



UNIVERSIDADE PRESBITERIANA MACKENZIE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



BEATRIZ MARTIN COVIELLO

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MOLECULARES
ASSOCIADAS AO PREJUÍZO COGNITIVO EXIBIDO POR
CAMUNDONGOS ADULTOS QUE CARREGAM O
POLIMORFISMO GENÉTICO ALA92-D2**

São Paulo

2022

BEATRIZ MARTIN COVIELLO

**Avaliação das alterações moleculares associadas ao
prejuízo cognitivo exibido por camundongos adultos que
carregam o polimorfismo genético Ala92-D2**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Centro de Ciências
Biológicas e da Saúde, da Universidade
Presbiteriana Mackenzie, como requisito
parcial à obtenção de título de Bacharel em
Ciências Biológicas, orientado
pela Profa. Dra. Miriam Oliveira Ribeiro.

São Paulo, SP

2022

BEATRIZ MARTIN COVIELLO

Avaliação das alterações moleculares associadas ao prejuízo cognitivo exibido por camundongos adultos que carregam o polimorfismo genético Ala92-D2.

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Centro de Ciências
Biológicas e da Saúde, da Universidade
Presbiteriana Mackenzie, como requisito
parcial à obtenção de título de Bacharel em
Ciências Biológicas, orientado
pela Prof^a. Dr^a. Miriam Oliveira Ribeiro.

Aprovado(a) em

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Miriam Oliveira Ribeiro
Universidade Presbiteriana Mackenzie

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Pimentel Costa
Universidade Presbiteriana Mackenzie

Prof^a. Dr^a. Esther Lopes Ricci Adari Camargo
Universidade Presbiteriana Mackenzie

AGRADECIMENTOS

Agradeço, a minha professora e orientadora Miriam Ribeiro pela confiança, colaboração, ensinamentos e oportunidades durante o processo de realização deste estudo e da graduação. Sua ajuda e suporte que foram essenciais durante minha formação acadêmica.

A Universidade Presbiteriana Mackenzie e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela disponibilidade do espaço para pesquisa, equipamentos e suporte financeiro. Agradeço ao Departamento Ciências Biológicas e da Saúde, todos os seus docentes e ao coordenador Adriano de Castro pela ótima formação e ensinamentos tanto acadêmicos quanto pessoais.

Aos alunos de pós-graduação do laboratório de Neurociência e Metabolismo Energético, Samuel e Fernando e do Laboratório de Fisiologia Animal e Comparada, Lorena, Guilherme e Leonardo por todo conhecimento transmitido, colaboração, simpatia, companheirismo e ótimos momentos compartilhados durante meu período de graduação e produção do TCC.

Por fim, agradeço aos meus pais, Antonio e Denise, a minha irmã, Bruna e aos familiares e amigos que sempre me apoiaram e deram suporte durante todas as etapas para que eu chegasse até aqui.

RESUMO

O polimorfismo Ala92-D2 é uma alteração genética da enzima que catalisa a conversão de T4 a T3, a desidase do tipo 2, e está presente em uma porção significativa da população mundial (12 a 36%). A Ala92-D2 exibe baixa atividade catalítica, está associada ao estresse do Retículo Endoplasmático (RE) e a prejuízos na cognição. Resultados prévios obtidos em nosso laboratório mostram que os prejuízos de memória dos camundongos Ala92-D2 pioram significativamente aos sete meses de idade. A performance dos animais no teste de reconhecimento social é boa aos 2 meses, com os animais Ala92-D2 sendo capazes de discriminar entre o animal conhecido e o desconhecido. No entanto, aos 7 meses de idade, essa capacidade de discriminação é perdida. Tendo como hipótese que a piora na cognição se deve ao agravamento do hipotireoidismo local associado ao estresse do retículo endoplasmático, ao aumento do estresse oxidativo e à neuro inflamação, o objetivo deste trabalho foi avaliar alterações moleculares em camundongos Ala92-D2 aos 7 meses de idade. Para tanto, amostras de hipocampo e córtex pré-frontal de animais Ala92-D2 e Thr92-D2 de 7 meses de idade foram congeladas previamente a -80°C para análise do transcriptoma por RNA *sequencing*. Os resultados do presente estudo demonstraram que o polimorfismo está associado com alterações no transcriptoma do hipocampo e córtex pré-frontal, com alterações nos genes associados com cognição, memória e neurodesenvolvimento. Além disso, observamos uma redução na densidade neuronal da região CA3 do hipocampo de animais portadores Ala92-D2. Os achados confirmam o polimorfismo Ala92-D2 como um possível fator de risco de declínio cognitivo associado ao envelhecimento.

Palavras-chave: polimorfismo, Hipotireoidismo, memória, Ala92-D2, desidase.

ABSTRACT

The Ala92-D2 polymorphism is a genetic mutation in the enzyme that catalyzes the conversion of T4 to T3, the type 2 deiodinase, that is present in a significant portion of the world population (12 to 36%). Ala92-D2 exhibits low catalytic activity, which is associated with the stress of the Endoplasmic Reticulum (ER), memory, and exploratory behavior impairment. Previous results from our laboratory show that memory impairments in Ala92-D2 mice significantly worsen at seven months old. The animal's performance in the social recognition test is good at 2 months, with the Ala92-D2 animals being able to discriminate between the known and the unknown animal. However, at 7 months old, this ability to discriminate is lost. Considering this data, we hypothesized that the worsening in cognition could be due to the chronification of local hypothyroidism associated with increased oxidative stress and neuroinflammation; the aim of this work is to evaluate molecular changes in Ala92-D2 mice at 7 months old. If the phenotype abnormalities result from local hypothyroidism, short-term treatment with T3 (10 days) should be able to reverse them. To test our hypothesis, samples of the hippocampus, amygdala, striatum, cerebellum, and prefrontal cortex from 7 months old Ala92-D2 and Thr92-D2 mice were frozen at -80°C to perform the analysis of the transcriptome by RNA sequencing. The results of the present study demonstrated that the polymorphism is associated with alterations in the transcriptome of the hippocampus and prefrontal cortex, with changes in genes associated with cognition, memory and neurodevelopment. In addition, we observed a reduction in neuronal density in the CA3 region of the hippocampus of Ala92-D2 carrier animals. The findings confirm the Ala92-D2 polymorphism as a possible risk factor for cognitive decline associated with aging.

Keywords: polymorphism, hypothyroidism, memory, Ala92-D2, deiodinase.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
JUSTIFICATIVA.....	10
2. OBJETIVOS	10
2.1 OBJETIVO GERAL	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
3. MÉTODOS	10
3.1 ANIMAIS	10
3.2 ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA POR RNA <i>SEQUENCING</i>	11
3.3 ANÁLISE DE AMOSTRAS DO CÓRTEX E HIPOCAMPO PELO PROGRAMA QUPATH	11
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	12
4. RESULTADOS	12
4.1 ANÁLISE DOS GENES QUE APRESENTAM VARIAÇÃO EM AMOSTRAS DO HIPOCAMPO E CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DE CAMUNDONGOS	12
4.2 ANÁLISE DE AMOSTRAS DO CÓRTEX E HIPOCAMPO NO PROGRAMA QUPATH.....	16
5. DISCUSSÃO	18
6. CONCLUSÃO	22
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

1. INTRODUÇÃO

Os hormônios tireoidianos (HTs) são fundamentais nos indivíduos desde a fase embrionária e ao longo de toda a vida pós-natal. Os HTs, tiroxina (T4) e triiodotironina (T3), são compostos iodados sintetizados pela glândula tireoide, processo que se inicia justamente pelo transporte de iodo para dentro da célula folicular da tireoide por meio do co-transportador Na^+/I^- (DAI; et al., 1996). Após sua oxidação, o I^0 é incorporado a resíduos de tirosina da proteína tireoglobulina (Tg) gerando a monoiodotironina, MIT, e a di-iodotironina, DIT que, após a reação de acoplamento, formarão T3 (MIT + DIT) ou T4 (DIT + DIT) (YEN, 2001).

A maior parte do HT sintetizado é o T4 (80%) considerado um pró-hormônio, pois precisa ser ativado a T3, sua forma biologicamente ativa (ENGLER; BURGER, 1948), uma vez que os receptores de HTs (TRs) exibem alta afinidade pelo T3 (WAGNER, 2001). Aproximadamente 80% do T3 circulante é gerado a partir da desiodação do T4 como resultado da ação das enzimas desiodases (BIANCO; KIM, 2006) e apenas 20% é sintetizado pela tireoide.

