

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Efeito do tratamento com tiroxina sobre parâmetros do estresse oxidativo em pacientes com hipotireoidismo congênito primário

Dissertação de Mestrado

FRANCIELE CIPRIANI

PORTO ALEGRE, 2009

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Efeito do tratamento com tiroxina sobre parâmetros do estresse oxidativo em pacientes com hipotireoidismo congênito primário

Dissertação apresentada por Franciele  
Cipriani para obtenção do GRAU DE  
MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Profa. Dra. Carmen Regla Vargas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 09.04.2009, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Prof. Dr. Alethea Gatto Barschak  
Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Fernanda Urruth Fontella  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Prof. Dr. Tiana Tasca  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

C577e Cipriani, Franciele

Efeito do tratamento com tiroxina sobre parâmetros do estresse oxidativo em pacientes com hipotireoidismo congênito primário / Franciele Cipriani. – Porto Alegre: UFRGS, 2009. – viii, 61 p.: il..

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Estresse oxidativo. 2. Hipotireoidismo congênito primário. 3. Tiroxina. I. Vargas, Carmen Regla. II. Título.

CDU: 616-074.12

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB10/480

*“Aos meus pais, Juarez e Neusa, pelo apoio incondicional, incentivo, carinho e confiança a mim sempre dedicados”.*

## AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Carmen Regla Vargas pela oportunidade concedida, pela confiança, estímulo e orientação constante.

À Dra. Paula Regla Vargas e ao Dr. Edmundo Kreisner pelo auxílio na obtenção das amostras e das informações dos pacientes que participaram desta pesquisa.

Aos pacientes que participaram deste estudo e aos seus familiares que prontamente se dispuseram a contribuir, meus sinceros votos de que este trabalho possa trazer melhorias futuras.

Aos colegas de pós-graduação Vanusa, Angela, Alethea, Marion, Carlos e Grazi pelo apoio e incentivo sempre prestados.

Às bolsistas de iniciação científica Camila e Giovana pelo comprometimento e dedicação em auxiliar a realização dos experimentos deste trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Análise de Metabólitos do Serviço de Genética Médica do HCPA: Dani, Anderson e Anelise pelo apoio e amizade e espaço cedido para a realização dos experimentos.

Ao Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e a Faculdade de Farmácia que disponibilizaram todos os equipamentos e material necessários para a realização dos experimentos práticos na elaboração da presente dissertação.

Ao CNPq, órgão que financiou a bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Ramon pela paciência e pelo incentivo em todos os momentos importantes.

Às minhas irmãs queridas pelo eterno e incondicional carinho e pela torcida para que meus objetivos fossem alcançados.

A Deus pela proteção e pela vida.

## ABREVIATURAS

CAT – Catalase

ERN – Espécie Reativa do Nitrogênio

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

GSH – Glutathiona Reduzida

GSH-Px – Glutathiona Peroxidase

GSSG - Glutathiona Oxidada

HC – Hipotireoidismo Congênito

HCY – Homocisteína

MDA – Malondialdeido

PNTN – Programa Nacional de Triagem Neonatal

RL – Radical Livre

SNC – Sistema Nervoso Central

SOD – Superóxido dismutase

T<sub>3</sub> – Triiodotironina

T<sub>4</sub>- Tiroxina

TAR – Reatividade Antioxidante Total

## SUMÁRIO

ABREVIATURAS.....	V
RESUMO.....	VII
ABSTRACT .....	VIII
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 OBJETIVOS .....	9
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	10
3 ARTIGO SUBMETIDO.....	11
4 DISCUSSÃO .....	41
5 CONCLUSÃO.....	51
6 PERSPECTIVAS .....	54
7 REFERÊNCIAS.....	56

## RESUMO

Os hormônios tiroxina ( $T_4$ ) e triiodotironina ( $T_3$ ) apresentam especial importância para o desenvolvimento e crescimento normal. A deficiente produção destes hormônios ao nascimento leva ao hipotireoidismo congênito (HC), caracterizado por severo retardo mental devido ao atraso no desenvolvimento do Sistema Nervoso Central. Crianças com HC devem iniciar o tratamento com tiroxina assim que o diagnóstico for confirmado. O rastreamento neonatal, portanto, é fundamental para detecção precoce desta doença metabólica que ocorre em cerca de 1 a cada 3.500 a 4.000 nascidos vivos. O estresse oxidativo é resultado do desequilíbrio entre a formação de compostos oxidantes e defesas antioxidantes do organismo levando ao dano potencial. Estudos prévios com modelos animais de hipotireoidismo mostraram uma alteração do *status* antioxidante cerebral associado ao aumento do estresse oxidativo. Considerando que estudos realizados em humanos adultos revelaram envolvimento de radicais livres com a patogênese do hipotireoidismo, o objetivo deste estudo foi avaliar o estresse oxidativo em neonatos com hipotireoidismo congênito primário no momento do diagnóstico e ao longo do tratamento com tiroxina (10-15  $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{d}$ ). Para tanto, foram avaliados os níveis de malondialdeído (MDA) e a reatividade antioxidante total (TAR) em plasma, bem como a medida da atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GSH-Px) nos eritrócitos de neonatos portadores de HC. Foi observado um aumento significativo dos níveis de MDA bem como uma redução da TAR em neonatos portadores de HC quando comparados ao grupo controle. Além disto, foi observada uma redução significativa na atividade enzimática da CAT e da GSH-Px em eritrócitos de recém-nascidos com HC quando comparados ao grupo controle. A atividade enzimática da SOD manteve-se inalterada. Todavia, não foram encontradas diferenças significativas dos parâmetros estudados após o tratamento com tiroxina. Ainda, não foi verificada correlação significativa entre os níveis de TSH e  $T_4$  livre e os parâmetros de estresse oxidativo. Desta forma, presume-se que ocorre estresse oxidativo em neonatos com HC e que o tratamento com tiroxina não é capaz de reverter a lipoperoxidação e a redução das defesas antioxidantes enzimática e não enzimática em neonatos com HC.

Palavras-chaves: Estresse oxidativo, Hipotireoidismo Congênito Primário, Tiroxina.



## ABSTRACT

Thyroxine ( $T_4$ ) and Triiodothyronine ( $T_3$ ) are important for normal growth and development. Insufficient production of these hormones lead to congenital hypothyroidism (CH), characterized by severe mental retardation due to delay of the central nervous system maturation. CH infants must start treatment with thyroxine replacement as soon as diagnosed. Neonatal screening program is, therefore, essential to early identification of this disease with an incidence of 1 in 3500 - 4000 newborns. Oxidative stress is a disturbance in the prooxidant-antioxidant balance in favor of the former, leading to potential damage. Previous studies using animal models of hypothyroidism showed an alteration of the cerebral antioxidant status associated with increased oxidative stress. Considering that human studies in adults revealed that oxidative stress may play a role in hypothyroidism pathogenesis, the objective of the present study was to evaluate oxidative stress parameters in neonates with primary CH before and after treatment with thyroxine (to 10-15  $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{d}$ ). We measured malondialdehyde levels (MDA) and total antioxidant reactivity (TAR) in plasma and the enzymatic activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in erythrocytes from CH neonates. It was observed a significant increase of plasma MDA measurement as well as a decrease of total antioxidant reactivity (TAR) when compared to the control group. Furthermore, a significant decrease of erythrocyte CAT and GSH-Px activities were also found in CH patients, in contrast with SOD activity which was normal. However, we did not find significant differences in any of these parameters after CH thyroxine treatment. Also, it wasn't verified any correlation between TSH and free  $T_4$  levels and oxidative stress parameters. Therefore, it is presumed that oxidative stress occurs in neonates with CH and that treatment with thyroxine cannot revert the induced lipoperoxidation and the reduction of enzymatic and non enzymatic antioxidant defenses in neonates with CH.

Key words: oxidative stress, Primary Congenital Hypothyroidism, thyroxine.

## 1 INTRODUÇÃO

---

A glândula da tireóide é responsável pela secreção de dois hormônios importantes para o crescimento e desenvolvimento no período pré e pós-natal: a tiroxina ( $T_4$ ) e a triiodotironina ( $T_3$ ). Secreta também a calcitonina, importante hormônio para metabolismo do cálcio. Para garantir a ação do  $T_3$  e  $T_4$  nas células alvo existe uma regulação retroativa firmemente coordenada entre a tireóide, o hipotálamo e a hipófise. Assim, a biossíntese e a liberação de hormônios da tireóide são controladas pelo hormônio estimulante da tireóide (TSH) secretado pela hipófise anterior. Da mesma forma, a secreção do TSH é regulada pelo hipotálamo por ação do hormônio liberador da tireotrofina (TRH) e pela retroalimentação negativa dos hormônios tireoideanos (HENRY et al., 1999) (Figura 1).

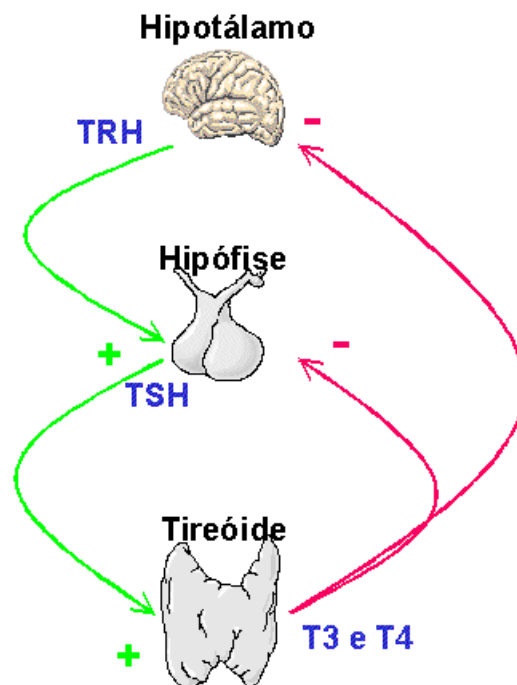


Figura 1: Esquema de regulação da liberação dos hormônios da tireóide (<http://www.endocrinopediatria.com.br/Feed-back.htm> - acesso em 02/03/2009).

O mecanismo de ação da  $T_4$  e da  $T_3$  é intracelular e mediado por receptores nucleares. Ao penetrar na célula a  $T_4$  é convertida em  $T_3$ , através de uma monodesiodinação, que se liga a uma proteína receptora específica associada ao DNA e ativa a síntese de RNA mensageiro e proteínas. A  $T_3$  liga-se a estes receptores com maior afinidade que a  $T_4$ , sendo assim, mais potente em suas ações (BRANCHTEIN e MATOS, 2006). Desta forma, os hormônios da tireóide influenciam

diretamente no metabolismo, crescimento e desenvolvimento de tecidos e órgãos incluindo o Sistema Nervoso Central (SNC) (RANG et al., 2007).

