



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA  
CELULAR**

**KEURI ELEUTERIO RODRIGUES**

**AVALIAÇÃO ELETORRETINOGRÁFICA DE RATOS WISTAR JOVENS  
SUBMETIDOS À TIREOIDECTOMIA BILATERAL**

**Belém  
2013**

**KEURI ELEUTERIO RODRIGUES**

**AVALIAÇÃO ELETORRETINOGRÁFICA DE RATOS WISTAR JOVENS  
SUBMETIDOS À TIREOIDECTOMIA BILATERAL**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular (Área de Concentração Neurociências), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular. Orientador: Prof. Dr. Fernando Allan de Farias Rocha.**

**Belém  
2013**

**KEURI ELEUTERIO RODRIGUES**

**AVALIAÇÃO ELETORRETINOGRÁFICA DE RATOS WISTAR JOVENS  
SUBMETIDOS À TIREOIDECTOMIA BILATERAL**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular (Área de Concentração Neurociências), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular. Orientador: Prof. Dr. Fernando Allan de Farias Rocha.**

**Professor Dr. Fernando Allan de Farias Rocha - Orientador**

Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

**Professor Dr. Bruno Duarte Gomes**

Instituto de Ciências Biológicas, UFPA – Membro Titular

Núcleo de Medicina Tropical, UFPA

**Professor Dr. Moisés Hamoy**

Instituto de Ciências Biológicas, UFPA – Membro Titular

**Professor Dr. Chubert Bernardo Castro de Sena**

Instituto de Ciências Biológicas, UFPA – Membro Suplente

**Belém**

**2013**

RODRIGUES, KEURI ELEUTERIO.

AVALIAÇÃO ELETORRETINOGRÁFICA DE RATOS WISTAR JOVENS  
SUBMETIDOS À TIREOIDECTOMIA BILATERAL.

Belém, Pará, UFPA/ICB, 2013.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Neurobiologia Oswaldo Cruz, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, sob a orientação do Prof. Dr. Fernando Allan de Farias Rocha. Em vigência os seguintes suportes financeiros: CAPES e UFPA.

A meus pais João e Wilma, que me incentivaram pela busca de conhecimento e novos saberes, sempre me apoiando.

A meus irmãos, pois cada um de maneira singular contribuiu para construção da pessoa que sou hoje.

A meu esposo Mario Sergio, pois sem você tudo isso não seria possível.

Dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

A meus pais, João e Wilma, que são pessoas maravilhosas e sempre me apoiam, agradeço por terem me criado e me ensinado a dar valor, no que de fato tem valor, obrigada por tudo pai e mãe.

A meus irmãos, em especial ao Janaifferson que sempre me ajuda com minhas “brincas” no computador e pelo apoio e carinho; e as minhas irmãs Kelen e Keifer pela companhia e carinho, obrigada a todos.

A meu Orientador Professor Dr. Fernando Allan de Farias Rocha, por aceitar ter me orientado, pela humildade e paciência que tem comigo.

A banca examinadora Professor Dr. Bruno Duarte Gomes e Professor Dr. Moisés Hamoy, por ter gentilmente aceito participar e colaborar para a melhoria deste trabalho.

Aos Professores, doutorandos, mestrandos e alunos de iniciação científica do Laboratório de Neuroendocrinologia, em especial ao Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano e Prof. Dr. Karen Renata Matos Oliveira.

Ao Professor Dr. Moisés Hamoy, por ter me ajudado tanto, agradeço pelas contribuições e pela amizade e aos alunos de iniciação científica do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais, em especial ao Luiz Batista, Rodrigo Borges e Geane, pela força que me deram nos experimentos. Obrigada Rodrigo por ter me cedido gentilmente tantos animais e pela ajuda na manutenção da minha colônia.

A minha amiga Margot que mesmo nos vendo tão pouquinho sinto todo seu carinho e torcida por mim, obrigada pela ajuda, guardo você no meu coração.

A minha amigas de batalha Susanne Suely, Suellen Moraes e Danielle Valente, obrigada pelo apoio. Dani muito obrigada pela ajuda, pois você de forma tão caridosa e altruísta sempre me ajudou.

A minha amiga Adriene Seabra, uma grande mulher, que sempre está disposta a ajudar, uma pessoa tão doce, tão generosa e inteligente, obrigada por dividir o sofrimento, pois sozinha teria sido muito mais difícil.

A minha amiga Tarcyane Garcia, não tenho palavras pra expressar a gratidão que sinto, obrigada pela generosidade, pelas contribuições, pelo carinho, pelo apoio, você merece tudo de bom, não posso deixar de destacar sua inteligência associada com humildade, dedicação e gentileza, combinação perfeita. Agradeço também a dona Maria e a Tarcymara, obrigada a todas.

A minha amiga Ilana Pinho, obrigada pela ajuda nos experimentos, pelo carinho e pelo apoio, ainda bem que você apareceu! Obrigada pelas conversas, distrações e por aceitar trabalhar no final de semana, mesmo com tantas contingências.

A meu esposo Mario Sergio, que é um homem tão generoso, dedicado, atencioso e carinho, são tantos predicados para descrevê-lo. Agradeço por ter aceitado dividir sua vida comigo, por ser um marido tão bom e prestativo, pelas ajuda nos experimentos. Eu te amo muito.

Ao pessoal da equipe técnica da Universidade Federal, Ismael, Amarildo, Marcelo e Manoel, obrigada pela ajuda e fornecimento de material todo esse tempo.

A família de meu esposo, minha sogra Itamar dos Santos e seus irmãos Rosangela e Marinaldo, pelo apoio durante os momentos difíceis e por ter me acolhido durante tantos anos.

A Rita de Cássia, Gabrielle e Adrienne jamais esquecerei a ajuda e o carinho de vocês, estarei sempre torcendo por vocês, estou com muita saudade.

À Universidade Federal do Pará (UFPA) e ao CAPES pelo suporte financeiro.

O Olho é uma espécie de globo,  
é um pequeno planeta  
com pinturas do lado de fora.  
Muitas pinturas:  
azuis, verdes, amarelas.  
É um globo brilhante:  
parece cristal,  
é como um aquário com plantas  
finamente desenhadas: algas, sargaços,  
miniaturas marinhas, areias, rochas, naufrágios e  
peixes de ouro.

Mas por dentro há outras pinturas,  
que não se veem:  
umas são imagem do mundo,  
outras são inventadas.

O Olho é um teatro por dentro.  
E às vezes, sejam atores, sejam cenas,  
e às vezes, sejam imagem, sejam ausências,  
formam, no Olho, lágrimas.

Cecília Meireles  
(Mapa de Anatomia: O Olho)

## RESUMO

A tireoide sintetiza a *tiroxina* (T4) e a *3,5,3'-triiodotironina* (T3), ambos hormônios apresentam uma função crucial no desenvolvimento do sistema nervoso central, incluindo o sistema visual e a retina. A diminuição dos níveis sanguíneos do T3 e T4 ocasionam uma síndrome denominada de hipotireoidismo, o que pode levar à prejuízos visuais. Os déficits visuais gerados pelo hipotireoidismo estão diretamente relacionados ao período de desenvolvimento do indivíduo. Foi demonstrado em modelos murinos que o hipotireoidismo congênito diminui a espessura da retina, o número de células, e interfere na diferenciação da subpopulação de cones M. Desta forma buscaremos investigar possíveis alterações funcionais na retina de ratos wistar jovens após a tireoidectomia bilateral, utilizando respostas eletrofisiológicas não invasivas. Para tanto, dividimos os ratos em três grupos (controle, sham e tireoidectomizado) cada um contendo  $\geq 8$  animais. As cirurgias foram realizadas 30 dias pós-natal. Os eletrorretinogramas de campo total foram realizados 10, 15, 20, 25 e 30 dias após a cirurgia, utilizando protocolos para avaliar a resposta escotópica máxima, resposta fotópica (com e sem o uso de filtros de luz) e a resposta ao *flicker* (12, 15, 18 e 30 Hz). Os parâmetros analisados foram o tempo implícito e a amplitude das *ondas a* e *b*. Além disso, realizamos o monitoramento dos parâmetros clínicos dos animais, visando identificar características que indiquem um quadro de hipotireoidismo, bem como a dosagem dos hormônios tireoidianos. Os resultados obtidos demonstraram que em todos dos protocolos de estimulação utilizados no ERG houve diminuição nas amplitudes das *ondas a* e *b* nos animais tireoidectomizados em todos os dias avaliados após a cirurgia, quando comparados com animais do grupo controle e sham. Os resultados da avaliação do tempo implícito para ambas as ondas não demonstraram diferença estatística quando comparamos os diversos grupos ao controle. Também podemos constatar uma redução do ganho de peso e tamanho nos animais que sofreram tireoidectomia, associados à redução dos níveis de hormônio tireoidiano (T3). Concluimos dessa forma que os hormônios tireoidianos estão diretamente ligados a alterações funcionais na retina dos animais que sofreram tireoidectomia, bem com, na redução da aquisição de peso e aumento de tamanho.

## ABSTRACT

The thyroid synthesizes thyroxine (T4) and 3,5,3'-triiodothyronine (T3), both hormones have a crucial role in the development of the central nervous system, including the retina and visual system. The decrease in blood levels of T3 and T4 causes a syndrome called hypothyroidism, which may lead to visual impairment. The visual deficits generated by hypothyroidism are directly related to the development period of the individual. It has been demonstrated in murine models that congenital hypothyroidism decreases the retinal thickness, the number of cells and interferes with the differentiation of M cones. Here, we investigated the possible functional changes in juvenile rat's retina after bilateral thyroidectomy using noninvasive electrophysiological responses. Therefore, we divided the rats into three groups (control, sham and thyroidectomized) each containing  $n \geq 8$  animals. The surgeries were performed 30 days post-natal and the full-field electroretinogram (ERG) were performed 10, 15, 20, 25 and 30 days after surgery, using standard protocols for assessing the scotopic response maximum, photopic response (with and without the use of light filters) and response to flicker (12, 15, 18 and 30 Hz). The parameters analyzed were implicit time and amplitude of a- and b-waves of ERG. We also perform monitoring of clinical parameters of animals in order to identify characteristics that indicate a hypothyroidism, as well as the dosage of thyroid hormones. The results showed that there was a decrease in the a- and b-waves amplitudes in thyroidectomy animals (10, 15, 20, 25 and 30 days after surgery), compared to control and sham animals at all the stimulation protocols used in ERG. The results of the evaluation of the implicit time for both waves showed none statistical difference when comparing to control and sham groups. Also we observed a reduction in size and weight of thyroidectomy animals, associated with reduced levels of thyroid hormone (T3). Thus we concluded that the thyroid hormones are directly related to functional changes in the retina of thyroidectomy animals, together with the reduction of weight and size.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Imagem esquemática demonstrando a forma e a localização da glândula tireoide humana. Apresentando dois lóbulos unidos por um istmo, está localizada na parte anterolateral da traqueia. É irrigada pela artéria tireoidea superior e inferior, a drenagem venosa é realizada pelas veias superiores, média e inferiores da tireoide (VT). Fonte: adaptado de SALADIN, 2004..... 21
- Figura 2.** Imagem demonstrando a aparência microscópica de um folículo tireoidiano normal, composto por epitélio cuboide que formam espaços esféricos, preenchidos pelo coloide que armazena a tiroglobulina. Fonte: obtido de <http://www.teliga.net/2010/11/tecido-glandular-ou-secretor-sistema.html>, capturado 22.10.12. .... 23
- Figura 3.** Representação esquemática da fórmula estrutural do aminoácido tirosina, do hormônio tiroxina-T4 e do hormônio triiodotironina-T3. Em destaque estão as moléculas de monoiodotirosil e diiodotirosil acopladas ao aminoácido para formação dos hormônios tireoidianos. Fonte: adaptado de FOX, 2003..... 25
- Figura 4.** Representação esquemática da síntese dos hormônios tireoidianos. O primeiro passo na biossíntese é a captação do iodeto do plasma para dentro da glândula, o qual será rapidamente oxidado para forma de iodo elementar, podendo gerar formas intermediárias. O iodo elementar passará por um processo de organificação quando se acoplar à resíduos de tirosina presentes na molécula de tiroglobulina, com formação de monoiodotirosil (MIT) e diiodotirosil (DIT), duas moléculas de DIT podem se acoplar para formar a tiroxina (T4) e do acoplamento de uma molécula de MIT e uma de DIT resulta a triiodotirosina (T3). Quando existe necessidade metabólica os hormônios produzidos no folículo e armazenados no coloide são liberados no citoplasma ainda aderidos à molécula de tiroglobulina, a qual sofre proteólise liberando T3 e T4, posteriormente secretados no sangue. Algumas moléculas de tiroglobulina com T3 e T4 acoplados também são liberadas. MIT e DIT liberados do coloide serão degradados formando iodeto que será convertido em iodo elementar entrando novamente no ciclo de formação dos hormônios. Fonte: Retirado de LOPES, 2002..... 28
- Figura 5.** Organização geral do sistema hipotálamo-hipófise-tireoide e sua integração com os tecidos estão representadas. Regiões hipotalâmicas cujos neurônios expressam SS (NPeV - núcleo periventricular) e TRH (NPV – núcleo paraventricular). As setas contínuas representam estimulação dos respectivos hormônios e as pontilhadas representam inibição sobre seus respectivos alvos. Fonte: modificado de ANTUNES-RODRIGUES, 2005..... 35
- Figura 6.** Diagrama esquemático da retina de vertebrados, mostrando a estrutura laminar da retina e seus elementos celulares. (CC) Camada coroidal; (EP) epitélio pigmentar; (SE) Camada de segmentos externos; (SI) Camada de segmentos internos; (MLE) Membrana limitante externa; (CNE) Camada nuclear externa; (CPE) Camada plexiforme externa; (CNI) Camada nuclear interna; (CPI) Camada plexiforme interna; (CCG) Camada de células ganglionares; (CF) Camada de fibras do nervo óptico; (MLI) Membrana limitante interna (Modificado de Rodieck, 1998). .... 41

- Figura 7.** Diferenças morfológicas entre os fotorreceptores. (A) Estrutura do bastonete e (B) estrutura do cone. Modificado de PURVES *et al.*, 2004. .... 42
- Figura 8.** Curva de sensibilidade espectral de cones e bastonetes de humanos. Bastonetes (R) e cones (S, M e L). Fonte: Adaptado de [http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro: Cone-response.png](http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Cone-response.png), acesso em 20/10/2012. .... 45
- Figura 9.** Curva de sensibilidade espectral dos cones (UV e M) de ratos. (Fonte: modificado de JACOBS *et al.*, 2001). .... 46
- Figura 10.** Esquema representativo da mensuração dos componentes do ERG de campo total em duas situações de estimulação. (A) Tempo implícito (setas) das ondas-a e b – tempo medido do momento do flash (linha tracejada) até o pico negativo do registro (onda a) ou até o pico positivo do registro (onda b). (B) Amplitude das ondas-a e b – A amplitude da onda a é a distância medida da linha de base do registro (linha horizontal tracejada) até o pico negativo do registro. A amplitude da onda b é a distancia medida entre o pico negativo e o pico positivo de registro. Fonte: Laboratório de Neurobiologia Oswaldo Cruz, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará. .... 50
- Figura 11.** Imagem mostrando região onde se realiza incisão cirúrgica (A), exposição da glândula tireoide (B). Fotografias obtidas de arquivo pessoal, tirada no Laboratório de farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará. .... 55
- Figura 12.** Animal posicionado em decúbito lateral com os respectivos eletrodos posicionados: o vermelho é o terra, o azul é o de referência e o amarelo é o registro. .... 58
- Figura 13.** Parâmetros clínicos. Peso (A) e tamanho (B), os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (ANOVA-Tukey  $*p \leq 0.05$  em relação ao controle,  $n = 5$ ). Níveis de T3 (C) expressos como valores absolutos, representativos de um animal para 15 e 30 dias pós-operatório. .... 65
- Figura 14.** Histograma com os valores temporais dos registros monocular do ERG de campo total. (A) Tempo implícito da onda-a e onda-b em ms, da resposta escotópica máxima e fotópica, após adaptação ao escuro por 30 minutos e adaptação ao claro por um período de 10 minutos respectivamente. (B) Tempo implícito da onda-a e onda-b em ms na resposta escotópica, com a utilização de filtros de luz, empregando o mesmo protocolo de adaptação ao claro. (Os valores são expressos em média  $\pm$  desvio padrão, como teste estatístico aplicou-se ANOVA um critério  $n = 8$ ). .... 68
- Figura 15.** Eletrorretinografia de campo total monocular realizado em ratos Wistar. Resposta escotópica máxima (painel à esquerda) a estímulo de máxima intensidade sem luz branca de fundo, após adaptação de 30 minutos em ambiente livre de iluminação. Resposta fotópica (painel à direita) a estímulo de máxima intensidade com luz branca de fundo, após adaptação de 10 minutos em ambiente com iluminação. (10, 15, 20, 25 e 30 dias pós-cirúrgico). .... 69

**Figura 16.** Histograma com os valores de amplitude dos registros monocular do ERG de campo total. Amplitudes da *onda-a*, *onda-b* em  $\mu V$  (A) e a *razão entre onda-b e onda-a* (B), na resposta escotópica máxima, utilizando-se o protocolo de adaptação ao escuro por um período de 30 minutos. Os valores são expressos em média  $\pm$  desvio padrão (ANOVA-Tukey  $*p < 0.01$  em relação ao controle *onda-a*, *onda-b* e *razão entre onda-b e onda-a*;  $n = 8$ ). ..... 71

**Figura 17.** Valores do registro monocular do ERG de campo total dos animais de estudo. (A) Amplitude da *onda-a*, *onda-b* em  $\mu V$ . (B) *Razão entre onda-b e onda-a* na resposta fotópica, utilizando o protocolo de adaptação ao claro por um período de 10 minutos. (C) Amplitude da *onda-a* e *onda-b* em  $\mu V$  na resposta fotópica, com a utilização de filtros de luz, empregando o mesmo protocolo de adaptação ao claro. (D) *Razão entre onda-b e onda-a*. Os valores são expressos em média e desvio padrão (ANOVA-Tukey  $*p < 0.05$  em relação ao controle *onda-a*, *onda-b* e *razão entre onda-b e onda-a*;  $n = 8$ ). ..... 74

**Figura 18.** Valores do registro monocular do ERG de campo total dos animais de estudo. Amplitude da *onda-b* em  $\mu V$  na resposta fotópica de *flicker*, com estimulação intermitente com variação na frequência de apresentação. Utilizando o protocolo de adaptação ao claro por um período de 10 minutos. Os valores são expressos em média e desvio padrão (ANOVA-Tukey  $*p < 0.01$  em relação ao controle;  $n = 8$ ). ..... 78

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AMPc** - Monofosfato de adenosina cíclico

