidativo representa um estado caracterizado pela superprodução de radicais livres e diminuição da eficiência do sistema antioxidante, composto por enzimas como a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD) e por antioxidantes não-enzimáticos como os tióis não-protéicos (SH) e a vitamina E (VIT E) (MANTHA et al., 1996). Os processos de peroxidação lipídica são constituintes dos processos metabólicos normais. O aumento da peroxidação lipídica, é consequência do estresse oxidativo (KUMARI & MENON, 1987).

As enzimas SOD e CAT constituem a primeira linha de defesa celular contra os processos oxidativos, decompondo superóxido ($O_2^{\cdot -}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), antes da reação de formação do radical hidroxil ($\cdot OH$), altamente reativo. Estas enzimas atuam protegendo as células da peroxidação lipídica induzida pelo $O_2^{\cdot -}$ e H_2O_2 . (SENTHIL et al., 2004). A SOD constitui um grupo de enzimas contendo metais, catalisando a remoção do $O_2^{\cdot -}$, gerando como produto final da reação de dismutação o peróxido de hidrogênio, que por sua vez, sofre a ação da CAT que atua convertendo o H_2O_2 à água (H_2O) e oxigênio (O_2), estando localizada principalmente em organelas subcelulares como os peroxissomos (LIMÓN-PACHECO & GONSEBATT, 2009).

A glutathiona reduzida (GSH) é um dos principais antioxidantes endógenos e o mais abundante tiol não-protéico. Atua doando um grupo sulfidril (SH) em reações diretas com os radicais livres. Além disso, serve de substrato nas reações catalisadas pela glutathiona peroxidase e reage com radicais livres derivados das vitaminas C e E (SENTHIL et al., 2004).

A vitamina E constitui-se um antioxidante lipossolúvel presente na partícula de LDL (SERDAR et al., 2006) que atua inibindo sua oxidação, prevenindo assim o desenvolvimento de lesão aterosclerótica (MOSCA et al., 1997). Além disso, confere proteção à membrana celular por atuar limitando a lipoperoxidação (DELANTY et al., 1997).

Apesar dos poucos relatos na literatura, um estudo envolvendo mulheres com hipotireoidismo mostrou níveis elevados de TBARS, de carbonilação de proteínas e alterações em várias enzimas antioxidantes demonstrando a geração de radicais livres e indução de enzimas antioxidantes (MORRIS et al., 2001). Em ratos hipotireóides os níveis de TBARS plasmáticos, eritrocitários, hepáticos, cardíacos e

de músculo esquelético demonstraram-se aumentados quando comparados com controles, sendo a condição amenizada com a administração de taurina e vitamina E (NANDA et al., 2007).

A alta prevalência de aterosclerose em pacientes hipotireóideos é responsável pelo aumento das doenças cardiovasculares e da mortalidade por causas cardíacas nestes pacientes (NANDA et al., 2007). Por essa razão, investigações que elucidem padrões bioquímicos e de estresse oxidativo em pacientes com hipotireoidismo clínico são de interesse científico e clínico.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ocorrência de alterações no metabolismo de lipídeos e estresse oxidativo em pacientes com hipotireoidismo clínico.

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a relação entre o hipotireoidismo clínico e a ocorrência de estresse oxidativo, através da determinação dos níveis de TBARS (indicador de peroxidação lipídica).
- Avaliar as defesas antioxidantes em pacientes com hipotireoidismo através da determinação das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) e dos níveis dos antioxidantes não-enzimáticos vitamina E (VIT E) e tióis não-protéicos (SH).
- Determinar os níveis dos marcadores bioquímicos colesterol total (CT) colesterol HDL (HDL-C), colesterol LDL (LDL-C) e triglicerídeos em pacientes com hipotireoidismo clínico.
- Correlacionar os níveis de hormônios tireoideanos tiroxina (T4), triiodotironina (T3) e hormônio tireoestimulante (TSH) com os biomarcadores de estresse oxidativo em pacientes com hipotireoidismo.
- Verificar a influência do marcador bioquímico colesterol total, na modulação dos biomarcadores de estresse oxidativo no hipotireoidismo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 GLÂNDULA TIREÓIDE

Nos seres humanos, a glândula tireóide consiste em dois lobos presos, nos dois lados da traquéia, por tecido conjuntivo. O dois lobos são unidos por faixa de tecido tireóideo, ou istmo, situado logo abaixo da cartilagem cricóide (RHOADES & TANNER, 2005). É uma das maiores glândulas endócrinas, normalmente pesando de 15 a 20 gramas no adulto (GUYTON & HALL, 2002) (Figura 1).

Cada lobo da tireóide recebe seu suprimento sanguíneo arterial por meio das artérias tireóideas superior e inferior, que se originam da artéria carótida externa e da artéria subclávia, respectivamente. O sangue deixa os lobos da tireóide, cursando série de veias tireóideas que drenam para as veias jugular externa e braquiocefálica. Essa circulação confere rico suprimento sanguíneo à glândula tireóide, permitindo-lhe maior intensidade de fluxo sanguíneo por grama, do que os próprios rins (RHOADES & TANNER, 2005).

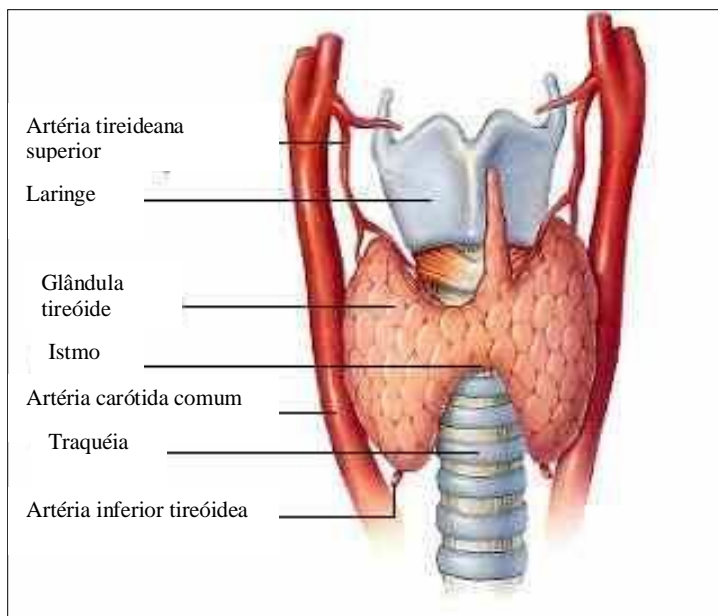


Figura 1 – A glândula tireóide (www. trifoundation.com).

A glândula tireóide recebe sua inervação adrenérgica dos gânglios cervicais e sua inervação colinérgica dos nervos vagos. Essa inervação regula a função vasomotora, aumentando o suprimento de TSH, iodeto e substratos metabólicos à glândula tireóide. O sistema adrenérgico também pode afetar a função tireóidea por meio de efeitos diretos sobre as células (WILLIAMS, 1974).

Histologicamente, a glândula consiste de numerosos folículos esféricos preenchidos por substância secretora, denominada colóide, e revestidos por células epiteliais cubóides, que secretam seu material para o interior dos folículos. O principal componente do colóide é a tireoglobulina, que é uma glicoproteína, com peso molecular de 660kD e que contém os hormônios tireoideanos no interior da sua molécula (DOUGLAS, 1999; GUYTON & HALL, 2002). Assim, os folículos tireoideanos representam a unidade funcional da glândula, sendo responsáveis pela síntese, armazenamento e liberação dos hormônios tireoideanos (HT) (McGEOWN, 2002) (Figura 2).

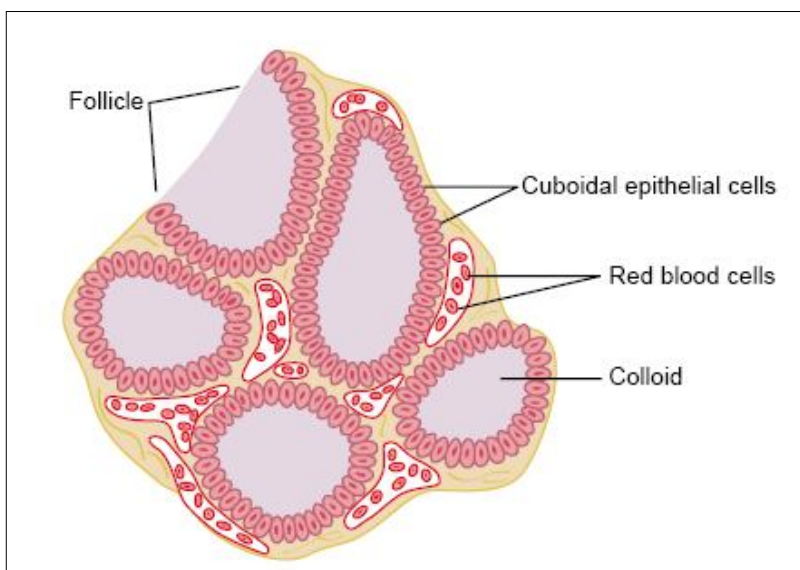


Figura 2 - Aparência microscópica da glândula tireóide (GUYTON & HALL, 2006).

2.1.1 SÍNTESE DOS HORMÔNIOS TIREOIDEANOS

O folículo tireóideo produz e secreta dois hormônios: a tiroxina (T4) e a triiodotironina (T3). Suas estruturas moleculares são mostradas na Figura 3.

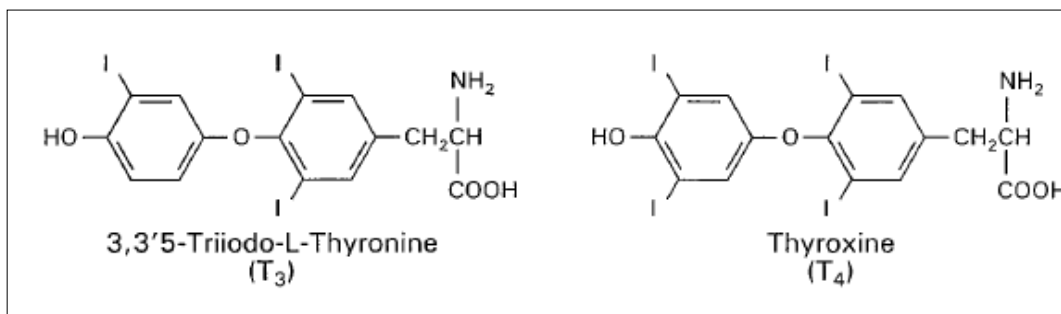


Figura 3 – Estrutura dos hormônios tireoideanos (YEN, 2001).

A tiroxina e a triiodotironina são derivados iodados do aminoácido tirosina. São formadas pelo acoplamento dos anéis fenil de duas moléculas de tirosina iodada, por ligação éter. A estrutura resultante é a chamada iodotironina (RHOADES & TANNER, 2005). O mecanismo de síntese da T3 e T4 compreende cinco etapas principais, descritas abaixo:

1. Transporte ativo de iodeto (I⁻)

O iodeto é transportado através da membrana basal para o citosol da célula folicular, por meio de transportadores de iodeto, que constituem um mecanismo de transporte ativo, que necessita de ATP, é saturável, e também pode transportar alguns outros ânions como brometo, tiocianato e perclorato. Este sistema de transporte ativo permite que a glândula tireóide mantenha a concentração de iodo livre de 30-40 vezes maior do que a do plasma (GREENSPAN & STREWLER, 1997; RHOADES & TANNER, 2005);

2. Oxidação do iodeto e iodetação dos resíduos tirosil da tireoglobulina

Os íons iodeto são oxidados, gerando o iodo nascente (I⁰) ou (I₃⁻) que tem a capacidade de se combinar diretamente com o aminoácido tirosina. Essa oxidação

do iodo é promovida pela enzima peroxidase acompanhada por peróxido de hidrogênio. A peroxidase encontra-se localizada na membrana apical da célula, ou fixada a ela, fornecendo assim, o iodo oxidado exatamente no ponto da célula onde a molécula de tireoglobulina emerge da parede do aparelho de Golgi e passa pela membrana para o colóide armazenado na glândula tireóide. A ligação do iodo a tireoglobulina é denominada organificação da tireoglobulina.