As iodotironinas desiodases pertencem a uma família de selenoenzimas que possuem propriedades catalíticas de ativação ou inativação de HTs por desiodação do anel fenólico ou tirosínico da molécula do T4, respectivamente. Existem três tipos de desiodases nos mamíferos: desiodase tipo 1 (D1), desiodase tipo 2 (D2) e desiodase tipo 3 (D3). A D1 e a D2 são capazes de gerar T3. Já a D3, remove o iodo do anel interno do T4 gerando o rT3, uma forma inativa do hormônio (MEYER; WAGNER; MAIA, 2007).

A D1 está presente em ratos e humanos no fígado, rins, tireoide e glândula pituitária, no sistema nervoso central (SNC) apenas em ratos e é a única que catalisa a desiodação do anel externo e interno gerando, a partir de cada substrato, T3, rT3 ou T2. Exibe uma fraca atividade catalítica para remover o iodo do anel interno do T4 e sua atuação é aumentada no hipertireoidismo e diminuída no hipotireoidismo (BIANCO et al., 2002; WILLIAMS, 2008).

A D2 está altamente presente no SNC, adeno-hipófise, tecido adiposo marrom, placenta, tireoide, coração e músculo esquelético. Sua atividade de desiodação é exclusiva no anel externo das iodotironinas, resultando em um papel essencial em diferentes tecidos para ativação do T4 em T3 (BIANCO et al., 2002).

O T3 exerce sua atividade biológica regulando a expressão gênica através de sua interação com os TRs, presentes em praticamente todos os tecidos. Processos fundamentais do SNC como proliferação, diferenciação, mielinização, sinalização, migração celular (ROMAN et al., 2015) e desenvolvimento de neurônios dependem da ação do T3 (STENZEL; HUTTNER, 2013). Os HTs estão diretamente relacionados com os processos de desenvolvimento do cérebro como sinaptogênese, migração celular e formação e sinalização neuronal (BERNAL; NUNES, 1995). Durante a vida adulta, o sistema endócrino e nervoso mantém a interação essencial para a regulação do funcionamento de neurônios e células da glia (KRAUSE et al., 2011). De acordo com Cooke et al. (2014), adultos hipotiroideos apresentam volume menor e prejuízo na atividade do hipocampo.

A região do hipocampo e córtex cerebral apresentam uma alta expressão de proteínas como o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) (SHABANI et al., 2019). O BDNF, produzido pelos neurônios, está envolvido em processos como a neurogênese, manutenção neural, plasticidade sináptica e promoção da potenciação de longo termo (LTP) dessas regiões (GAZZANIGA, 2000), além de estar relacionado com a síntese e consolidação de novas memórias (ALLEN et al., 2013). Estudos mostram uma associação do hipotireoidismo com prejuízos na cognição, funções executivas e principalmente na memória (CORREIA et al., 2009) e que baixos níveis de BDNF no hipocampo reduzem a magnitude do LTP (MA et al., 1998). Além disso, a disfunção tireoidiana está relacionada diretamente com prejuízos na consolidação e evocação da memória, pois o hipocampo, região chave para a formação da memória, é sensível ao T3. (TAN et al., 2009; ETGEN et al., 2010).

Um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) identificado como rs225014 localizado no éxon 2 do gene da D2 causa uma troca no aminoácido 92 da proteína (DORA et al., 2010; GUO et al., 2004), resultando na troca do aminoácido treonina (Thr) pelo aminoácido alanina (Ala) (MENTUCCIA et al., 2002). Esse polimorfismo está presente em cerca de 12% a 36% da população e está associado com redução

no QI, bipolaridade, Diabetes tipo 2, resistência à insulina, suscetibilidade a lesão pulmonar, osteoartrite, hipertensão e doença de Alzheimer (MCANINCH et al., 2018; MENTUCCIA et al., 2002; GUO et al., 2004; DORA et al., 2010).

Recentemente, um modelo animal que expressa o Thr92Ala-D2 foi desenvolvido de modo a compreender as alterações moleculares e fenotípicas resultantes desse polimorfismo da D2. A avaliação do comportamento dos animais portadores do polimorfismo Thr92Ala -D2 mostrou que, quando comparados com o grupo controle, exibem menor atividade locomotora, maior tempo de sono e prejuízos moderados na cognição (JO et al.; 2019).

É possível que essas alterações comportamentais sejam resultado do hipotireoidismo observado localmente no hipocampo e no estriado, uma vez que houve uma redução na sinalização T3-TR no tecido estriado de animais Ala92-Dio2. Outras observações nos camundongos e que podem estar envolvidas no seu fenótipo são o estresse no retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi e estresse oxidativo, confirmados em células que expressam o polimorfismo Thr92Ala-D2 que apresentaram diminuição dos genes envolvidos na sinalização do Receptor de Fator de Crescimento Epitelial (EGFR). Após a confirmação desses achados, ao serem tratados com T3 por um curto período (1 μ /d por 10 dias), seus fenótipos foram parcialmente restaurados (JO et al., 2019).

Resultados prévios obtidos em nosso laboratório mostraram que os prejuízos moderados na memória dos camundongos Ala92-D2 de 2 meses pioram significativamente aos 7 meses de idade. Além disso, observamos que a memória de trabalho, parte integrante das funções executivas, também se apresenta comprometida nos animais Ala92-D2 aos 7 meses de idade.

O tratamento dos animais com T3 por 10 dias (1 μ /d) reverteu o fenótipo apresentado pelos animais Ala92-D2 (Figuras 1A e 1B), corroborando a ideia de que o hipotireoidismo local resultante da menor atividade catalítica da D2 polimórfica pode ser a causa dessas alterações na cognição.