**APB** - 2-Amino-4-fosfonobutirato

**ATP** - Trifosfato de adenosina

**DAG** - Diacilglicerol

**DIT** - Diiodotirosil

**ECG** - Eletrocardiograma

**ERG** - Eletrorretinograma

**GDP** - Guanosina difosfato

**GTP** - Guanosina trifosfato

**IP3** - Trifosfato de inositol

**kDa** - KiloDalton

**MIT** - Monoiodotirosil

**ms** - milissegundo

**NIS** - Simportador de sódio-iodo

**Nm** - nanômetros

**PDE** – Fosfodiesterase

**PIT 1** - Fator de transcrição relacionado à expressão do gene do TSH

**PKA** - Proteína cinase A

**PKC** - Proteína cinase C

**SS** - Somatostatina

**SSTR** - Receptor para SS

**TBG** - Globulina de ligação da tiroxina

**TG** - Tireoglobulina

**Thrb** - Gene responsável em codificar TR $\beta$ 2

**TPO** - Enzima peroxidase tireoidea

**TSH** - Tireotrofina

**TRH** - Hormônio liberador de tireotrofina

**TR $\beta$ 2** - Receptor do hormônio tireoidiano beta-2

**T3** - 3,5,3'-triiodotironina

**T4** - Tiroxina

**VEP** - Potencial evocado

**$\mu$ V** - microVolts

## Sumário

RESUMO.....	10
ABSTRACT .....	11
LISTA DE FIGURAS .....	12
LISTA DE ABREVIATURAS.....	15
1 INTRODUÇÃO .....	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS E ASPECTOS HISTÓRICOS .....	24
2.2 SÍNTESE DOS HORMÔNIOS TIREOIDIANOS.....	29
2.3 LIBERAÇÃO E TRANSPORTE DOS HORMÔNIOS TIREOIDIANOS .....	30
2.4 RECEPTORES E AÇÃO HORMONAL .....	31
2.5 REGULAÇÃO NEUROENDÓCRINA DA FUNÇÃO TIREOIDIANA .....	36
2.6 HIPOTIREOIDISMO.....	37
2.7 SISTEMA VISUAL E HIPOTIREOIDISMO.....	39
2.8 ESTRUTURA MORFO-FUNCIONAL DO TECIDO RETINIANO.....	48
2.9 ELETORRETINOGRAMA DE CAMPO TOTAL .....	52
3 OBJETIVOS .....	52
3.1 OBJETIVO GERAL .....	52
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	53
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	53
4.1 ANIMAIS UTILIZADOS NO ESTUDO .....	53
4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	54
4.3 CIRURGIA EXPERIMENTAL.....	56
4.4 PARÂMETROS CLÍNICOS .....	56
4.4.1 Monitoramento do peso e tamanho .....	56
4.4.2 Níveis séricos de T3 .....	57
4.5 ELETORRETINOGRAMA .....	57
4.5.1 Registro do eletrorretinograma de campo total (ERG).....	57
4.5.2 Condições de registro .....	58
4.5.3 Protocolo para realização do exame.....	59
4.5.4 Equipamento utilizado nos registros eletrofisiológicos.....	60
4.5.5 Mensuração dos componentes do ERG .....	60

4.6 ANÁLISE DOS REGISTROS .....	61
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	62
5 RESULTADOS .....	63
5.1 PARÂMETROS CLÍNICOS .....	63
5.2 AVALIAÇÃO DO TEMPO IMPLÍCITO PARA RESPOSTAS ESCOTÓPICAS MÁXIMAS E FOTÓPICAS .....	66
5.3 AVALIAÇÃO DA AMPLITUDE DAS ONDAS NO ERG DOS DIFERENTES GRUPOS E CONDIÇÕES DE REGISTRO .....	69
5.4 AVALIAÇÃO DA AMPLITUDE DA <i>onda-a</i> E DA <i>onda-b</i> NA RESPOSTA ESCOTÓPICA MÁXIMA.....	70
5.5 AVALIAÇÕES DA AMPLITUDE DA <i>onda-a</i> E DA <i>onda-b</i> NA RESPOSTA FOTÓPICA.....	72
5.6 AVALIAÇÕES DA AMPLITUDE DA <i>onda-b</i> NA RESPOSTA FOTÓPICA, COM ESTÍMULOS INTERMITENTES E DIFERENTES FREQUÊNCIAS TEMPORAIS.....	77
6. DISCUSSÃO .....	79
7. CONCLUSÃO.....	84
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	85

## 1 INTRODUÇÃO

A tireoide foi a primeira glândula descoberta apresentando atividade endócrina (MOHEBATI & SHAHA, 2012). É constituída pelos folículos tireoidianos, que apresentam em seu interior a tireoglobulina. Essa proteína pela ação da enzima deiodinase reage com o iodo presente no folículo para formação de moniodotirosil (MIT) e diiodotirosil (DIT). A etapa final de formação dos hormônios tireoidianos consiste no acoplamento de dois resíduos de DIT, para formar a *tiroxina* (T4) e de um resíduo de MIT e um de DIT, para formar a *3,5,3'-triiodotironina* (T3) (DUNN & DUNN, 2001; BERNAL *et al.*, 2003)..

Os hormônios tireoidianos formados continuam ligados à molécula de tireoglobulina, até que sejam requeridos pelo organismo, se desprendendo da mesma e sendo liberados na circulação (DUNN & DUNN, 2001). A síntese e secreção dos hormônios tireoidianos são controladas pelo eixo hipotálamo-hipófise-tireoide. A tireotrofina (TSH) controla o crescimento da glândula tireoide, bem com a síntese e secreção de T3 e T4. O TSH aumenta sua secreção quando estimulado pelo hormônio liberador de tireotrofina (TRH) e diminui sua secreção quando inibido pela somatostatina (SS). Todavia, seu principal regulador são os hormônios tireoidianos (retroalimentação negativa) (NUNES, 2005; MELMED, 2011).

Vários fatores estão relacionados à diminuição dos níveis de T3 e T4. Dentre eles destacam-se as alterações no eixo hipotálamo-hipófise-tireoide, ou mesmo na própria glândula (NUNES, 2005; MELMED, 2011). A carência dos hormônios tireoidianos gera uma síndrome denominada hipotireoidismo. Já foi estabelecido que essa doença afeta o sistema nervoso central, bem como a retina (LOOSEN *et al.*,

1985; BAUER *et al.*, 2003; BERNAL, 2003; AMBROGINI *et al.*, 2005; DEVDHAR *et al.*, 2007).

Foi demonstrado em modelos de hipotireoidismo congênito que a alteração do gene *Thrb*, responsável por codificar o receptor TR $\beta$ 2, alterou o desenvolvimento dos fotorreceptores, promovendo diminuição da subpopulação de cones M e aumento de cones S (LILYNG *et al.*, 2001). Em um estudo que avaliou hipotireoidismo em animais adultos e jovens, verificaram-se mudanças morfológicas nas camadas que compõe a retina e nos vários tipos celulares, incluindo os fotorreceptores e as células bipolares (ABOU-ELGHAIT *et al.*, 2011). Desta forma, para verificarmos se tais alterações morfológicas são acompanhadas por alterações funcionais, buscamos identificar se a indução do hipotireoidismo em ratos jovens, pela ablação da glândula tireoide, provocaria alterações em registros eletrorretinográficos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS E ASPECTOS HISTÓRICOS

A primeira glândula reconhecida apresentando atividade endócrina foi a tireoide, localizada no pescoço abaixo da laringe, em ambos os lados da traqueia em sua região anterior, situada entre a 5ª e a 7ª vértebra cervical, apresentando a forma da letra H, sendo constituída por dois lobos unidos por um istmo (Figura 1) (HARINGTON, 1936; MACIEL, 2007; MOHEBATI & SHAHA, 2012).

Apresenta uma cápsula interna fibrosa aderente e uma bainha externa frouxa derivada da camada média da fáscia (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). Sua lateral é coberta pelo músculo infra-hioide; a região medial está em contato com a faringe, laringe, traqueia e esôfago; e a superfície posterior comunica-se com a bainha carotídea e as glândulas paratireoides. O istmo localiza-se na região anterior ao 2º, 3º e 4º anéis traqueais (WANG *et al.*, 1998; MOORE & PERSAUD, 2000; GORMUS *et al.*, 2004).

A glândula tem origem do espessamento endodérmico mediano, a partir do soalho da faringe primitiva, sendo a primeira glândula endócrina a se desenvolver. O divertículo tireoidiano inicialmente é oco, posteriormente torna-se maciço e se divide em dois lobos, esquerdo e direito, unidos pelo istmo. Aproximadamente na sétima semana de gestação, a tireoide já apresenta sua forma definida e localiza-se em seu sítio final (MOORE & PERSAUD, 2000). Em humanos seu desenvolvimento começa aproximadamente na terceira semana de gestação, por volta do 16º–17º dia

(FISHER, 1997) e a síntese de hormônios se verifica entre 10<sup>a</sup>–12<sup>a</sup> semana de gestação (ROCHA *et al.*, 2010; MOHEBATI & SHAHA, 2012).

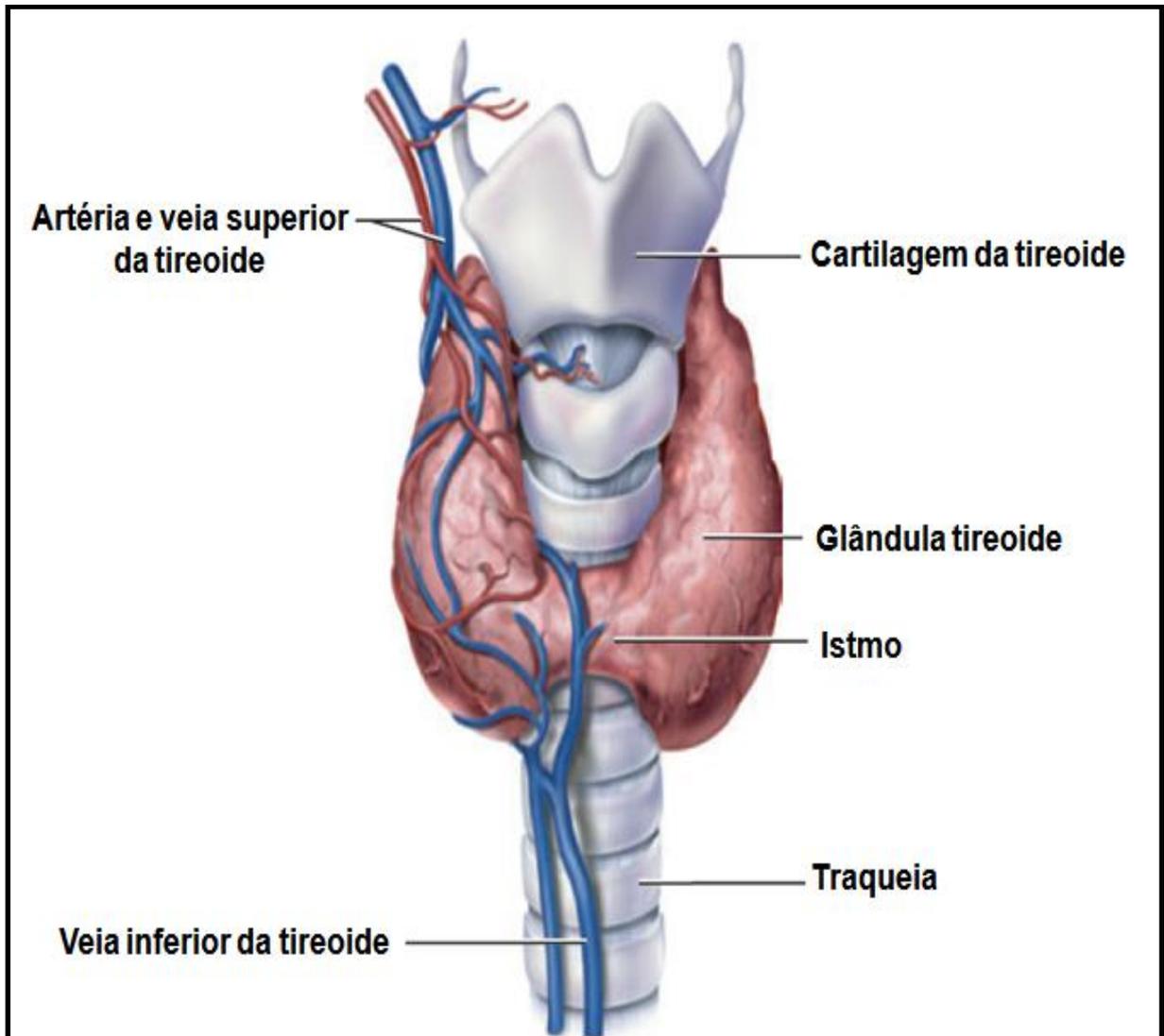


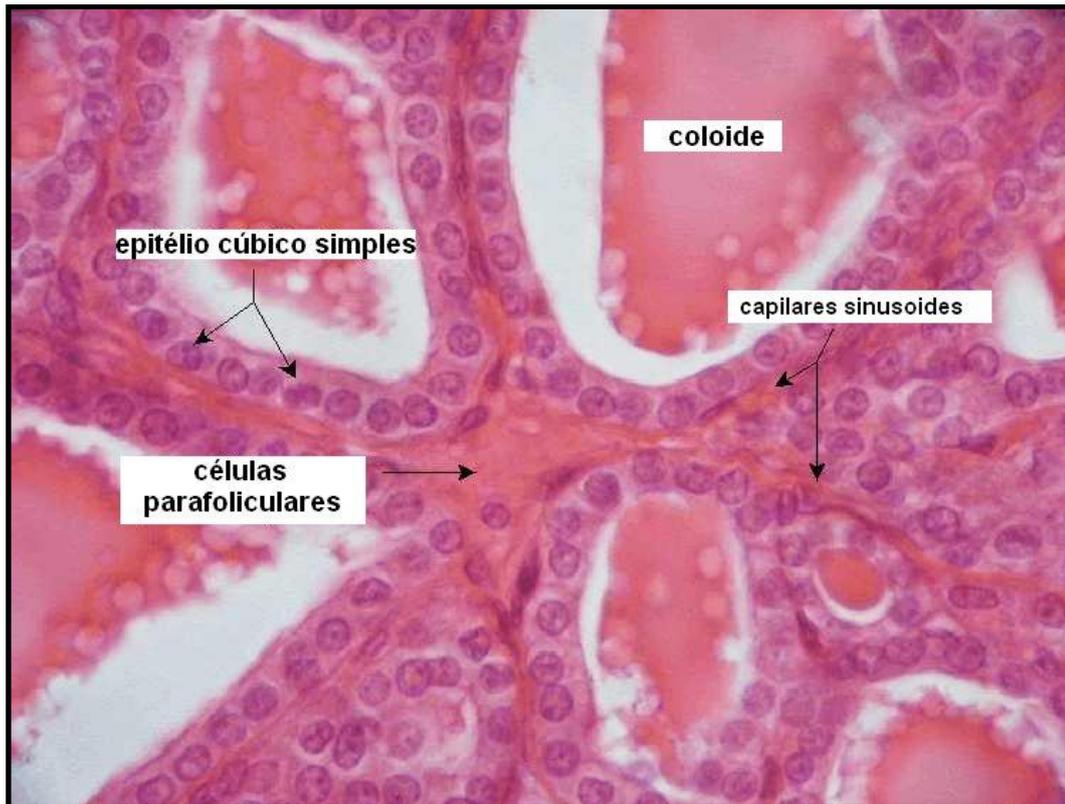
Figura 1. Imagem esquemática demonstrando a forma e a localização da glândula tireoide humana. Apresentando dois lóbulos unidos por um istmo, está localizada na parte anterolateral da traqueia. É irrigada pela artéria tireoidea superior e inferior, a drenagem venosa é realizada pelas veias superiores, média e inferiores da tireoide (VT). Fonte: adaptado de SALADIN, 2004.

A tireoide é composta por um epitélio cuboide, disposto em uma só camada, limitando espaços esféricos, preenchidos por uma substância gelatinosa, formando os folículos tireoidianos (Figura 2). Ela apresenta-se envolta por uma cápsula de

tecido conjuntivo frouxo que envia septos para o interior do parênquima glandular. Esses septos separam os folículos uns dos outros, através de uma membrana de tecido conjuntivo, constituída de fibras reticulares (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

O aspecto dos folículos varia de acordo com a sua atividade funcional e região na glândula. Os folículos tireoidianos apresentam em seu interior, a tireoglobulina, uma glicoproteína que armazena os hormônios tireoidianos (KIRSTEN, 2000).

A glândula tireoide é muito vascularizada, possuindo uma extensa rede sanguínea e linfática. Seus capilares são fenestrados, facilitando dessa forma a passagem do hormônio para o interior dos vasos. O suprimento sanguíneo é realizado pela artéria tireoidea superior (ramo da carótida externa), que entra no polo superior da glândula e pela artéria tireoidea inferior (ramo do tronco tireocervical), recebendo inervação vasomotora, dos sistemas simpático e parassimpático (FIGURA 1) (BORGES *et al.*, 2000; GORMUS *et al.*, 2004; MOHEBATI & SHAHA, 2012).



**Figura 2.** Imagem demonstrando a aparência microscópica de um folículo tireoidiano normal, composto por epitélio cuboide que formam espaços esféricos, preenchidos pelo coloide que armazena a tiroglobulina. Fonte: obtido de <http://www.teliga.net/2010/11/tecido-glandular-ou-secretor-sistema.html>, capturado 22.10.12.

A importância da tireoide só foi reconhecida após a publicação dos trabalhos de Caleb Parry em 1825, que associou alterações cardíacas e oculares com o hipertireoidismo (FERNANDES *et al.*, 2007); seguido pelos relatos de Graves e Basedow, em 1835 e 1840, sendo seus nomes associados aos distúrbios apresentados nas alterações da tireoide (LINDHOLM & LAURBERG, 2011).

William Withey Gull (1874) reconheceu a atrofia da glândula em determinados pacientes que apresentavam sintomas como, aumento de peso e cansaço excessivo. Condições associadas hoje, com hipotireoidismo ou doença de Gull em adultos (LINDHOLM & LAURBERG, 2011).

Os primeiros experimentos realizados de ablação da glândula tireoide para elucidar suas possíveis funções, foram interpretados de forma errônea, pois neles também foram removidas as glândulas paratireoides (CASPER & HEGNER, 1932; FARWELL & BRAVERMAN, 2006). Posteriormente, os trabalhos desenvolvidos pelo fisiologista francês Eugene Gley, no final do século XIX, demonstraram as diferenças funcionais entre as duas glândulas (CASPER & HEGNER, 1932; FARWELL & BRAVERMAN, 1996).

Uma série de pesquisas foram realizadas para elucidar as funções dos hormônios tireoidianos. Sabe-se hoje que eles desempenham papel fundamental no crescimento e desenvolvimento de vários órgãos e tecidos, exibindo ação durante o período embrionário e no período pós-natal, pois alguns órgãos e tecidos apresentam-se imaturos após o nascimento (FARWELL & BRAVERMAN, 1996; MOURA *et al.*, 1996; KOK *et al.*, 2001).

## 2. 2 SÍNTESE DOS HORMÔNIOS TIREOIDIANOS

A glândula tireoide sintetiza dois tipos de hormônios derivados do aminoácido tirosina, a *tiroxina* (T4) produzida em maior quantidade, cerca de 90% e a *3,5,3'-triiodotironina* (T3) produzida em menor quantidade, por volta de 10% (Figura 3). Todavia, quase toda T4 é convertida em T3 nos tecidos, pois a forma T3 do hormônio apresenta maior magnitude de ação (KÖHRLE, 2000).