O precursor de tireoglobulina contém 134 resíduos de tirosina, porém apenas pequena fração destas tirosinas é iodada. Uma molécula de tireoglobulina típica contém apenas 20 a 30 átomos de iodo. A enzima iodinase, permite a ligação do iodo à tirosina em poucos segundos, ou minutos, quase tão rapidamente quanto a molécula de tireoglobulina é liberada do aparelho de Golgi, ou é secretada através da membrana apical para o folículo tireoideano (GUYTON & HALL, 2002; RHOADES & TANNER, 2005);

3. Ligação dos resíduos iodotirosil na tireoglobulina

Da iodação da tirosina formam-se dois compostos iodados a monoiodotirosina (MIT) e a diiodotirosina (DIT), de modo que ambos já se encontram incorporados a grande molécula de tireoglobulina. Estes resíduos de tirosina iodados passam por uma reação de acoplamento que forma a estrutura da iodotironina. A reação de acoplamento é catalizada pela tireóide peroxidase, a mesma enzima que inicialmente oxida iodo, através da oxidação de resíduos de tirosina iodados adjacentes a radicais livres de vida curta. Esses radicais passam por adição (DOUGLAS, 1999).

Na reação de adição, ocorre a produção de um resíduo de iodotironina e um resíduo de desidroalanina. Assim, quando dois resíduos adjacentes de DIT são acoplados por esse mecanismo, forma-se a T4 e quando um resíduo de MIT e um de DIT são acoplados forma-se a T3. Estes já são os hormônios tireóideos bioativos (RHOADES & TANNER, 2005);

4. Proteólise da tireoglobulina e secreção dos hormônios tireoideanos

A tiroxina e a triiodotironina devem ser clivadas da molécula de tireoglobulina e a seguir, esses hormônios livres devem ser liberados. Esse processo ocorre da seguinte maneira: a superfície apical das células tireóideas emite extensões em forma de pseudópodos que englobam pequenas porções do colóide, formando

vesículas pinocíticas que penetram no ápice da célula tireóidea. A seguir, ocorre a fusão imediata do lisossomas do citoplasma com essas vesículas, formando vesículas digestivas, que contêm as enzimas digestivas dos lisossomas misturadas com o colóide. Entre as enzimas, encontram-se as proteinases, que digerem as moléculas de tireoglobulina, liberando a T4 e a T3 em sua forma livre, que se difundem para o interior dos capilares circundantes e assim, são liberados no sangue. A maior produção pela glândula tireóide é a T4, cerca de 93%, enquanto apenas 7% são representados pela T3 (GUYTON & HALL, 2002).

5. Processo de desiodação

Apenas cerca de 20 a 25% dos resíduos de DIT e MIT, na molécula de tireoglobulina, são acoplados, formando iodotironinas. O restante dos resíduos são desiodados na célula folicular, por uma deiodinase, uma flavoproteína dependente de NADPH encontrada na mitocôndria e nos microsossomos. Ela atua sobre MIT e DIT, porém não tem atuação sob T3 e T4. O iodeto liberado é então, reutilizado, pela célula folicular, para a iodação da tireoglobulina, ou seja, para uma nova síntese dos hormônios tireóideos e uma pequena quantidade é liberada para a circulação (GREENSPAN & STREWLER, 1997; RHOADES & TANNER, 2005);

2.1.2 TRANSPORTE DOS HORMÔNIOS TIREOIDEANOS

As moléculas de T3 e T4 que chegam à corrente sanguínea se ligam, em sua maior parte, às proteínas plasmáticas. Cerca de 70% da T4 e 80% da T3 se ligam, de forma não-covalente, à globulina fixadora de tiroxina (TBG), uma glicoproteína de 54-kDa que é sintetizada e secretada pelo fígado (RHOADES & TANNER, 2005).

A T4 e a T3 remanescentes, se ligam à transtiretina ou à albumina. As moléculas de T4 e T3 ligadas às proteínas são protegidas da inativação metabólica e da excreção na urina. Como conseqüências desses fatores, os hormônios tireóideos, apresentam meias-vidas prolongadas na corrente sanguínea. A meia-vida da T4 é cerca de 7 dias e a de T3, cerca de 1 dia. Menos de 1% da T4 e da T3, no sangue, estão na forma livre estando em equilíbrio com a grande fração ligada às proteínas (RHOADES & TANNER, 2005).

2.2 REGULAÇÃO DA FUNÇÃO TIREOIDEANA

A função da glândula tireóide é controlada por 4 mecanismos: (1) o clássico eixo hipotálamo-hipófise-tireóide; (2) as deiodinases hipofisárias e periféricas, que modificam os efeitos da T4 e T3; (3) a auto-regulação da síntese hormonal, pela própria glândula tireóide e a (4) estimulação ou inibição da função tireoideana por auto-anticorpos do receptor de TSH (GREENSPAN & STREWLER, 1997).

2.2.1 Eixo hipotálamo-hipófise-tireóide

O principal mecanismo de regulação da glândula tireóide é o eixo hipotálamo-hipófise, representado na Figura 4. O hormônio de liberação de tireotropina (TRH) secretado pelo hipotálamo, estimula a síntese e liberação pela hipófise anterior do hormônio estimulador da tireóide (TSH), que por sua vez, estimula a glândula tireóide a produzir e secretar tiroxina e triiodotironina, resultando no status eutireóideo a nível tecidual (GREENSPAN & STREWLER, 1997; LAFRANCHI, 2006).

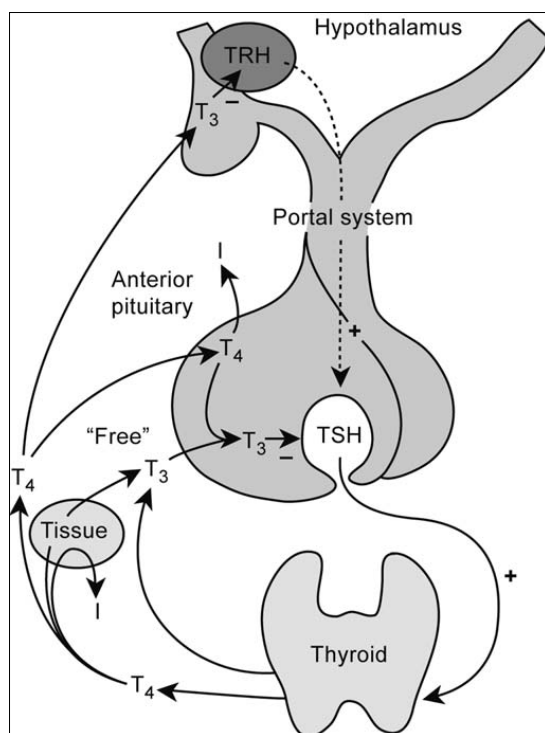


Figura 4 – O eixo hipotálamo-hipófise-tireóide (GREENSPAN & STREWLER, 1997).

Hormônio de liberação de tireotropina (TRH)

A secreção de TSH pela hipófise anterior é controlada por um hormônio hipotalâmico, o hormônio de liberação de tireotropina (TRH), secretado por terminações nervosas na eminência mediana do hipotálamo. O TRH trata-se de substância simples, uma amida tripeptídica piroglutamil-histidil-prolina-amida, que afeta diretamente as células glandulares da hipófise anterior para aumentar a produção de TSH (GUYTON & HALL, 2002).

Os receptores da hipófise para TRH são do tipo de membrana, próprios para os hormônios hidrossolúveis, cuja concentração é controlada pelo T4, que diminui o número de receptores hipofisários, contribuindo para a regulação da secreção tireoideana, por *feed-back* negativo (DOUGLAS, 1999).

Hormônio estimulador da tireóide ou tirotropina (TSH)

O TSH é produzido na adeno-hipófise, sendo quimicamente uma glicoproteína de peso molecular de aproximadamente 28 kD (DOUGLAS, 1999). Esse hormônio aumenta a secreção de tiroxina e triiodotironina pela glândula tireóide. Seus efeitos específicos sobre a glândula tireóide são os seguintes:

- Aumento da proteólise da tireoglobulina já armazenada nos folículos, com a conseqüente liberação dos hormônios tireoideanos no sangue e diminuição da própria substância folicular;
- Aumento da atividade da bomba de iodeto, que aumenta o “seqüestro do iodeto” nas células glandulares, aumentando em algumas vezes, a relação entre a concentração de iodeto intracelular e extracelular por até 8 vezes o normal;
- Aumento da iodetação da tirosina para formar os hormônios tireóides;
- Aumento de tamanho e da atividade secretora das células tireóideas;
- Aumento do número de células tireóideas, juntamente com a transformação das células cubóides em células colunares e acentuado pregueamento do epitélio da tireóide nos folículos (GUYTON & HALL, 2002).

Em resumo, o TSH aumenta todas as atividades secretoras, conhecidas das células glandulares da tireóide, tendo seu efeito estimulador mediado pelo monofosfato cíclico de adenosina (cAMP). O primeiro evento na ativação, consiste na ligação do TSH a receptores específicos de TSH na superfície basal da membrana da célula tireóidea. Essa ligação ativa a adenilil ciclase na membrana, que aumenta a formação de cAMP no interior da célula. Por fim, o cAMP atua como segundo mensageiro para ativar a proteína cinase, que causa múltiplas fosforilações por toda a célula. O resultado consiste em aumento imediato na secreção dos hormônios tireóideos, bem como em crescimento prolongado do próprio tecido glandular (GUYTON & HALL, 2002; RHOADES & TANNER, 2005).

2.3 EFEITOS FISIOLÓGICOS DOS HORMÔNIOS TIREOIDEANOS

Os hormônios tireoideanos exercem funções importantes na diferenciação, crescimento e no metabolismo. Além disso, são necessários para o funcionamento normal de praticamente todos os tecidos, tendo os principais efeitos sobre o consumo de oxigênio e taxa metabólica (YEN, 2001).

2.3.1 METABOLISMO DE LIPÍDEOS

Praticamente todos os aspectos do metabolismo de lipídeos, aumentam sob a influência dos HT. Os lipídeos são mobilizados rapidamente do tecido adiposo, que assim, reduz os estoques de gordura corporal. Ocorre um aumento na concentração de ácidos graxos livres no plasma e acelerada oxidação destes ácidos graxos pelas células.

O aumento da síntese de HT diminui a concentração de colesterol, fosfolipídeos e triglicerídeos no plasma, apesar de aumentar os ácidos graxos livres. Diferentemente, a diminuição da secreção de HT promove o aumento das concentrações de colesterol, fosfolipídeos e triglicerídeos e na maioria dos casos promove depósito excessivo de gordura no fígado.

Um dos mecanismos pelo quais os HT diminuem a concentração plasmática de colesterol consiste no aumento significativo da intensidade de secreção de colesterol na bile, com a conseqüente perda nas fezes. O possível mecanismo para

a secreção aumentada de colesterol é a de que os HT induzem o aumento no número de receptores para LDL nas células hepáticas, levando a rápida remoção das LDLs do plasma para o fígado, e em secreção subsequente do colesterol nessas lipoproteínas pelas células hepáticas (GUYTON & HALL, 2006).

2.4 HIPOTIREOIDISMO

O hipotireoidismo é caracterizado por uma síndrome clínica, decorrente da deficiência de hormônios tireoideanos, que resulta na diminuição dos processos metabólicos (GREENSPAN & STREWLER, 1997).

O hipotireoidismo clínico é definido pela presença de níveis elevados de TSH e concentrações diminuídas dos hormônios tireoideanos T3 e T4. (CESENAF et al., 2005).