A deficiência na produção dos hormônios tireoidianos ao nascimento leva a uma condição clínica denominada hipotireoidismo congênito. As causas desta disfunção hormonal são múltiplas. Quando a falta de produção de  $T_3$  e  $T_4$  ocorre pelo desenvolvimento anormal da glândula ou falha na síntese e secreção dos hormônios da tireóide define-se Hipotireoidismo Congênito (HC) primário. Menos frequentemente pode ocorrer o hipotireoidismo central, devido a uma disfunção hipofisária (hipotireoidismo congênito secundário), ou hipotalâmica (hipotireoidismo congênito terciário). Condições transitórias de hipotireoidismo congênito também podem acontecer devido à indução de anticorpos maternos, drogas ou deficiência de iodo. Aproximadamente 85% dos casos de hipotireoidismo congênito primário são permanentes e ocorrem devido à alteração na glândula da tireóide (disgenesia) tais como ausência da glândula (agenesia), glândula deslocalizada (ectopia) e glândula reduzida (hipogenesia), ou, ainda, devido a uma falha na síntese ou secreção dos hormônios pela tireóide (disormogênese). Estima-se na literatura internacional que o hipotireoidismo congênito ocorra em cerca de 1 em cada 3500 a 4000 recém-nascidos vivos (EUGSTER et al., 2004; BEARDSALL e OGIVY-STUART, 2004; ROSE e BROWN, 2006; JAIN et al., 2008; KRATZSCH, 2008). Em 2005, a prevalência apresentada pelo Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) foi de 1 em cada 2107 recém-nascidos no Brasil (MEDEIROS-NETO e KNOBEL, 2008). O reconhecimento precoce desta condição clínica é considerado emergência pediátrica entre os recém-nascidos. Os efeitos da falta de  $T_3$  e  $T_4$  na vida fetal e no recém-nascido mantêm a imaturidade do SNC, hipoplasia dos neurônios corticais, atraso na mielinização e, conseqüentemente, do desenvolvimento neuropsicomotor. O crescimento e desenvolvimento infantil também são prejudicados, uma vez que os hormônios da tireóide exercem função direta sobre as células e indireta sobre o hormônio do crescimento. Os sinais clínicos do HC primário nem sempre se apresentam de modo evidente e incluem: icterícia neonatal, hérnia umbilical, hipotermia, entre outros. Por isso, exames laboratoriais e complementares são essenciais para o diagnóstico precoce (SETIAN, 2007; KRATZSCH, 2008).

A triagem neonatal iniciou em 1990 com o Estatuto da Criança e do Adolescente tornando-se a partir de então obrigatória em todo país. Somente com a Portaria nº 22 de 15/01/2001 estabeleceu-se o Programa Nacional de Triagem

Neonatal (PNTN). Desde 2001, este programa desempenha no Brasil importante papel na detecção precoce de doenças metabólicas, entre elas, o hipotireoidismo congênito. A triagem neonatal deve ser realizada no recém-nascido entre o 3º e 6º dia de vida. O teste de triagem para a doença é feito através da coleta de amostra de sangue da região plantar do pé de neonatos em papel filtro para posterior determinação de TSH utilizando-se o sangue seco em cartão (CARVALHO et al., 2007). Bebês com níveis de TSH variáveis entre 5,2 a 20  $\mu\text{U/mL}$  na triagem devem realizar nova coleta de sangue total para repetir a dosagem de TSH e outros parâmetros da função tireoidiana em soro (SETIAN, 2007; CARVALHO et al., 2007; MEDEIROS-NETO e KNOBEL, 2008). O valor de referência para TSH em soro é de 0,35 a 5,5  $\mu\text{UI/mL}$ . As etapas de triagem neonatal incluem: coleta de amostras (3º ao 6º dia de vida); envio da amostra ao laboratório de análise (até 5 dias após a coleta); busca ativa dos pacientes suspeitos para a realização dos exames confirmatórios; consulta de orientação, acompanhamento dos tratamentos e aconselhamento genético ou familiar (MEDEIROS-NETO e KNOBEL, 2008). Considerando-se que ocorrem variações dos níveis de TSH ao nascimento, com elevação nas primeiras horas de vida, preconiza-se que a coleta do teste de triagem seja feita no mínimo após 48 horas de vida do recém-nascido (Figura 2). Outro exame importante para o diagnóstico definitivo do HC primário é a ecografia de tireóide (KREISNER et al., 2003; ROSE e BROWN, 2006; MEDEIROS-NETO e KNOBEL, 2008).

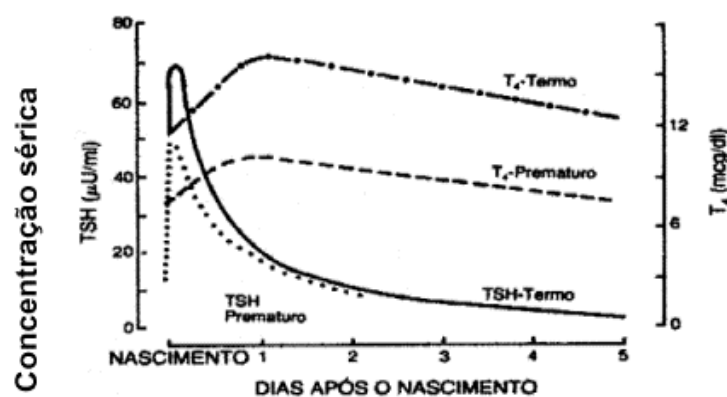


Figura 2: Concentrações séricas de TSH e T<sub>4</sub> em crianças recém-nascidas durante os primeiros 5 dias de vida ( MEDEIROS-NETO e KNOBEL, 2008).

O tratamento realizado precocemente previne o desenvolvimento de retardo mental no recém-nascido com HC, devendo ser iniciado nas primeiras duas

semanas de vida do bebê. A tiroxina via oral é a droga de escolha para o tratamento do HC primário e deve ser administrada uma vez ao dia pela manhã. O tempo de meia vida do fármaco é de sete dias e, portanto, a resposta máxima é atingida na segunda semana de tratamento quando grande parte foi convertida em T<sub>3</sub>. Uma dosagem inicial de 10 – 15 µg/Kg/dia é recomendada e os níveis de T<sub>4</sub> livre e TSH deverão normalizar entre 2 e 4 semanas de tratamento, respectivamente (SETIAN et al., 2007) (Tabela 1). Para adequação da terapia são realizadas dosagens sanguíneas periódicas de T<sub>4</sub> livre e TSH. A avaliação dos pacientes em tratamento é feita a cada 1-2 meses no primeiro ano de vida e a cada 3-4 meses até o terceiro ano de vida. As doses devem ser ajustadas quando houver sinais de superdosagem: irritabilidade, perda de sono, rubor, diarreia, taquicardia e sudorese (SELVA et al., 2002; ROSE e BROWN, 2006; BRANCHTEIN e MATOS, 2006; SETIAN, 2007; KRATZSCH, 2008).

Tabela 1: Doses de tiroxina recomendadas para crianças e adolescentes (SETIAN, 2007).

Idades	Dose (µg/kg/dia)
0 a 3 meses	10 a 15
3 a 12 meses	6 a 10
1 a 3 anos	4 a 6
3 a 10 anos	3 a 5
10 a 16 anos	2 a 4

O termo radical livre (RL) refere-se a um átomo ou uma molécula altamente reativa, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. Devido a esta característica, interagem rapidamente com proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos (HALLIWEL e GUTTERIDGE, 2007). Em nosso organismo são produzidos RL de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio. As mais estudadas são as espécies reativas do oxigênio (ERO) e as espécies reativas de nitrogênio (ERN). Os que ganham grande destaque devido à reatividade e aos danos que podem causar são os radicais derivados do oxigênio como superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) e oxigênio *singlet* (O'<sub>2</sub>) (RAMOS-VASCONCELOS et al., 2000). O termo ERO inclui não somente RL, mas também espécies não radicalares derivadas do oxigênio, como por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) capaz de levar à

formação do radical hidroxila ( $\text{HO}^{\bullet}$ ) (HALLIWEL e CHIRICO, 1993). As ERO e outros RL podem ser produzidos por fontes exógenas ou endógenas. Dentre as fontes exógenas pode-se citar xenobióticos, exposição à radiação, fumo, estresse e administração de alguns medicamentos como paracetamol e doxorrubicina (BOVERIS, 1998). Numa célula, as principais fontes endógenas responsáveis pela geração de ERO são: a redução do oxigênio na mitocôndria, a degradação de ácidos graxos nos peroxissomos, o complexo enzimático citocromo P450, o processo de fagocitose e a atividade combinada da xantina oxidase e xantina desidrogenase, que produzem  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , respectivamente (BECKMAN e AMES, 1998).

O mecanismo pelo qual as ERO lesam as células é bastante complexo. Portanto, compostos que atuam como *scavengers* (sequestradores) e que sejam capazes de diminuir o efeito em cascata causado pelos RL podem tornar-se coadjuvantes importantes no processo de manutenção do equilíbrio celular. Neste sentido, os antioxidantes são compostos que funcionam como bloqueadores dos processos de óxido-redução desencadeados pelos RL (HALLIWEL e GUTTERIDGE, 2007). A célula possui um sistema de defesa que pode atuar em duas linhas: agentes antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. A primeira atua como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão, sendo constituída por, superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona-peroxidase (GSH-Px). A segunda tem a função de prevenir a ocorrência da lesão, sendo constituída pelo ácido ascórbico, glutathiona reduzida (GSH), ácido úrico, carotenos, tocoferóis, entre outros (WENDEL, 1981; FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Em sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre agentes óxido-redutores (como as ERO) e o sistema de defesa antioxidante. Em condições normais, as ERO produzidas numa célula reagem com as defesas antioxidantes enzimáticas e/ou não-enzimáticas. Entretanto, quando ocorre um desequilíbrio entre a formação dos compostos oxidantes e antioxidantes do organismo, estabelece-se uma condição denominada de estresse oxidativo, onde os RL em excesso começam a produzir danos às macromoléculas biológicas como lipídios (lipoperoxidação), proteínas e DNA (BECKMAN e AMES, 1998).

O estresse oxidativo está envolvido com o mecanismo de instalação de diversas doenças, entre elas: diabetes, doença de Parkinson e de Alzheimer, esclerose múltipla, distrofia muscular, catarata e retinopatias, aterosclerose, infarto

do miocárdio, enfisema pulmonar, cirrose hepática e vários tipos de câncer (DRÖGE, 2002). Atualmente, já foi demonstrada a ocorrência de estresse oxidativo em alguns erros inatos do metabolismo intermediário. A geração de radicais livres pode estar relacionada com a disfunção neurológica de algumas acidemias orgânicas, tais como: a propiônica, a metilmalônica (FONTELLA et al., 2000) e a glutárica (KÖLKER et al., 2001; LATINI et al., 2002); em aminoacidopatias, como na Tirosinemia tipo 1 (BIRD et al., 1995); na Doença da Urina do Xarope do Bordo (BRIDI et al., 2003; BARSCHAK et al., 2006); na Homocistinúria (STRECK et al., 2003) e na Adrenoleucodistrofia (VARGAS et al., 2004; DEON et al., 2006). Estudos recentes também demonstraram que na Fenilcetonúria, uma das doenças detectadas na triagem neonatal cujos sintomas incluem retardo mental e déficit neurológico, ocorre estresse oxidativo o que explica, em parte, a fisiopatologia da doença (SIRTORI et al., 2005; SITTA et al., 2009).

Sabe-se que os hormônios da tireóide têm uma importante influência na maturação do Sistema Nervoso Central. Alguns pesquisadores têm investigado a ação dos hormônios da tireóide sobre alguns parâmetros do estresse oxidativo em modelos animais de hipotireoidismo (PASQUINI e ADAMO, 1994; RAHAMAN et al., 2001; CANO-EUROPA et al., 2008). PASQUINI e ADAMO (1994) observaram que os hormônios T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> têm efeitos na diferenciação de vários tipos de células no cérebro e cerebelo de ratos submetidos ao modelo experimental de hipotireoidismo, assim como no processo de mielinização. Estes autores sugerem que isto possa ser devido ao dano produzido pelo estresse oxidativo gerado por um excesso de hormônios tireoideos. RAHAMAN e colaboradores (2001) verificaram aumento da lipoperoxidação e da atividade das enzimas SOD e CAT, bem como diminuição da GSH em cérebro de ratos submetidos ao modelo de hipotireoidismo durante as primeiras quatro semanas de desenvolvimento pós-natal. As alterações bioquímicas encontradas no cérebro de ratos hipotireoideos foram comparáveis àquelas vistas em várias doenças neurológicas. Mais recentemente, CANO-EUROPA e colaboradores (2008) demonstraram que ratos adultos submetidos ao modelo experimental de hipotireoidismo apresentaram aumento da peroxidação lipídica e geração de espécies reativas de oxigênio em diferentes regiões cerebrais. Por outro lado, estudos em humanos também reforçam a hipótese da geração de radicais livres em pacientes com hipotireoidismo (RESCH et al., 2002; DUNTAS, 2005; BASKOL et al., 2007; CARMELI et al. 2008; ERDAMAR et al., 2008; NANDA et al.