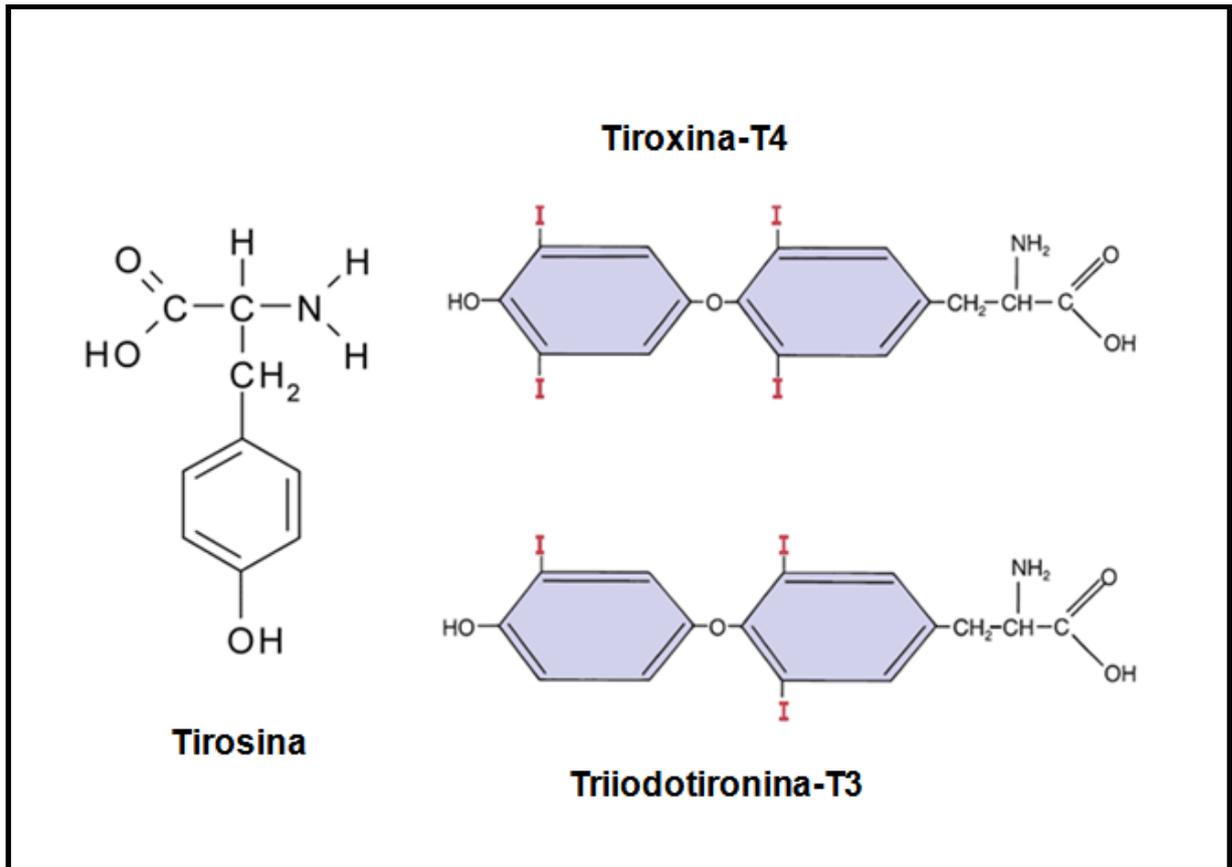


Figura 3. Representação esquemática da fórmula estrutural do aminoácido tirosina, do hormônio tiroxina-T4 e do hormônio triiodotironina-T3. Em destaque estão as moléculas de monoiodotirosil e diiodotirosil acopladas ao aminoácido para formação dos hormônios tireoidianos. Fonte: adaptado de FOX, 2003.

Edward Calvin Kendall em 1915 isolou a tiroxina a partir de um hidrolisado da tireoide, ele constatou que os cristais formados exerciam efeito fisiológico equivalente ao do extrato do qual o mesmo foi obtido (KENDALL, 1925). Em 1926, Harington descreveu a fórmula estrutural desse hormônio (HARINGTON & GEORGE, 1926).

Inicialmente toda a atividade hormonal da tireoide foi atribuída ao T4, no entanto, Gross e Pitt-Rivers em 1953 isolaram o T3 de extratos da tireoide, comprovando sua maior atividade biológica (GROSS & PITT-RIVERS, 1953).

A atividade dos hormônios tireoidianos está diretamente relacionada à sua natureza estereoquímica (GROSS & PITT-RIVERS, 1953). Foram desenvolvidas diversas pesquisas para tentar elucidar a relação entre estrutura e atividade dos hormônios. Leeson e colaboradores (1989) conseguiram obter um análogo da triiodotironina que apresentava ação de redução do colesterol, no entanto, sem efeitos calorigênicos e/ou cardíacos. Foram também sintetizados inúmeros análogos estruturais da tiroxina, que apresentavam atividade similar ao T4 (LEESON *et al.*, 1989; LIANG *et al.*, 1997).

Embora a natureza estereoquímica seja importante, outros fatores interferem na intensidade da ação do hormônio, incluindo: afinidade pelas proteínas plasmáticas; afinidade pelo receptor; expressão do receptor; e a taxa de entrada no núcleo da célula (LIANG *et al.*, 1997).

Para a produção dos hormônios tireoidianos é indispensável a presença do iodo, que é consumido na dieta na forma de iodeto, sendo necessária a ingestão de 75 µg do mesmo diariamente, para uma produção normal (DUNN, 2001).

A captação do iodo pela glândula se faz através de um intenso mecanismo de transporte ativo, por uma proteína transmembrana denominada simportador de sódio-iodo (NIS) (DAI *et al.*, 1996; ESKANDARI *et al.*, 1997; DOHAN *et al.*, 2003), localizada na região basal das células foliculares (DOHAN *et al.*, 2003). Vários tecidos como, mucosa gástrica, intestino delgado, pele, placenta e glândulas mamárias, apresentam uma concentração do iodeto superior a do sangue, associada com a presença da NIS nos mesmos (GRIFFIN, 2004).

A captação do iodo pode ser inibida por diversos competidores, tais como, o perclorato e o tiocianato. Bem como, pode ser estimulada pela ação da tireotrofina (TSH), que aumenta a expressão da NIS (ENG *et al.*, 1999).

O passo seguinte à captação de iodeto é a sua conversão em iodo elementar, através da oxidação do mesmo pela enzima peroxidase tireoidea (TPO) (CORVILAIN *et al.*, 1988). Simultaneamente, a tireoglobulina (660 kDa), uma proteína com 140 resíduos de tirosina, é produzida e secretada pelo retículo endoplasmático e aparelho de Golgi das células foliculares para o interior do folículo. Sob a ação da enzima iodinase, o iodo reage com a tireoglobulina para a formação de moniodotirosil (MIT) e diiodotirosil (DIT) (CARVALHO *et al.* 1987; MEDEIROS *et al.*, 1996).

A etapa final consiste no acoplamento de dois resíduos de DIT, para formar o T4, ocorrendo preferencialmente na extremidade amino-terminal da proteína (Figura 3). Enquanto que na formação do T3 acontece a junção de um resíduo de MIT e de um DIT, na extremidade carboxi-terminal (Figura 3) (DUNN & DUNN, 2001; BERNAL *et al.*, 2003). Concluída a síntese dos hormônios tireoidianos, eles serão armazenados nos folículos, como parte da molécula de tireoglobulina, em quantidades suficientes para atender a demanda do organismo (DUNN & DUNN, 2001) (Figura 4).

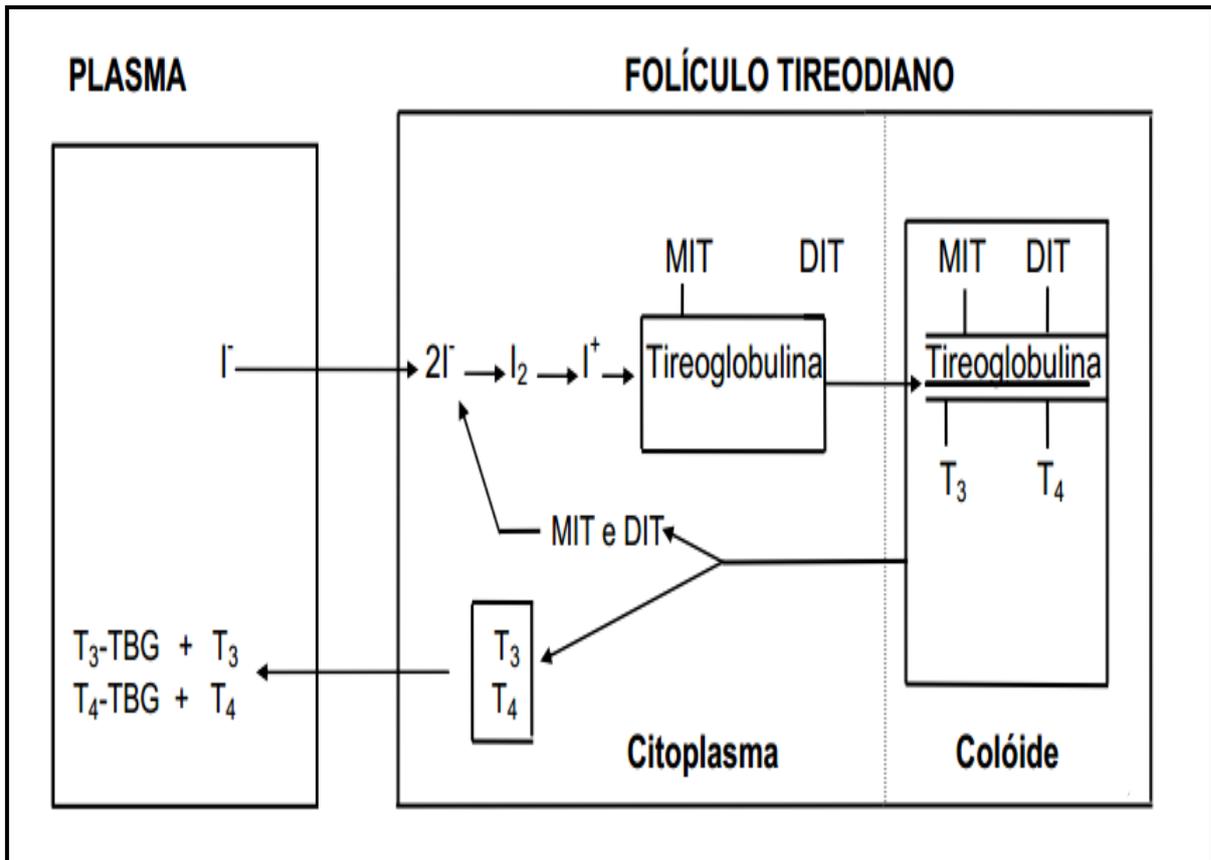


Figura 4. Representação esquemática da síntese dos hormônios tireoidianos. O primeiro passo na biossíntese é a captação do iodeto do plasma para dentro da glândula, o qual será rapidamente oxidado para forma de iodo elementar, podendo gerar formas intermediárias. O iodo elementar passará por um processo de organificação quando se acoplar à resíduos de tirosina presentes na molécula de tiroglobulina, com formação de monoiodotirosil (MIT) e diiodotirosil (DIT), duas moléculas de DIT podem se acoplar para formar a tiroxina (T4) e do acoplamento de uma molécula de MIT e uma de DIT resulta a triiodotirosina (T3). Quando existe necessidade metabólica os hormônios produzidos no folículo e armazenados no coloide são liberados no citoplasma ainda aderidos à molécula de tiroglobulina, a qual sofre proteólise liberando T3 e T4, posteriormente secretados no sangue. Algumas moléculas de tiroglobulina com T3 e T4 acoplados também são liberadas. MIT e DIT liberados do coloide serão degradados formando iodeto que será convertido em iodo elementar entrando novamente no ciclo de formação dos hormônios. Fonte: Retirado de LOPES, 2002.

## 2. 3 LIBERAÇÃO E TRANSPORTE DOS HORMÔNIOS TIREOIDIANOS

O processo de secreção dos hormônios tireoidianos se inicia com a pinocitose do coloide pelas células foliculares, formando uma vesícula que irá se fundir com lisossomos, os quais depositarão nas vesículas proteínases que irão degradar a molécula de tireoglobulina, havendo a liberação da T3 e da T4. Por sua vez, estes hormônios se difundirão da base da célula para os capilares circunvizinhos, sendo desta forma liberados na corrente sanguínea (KOPP *et al.*, 2005).

A TSH intensifica o processo de degradação da tireoglobulina, pois aumenta a produção de endopeptidases nos lisossomos. Essas enzimas clivam seletivamente a tireoglobulina, produzindo compostos intermediários que serão degradados posteriormente por exopeptidases (KOPP *et al.*, 2005).

Quando a tireoglobulina é degradada, além de secretar os hormônios tireoidianos, também libera MIT e DIT, que serão metabolizados, desprendendo o iodeto, que será disponibilizado para produção de quantidades adicionais de hormônio (Figura 4) (KOPP *et al.*, 2005).

Ao adentrarem na corrente sanguínea T3 e T4 rapidamente se ligam a diversas proteínas plasmáticas de forma não-covalente. Dentre elas destaca-se a globulina de ligação da tiroxina (TBG), uma glicoproteína ácida com peso molecular de 63 kDa, que se liga com menor afinidade à T3 (FELING *et al.*, 1995). Outra proteína encontrada em concentrações mais elevadas no plasma, a pré-albumina (transtirretina) também se liga preferencialmente à T4. Essa proteína apresenta quatro subunidades idênticas, mas apenas um sítio de ligação com alta afinidade. Já a albumina participa também do transporte dos hormônios tireoidianos, porém

apenas quando as outras proteínas carreadoras encontram-se com seus sítios de ligação saturados (INGENBLEEK & YOUNG, 1994).

Quando comparada ao T3, a maior afinidade das proteínas plasmáticas ao T4 reflete-se nas diferenças de concentração desta última e na sua meia-vida, pois a ligação dos hormônios tireoidianos às proteínas, os protege da degradação e excreção (MENDEL *et al.*, 1987). Ao serem liberadas lentamente na corrente sanguínea, T3 e T4 se fixam às proteínas intracelulares plasmáticas, sendo armazenadas para serem utilizadas no decorrer do tempo (MORI *et al.*, 2002).

## **2. 4 RECEPTORES E AÇÃO HORMONAL**

O efeito geral dos hormônios tireoidianos é promover a transcrição gênica, por meio dos seus receptores nucleares, espalhados por todo organismo. Estes receptores pertencem a uma subclasse da superfamília de receptores nucleares. Os receptores tireoidianos são classificados como TR $\alpha$  e TR $\beta$ , para os quais diferentes isoformas foram descritas:  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 e  $\beta$ 3 (LAZAR, 1993; FLAMANT & SAMARUT, 2003).

Após a ativação destes receptores, verifica-se um aumento no número de enzimas, proteínas estruturais e de transporte, apresentando como resultado um aumento generalizado da atividade funcional (MORI *et al.*, 2002). Quase todo T4 que atravessa a membrana plasmática, antes de se ligar ao gene através de receptores específicos, é convertida em T3 pela remoção de um íon iodeto (BRENT, 1994). A T3 apresenta elevada afinidade de ligação aos receptores dos hormônios

tireoidianos, sendo os mesmos fixados aos filamentos de DNA (MANGELSDORF *et al.*, 1995).

Muitos papéis foram associados aos hormônios tireoidianos, dentre eles destacam-se o aumento do tamanho e número de mitocôndrias, alterando dessa forma a função dessa organela, elevando a velocidade de formação do ATP (trifosfato de adenosina), resultando no aumento da atividade da célula (TATA *et al.*, 1963; MORI *et al.*, 2002). Participa também do crescimento, principalmente durante a infância. Crianças com hipotireoidismo têm seu crescimento retardado, enquanto que as que apresentam hipertireoidismo frequentemente apresentam aumento excessivo do esqueleto, com o amadurecimento ósseo precoce (UHRMANN *et al.*, 1978).

São essenciais no desenvolvimento do sistema nervoso central, participando do crescimento e diferenciação neuronal, durante o período embrionário, pós-natal e nos primeiros anos de vida. Por este motivo, quantidades reduzidas de hormônios tireoidianos retardam a maturação e o desenvolvimento cerebral (MOURA *et al.*, 1996).

## **2. 5 REGULAÇÃO NEUROENDÓCRINA DA FUNÇÃO TIREOIDIANA**

A função tireoidiana é controlada por um complexo sistema neuroendócrino, que envolve o eixo hipotálamo-hipófise-tireoide (Figura 5). O hipotálamo e a hipófise encontram-se interconectados, através de um sistema circulatório especializado (porta-hipotálamo-hipofisária) composto por duas redes de capilares situados na

eminência mediana do hipotálamo, por meio do qual os hormônios hipotalâmicos são direcionados para a hipófise anterior (NUSSEY & WHITEHEAD, 2001).

Apresentam-se também integrados por terminações nervosas, localizadas nos núcleos paraventriculares e periventriculares, estabelecendo sinapses entre si. Estão associados com outras áreas do sistema nervoso central, bem como recebendo influência de informações periféricas, que desencadeiam respostas de ativação ou inibição de sua atividade (NUNES, 2005; MELMED, 2011).

A hipófise anterior apresenta uma população de células denominadas tireotrofos, que sintetizam e secretam o hormônio tireotrófico ou tireotrofina (TSH), o qual apresenta duas subunidades, alfa e beta, ligadas não covalentemente. Este hormônio é responsável pelo crescimento e função da glândula tireoide (WEINTRAUB & GESUNDHEIT, 1987).

No processo de secreção de TSH pela hipófise anterior, o hormônio liberador de tireotrofina (TRH) estimula sua liberação enquanto que a somatostatina (SS) a inibe. No entanto, seu principal regulador é o hormônio tireoidiano T3, que eleva a expressão de receptores que participam da inibição da secreção, e diminui a de receptores que aumentam a liberação (NUNES, 2005; MELMED, 2011).

Os efeitos biológicos do TSH ocorrem após sua interação com receptores metabotrópicos (TSH-R) na membrana das células foliculares da glândula tireoide, que reconhecem sua subunidade beta e desencadeiam o aumento dos níveis de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) e ativação de fosfolipase C (NUNES, 2005; MELMED, 2011).

O TSH participa da síntese e secreção dos hormônios tireoidianos, sendo seu primeiro efeito biológico nas células foliculares, aumentando a captação de iodeto, através da indução da expressão gênica da NIS (HARUN-OR-RASHID *et al.*, 2010).

O hormônio liberador de tireotrofina (TRH) apresenta efeito estimulante na liberação de TSH (NUNES, 2005). É sintetizado por um gene localizado no cromossomo três, na forma de um pré-pró-hormônio, sofrendo processamento no retículo endoplasmático e complexo de Golgi (NUSSEY & WHITEHEAD, 2001; NUNES, 2005).