Nos estágios iniciais da doença, os sintomas podem ser inespecíficos, como: mialgia, artralgia, câimbras, pele seca, dores de cabeça e menorragia. Unhas quebradiças, cabelos mais finos, palidez e sintomas do túnel do carpo também podem aparecer. O depósito de glicosaminoglicanos levará ao atraso da fase de relaxamento dos reflexos e aparecimento de macroglosia. Quando o hipotireoidismo se torna mais acentuado, pode ser evidenciado edema periférico, constipação, dispnéia e ganho de peso. Outras manifestações incluem edema pericárdico, ascite, audição diminuída, hipertensão diastólica. Dislipidemia tem sido descrita e pode contribuir para aterosclerose acelerada. Tipicamente, têm sido relatados níveis elevados de LDL e baixos de HDL1 (NOGUEIRA, 2005).

ETIOLOGIA

O hipotireoidismo pode ser classificado como primário (falência tireoideana); secundário (deficiência de TSH), terciário (deficiência de TRH) ou caracterizado pela resistência periférica à ação dos HT (GREENSPAN & STREWLER, 1997).

A Tireoidite de Hashimoto é uma doença auto-imune da glândula tireóidea, representando a principal causa do hipotireoidismo (TAGAMI et al., 2009). As doenças auto-imunes são responsáveis por mais de 50% dos casos, respondendo por 3% dos adultos e maior proporção (10%) no sexo feminino na menopausa (ROMALDINI et al., 2004). É caracterizada pela presença de numerosos linfócitos,

com a formação de folículos linfóides e acentuadas alterações nas células epiteliais tireoideanas (TAGAMI et al., 2009).

As formas secundárias e terciárias de hipotireoidismo são menos freqüentes. O hipotireoidismo pode resultar da perda da estimulação trófica devido a dano ou doença do eixo hipotálamo-hipófise. Assim, na ausência do TRH ou TSH, a função tireoideana está reduzida (NUSSEY & WHITEHEAD, 2001).

A incapacidade das células de responder ao hormônio é conhecida como resistência hormonal e é causa comum de distúrbios endócrinos. A resistência pode resultar de uma redução ou perda dos receptores para hormônio, anormalidades no receptor ou em uma molécula sinalizadora (NUSSEY & WHITEHEAD, 2001).

2.4.1 DISLIPIDEMIAS NO HIPOTIREOIDISMO

Os hormônios tireoideanos possuem muitos efeitos no coração e no sistema cardiovascular. O hipotireoidismo clínico está associado ao desenvolvimento de doenças arteriais coronarianas (DAC), o que em parte pode ser explicado, pela função destes hormônios na regulação do metabolismo lipídico e efeitos sobre a pressão arterial (JUNG, et al., 2008). A hipertensão diastólica, dislipidemia, aumento da rigidez arterial, são importantes fatores de risco para a aterosclerose e achados freqüentes no estado hipometabólico (BIONDI & KLEIN, 2004).

As dislipidemias podem ser classificadas fenotipicamente ou bioquimicamente considerando os valores de colesterol total (CT), lipoproteína de baixa densidade (LDL-C), triglicerídeos (TG) e lipoproteína de alta densidade (HDL-C) em quatro tipos principais bem definidos: hipercolesterolemia isolada caracterizada pela elevação isolada do LDL-C (≥ 160 mg/dL); hipertrigliceridemia isolada caracterizada pela elevação isolada dos TG (≥ 150 mg/dL), que reflete o aumento do volume de partículas ricas em TG como VLDL, IDL e quilomícrons; hiperlipidemia mista, na presença de valores aumentados de ambos LDL-C (≥ 160 mg/dL) e TG (≥ 150 mg/dL) e finalmente HDL-C baixo caracterizada pela redução do HDL-C (homens < 40 mg/dL e mulheres < 50 mg/dL) isolada ou em associação com aumento de LDL-C ou de TG (SPOSITO et al., 2007).

O hipotireoidismo é a principal causa de dislipidemia secundária, causada pela diminuída excreção de colesterol e aumento nos níveis das lipoproteínas apo B,

indicando uma conversão diminuída de VLDL para LDL, provavelmente devido à deficiência de HT e a conseqüente desativação da LPL que cataboliza a VLDL (DAGRE, et al., 2007; BECERRA et al., 1999). Além disso, o hipotireoidismo está associado a diminuição da atividade da proteína de transferência de colesterol esterificado, da lipase endotelial hepática, da 7-alfa hidroxilase (BIONDI & KLEIN., 2004).

A deficiência dos HT, também promove uma diminuição reversível da expressão de receptores para LDL no fígado e conseqüentemente diminuição do catabolismo desta lipoproteína (BECERRA et al., 1999), resultando em elevação dos níveis sanguíneos de LDL. Além disso, o acúmulo de lipídeos favorece os processos de oxidação lipídica, uma vez que estes podem servir de substratos para o ataque dos radicais livres (DUNTAS, et al., 2002). No hipotireoidismo, a oxidação da LDL está aumentada, gerando a LDL oxidada, que por sua vez é fagocitada por macrófagos levando a formação das células espumosas, que participam da etapa inicial do desenvolvimento do processo aterosclerótico (DAGRE, et al., 2007).

2.5 ESTRESSE OXIDATIVO

Em condições fisiológicas há um balanço entre a geração de radicais livres e os sistemas de defesa antioxidantes. A alteração do equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, gera o quadro de estresse oxidativo geralmente caracterizado pela hiperprodução de oxidantes (SIES, 1997). O estresse oxidativo provoca danos moleculares e teciduais estando associado a inúmeras patologias (YANG et al., 2008).

A redução tetravalente de elétrons de oxigênio molecular para água, é uma das principais reações que ocorrem no final da cadeia transportadora de elétrons sendo considerada essencial aos organismos vivos. Entretanto, 1 a 2% do oxigênio total consumido pela mitocôndria está reduzido de forma incompleta, formando as espécies reativas de oxigênio (EROs) e outras espécies reativas (VENDITTI & DI MEO et al., 2006.; DAS & CHAINY et al., 2001).

As EROs compreendem as espécies químicas como o ânion superóxido (O_2^*), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\bullet OH$) (Figura 5). Estas espécies podem reagir com uma grande quantidade de biomoléculas incluindo os

ácidos graxos poliinsaturados das biomembranas (promovendo uma cadeia de reações peroxidativas) com proteínas e enzimas (causando danos as propriedades funcionais) e com ácidos nucleicos (gerando quebras e alterações de bases) (SIES, 1997; VENDITTI & DI MEO et al., 2006).

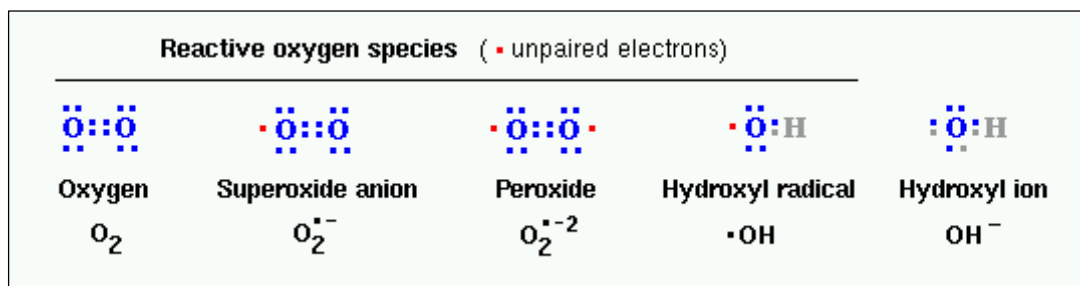


Figura 5: Espécies reativas de oxigênio (www.vivo.colostate.edu).

O nitrogênio também participa na geração de espécies reativas, sendo as mais danosas o óxido nítrico (ON•) e o peroxinitrito (ONOO-). O óxido nítrico é um radical livre contendo um único elétron não pareado, reagindo rapidamente com um pequeno número de moléculas dentre elas o superóxido, formando peroxinitrito oxidante principalmente de proteínas e DNA (MOZAFFARIEH et al., 2008).

Os hormônios tireoideanos influenciam a taxa metabólica basal durante os estados fisiológicos através da alteração no consumo de oxigênio mitocondrial, o principal local da produção dos radicais livres. Assim, alterações nos níveis de hormônios tireoideanos afetam a geração de radicais livres pela mitocôndria. Além disso, os hormônios também possuem efeitos sobre a síntese e a degradação de proteínas antioxidantes, vitaminas e enzimas (TORUN et al., 2009).

No hipotireoidismo, a presença de estresse oxidativo é controversa (NANDA et al., 2007). Entretanto, estudos têm sugerido que a geração de radicais livres em pacientes com hipotireoidismo não é proporcionalmente baixa quando comparado com indivíduos normais como demonstrado por análises de citometria de fluxo, uma vez que a disfunção endócrina está associada à hiperlipidemia, a principal causa de doença cardiovascular e de aumento da geração de EROs (SUBUDHI et al., 2009).

2.5.1 BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

2.5.1.1 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Os lipídeos são os principais componentes das membranas celulares (SCHNITZER et al., 2007), sendo os ácidos graxos poliinsaturados os componentes mais suscetíveis a processos oxidativos causados pela ação de EROs (MESSARAH et al., 2007). O processo de peroxidação lipídica ocorre quando, por exemplo, radicais peroxil e hidroxil são adicionados a ácidos graxos insaturados ou uma cadeia carbônica de ácidos graxos sofre clivagem ao reagir com um elétron livre (RADWAŃSKA-WALA et al., 2008) gerando como produtos inúmeros compostos oxigenados, principalmente aldeídos como malondialdeído (MDA) e dienos conjugados (YANG et al., 2008). Este processo uma vez iniciado, é sustentado pela ação de radicais livres. Assim, o acúmulo de produtos da peroxidação lipídica constitui-se um importante biomarcador de estresse oxidativo (SENTHIL et al., 2004; NELSON et al., 2006).

No hipotireoidismo, a oxidação de lipídeos é um achado freqüente (NANDA et al., 2008), estando associada à hiperlipidemia e ao aumento na geração de EROs (SUBUDHI et al., 2009). As principais conseqüências da peroxidação lipídica são alterações nas propriedades das biomembranas, incluindo sua fluidez e permeabilidade. Estas alterações por sua vez, afetam a atividade de proteínas de membrana, incluindo enzimas ligadas a membranas, receptores e proteínas transportadoras podendo levar a morte celular (SCHNITZER et al., 2007; LIMÓN-PACHECO & GONSEBATT, 2009).

2.5.2 ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

2.5.2.1 SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

Superóxidos dismutases (EC 1.15.1.1) constituem um grupo de metaloenzimas que catalisam a remoção do ânion superóxido (O_2^-) (YIM et al., 1990; LIMÓN-PACHECO & GONSEBATT, 2009) (Figura 6).

As SODs constituem a primeira e mais importante linha de defesa antioxidante enzimática contra os RL e particularmente os radicais ânion superóxido. Em mamíferos, existem três isoformas diferentes desta enzima, sendo que duas isoformas possuem cobre (Cu) e zinco (Zn) no centro catalítico e estão localizadas em compartimentos citoplasmáticos intracelulares (CuZn-SOD ou SOD1) ou em elementos extracelulares (EC-SOD ou SOD3) (ZELKO et al., 2002; LANDIS & TOWER, 2005).

SOD1 tem peso molecular de 32.000 Da, sendo encontrada no citoplasma, compartimentos nucleares e lisossomos de células de mamíferos. A SOD3 estruturalmente apresenta-se como um homotetrâmero com peso molecular de 135.000 Da, sendo inicialmente detectada no plasma humano, linfa, ascite e líquido. A terceira isoforma das SODs possui manganês (Mn) como co-fator estando localizada na mitocôndria de células aeróbicas (Mn-SOD or SOD2). Consiste de um homotetrâmero com uma única subunidade com peso molecular de 23.000 Da, constituindo a primeira linha de defesa contra as EROs na mitocôndria (ZELKO et al., 2002; BAG & BAG, 2008).