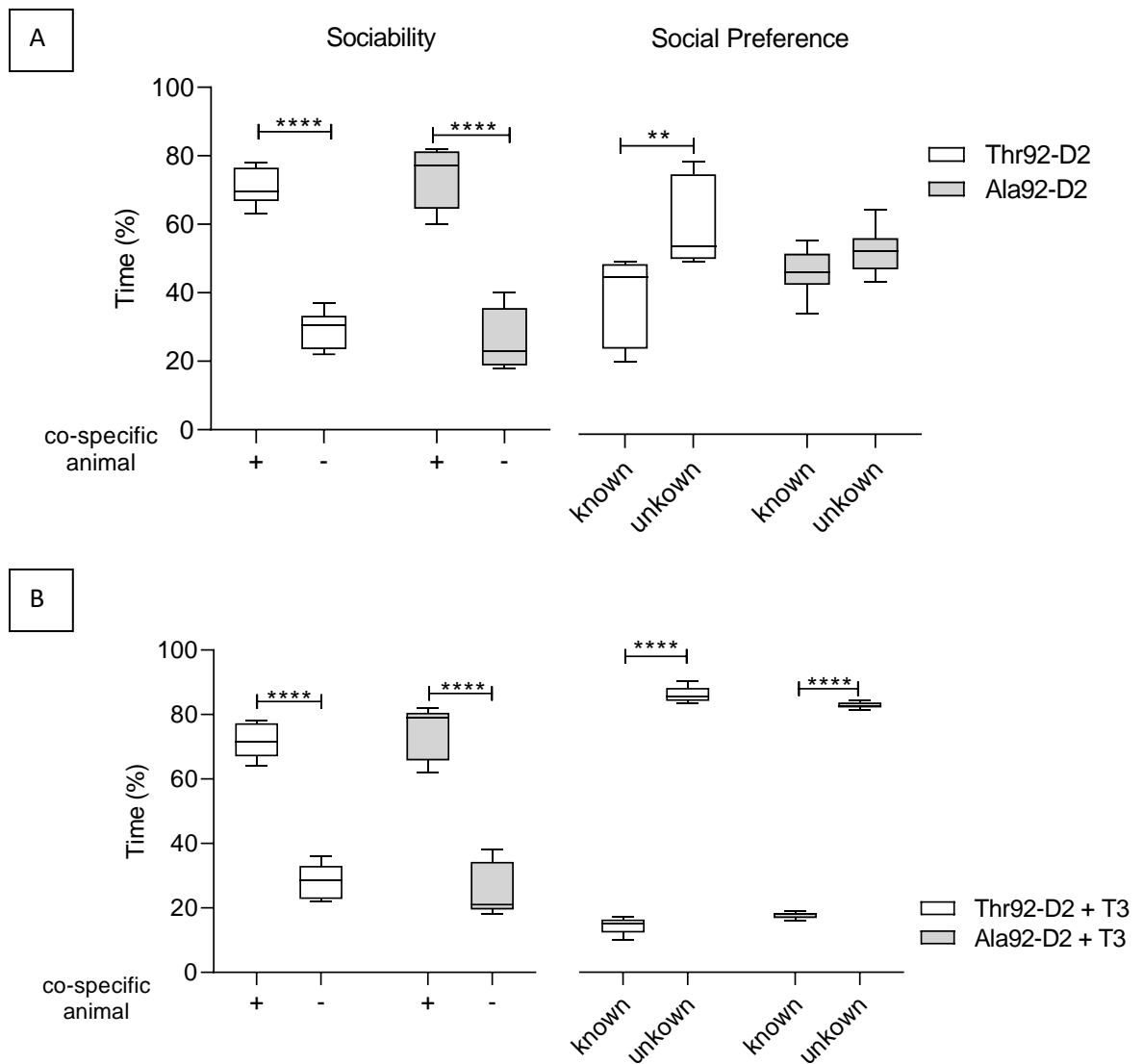


Figura 1. Avaliação da sociabilidade e da memória declarativa de camundongos Thr92-D e Ala92-Dio2. A diferença significativa entre as médias foi avaliada por meio do ANOVA de 2 vias seguida do pós-teste de Bonferroni com $p < 0,05$. $n = 6-7$ /grupo. LORENA et al., 2022.

Tendo como hipótese que a piora na cognição se deve ao agravamento do hipotireoidismo local associado ao estresse do retículo endoplasmático rugoso, ao aumento do estresse oxidativo e à neuro inflamação, o objetivo deste estudo foi avaliar as alterações no transcriptoma resultantes do polimorfismo Thr92Ala-D2.

Pretendeu-se com esse projeto contribuir com os estudos sobre os efeitos do SNP Thr92Ala-D2 no organismo que pode favorecer a piora na cognição associada ao envelhecimento.

JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a presença do polimorfismo Ala92-D2 em até 36% da população mundial (DORA et al., 2010), e sua relação direta com a memória e outras patologias (MCANINCH et al., 2018) é importante compreender os mecanismos associados ao polimorfismo e quais possíveis tratamentos apresentam impacto positivo nos aspectos cognitivos desses indivíduos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar quais os mecanismos envolvidos nas alterações fenotípicas observadas na memória de camundongos machos com o polimorfismo Ala92-D2 na idade de sete meses.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as alterações no transcriptoma de camundongos Ala92-D2.
- Avaliar as alterações morfológicas no hipocampo e córtex retro esplenial.

3. MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética para o uso de Animais da Universidade Presbiteriana Mackenzie (UPM) (CEUA/UPM N° 180-10-2019). Os camundongos utilizados no estudo foram reproduzidos no Biotério Central da UPM e apresentam o mesmo polimorfismo da D2 encontrado em humanos.

Os camundongos utilizados foram criados a partir da tecnologia CRISPR com a mutação Ala92-D e controle “humanizados” com a treonina Thr92-D, uma vez que a posição 92 no gene Dio2 em humanos é uma treonina, em camundongos é uma prolina (JO et al.; 2019). O grupo Thr92-D2 será considerado controle, enquanto o grupo Ala92-D2 será considerado mutante. Os animais serão divididos nos seguintes grupos:

- **Thr92-D2 7m** (n= 9): Camundongos de 7 meses de vida “humanizados”, com treonina na posição 92;

- **Ala92-D2 7m** (n= 9): Camundongos de 7 meses de vida com a substituição da treonina pela alanina na posição 92 da D2.

3.2 ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA POR RNA *SEQUENCING*

Foi feita a análise do transcriptoma do hipocampo e córtex pré-frontal, dos animais de 7 meses de idade, por meio da técnica de RNA *sequencing* no laboratório do Prof. Antonio Bianco da Universidade de Chicago. A técnica permitiu a análise dos padrões de expressão dos genes através do sequenciamento em larga escala das amostras de RNA contidas nas regiões do córtex e hipocampo dos camundongos. Brevemente, o RNA foi isolado do hipocampo, amígdala, córtex pré-frontal e cerebelo dos camundongos usando o RNeasy Kit (Qiagen). A degradação do RNA foi monitorada usando um BioAnalyzer (Agilent). Amostras de RNA total com RIN > 9,2 foram enviadas para o The Genomic Center Facility na Universidade de Chicago para preparação e sequência da biblioteca. As bibliotecas foram sequenciadas em pares com NovaSeqS4 (Illumina). Chamadas de base e de multiplexação foram realizadas com o software bcl2fastq da Illumina e um programa de desmultiplexação Python personalizado com no máximo uma incompatibilidade na leitura de indexação. Os arquivos FASTQ foram alinhados ao transcriptoma gencode. vM24 com STAR (v.2.6.1d) usando a plataforma de fluxo Partek (Partek Inc.).

3.3 ANÁLISE DE AMOSTRAS DO CÓRTEX E HIPOCAMPO PELO PROGRAMA QUPATH

Com a intenção de compreender a existência ou não da relação entre a densidade neuronal das regiões do cérebro e as características fenotípicas associadas ao polimorfismo, lâminas histológicas preparadas com Violeta de Cresil foram enviadas ao laboratório do Prof. Antonio Bianco, na University of Chicago e escaneadas com Olympus VS200 Slide Scanner©.

Essas fotos então foram recebidas para que a análise dos neurônios e das regiões do hipocampo fossem feitas por meio do programa QuPath – 0.3.2. Lâminas com alturas semelhantes foram analisadas para permitir a comparação das regiões do hipocampo: CA1, CA2, CA3 e Giro Denteado.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada o teste t de *Student* paramétrico, não pareado. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DOS GENES QUE APRESENTAM VARIAÇÃO EM AMOSTRAS DO HIPOCAMPO E CÓRTEX PRÉ-FRONTAL DE CAMUNDONGOS

A fim de compreender quais genes estariam envolvidos nas alterações genotípicas apresentadas pelos animais, foi estudado o transcriptoma por meio do *RNA sequencing*. Foram incluídos na análise os genes que exibiram no mínimo 2 *fold change* acima ou abaixo quando comparados com os Thr92-D2.

Os genes alterados, nos animais Ala92-D2 em relação aos animais Thr92-D2 (sete meses), descritos abaixo (Tabela 1) demonstraram de fato a existência de variações nos padrões de expressão gênica significativas nesses animais. A maioria dos genes que apresentaram variações possuem uma correlação com cognição e possivelmente com alterações na memória.

A partir de uma revisão nas bases Gene Ontology e PubMed, para identificar os processos biológicos impactados e associados com as alterações do padrão de expressão gênica, observamos que a maior parte dos genes alterados no hipocampo e no córtex pré-frontal, parecem estar associados com memória e cognição (Figura 2).

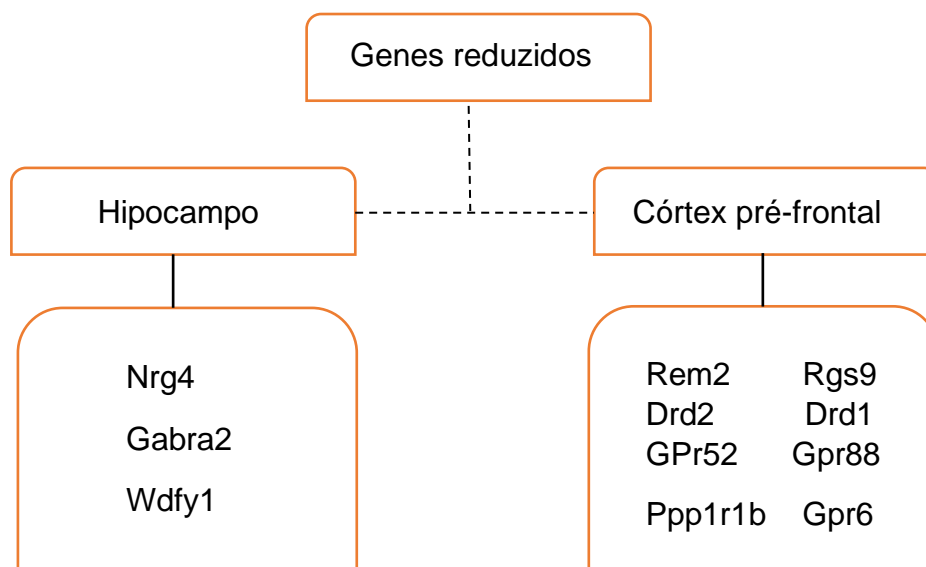


Figura 2. Genes reduzidos relacionados com memória, aprendizagem e/ou neurogênese.