Como um mecanismo de retroalimentação negativa, os próprios hormônios tireoidianos atuam sobre a região promotora do gene que regula a expressão do pré-pró-hormônio-TRH (FEKETE *et al.*, 2001).

O TRH atua na membrana dos tireótrofos, em receptores específicos (TRH-R) acoplados à proteína G, os quais ativam fosfolipase C, levando à formação de trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG) (NUNES, 2005; MELMED, 2011). O IP3 induz a liberação de cálcio ( $Ca^{++}$ ) no citossol pelo retículo endoplasmático, desencadeando uma série de eventos como a exocitose de vesículas que contém TSH. Em paralelo, o  $Ca^{++}$  juntamente com o DAG promove a ativação da proteína cinase C (PKC) que é rapidamente translocada para a membrana, fosforilando outras proteínas e aumentando o influxo de  $Ca^{++}$ , que sustenta a síntese e secreção de TSH (NUNES, 2005; MELMED, 2011).

Os núcleos periventriculares do hipotálamo apresentam neurônios que expressam somatostatina, um peptídeo sintetizado na forma de um precursor pré-pró-SS (NUNES, 2005; MELMED, 2011). Destes núcleos partem feixes de fibras nervosas, que se encaminham à eminência mediana. Uma parte dessas células faz

sinapses com neurônios TRHérgicos, inibindo a liberação do hormônio TRH. Outra parte secreta a SS nos capilares do sistema porta-hipotálamo-hipofisário, que atua nos tireotrofos e somatotrofos, na hipófise anterior, reduzindo a produção e liberação de TSH (NUNES, 2005; MELMED, 2011; PATEL *et al.*, 2011).

O mecanismo de ação da SS ocorre por meio da interação com receptores metabotrópicos, com pelo menos cinco isoformas (SSTR-1 a 5), que exibem diferentes vias de transdução de sinais (KOLAKOWSKI *et al.*, 1996; BRONSTEIN-SITTON, 2006; PATEL *et al.*, 2011).

A interação da SS com a isoforma SSTR-2, receptor predominante na hipófise, resulta na inibição da atividade da enzima adenilato ciclase, levando à diminuição dos níveis de AMPc intracelulares, e da atividade da proteína cinase A (PKA), resultando na diminuição do influxo de  $Ca^{++}$ , reduzindo dessa forma a liberação de TRH e por conseguinte de TSH. A SS também altera a síntese de TSH, pois diminui a atividade da PKA no tireotrofo, interferindo na fosforilação de PIT 1, um fator de transcrição que está relacionado à expressão do gene do TSH (NUNES, 2005; MELMED, 2011).

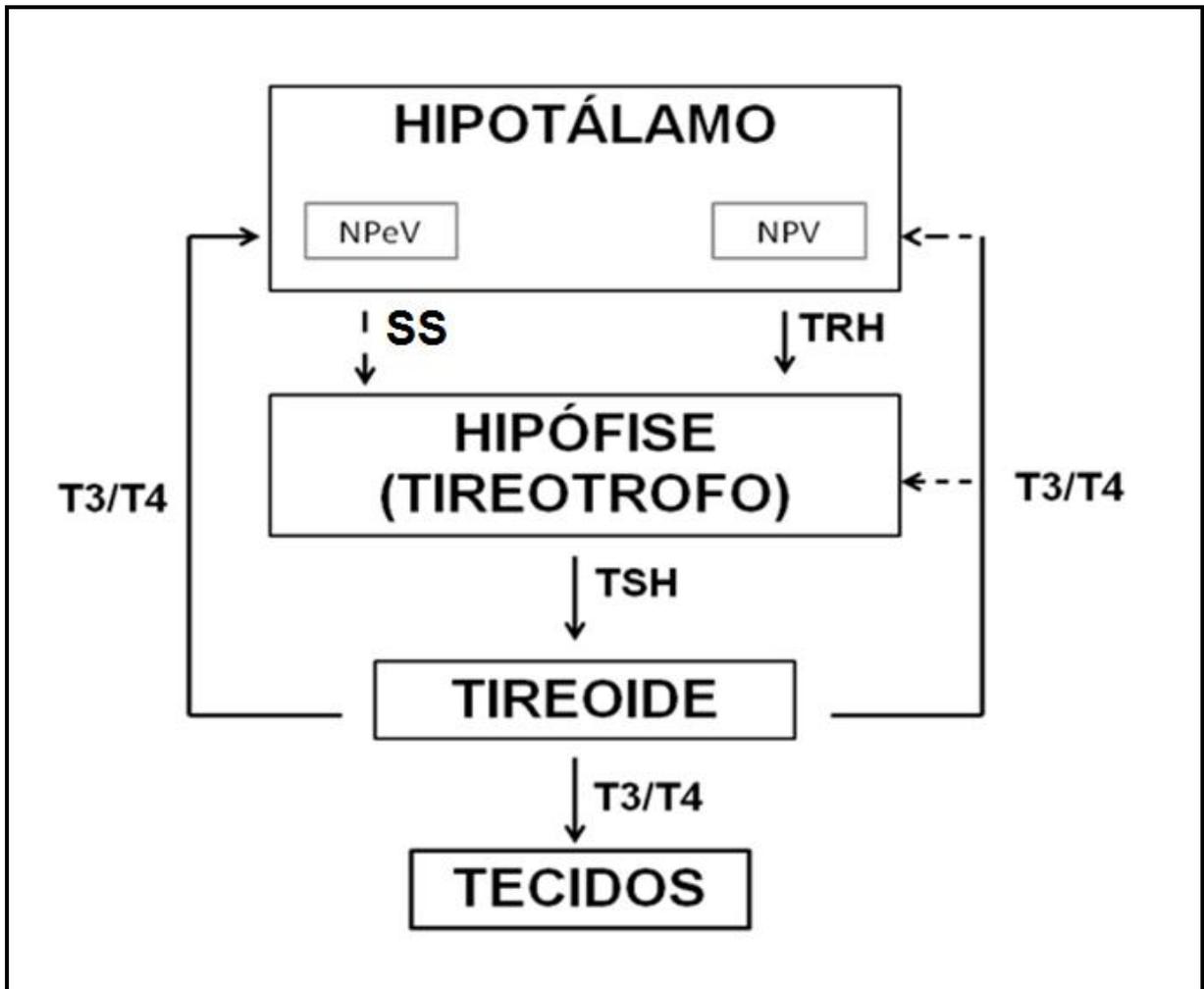


Figura 5. Organização geral do sistema hipotálamo-hipófise-tireoide e sua integração com os tecidos estão representadas. Regiões hipotalâmicas cujos neurônios expressam SS (NPeV - núcleo periventricular) e TRH (NPV - núcleo paraventricular). As setas contínuas representam estimulação dos respectivos hormônios e as pontilhadas representam inibição sobre seus respectivos alvos. Fonte: modificado de ANTUNES-RODRIGUES, 2005.

## 2.6 HIPOTIREOIDISMO

O hipotireoidismo é a doença mais comum, dentro das deficiências hormonais, caracteriza-se pela diminuição dos níveis plasmáticos dos hormônios T3 e T4, ocasionando uma série de alterações no indivíduo, devido às diversas funções relacionadas a esses hormônios (DEVDHAR *et al.*, 2007).

O conjunto de sinais e sintomas mais frequentes apresentados por indivíduos com hipotireoidismo são: intolerância ao frio; ganho de peso; constipação; pele seca; bradicardia; rouquidão; retardamento do processamento mental e prejuízo visual. Também podem manifestar sintomas menos frequentes; dentre eles: hipotermia; insuficiência cardíaca congestiva; derrame pleural; coagulopatia; manifestações neurológicas como; depressão; psicose; ataxia; convulsões; coma; déficit de memória e demência (GOLD *et al.*, 1981; SHAFER *et al.*, 1984; KLEIN, 1990; HEYMANN *et al.*, 1992; BURMEISTER *et al.*, 2001).

Essa doença pode ser classificada de acordo com: o período de aquisição (congenito ou adquirido); o nível da disfunção endócrina (primário ou secundário); e sua gravidade (evidente, quando apresentar sinais e sintomas clínicos, e leve, quando for subclínico) (ROBERTS & LADENSON, 2004).

Em 1874, William Gull descreveu mudanças de características clínicas em pacientes do sexo feminino, as quais se assemelhavam às descritas em crianças que apresentavam cretinismo. Em 1878 denominou de mixedema, uma síndrome que afetava mulheres, modificando seu aspecto facial, com características grosseiras ao passar do tempo, bem como, embotamento mental, hipotermia, pele seca e edema (SETIAN, 2007). No mesmo período, dois cirurgiões suíços, Kocher e

Reverdin, em pesquisas distintas, descreveram o desenvolvimento de um estado cretino após a remoção da glândula tireoide de pacientes, o qual denominaram, caquexia estrumipriva, conhecida atualmente como caquexia tiropriva (ROBERTS & LADENSON, 2004).

A Sociedade Clínica de Londres formou uma comissão, em 1883, para investigar a relação entre as três condições descritas, determinando anos mais tarde a real ligação entre as mesmas. O diagnóstico do hipotireoidismo só ocorreu no século seguinte com a identificação dos hormônios que participavam da liberação dos hormônios tireoidianos, e o desenvolvimento de técnicas de imunoenaios para dosar TRH, TSH, T3 e T4 (ROBERTS & LADENSON, 2004).

O tratamento contra o hipotireoidismo realiza-se com levotiroxina sódica (tiroxina), que apresenta um alto grau de eficácia e poucas reações adversas (TOFT, 1994). Nos casos das desordens hormonais devido à presença de tumores, é feita a remoção do tumor (MAIA *et al.*, 2007).

## **2.7 SISTEMA VISUAL E HIPOTIREOIDISMO**

Os hormônios tireoidianos desempenham um papel crucial no desenvolvimento do sistema nervoso central, incluindo o sistema visual cortical e a retina. Regulam genes envolvidos principalmente com a mielinização de neurônios, diferenciação de células gliais e neuronais, migração, sinaptogênese e ramificação dendrítica (LOOSEN *et al.*, 1985; BAUER *et al.*, 2003; BERNAL, 2003; AMBROGINI *et al.*, 2005). Para tanto, faz-se necessário que a expressão dos receptores

tireoidianos em diferentes momentos nas células alvo, bem como a síntese e liberação destes hormônios sejam altamente reguladas.

Todas as isoformas dos receptores tireoidianos estão presentes durante o desenvolvimento e na vida adulta na retina de roedores (AZADI *et al.*, 2002). A presença de TR $\beta$ 2 é essencial no desenvolvimento da visão de cores. Estudos *in vitro* e *in vivo* de células progenitoras retinianas de camundongos, demonstraram que a ativação deste receptor promove a diferenciação dos fotorreceptores, bem como, a definição de seu sítio definitivo na retina e o tipo de cone (ROBERTS *et al.*, 2006).

Lilyng *et al.*, (2001) realizaram eletrorretinograma (ERG) em camundongos transgênicos para o gene *Thrb*, responsável em codificar o receptor TR $\beta$ 2, o qual está envolvido no desenvolvimento de cones M, e verificaram diminuição na amplitude da *onda-b*, quando comparadas com camundongos tipo selvagem. Nesse mesmo estudo os autores identificaram a mudança fenotípica no desenvolvimento dos fotorreceptores, apresentando diminuição da subpopulação de cones M, com um aumento significativo de cones S. Resultados semelhantes foram obtidos por Pessoa *et al.* (2008), demonstrando que a expressão de cones S e M são dependentes dos níveis normais do hormônio tireoidiano durante o desenvolvimento da retina de camundongos. Neste estudo, registros eletrorretinográficos mostraram que em animais “knockout” para o gene *Thrb*, não havia resposta eletrofisiológica foram utilizados estímulos de comprimentos de onda na faixa de 540 nm.

Holdew & Condon, (1989) realizaram ERG e potencial evocado (VEP) em indivíduos que apresentavam hipotireoidismo idiopático, verificaram aumento no

tempo implícito das respostas, o qual foi revertido em indivíduos tratados com tiroxina.

Foi demonstrado em modelos murinos que o hipotireoidismo congênito diminui a espessura da retina e o número de células (PESSOA *et al.* 2008). O prejuízo visual relacionado com o hipotireoidismo é muito variado, apresentando forte ligação entre o período de desenvolvimento do indivíduo e a aquisição da doença. Em crianças com hipotireoidismo congênito, por exemplo, as alterações são bem mais graves e normalmente irreversíveis após seu estabelecimento, quando comparadas a indivíduos adultos (EL-SHEIKH *et al.*, 1994; RASTOGI & LAFRANCHI, 2010).

## **2.8 ESTRUTURA MORFO-FUNCIONAL DO TECIDO RETINIANO**

Durante o processo evolutivo os animais desenvolveram conjuntos de células que apresentavam sensibilidade à luz. Muitos destes também adquiriram percepção cromática, que lhes permitiu identificar variações espectrais e temporais de luz. Em vertebrados, a primeira etapa no processo de captação e transformação do estímulo luminoso ocorre na retina, composta por dez camadas dispostas de forma laminar, sendo bem conservada ao longo do processo evolutivo dos vertebrados (AHNELT & KOLB, 2000; JACOBS, 2001; KOLB, 2004).

A compreensão sobre o mosaico e os diferentes tipos celulares que compõe a retina, nos permite entender melhor as diferentes vias que um sinal gerado pode tomar. Bem como, o grau de percepção visual de cada espécie. As camadas que

copõem a retina, tomando com base a região mais externa do globo ocular são (WÄSSLE & BOYCOTT, 1991; KOLB, 2004):

1. O epitélio pigmentar - formado pelas células produtoras de melanina, responsáveis pela dissipação dos fótons de luz que atravessam a retina. Realiza também a captação de todo o trans-retinal, o convertendo novamente a 11-cis-retinal, que é então liberado para o meio.

2. Segmento externo dos fotorreceptores - responsável pela fototransdução.

3. Membrana limitante externa - separa o segmento externo dos fotorreceptores de seus núcleos.

4. Camada nuclear externa - formada pelos núcleos e corpos celulares dos fotorreceptores, cones e bastonetes.

5. Camada plexiforme externa - onde ocorre a interação entre os axônios dos fotorreceptores e os dendritos dos interneurônios (células bipolares e horizontais).

6. Camada nuclear interna - apresenta os corpos e núcleos dos neurônios de segunda ordem ou interneurônios, que são as células bipolares, horizontais e amácrinas.

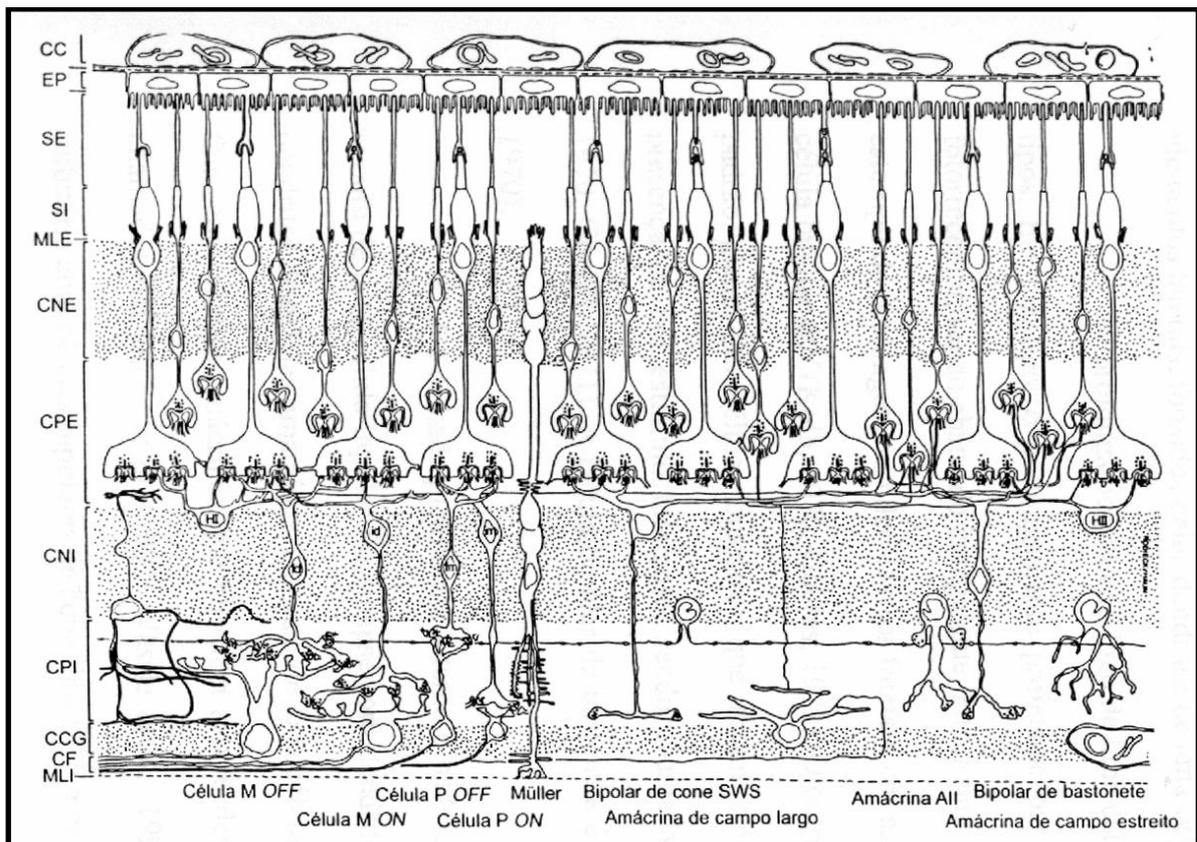
7. Camada plexiforme interna - que contém as sinapses formadas pelos axônios dos interneurônios e os dendritos das células ganglionares.

8. Camada de células ganglionares - abriga os corpos celulares dessas células.

9. Camada de fibras nervosas - é formada pelos axônios das células ganglionares que darão origem ao nervo óptico. Este conduz as informações visuais

captadas pela retina até o quiasma óptico, e daí até os centros superiores do processamento visual.