2.5.2.2 Catalase (CAT)

A Catalase (EC 1.11.1.6) humana apresenta-se como um tetrâmero composto por quatro subunidades idênticas de 60 KDa (PUTNAM et al., 2000) cada uma com um grupo heme protoporfirina IX no sítio ativo, localizado internamente e acessível por uma passagem que se torna estreita, explicando assim, a capacidade da enzima em usar apenas substratos de pequeno tamanho (KIRKMAN & GAETANI, 2007).

Praticamente todos os organismos aeróbicos produzem peróxido de hidrogênio (H_2O_2) através de processos metabólicos normais, principalmente a partir do superóxido (OGATA et al., 2008). A CAT atua convertendo H_2O_2 em água e oxigênio (O_2), estando localizada principalmente em organelas subcelulares como os peroxissomas e menor quantidade na mitocôndria e no retículo endoplasmático. Portanto, a eliminação do H_2O_2 é dependente principalmente de sua difusão para os peroxissomas (LIMÓN-PACHECO & GONSEBATT, 2009) (Figura 6).

Assim, a CAT é uma enzima central da defesa antioxidante atuando em conjunto com a GSH-Px na remoção de H_2O_2 e na prevenção contra danos oxidativos (CHOUDHURY et al., 2003).

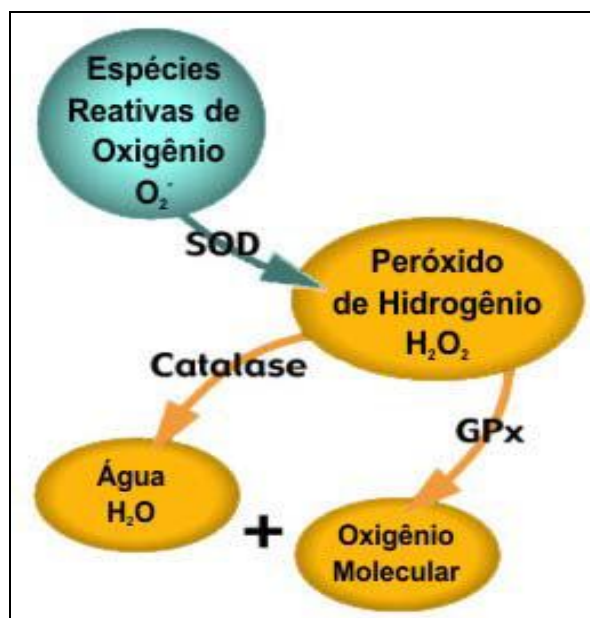


Figura 6 - Mecanismo enzimático antioxidante (NORDBERG & ARNER, 2001).

2.5.3 Antioxidantes não-enzimáticos

2.5.3.1 Vitamina E (α - tocoferol)

A LDL humana contém vários antioxidantes lipossolúveis, incluindo o α -tocoferol (vitamina E), γ -tocoferol, ubiquinol-10 e vários carotenóides e oxicarotenóides (CARR, 2000).

O α -tocoferol é o antioxidante mais abundante na LDL, atuando na captura dos radicais peroxila e alcoxila, altamente reativos com lipídeos, e que podem propagar a reação em cadeia da peroxidação lipídica (PRYOR, 2000). Nesse processo, a vitamina E atua doando um átomo de hidrogênio para estes radicais, derivados da oxidação de ácidos graxos. O radical peroxila oxida a vitamina E e produz o radical tocoferoxila, um radical estável que não propaga a cadeia. Subseqüentemente, o radical tocoferoxila é regenerado à vitamina E pela vitamina C e pela glutathiona (CHAN, 1993; LIEBLER, 1993).

Estudos envolvendo seres humanos demonstraram uma correlação inversa entre os níveis de vitamina E e a expressão de β 1 integrina em monócitos, bem como uma diminuição da adesão celular endotelial por monócitos após suplementação com a vitamina E.

A α -tocoferol pode inibir a expressão de moléculas de adesão e a subseqüentes interações célula-célula, através da captura de EROs ou inibindo a proteína quinase C (PKC) associada a produção de EROs (CARR et al., 2000). Além disso, possui efeito inibidor sobre a proliferação de células de músculo liso e sobre a adesão e agregação plaquetária prevenindo assim, o desenvolvimento de doenças ateroscleróticas (HARRIS et al., 2002).

2.5.2.2 Tióis não-protéicos

A Glutationa (GSH) (L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina) é o principal tiol não-protéico intracelular livre, encontrado em vários tecidos biológicos, sendo o principal antioxidante das células dos mamíferos. É um tripeptídeo composto por cisteína, ácido glutâmico e glicina com o grupo ativo representado por um tiol (-SH) no resíduo de cisteína (ROSEMBLAT et al., 2007).

A GSH possui uma variedade de funções fisiológicas atuando na detoxificação de compostos xenobióticos e na eliminação de intermediários reativos, reduzindo hidroperóxidos na presença da GSH-Px (HULTBERG M & HULTBERG B, 2005). A reação catalisada pela GSH-Px ocorre às custas de glutatona reduzida, tendo como resultado a glutatona oxidada que é então, reciclada à forma reduzida pela glutatona redutase e NADPH (GUL et al., 2000). Dessa forma, este processo de reciclagem e a manutenção de níveis adequados de GSH podem prevenir o dano celular causado pelo estresse oxidativo (STAMLER & SLIVKA, 1996), uma vez que a GSH captura RL e repara os danos biológicos ocasionados pelos mesmos (YAO, et al., 2008) (Figura 7).

Por possuir propriedades nucleofílicas e redutoras, pode reagir com espécies eletrofílicas ou oxidadas direta ou indiretamente, através de reações enzimáticas evitando desta forma, a reação destas espécies com constituintes celulares importantes, como os ácidos nucléicos e proteínas, o que pode levar à apoptose (HULTBERG & HULTBERG, 2006).

Além disso, participa de reações de transhidrogenação que estão envolvidas na formação e manutenção dos grupos sulfidrílicos de outras moléculas, como coenzima A e de várias outras enzimas e proteínas (PASTORE et al., 2003).

3. MANUSCRITO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito, o qual se encontra aqui organizado. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio manuscrito. A apresentação está baseada na versão submetida à publicação na revista *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*.

O manuscrito encontra-se em fase de revisão.

3.1 ASSOCIAÇÃO ENTRE HORMÔNIOS TIREOIDEANOS, LIPÍDEOS E BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NO HIPOTIREOIDISMO CLÍNICO.

Manuscrito

ASSOCIATION BETWEEN THYROID HORMONES, LIPIDS AND OXIDATIVE STRESS BIOMARKERS IN OVERT HYPOTHYROIDISM.

Adriana Santi, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte, Rafael Noal Moresco, Charlene Menezes, Margarete Dulce Bagatini, Maria Rosa Chitolina Schetinger, Vania Lucia Loro.

Manuscrito Submetido para Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.

**ASSOCIATION BETWEEN THYROID HORMONES, LIPIDS AND OXIDATIVE
STRESS BIOMARKERS IN OVERT HYPOTHYROIDISM**

**Adriana Santi¹, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte², Rafael Noal Moresco³,
Charlene Menezes², Margarete Dulce Bagatini², Maria Rosa Chitolina
Schetinger², Vania Lucia Loro^{1,2,*}**

¹Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

²Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

³Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

***Corresponding author:** Vania Lucia Loro

Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil.

Phone: +55 55 32209456

Fax: +55 55 32208240

E-mail: vania.loro@gmail.com

Abstract

Background: The aim of this study was to investigate the effect of hypothyroidism on lipid peroxidation and antioxidant profile as well as to evaluate the interaction between thyroid hormones and oxidative stress biomarkers in patients with overt hypothyroidism. We also evaluated the influence of cholesterol levels on oxidative stress biomarkers in these patients.

Methods: Total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, triglycerides, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), thiol groups (SH), and vitamin E were measured in 20 subjects with overt hypothyroidism (OH) and 20 controls.

Results: Total cholesterol, LDL cholesterol, triglycerides, TBARS, SOD, CAT, and vitamin E were significantly higher in the OH group. Significant correlations were observed for TSH and SOD, CAT, vitamin E and TBARS. Correlations were observed for T3 and SOD, CAT, vitamin E and TBARS. Significant correlations were also observed for fT4 and SH, vitamin E and TBARS. However, correlations between T3 and CAT, and fT4 and SH, remained significant after controlling for total cholesterol levels.

Conclusions: Overt hypothyroidism is associated with an increase in oxidative stress, and hypercholesterolemia has a stronger influence on development of oxidative stress in hypothyroid condition than thyroid hormones.

Keywords: hypothyroidism; lipids; oxidative stress; thyroid hormones.

Introduction

Hypothyroidism is characterized by decreased thyroid hormone production by the thyroid gland. This in turn leads to decreased hormone levels in cells and tissues (1). It is a common disorder with a prevalence rate up to 20% increasing with age, especially in women (2). This disorder is associated with abnormalities of lipid metabolism, which may predispose to the development of atherosclerotic coronary artery disease (CAD), mainly by the increase of the total cholesterol level and low-density lipoprotein (LDL) leading to hypercholesterolemia (3-6). Hypercholesterolemia is associated with oxidative stress (7-9), which results from the increased production of reactive oxygen radicals or impairment of the antioxidant system (10). However, in hypothyroidism, the occurrence of oxidative stress is controversial (11). The metabolic suppression brought about by hypothyroidism is associated with a decrease in free radical production. Besides, it has also been suggested that hypothyroidism protects tissues against acceleration of lipid peroxidation (12). In contrast, increased LDL oxidation has been reported in hypothyroidism and it was strongly influenced by serum lipids (12). Also, an increased oxidative stress in both hypothyroid and subclinical hypothyroidism states was observed (13).

Superoxide and hydroxyl radicals along with non radical oxygen species, such as hydrogen peroxide (H_2O_2) are commonly termed as reactive oxygen species (ROS) that may produce tissue injury by initiating lipid, protein and DNA oxidative modifications (13,14). The attack of ROS on membranes or lipoproteins may lead to lipid peroxidation and loss of membrane integrity, resulting in necrosis and cell death (15, 16).

In order to protect tissues from these damaging effects, the organism possesses enzymatic and non enzymatic antioxidant systems (14). The antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) present a great ability to catalyze the reactions of their substrates superoxide radical and hydrogen peroxide, respectively. This way, they have an enormous theoretical advantage over exogenous antioxidants that are stoichiometrically consumed (16). In addition to these enzymatic systems, non enzymatic mechanisms also protect against oxidative stress. These mechanisms include natural lipophilic antioxidants such as vitamin E and hydrophilic substances such as glutathione reduced (GSH), which could act synergistically. Vitamin E acts as a peroxy radical scavenger and could be further regenerated by vitamin C and GSH, for instance (14). GSH, main non-protein thiol, is a tripeptide with a broad spectrum of effects including neutralization of ROS, detoxification of xenobiotics, lipid peroxidation, and hydroperoxides issued from the respiratory chain (17, 18).

Considering the importance of hypothyroidism and its association with hypercholesterolemia, the aim of this study was to investigate the effect of hypothyroidism on lipid peroxidation and antioxidant profile as well as to evaluate the interaction between thyroid hormones and oxidative stress biomarkers in patients with overt hypothyroidism. We also evaluated the influence of cholesterol levels on oxidative stress biomarkers in these patients.