Tabela 1 – genes alterados e descrição de seu papel principal nas regiões do Hipocampo e córtex pré-frontal.

Gene	Região	Descrição	Fold change (Ala vs Thr)	Valor de P
Nrg4	Hipocampo	regulador fisiológico no crescimento de dendritos nos neurônios médios espinhosos; Manutenção dos neurônios Piramidais e córtex motor	2,21	0,002415
Gabra2	Hipocampo	Memória espacial	2,35	9,456E-08
Fam205A4	Hipocampo	Função desconhecida	2,268313835	5,21476E-07
Fam205A3	Hipocampo	Função desconhecida	2,268308141	8,7949E-06
Zfp951	Hipocampo	Prevenção de câncer de fígado	-2,550210723	0,001654088
Zfp97	Hipocampo	Função desconhecida	-2,24855763	0,001038734
Wdfy1	Hipocampo	Inibe neurogênese pelo downregulation do WDFY1;	2,25	0,00003589
Nudt6	Córtex	Deposição de gordura; Câncer	-2,24	0,00005865
Pde10a	Córtex	Resposta Motivada; memória viso espacial	-2,79	0,00009547
Scn4b	Córtex	Depressão	-2,47	0,0001807
Syndig1L	Córtex	Desenvolvimento sináptico e de sinapses excitatórias	-4,07	0,0002531

Gene	Região	Descrição	Fold change (Ala vs Thr)	Valor de P
Rem2	Córtex	Memória (doença de Alzheimer); diminuição de botões dos dendritos	-3,07	0,0002827
Rgs9	Córtex	Aprendizagem; memória de trabalho alvo em disfunções motoras e cognitivas	-3,62	0,0003465
Adora2a	Córtex	Ansiedade	-5,47	0,0003472
Htr4	Córtex	Disfunções de humor	-3,8	0,0004247
Tac1	Córtex	Depressão e ansiedade	-3,18	0,0004796
Drd2	Córtex	Memória de trabalho	-5,06	0,000603
Mid1	Córtex	Associado com Opitz syndrome	2,15	0,0007567
Rxrg	Córtex	Câncer; Diabetes tipo 1	-2,97	0,0007662
Drd1	Córtex	Associado com TDAH; memória de trabalho	-3,34	0,0007676
Rarb	Córtex	Esquizofrenia	-2,46	0,001012
Gpr52	Córtex	Memória e memória de trabalho	-2,45	0,001245
Ppp1r1b	Córtex	Memória; memória declarativa, aprendizado	-2,71	0,001801
Ano2	Córtex	Ansiedade e memória do medo	-2,33	0,002818
Prkch	Córtex	Resposta antidepressiva	-2,33	0,002862
Gpr88	Córtex	Capacidade motora; memória espacial; ansiedade	-3,6	0,00393
Oprk1	Córtex	Dependência nicotina/álcool	-2,34	0,00472
Vipr2	córtex	Sensibilidade temporal relacionada a ações de reinicialização de estímulos fóticos	6,06	0,00591

Gene	Região	Descrição	Fold change (Ala vs Thr)	Valor de P
Slc9a4	córtex	Hormônios sexuais;	3,29	0,006122
Foxp2	córtex	Vocalização	-2,08	0,007211
Hydin	córtex	Cardiopatias e hidrocefalia; cílios e flagelos de células	2,21	0,007931
Gimap8	córtex	Desenvolvimento de células T e B; imunidade	-2,02	0,009875
Gpr6	córtex	Aprendizagem	-3,32	0,006892
Nexn	Córtex	Autismo; hipertrofia cardíaca	-2,63	0,000000722
Gng7	Córtex	Pré-eclâmpsia; câncer do esôfago	-2,01	0,00447
Pdny	Córtex	Receptor de opióide	-2,38	0,0000308
Gprin3	Córtex	Excitabilidade neural no estriado, comportamentos dependentes do estriado;	-2,37	0,0032
Lrrc10b	Córtex	Cardiomiopatias/coração;	-3,53	0,000219
Lhx9	Córtex	Expresso no córtex e hipocampo durante desenvolvimento do pró-encéfalo; diferenciação neural; relacionado com neurônios pioneiros do córtex.	3,34	3,77E-08
Penk	Córtex	Efeito na migração celular de Osteosarcomas; proliferação e diferenciação celular; desenvolvimento ocular	-2,88	0,00000891

Gene	Região	Descrição	Fold change (Ala vs Thr)	Valor de P
Lgr6	Córtex	Função fagocítica	3,99	0,00132
Tbata	Córtex	Regula função do timo	2,06	0,000000452
Slc35d3	Córtex	Deposição de gordura; atividade autofágica nos neurônios	-3,84	0,00111
Gpr149	Córtex	Fertilidade aumentada e ovulação aumentada	-3,34	0,000701

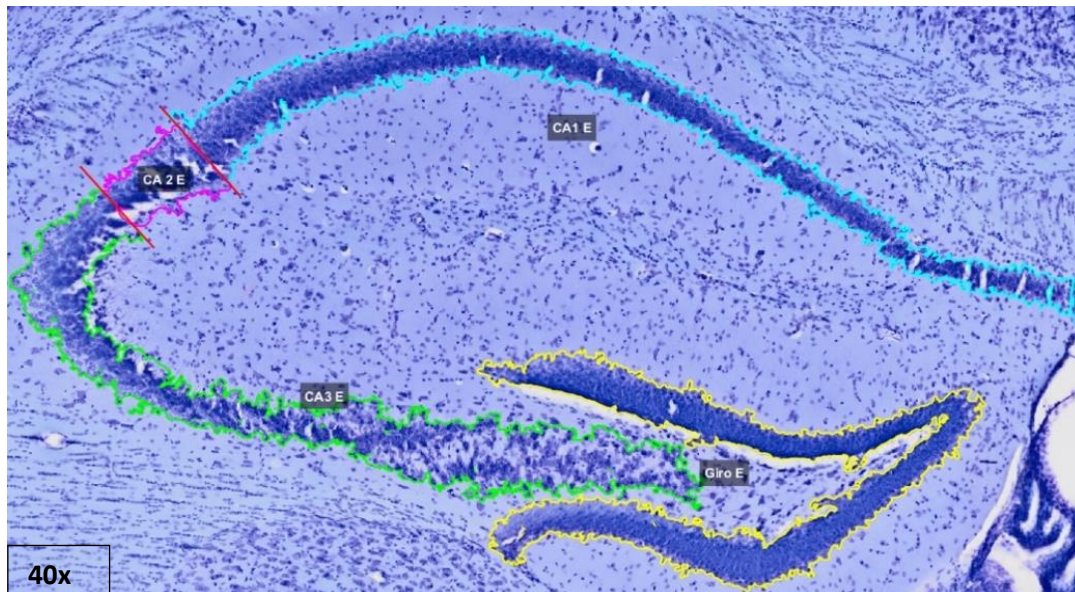
Fonte: Elaborada pela autora.

4.2 ANÁLISE DE AMOSTRAS DO CÓRTEX E HIPOCAMPO NO PROGRAMA QUPATH

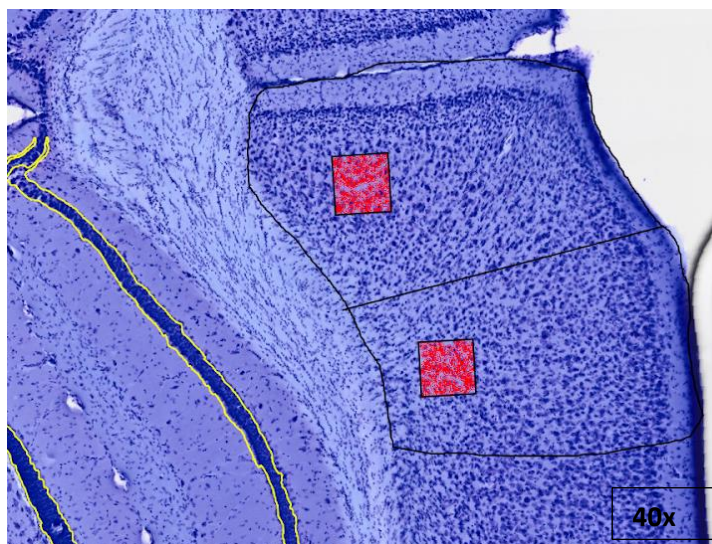
As regiões do hipocampo, CA1, CA2, CA3 e Giro Denteado e córtex pré-frontal (Figura 3) foram analisadas nos animais Ala92-D2 e Thr92-D2 e os resultados referentes a área e densidade neuronal encontram-se Tabela 2.