2008; TORUN et al., 2009). RESCH e colaboradores (2002) investigaram o *status* antioxidante na disfunção tireoidiana em pacientes e verificaram que a hipofunção da tireóide está associada com aumento do estresse oxidativo envolvendo antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Ainda, DUNTAS (2005) propôs que tanto o hipertireoidismo quanto o hipotireoidismo têm sido associados ao aumento da produção de espécies reativas do oxigênio, assim como estão relacionados à resposta inflamatória e miopatia. Mais recentemente, CARMELI e colaboradores (2008) confirmaram a hipótese da redução das defesas antioxidantes em pacientes com hipotireoidismo. Outros estudos verificaram que pacientes com hipotireoidismo apresentaram aumento da lipoperoxidação e redução da reatividade antioxidante total (BASKOL et al., 2007; NANDA et al. 2008; ERDAMAR et al., 2008; TORUN et al., 2009).

Existem poucas referências na literatura científica que descrevem o estresse oxidativo gerado pela disfunção tireoidiana em neonatos, bem como o efeito do tratamento com tiroxina sobre o estresse oxidativo nestes pacientes. Considerando, portanto, uma possível associação entre a disfunção tireoidiana e a produção de radicais livres, o objetivo geral deste trabalho foi investigar o efeito do tratamento com T<sub>4</sub> sobre parâmetros do estresse oxidativo em neonatos com HC primário. Para tanto, foram avaliados os níveis de malondialdeído (MDA) e a reatividade antioxidante total (TAR) em plasma, bem como a medida da atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GSH-Px) nos eritrócitos de neonatos portadores de HC tratados e não tratados com tiroxina e de indivíduos saudáveis da mesma idade dos pacientes em estudo (controles). Além disto, foi feita a correlação dos níveis séricos do hormônio TSH no soro dos pacientes com HC tratados e não tratados com tiroxina com os diferentes parâmetros de estresse oxidativo.

## **2 OBJETIVOS**

---

## 2.1. Objetivo geral:

O objetivo geral deste projeto foi avaliar o efeito do tratamento com tiroxina ( $T_4$ ) sobre parâmetros de estresse oxidativo em pacientes portadores de hipotireoidismo congênito primário diagnosticados na fase neonatal.

## 2.2. Objetivos específicos:

2.2.1. Avaliar o estresse oxidativo em pacientes portadores de hipotireoidismo congênito primário no momento do diagnóstico através de vários parâmetros, como:

- a) Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA) em plasma;
- b) Determinação da reatividade antioxidante total (TAR) em plasma;
- c) Medidas das atividades enzimáticas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) em eritrócitos.

2.2.2. Avaliar o estresse oxidativo em pacientes portadores de hipotireoidismo congênito primário ao longo do tratamento preconizado para esta doença através de vários parâmetros, como:

- a) Determinação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (MDA) em plasma;
- b) Determinação da reatividade antioxidante total (TAR) em plasma;
- c) Medidas das atividades enzimáticas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) em eritrócitos.

2.2.3. Correlacionar os níveis séricos do hormônio TSH e  $T_4$  livre no soro dos pacientes com HC tratados e não tratados com os diferentes parâmetros de estresse oxidativo.

**3 ARTIGO SUBMETIDO**

**NEONATAL SCREENING OF CONGENITAL HIPOTHYROIDISM: OXIDATIVE  
STRESS EVALUATION BEFORE AND AFTER TREATMENT**

Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes

Manuscript ID: ECED-03-2009-0086-Endocrinology-Art

Data Submetida: 11/03/2009

---

# Neonatal Screening of Congenital Hypothyroidism: Oxidative Stress Evaluation Before and After Treatment

Franciele Cipriani<sup>1</sup>, Angela Sitta<sup>2,3</sup>, Vanusa Manfredini<sup>1</sup>, Camila Simioni Vanzin<sup>1,2</sup>, Giovana Brondani Biancini<sup>1,2</sup>, Edmundo Kreisner<sup>4</sup>, Paula Regla Vargas<sup>4</sup>, Moacir Wajner<sup>2,3</sup>, Carmen Regla Vargas<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>2</sup>Serviço de Genética Médica, HCPA, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:Bioquímica, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>4</sup>Hospital Materno Infantil Presidente Vargas, PMPA, Porto Alegre, RS, Brasil

**Corresponding author:**

Carmen Regla Vargas  
Serviço de Genética Médica, HCPA  
Rua Ramiro Barcelos, 2350  
CEP 90.035-903  
Porto Alegre, RS, Brazil  
Tel +55 51 21018011; fax: +55 51 2101 8010  
E-mail address: crvargas@hcpa.ufrgs.br

## **Abstract**

Thyroxine ( $T_4$ ) and Triiodothyronine ( $T_3$ ) are important for normal growth and development. Insufficient production of these hormones at birth lead to congenital hypothyroidism (CH), characterized by severe mental retardation due to delay of the central nervous system maturation. CH infants must start treatment with thyroxine replacement as soon as diagnosed. Previous studies using animal models of hypothyroidism showed an alteration of the cerebral antioxidant status associated with increased oxidative stress. Considering that few human studies revealed that oxidative stress may play a role in hypothyroidism pathogenesis, the objective of the present study was to evaluate oxidative stress parameters in neonates with primary CH before and after treatment with thyroxine (10-15  $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{d}$ ). We measured malondialdehyde levels (MDA) and total antioxidant reactivity (TAR) in plasma, and the enzymatic activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in erythrocytes from CH neonates. It was observed a significant increase of plasma MDA measurement as well as a decrease of total antioxidant reactivity (TAR) when compared to the control group. Furthermore, a significant decrease of erythrocyte CAT and GSH-Px activities were also found in CH patients, in contrast with SOD activity which was normal. However, we did not find significant differences in any of these parameters after CH thyroxine treatment. Therefore, it is presumed that oxidative stress occurs in neonates with CH and that the treatment with thyroxine was not capable to revert the lipoperoxidation and the reduction of enzymatic and non enzymatic antioxidant defenses in these patients.

**Key-Words:** Congenital Hypothyroidism, Thyroxine, Oxidative Stress, Thyroxine treatment

## Introduction

Congenital hypothyroidism (CH) is a very frequent hormonal disorder characterized by low or absent levels of thyroxine ( $T_4$ ) and triiodothyronine ( $T_3$ ). Abnormal developmental of the thyroid gland (thyroid dysgenesis) represents about 85% of the cases and may be due to total agenesis of gland, ectopic thyroid or thyroid hypoplasia. This range of etiologies leads to a wide spectrum of clinical presentations that differs on time of presentation. However, symptoms of hypothyroidism are often mild or absent during the first weeks after birth, and this is why it is critical to screen newborns for CH to avoid mental retardation. Neonatal screening programs, therefore, are very important to the early diagnosis of this metabolic disease which occurs at a rate of 1 out of every 3,500 to 4,000 birth (Jain et al., 2008; Kratzsch, 2008; Carvalho et al., 2007; Rose et al., 2006; Beardsall and Ogivy-Stuart, 2004; Eugster et al., 2004). This disease is detected by high TSH levels in dried blood spot. Ultrasound imaging and clinical evaluation are performed to establish the definitive diagnosis of CH (Carvalho et al. 2007; Kreisner et al., 2003).

Thyroid hormones are very important for energy metabolism including nutrients and inorganic ions, thermogenesis, normal growth and development of central nervous system and others tissues.  $T_4$  play a crucial role in neurological development as a regulator of nervous system myelination (Kratzsch, 2008; Beardsall and Ogivy-Stuart, 2004). Deficiency of thyroid hormones causes biochemical abnormalities resulting in neuronal and glial dysfunctions. The immediate postnatal period is the most dangerous time for neonates with CH



because of the severity and irreversibility of brain damage that results from thyroid hormone deficiency in early life (Jain et al., 2008; Kratzsch, 2008; Carvalho et al., 2007; Rose et al., 2006; Beardsall and Ogivy-Stuart, 2004; Eugster et al., 2004). Treatment in these cases should be started as early as possible, preferably in the first 13 days of life because an optimal cognitive outcome depends on the adequacy timing of postnatal therapy, particularly in severe cases. An initial dosage of 10-15 µg/Kg/d of thyroxine is recommended. T<sub>4</sub> and TSH serum levels should be normalized within 2 and 4 weeks of hormone replacement therapy, respectively. The adequacy of treatment should be monitored by regular measurement of blood levels of free T<sub>4</sub> and TSH (Kratzsch, 2008; Rose et al., 2006; Selva et al., 2002).

Oxidative stress, which is defined as an imbalance between the total antioxidant defenses and the reactive species formed in the tissues, is an important event that has been related to the pathogenesis of various neurodegenerative disorders, epileptic seizures, demyelination (multiple sclerosis), dementia, phenylketonuria and other diseases (Halliwell and Gutteridge, 2007; Sirtori et al., 2005). Oxidative stress has also been reported in animal models of hypothyroidism (Cano-Europa et al., 2008; Rahaman et al., 2001; Pasquini and Adamo, 1994). Studies in adults with hypothyroidism also support that reactive oxygen species may play a role in the pathogenesis of the thyroid disorders (Torun et al., 2009; Erdamar et al., 2008; Nanda et al. 2008; Carmeli et al. 2008; Baskol et al., 2007; Duntas, 2005; Resch et al., 2002). Considering that very few works were performed with CH in what concerns to oxidative damage, the aim of the present study was to investigate the level of oxidative stress in blood of neonates with congenital hypothyroidism before and after treatment with thyroxine. Thus, we evaluated the oxidative stress parameters malondialdehyde (MDA) and total antioxidant reactivity

(TAR) in plasma, as well as the activities of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in erythrocytes from CH neonates before and after treatment with thyroxine.

## Material and methods

### Patients and controls

Blood samples were obtained from 11 newborns with congenital hypothyroidism (average age 4 weeks) diagnosed at the Brazilian Neonatal Screening Program of Hospital Materno Infantil Presidente Vargas, the reference center for the Neonatal Screening Program of Rio Grande do Sul, Brazil. The clinical symptoms presented by these patients included hyperbilirubinemia, hypotonia and lethargy. CH should be diagnosed precociously within the first two weeks of life to obtain a better prognosis (Kratzsch, 2008; Rose et al., 2006; Selva et al., 2002). Unfortunately, in countries like Brazil, where the neonatal screening program is being yet implanted, the diagnosis of CH is late in some patients. So, in this work, patients' average age was late, reflecting this reality.

The diagnosis was based on TSH serum levels (reference values 0.35-5.50  $\mu\text{IU/mL}$ ) and ultrasound imaging. The control group was composed by twelve healthy age matched individuals (mean TSH levels 5.3  $\mu\text{IU/mL}$ ). After diagnosis patients started treatment with thyroxine (10-15  $\mu\text{g/Kg/day}$ ). Samples were collected at diagnosis (mean TSH levels 345  $\mu\text{IU/mL}$ ) and 6 months afterwards (mean TSH levels 5.5  $\mu\text{IU/mL}$ ). Informed consent was obtained from the parents of the newborns included in the study and the protocol was approved by the Ethics Committee of the Clinical Hospital of Porto Alegre.

## Reagents

All chemicals were of PA purity and purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) except for MDA, which was purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and the RANSOD and RANSEL kits, which were purchased from Randox<sup>®</sup> (UK). TAR was assayed using a beta liquid scintillation spectrometer (Wallac model 1409). MDA content was determined by HPLC method and the antioxidant enzyme activities were measured in a double-beam spectrophotometer with temperature control (Hitachi U-2001).