Materials and Methods

Study population

Patients were enrolled prospectively in this study from clinical laboratory LABIMED, located in Santa Maria-RS, Brazil. This study was performed in 40 patients divided into two groups as follows: control group, 20 healthy subjects (50.25 ± 10.90 years); and overt hypothyroidism (OH) group, 20 patients (48.00 ± 10.81 years). Overt hypothyroidism was defined as thyroid-stimulating hormone (TSH) higher than 10 mIU/L and low free thyroxine (fT4) and triiodothyronine (T3) levels (19). Patients taking lipid-lowering drugs, antioxidant vitamin supplements, acetylsalicylic acid, antihistamines, antihypertensive, exposure to high iodine condition, smokers, alcoholics, pregnant women, women on hormone replacement therapy, diabetics and subjects with acute, chronic or malignant diseases were excluded. All subjects gave written informed consent to participate in the study. The protocol was approved by the Human Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria (number 23081.016996/2008) (Anexo II).

Sample collection and biochemical determinations

Venous blood samples were drawn from each participant after a 12 h overnight fasting by venous puncture into blue and red top Vacutainers (BD Diagnostics, Plymouth, UK) tubes with sodium citrate or no anticoagulant, respectively. The samples were centrifuged for 15 min at $2500 \times g$, and aliquots of plasma and serum were kept at -20°C for maximum of 4 weeks. An aliquot of whole blood was collected in sodium citrate 3.2% and diluted 1:10 in saline solution for measurement of CAT and SOD activities. Serum TSH, T3 and fT4 concentrations were measured by chemiluminescent immunometric assay on IMMULITE 2000[®]

(Siemens Healthcare Diagnostics, Los Angeles, USA). Detection limits for TSH was 0.004 - 14.000 mIU/L, FT4 was 3.9 - 77.2 pmol/L and T3 was 0.29 nmol/L. Serum total cholesterol (TC) and triglycerides (TG) concentrations were measured using standard enzymatic methods on a fully automated analyzer Vitros 950[®] dry chemistry system (Johnson & Johnson, Rochester, NY, USA). High-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) was measured in the supernatant plasma after precipitation of apolipoprotein B-containing lipoproteins with dextran sulfate and magnesium chloride as previously described (20). Low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) was estimated with the Friedewald equation (21). Serum thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were measured according to the modified method of Jentsch et al (22). Serum sample was added to the reaction mixture containing 1% ortho-phosphoric acid, alkaline solution of thiobarbituric acid-TBA, followed by 45 min heating at 95°C. After cooling, samples and standards of malondialdehyde (0.03mM) were read at 532 nm against the blank of the standard curve. The results were expressed as nmol MDA/mL. Whole blood catalase activity was determined by the method of Aebi (23) by measuring the rate of decomposition of H₂O₂ at 240 nm. An aliquot of blood was homogenized in potassium phosphate buffer, pH 7.0. The spectrophotometric determination was initiated by the addition of sample in an aqueous solution of hydrogen peroxide 0.3 mol/l. The change in absorbance at 240 nm was measured for 2 min. CAT activity was calculated using the molar extinction coefficient (0.0436 cm²/μmole) and the results were expressed as U/g Hb. Whole blood superoxide dismutase activity was measured as described by McCord & Fridovich (24). In this method, SOD present in the sample competes with the detection system for superoxide anion. A unit of SOD is defined as the amount of enzyme that inhibits the rate of adrenalin oxidation by 50%. Adrenalin oxidation leads

to the formation of the colored product, adrenochrome, which is detected by spectrophotometer. SOD activity is determined by measuring the rate of adrenochrome formation, observed at 480 nm, in a reaction medium containing glycine-NaOH (50 mM, pH 10.0) and adrenalin (1 mM). The results were expressed as U/mg Hb. Plasma SH was assayed by the Ellman method (25). Aliquots of plasma were added to a phosphate buffer 0.3 mol/l, pH 7.4 and the reaction was followed at 412 nm after the addition of 10 mM 5-5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB). Results were expressed as $\mu\text{mol/mL}$. Serum vitamin E was estimated by a modified method of Hansen & Warwick (26). In a covered tube, Milli-Q water (Millipore, Bedford, MA, USA) was added to butylated hydroxytoluene 10 mM (BHT), serum sample and ethanol solution (66%). The mixture was then vortex-mixed for 10 s and n-hexane was added and mixed for 1 min, followed by centrifugation at 1,800 g for 10 min. Then, superior phase was transferred to fluorimeter cuvettes and vitamin E was measured in the fluorimeter: excitement: 295 nm; emission: 340 nm. Calibration curves with α -tocopherol (3.12, 6.25, 12.5, 25.0 mg/L) were used to determine the concentration, following the same procedure used for the samples. Results were expressed as $\mu\text{mol/L}$. Hemoglobin concentration was measured in whole blood sample by use of Pentra 120 analyzer (ABX, Montpellier, France). The results were expressed as g/dL. Protein was measured by the method of Bradford using bovine serum albumin as standard (27).

Statistical analysis

Data are presented as mean and standard deviation (SD). Statistical differences between groups were evaluated by Mann-Whitney *U* test. Spearman correlation was assessed to evaluate the correlations between the variables. Partial

correlations were performed to control the associations between variables for total cholesterol levels. Statistical significance was assumed at $p < 0.05$. Data were analyzed using Statistica 6.0 software (Statsoft Inc., 2001).

Results

Baseline characteristics of the study subjects are shown in Table 1. TC, LDL-C and TG were significantly higher in OH group when compared to control group. No significant differences for HDL-C and body mass index (BMI) were observed between groups. The OH group presented higher TSH and lower T3 and fT4 levels. The patients with OH had significantly higher values of SOD, CAT, vitamin E and TBARS. No statically significant differences were observed for SH levels between groups. We observed significant positive correlations between TSH and SOD ($r=0.5603$, $p < 0.001$), TSH and CAT ($r=0.3263$, $p=0.040$), TSH and vitamin E ($r=0.6982$, $p < 0.001$), and TSH and TBARS ($r=0.5052$, $p=0.010$), as indicated in Table 2. However, no significant correlations were observed between TSH and oxidative biomarkers after controlling for TC levels. We also observed significant negative correlations between T3 and SOD ($r= -0.5323$, $p < 0.001$), T3 and CAT ($r= -0.4736$, $p=0.002$), T3 and Vitamin E ($r= -0.6497$, $p < 0.001$), and T3 and TBARS ($r= -0.4607$, $p=0.003$). The correlation between T3 and CAT ($r= -0.3996$, $p=0.012$) remained significant after controlling for TC levels. Significant correlations were also observed between fT4 and SH ($r=0.3943$, $p=0.012$), fT4 and vitamin E ($r= -0.4606$, $p=0.003$), and fT4 and TBARS ($r= -0.3242$, $p=0.041$). The correlation between fT4 and SH ($r=0.4427$, $p=0.005$) remained significant after controlling for TC levels.

Table 1 here

Table 2 here

Discussion

Our results clearly indicated that OH is associated with lipid peroxidation and antioxidant system induction. In addition, higher levels of total cholesterol, LDL cholesterol and triglycerides in OH patients were observed. These findings are in agreement with results of other recent investigations, which showed hyperlipidaemia in patients with hypothyroidism (28-30). Thyroid hormones upregulate LDL-receptor expression; thus, the low levels of T3 and T4, found in hypothyroidism, promote a reduction in catabolism of lipoproteins leading to hypercholesterolemia (31-32). High serum lipids are associated with lipid peroxidation as well as with oxidative stress damage in hypothyroidism because the hypercholesterolemia provides a pool of substrates to be oxidized by free radicals (33). In this study TBARS levels were significantly higher in subjects with hypothyroidism, showing direct damage to lipid structures via free radicals in hypothyroid status. Previous studies have also demonstrated an increase in lipid peroxidation markers in human overt hypothyroidism (11, 13).

The biological oxidative effects of the free radicals on lipids, proteins and DNA are controlled by a spectrum of antioxidants. Enzymatic protection against ROS is provided by many systems including enzymes SOD and CAT (34). We found that subjects with hypothyroidism had significantly higher SOD and CAT activities. These findings suggest increased formation of superoxides and hydrogen peroxides in the hypothyroid status, which increases the activities of these antioxidant enzymes as a mechanism to enhance their sequestration. SOD and CAT act synergistically in the dissociation and formation of hydrogen peroxide and their activities are adjusted by their variation in the thyroid gland activity (17). However, some studies have reported no changes in some antioxidant enzymes in overt hypothyroidism (11, 33, 35).

In addition, we investigated the effect of hypothyroidism on the levels of non-enzymatic antioxidants such as vitamin E. This vitamin has an antioxidant capacity because it protects cell membranes against free radical mediated lipid and protein oxidation and plays a pivotal role in maintaining normal endothelial (35). However, vitamin E, being a lipid soluble vitamin correlates directly with lipid and beta-lipoprotein level (36). Thus, high vitamin E levels in OH group may be due to the elevated lipid levels in hypothyroidism than that a defense mechanism against the increased generation of free radicals. This finding is in agreement with data obtained by Erdamar et al (35) where high levels of vitamin E were found in patients with hypothyroidism.

The TSH was reported recently to promote oxidative stress (35). We report here positive correlations between TSH and oxidative stress parameters. However, these correlations were not significant after controlling for total cholesterol levels, and this finding indicates the influence of hypercholesterolemia on oxidative stress biomarkers in patients with OH. It is well known that hypercholesterolemia increases vascular oxidative stress (37). High cholesterol levels favor oxidative stress leading to the modification of LDL. Under conditions of oxidative stress, the lipoprotein phospholipids become progressively oxidized, also free radicals play an important role in the dysfunction of the endothelium and recruitment of inflammatory cells into the vessel wall, initiating the atherosclerotic process (38).

Significant correlations between T3 and CAT, and fT4 and SH were reported in this study, even after controlling for total cholesterol levels. These correlations do not necessarily mean cause-and-effect relationship, but these correlations show the influence of T3 levels on CAT activity leading to its induction as an attempt to combat oxidative stress, and the influence of fT4 levels on GSH levels. However, oxidative

stress is a complex process accompanied by the extended production of ROS and/or impaired antioxidant defense mechanisms, and other conditions not directly associated to overt hypothyroidism can act on these correlations. T3 and T4 have been shown to affect the synthesis and degradation of the antioxidant proteins, vitamins and enzymes (13).

In summary, the present study demonstrated an increase of oxidative stress in overt hypothyroidism and its association with thyroid hormones. Nevertheless, this study indicates a strong influence of total cholesterol levels on development of oxidative stress in hypothyroid condition, and a discrete impact of thyroid hormones on oxidative stress biomarkers. We suggest that monitoring of lipid profile and thyroid hormones levels should be considered in hypothyroidism management, and lipid-lowering drugs may be useful for reduction of oxidative stress on hypothyroidism. However, further larger clinical studies are required to better understand these associations as well as the role of oxidative stress on physiopathology of hypothyroidism.

Conflict of Interest

None declared.

References

1. Biondi B, Klein I. Hypothyroidism as a risk factor for cardiovascular disease. *Endocrine* 2004; 24:1-13.
2. Duntas LH. Thyroid Disease and Lipids. *Thyroid* 2002; 12: 287-93.
3. Efstathiadou Z, Bitsis S, Milionis HJ, Kukuvtis A, Bairaktari ET, Elisaf MS, et al. Lipid profile in subclinical hypothyroidism: is L-thyroxine substitution beneficial? *Eur J Endocrinol* 2001; 145:705-10.
4. Becerra A, Bellido D, Luengo A. Lipoprotein (a) and other lipoproteins in hypothyroid patients before and after thyroid replacement therapy. *Clin Nutr* 1999;18: 319-22.
5. Sundaram V, Hanna AN, Koneru L, Newman HAI, Falko JM. Both Hypothyroidism and Hyperthyroidism Enhance Low Density Lipoprotein Oxidation. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 3421-24.
6. Diekman T, Demacker PNM, Kastelein JJP, Stalenhoef AFH, Wiersinga WM. Increased Oxidizability of Low-Density Lipoproteins in Hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:1752-55.