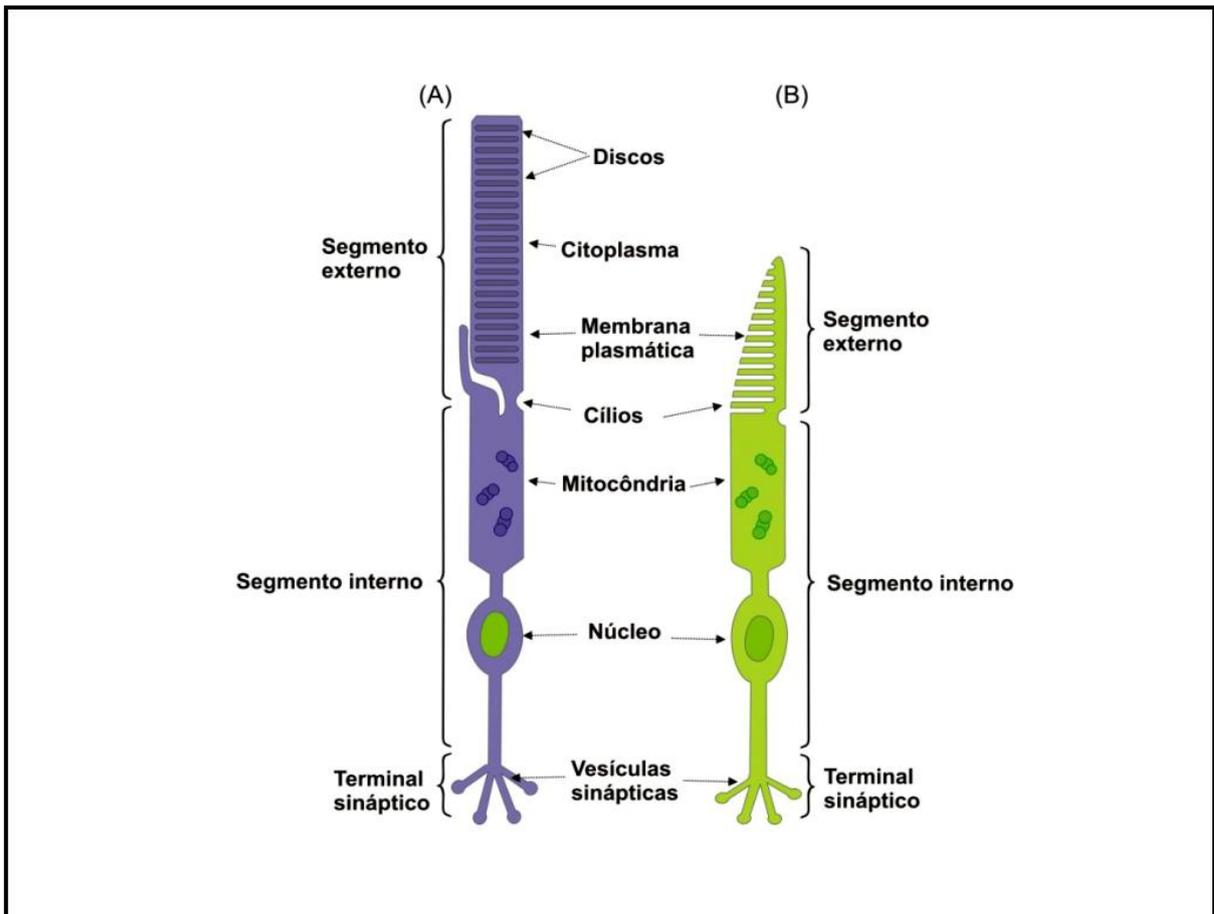
10. Membrana limitante interna - formada por células de Müller, que têm como principal função a manutenção da forma da retina e o fornecimento dos substratos essenciais à manutenção dos neurônios.



**Figura 6. Diagrama esquemático da retina de vertebrados, mostrando a estrutura laminar da retina e seus elementos celulares. (CC) Camada coroidal; (EP) epitélio pigmentar; (SE) Camada de segmentos externos; (SE) Camada de segmentos internos; (MLE) Membrana limitante externa; (CNE) Camada nuclear externa; (CPE) Camada plexiforme externa; (CNI) Camada nuclear interna; (CPI) Camada plexiforme interna; (CCG) Camada de células ganglionares; (CF) Camada de fibras do nervo óptico; (MLI) Membrana limitante interna (Modificado de Rodieck, 1998).**

O conjunto de células responsável pela fototransdução da energia luminosa em energia eletroquímica são os fotorreceptores, esses tipos celulares podem ser

divididos em duas classes, os bastonetes e os cones (Figura 7). Sendo diferenciados pela sua morfologia, distribuição espacial, características bioquímicas e pela diferença na absorção do espectro de luz (WÄSSLE & BOYCOTT, 1991).



**Figura 7. Diferenças morfológicas entre os fotorreceptores. (A) Estrutura do bastonete e (B) estrutura do cone. Modificado de PURVES *et al.*, 2004.**

A morfologia dos fotorreceptores é bem característica apresentando quatro regiões principais: 1) o segmento externo – que é formado por discos membranosos, empilhados uns sobre os outros e empacotados, apresentando proteínas responsáveis pela fototransdução, que convertem a energia luminosa (fótons) em energia eletroquímica; 2) o segmento interno – que apresenta uma grande

quantidade de organelas em seu interior, sendo responsável pela síntese e metabolismo de proteínas e pela produção de energia que será utilizada pela célula; 3) o pericário – que aloja o núcleo do fotorreceptor, situado na camada nuclear externa; 4) a terminação sináptica – situada logo abaixo do pericário na camada plexiforme externa, comunica-se com as células bipolares e horizontais da camada nuclear interna. É específica para cada tipo de fotorreceptor, no cone recebe a denominação de pedículo e nos bastonetes recebe a denominação de esférula (COHEN, 1992).

Os bastonetes receberam essa denominação pela sua morfologia, tendo um formato de bastão ou cilindro no segmento externo, apresentando alta sensibilidade a estímulos luminosos, funcionando preferencialmente sob condições de baixa luminosidade o que caracteriza a visão escotópica (BROWMAKER & HUNT, 2006). Na retina de vertebrados somente um tipo de bastonete é encontrado, apresentando-se em maior quantidade, quando comparado ao cone, principalmente nas regiões periféricas da retina, sendo responsável pela visão periférica, exibindo como fotorpigmento a rodopsina (BROWMAKER & HUNT, 2006).

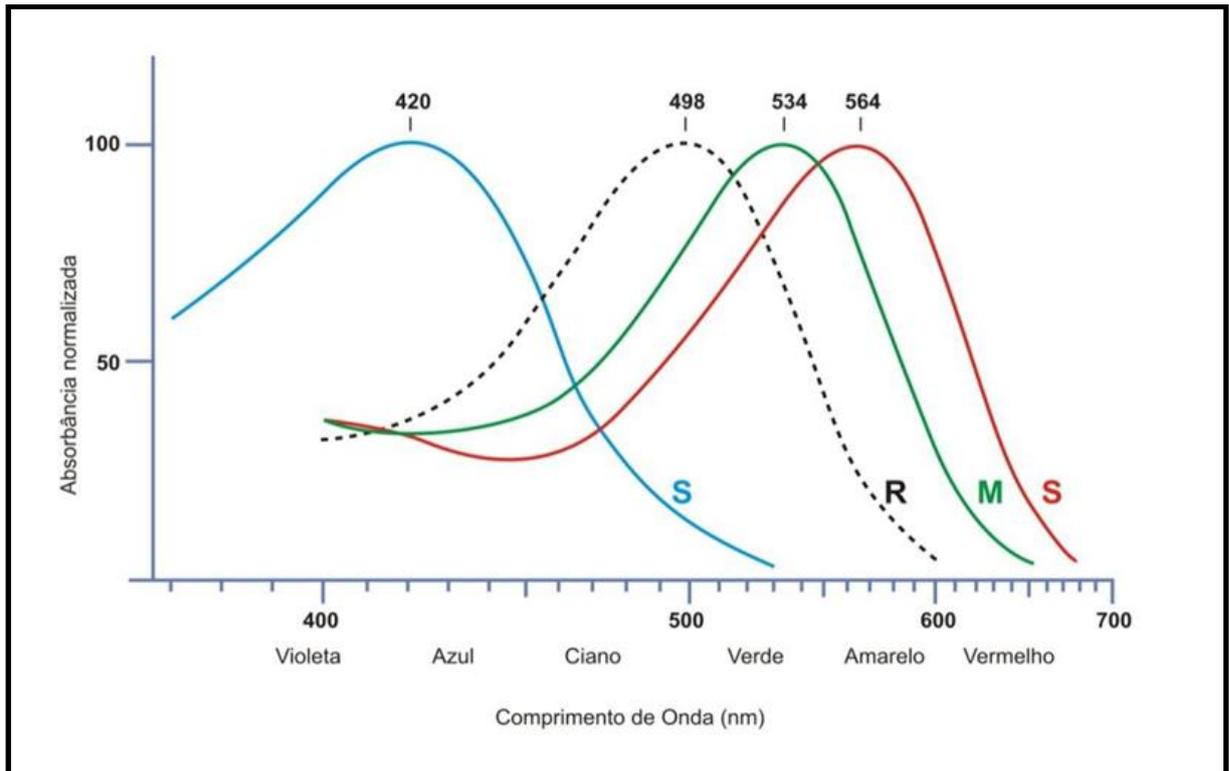
Os cones têm forma cônica e alongada em seu segmento externo, e uma menor sensibilidade à luz, funcionando dessa forma, em ambiente com um maior índice de luminosidade (visão fotópica). Estão relacionados ao detalhamento da imagem (alta acuidade visual) e a visão de cores, pois têm sensibilidade a diferentes faixas espectrais, tendo como fotorpigmento a opsina (BOWMAKER & HUNT, 2006).

Na visão fotópica de vertebrados a absorção da luz ocorre pelo fotorpigmento dos cones. Os genes responsáveis pela formação das opsinas dos cones pertencem à três famílias de genes (SWS1, SWS2, MWS/LWS), os quais codificam todos os

pigmentos de cone de vertebrados. Contudo, apenas duas destas famílias de genes são expressas em mamíferos (SWS1 e MWS/LWS). Em mamíferos, podemos encontrar animais com até três tipos de cones (tricromatas) com fotopigmentos diferentes, os quais podem ser classificados em um dos dois grupos de acordo com pico de sensibilidade espectral. Assim, temos os cones ultravioleta (UV) e os cones S (*“short wavelength-sensitive”*) classificados na família SWS1, e os cones M (*“middle wavelength-sensitive”*) e os cones L (*“long wavelength-sensitive”*) classificados na família MWS/LWS (AHNELT & KOLB, 2000; JACOBS, 2001).

Os Mamíferos apresentam a capacidade de colonizar uma grande variedade de habitats, no qual o sistema visual apresenta-se como uma fonte importante de informações ambientais. A forma como as informações visuais são captadas e processadas são de extrema importância para a sobrevivência e obtenção de alimentos. Nesse contexto, a visão de cores tem papel crucial no reconhecimento de variações espectrais no ambiente propiciado inicialmente pela sensibilidade dos diferentes fotopigmentos e um sofisticado processamento pós-receptor (AHNELT & KOLB, 2000; JACOBS, 2001).

Como exposto anteriormente, na retina de mamíferos podemos encontrar até três tipos distintos de cones, que possuem sensibilidade a diferentes comprimentos de onda. Em primatas a presença dos seguintes cones: Cones S, sensíveis a comprimento de ondas curto, que apresentam absorção de luz em comprimentos de onda situados na faixa de 420 nm; cones M, que demonstram sensibilidade a comprimento de ondas médio, na faixa de 534 nm (cones M); e os cones L maximamente sensíveis aos comprimentos de onda longos, na faixa de 564 nm (Figura 8) (WÄSSLE & BOYCOTT, 1991; KOLB, 2004).



**Figura 8. Curva de sensibilidade espectral de cones e bastonetes de humanos. Bastonetes (R) e cones (S, M e L).** Fonte: Adaptado de [http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro: Cone-esponse.png](http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Cone-esponse.png), acesso em 20/10/2012.

A despeito de primatas e alguns marsupiais, a regra geral em mamíferos é a presença de apenas dois subtipos de cones. Na retina de vários roedores, dentre eles o rato, encontramos dois subtipos de cones: cones UV com pico de sensibilidade espectral em 358 nm; e os cones M, apresentando pico de sensibilidade em 510 nm (Figura 9). A presença de apenas dois cones nesses animais é o requisito básico para o estabelecimento da visão dicromata (JACOBS, 2001).

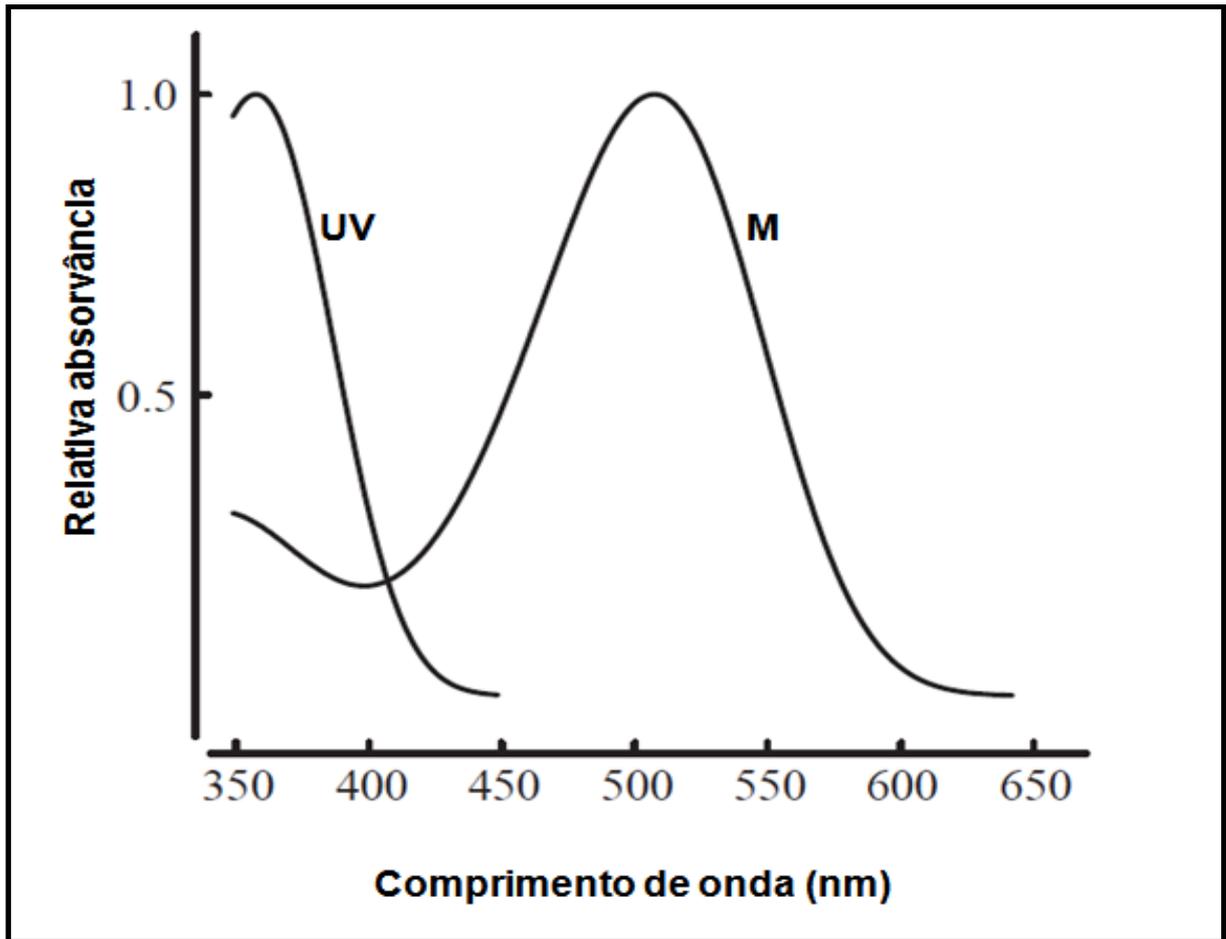


Figura 9. Curva de sensibilidade espectral dos cones (UV e M) de ratos. (Fonte: modificado de JACOBS *et al.*, 2001).

Os terminais sinápticos dos fotorreceptores são estruturas morfologicamente distintas, como já foi descrito, podendo classicamente fazer sinapses com células bipolares e horizontais, denominadas desta forma, de sinapses em fita ou *ribbon-synapse*. Os fotorreceptores também realizam comunicação sináptica entre si, através de junções comunicantes ou do tipo *gap* (EULLER & WASSLE, 1995; MILLS & MASSEY, 2000).

O sinal eletroquímico gerado a partir da fototransdução deve ser passado adiante na circuitaria retiniana. Na resposta fotópica, o fotorreceptor do tipo cone, lança esse sinal (*input*) para a célula bipolar, existindo dois tipos de células bipolares

que respondem, as centro-ON (despolarizam em resposta a um estímulo luminoso) e centro-OFF (hiperpolarizam frente a um estímulo luminoso), que transmitem, respectivamente, a informação a células ganglionares centro-ON e centro-OFF (TSUKAMOTO *et al.*, 2001).

As respostas distintas das células bipolares frente a um estímulo luminoso podem ser explicadas, pela expressão diferencial de receptores de glutamato em sua membrana sináptica. Dessa forma, as células bipolares centro-ON expressam receptores acoplados à proteína G (metabotrópicos), que sinalizam para diminuição dos níveis intracelulares de GMPc. Em contrapartida, as centro-OFF expressam receptores ionotrópicos do tipo alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) ou kainato. Dessa forma, a diminuição da liberação de glutamato pelo cone, reduz o número de canais abertos na célula bipolar, e conseqüentemente o influxo de íons, levando à hiperpolarização (PUGH & LAMB, 2000).

Na maior parte dos neurônios têm um potencial de repouso negativo (hiperpolarizado), com conseqüente inibição da liberação de neurotransmissores. Contudo, o fotorreceptor em repouso encontra-se com um potencial de membrana mais positivo, convencionalmente denominado “despolarizado”, devido a um fluxo contínuo de íons positivos para o interior do segmento externo, através da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ , gerando dessa forma uma corrente positiva, assim denominada, corrente do escuro, com liberação de glutamato (PUGH & LAMB, 2000).

Na presença do estímulo luminoso, ocorre o fechamento dos canais de sódio ( $\text{Na}^+$ ), interrompendo dessa forma a corrente, com alteração do potencial de membrana, o tornando mais negativo, gerando a inibição da liberação do glutamato pelo fotorreceptor (PUGH & LAMB, 2000).

Ao penetrar no olho a luz atravessa todas as camadas celulares até atingir o segmento externo, nessa região encontram-se os pigmentos fotossensíveis que irão converter a energia luminosa em energia eletroquímica. Quando um fóton atinge o pigmento (cis-rodopsina) altera sua conformação molecular, após a fotoisomerização, ocorre a formação de uma molécula intermediária (metarrodopsina II) que desencadeia a cascata de transdução (PUGH & LAMB, 2000).

A metarrodopsina II vai se ligar ao complexo transducina (proteína G) e GDP, promovendo a troca de GDP por GTP, seguida pela dissociação das subunidades e liberação da metarrodopsina II, resultando no complexo ativo transducina/GTP, com ativação da fosfodiesterase (PDE), a qual irá atuar sobre o GMPc, determinando o fechamento dos canais de  $\text{Na}^+$ , com declínio da corrente. O retorno à condição de repouso envolve a recuperação da concentração de GMPc (PUGH & LAMB, 2000).

Na retina dos vertebrados as informações luminosas são codificadas pelos fotorreceptores, sendo projetadas para as células bipolares, horizontais e amácrinas, que por sua vez as transmitem para as células ganglionares, os axônios dessas últimas formam o nervo óptico, que irá formar o quiasma e o trato óptico, encaminhando as informações visuais para as respectivas áreas corticais (PUGH & LAMB, 2000).

## **2.9 ELETORRETINOGRAMA DE CAMPO TOTAL**

O Eletrorretinograma de campo total é uma ferramenta muito utilizada para avaliar a função retiniana e no diagnóstico de possíveis alterações visuais. Consiste no registro da atividade elétrica que se origina do conjunto de células que formam a

retina, obtido a partir de um estímulo luminoso difuso (*flashes*) que é projetado no olho, sendo esta atividade captada na superfície da córnea (MARMOR *et al.*, 2009).