## TSH and free T4 determination

TSH and free T4 were measured in serum using the AutoDELFI<sup>®</sup> neonatal kit assay. The assay is based on the direct sandwich technique in which two monoclonal antibodies (derived from mice) are directed against two separate antigenic determinants on the TSH or T4 molecule. Standards, controls and test specimens containing TSH or T4 are reacted simultaneously with immobilized monoclonal antibodies directed against a specific antigenic site on the TSH or T4 subunit and europium labeled monoclonal antibodies. The fluorescence in each sample is proportional to the TSH and free T4 content.

## Erythrocyte and Plasma Preparation

Erythrocytes and plasma were prepared from whole blood samples obtained from control individuals and neonates with congenital hypothyroidism by venous puncture with heparinized vials. Whole blood was centrifuged at  $1,000 \times g$ , plasma was removed by aspiration and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until determination. Erythrocytes were washed three times with cold saline solution (0.153 mol/L sodium chloride). Lysates were prepared by the addition of 1 mL of distilled water to 100  $\mu\text{L}$  of washed erythrocytes and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until determination of the antioxidant enzyme activities. At the moment of analysis lysates were centrifuged at  $13,500 \times g$  for 10 min. The supernatant was diluted in order to contain approximately 0.5 mg/mL of protein.

#### Malondialdehyde measurement (MDA)

MDA was measured by HPLC following method described by Karatepe, 2004. Twenty five milliliters of 0.1M perchloric acid and 55 mL of distilled water were added to 100  $\mu\text{L}$  of plasma. Addition of perchloric acid was necessary to precipitate proteins and release the malondialdehyde bound to the amino groups of proteins and other compounds. The samples were centrifuged at  $1,500 \times g$  for 5 min and used for HPLC analysis. The mobile phase was 82.5:17.5 (v/v) 30 mM monobasic potassium phosphate (pH 3.6)-methanol, the column used was a Supelcosil C18 (5  $\mu\text{m}$  x 15 cm x 4.6 mm), the flow rate was 1.2 mL/min and the chromatograms were monitored at 250 nm.

## Total Antioxidant Reactivity (TAR)

TAR, which represents the quality of the tissue antioxidants, was determined by measuring the luminol chemiluminescence intensity induced by 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropane) (ABAP) according to the method of Lissi et al., 1992. The background chemiluminescence was measured by adding 4 mL of 2 mM ABAP (in 0.1 M glycine buffer, pH 8.6) into a glass scintillation vial. Fifteen microliters of luminol (4 mM) was added to each vial and the chemiluminescence was measured. This was considered to be the basal value. Ten microliters of 25–200  $\mu$ M Trolox (curve calibration) or plasma was then added and the chemiluminescence was measured during 60 s. The Trolox or plasma addition reduces the chemiluminescence. The rapid reduction in luminol intensity is considered as a measure of the TAR capacity. TAR measurement was calculated as nmol Trolox/mg protein.

## Catalase activity (CAT)

CAT activity was assayed by the method of Aebi, 1983, measuring the absorbance decrease at 240 nm in a reaction medium containing 20 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, and 0.1–0.3 mg protein/mL. One unit of the enzyme is defined as 1  $\mu$ mol of  $\text{H}_2\text{O}_2$  consumed per minute and the specific activity is reported as units per milligram of protein.

## Glutathione peroxidase activity (GSH-Px)

GSH-Px was measured using RANSEL<sup>®</sup> kit (Randox, Antrim, United Kingdom). The activity was determined monitoring the NADPH disappearance at 340 nm in a medium containing 4 mM glutathione, 0.5 U/L glutathione reductase, 4.3 mM EDTA, 0.18 mM cumene hydroperoxide and 0.34 mM NADPH. One GSH-Px unit is defined as 1  $\mu$ mol of NADPH consumed per minute and the specific activity is represented as units per mg protein.

## Superoxide dismutase activity (SOD)

SOD activity was determined using the RANSOD<sup>®</sup> kit (Randox, Antrim, United Kingdom). The method is based on the formation of red formazan from the reaction of 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride and superoxide radical (produced in the incubation medium from the xanthine–xanthine oxidase reaction system), which is assayed spectrophotometrically at 505 nm. The inhibition of the produced chromogen is proportional to the activity of the SOD present in the sample. A 50% inhibition is defined as one unit of SOD and the specific activity is represented as units per mg protein.

## Protein determination

Erythrocyte protein concentrations were determined by the method of Lowry et al., 1951, using bovine serum albumin as standard. Plasmatic protein concentrations were determined by Biuret method using the Labtest Kit (Labtest Diagnóstica, MG, Brazil).

### Statistical analysis

Data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Comparisons between means were analyzed by one-way ANOVA followed by Duncan multiple range test when the F value was significant. Correlations between variables were calculated using the Pearson correlation coefficient. A p value less than 0.05 was considered significant. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software in a PC-compatible computer.



## Results

MDA, a parameter of lipid peroxidation, was determined in plasma of CH patients before and after treatment with thyroxine. Table 1 shows that MDA measurement was significantly and similarly increased in CH patients before and after treatment when compared to the control group [ $F(2,31)=5.972$ ,  $p<0.05$ ]. On the other hand, TAR measurement was markedly reduced in plasma of both groups of CH patients (before and after thyroxine treatment) when compared to the control group [ $F(2,31)=9.383$ ,  $p<0.05$ ]. These results strongly indicate that lipid peroxidation is stimulated while the antioxidant defenses (TAR levels) are reduced in CH patients. The data also indicate that the administration of thyroxine was not capable to revert the alterations of the plasmatic oxidative stress parameters studied.

Table 1

Next, we examined the activities of the antioxidant enzymes CAT, GSH-Px, and SOD in erythrocytes from patients and controls (table 2). A significant decrease of erythrocyte CAT activity was verified in both groups of CH patients (before and after thyroxine treatment) when compared to the controls [ $F(2,25)=5.328$ ,  $p<0.05$ ]. Similarly, erythrocyte GSH-Px activity was also significantly decreased in the two groups of CH patients when compared to the control group [ $F(2,28)=3.850$ ,  $p<0.05$ ]. In contrast, the erythrocyte activity of SOD in both groups of CH patients showed no significant difference from the controls [ $F(2,27)=0.223$ ,  $p>0.05$ ].

Table 2

We also correlated MDA levels (lipid oxidative damage) with TAR (tissue antioxidant defense) in CH patients at diagnosis and observed a strong inverse correlation ( $r=-0.716$ ,  $p < 0.01$ ), indicating that these associated variables were altered probably secondarily to free radical generation (figure 1). In order to investigate whether blood TSH and free T4 serum levels were associated with oxidative stress in CH patients, we correlated TSH and free T4 serum levels with MDA and TAR values, as well as with erythrocyte CAT and GSH-Px activities before and after treatment with thyroxine. No significant correlation was observed between TSH and free T4 serum levels with all oxidative stress parameters evaluated, indicating that these parameters were not directly influenced by the hormonal levels (results not shown).

Figure 1

## 4 Discussion

Thyroid hormones are important to energy metabolism, thermogenesis, the metabolism of nutrients and inorganic ions, as well as for growth and development of various tissues, including the central nervous system. Therefore, congenital hypothyroidism (CH) usually leads to abnormal growth and developmental, as well as mental retardation in untreated patients (Kratzsch, 2008; Rose et al., 2006; Beardsall and Ogivy-Stuart, 2004).

It is well established now that measures to prevent neurological symptoms in CH patients are based on hormonal reposition of thyroxine, which must be implemented as quickly as possible (Jain et al., 2008; Kratzsch, 2008; Carvalho et al., 2007; Rose et al., 2006; Beardsall and Ogivy-Stuart, 2004; Eugster et al., 2004). However, we still know very little about the pathophysiology involving the tissue damage of this disorder and particularly about the effect of thyroxine treatment on the oxidative status in neonates with CH.

In this context, recent studies have been demonstrating that oxidative stress is involved in animal models of hypothyroidism (Sahoo et al., 2008; Cano-Europa et al., 2008; Rahaman et al., 2001; Pasquini and Adamo, 1994). Studies in humans adults also revealed that hypothyroidism is associated with increased production of reactive oxygen species (ROS), as well as with an inflammatory response and myopathy (Torun et al., 2009; Erdamar et al., 2008; Nanda et al. 2008; Carmeli et al. 2008; Baskol et al., 2007; Duntas, 2005; Resch et al., 2002). Furthermore, thyroxine and triiodothyronine are phenols with structural homology with flavonoids. Thus, T<sub>4</sub> could potentially exert an antioxidant activity in vitro protecting against free radical attack.

However, their antioxidant activity in biological fluids is uncertain, especially in plasma (Halliwell and Gutteridge, 2007). Therefore, in the present study we investigated various parameters of oxidative stress in plasma and erythrocytes from CH neonates before and after receiving thyroxine therapy.

We demonstrated a significant increase of MDA levels in plasma of CH patients before and after receiving treatment with thyroxine. Considering that MDA is an end product of membrane fatty acid peroxidation (Halliwell and Gutteridge, 2007), our data indicate that lipid peroxidation is induced in CH patients, probably secondary to free radical generation. This result is in agreement with previous studies that also demonstrated the induction of lipid peroxidation, measured by MDA levels or by reactive species of thiobarbituric acid (TBARS) in hypothyroid and subclinical hypothyroid adult patients (Baskol et al., 2007; Konukoglu et al., 2002; Torun et al., 2009). In addition, it was demonstrated that thyroxine treatment in adults with hypothyroidism provokes a decrease of MDA levels when compared to untreated group, but not at level of the controls (Baskol et al., 2007).

We also observed a significant and similar decrease of TAR measurement in CH neonates before and after thyroxine treatment when compare to the control group, reflecting a deficient capacity to rapidly handle an increase of reactive species in these patients. These results are in agreement with other findings in hypothyroid adults patients, revealing that the level of non-enzymatic antioxidants was lower relatively to control individuals (Resch et al., 2002).

We also found a significant decrease of erythrocyte GSH-Px and CAT activities in CH patients before and after treatment, when compared to controls, indicating that thyroxine was not able to reverse this effect. Otherwise, SOD activity

was not different in neonates with CH when compared to controls. Considering that GSH-Px converts hydrogen peroxide into water using reduced glutathione (GSH) and that can also act on other peroxides like lipid peroxides, it is conceivable that the induction of lipid oxidative damage may be related to the reduction of GSH-Px activity. This is especially important in erythrocytes once these cells are highly susceptible to oxidative stress because of their membranes, rich in polyunsaturated fatty acids. On the other hand, the erythrocyte content of oxygen and iron are high and catalase is a ferric heme protein that directly catalyses the decomposition of hydrogen peroxide (Halliwell and Gutteridge, 2007). Our present results on the enzymatic antioxidant activity profile in hypothyroid neonates (reduced CAT and GSH-Px activities) agree with those found in adult patients by other investigators (Carmeli et al., 2008). In contrast, other investigators verified that oxidative damage is decreased while the antioxidant system is improved in adult patients with hypothyroidism after six month of thyroxine replacement. Our results showed no alterations in oxidative stress parameters after thyroxine replacement. This is may be due to the age of patients used in our study in contrast with others which include hypothyroid adult patients (Baskol et al., 2007; Erdamar et al., 2008).

On the other hand, we did not observe any correlation between TSH and free T4 serum levels with the oxidative stress parameters studied (MDA, TAR, CAT and GSH-Px). So, we can suppose that TSH and free T4 are not directly responsible for the alterations of these parameters in CH neonates.

In conclusion, to the best of our knowledge this is the first report demonstrating that oxidative stress occurs in babies with CH diagnosed in the neonatal period. Therefore, this pathological process could explain, at least in part, the pathogenesis of the disease in neonates. We also verified no difference in

oxidative stress parameters studied in CH neonates after thyroxine therapy when compared with untreated patients. These results may suggest that thyroxine therapy was not able, per se, to revert the oxidative damage in CH neonates. It is important to emphasize that other factors than TSH and free T4 should be investigated in order to better elucidate the etiology of the oxidative stress in CH neonates. Furthermore, it may be presumed that classical antioxidants may represent a potential adjuvant therapy to neonates with CH, but should be first tested in animal models.