7. Duarte MM, Loro VL, Rocha JB, Leal DB, Bem AF, Dorneles A, et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides of patients with hypercholesterolemia and inflammatory process. *FEBS J* 2007; 274:2707-14.
8. Prasad K, Kalra J. Oxygen free radicals and hypercholesterolemic atherosclerosis. *Am Heart J* 1993; 125:958 -71.
9. Zou Y, Lu Y, Wei D. Hypocholesterolemic effects of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. in rats fed a cholesterol-rich diet. *J Agric Food Chem* 2005; 53:2462-66.
10. Kebapcilar L, Akinci B, Bayraktar F, Comlekci A, Solak A, Demir T, et al. Plasma thiobarbituric acid-reactive substance levels in subclinical hypothyroidism. *Med Princ Pract* 2007; 16: 432-36.
11. Nanda N, Bobby Z, Hamide A, Koner BC, Sridhar MG. Association between oxidative stress and coronary lipid risk factors in hypothyroid women is independent of body mass index. *Metabolism*, 2007; 56:1350-55.
12. Costantini F, Pierdomenico SD, De Cesare D, De Remigis P, Bucciarelli T, Bittolo-Bon G, et al. Effect of thyroid function on LDL oxidation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 5:732-37.

13. Torun AN, Kulaksizoglu S, Kulaksizoglu M, Pamuk BO, Isbilen E, Tutuncu NB. Serum total antioxidant status and lipid peroxidation marker malondialdehyde levels in overt and subclinical hypothyroidism. *Clin Endocrinol* 2009; 70: 469-474.
14. Maggi-Capeyron MF, Cases J, Badia E, Cristol JP, Rouanet JM, Besançon, P, et al. A diet high in cholesterol and deficient in vitamin E induces lipid peroxidation but does not enhance antioxidant enzyme expression in rat liver. *J Clin Biochem Nutr* 2002; 13: 296-301.
15. Lazzarino G, Raatikainen P, Nuutinen M, Nissinen J, Tavazzi B, Di Pierrô D, et al. Myocardial release of malondialdehyde and purine compounds during coronary bypass surgery. *Circulation* 1994; 90:291-7.
16. Nelson SK, Bose SK, Grunwald GK, Myhill P, McCord JM. The induction of human superoxide dismutase and catalase in vivo: a fundamentally new approach to antioxidant therapy. *Free Radic Biol Med* 2006; 40: 341-47.
17. Messarah M, Boulakoud MS, Boumendjel A, Abdennour C, El Feki A. The impact of thyroid activity variations on some oxidizing-stress parameters in rats. *C R Biol* 2007; 330:107-12.
18. Rosenblat M, Volkova N, Coleman R, Aviram M. Anti-oxidant and anti-atherogenic properties of liposomal glutathione: studies in vitro, and in the atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 2007; 195:61-8.

19. Nanda N, Bobby Z, Hamide A. Association of thyroid stimulating hormone and coronary lipid risk factors with lipid peroxidation in hypothyroidism. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46:674-79.
20. Bachorik PS, Albers JJ. Precipitation methods for quantification of lipoproteins. *Methods Enzymol* 1986; 129:78-100.
21. Friedwald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density. *Clin Chem* 1972; 18:499-502.
22. Jentzsch AM, Bachmann H, Fürst P, Biesalski HK. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 251–56.
23. Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105:121-26.
24. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969; 244: 6049-55.
25. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959; 82: 70–7.
26. Hansen LG, Warwick WJ. A fluorometric micromethod for serum vitamins A and E. *Am J Clin Pathol* 1969; 51: 538-41.
27. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-54.

28. Morris MS, Bostom AG, Jacques PF, Selhub J, Rosenberg IH. Hyperhomocysteinemia and hypercholesterolemia associated with hypothyroidism in the third US National Health and Nutrition Examination Survey. *Atherosclerosis* 2001; 155:195-200.
29. Wiseman SA, Powell JT, Humphries SE, Press M. The magnitude of the hypercholesterolemia of hypothyroidism is associated with variation in the low density lipoprotein receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 108-12.
30. Lee WY, Suh JY, Rhee EJ, Park JS, Sung KC, Kim SW. Plasma CRP, apolipoprotein A-1, apolipoprotein B and Lpa levels according to thyroid function status. *Arch Med Res* 2004; 35: 540-5.
31. Huesca-Gómez C, Franco M, Luc G, Montañó LF, Massó F, Posadas-Romero C, et al. Chronic hypothyroidism induces abnormal structure of high-density lipoproteins and impaired kinetics of apolipoprotein A-I in the rat. *Metabolism* 2002; 51: 443-50.
32. Mayer O Jr, Simon J, Filipovský J, Plásková M, Pikner R. Hypothyroidism in coronary heart disease and its relation to selected risk factors. *Vasc Health Risk Manag* 2006; 4: 499-506.
33. Nanda N, Bobby Z, Hamide A. Oxidative stress and protein glycation in primary hypothyroidism: Male/female difference. *Clin Exp Med* 2008; 8:101-08.

34. Serdar Z, Aslan K, Dirican M, Sarandöl E, Yeşilbursa D, Serdar A. Lipid and protein oxidation and antioxidant status in patients with angiographically proven coronary artery disease. *Clin Biochem* 2006; 39: 794-803.
35. Erdamar H, Demirci H, Yaman H, Erbil MK, Yakar T, Sancak B, et al. The effect of hypothyroidism, hyperthyroidism, and their treatment on parameters of oxidative stress and antioxidant status. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46:1004-10.
36. Tietz NW. *Clinical Guide to Laboratory Tests*. 2th ed. Philadelphia, PA: WB Saunders, 1990, p. 588-9.
37. Csont T, Bereczki E, Bencsik P, Fodor G, Görbe A, Zvara A, et al. Hypercholesterolemia increases myocardial oxidative and nitrosative stress thereby leading to cardiac dysfunction in apoB-100 transgenic mice. *Cardiovasc Res* 2007; 76: 100-9.
38. Duarte MM, Rocha JB, Moresco RN, Duarte T, Da Cruz IB, Loro VL, et al. Association between ischemia-modified albumin, lipids and inflammation biomarkers in patients with hypercholesterolemia. *Clin Biochem* 2009; 42: 666-71.

Table 1. Baseline characteristics of study participants

	Control	Overt Hypothyroidism
N	20	20
Age (years)	50.25 ± 10.90	48.00 ± 10.81
Male (%)	55	50
Body mass index (Kg/m ²)	21.45 ± 5.97	21.38 ± 3.63
Total cholesterol (mmol/L)	3.75 ± 0.45	7.39 ± 0.61 ^{***}
HDL cholesterol (mmol/L)	1.15 ± 0.27	1.27 ± 0.26
LDL cholesterol (mmol/L)	2.05 ± 0.43	4.9 ± 1.00 ^{***}
Triglycerides (mmol/L)	1.18 ± 0.43	1.53 ± 0.42 [*]
TSH (mIU/L)	1.67 ± 0.35	11.75 ± 2.87 ^{***}
T3 (nmol/L)	1.27 ± 0.23	0.50 ± 0.20 ^{***}
fT4 (pmol/L)	18.70 ± 5.54	13.54 ± 3.61 ^{**}
SOD (U/mg Hb)	0.75 ± 0.12	0.92 ± 0.10 ^{***}
Catalase (U/g Hb)	125.60 ± 21.35	150.70 ± 34.01 [*]
SH (µmol/mL)	1.36 ± 0.39	1.34 ± 0.37
Vitamin E (µmol/L)	9.03 ± 3.10	15.62 ± 2.31 ^{***}
TBARS (nmol MDA/mL)	8.09 ± 1.54	13.49 ± 4.57 ^{***}

Data are expressed as mean ± SD. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Table 2. Correlations of serum TSH, T3 and fT4 with oxidative stress biomarkers in overt hypothyroidism patients before and after controlling for total cholesterol levels.

Biomarkers	TSH				T3				fT4			
	Before		After		Before		After		Before		After	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
SOD (U/mg Hb)	0.5603	<0.001	-0.0097	0.953	-0.5323	<0.001	0.0070	0.966	-0.3072	0.054	-0.0367	0.824
CAT (U/g Hb)	0.3263	0.040	0.1153	0.484	-0.4736	0.002	-0.3996	0.012	-0.1929	0.233	-0.0667	0.687
SH ($\mu\text{mol/mL}$)	0.0883	0.588	0.1584	0.335	-0.0577	0.724	-0.0860	0.603	0.3943	0.012	0.4427	0.005
Vitamin E ($\mu\text{mol/L}$)	0.6982	<0.001	0.1026	0.534	-0.6497	<0.001	-0.0497	0.764	-0.4606	0.003	-0.2214	0.176
TBARS (nmol MDA/mL)	0.5052	0.010	-0.1128	0.494	-0.4607	0.003	0.1371	0.405	-0.3242	0.041	-0.0713	0.666

p<0.05 was considered statistically significant.

4. DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliamos o perfil lipídico e de estresse oxidativo em pacientes com hipotireoidismo clínico. Nossos resultados demonstraram um aumento nos níveis do hormônio TSH e diminuição dos níveis de T3 e T4, comprovando o diagnóstico de hipotireoidismo clínico.

O hipotireoidismo clínico está associado a alterações no metabolismo lipídico e elevação dos parâmetros lipídicos séricos. A hipercolesterolemia secundária a disfunção endócrina, frequentemente observada no hipotireoidismo, resulta da diminuição do catabolismo de lipoproteínas, um fenômeno que pode ser explicado pela diminuída expressão de receptores para as lipoproteínas (MAYER et al., 2006). Os resultados deste estudo mostraram alterações do metabolismo lipídico no grupo hipotireóideo, com elevações dos níveis séricos de colesterol total, colesterol LDL e dos triglicerídeos.

Muitos estudos têm demonstrado estes mesmos achados em pacientes com hipotireoidismo (WISEMAN et al., 1993; LEE et al., 2004). A alta prevalência de aterosclerose em pacientes com hipotireoidismo, pode ter origem a partir de inúmeros fatores de risco cardiovasculares, dentre eles a hipercolesterolemia (CHICHE et al., 2009). Existe um consenso que a hipercolesterolemia e consequentemente a aterosclerose representa um estado de estresse oxidativo aumentado caracterizado por uma oxidação de lipídios e de proteínas na parede vascular (SKILTON et al., 2007).

A peroxidação lipídica está aumentada na hiperlipidemia, um importante achado bioquímico no hipotireoidismo. Além das alterações nas estruturas lipídicas, a lipoperoxidação facilita a ocorrência de alterações estruturais e funcionais de proteínas e promove a geração de radicais livres (NANDA, et al., 2008). Neste estudo, verificamos elevada peroxidação lipídica, determinada pelos níveis de TBARS, nos pacientes hipotireóideos. Estes resultados estão de acordo com recentes estudos, os quais demonstraram elevação na peroxidação lipídica e sua associação com a hiperlipidemia, no hipotireoidismo (NANDA et al., 2007; TORUN et al., 2009).

Entretanto, o sistema celular possui eficientes sistemas enzimáticos e não-enzimáticos para combater as EROs e assim, proteger as células dos efeitos nocivos destas espécies. Entre as defesas enzimáticas celulares a enzima SOD, catalisa a dismutação dos radicais superóxido para peróxido de hidrogênio, que por sua vez sofre redução catalisada pela enzima CAT (DAS, et al., 2004).

Nossos resultados demonstraram um aumento na atividade de ambas as enzimas nos pacientes com hipotireoidismo. Estes resultados sugerem a indução da SOD e da CAT como mecanismos de defesa celulares, no estado hipometabólico, como tentativa de minimizar a geração de radicais livres e a elevada oxidação lipídica observada nestes pacientes. Contudo, estudos prévios têm sugerido uma depleção das enzimas antioxidantes ou a não ocorrência de alterações no sistema antioxidante enzimático no estado hipotireóideo (NANDA et al., 2007; TORUN et al., 2009).