A resposta elétrica resultante de um estímulo gerado por uma corrente alternada de curta duração é constituída por uma onda bifásica, apresentando a forma senoidal, com um componente negativo (*onda-a*) e um positivo (*onda-b*). A origem dessas ondas ocorre a partir de tipos específicos de células que compõem a retina (MARMOR *et al.*, 2009).

A *onda-a* resulta da hiperpolarização dos fotorreceptores, originando uma onda com amplitude negativa, mensurada a partir da linha de base até o pico da mesma, apresenta dois componentes, um rápido e um lento (Figura 10). O primeiro resulta da reação do fotorpigmento à presença de luz, o segundo constitui a transmissão do sinal gerado pelo fotorreceptor, a inclinação da onda que resulta da diminuição dos níveis de  $K^+$  dos fotorreceptores, pela ação da célula de Müller (SANTIESTEBAN *et al.*, 2005).

A *onda-b* apresenta amplitude positiva (Figura 10). Resulta da resposta das células bipolares após serem estimuladas pelos fotorreceptores, especificamente as bipolares centro-ON, pois, como já descrito anteriormente, essas células apresentam receptores metabotrópicos específicos para o glutamato (mGluR6). Seu envolvimento neste fenômeno foi demonstrado após estudos farmacológicos com 2-amino-4-fosfonobutirato (APB), um agonista glutamatérgico específico que compete pelo sítio de ligação nas células pós-sinápticas, abolindo dessa forma a resposta das células bipolares centro-ON e conseqüentemente a *onda-b* (SCHILLER *et al.*, 1986; SANTIESTEBAN *et al.*, 2005).

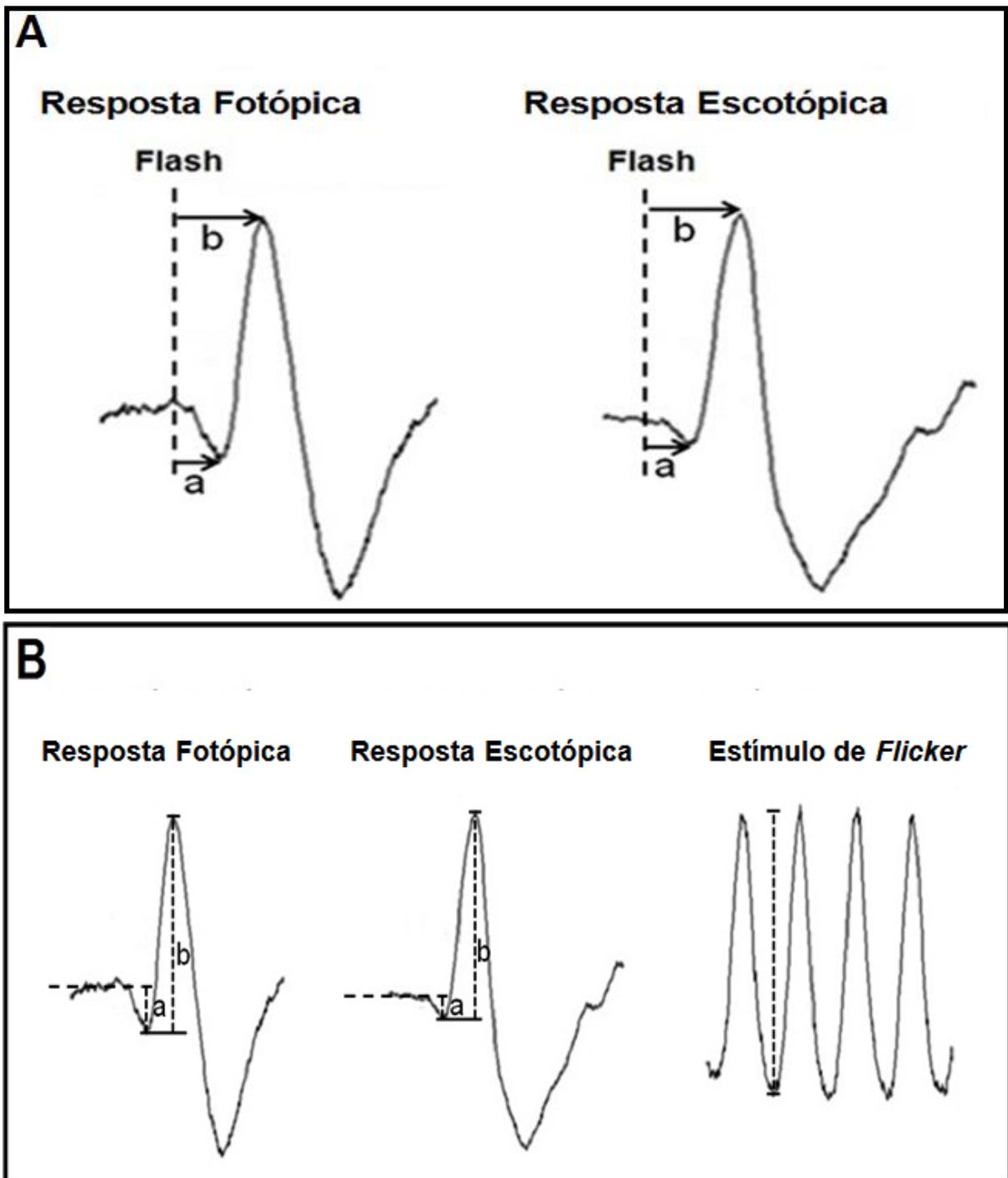


Figura 10. Esquema representativo da mensuração dos componentes do ERG de campo total em duas situações de estimulação. (A) Tempo implícito (setas) das *ondas-a* e *b* – tempo medido do momento do flash (linha tracejada) até o pico negativo do registro (*onda-a*) ou até o pico positivo do registro (*onda-b*). (B) Amplitude das *ondas-a* e *b* – A amplitude da *onda-a* é a distância medida da linha de base do registro (linha horizontal tracejada) até o pico negativo do registro. A amplitude da *onda-b* é a distancia medida entre o pico negativo e o pico positivo de registro. Fonte: Laboratório de Neurobiologia Oswaldo Cruz, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará.

O registro do ERG pode ser feito sob diferentes condições de adaptação (fotópica ou escotópica), sendo possível isolar a resposta dos subsistemas de fotorreceptores (cones e bastonetes), manipulando os níveis de iluminação, intensidade do estímulo e do espectro de luz apresentado (utilizando filtros que permitem a passagem de apenas uma faixa do espectro) (HOLDER *et al.*, 2010).

Na adaptação escotópica, isola-se a resposta de bastonetes, ou então, pode-se obter uma resposta mista, de cones e bastonetes. Na adaptação fotópica isola-se a resposta de cones. A resposta fotópica é bem mais complexa, devido seus múltiplos componentes celulares, células bipolares-ON/OFF, bem como pela heterogeneidade dos cones, que se apresentam subdivididos em dois ou três tipos. O modo pelo qual os centros superiores do processamento visual discriminam informações a respeito da composição espectral está relacionado à interação de cada tipo de cone com os neurônios de segunda ordem (HOLDER *et al.*, 2010).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar possíveis alterações funcionais na retina de ratos wistar jovens após a tireoidectomia bilateral, utilizando respostas eletrofisiológicas não invasivas.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar alteração de peso, tamanho e os níveis do hormônio tireoidiano T3 nos animais como parâmetros clínicos para diagnóstico de hipotireoidismo.
- Verificar possíveis alterações no tempo implícito da *onda-a* e *onda-b*, na resposta escotópica e fotópica.
- Investigar variações na amplitude da *onda-a*, *onda-b* e a *razão entre onda-b* e *onda-a*, na resposta escotópica máxima.
- Analisar variações na amplitude da *onda-a*, *onda-b* e a *razão entre onda-b* e *onda-a*, na resposta fotópica.
- Investigar alterações na amplitude da *onda-b*, na resposta fotópica de flicker, com estimulação intermitente, com variação na frequência de apresentação.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS UTILIZADOS NO ESTUDO

Foram utilizados nesse estudo experimental 27 ratos Wistar machos, com aproximadamente um mês de vida, pesando em média 50 g e medindo cerca de 25 cm, fornecidos pelo Biotério da Universidade Federal do Pará, anexo ao Instituto de Ciências Biológicas. Os animais passaram por um período de adaptação de quatro dias para habituação no novo ambiente. Foram mantidos em gaiolas plásticas, medindo 41x34x16 cm, sendo distribuídos cinco animais por gaiola, sob condições de controle de temperatura e um ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à água e ração. A pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.

### 4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em três grupos distintos de forma randômica, sendo o primeiro grupo constituído de nove animais controle, o segundo formado por nove animais sham e o terceiro composto por nove animais tireoidectomizados e avaliados nos dias 10, 15, 20, 25 e 30 dias pós-cirúrgico.

O grupo controle é formado pelos animais que não sofreram nenhuma intervenção cirúrgica, apresentando a tireoide intacta, com todas suas funções correspondentes. O grupo Sham corresponde aos animais que passaram pela

cirurgia, porém sua tireoide não foi removida, sendo um controle positivo do terceiro grupo, representado pelos animais que têm a tireoide removida bilateralmente.

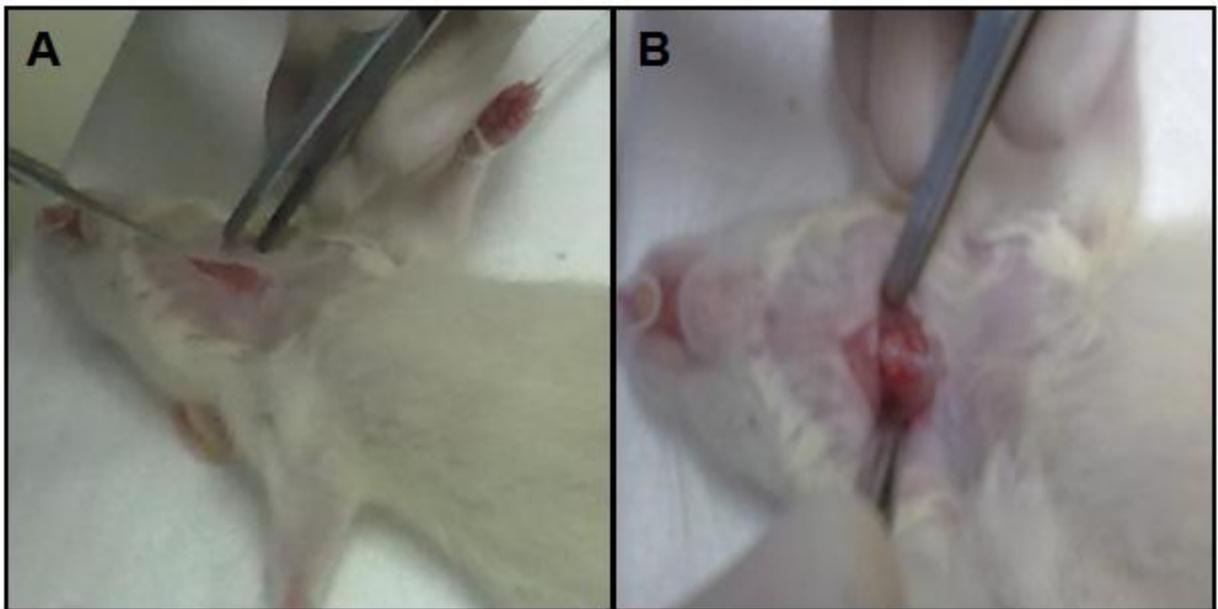
### **4.3 CIRURGIA EXPERIMENTAL**

A cirurgia de ablação bilateral da glândula tireoide ocorreu no trigésimo dia pós-natal (PN30). Para tanto, o animal foi previamente anestesiado através de injeção intraperitoneal, utilizando-se a associação de Cloridrato de Quetamina 10% (50 mg/kg) e Cloridrato de Xilazina 2% (5 mg/kg). Em seguida, o rato foi posicionado em um aparato em decúbito dorsal com o pescoço em extensão, objetivando a elevação da traqueia e conseqüentemente da tireoide, mantendo seus membros fixados no aparato (Figura 11).

Verificada a ausência de reflexos foi realizada então a tricotomia da região (face ventral da região cervical) e assepsia do local com iodopovidona degermante 10% (contém 1% de iodo ativado) e injeção subcutânea de cloridrato de lidocaína 2%. Posteriormente, se fez uma incisão de 1 cm sobre a linha média da face ventral da região cervical e o descolamento dos retalhos, com abertura da rafe mediana e o deslocamento dos músculos pré-tireoidianos (esternocleidomastoideo, omoioideo, esternohioideo e esternotireoide), com a visualização da glândula tireoide e sua remoção bilateral. Por fim, ocorreu o fechamento da incisão através da sutura contínua do tipo chuleio simples para os planos profundos e sutura com ponto simples para a derme e a epiderme seguida de curativo. Os animais Sham passaram pelo mesmo processo, porém não tiveram a glândula tireoide removida.

Durante o pós-operatório, os animais foram mantidos em analgesia e antibioticoterapia profilática utilizando *flunixin meglumine* (Banamine® 10 mg/ml) na dose de 2 mg/Kg e enrofloxacin (Flotril® 2,5%) na dose de 10 mg/Kg. Foi realizada assepsia da incisão cirúrgica três vezes por semana.

Foram avaliados alguns parâmetros clínicos que serviram como base para identificação do hipotireoidismo, tais como: peso e tamanho. Além disso, foram avaliados os níveis séricos de T3 no sangue.



**Figura 11.** Imagem mostrando região onde se realiza incisão cirúrgica (A), exposição da glândula tireoide (B). Fotografias obtidas de arquivo pessoal, tirada no Laboratório de farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.

## 4.4 PARÂMETROS CLÍNICOS

### 4.4.1 Monitoramento do peso e tamanho

No dia do procedimento cirúrgico os ratos foram individualmente identificados, pesados e medidos. O monitoramento do peso e do tamanho ocorreu nos dias em que foram realizados os registros eletrofisiológicos (10, 15, 20, 25 e 30 dias pós-cirúrgico), pois o processo de anestesia dos animais facilita sua medida e pesagem.

A mensuração do tamanho foi realizada com uma trena (MEASURING TAPE 2 m/6ft), sendo o animal colocado em decúbito lateral e medido, da ponta do focinho até a extremidade da cauda.

### 4.4.2 Níveis séricos de T3

Para avaliar os níveis de T3 nos grupos experimentais, após 15 e 30 dias pós-cirurgia, os animais foram decapitados segundo as recomendações descritas em *AVMA Guidelines on euthanasia*, 2007. Amostras de sangue foram coletadas em tubos de ensaio, mantidos em 4°C. Esperou-se por um período de 15 min para que o sangue obtido coagulasse, foram feitas então três centrifugações a 5000 rpm, retirando-se o sobrenadante e descartando o restante. O soro obtido foi embalado e mantido sob refrigeração sendo encaminhado para o laboratório de análises clínicas. O níveis séricos de T3 foram dosados pelo método de quimiluminescência.

## 4.5 ELETORRETINOGRAMA

### 4.5.1 Registro do eletrorretinograma de campo total (ERG)

Os animais pertencentes aos três grupos foram submetidos ao ERG após dez dias do procedimento cirúrgico. Foram registrados nove animais de cada grupo, os registros foram realizados a cada cinco dias até o segundo mês pós-cirurgia.

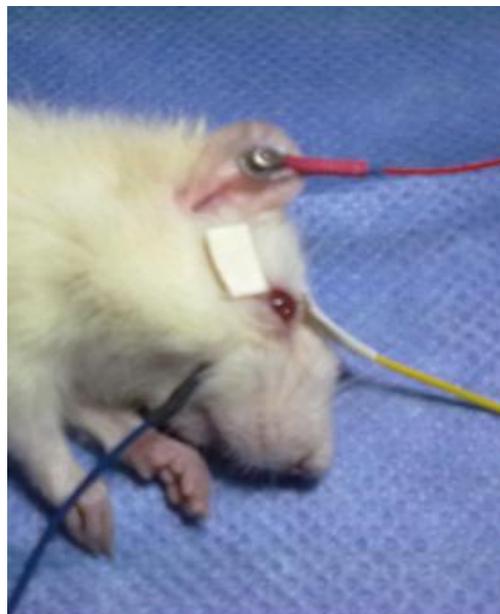
O primeiro passo foi a anestesia geral dos animais, através de uma injeção intraperitoneal, utilizando a associação de cloridrato de ketamina 10% (50 mg/kg) e cloridrato de Xilazina 2% (5 mg/kg). Em seguida, o anestésico local lidocaína 2% foi administrado intraocularmente.

Posteriormente o rato foi posicionado dentro de uma gaiola de Faraday, sua pupila dilatada com uma gota de Tropicamida (Mydriacyl 1%), sendo posicionados três eletrodos no animal (Figura 12):

- O eletrodo terra (com o formato de disco): instalado na região interna do lóbulo da orelha, após escarificação do local com para remoção dos pelos, com o objetivo de melhorar o contato do eletrodo com a pele, diminuindo dessa forma interferências. Para a fixação do mesmo utilizou-se um gel que também ajuda na condutância.
- O eletrodo de referência (com um formato de agulha): instalado na região subpalpebral, ficando sua extremidade adjacente à córnea.

- O eletrodo de registro: sendo feito artesanalmente com DTL (Dawson, Trick e Litzkow), consiste em um fino fio de prata, o qual foi posicionado sobre a córnea para obter os registros advindos da retina.

Após a instalação dos eletrodos, foi administrada no olho de registro uma gota de metilcelulose 2%, para lubrificação da córnea, evitando-se possíveis ressecamentos.



**Figura 12. Animal posicionado em decúbito lateral com os respectivos eletrodos posicionados: o vermelho é o terra, o azul é o de referência e o amarelo é o registro.**

#### 4.5.2 Condições de registro

O registro do ERG pode ser feito em diferentes condições de adaptação, sendo possível isolar o tipo de sistema que se deseja avaliar (cones ou bastonetes), por meio da manipulação da intensidade de luz e o nível de adaptação do animal

(adaptado ao escuro ou adaptado ao claro), obtendo-se registros escotópicos ou fotópicos.

As medições foram feitas nas condições escotópicas, adaptando-se o animal de interesse 30 minutos em um ambiente livre de iluminação. Após esse período realizou-se o registro, com estímulos luminosos (*flashes*) na intensidade de  $30 \text{ cd/m}^2$  para se obter a resposta escotópica máxima. Na condição fotópica o animal foi adaptado 10 minutos em um ambiente com iluminação e após esse período foi feito o registro, utilizando-se *flashes* com intensidade de  $30 \text{ cd/m}^2$ , sendo mantida uma luz de fundo.

#### 4.5.3 Protocolo para realização do exame

O protocolo que foi utilizado é uma ampliação do protocolo padrão proposto pela *International Society for Clinical Electrophysiology of vision* (ISCEV), baseado em pesquisas anteriores realizadas com animais que também fizeram uso desse mesmo protocolo (SAFATLE *et al.*, 2010). Foram realizados os seguintes passos após a adaptação do animal por 30 minutos:

- Estímulo com *flash* único com duração de  $10 \mu\text{s}$  cada, por um período de um minuto.