## **Acknowledgments**

This work was supported by grants from Brazilian National Research Council (CNPq), CAPES and FINEP/HCPA-Brazil.

## References

Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer H U, Bergmeyer J and Grabl M (eds). *Methods of Enzymatic Analysis*. 3<sup>rd</sup> edn. Florida: Verlag Chemie, 1983: 273–296.

Baskol G, Atmaca H, Tanriverdi F, Baskol M, Kocer D, Bayram F. Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in patients with hypothyroidism before and after treatment. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2007; 115: 522-526.

Beardsall K, Ogilvy-Stuart AL. Congenital Hypothyroidism. *Curr Pediatr* 2004; 14: 422-429.

Cano-Europa E, Pérez-Severiano F, Vergara P, Ortiz-Butrón R, Ríos C, Segovia J, Pacheco-Rosado J. Hypothyroidism induces selective oxidative stress in amygdala and hippocampus of rat. *Metab Brain Dis* 2008; 23: 275-287.

Carmeli E, Bachar A, Barchad S, Morad M, Merrick J. Antioxidant status in the serum of persons with intellectual disability and hypothyroidism: a pilot study. *Res Dev Disabil* 2008; 29: 431-438.



Carvalho TM, Santos HP, Santos ICGP, Vargas PR, Pedrosa J. Newborn Screening: A national public health programme in Brazil. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30: 1-7.

Duntas LH. Oxidants, antioxidants in physical exercise and relation to thyroid function. *Horm Metab Res* 2005; 37: 572-576.

Erdamar H, Demirci H, Yaman H, Erbil MK, Yakar T, Sancak B, Elbeg S, Biberoglu G, Yetkin I. The effect of hypothyroidism, hyperthyroidism, and their treatment on parameters of oxidative stress and antioxidant status. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46:1004-1010

Eugster EA, LeMay D, Zerlin JM, Pescovitz OH. Definitive diagnosis in children with congenital hypothyroidism. *J Pediatr* 2004; 144: 643-647.

Halliwell B, Gutteridge J M C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4<sup>th</sup> edn. New York: Oxford University Press, 2007: 851.

Jain V, Agarwal R, Deorari AK, Paul VK. Congenital hypothyroidism. *Indian J Pediatr* 2008; 75: 363-367.

Karatepe M S. Simultaneous Determination of Ascorbic Acid and free Malondialdehyde in Human Serum. *LCGC North America*, 2004; 22: 362-365.

Konukoglu D, Ercan M, Hatemi H. Plasma viscosity in female patients with hypothyroidism: effects of oxidative stress and cholesterol. *Clin Hemorheol Microcirc* 2002; 27: 107-113.

Kratzsch J. Thyroid gland development and defects. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008; 22: 57-75.

Kreisner E, Camargo-Neto E, Maia C R, Gross J L. Accuracy of ultrasonography to establish the diagnosis and aetiology of permanent primary congenital hypothyroidism. *Clin Endocrinol* 2003; 59:361–365.

Lissi E, Pascual C, Del Castillo MD. Luminol luminescence induced by 2, 2'-azobis-(2-amidinopropane) thermolysis, *Free Radic Res Commun* 1992; 17: 299–311.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Lewis-Farr A, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem* 1951; 193: 265–275.

Nanda N, Bobby Z, Hamide A. Oxidative stress and protein glycation in primary hypothyroidism. Male/female difference. *Clin Exp Med* 2008; 8: 101-108.

Pasquini JM, Adamo AM. Thyroid hormones and the central nervous system. *Dev Neurosci* 1994; 16: 1-8.

Rahaman SO, Ghosh S, Mohanakumar KP, Das S, Sarkar PK. Hypothyroidism in the developing rat brain is associated with marked oxidative stress and aberrant intraneuronal accumulation of neurofilaments. *Neurosci Res* 2001; 40: 273-279.

Resch U, Hesel G, Tatzber F, Sinzinger H. Antioxidant status in thyroid dysfunction. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40: 1132-1134.

Rose SR, Brown RS, Foley T, Kaplowitz PB, Kaye CI, Sundararajan S, Varma SK. Update of Newborn Screening and Therapy for Congenital Hypothyroidism. *Pediatrics* 2006; 117: 2290-2303.

Sahoo DK, Roy A, Bhanja S, Chainy GB. Hypothyroidism impairs antioxidant defence system and testicular physiology during development and maturation. *Gen Comp Endocrinol* 2008; 156: 63-70.

Selva KA, Mandel SH, Rien L, Sesser D, Miyahira R, Skeels M, Nelson JC, Lafranchi SH. Initial treatment dose of L-thyroxine in congenital hypothyroidism. *J Pediatr* 2002; 141: 786-792.

Sirtori LR, Dutra-Filho CS, Fitarelli D, Sitta A, Haeser A, Barschak AG, Wajner M, Coelho DM, Llesuy S, Bello-Klein A, Giugliani R, Deon M, Vargas CR. Oxidative stress in patients with phenylketonuria. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1740: 68-73.

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.

Wendel A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1981; 77: 325–332.

**Figure legends:**

**Figure 1:** Correlation between malondialdehyde levels (MDA) and total antioxidant reactivity (TAR) in CH patients. Graph shows the Pearson correlation coefficient and probabilities.

### **Table legends:**

**Table 1:** Plasma malondialdehyde (MDA) and total antioxidant reactivity (TAR) values in CH patients before and after treatment and in controls. Data represent the mean $\pm$ S.D (n=11). Difference from control, \* $P$ <0.05 (ANOVA).

**Table 2:** Catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) and superoxide dismutase (SOD) activities in erythrocyte from CH patients before and after treatment and from controls. Data represent the mean $\pm$ S.D (n=9). Difference from control, \* $P$ <0.05 (ANOVA).

**Table 1:** Measurement of MDA levels and TAR.

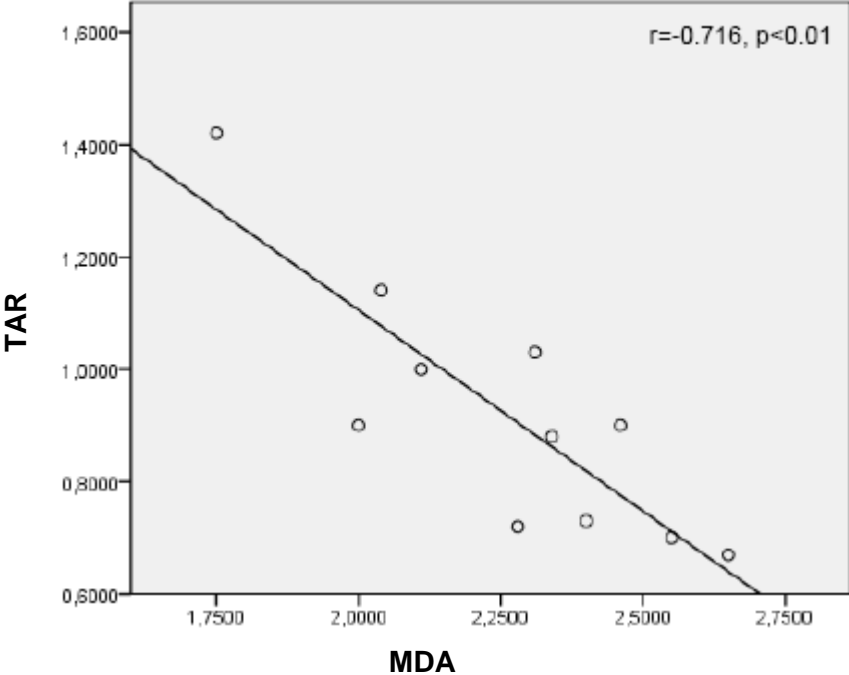
Oxidative stress parameter	Controls	CH patients (before treatment)	CH treated patients
MDA ( $\mu\text{M}$ )	$1.96 \pm 0.14$	$2.26^* \pm 0.27$	$2.16^* \pm 0.23$
TAR (nmol/mg protein)	$1.50 \pm 0.47$	$0.92^* \pm 0.23$	$1.09^* \pm 0.25$

**Table 2:** Antioxidant enzyme activities.

Enzyme activity	Controls	CH patients (before treatment)	CH treated patients
CAT (pmol/mg protein)	2.43 ± 0.43	1.79* ± 0.52	1.99* ± 0.35
GSH-Px (U/mg protein)	0.66 ± 0.10	0.57* ± 0.06	0.57* ± 0.08
SOD (U/mg protein)	0.47 ± 0.06	0.47 ± 0.12	0.5 ± 0.12



Figure 1



## 4 DISCUSSÃO

---

O Hipotireoidismo Congênito (HC) primário é uma disfunção endócrina causada por distúrbios na formação ou na síntese hormonal da glândula da tireóide. Os hormônios da tireóide desempenham importante papel no metabolismo energético, termogênese, metabolismo de nutrientes e íons inorgânicos, crescimento e desenvolvimento de vários tecidos incluindo Sistema Nervoso Central (SNC). Baixos níveis destes hormônios provocam severo déficit mental e motor se o paciente não receber o tratamento preconizado com tiroxina ( $T_4$ ). O HC primário, portanto, representa uma das causas mais frequentes de retardo mental que podem ser prevenidas através do diagnóstico precoce e do tratamento adequado (BEARDSALL e OGIVY-STUART, 2004; EUGSTER et al., 2004; ROSE e BROWN, 2006; JAIN et al., 2008; KRATZSCH, 2008). Clinicamente, o HC apresenta baixa prevalência de sintomas e sinais indicativos da doença, sendo a icterícia neonatal prolongada a manifestação clínica mais frequente. Existe, portanto, uma grande dificuldade quanto ao diagnóstico clínico de recém-nascido portador de HC no momento do nascimento. Considerando-se apenas os elementos de ordem clínica, menos de 5% das crianças com HC são reconhecidas nos primeiros dias de vida. Desta forma, o programa de triagem é ferramenta indispensável para a detecção precoce da doença. Sabe-se que o TSH sofre elevação após o parto, sendo, portanto, o período entre o 3<sup>o</sup> e o 6<sup>o</sup> dia de vida o momento ideal para a realização da triagem neonatal, quando o TSH da criança encontra-se estabilizado (Figura 2). O diagnóstico pode ser confirmado com as dosagens de  $T_4$  livre e TSH. No período neonatal níveis de  $T_4$  livre menores que 6,5  $\mu\text{g/dL}$  e de TSH maiores que 10  $\mu\text{U/mL}$  sugerem hipotireoidismo. Desde 2001, a triagem neonatal tem contribuído para o diagnóstico e tratamento precoce do hipotireoidismo congênito no Brasil.

O tratamento do HC consiste em reposição hormonal com tiroxina via oral numa dosagem inicial de 10 a 15  $\mu\text{g/Kg/dia}$  e deve ser administrada uma vez ao dia, preferencialmente pela manhã. A tiroxina possui um tempo de meia vida prolongado, em torno de 7 dias e, portanto, sua resposta máxima é observada na segunda semana de tratamento quando grande parte da tiroxina já foi convertida em  $T_3$ . Por outro lado, os níveis de TSH levam quatro semanas para normalizar após início do tratamento. A eficácia do tratamento e os ajustes de doses são avaliados a partir das dosagens de  $T_4$  livre e TSH no soro após o início do tratamento. Pacientes que iniciam o tratamento precocemente geralmente apresentam desenvolvimento

cognitivo normal (ROSE and BROWN, 2006; SETIAN, 2007; KRATZSCH, 2008; MEDEIROS-NETO e KNOBEL, 2008).