Não foram observadas diferenças entre as áreas das regiões do hipocampo. Por outro lado, os animais portadores da Ala92-D2A exibiram uma redução significativa na densidade neuronal na região CA3 quando comparada com os animais Thr92-D2 ($p=0,002$). As demais regiões CA1, CA2 e Giro Denteado não apresentaram diferenças significativas da densidade neuronal entre grupo controle e experimental ($p>0,05$).

Figura 3 – Hipocampo esquerdo com as regiões CA1 (azul), CA2 (rosa), CA3 (verde) e Giro Denteado (amarelo) demarcadas e Córtex pré-frontal. Coloração: Violeta de Cresil. Aumento 40x.



Fonte: Elaborada pela autora.



Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 2. Área e densidade neuronal do Hipocampo (CA1, CA2 e CA3), Giro dentado (GD) e córtex retrosplenial (RSC). Valores expressos como média±EPM. Análise estatística usando Teste T-student. (Thr-Dio2 n=6; Ala92-Dio2 n=4)

	Area	Parâmetro	Thr92-Dio2	Ala92-Dio2	P-value
<i>Hipocampo</i>		Área (mm ²)	117.7±7.07	110.1±6.54	0.464
	CA1				
		Densidade neuronal (n/mm ²)	10.1±0.24	10.1±0.63	0.992
		Área (mm ²)	16.6±0.70	14.8±1.69	0.35
	CA2				
		Densidade neuronal (n/mm ²)	10.6±0.51	9.7±0.81	0.412
		Área (mm ²)	100.3±5.93	132.2±16.8	0.124
	CA3				
		Densidade neuronal (n/mm ²)	10.2±0.30	8.5±0.13	0.002
		Área (mm ²)	144.6±16.39	116.9±11.55	0.216
	GD				
		Densidade neuronal (n/mm ²)	9.8±0.85	11.5±0.27	0.11
<i>RSC</i>	Ventral	Densidade neuronal (n/mm ²)	7.0±0.75	7.0±0.23	0.957
	Dorsal	Densidade neuronal (n/mm ²)	7.4±0.82	6.8±0.77	0.769

Fonte: Lorena *et al.* 2021

5. DISCUSSÃO

O polimorfismo Ala92-D2 resulta em alterações moleculares e fenotípicas dos indivíduos afetados. Os animais apresentam um genótipo com modificações significantes em genes do hipocampo e córtex retrosplenial relacionados com memória, aprendizagem e neurogênese, além de um fenótipo comprometido conforme a progressão etária.

Machos portadores do polimorfismo exibiram diversos genes alterados nas regiões do córtex pré-frontal e hipocampo, dentre eles os genes *Nrg4*, *Gabra2*, *Wdfy1*, *Rem2*, *Rgs9*, *Drd2*, *Drd1*, *Gpr52*, *Ppp1r1b*, *Gpr88*, *Gpr6* e *Lhx9*, reduzidos, que estão diretamente envolvidos com a memória, desenvolvimento neural ou aprendizagem.

Os achados do presente estudo mostram os genes *Nrg4*, *Gabra2* e *Wdfy1* (Valores de P: $2,415E^{-03}$; $9,456E^{-08}$; $3,589E^{-05}$, respectivamente) alterados em amostras do hipocampo de animais Ala92-D2. Da família do fator de crescimento epidérmico (EGF), a neurogulina 4 (*Nrg4*) altamente expressa no tecido adiposo marrom, era descrita com quase ou nenhuma expressão em cérebros adultos (HARARI, D. et. al, 1999). Entretanto, Paramo et.al. (2018) trouxe a primeira evidência da sua importância por meio da confirmação do seu papel na manutenção neuronal e para o neurodesenvolvimento. O *Gabra2*, codificador da subunidade receptora A do GABA_A, quando alterado, está relacionado com doenças do neurodesenvolvimento como a do espectro autista. Além de ser uma isoforma de receptor para o GABA, considerado o principal neurotransmissor de ação inibitória de sinapses do cérebro adulto (HOGART, A. et. al.; 2007; DIXON, C.I et. al.; 2008). Já o gene *Wdfy*, está envolvido no processo de inibição da neurogênese, diminuindo a habilidade de células tronco neurais realizarem diferenciação (YEO, J.I, et al.; 2019).

Quanto a região do córtex, os genes alterados que se relacionam com o fenótipo apresentado pelos animais são: *Rem2*, *Rgs9*, *Drd2*, *Drd1*, *GPr52*, *Ppp1r1b*, *gpr88* e *Gpr6* (Valores de P: $2,827E^{-04}$; $3,465E^{-04}$; $6,030E^{-04}$; $7,676E^{-04}$; $1,245E^{-03}$; $1,801E^{-03}$; $3,930E^{-03}$; $6,892E^{-03}$, respectivamente). Altamente expresso no sistema Nervoso Central, o *Rem2* possui um papel na regulação do desenvolvimento de células da barreira cortical de camundongos (ZHANG, T.; 2019). Com o papel de modulação negativa da sinalização do receptor de dopamina e opioides, o *Rgs9*, quando suprimido em ratos mostrou-se relacionado com a diminuição da coordenação motora e deficiências na memória de trabalho (BLUNDELL et al.; 2008).

Os genes *Drd1* e *DRd2* são receptores de dopamina D1 ou D2 no córtex pré-frontal. O primeiro possui um papel significativo na sinalização que molda a atividade do córtex durante a utilização da memória de trabalho e o aumento na sua sinalização está relacionado com um melhor desempenho da memória de trabalho em estudos com primatas não humanos (VIJAYRAGHAVAN et al.; 2007; FAZIO et al.; 2018).

Em ratos, quando o *Drd2* se apresenta super expresso, observa-se deficiências em tarefas de memória de trabalho, mas não problemas na memória espacial; KELLENDONK et al.; 2006).

O gene GPr52 está associado com a modulação da proteína mutante de huntingtina, codificada pelo gene huntingtina que causa a doença de Huntington, uma doença neurodegenerativa monogenética (CONGCONG et al.; 2020). Além disso o gene é altamente identificado nas regiões cerebrais envolvidas com funções cognitivas, como o córtex pré-frontal. O agonista do gene GPr52, o 4-(3-(3-fluoro-5-(trifluorometil)benzil)-5-metil-1H-1,2,4-triazol-1-il)-2metilbenzamida (FTBMT), mostrou-se capaz de melhorar o reconhecimento e a memória espacial de trabalho em ratos (NISHIYAMA et al.; 2017).

Animais knockout de Ppp1r1b mostraram prejuízo na memória e aprendizado (AVANES et al.; 2019), e seu polimorfismo (rs879606) está relacionado com influência no volume de matéria cinza frontal e memória episódica em humanos (JONAS, 2016).

Animais que apresentam *knockout* para o gene Gpr88 apresentaram piores resultados em testes de memória que sugerem o papel desse gene em circuitos de memória de trabalho, uma vez que sua performance foi diminuindo conforme a progressão da dificuldade da tarefa, quando comparado com o fenótipo selvagem. Os resultados gerais mostraram uma redução na performance de memória de trabalho destes animais Gpr88 KO (THOMPSON et al.; 2020).

Por fim, o gene Gpr6, receptor de proteína específica do estriado está diretamente associado com a taxa de aprendizagem de reforço em humanos (COLLINS; FRANK; 2012). Desse modo, a alteração desses genes em animais com fenótipo comportamental e de aprendizado alterados se justifica a partir da função que cada gene exerce nas diferentes regiões cerebrais. Entretanto algumas descrições dos genes alterados, como a do gene Drd2, não corroboram com os achados do estudo, uma vez que o prejuízo em tarefas de memória de trabalho está ligado à sua super expressão e os achados aqui mostram o gene suprimido e não altamente expresso.

Jo e et al. (2022) mostraram que animais polimórficos com dois meses de idade não apresentavam os mesmos genes alterados que aos setes meses, apontando que outras vias estão alteradas quando o animal está envelhecido uma vez que os fenótipos apresentados pelos animais portadores do polimorfismo pioram a longo prazo e conseqüentemente com o avanço da idade, podendo estar relacionado com doenças neurodegenerativas associadas ao envelhecimento.