Neste estudo a vitamina E, cuja função é a proteção tecidual contra as reações oxidativas também foi estudada. A função antioxidante da Vit E está bem estabelecida. A vitamina E é um eficiente antioxidante lipossolúvel presente nas células (PRYOR, 2000). Sua principal função antioxidante é a proteção contra a lipoperoxidação (VALKO et al., 2006). Nossos resultados demonstraram um aumento dos níveis da Vit E nos pacientes com hipotireoidismo. Segundo Erdamar e colaboradores (2008), a concentração de vitamina E foi significativamente mais alta em pacientes com hipotireodismo clínico, quando comparados com os controles.

Entretanto, a Vit E tratando-se de uma vitamina lipossolúvel se correlaciona diretamente com os níveis de lipídeos e de lipoproteínas (TIETZ, 1990). Assim, não podemos inferir que os elevados níveis de Vit E observados no grupo hipotireóideo representem um mecanismo antioxidante contra o estresse oxidativo, uma vez que estes pacientes apresentavam elevação nos parâmetros lipídicos o que consequentemente pode causar elevação desta vitamina.

Observou-se uma significativa correlação entre TSH e os biomarcadores de estresse oxidativo TBARS, SOD, CAT, e Vit E. O TSH tem sido recentemente apontado como promotor de estresse oxidativo (ERDAMAR et al., 2008). Além disso, demonstramos correlações negativas entre o T3 e os marcadores de estresse oxidativo TBARS, SOD, CAT e Vit E. O hormônio T4 demonstrou associação com TBARS, SH e Vit E. Estes resultados sugerem a influência dos níveis hormonais no desenvolvimento de estresse oxidativo.

Entretanto, a fim de verificarmos a influência do colesterol na associação hipotireoidismo e estresse oxidativo, as correlações foram realizadas controlando-se os níveis de colesterol total. Após o controle dos níveis de colesterol, apenas as associações entre T3 e CAT e T4 e SH permaneceram significativas. Estes resultados apontam a forte influência dos níveis de colesterol na modulação do sistema antioxidante e na geração de EROs em pacientes com hipotireoidismo. Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos por NANDA et al (2008), onde após a nulificação de fatores de risco lipídicos para aterosclerose a associação entre TSH e peroxidação lipídica, medida pelos níveis de malondialdeído, foi perdida.

Os hormônios tireoideanos afetam a síntese e a degradação de antioxidantes, vitaminas e enzimas (TORUN et al., 2009). A produção diminuída de T3 e T4 no hipotireoidismo parece afetar o sistema antioxidante, modulando a atividade da enzima catalase, uma das principais e primeiras linhas de defesa do organismo contra o radical livre, peróxido de hidrogênio. Além disso, a relação do hormônio T4 com os SH, reforça esta afirmação, da influência hormonal sobre os níveis de antioxidantes. O mais abundante tiol não-protéico identificado é a GSH, importante na manutenção dos tióis protéicos na forma reduzida. Além disso, atua como na detoxificação de substâncias tóxicas e como antioxidante reagindo com EROs e radicais livres (HULTBERG & HULTBERG, 2006).

Entretanto, as correlações observadas entre os hormônios tireoideanos e o sistema antioxidante, não significam necessariamente relações de causa-efeito. O estresse oxidativo resulta de um processo complexo caracterizado pelo status pró-oxidante (CHOUDHURY et al., 2003) e outras condições não necessariamente associadas ao hipotireoidismo podem ter influência no significado destas correlações.

Em resumo, o hipotireoidismo clínico mostrou-se associado ao estresse oxidativo e a hipercolesterolemia. A hipercolesterolemia representou um fator de forte impacto na modulação dos biomarcadores de estresse oxidativo no hipotireoidismo, enquanto que os hormônios tireoideanos tiveram uma menor influência no desenvolvimento de estresse oxidativo no status hipotireóideo.

5. CONCLUSÕES

- O hipotireoidismo clínico está associado ao aumento dos biomarcadores de estresse oxidativo, representado pela elevada lipoperoxidação e indução das enzimas antioxidantes como mecanismo de defesa contra a geração de radicais livres e danos às estruturas lipídicas;
- O hipotireoidismo clínico está associado à hipercolesterolemia, fator reconhecido por promover estresse oxidativo e que apresentou forte impacto na modulação dos biomarcadores de estresse oxidativo nos pacientes.
- Os hormônios tireoideanos apresentam pouca influência no desenvolvimento de estresse oxidativo no hipotireoidismo, relacionando-se apenas com a atividade da catalase e os níveis de tióis não-protéicos.
- A associação entre hipotireoidismo e estresse oxidativo apresenta forte influência dos níveis de colesterol, demonstrando a importância do monitoramento de marcadores lipídicos nos pacientes com hipotireoidismo clínico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-TONSI, A.A.; ABDEL-GAYOUM, A.A.; SAAD, M. The secondary dyslipidemia and deranged serum phosphate concentration in thyroid disorders. **Experimental Molecular Pathology**, v. 76, n.2, p. 182-187, 2004.

BAG, A.; BAG, N. Target sequence polymorphism of human manganese superoxide dismutase gene and its association with cancer risk: a review. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 17, n. 12, p. 3298-3305, 2008.

BECERRA, A.; BELLIDO, D.; LUENGO, A.; PIÉDROLA, G.; DE LUIS, D.A. Lipoprotein (a) and other lipoproteins in hypothyroid patients before and after thyroid replacement therapy. **Clinical Nutrition**, v. 18, n.5, p. 319-322, 1999.

BERTI, J.A.; AMARAL, M.E. BOSCHERO, A.C.; NUNES, V.S.; HARAD, L.M.; CASTILHO, L.N.; OLIVEIRA, H.C. Thyroid Hormone Increases Plasma Cholesteryl Ester Transfer Protein Activity and Plasma High-Density Lipoprotein Removal Rate in Transgenic Mice. **Metabolism**, v. 50, n.5, p. 530-536, 2001.

BIONDI, B.; KLEIN, I. Hypothyroidism as a Risk Factor for Cardiovascular Disease. **Endocrine**, v. 245, n. 1, p. 1-13, 2004.

CARR, A.C.; ZHU, B.Z.; FREI, B. Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha-tocopherol (vitamin E). **Circulation Research**, v. 87, n. 5, p. 349-354, 2000.

CESENAF. H.Y.; XAVIER, H.T.; LUZ, P. Terapia hipolipemiante em situações especiais – hipotireoidismo e hepatopatias. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 85, n.5 p.28-33, 2005.

CHICHE, F.; JUBLAN, C. C.; COUDERT, M.; CARREAU, V; KAHN, J.F.; BRUCKERT, E. Hypothyroidism is not associated with increased carotid atherosclerosis when cardiovascular risk factors are accounted for in hyperlipidemic patients. **Atherosclerosis**, v. 203, n.1, p. 269-276, 2009.

CHOUDHURY, S.; CHAINY, G.B.; MISHRO, M.M. Experimentally induced hypo- and hyper-thyroidism influence on the antioxidant defence system in adult rat testis. **Andrologia**, n. 35, v.3, p. 131-140, 2003.

CHAN, A. C. Partners in defense, vitamin E and vitamin C. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 71, n. 9, p. 725-731, 1993.

DAGRE, A.G.; LEKAKIS, J.P.; PROTOGEROU, A.D.; DOURIDAS G.N PAPAIOANNOU, TG.; TRYFONOPOULOS, D.J.; PAPAMICHAEL, C.M.; ALEVIZAKI, M. Abnormal endothelial function in female patients with hypothyroidism and borderline thyroid function. **International Journal of Cardiology**, v.144, n. 3, p. 332-338, 2007.

DAS, K.; CHAINY, G.B. Modulation of rat liver mitochondrial antioxidant defence system by thyroid hormone. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1537, n. 1, p. 1-13, 2001.

DAS, K.; CHAINY, G.B. Thyroid hormone influences antioxidant defense system in adult rat brain. **Neurochemical Research**,v.29,n.9,p.1755-1766, 2004.

D'AUTRÉAUX, B.; TOLEDANO, M.B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. **Nature reviews Molecular cell biology**, n. 10, p. 813-824, 2007.

DELANTY, N.; REILLY, M.P.; PRATICO, D.; LAWSON, J.A.; MCCARTHY, J.F.; WOOD, A.E.; OHNISHI, S.T.; FITZGERALD, D.J.; FITZGERALD, G.A. 8-epi PGF₂a generation during coronary reperfusion. A potential quantitative marker of oxidant stress in vivo. **Circulation**, v. 95, n.11, p. 2492-2499, 1997.

DOUGLAS, C. R. Tratado de Fisiologia aplicada à Ciência da Saúde. In: DOUGLAS, C.R. **Fisiologia da Glândula Tireóide**. 4 ed. São Paulo: Robe, 1999, p.1044-1054.

DUARTE, M.M.; LORO, V.L.; ROCHA, J.B.; LEAL, D.B.; BEM, A.F.; DORNELES, A., MORSCH V. M.; SCHETINGER, M.R. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides of patients with hypercholesterolemia and inflammatory process. **The FEBS Journal**, v. 274, n. 11, p.2707-2714, 2007.

DUNTAS, L.H. Thyroid Disease and Lipids. **Thyroid**, v. 12, n.4, p. 287-293, 2002.

DHALLA, N.S.; ELMOSELHI, A.B.; HATAC, T.; MAKINO, N. Status of myocardial antioxidants in ischemia–reperfusion injury. **Cardiovascular Research**, v. 47, p. 446–456, 2000.

ERDAMAR, H.; DEMIRCI, H.; YAMAN, H.; ERBIL, M.K.; YAKAR, T.; SANCAK, B.; ELBEG,S.;BIBEROĞLU, G.; YETKIN, I.The effect of hypothyroidism, hyperthyroidism, and their treatment on parameters of oxidative stress and antioxidant status. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 46, n, 7, p. 1004-1010, 2008.

GREENSPAN, F.S.; STREWLER, G.J. Basic & clinical endocrinology. In: GREENSPAN, F.S. **The Thyroid Gland**. 5 ed. Stamford Appleton & Lange, 1997, p-193-259.

GUL, M.; KUTAY, F. Z.; TEMOCIN, S.; HAANNINEN, O. Cellular and Clinical implications of glutathione. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 38, p. 625-634, 2000.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Tratado de Fisiologia Médica. In: _____. **Os Hormônios Metabólicos da Tireóide**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, p. 802-811.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Textbook of medical physiology. In: _____. **Thyroid Metabolic Hormones**. 11 ed. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Saunders, 2006, p. 931-939.

HARRIS, A.; DEVARAJ, S.; JIALAL, I. Oxidative stress, alpha-tocopherol therapy, and atherosclerosis. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 4, p. 373-80, 2002.

HULTBERG, M.; HULTBERG, B. Glutathione turnover in human cell lines in the presence of agents with glutathione influencing potential with and without acivicin inhibition of gamma-glutamyltranspeptidase. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1726, n. 1, p. 42-47, 2005.

HULTBERG, M.; HULTBERG, B. The effect of different antioxidants on glutathione turnover in human cell lines and their interaction with hydrogen peroxide. **Chemico Biological Alterations**, v. 163, n. 3, p.192-198, 2006.

JUNG, C.H.; RHEE, E.J, SHIN, H.S.; JO, SK.; WON, J.C.; PARK, C.Y.; KIM, B.J.; Sung, K.C.; Kim, B.S.; Lee, W.Y.; Oh ,K.W.; Kang, J.H.; Park, S.W.; Lee, M.H.; Kim, S.W. Higher serum free thyroxine levels are associated with coronary artery disease. **Endocrine Journal**, v. 55, n. 5, p. 819-826, 2008.

KIRKMAN, H.N.; GAETANI G.F. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 32, n. 1, p. 44-50, 2007.

KUMARI, S.S.; MENON, V.P. Changes in concentrations of lipid peroxides and activities of superoxide dismutase and catalase in isoproterenol induced myocardial infarction in rats. **Indian Journal Experimental Biology**, v. 25, p. 419-423, 1987.