Está bem estabelecido que as medidas estabelecidas para prevenir os sintomas neurológicos em pacientes com HC estão baseadas na reposição hormonal ( $T_4$ ), a qual deve ser iniciada o mais precocemente possível (EUGSTER et al., 2004; JAIN et al., 2008; KRATZSCH, 2008). Entretanto, pouco é sabido sobre a fisiopatologia do dano tecidual nesta doença e, particularmente, sobre o efeito do tratamento com tiroxina sobre o estresse oxidativo em neonatos portadores de HC.

Os hormônios tireoidianos têm uma influência importante na maturação do SNC e, portanto, diversos pesquisadores estudaram a influência dos hormônios da tireóide no desenvolvimento do SNC de ratos submetidos ao modelo experimental de hipotireoidismo. Alguns trabalhos mostraram o efeito dos hormônios da tireóide na expressão do gene da proteína da mielina no cérebro e cerebelo de ratos sugerindo que isto possa ser devido ao dano produzido pelo estresse oxidativo gerado por um excesso de hormônios tireóideos (PASQUINI e ADAMO, 1994). RAHAMAN e colaboradores (2001) verificaram aumento da lipoperoxidação e da atividade das enzimas SOD e CAT, bem como diminuição dos níveis da glutathione reduzida (GSH) em cérebro de ratos submetidos ao modelo de hipotireoidismo durante as primeiras quatro semanas de desenvolvimento pós-natal. Além disto, BASKOL e colaboradores (2007) verificaram que em pacientes adultos com hipotireoidismo ocorre aumento da produção de radicais livres demonstrado pela elevação dos níveis plasmáticos dos marcadores de estresse oxidativo. NANDA e colaboradores (2008) observaram que pacientes adultos portadores de hipotireoidismo apresentaram alteração em dois importantes marcadores de dano celular devido ao ataque de espécies reativas em proteínas e lipídios de membrana, especialmente em pacientes do sexo masculino que apresentaram alteração do perfil lipídico. TORUN e colaboradores (2009) verificaram uma correlação positiva entre o aumento dos níveis de malondialdeído e o perfil lipídico de pacientes com hipotireoidismo. Ainda, foi verificado em outro estudo que ocorre intensificação do processo de peroxidação lipídica e ataque de radicais livres em pacientes adultos com hipofunção da tireóide e que este processo parece ser atenuado após o tratamento com tiroxina, porém, não se igualando ao grupo controle (ERDAMAR et al., 2008).

O mecanismo pelo qual a hipofunção da tireóide parece estar envolvida com estresse oxidativo ainda é desconhecido, especialmente em neonatos. Levando-se em consideração os trabalhos que sugerem a ocorrência de estresse oxidativo em modelos animais de hipotireoidismo e em pacientes adultos portadores de hipotireoidismo, o presente trabalho teve como objetivo investigar diversos parâmetros de estresse oxidativo em neonatos com HC primário diagnosticados pelo Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) no momento do diagnóstico e após o tratamento com tiroxina, a fim de avaliar os mecanismos envolvidos na fisiopatologia desta doença, bem como o efeito do tratamento com tiroxina sobre o estresse oxidativo. Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Na primeira parte deste trabalho foram analisadas amostras de plasma e eritrócitos de pacientes com hipotireoidismo congênito primário diagnosticados no PNTN. Cabe salientar que a idade média de diagnóstico dos pacientes foi de quatro semanas, o que pode ser considerado diagnóstico tardio se observarmos o tempo de diagnóstico preconizado.

Nossos resultados apontaram um aumento dos níveis de malondialdeído (MDA) no plasma de recém-nascidos portadores de HC primário antes do início do tratamento com tiroxina quando comparados ao grupo controle, o que está de acordo com estudos prévios que também demonstraram indução da lipoperoxidação em pacientes com hipotireoidismo. RAHAMAN e colaboradores (2001) verificaram aumento dos níveis de MDA em cérebro de animais submetidos ao modelo de hipotireoidismo e concluíram que diversos parâmetros de estresse oxidativo encontraram-se alterados durante o desenvolvimento cerebral de ratos. Da mesma forma, CANO-EUROPA e colaboradores (2008) também verificaram aumento dos níveis de MDA em cérebro de ratos submetidos ao modelo experimental de hipotireoidismo. Outros estudos em adultos demonstraram aumento dos níveis de MDA em plasma de pacientes com hipotireoidismo (BASKOL et al., 2007; TORUN et al., 2009). Todos os componentes celulares estão suscetíveis a ação de radicais livres. A membrana celular é preferencialmente atacada pela sua constituição rica em lipídios de cadeias insaturadas, caracterizando a peroxidação lipídica. As principais consequências deste ataque incluem alteração da estrutura e permeabilidade da membrana celular. Desta forma, pode haver perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas

hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos (como o malondialdeído), culminando com a morte celular (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Além disto, nossos resultados mostraram uma redução da reatividade antioxidante total (TAR) em plasma de neonatos com HC primário antes do início do tratamento com tiroxina. Este parâmetro mensura a capacidade dos antioxidantes em modular o dano causado pelo aumento da produção de radicais livres, refletindo a qualidade dos antioxidantes pela sua reatividade. Assim, os neonatos com HC apresentaram reduzida capacidade de responder ao aumento de espécies reativas. Este resultado está de acordo com outros achados na literatura em pacientes adultos com hipotireoidismo, mostrando que os níveis de antioxidantes não enzimáticos está diminuído comparativamente a indivíduos controle (RESCH et al., 2002; CARMELI et al., 2008). Ainda, de forma complementar, foi verificada uma correlação significativa negativa entre os níveis de MDA e TAR nestes pacientes, sugerindo que ocorre estresse oxidativo em recém-nascidos com hipotireoidismo congênito diagnosticados na fase neonatal, provavelmente secundário a geração de radicais livres.

A determinação das atividades das enzimas antioxidantes em eritrócitos de neonatos com HC diagnosticados pelo PNTN também foi realizada neste trabalho. A atividade da SOD em eritrócitos encontrada nos pacientes não foi significativamente diferente do grupo controle, enquanto que as atividade da GSH-Px e CAT apresentaram-se significativamente diminuídas em eritrócitos de neonatos com HC obtidos no diagnóstico, quando comparados ao grupo controle.

Outros trabalhos mostraram resultados variáveis quanto à atividade de enzimas antioxidantes em modelos animais de hipotireoidismo e pacientes adultos portadores da doença. RESCH e colaboradores (2002) verificaram que defesas antioxidantes enzimáticas estavam aumentadas em pacientes com hipotireoidismo quando comparados ao grupo controle, porém as defesas antioxidantes não enzimáticas mostraram-se reduzidas nestes pacientes quando comparadas ao grupo controle. Ainda, CARMELI e colaboradores (2008) verificaram diminuição da atividade da CAT e GSH-Px em pacientes com hipotireoidismo quando comparados ao grupo controle, resultados que estão de acordo com nossos achados. Além disto, dois outros estudos mostraram que a atividade enzimática da SOD não se mostrou

diferente do grupo controle (BASKOL et al., 2007; ERDAMAR et al. 2008), estando de acordo com os resultados encontrados em nosso estudo.

A CAT é uma heme proteína citoplasmática que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio e atua como enzima antioxidante na remoção desta espécie reativa formada como produto metabólico. Esta enzima possui uma ação muito específica atuando apenas em reações com peróxidos de hidrogênio, metila e etila (CHANCE et al., 1979). Desta forma, podemos concluir, a partir de nossos resultados, que neonatos com HC primário possuem limitada capacidade para remover peróxido de hidrogênio gerado como produto do metabolismo celular.

A GSH-Px é outra enzima antioxidante que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e de hidróxidos orgânicos através da oxidação da glutathiona reduzida (GSH) a glutathiona oxidada (GSSG). Esta enzima tem elevada atividade no fígado e eritrócitos e encontra-se principalmente no citosol e matriz mitocondrial. A GSH-Px é capaz de proteger membranas e proteínas essenciais dos efeitos potencialmente danosos das espécies reativas e lipoperóxidos (SHULZ et al., 2000). Em eritrócitos esta enzima tem importância particular, já que estas células apresentam elevada suscetibilidade de ataque por radicais livres, uma vez que a composição da suas membranas é rica em ácidos graxos poliinsaturados, e também, por apresentarem conteúdo rico em oxigênio e ferro (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Assim, é possível que a indução de dano oxidativo a lipídios possa estar relacionado a redução da atividade da GSH-Px em eritrócitos de neonatos com HC.

Os resultados encontrados neste estudo em neonatos portadores de HC primário diagnosticados no PNTN (aumento da lipoperoxidação, redução da capacidade de reagir aos radicais livres, diminuição das atividades antioxidantes enzimáticas da glutathiona peroxidase e catalase) permitem sugerir que nestes pacientes há uma produção de radicais livres aumentados concomitantemente a uma diminuição das defesas antioxidantes, ocasionando o processo conhecido como estresse oxidativo.

Levando-se em consideração os resultados obtidos no primeiro momento da realização deste trabalho, que indicam o envolvimento do estresse oxidativo no hipotireoidismo congênito primário, buscamos, no segundo momento, avaliar os mesmos parâmetros de estresse oxidativo nos mesmos neonatos com HC submetidos ao tratamento de reposição hormonal com tiroxina. O tratamento quando

iniciado precocemente, ainda nas duas primeiras semanas de vida é capaz de prevenir o retardo mental ocasionado pela falta destes hormônios ao nascimento. Cabe ressaltar que nossos pacientes tiveram diagnóstico tardio e, portanto, iniciaram o tratamento com mais de duas semanas de vida (tempo médio de diagnóstico de 30 dias). Uma dosagem inicial de 10 a 15 µg/Kg/dia foi administrada aos pacientes após o diagnóstico. Foram coletadas novas amostras de soro dos pacientes após o tratamento para monitorar os níveis de TSH e T<sub>4</sub> livre. O tempo médio de tratamento foi de seis meses (variação 1 a 10 meses de tratamento).

Os níveis de malondialdeído em plasma de recém-nascidos com HC mostraram-se igualmente aumentados após o tratamento com tiroxina quando comparados aos controles, indicando que a terapia de reposição hormonal não impede ou reverte o processo, que provavelmente é secundário a geração de radicais livres. Além disto, a medida da reatividade antioxidante total (TAR) em plasma de neonatos com HC mostrou-se similarmente reduzida após o tratamento com a tiroxina quando comparados aos controles, sugerindo que o tratamento não causou melhora na capacidade dos antioxidantes circulantes reagirem rapidamente frente a um aumento na geração de espécies reativas. Também foram avaliadas as defesas antioxidantes enzimáticas em eritrócitos de neonatos com HC submetidos ao tratamento com tiroxina. As enzimas CAT e GSH-Px estavam significativamente diminuídas em relação ao grupo controle e não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparadas às atividades enzimáticas medidas no momento do diagnóstico. A atividade enzimática da SOD não apresentou variação estatisticamente significativa entre os grupos analisados.

Assim, em conjunto, estes resultados permitem sugerir que a tiroxina não reverte o estresse oxidativo em neonatos com diagnóstico tardio de HC primário. BASKOL e colaboradores (2007) mostraram que o tratamento com tiroxina oferece proteção contra o estresse oxidativo em pacientes adultos portadores de hipotireoidismo, uma vez que o tratamento levou à redução dos níveis de MDA comparativamente aos pacientes não tratados, não se igualando, porém, aos níveis de MDA medido nos indivíduos controles, o que está em desacordo com os resultados encontrados em neonatos. Esta divergência de resultados poderia ser explicada pela idade dos pacientes em cada estudo, de forma que pacientes adultos e neonatos podem responder diferentemente ao tratamento com tiroxina.