Também foi avaliada a densidade neuronal do hipocampo dos animais controle e experimental uma vez que o hipocampo é uma região do cérebro que desempenha um papel importante quando se trata de plasticidade neuronal, aprendizado, memórias e regulação do estresse (MAGARINOS et al., 1995; FANSELOW; DONG, 2009). De fato, a remoção do hipocampo acarreta graves perdas na memória, desde episódica a espacial e de aprendizado (FANSELOW; DONG, 2009). Ao estudar o comportamento de roedores no Labirinto aquático de Morris, Morris (1991) comprovou que a região dorsal do hipocampo atua na memória espacial. Posteriormente, Pothuizen et al. (2004) mostrou que lesões na região dorsal do hipocampo resultavam em um déficit de memória espacial enquanto lesões na região ventral não.

Em seres humanos, o volume menor do hipocampo e suas disfunções estão associadas com doenças psicológicas e componentes como a depressão ou a bipolaridade (FREY et al., 2007). De acordo com Magarinos et al. (1995) e Schloesser et al. (2013), o estresse repetitivo ou o conjunto de fatores estressantes diários estão correlacionados com uma atrofia nos neurônios piramidais da região CA3 do hipocampo. Os animais expostos ao estresse tiveram redução no número de pontos de ramos apicais e comprimento total apical dendríticos nos neurônios piramidais da região quando comparados com o grupo controle, enquanto as regiões CA1, CA2 e giro denteado não foram afetadas. Watanabe et al. (1992) também provou que a submissão de animais a 10 dias de estresse de imobilização crônica, levou a um encolhimento dos neurônios do CA3. Todavia os resultados apresentados relacionam a redução da região CA3 aos níveis de estresse e não correlaciona com o objetivo de estudo desse projeto, apesar dos resultados obtidos mostrarem a redução da região CA3.

Entretanto devemos considerar que a densidade neuronal confirmada pode estar relacionada com um outro tipo de estresse gerado a partir do polimorfismo Ala92-D2, visto que resultados anteriores apresentados por Lorena et al. (2022), e estudos com camundongos e seres humanos, por Jo et al. (2019) e McAnich et al. (2018) respectivamente, indicaram o envolvimento do estresse do retículo endoplasmático como fundamental para a caracterização do fenótipo gerado pelo polimorfismo.

Banerman et al. (2002; 1999) e Moser et al (1995) mostram que lesões nas regiões ventral e dorsal do hipocampo impactam diferentes funções como aprendizagem, comportamento ou memória, dependendo da região afetada. Além

disso, LAKSHMINARASIMHAN et al. (2012) relatou a importância dos níveis de neurotrofina como o BDNF na região CA3 por apresentarem um papel essencial na mediação dendrítica do hipocampo. Sendo assim estudos futuros poderiam analisar a região CA3 dorsal e ventral separadamente para avaliar onde há uma perda mais significativa do tamanho ou densidade neuronal e avaliar a expressão de neurotrofinas nas regiões do hipocampo para correlacionar com o fenótipo de perda de memória, dificuldade de aprendizado e comportamentos apresentados por animais portadores do polimorfismo.

6. CONCLUSÃO

Concluindo, os resultados do presente estudo confirmaram que o polimorfismo Ala92-D2 está associado com alterações estruturais e nos padrões de expressão gênica do hipocampo relacionadas com prejuízo na memória e cognição e alterações comportamentais que se agravam conforme o avanço da idade. É possível que o polimorfismo Ala92-D2 seja um fator de risco para o declínio cognitivo associado ao envelhecimento.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B. **Biologia Molecular da Célula**. 6 ed. Porto Alegre. p. 1464. Artmed, 2017.

ALIZADEH-EZDINI, Z.; VATANPARAST, J. Differential impact of two paradigms of early-life adversity on behavioural responses to social defeat in young adult rats and morphology of CA3 pyramidal neurons. **Behavioural Brain Research**, v. 435, p. 114048, out. 2022.

ALIZADEH-EZDINI, Z.; VATANPARAST, J. Differential impact of two paradigms of early-life adversity on behavioural responses to social defeat in young adult rats and morphology of CA3 pyramidal neurons. **Behavioural Brain Research**, v. 435, p. 114048, out. 2022.

ALLEN, S. J.; WATSON, J. J.; SHOEMARK, D. K.; *et al.* GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 138, n. 2, p. 155–175, 2013.

AVANES, A.; LENZ, G.; MOMAND, J. Darpp-32 and t-Darpp protein products of PPP1R1B: Old dogs with new tricks. **Biochemical Pharmacology**, v. 160, p. 71–79, fev. 2019. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.0c01133.

BADDELEY, A. D.; HITCH, G. Working Memory. In: **Psychology of Learning and Motivation**, V. 8 p. 47–89, 1974.

BANNERMAN, D. M., DEACON, R. M. J., OFFEN, S., FRISWELL, J., GRUBB, M., & RAWLINS, J. N. P. (2002). Double dissociation of function within the hippocampus: Spatial memory and hyponeophagia. **Behavioral Neuroscience**, 116(5), 884–901. doi:10.1037/0735-7044.116.5.884.

BANNERMAN, D. M.; YEE, B. K.; GOOD, M. A.; HEUPEL, M. L.; IVERSEN, S. D.; RAWLINS, J. N. Double dissociation of function within the hippocampus: a comparison of dorsal, ventral, and complete hippocampal cytotoxic lesions. **Behavioral neuroscience**, v. 113, n. 6, 2022.

BEILIN, O. K.; LIPINA, T.; VUKOBRADOVIC, I.; RODER, J.; WOODGETT, J. R. Assessment of Social Interaction Behaviors. **Journal of Visualized Experiments**, n. 48, 2011.

BERNAL, J; NUNEZ, J. Thyroid hormones and brain development. **European Journal of Endocrinology**, v. 133, n. 4, p. 390–398, 1995.

BIANCO, A. C.; KIM, B. W. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 10, p. 2571–2579, 2006.

BIANCO, A. C.; SALVATORE, D.; GEREBEN B.; BERRY J. M.; LARSEN R. P. Biochemistry, Cellular and Molecular Biology, and Physiological Roles of the Iodothyronine Selenodeiodinases. **Endocrine Reviews**, v. 23, n. 1, p. 38–89, 2002.

BLUNDELL, J.; HOANG, C. V.; POTTS, B.; GOLD, S. J.; POWELL, C. M. Motor coordination deficits in mice lacking RGS9. **Brain Research**, v. 1190, p. 78–85, jan. 2008.

COLLINS, A. G. E.; FRANK, M. J. How much of reinforcement learning is working memory, not reinforcement learning? A behavioral, computational, and neurogenetic analysis. **European Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 7, p. 1024–1035, abr. 2012.

COOKE, G. E.; MULLALLY, S.; CORREIA, N.; O'MARA, SM.; GIBNEY, J. Hippocampal Volume Is Decreased in Adults with Hypothyroidism. **Thyroid**, v. 24, n. 3, p. 433–440, 2014.

CORREIA, N.; MULLALLY, S.; COOKE, G.; TUN, TK.; PHELAN, N.; FEENEY, J.; FITZGIBBON, M.; BORAN, G.; O'MARA, S. GIBNEY, J. Evidence for a Specific Defect in Hippocampal Memory in Overt and Subclinical Hypothyroidism. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 94, n. 10, p. 3789–3797, 2009.

DAI, Ge; LEVY, O.; CARRASCO, N. Cloning and characterization of the thyroiodide transporter. **Nature**, v. 379, n. 6564, p. 458–460, 1996.

DIXON, C.I.; ROSAHL, T.W.; STEPHENS, D.N. Targeted deletion of the GABRA2 gene encoding α 2-subunits of GABAA receptors facilitates performance of a conditioned emotional response and abolishes anxiolytic effects of benzodiazepines and barbiturates. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **2008**, 90, 1-8, doi: <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2008.01.015>.

DORA, J. M.; MACHADO, E.W.; RHEINHEIMER, J.; CRISPIM D.; MAIA L. A. Association of the type 2 deiodinase Thr92Ala polymorphism with type 2 diabetes: case–control study and meta-analysis. **European Journal of Endocrinology**, v. 163, n. 3, p. 427–434, 2010.

EAYRS, J. T.; LISHMAN, W. A. The maturation of behavior in hypothyroidism and starvation. **British Journal of Animal Behavior**, 1995.

ENGLER, D.; BURGER, A. G. The Deiodination of the Iodothyronines and of Their Derivatives in Man. **Endocrine Reviews**, v. 5, n. 2, p. 151–184, 1984.