Em seguida foi avaliada a resposta fotópica, realizando-se a adaptação do animal por 10 minutos, seguindo-se os testes abaixo:

- Estímulo com *flash* único com duração de  $10 \mu\text{s}$  cada, por um período de um minuto.

- Estímulo com *flash* único com duração de 10  $\mu$ s cada, por um período de um minuto, utilizando filtros de luz (vermelho, verde e azul).
- Estímulos luminosos intermitentes de 12, 15, 18 e 30 Hz, com *flash* com duração de 10  $\mu$ s cada, por um período de 15 s.

#### 4.5.4 Equipamento utilizado nos registros eletrofisiológicos

A aquisição do registro foi realizada através de um amplificador diferencial com alta impedância de entrada AC (Grass Technologies, modelo P511), ajustado com filtragem de 0,3 Hz (passa alta) e 300 Hz (passa baixa). Os registros foram monitorados com um osciloscópio (Protek, modelo 6510) e continuamente digitalizados em uma faixa de 1 KHz por um computador equipado com uma placa de aquisição de dados A/D (*National Instruments, Austin, TX*). O software que foi utilizado para registro das respostas ERG foi Labview 3.0 (*National Instruments, Austin, TX*).

#### 4.5.5 Mensuração dos componentes do ERG

Os parâmetros do ERG medidos foram: tempo implícito da resposta da *onda-a* e da *onda-b*, também foram avaliados a amplitude da *onda-a* e da *onda-b*:

- Tempo implícito da *onda-a*: medida que avalia o tempo implícito entre o início do estímulo e o platô da resposta da *onda-a*, expressa em milissegundos (ms).

- Tempo implícito da *onda-b*: medida que avalia o tempo implícito entre o início do estímulo e o platô da resposta da *onda-b*, expressa em milissegundos (ms).
- Amplitude da *onda-a*: é mensurada a partir da linha de base até o primeiro pico (componente negativo), expressa em microvolts ( $\mu\text{V}$ ).
- Amplitude da *onda-b*: é medida pico-a pico, corresponde à distância entre o pico da *onda-a* (negativa) e o pico da *onda-b* (positiva), expressa em microvolts ( $\mu\text{V}$ ).

Foram avaliadas no ERG as respostas ao *flicker*, também se medindo o tempo implícito e a amplitude da onda:

- Tempo implícito da *onda-b*: medida que avalia o tempo implícito entre o início do estímulo e o platô da resposta da *onda-b*, expressa em milissegundos (ms).
- Amplitude da *onda-b*: é mensurada a partir da linha de base até o primeiro pico (componente positivo), expressa em microvolts ( $\mu\text{V}$ ).

#### 4.6 ANÁLISE DOS REGISTROS

Para o processamento dos dados obtidos a partir dos registros eletrofisiológicos foi utilizado o programa *Signal 3.0 (Cambridge Electronic Design)* que possibilitou mensurar e avaliar as *ondas-a* e *b* produzidas pela resposta das células retinianas ao estímulo luminoso e também mensurar a resposta das células cardíacas. Em seguida os dados obtidos foram calculados no programa *Microsoft Office Excel 2007*.

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados apresentados foram estabelecidos através da média  $\pm$  desvio-padrão, sendo cada grupo experimental formado por  $n \geq 5$  animais. O programa estatístico usado para análise dos experimentos foi o BioEstat 5.0, onde foram comparados os resultados entre os diferentes grupos por Análise de Variância (ANOVA) um critério, seguida do pós-teste Tukey. Os valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 PARÂMETROS CLÍNICOS

Buscamos comparar parâmetros clínicos como o ganho de peso entre os grupos experimentais (Figura 13a), para que pudéssemos estabelecer alterações compatíveis com o desenvolvimento de hipotireoidismo. Verificamos que o grupo controle apresentava no início do experimento valores em torno de  $52,6 \pm 3,2$  g, não apresentando diferença estatística para o grupo sham que exibia média de  $53 \pm 1,5$  g, bem como, para o grupo tireoidectomizado que apresentava valores em torno de  $52,8 \pm 2,8$  g. Todavia, constatamos uma diminuição do ganho ponderal de peso nos animais tireoidectomizados após 20 dias da cirurgia de remoção da glândula, com valores em torno de  $107,8 \pm 7,9$  g, quando comparados ao grupo controle, com média de  $144,4 \pm 6,8$  g, apresentando diferença estatística nos demais dias investigados (25 e 30 dias pós-cirúrgico).

Outro parâmetro pesquisado foi o aumento no tamanho do animal (Figura 13b). Constatamos que no início do experimento os grupos experimentais não apresentavam diferença estatística significativa, o grupo controle apresentava valores de  $20 \pm 0,7$  cm, enquanto que o grupo sham tinha média de  $21 \pm 1,0$  cm e o grupo tireoidectomizado valores em torno de  $21,6 \pm 1,6$  cm. Contudo, a partir de 15 dias pós-cirúrgico, os animais tireoidectomizados apresentaram uma diminuição do aumento no tamanho, com média de  $28,4 \pm 0,5$  cm, quando comparados ao grupo controle, com valores em torno de  $30,2 \pm 0,8$  cm. Essa tendência de diminuição permaneceu nos demais dias avaliados.

O último parâmetro avaliado foi os níveis de T3 entre os grupos experimentais (Figura 13c). Constatamos que houve uma redução no grupo tireoidectomizado nos dois períodos avaliados. No primeiro período verificamos uma redução de 27% nos níveis de T3 no grupo tireoidectomizado, quando comparados com o grupo controle. Essa redução aumentou ainda mais após trinta dias de cirurgia, pois o grupo tireoidectomizado apresentou redução de 34,7% nos níveis de T3, quando comparados ao grupo controle.

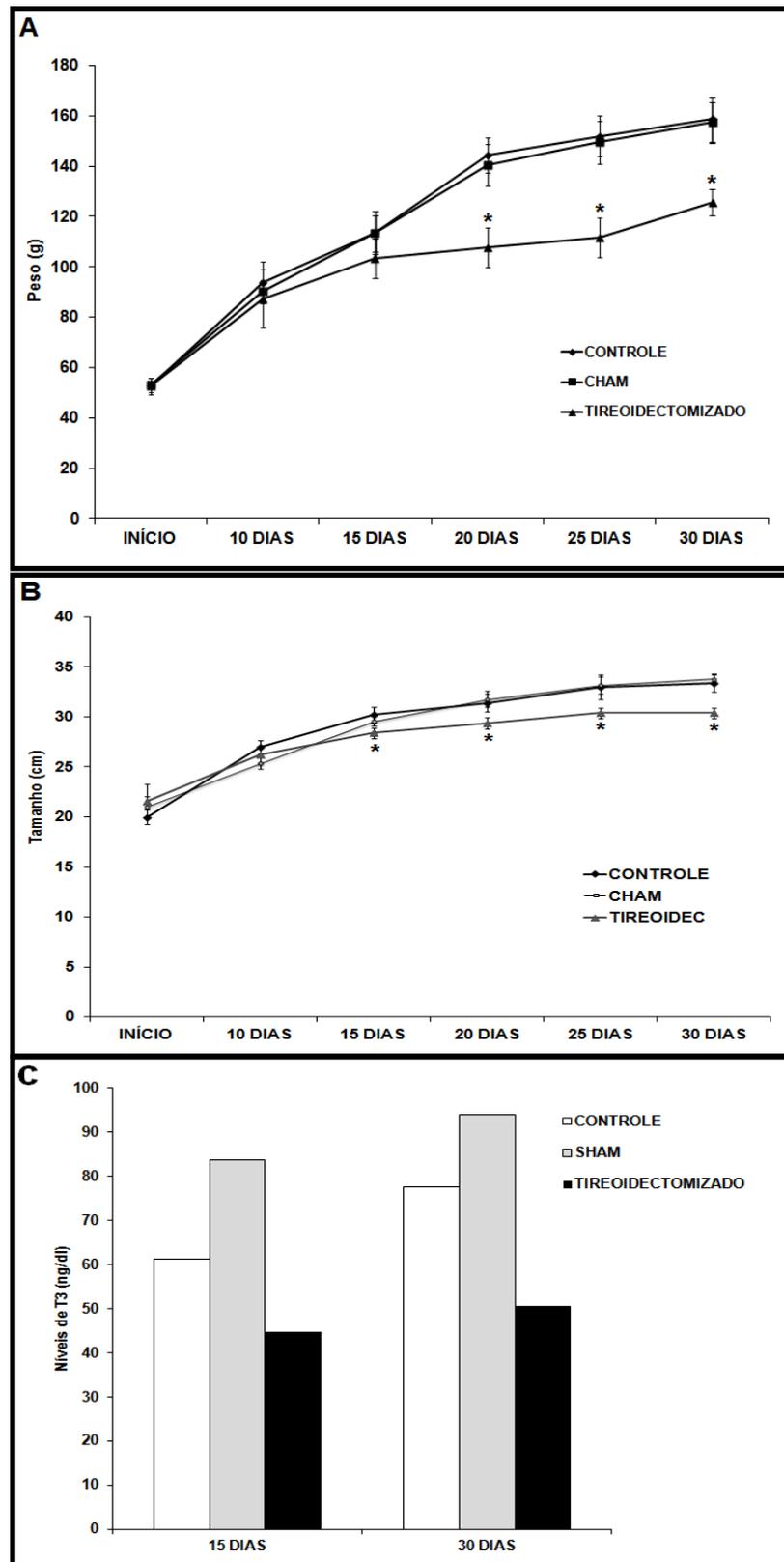


Figura 13. Parâmetros clínicos. Peso (A) e tamanho (B), os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (ANOVA-Tukey  $*p \leq 0.05$  em relação ao controle,  $n = 5$ ). Níveis de T3 (C) expressos como valores absolutos, representativos de um animal para 15 e 30 dias pós-operatório.

## 5.2 AVALIAÇÃO DO TEMPO IMPLÍCITO PARA RESPOSTAS ESCOTÓPICAS MÁXIMAS E FOTÓPICAS

Com o objetivo de avaliar o tempo implícito para as respostas escotópica máxima e fotópica dos fotorreceptores e das células bipolares dos grupos de estudo, realizamos o ERG em diferentes condições de iluminação. Para tanto, fizemos a adaptação ao escuro visando avaliar como ocorreria a captação do estímulo luminoso por ambos os tipos de fotorreceptores (cones e bastonetes) e a adaptação ao claro, para avaliar especificamente a resposta de cones.

O ERG escotópico avaliou a resposta da retina iniciada pelos dois tipos de fotorreceptores, predominando a resposta dos bastonetes, bem como, a resposta das células bipolares (Figura 14a). O registro apresentou dois componentes: um primeiro com magnitude negativa (*onda-a*) e um segundo com magnitude positiva (*onda-b*).

O ERG fotópico mediu a resposta da retina iniciada especificamente pelos cones, seguida pela resposta das células bipolares (Figura 14a), a qual apresentou também os mesmos componentes. Observamos que tanto na resposta escotópica máxima quanto na fotópica o tempo implícito não sofreu alteração nos grupos testados, bem como, não houve diferença estatística entre as respostas escotópica e fotópica.

Utilizamos filtros de luz para identificar o comportamento dos fotorreceptores (cones) quanto à sensibilidade a diferentes faixas espectrais, pois essas células possuem sensibilidade a diversos comprimentos de onda.

No ERG fotópico foram utilizados três filtros (azul, verde e vermelho), correspondente aos três tipos distintos de cones (S, M e L), sensíveis a diferentes comprimentos de onda (curto, médio e longo), respectivamente. As respostas para os filtros azul e verde geraram também dois componentes, negativo (*onda-a*) e positivo (*onda-b*) (Figura 14b). Nessa condição verificamos que não havia diferença do tempo implícito da *onda-a*, bem como, da *onda-b* entre os diferentes grupos testados.

Não obtivemos resposta quando utilizamos o filtro vermelho, o qual permite a passagem de espectros de luz correspondente ao comprimento de onda longo e bloqueia o restante. Constatamos dessa forma que o animal não apresenta sensibilidade a esse espectro de luz em nenhum dos grupos testados (dados não mostrados).

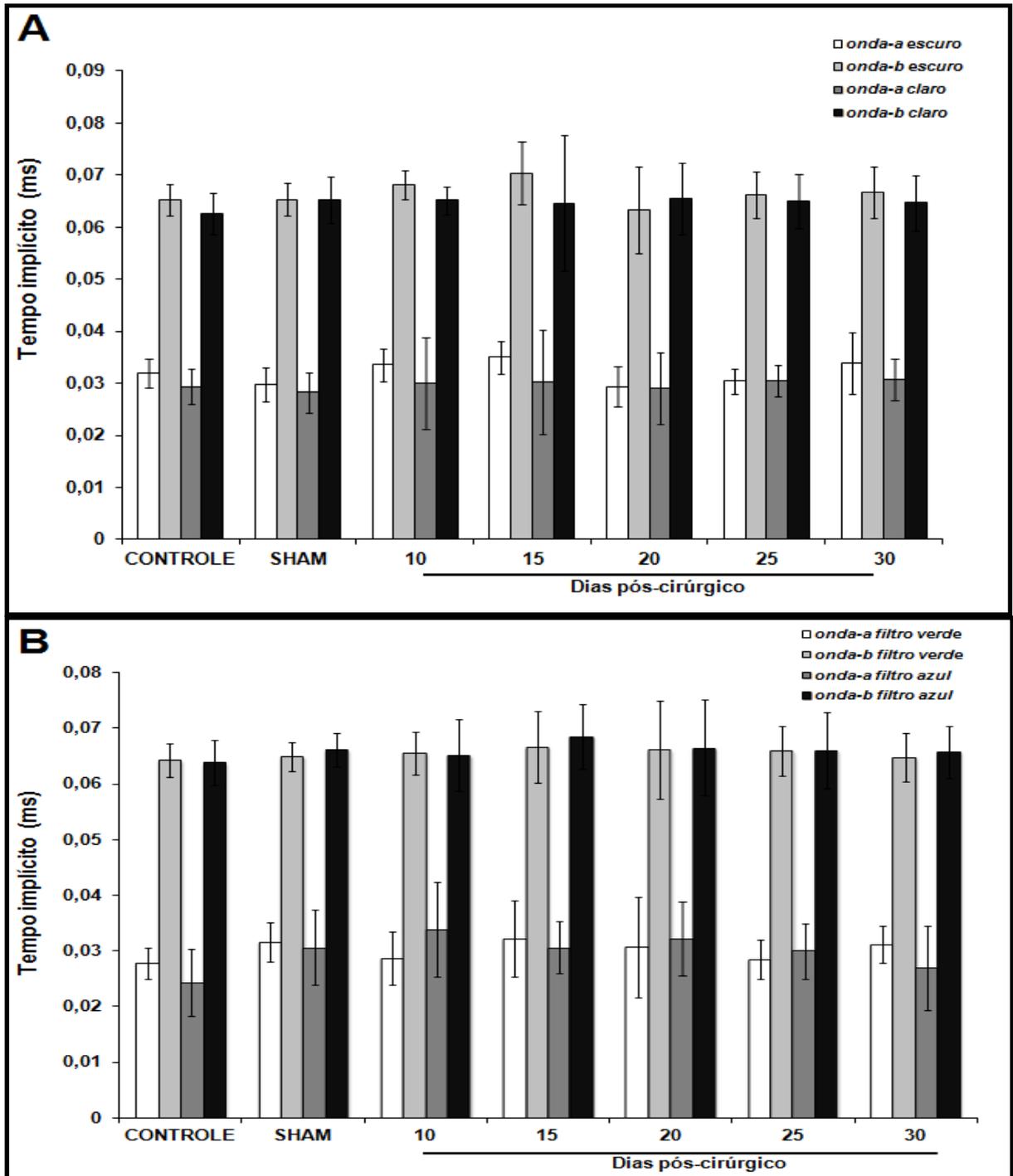


Figura 14. Histograma com os valores temporais dos registros monocular do ERG de campo total. (A) Tempo implícito da *onda-a* e *onda-b* em ms, da resposta escotópica máxima e fotópica, após adaptação ao escuro por 30 minutos e adaptação ao claro por um período de 10 minutos respectivamente. (B) Tempo implícito da *onda-a* e *onda-b* em ms na resposta escotópica, com a utilização de filtros de luz, empregando o mesmo protocolo de adaptação ao claro. (Os valores são expressos em média  $\pm$  desvio padrão, como teste estatístico aplicou-se ANOVA um critério  $n = 8$ ).

### 5.3 AVALIAÇÃO DA AMPLITUDE DAS ONDAS NO ERG DOS DIFERENTES GRUPOS E CONDIÇÕES DE REGISTRO

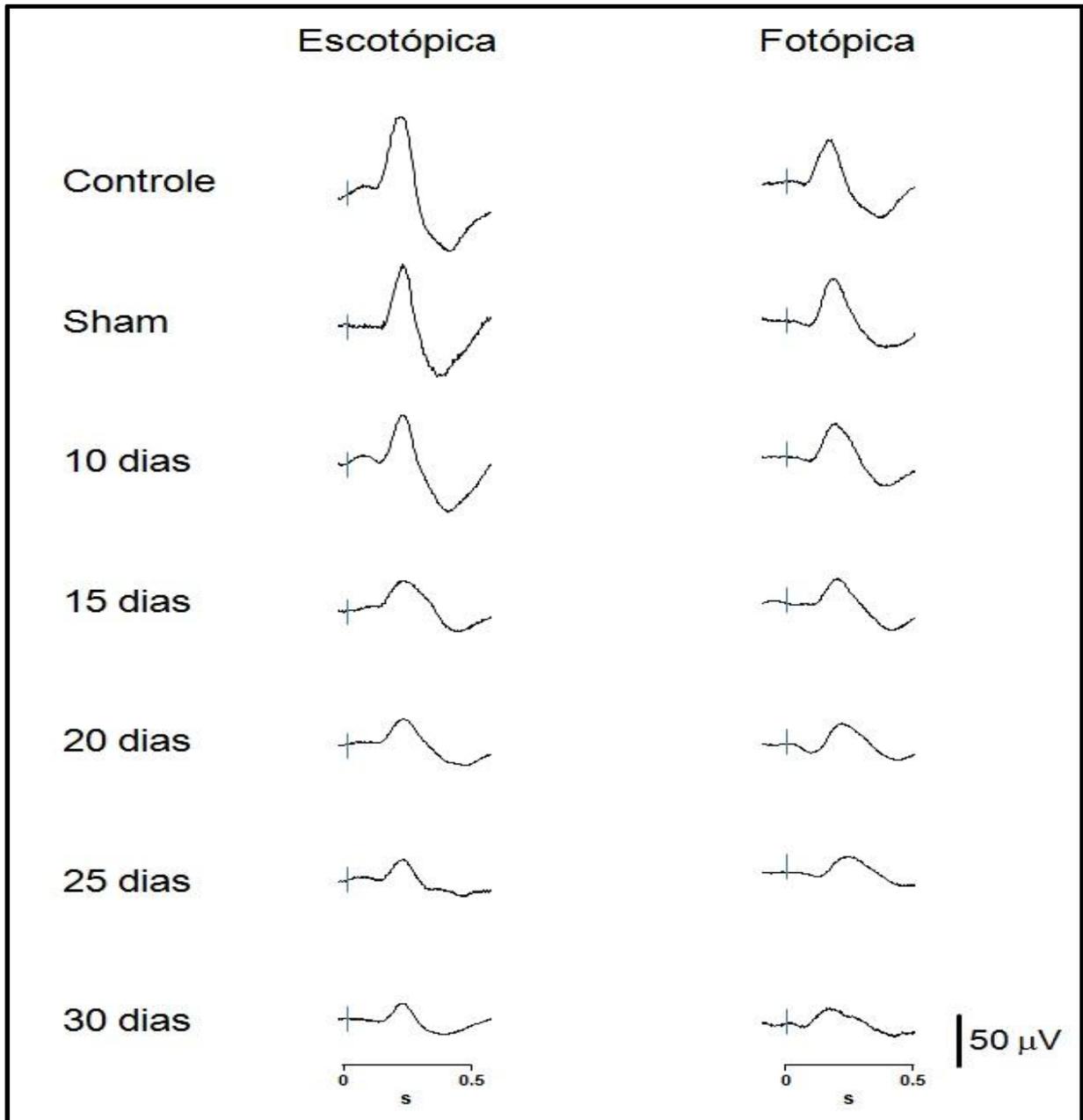


Figura 15. Eletroretinografia de campo total monocular realizado em ratos Wistar. Resposta escotópica máxima (painel à esquerda) a estímulo de máxima intensidade sem luz branca de fundo, após adaptação de 30 minutos em ambiente livre de iluminação. Resposta fotópica (painel à direita) a estímulo de máxima intensidade com luz branca de fundo, após adaptação de 10 minutos em ambiente com iluminação. (10, 15, 20, 25 e 30 dias pós-cirúrgico).