De forma complementar, a fim de verificarmos se os níveis de TSH estavam relacionados com as alterações dos parâmetros do estresse oxidativo estudados neste trabalho, foi verificado se havia correlação entre TSH e T<sub>4</sub> livre no soro com as medidas plasmáticas de MDA e TAR, bem como com as atividades enzimáticas eritrocitárias da CAT, GSH-Px. Nenhuma correlação significativa foi verificada para estes parâmetros tanto nos ensaios realizados no momento do diagnóstico quanto após o tratamento, sugerindo que o TSH e o T<sub>4</sub> livre podem não estar diretamente envolvidos com o mecanismo de dano oxidativo nestes pacientes. Podemos concluir, portanto, que outros mecanismos ainda desconhecidos podem estar influenciando o desequilíbrio pró-oxidante e antioxidante em neonatos com HC primário.

Pacientes adultos com hipotireoidismo comumente apresentam desenvolvimento de aterosclerose. MAYER e colaboradores (2006) verificaram uma alta prevalência de hipotireoidismo em pacientes com doenças coronarianas. O aumento da morbidade cardiovascular nestes pacientes tem sido relacionado aos índices elevados de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e colesterol total. O quadro clínico de adultos com hipofunção de tireóide inclui: aumento da resistência vascular sistêmica, perfil lipídico alterado com aumento de LDL e hipertensão diastólica (NEDREBØ et al., 1998; RESCH et al., 2002; MAYER et al., 2006). DUNTAS (2002) caracterizou o perfil lipídico de pacientes adultos com hipotireoidismo: hipercolesterolemia, aumento de LDL e apolipoproteína B, evidenciando a desordem lipídica nestes pacientes. Sabe-se, ainda, que o LDL é suscetível ao ataque de radicais livres e pode sofrer modificações oxidativas estando, portanto, intimamente relacionado ao desenvolvimento e à progressão da arterosclerose devido ao aumento da lipoperoxidação durante o estresse oxidativo (DIEKMAN et al., 1998; RESCH et al., 2002; ORZECOWSKA-PAWIŁOJC et al., 2005). Com base nestes estudos, cabe salientar que seria importante investigar no futuro se o estresse oxidativo demonstrado em neonatos com hipotireoidismo congênito primário pode estar relacionado com o perfil lipídico destes pacientes. Alguns trabalhos sugeriram que a lipoperoxidação está envolvida com a patogênese da arterosclerose no hipotireoidismo (RESCH et al., 2002; BASKOL et al., 2007; TORUN et al., 2009). NANDA e colaboradores (2008) verificaram um aumento dos níveis de MDA em pacientes adultos com hipotireoidismo e uma correlação positiva significativa deste com níveis de colesterol total, colesterol LDL e triglicerídios nestes

pacientes. Outro parâmetro passível de ser investigado em neonatos com HC é homocisteína (HCY). Sabe-se que a hiperhomocisteinemia é considerada fator de risco independente para doenças coronarianas, periféricas e cerebrovasculares. Já está bem documentado na literatura científica que elevados níveis plasmáticos de HCY levam ao aumento do estresse oxidativo (HUSSEIN et al., 1999; DAÍ et al., 2006; JIN et al, 2007). DIEKMAN e colaboradores (2001) estudaram a alteração dos níveis plasmáticos de HCY em pacientes com disfunção da tireóide. Pacientes adultos com hipotireoidismo apresentaram aumento significativo da concentração plasmática total de HCY, a qual diminuiu após tratamento com reposição hormonal com T<sub>4</sub> (HUSSEIN et al., 1999; SENGÜL et al., 2004). As avaliações do perfil lipídico e dos níveis plasmáticos de HCY poderiam, portanto, fornecer importantes informações na investigação do envolvimento de radicais livres com o hipotireoidismo congênito primário. Da mesma forma, será importante em estudos futuros investigar parâmetros de avaliação de dano ao DNA e a proteínas em neonatos com HC, no intuito de melhor entender o dano secundário ao ataque das espécies reativas no HC primário. Cabe salientar que estes parâmetros ainda não foram estudados em neonatos.

Neste trabalho, também não tivemos a oportunidade de realizar a análise dos níveis de oligoelementos que atuam como antioxidantes, como o selênio. Este micronutriente é componente de enzimas essenciais à manutenção das defesas antioxidantes e do metabolismo do hormônio tiroxina tais como glutathiona peroxidase (GSH-Px) e iodotironina deiodinases, respectivamente (OLIVERI et al., 1995; CHANOINE, 2003; SCHWEIZER et al., 2004). OLIVERI e colaboradores (1995) verificaram que os níveis plasmáticos de selênio influenciam os hormônios da tireóide, principalmente por modular os níveis de tiroxina. Além disto, ERDAL e colaboradores (2008) concluíram que a deficiência de selênio poderia contribuir para o risco de doenças cardiovasculares em pacientes com hipotireoidismo subclínico.

Os resultados obtidos neste trabalho em amostras de neonatos com HC obtidas no momento do diagnóstico da doença permitem concluir que há um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a ação de antioxidantes nestes pacientes. Estes pacientes tiveram diagnóstico com idade média de quatro semanas (variando de 20 a 60 dias de vida) e, desta forma, um diagnóstico tardio. No Rio Grande do Sul, ainda apenas 26,6% dos pacientes realizam a coleta de triagem com até 7 dias de vida e a idade de coleta ocorre em média com 11 dias de vida. Além

disto, o tempo de processamento da amostra desde a data da coleta até o diagnóstico final no Brasil é de 43 dias e no Rio Grande do Sul é de 24 dias (MEDEIROS-NETO e KNOBEL, 2008). Neste contexto, considerando o diagnóstico e o início do tratamento tardio dos pacientes estudados, podemos sugerir que o estresse oxidativo demonstrado nestes neonatos com hipotireoidismo congênito primário poderia estar relacionado às consequências da falta do hormônio da tireóide por tempo prolongado. Para que esta hipótese seja confirmada, estudos mais aprofundados que avaliem parâmetros de estresse oxidativo em neonatos com diagnóstico precoce de HC seriam necessários.

Por outro lado, os resultados deste estudo mostram que o tratamento com tiroxina não reverteu os parâmetros de estresse oxidativo estudados em neonatos com HC primário. Os pacientes por nós estudados não iniciaram o tratamento precocemente, o que permite supor que o dano causado pela falta do hormônio da tireóide antes do início do tratamento possa ter sido irreversível. Ainda, estudos futuros avaliando neonatos portadores HC com diagnóstico e início de tratamento precoce devem ser realizados, de tal forma a monitorar os parâmetros de estresse oxidativo ao longo do tratamento. Por fim, poderíamos, ainda, sugerir que a administração de antioxidantes e oligoelementos como selênio poderiam ser considerados uma terapia adjuvante para neonatos HC primário.

## **5 CONCLUSÕES**

---

Os resultados deste trabalho permitem concluir que:

- a) O parâmetro de lipoperoxidação MDA está significativamente aumentado em amostras de plasma de neonatos com HC no momento do diagnóstico.
- b) A medida da reatividade antioxidante total (TAR) mostrou uma diminuição significativa em plasma de neonatos com HC no momento do diagnóstico.
- c) As atividades das enzimas antioxidantes da CAT e GSH-Px mostraram-se significativamente reduzidas em eritrócitos de neonatos com HC no momento do diagnóstico, enquanto que a atividade da SOD não foi significativamente diferente do grupo controle.
- d) Observou-se aumento significativo dos níveis de MDA em plasma de neonatos com HC tratados com tiroxina quando comparados ao grupo controle, porém não foi verificada diferença estatisticamente significativa deste parâmetro quando comparado ao resultado obtido no momento do diagnóstico.
- e) A medida da reatividade antioxidante total (TAR) mostrou uma diminuição significativa em plasma de neonatos com HC tratados com tiroxina quando comparada a do grupo controle, porém não foi verificada diferença estatisticamente significativa para este parâmetro quando comparado ao resultado obtido no momento do diagnóstico.
- f) As atividades das enzimas antioxidantes da CAT e GSH-Px mostraram-se reduzidas em eritrócitos de neonatos com HC tratados com tiroxina quando comparadas às do grupo controle, porém não foi verificada diferença estatisticamente significativa para este parâmetro quando comparado ao resultado obtido no momento do diagnóstico. A atividade enzimática da SOD manteve-se inalterada em pacientes tratados quando comparado ao grupo controle.
- g) Foi verificada uma correlação positiva entre as medidas de MDA e TAR no plasma de neonatos com HC, reforçando o envolvimento das espécies reativas com a fisiopatologia do HC.

Embora outras técnicas complementares de avaliação de estresse oxidativo possam ser empregadas para melhor explicar nossos resultados, podemos concluir que o estresse oxidativo contribui, pelo menos em parte, para a fisiopatologia do HC primário e que este processo não está diretamente relacionado com os níveis de TSH e T<sub>4</sub> livre. Ainda, o tratamento com tiroxina parece não reverter o estresse oxidativo em neonatos com HC. Desta forma, pode-se sugerir que antioxidantes possam ser utilizados como terapia adjuvante em neonatos com HC primário.



Pretendemos dar continuidade a este trabalho. Assim, nossas perspectivas incluem ainda:

- a) Avaliar o dano ao DNA e a proteínas em neonatos com HC no momento do diagnóstico e ao longo do tratamento com tiroxina;
- b) Avaliar o perfil lipídico de neonatos com HC no momento do diagnóstico e ao longo do tratamento com tiroxina e correlacionar com os níveis de TSH e T<sub>4</sub> livre;
- c) Verificar os níveis de homocisteína em neonatos com HC no momento do diagnóstico e ao longo do tratamento com tiroxina;
- d) Realizar dosagem de selênio em neonatos com HC no momento do diagnóstico e ao longo do tratamento com tiroxina;
- e) Realizar estudo comparativo entre diagnóstico tardio e precoce no HC primário;
- f) Realizar o seguimento do tratamento dos pacientes com HC com parâmetros de estresse oxidativo.



## **7 REFERÊNCIAS**

---

BASKOL, G.; ATMACA, H.; TANRIVERDI, F.; BASKOL, M.; KOCER D AND BAYRAM , F. **Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in patients with hypothyroidism before and after treatment.** Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes, v.115, p. 522-526, 2007.

BARSchAK, A.G.; SITTA, A.; DEON, M.; DE OLIVEIRA, M.H.; HAESER, A.; DUTRA-FILHO, C.S.; WAJNER, M.; VARGAS, C.R. **Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients with maple syrup urine disease.** Metabolic Brain Disease, v. 21, p. 279-86, 2006.

BEARDSAL, L. K.; OGILVY-STUART, A.L. **Congenital Hypothyroidism.** Current Pediatrics, v. 14, p. 422-429, 2004.

BECKMAN, K.B.; AMES, B.N. **The free radical theory of aging matures,** Physiological Reviews, v. 78, n. 2, p. 547-581, 1998.

BIRD, S.; MILLER, N.J.; COLLENS, J.E.; RICE-EVENS, A. **Plasma antioxidant capacity in two cases of tirosinaemia type 1: one case treated with NTBC.** Journal of Inherited Disease, v. 18, p. 123-126, 1995.

BOVERIS, A. **Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues.** Medicina, v. 58, n. 4, p. 350-356, 1998.

BRANCHTEIN, L. E MATOS, G.C.M. **Fármacos e Tireóide.** In: FUCHS, D. F.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, C.B.M. Farmacologica Clínica Fundamentos da terapêutica Racional. 3. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap. 67 p. 876-885.

BRIDI, R.; ARALDI, J.; SGARBI, M.B.; TESTA, C.G.; DURIGON, K.; WAJNER, M.; DUTRA-FILHO, C.S. **Induction of oxidative stress in rat brain by the metabolites accumulating in maple syrup urine disease.** International Journal of Developmental Neuroscience, v. 21, p. 327–332, 2003.

CANO-EUROPA, E.; PÉREZ-SEVERIANO, F.; VERGARA, P.; ORTIZ-BUTRÓN, R.; RÍOS, C.; SEGOVIA, J.; PACHECO-ROSADO, J. **Hypothyroidism induces selective oxidative stress in amygdala and hippocampus of rat.** Metabolic Brain Disease, v. 23, p. 275-287, 2008.