ETGEN, T.; BICKEL, H.; FÖRSTL, H. Metabolic and endocrine factors in mild cognitive impairment. **Ageing Research Reviews**, v. 9, n. 3, p. 280–288, 2010.

FANSELOW, M. S.; DONG, H.-W. Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 7–19, jan. 2010.

FAZIO, L.; PERGOLA, G.; PAPALINO, M.; BLASI, G. Transcriptomic context of *DRD1* is associated with prefrontal activity and behavior during working memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 21, p. 5582–5587, 7 maio 2018.

FREY, B.N., ANDREAZZA, A.C., NERY, F.G., MARTINS, M.R., QUEVEDO, J., SOARES, J.C., AND KAPCZINSKI, F. (2007). The role of hippocampus in the pathophysiology of bipolar disorder. *Behav. Pharmacol.* 18, 419–430.

GALERA, C.; GARCIA, B.R.; VASQUES, R. Componentes funcionais da memória visuoespacial. **Estudos Avançados**, v. 27, n. 77, p. 29–44, 2013.

GAZZANIGA, M.S. The New Cognitive Neuroscience. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, p. 1689 -1699, 2000.

GIANNOCCO, G.; KIZYS, M. M. L.; MACIEL, R. M.; DE SOUZA, JS.; Thyroid hormone, gene expression, and Central Nervous System: Where we are. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 114, p. 47–56, 2021.

GOLDMAN-RAKIC, P.S. Cellular basis of working memory. **Neuron**, v. 14, n. 3, p. 477–485, 1995.

GUO, T-W. Positive association of the DIO2 (deiodinase type 2) gene with mental retardation in the iodine-deficient areas of China. **Journal of Medical Genetics**, Shanghai, v. 41, n. 8, p. 585–590, 2004.

HARARI, D.; ROMANO, J.; SHELLY, M.; PIERCE, JH.; ANDREWS, GC.; YARDEN, Y. Neuregulin-4: a novel growth factor that acts through the ErbB-4 receptor tyrosine kinase. **Oncogene**, v. 18, n. 17, p. 2681–2689, 28 abr. 1999.

HOGART, A., NAGARAJAN, R. P., PATZEL, K. A., YASUI, D. H., & LASALLE, J. M. (2007). 15q11-13 GABAA receptor genes are normally biallelically expressed in brain yet are subject to epigenetic dysregulation in autism-spectrum disorders. *Human molecular genetics*, 16(6), 691–703.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddm014>.

JO, S.; FONSECA, L.T.; BOCCO, M. L. C.B.; FERNANDES, G. W.; MCANINCH, E. E.; BOLIN, A. P.; DA CONCEIÇÃO, R. R.; WERNECK DE CASTRO, J. P.; IGNACIO, D. L.; EGRI, P.; NÉRMETH, D.; FEKETE, C.; BERNARDI, M. M.; LEITCH, V. D.; MANNAN, N. S.; CURRY, K. F.; BUTTERFIELD, N. C.; BASSET, J. H. D.; WILLIAMS, G. R.; BEREGEN, B. ... BIANCO, A. C. Type 2 deiodinase polymorphism causes ER stress and hypothyroidism in the brain. **Journal of Clinical Investigation**, v. 129, n. 1, p. 230–245, 2019.

JONIDES, J.; LACEY, S. C.; NEE, D. E. Processes of Working Memory in Mind and Brain. **Current Directions in Psychological Science**, v. 14, n. 1, p. 2–5, 2005.

KELLENDONK, C. SIMPSON, E. H.; POLAN, H. J.; MALLERET, G.; VRONSKAYA, S.; WINIGER, V.; MOORE, H.; KANDEL, E. R. Transient and Selective Overexpression of Dopamine D2 Receptors in the Striatum Causes Persistent Abnormalities in Prefrontal Cortex Functioning. **Neuron**, v. 49, n. 4, p. 603–615, fev. 2006.

KOGAN J. H.; FRANKLAND P. W.; SILVA A. J. Long-term memory underlying hippocampus-dependent social recognition in mice. **Hippocampus**, v. 10, n. 1, 2021.

KRAUSE, E. G.; DE KLOET, A. D.; FLAK, J. N.; SMELTZER, M. D.; SOLOMON, M.B.; EVANSON, N. K.; WOODS, S. C.; SAKAI, R. R.; HERMAN, J. P. Hydration State Controls Stress Responsiveness and Social Behavior. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 14, p. 5470–5476, 2011.

LAKSHMINARASIMHAN, S.; KUMAR, P.; LIAO, W. K.; CHOUDHARY, A.; KUMAR, V.; SAMATOVA, N. F. On the path to sustainable, scalable, and energy-

efficient data analytics: Challenges, promises, and future directions. **2012 International Green Computing Conference (IGCC)**, jun. 2012.

LORENA, F. B., SATO, J. M., COVIELLO, B. M., ARNOLD, A., BATISTUZZO, A., YAMANOUCHI, L. M., DIAS JUNIOR, E., DO NASCIMENTO, B., FONSECA, T. L., BIANCO, A. C., & RIBEIRO, M. O. (2022). Age Worsens the Cognitive Phenotype in Mice Carrying the Thr92Ala-DIO2 Polymorphism. *Metabolites*, v. 12, n.7, p. 629. <https://doi.org/10.3390/metabo12070629>.

MA, Y.L; WANG, H.L; WU, H.C; WEI, C. L.; LEE, E. H. Brain-derived neurotrophic factor antisense oligonucleotide impairs memory retention and inhibits long-term potentiation in rats. *Neuroscience*, v. 82, n. 4, p. 957–967, 1997.

MACBETH, A. H.; EDDS, J. S.; YOUNG, W. S. Housing conditions and stimulus females: a robust social discrimination task for studying male rodent social recognition. *Nature Protocols*, v. 4, n. 11, p. 1574–1581, 2009.

MAGARIÑOS, A. M.; MCEWEN, B. S.; FLUGGE, G.; FUCHS, E. Chronic Psychosocial Stress Causes Apical Dendritic Atrophy of Hippocampal CA3 Pyramidal Neurons in Subordinate Tree Shrews. *The Journal of Neuroscience*, v. 16, n. 10, p. 3534–3540, 15 maio 1996.

MCANINCH, A.E.; JO, S.; PREITE, Z.N.; FARKAS, E.; MOHACSIK, P.; FEKETE, C.; EGRI, P.; GEREBEN, B.; LI, Y.; DENG, Y.; PATTI, M. E.; ZEVENBERGEN, C.; PEETER, R. P.; MASH, D. C.; BIANCO, A. C. Prevalent Polymorphism in Thyroid Hormone-Activating Enzyme Leaves a Genetic Fingerprint That Underlies Associated Clinical Syndromes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 100, n. 3, p. 920–933, 2015.

MCANINCH, A.E.; RAJAN, B.K.; EVANS, A.D.; JO, S.; CHAKER, L.; PEETER, R. P.; BENNETT, D. A.; MASH, D. C.; BIANCO, A. C. A Common DIO2 Polymorphism and Alzheimer Disease Dementia in African and European Americans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 103, n. 5, p. 1818–1826, 2018.

MENTUCCIA, D.; PROIETTI-PANNUNZI, L.; TANNER, K.; BACCI, V.; POLLIN, T. I.; POEHLMAN, E. T.; SHULDINER, A. R.; CELI, F. S. Association Between a Novel Variant of the Human Type 2 Deiodinase Gene Thr92Ala and Insulin Resistance: Evidence of Interaction with the Trp64Arg Variant of the β -3-Adrenergic Receptor. *Diabetes*, v. 51, n. 3, p. 880–883, 2002.

MEYER, L. S.E.; WAGNER, S.M.; MAIA, L. A. Expressão das iodotironinas desiodases nas neoplasias tireoidianas. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, Porto Alegre, v. 51, n. 5, p. 690–700, 2007.

MILNER, B.; SQUIRE, L. R.; KANDEL, E. R. Cognitive Neuroscience and the Study of Memory. *Neuron*, v. 20, n. 3, p. 445–468, 1998.

MORRIS, R.G.M. (1981). Spatial localization does not require the presence of local cues. **Learn. Motiv.** 12, 239–260.

MOSER, M. B.; MOSER, E. L.; FORREST, E.; ANDERSEN, P.; MORRIS, R. G. Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 21, p. 9697–9701, 10 out. 1995.