LAFRANCHI S. Thyroid hormone in hypopituitarism, Graves' disease, congenital hypothyroidism, and maternal thyroid disease during pregnancy. **Growth Hormone & IGF Research**, v. 16, p. s 20-24, 2006.

LANDIS, G.N.; TOWER J. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. **Mechanisms of ageing and development**, v. 126, n. 3, p. 365-379, 2005.

LEE, W.Y.; SUH, J.Y.; RHEE, E.J.; PARK, J.S.; SUNG, K.C.; KIM, S.W. Plasma CRP, apolipoprotein A-1, apolipoprotein B and Lpa levels according to thyroid function status. **Archives Medical Research**, v. 35, n. 6, p. 540-545, 2004.

LIEBLER, D.C. The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. **Critical Reviews Toxicology**, v. 23, p. 147-169, 1993.

LIMÓN-PACHECO, J.; GONSEBATT M.E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation research**, v. 674, n. 1-2, p. 137-147, 2009.

MANTHA, S.V.; KALRA, J.; PRASAD, K. Effects of probucol on hypercholesterolemia-induced changes in antioxidant enzymes. **Life Sciences**, v. 58, n. 6, p. 503-509, 1996.

MAYER, O JR.; SIMON, J.; FILIPOVSKÝ, J.; PLÁSKOVÁ, M.; PIKNER, R. Hypothyroidism in coronary heart disease and its relation to selected risk factors. **Vascular Health Risk Management**, v. 2, n.4, p. 499-506, 2006.

McGEOWN, J.G. Physiology. In: _____. **Endocrine physiology**. 2 ed. Philadelphia:Churchill Livingstone, 2002, 207-211.

MESSARAH, M.; BOULAKOUD, M.S.; BOUMENDJEL, A.; ABDENNOUR, C.; EL FEKI, A. The impact of thyroid activity variations on some oxidizing-stress parameters in rats. **Comptes rendus biologies**, v. 330, n. 2, p. 107-112, 2007.

MEUWESE, M.C.; STROES, E.S.; HAZEN, S.L.; VAN MIERT, J.N.; KUIVENHOVEN, J.A.; SCHAUB, R.G.; WAREHAM, N.J.; LUBEN, R.; KASTELEIN, J.J.; KHAW, K.T.; BOEKHOLDT, S.M. Serum Myeloperoxidase Levels Are Associated With the Future Risk of Coronary Artery Disease in Apparently Healthy Individuals. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 50, n. 2, p. 159-165, 2007.

MORRIS, M.S.; BOSTOM, A.G.; JACQUES, P.F.; SELHUB, J.; ROSENBERG, I.H. Hyperhomocysteinemia and hypercholesterolemia associated with hypothyroidism in the third US National Health and Nutrition Examination Survey. **Atherosclerosis**, v.155, n. 1, p. 195-200, 2001.

MOSCA, L.; RUBENFIRE, M.; MANDEL, C.; ROCK, C.; TARSHIS, T.; TSAI, A.; PEARSON, T. Antioxidant nutrient supplementation reduces the susceptibility of low density lipoprotein to oxidation in patients with coronary artery disease. **Journal of American College of Cardiology**, v.30, n.2, p. 392-9, 1997.

MOZAFFARIEH, M.; GRIESHABER, M.C.; ORGÜL, S.; FLAMMER, J. The potential value of natural antioxidative treatment in glaucoma. **Survey of Ophthalmology**, v. 53, n. 5, p. 479-505, 2008.

NANDA, N.; BOBBY, Z.; HAMIDE, A. Association of thyroid stimulating hormone and coronary lipid risk factors with lipid peroxidation in hypothyroidism.. **Clinical chemistry and laboratory medicine**. v. 46, n. 5, p.674-679, 2008.

NANDA, N.; BOBBY, Z.; HAMIDE, A.; KONER, B.C, SRIDHAR, M.G. Association between oxidative stress and coronary lipid risk factors in hypothyroid women is independent of body mass index. **Metabolism**, v. 56, n. 10, p. 1350-1355, 2007.

NELSON, S.K.; BOSE, S.K.; GRUNWALD, G.K.; MYHILL, P.; MCCORD, J.M. T. The induction of human superoxide dismutase and catalase in vivo: a fundamentally new

approach to antioxidant therapy. **Free radical biology and medicine**, v. 40, n. 2, p. 341-347, 2006.

NOGUEIRA, C.R. Hipotireoidismo. Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. **Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina**, p.4-6, 2005.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n.11, p.1287-1312, 2001.

NUSSEY, S.S; WHITEHEAD, S.A. Endocrinology: an integrated approach. In:_____. **The thyroid gland**. BIOS Scientific Publishers, 2001.

OGATA, M.; WANG D.H.; OGINO K. Mammalian acatalasemia: the perspectives of bioinformatics and genetic toxicology. **Acta Medica Okayama**, v. 62, n. 6, p. 345-361, 2008.

PASTORE, A.; FEDERICI, G.; BERTINI, E.; PIEMONTE, F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clinica Chimica Acta**, v. 333, n. 1, p. 19-39, 2003.

PRASAD, K., KALRA, J. Oxygen free radicals and hypercholesterolemic atherosclerosis. **American Heart Journal**, v. 125, n. 4, p. 958-971, 1993.

PRYOR, W. A. Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, n. 1, p. 141–164, 2000.

PUTNAM, C.D.; ARVAI A.S.; BOURNE Y.; TAINER J.A. Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. **Journal of Molecular Biology**, v. 296, n. 1, p. 295-309, 2000.

RADWAŃSKA-WALA, B.; BUSZMAN, E.; DRUZBA, D. Reactive oxygen species in pathogenesis of central nervous system diseases. **Wiadomości Lekarskie**, v.61, n. 1-3, p. 67-73, 2008.

ROMALDINI, J. H.; SGARBI, J.A.; FARAH, C.S. Disfunções Mínimas da Tiróide: Hipotireoidismo Subclínico e Hipertireoidismo Subclínico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 48, n. 1, 2004.

ROSENBLAT, M.; VOLKOVA, N.; COLEMAN, R.; AVIRAM, M. Anti-oxidant and anti-atherogenic properties of liposomal glutathione: studies in vitro, and in the atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. **Atherosclerosis**, v. 195, n. 2, p. 61-68, 2007.

RHOADES, R. A.; TANNER, G.A. Fisiologia Médica. In: CONSIDINE, R.V. **A Glândula Tireóide**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, p. 583-593.

SCHNITZER, E.; PINCHUK, I.; BOR, A.; LEIKIN-FRENKEL, A.; LICHTENBERG, D. Oxidation of liposomal cholesterol and its effect on phospholipid peroxidation. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 146, n. 1, p. 43-53, 2007.

SENTHIL, S.; VEERAPPAN R.M.; RAMAKRISHNA RAO M.; PUGALENDI K.V. Oxidative stress and antioxidants in patients with cardiogenic shock complicating acute myocardial infarction. **Clinica Chimica Acta**, v. 348, n. 1-2, p. 131-137, 2004.

SERDAR, Z.; ASLAN, K.; DIRICAN, M.; SARANDÖL, E.; YEŞILBURSA, D.; SERDAR A. Lipid and protein oxidation and antioxidant status in patients with angiographically proven coronary artery disease. **Clinical Biochemistry**, v. 39, n.8, p. 794-803, 2006.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v. 82, n. 2, p. 291-295, 1997.

SPOSITO, A.C.; CARAMELLI, B.; FONSECA, F.A.H.; BERTOLAMI, M.C. IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88, p.2-18, 2007.

STAMLER, J. S.; SLIKVA, A. Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular-related disease. **Nutrition Reviews**, v. 54, p. 1-30, 1996.

SUBUDHI, U.; DAS K.; PAITA, L B.; BHANJA, S.; CHAINY, GB. Supplementation of curcumin and vitamin E enhances oxidative stress, but restores hepatic histoarchitecture in hypothyroid rats. **Life Sciences**, v. 84, n. 11-12, p. 372- 379, 2009.

TAGAMI, T.; TAMANAHA, T.; SHIMAZU, S.; HONDA, K.; NANBA, K.; NOMURA, H.; SAKANE, U. Y.; USUI, T.; SHIMATSU, A.; NARUSE, M. Lipid Profiles in the Untreated Patients with Hashimoto Thyroiditis and the Effects of Thyroxine Treatment on Subclinical Hypothyroidism with Hashimoto Thyroiditis. **Endocrine Journal**, 2009.

TIETZ, N. W. Clinical Guide to Laboratory Tests. 2th ed. Philadelphia, PA: WB Saunders, 1990, p. 588-589.

TORUN, A.N.; KULAKSIZOGLU, S.; KULAKSIZOGLU, M.; PAMUK, B.O.; ISBILEN, E.; TUTUNCU, N.B. Serum total antioxidant status and lipid peroxidation marker malondialdehyde levels in overt and subclinical hypothyroidism. **Clinical Endocrinology**, v. 70, n.3, p.469-474,2009.

VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.;MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer.**Chemico Biological Interactions.**, v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.

VENDITTI, P.; DI MEO, S. Thyroid hormone-induced oxidative stress. **Cellular and Molecular Life Sciences**,v. 63, n. 4, p. 414-434, 2006.

WILLIAMS, R. H. Textbook of endocrinology. In: LARSEN, P.R.; DAVIES, T.F.; HAY, I.D. **The thyroid gland**. 5 ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1974.

WISEMAN, S.A.; POWELL, J.T.; HUMPHRIES, S.E.; PRESS, M. The magnitude of the hypercholesterolemia of hypothyroidism is associated with variation in the low density lipoprotein receptor gene. **Journal Clinical Endocrinology and Metabology**, v. 77, n. 1 p. 108-112, 1993.

YANG, R.L.; SHI, Y.H.; HAO, G.; LI, W.; LE, G.W. Increasing Oxidative Stress with Progressive Hyperlipidemia in Human: Relation between Malondialdehyde and Atherogenic Index. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 43, n. 3, p. 154-158, 2008.

YAO H.T, CHANG Y.W, CHEN C.T, CHIANG M.T, CHANG L, YEH T.K. Shengmai San reduces hepatic lipids and lipid peroxidation in rats fed on a high-cholesterol diet. **Journal of Ethnopharmacology**,v. 116, n. 1, p.49-57, 2008.

YEN, P. M. Physiological and Molecular Basis of Thyroid Hormone Action. **Physiological Reviews**, v. 81, n.3, 2001.



YIM M.; BCHOCK P.B.; STADTMAN, E.R. Copper, zinc superoxide dismutase catalyzes hydroxyl radical production from hydrogen peroxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 13, p. 5006-5010, 1990

ZELKO I.N.; MARIANI T.J.; FOLZ R.J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 3, p. 337-349, 2002.

ZOU, Y.; LU, Y.; WEI, D. Hypocholesterolemic effects of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. in rats fed a cholesterol-rich diet. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, p. 2462-2466, 2005.

7. ANEXOS

7.1 ANEXO I: Carta de aprovação do Comitê de Ética

	<p>MINISTÉRIO DA SAÚDE Conselho Nacional de Saúde Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)</p>	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa Comitê de Ética em Pesquisa - CEP- UFSM REGISTRO CONEP: 243</p>	
---	--	---	---

CARTA DE APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa – UFSM, reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – (CONEP/MS) analisou o protocolo de pesquisa:

Título: Alterações bioquímicas e estresse oxidativo associados ao hipotireoidismo.

Número do processo: 23081.016996/2008-83

CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética): 0232.0.243.000-08

Pesquisador Responsável: Vânia Lucia Loro

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes estabelecidas na Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê. O pesquisador deve apresentar ao CEP:

Janeiro/2010

Relatório final

Os membros do CEP-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO: 03/12/2008

Santa Maria, 03 de dezembro de 2008.



Lissandra Dal Lago
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa – UFSM
Registro CONEP N. 243.