CARMELI, E.; BACHAR, A.; BARCHAD, S.; MORAD, M.; MERRICK ,J. **Antioxidant status in the serum of persons with intellectual disability and hypothyroidism: a pilot study.** Research in Developmental Disabilities, v. 29, p. 431-438, 2008.

CARVALHO, T.M.; SANTOS, H.P.; SANTOS, I.C.G.P.; VARGAS, P.R.; PEDROSA, J. **Newborn Screening: A national public health programme in Brazil.** Journal of Inherited Metabolic Disease, v. 30, p.1-7, 2007.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. **Hydroperoxide metabolism in mammalian organs.** Physiological Reviews, v. 59, p. 527-605, 1979.

CHANOINE, J. P. **Selenium and thyroid function in infants, children and adolescents**, Biofactors, v. 19, n. 3-4, p. 137-143, 2003.

DAI, J.; LI, W.; CHANG, L.; ZHANG, Z.; TANG, C.; WANG, N.; ZHU, Y.; WANG, X. **Role of redox factor-1 in hyperhomocysteinemia-accelerated atherosclerosis**, Free Radical Biology & Medicine, v. 41, n. 10, p. 1566-1577, 2006.

DEON, M.; WAJNER, M.; SIRTORI, L.R.; FITARELLI, D.; COELHO, D.M.; SITTA, A.; BARSCHAK, A.G.; FERREIRA, G.C.; HAESER, A.; GIUGLIANI, R.; VARGAS, C.R. **The effect of Lorenzo's oil on oxidative stress in X-linked adrenoleukodystrophy**. Journal of the Neurological Science, v. 247, n. 2, p. 157-164, 2006.

DIEKMAN, T.; DEMACKER, P.N.; KASTELEIN, J.J.; STALENHOF, A.F.; WIERSINGA, W.M. **Increased oxidizability of low-density lipoproteins in hypothyroidism**, The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v. 83, n. 5, p. 1752-1755, 1998.

DIEKMAN, M.J.; VAN DER PUT, N.M.; BLOM, H.J.; TIJSSEN, J.G.; WIERSINGA, W.M. **Determinants of changes in plasma homocysteine in hyperthyroidism and hypothyroidism**, Clinical Endocrinology, v. 54, n. 2, p. 197-204, 2001.

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

DUNTAS, L.H. **Oxidants, antioxidants in physical exercise and relation to thyroid function**, Hormone and Metabolic Research, v. 37, n. 9, p. 572-576, 2005.

DRÖGE, W. **Free radicals in the physiological control of cell function**. Physiological Reviews, v. 82, p. 47-95, 2002.

ERDAL, M., SAHIN, M., HASIMI, A., UCKAYA, G., KUTLU, M., SAGLAM, K. **Trace element levels in Hashimoto thyroiditis patients with subclinical hypothyroidism**, Biological Trace Element Research, v.123, n. 1-3, p. 1-7, 2008.

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 Laboratory Medicine, v. 46, p. 1004-1010, 2008.

EUGSTER, E.A.; LEMAY, D.; ZERIN, J.M.; PESCOVITZ, O.H. **Definitive diagnosis in children with congenital hypothyroidism**, The Journal of Pediatrics, v.144, 643-647, 2004.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. **Radicais Livres: conceito, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo**, Revista da Associação Médica Brasileira, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FONTELLA, F.U.; PULROLNIK, V.; GASSEN, E.; WANNMACHER, C.M.; KLEIN, A.B.; WAJNER, M.; DUTRA-FILHO, C.S. **Propionic and L-methylmalonic acids**

**induce oxidative stress in brain of young rats.** Neuroreport, v.11, p. 541-544, 2000.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. **Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significant,** American Journal of Clinical Nutrition, v. 57, n. 5, p. 715s- 725s, 1993.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in biology and medicine.** 4 ed. New York: Oxford University Press, 2007. 851p.

HENRY, J.B.; ALEXANDER, D.R.; ENG, C.D. **Avaliação da função endócrina.** In: Henry, J.B. Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais. 19. ed. São Paulo: Manole, 1999. Cap. 16. p. 322-373.

HUSSEIN, W.I.; GREEN, R.; JACOBSEN, D.W.; FAIMAN, C. **Normalization of hyperhomocysteinemia with L-thyroxine in hypothyroidism,** Annals of Internal Medicine, v. 131, n. 5, p. 348-351, 1999.

JAIN, V.; AGARWAL, R.; DEORARI, A.K.; PAUL, V.K. **Congenital hypothyroidism.** Indian Journal of Pediatrics, v. 75, p. 363-367, 2008.

JIN, L.; CALDWELL, R.B.; LI-MASTERS, T.; CALDWELL, R.W. **Homocysteine induces endothelial dysfunction via inhibition of arginine transport,** Journal of Physiology and Pharmacology, v. 58, n. 2, p. 191-206, 2007.

KÖLKER, S.; AHLEMEYER, B.; KRIEGLSTEIN, J.; HOFFMANN, G.F. **Contribution of reactive oxygen species to 3-hydroxyglutarate neurotoxicity in primary neuronal cultures from chick embryo telencephalons.** Pediatric Research, v. 50, p. 76-82, 2001.

KRATZSCH, J. **Thyroid gland development and defects.** Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, v. 22, p. 57-75, 2008.

KREISNER, E.; CAMARGO-NETO, E.; MAIA, C. R.; GROSS, J. L. **Accuracy of ultrasonography to establish the diagnosis and aetiology of permanent primary congenital hypothyroidism,** Clinical Endocrinology, v. 59, p. 361–365, 2003.

LATINI, A.; BORBA ROSA, R.; SCUSSIATO, K.; LLESUY, S.; BELLÓ-KLEIN, A.; WAJNER, M. **3-Hydroxyglutaric acid induces oxidative stress and decreases the antioxidant defenses in cerebral cortex of young rats.** Brain Research, v. 956, p. 367-373, 2002.

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

MEDEIROS-NETO, G.; KNOBEL, M. **Hipotireoidismo Congênito no Brasil Desafios à busca de soluções.** São Paulo. Conectfarma Publicações Científicas, 2008, 194 p.

NANDA, N.; BOBBY, Z.; HAMIDE, A. **Oxidative stress and protein glycation in primary hypothyroidism. Male/female difference.** Clinical and Experimental Medicine, v. 8, p. 101-108, 2008.

NEDREBØ, B.G.; ERICSSON, U.B.; NYGÅRD, O.; REFSUM, H.; UELAND, P.M.; AAKVAAG, A.; AANDERUD, S.; LIEN, E. A. **Plasma total homocysteine levels in hyperthyroid and hypothyroid patients**, Metabolism: Clinical and Experimental, v. 47, n. 1, p. 89-93, 1998.

OLIVERI, O., GIRELLI, D., AZZINI, M., STANZIAL, AM., RUSSO, C., FERRONI, M., CORROCHER, R. **Low selenium status in the elderly influences thyroid hormones.** Clinical Science, v. 89, n. 6, p. 637-642, 1995.

ORZECZOWSKA-PAWIŁOJC, A.; LEWCZUK, A.; SWORCZAK, K. **The influence of thyroid hormones on homocysteine and atherosclerotic vascular disease**, Endokrynologia Polska, v. 56, n. 2, p. 194-202, 2005.

PASQUINI, J.M.; ADAMO, A.M. **Thyroid hormones and the central nervous system**, Developmental Neuroscience, v.16 n. 1-2, p. 1-8, 1994.

RAMOS-VASCONCELOS, G.R.; ALVES, A.L.H.; HERMES-LIMA, M. **Radicaís livres, antioxidantes e a adaptabilidade animal.** In: EL-HANI, C.N. & VIDEIRA, A.A.P. O Que é Vida: Para Entender a Biologia do Século XXI. 1. ed. Rio de Janeiro: Relume Dumará, 2000. Cap. 9. p. 209-231.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia.** 6<sup>o</sup> ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2007, 704 p.

RAHAMAN, S.O.; GHOSH, S.; MOHANAKUMAR, K.P.; DAS, S.; SARKAR, P.K. **Hypothyroidism in the developing rat brain is associated with marked oxidative stress and aberrant intraneuronal accumulation of neurofilaments**, Neuroscience Research, v. 40, n. 3, p. 273-9, 2001.

RESCH, U.; HELSEL, G.; TATZBER, F.; SINZINGER, H. **Antioxidant status in thyroid dysfunction**, Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, v. 40, n. 11, p. 1132-114, 2002.

ROSE, S.R. E BROWN, R.S. **Update of Newborn Screening and Therapy for Congenital Hypothyroidism.** American Academy of Pediatrics, v. 117, p. 2290-2303, 2006.

SCHULZ, J.B.; LINDENAU, J.; SEYFRIED, J.; DICHGANS, J. **Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration.** European Journal of Biochemistry, v. 267, p. 4904-4911. 2000.

SCHWEIZER, U.; BRÄUER, A.U.; KÖHRLE, J.; NITSCH, R.; SAVASKAN, N.E. **Selenium and brain function: a poorly recognized liaison.** Brain Research Reviews, v. 45, p. 164-178, 2004.

SELVA, K.A.; MANDEL, S.H.; RIEN, L.; SESSER, D.; MIYAHIRA, R.; SKEELS, M.; NELSON, J.C.; LAFRANCHI, S.H. **Initial treatment dose of L-thyroxine in congenital hypothyroidism.** Journal of Pediatrics, v. 141, p. 786-792, 2002.

SENGÜL, E.; CETINARSLAN, B.; TARKUN, I.; CANTÜRK, Z.; TÜREMEN, E. **Homocysteine concentrations in subclinical hypothyroidism.** Endocrine Research, v. 30, n. 3, p. 351-359, 2004.

SETIAN, N. **Hipotireoidismo na criança: diagnóstico e tratamento.** Jornal de Pediatria, v. 83, n. 5, p. 209-216, 2007.

SIRTORI, L.R.; DUTRA-FILHO, C.S.; FITARELLI, D.; SITTA, A.; HAESER, A.; BARSCHAK, A.G.; WAJNER, M.; COELHO, D.M.; LLESUY, S.; BELLO-KLEIN, A.; GIUGLIANI, R.; DEON, M.; VARGAS, C.R. **Oxidative stress in patients with phenylketonuria.** Biochimica and Biophysica Acta, v. 1740, p. 68-73, 2005.

SITTA, A.; BARSCHAK, A.G.; DEON, M.; MARI, J.F.; BARDEN, A.T.; VANZIN, C.S.; BIANCINI, G.B.; SCHWARTZ, I.V.D.; WAJNER, M.; VARGAS, C.R. **L-Carnitine Blood Levels and Oxidative Stress in Treated Phenylketonuric Patients.** Cellular and Molecular Neurobiology, v. 29, p. 211–218, 2009.

STRECK, E.L.; VIEIRA, P.S.; WANNMACHER, C.M.; DUTRA-FILHO, C.S.; WAJNER, M.; WYSE, A.T. **In vitro effect of homocysteine on some parameters of oxidative stress in rat hippocampus.** Metabolic Brain Disease, v.2, p. 147-154, 2003.

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, p. 469–474, 2009.

VARGAS, C.R.; WAJNER, M.; SIRTORI, L.R.; GOULART, L.; CHIOCHETTA, M.; COELHO, D.; LATINI, A.; LLESUY, S.; BELLO-KLEIN, A.; GIUGLIANI, R.; DEON, M.; MELLO, C.F. **Evidence that oxidative stress is increased in patients with X-linked adrenoleukodystrophy.** Biochimica et Biophysica Acta, n.1688, v. 1, p. 26-32, 2004.

WENDEL, A. **Glutathione peroxidase,** Methods in Enzymology, v. 77, p. 325-333, 1981.