MOURÃO, C.; BANDEIRA, L.; MELO, R. Integração de Três Conceitos: Função Executiva, Memória de Trabalho e Aprendizado. Integration of Three Concepts: Executive Function, Working Memory and Learning. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, v. 27, n. 3, p. 309–314, 2011.

NISHIYAMA K, SUZUKI H, HARASAWA T, SUZUKI N, KURIMOTO E, KAWAIT, MARUYAMA M, KOMATSU H, SAKUMA K, SHIMIZU Y, SHIMOJO M. FTBMT, a Novel and Selective GPR52 Agonist, Demonstrates Antipsychotic-Like and Procognitive Effects in Rodents, Revealing a Potential Therapeutic Agent for Schizophrenia. **J Pharmacol Exp Ther.** 2017 Nov;363(2):253-264. doi: 10.1124/jpet.117.242925. Epub 2017 Aug 29. PMID: 28851764.

NUNES, T. M. Hormônios tireoidianos: mecanismo de ação e importância biológica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, n. 6, p. 639–643, 2003.

PANICKER, V.; SARAVANAN, P.; VAIDYA, B.; EVANS, J.; HATTERSLEY, A. T.; FRAYLING, M. T.; DAYAN, C. M. Common Variation in the DIO2 Gene Predicts Baseline Psychological Well-Being and Response to Combination Thyroxine Plus Triiodothyronine Therapy in Hypothyroid Patients. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 94, n. 5, p. 1623–1629, 2009.

PARAMO, B.; WYATT, S.; DAVIES, A. M. An essential role for neuregulin-4 in the growth and elaboration of developing neocortical pyramidal dendrites. **Experimental Neurology**, v. 302, p. 85–92, abr. 2018.

PATEL, D.; ANILKUMAR, S.; CHATTARJU, S.; BUWALDA, B. Repeated social stress leads to contrasting patterns of structural plasticity in the amygdala and hippocampus. **Behavioural Brain Research**, v. 347, p. 314–324, jul. 2018.

PERSSON, N.; PERSSON, J.; FISCHER, H. Effects of the gene coding for DARPP-32 (PPP1R1B) on the prefrontal cortex and declarative memory. Apresentado no 22^a Encontro Anual da Organização de Mapeamento Cerebral Humano, Geneva, Suíça. Junho de 2016.

POTHUIZEN, H.H., ZHANG, W.N., JONGEN-RE[^] LO, A.L., FELDON, J., AND YEE, B.K. (2004). Dissociation of function between the dorsal and the ventral hippocampus in spatial learning abilities of the rat: a within-subject, within-task comparison of reference and working spatial memory. **Eur. J. Neurosci.** 19, 705–712.

RESHETNIKOV, V. V.; KISARETOVA, P. E.; ERSHOV, N. I.; MERKULOVA, T. I.; BONDAR, M. P. Social defeat stress in adult mice causes alterations in gene expression, alternative splicing, and the epigenetic landscape of H3K4me3 in the prefrontal cortex: An impact of early-life stress. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 106, p. 110068, mar. 2021.

RICCERI, L; MOLES, A; CRAWLEY, J. Behavioral phenotyping of mouse models of neurodevelopmental disorders: Relevant social behavior patterns across the life span. **Behavioural Brain Research**, v. 176, n. 1, p. 40–52, 2007.

ROMAN, C.; FUIOR, V.E.; TRUSCA, G.V.; KARDASSIS, D.; SIMIONESCU M.; GAFENCU, V.A. Thyroid hormones upregulate a polipoprotein E gene expression in astrocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 468, n. 1-2, p. 190–195, 2015.

SEKIGUCHI, R.; WOLTERINK, G.; VAN REE, JAN M. Short duration of retroactive facilitation of social recognition in rats. **Physiology & Behavior**, v. 50, n. 6, p. 1253–1256, 1991.

SHABANI, S.; FARBOOD, Y.; SARKAKI, A.; MARD, S. A.; AHANGARPOUR, A.; KHORSANDO, L. The effect of triiodothyronine on the hippocampal long-term potentiation in an animal model of the Alzheimer's disease: The role of BDNF and reelin. **Neurology, Psychiatry and Brain Research**, v. 33, p. 82–88, 2019.

SHAVITT, T.; JOHNSON, I.N.S.; BATISTUZZO, M.C. Hippocampal formation volume, its subregions, and its specific contributions to visuospatial memory tasks. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 53, n. 9, 2020.

SCHLOSSER, R. J., JIMENEZ, D. V., HARDY, N. F., PAREDES, D., CATLOW, B. J., MANJI, H. K., MCKAY, R. D., MARTINOWICH, K. (2014). Atrophy of pyramidal neurons and increased stress-induced glutamate levels in CA3 following chronic suppression of adult neurogenesis. **Brain Structure and Function**, v. 219, n. 3, 1139–1148. doi:10.1007/s00429-013-0532-8.

SHUPNIK, A.M.; RIDGWAY, E. C.; CHIN, W. W. Molecular Biology of Thyrotropin. **Endocrine Reviews**, v. 10, n. 4, p. 459–475, 1989.

STENZEL, D.; HUTTNER, W. B. Role of maternal thyroid hormones in the developing neocortex and during human evolution. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 7, 2013.

TAN, Zaldy S.; VASAN, Ramachandran S. Thyroid Function and Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 16, n. 3, p. 503–507, 2009.

THOMSON, D. M.; OPENSHAW, R. L.; MITCHELL, E. J.; KOUSKOU, M.; MILLAN, M. J.; LA COUR, C. M.; MORRIS, B. J.; PRATT, J. A. Impaired working

memory, cognitive flexibility and reward processing in mice genetically lacking Gpr88: Evidence for a key role for Gpr88 in multiple cortico-striatal-thalamic circuits. **Genes, Brain and Behavior**, v. 20, n. 2, 3 nov. 2020.

THOR, D. H.; HOLLOWAY, W. R. Social memory of the male laboratory rat. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 6, p. 1000 – 1006, 1982.

VENERO, C. Anxiety, memory impairment, and locomotor dysfunction caused by a mutante thyroid hormone receptor alpha1 can be ameliorated by T3 treatment. **Genes & Development**, v. 19, n. 18, p. 2152–2163, 2005.

VIJAYRAGHAVAN, S.; WANG, M.; BIRNBAUM, S. G.; WILLIAMS, V.; ARNSTEN, A. F. T. Inverted-U dopamine D1 receptor actions on prefrontal neurons engaged in working memory. **Nature Neuroscience**, v. 10, n. 3, p. 376–384, 4 fev. 2007.

WANG, C.; ZHANG, Y.; GUO, S.; ZHAO, Q.; ZENG, Y.; XIE, Z.; XIE, X.; LU, B.; HU, Y. GPR52 Antagonist Reduces Huntingtin Levels and Ameliorates Huntington's Disease-Related Phenotypes. **Journal of Medicinal Chemistry** 2021 64 (2), 941-957. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.0c01133.

WAGNER S. M. Expressão das iodotironinas desiodases tipos I e II em diferentes tecidos de camundongos normais e com deficiência inata para a desiodase tipo I. 2001. 85 p. **Tese. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto.**

WATANABE, Y.; GOULD, E.; MCEWEN, B. S. Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. **Brain Research**, v. 588, n. 2, p. 341–345, ago. 1992. **Alegre, 2001.**

WILLIAMS, G. R. Neurodevelopmental and Neurophysiological Actions of Thyroid Hormone. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 20, n. 6, p. 784–794, 2008.

XU, H.; KELLENDONK, C. B.; SIMPSON, E.; KEILP, J. G.; BRUNDER, G. E.; POLAN, H. J.; KANDEL, E. R.; GILLIAM, T. C. DRD2 C957T polymorphism interacts with the COMT Val158Met polymorphism in human working memory ability. **Schizophrenia Research**, v. 90, n. 1-3, p. 104–107, fev. 2007.

YEN, M. P. Physiological and Molecular Basis of Thyroid Hormone Action. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 3, p. 1097–1142, 2001.

Yeo, I.J., Park, M.H., Son, D.J. *et al.* PRDX6 Inhibits Neurogenesis through Downregulation of WDFY1-Mediated TLR4 Signal. **Mol Neurobiol** v. 56, 3132–3144 (2019). <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1287-2>.

ZHANG, T. **Rem2 Effects on the Development of Neonatal Mouse Barrel Cortex**. 2019. Tese (Mestrado em Ciências – Neurociência) – Faculdade de Pós-

Graduação da Escola de Artes e Ciências da Universidade Brandeis. Waltham, Massachusetts, 2019.