Na resposta escotópica máxima verificamos a formação de duas ondas: uma onda com amplitude negativa (*onda-a*) e outra positiva com maior amplitude (*onda-b*). Constatamos que houve diminuição de ambas, *onda-a* e *onda-b*, nos animais que sofreram ablação da glândula tireoide com o passar dos dias pós-cirúrgico, quando comparados ao grupo controle (Figura 15).

Na resposta fotópica observamos a presença também de duas ondas, apresentando as mesmas características das descritas acima. Ocorrendo também redução de ambas, *onda-a* e *onda-b*, nos animais tireoidectomizados com o passar dos dias pós-cirúrgico, quando comparados ao grupo controle (Figura 15).

#### **5.4 AVALIAÇÃO DA AMPLITUDE DA *onda-a* E DA *onda-b* NA RESPOSTA ESCOTÓPICA MÁXIMA**

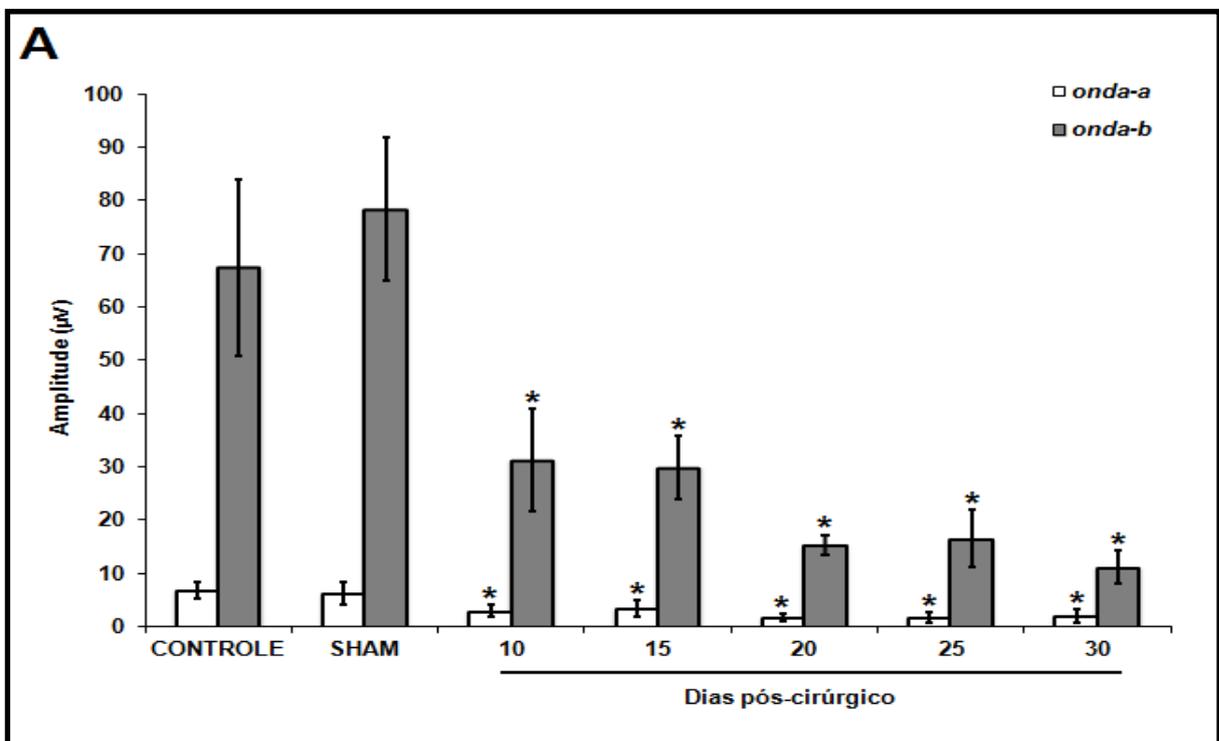
Como já descrito, na resposta escotópica máxima existe a formação de duas ondas: uma onda com amplitude negativa (*onda-a*) e outra positiva com maior amplitude (*onda-b*). Buscamos avaliar dessa forma, se ocorreria alteração na magnitude da resposta, ou seja, na amplitude das ondas, nos grupos experimentais com o passar do tempo.

O ERG escotópico máximo resulta da média de oito registros feitos em cada grupo (Figura 16a). No controle a amplitude da resposta da *onda-a* está em torno de  $6,8 \pm 1,5 \mu\text{V}$ , não apresentando diferença estatística com o grupo sham que mede  $6,2 \pm 2,2 \mu\text{V}$ , porém quando comparado com os grupos que sofreram a remoção da glândula tireoide, percebemos que existe diferença estatística, ocorrendo uma diminuição na amplitude da *onda-a* a partir do décimo dia com valores em torno de

$2,9 \pm 1,0 \mu\text{V}$ . Essa tendência de diminuição segue nos demais dias, sendo seu valor em torno de  $1,9 \pm 1,2 \mu\text{V}$  no grupo de trinta dias após a cirurgia.

Quando avaliamos a *onda-b* percebemos também uma redução de sua amplitude, pois o controle apresenta valores em torno de  $67,4 \pm 16,6 \mu\text{V}$ , enquanto que nos grupos tireoidectomizados, a partir do décimo dia, observamos um decréscimo com diferença estatística significativa, com valores por volta de  $31,2 \pm 9,6 \mu\text{V}$ , tendo o último grupo valores de  $11,1 \pm 3,0 \mu\text{V}$ .

Na avaliação da razão da *onda-b* pela *onda-a* (Figura 16b) verificamos diferença estatística significativa quando comparamos o grupo controle que apresentou média de  $10,4 \pm 0,7 \mu\text{V}$  com os grupos tireoidectomizados, com decréscimo significativo na razão, a partir do décimo dia, com média de  $6,2 \pm 2,4 \mu\text{V}$ , até o trigésimo dia com valores em torno de  $5,4 \pm 1,2 \mu\text{V}$ .



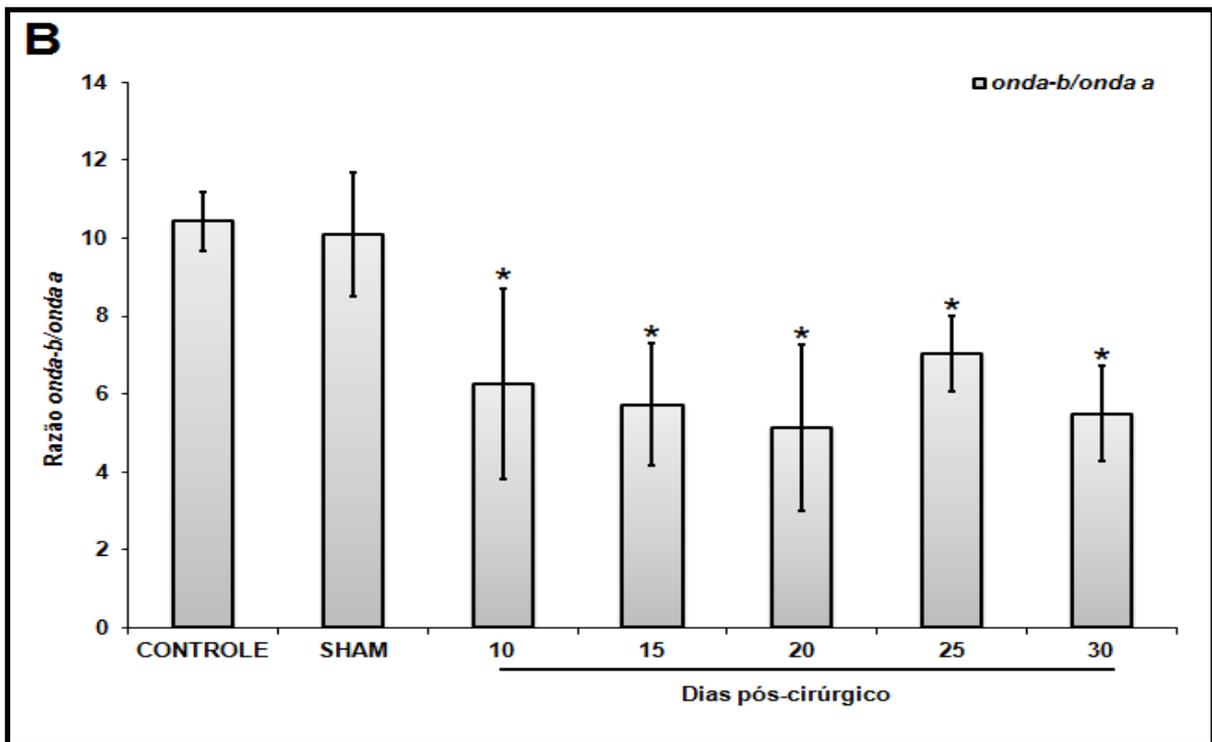


Figura 16. Histograma com os valores de amplitude dos registros monocular do ERG de campo total. Amplitudes da *onda-a*, *onda-b* em  $\mu\text{V}$  (A) e a razão entre *onda-b* e *onda-a* (B), na resposta escotópica máxima, utilizando-se o protocolo de adaptação ao escuro por um período de 30 minutos. Os valores são expressos em média  $\pm$  desvio padrão (ANOVA-Tukey  $*p < 0.01$  em relação ao controle *onda-a*, *onda-b* e razão entre *onda-b* e *onda-a*;  $n = 8$ ).

## 5.5 AVALIAÇÃO DA AMPLITUDE DA *onda-a* E DA *onda-b* NA RESPOSTA FOTÓPICA

Nos resultados do ERG fotópico, também observamos a presença de dois componentes, o primeiro denominado *onda-a*, de menor amplitude, e um segundo, *onda-b*, com maior amplitude (Figura 17a).

Na avaliação da amplitude da *onda-a*, o grupo controle apresenta valores em torno de  $6,3 \pm 1,7 \mu\text{V}$ , enquanto que os animais que sofreram tireoidectomia apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa em sua amplitude, o

grupo de dez dias pós-cirúrgico apresentou valores por volta de  $2,7 \pm 1,0 \mu\text{V}$  e o grupo de trinta dias apresentou valores entorno de  $0,8 \pm 0,4 \mu\text{V}$ .

Ao analisarmos a amplitude da *onda-b* podemos observar a mesma tendência de decréscimo, pois o grupo controle apresenta média de  $75,1 \pm 14,4 \mu\text{V}$  e o grupo de dez dias pós-cirúrgico apresenta média de  $34,4 \pm 6,6 \mu\text{V}$ , enquanto que o último grupo apresentou valores mais baixos ainda com média de  $11,2 \pm 1,9 \mu\text{V}$ .

Quando avaliamos a razão da *onda-b pela onda-a* (figura 17b) não verificamos diferença estatística significativa entre os grupos de estudo.

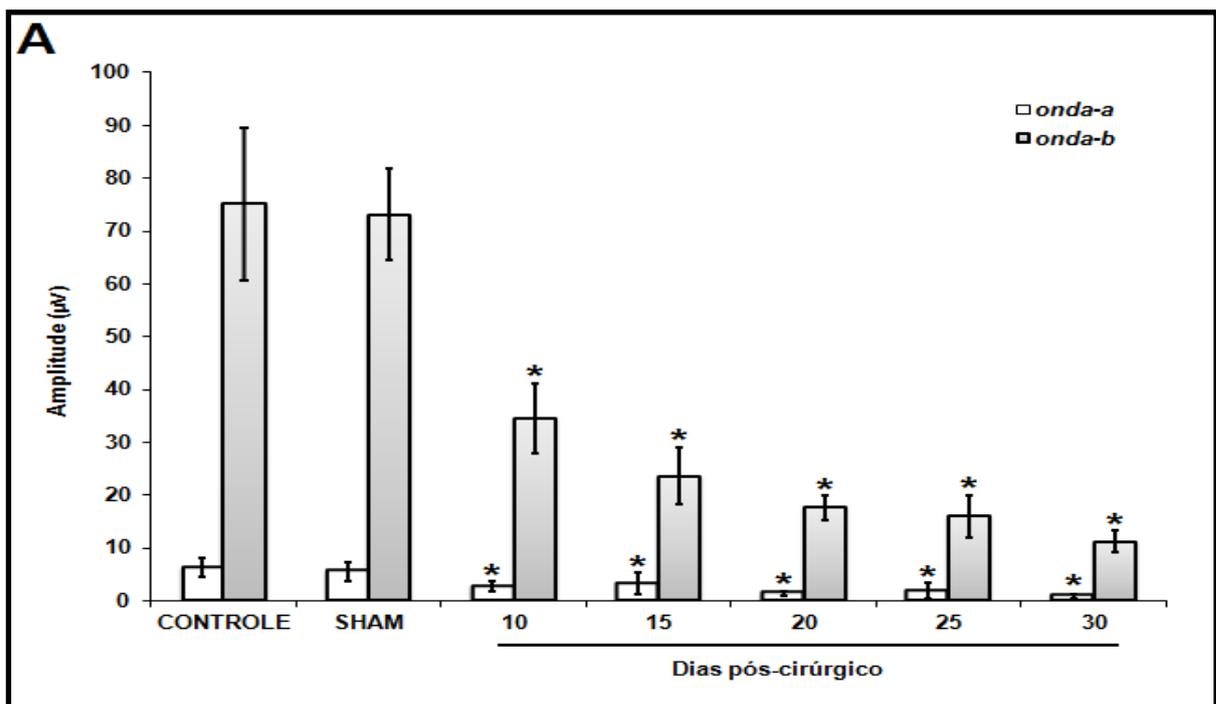
Após a identificação da alteração na amplitude das *ondas-a e b*, buscamos investigar como a falta dos hormônios tireoidianos afetariam as subpopulações de cones. Dessa forma, utilizamos o filtro de luz que permite a passagem de apenas uma faixa do espectro de luz, bloqueando as demais. Com isso poderíamos inferir que tipo de cone estaria sendo mais afetado (Figura 17c).

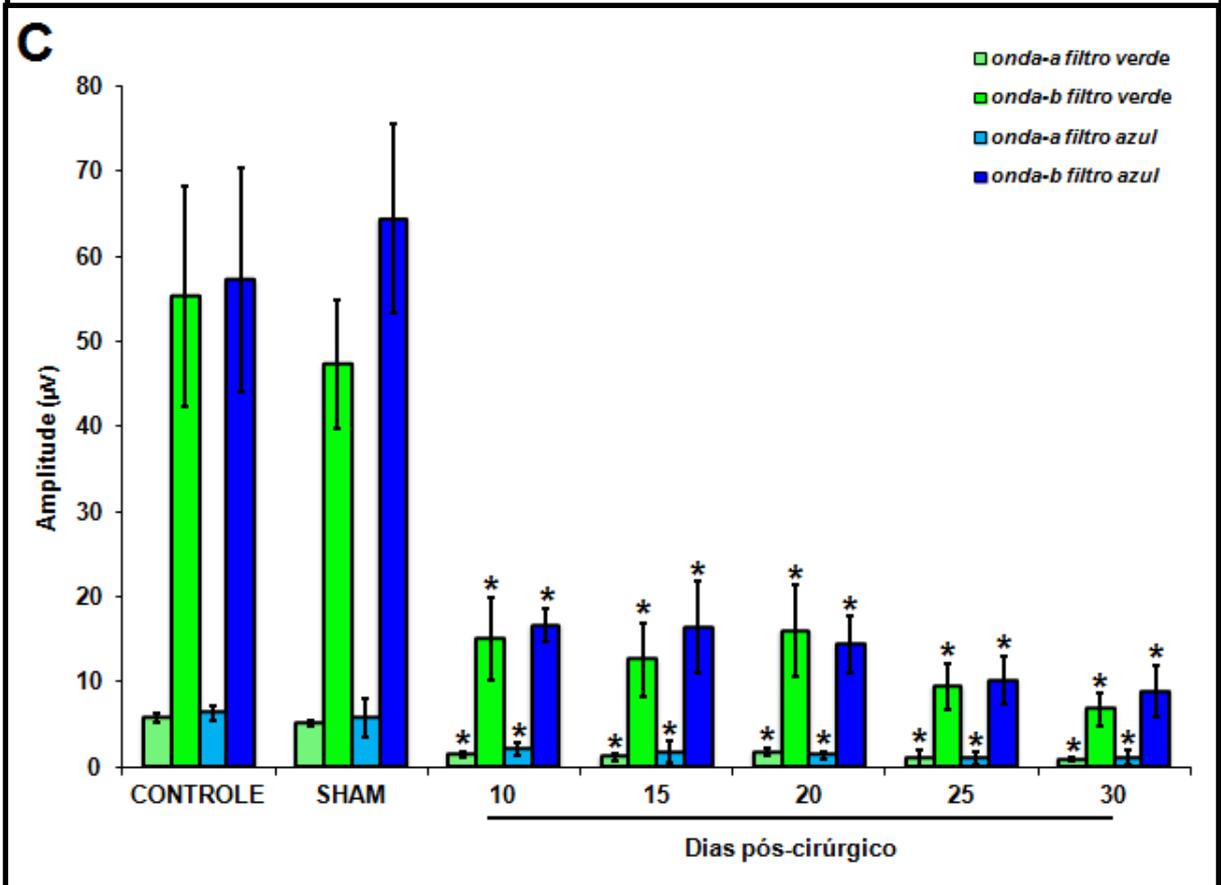
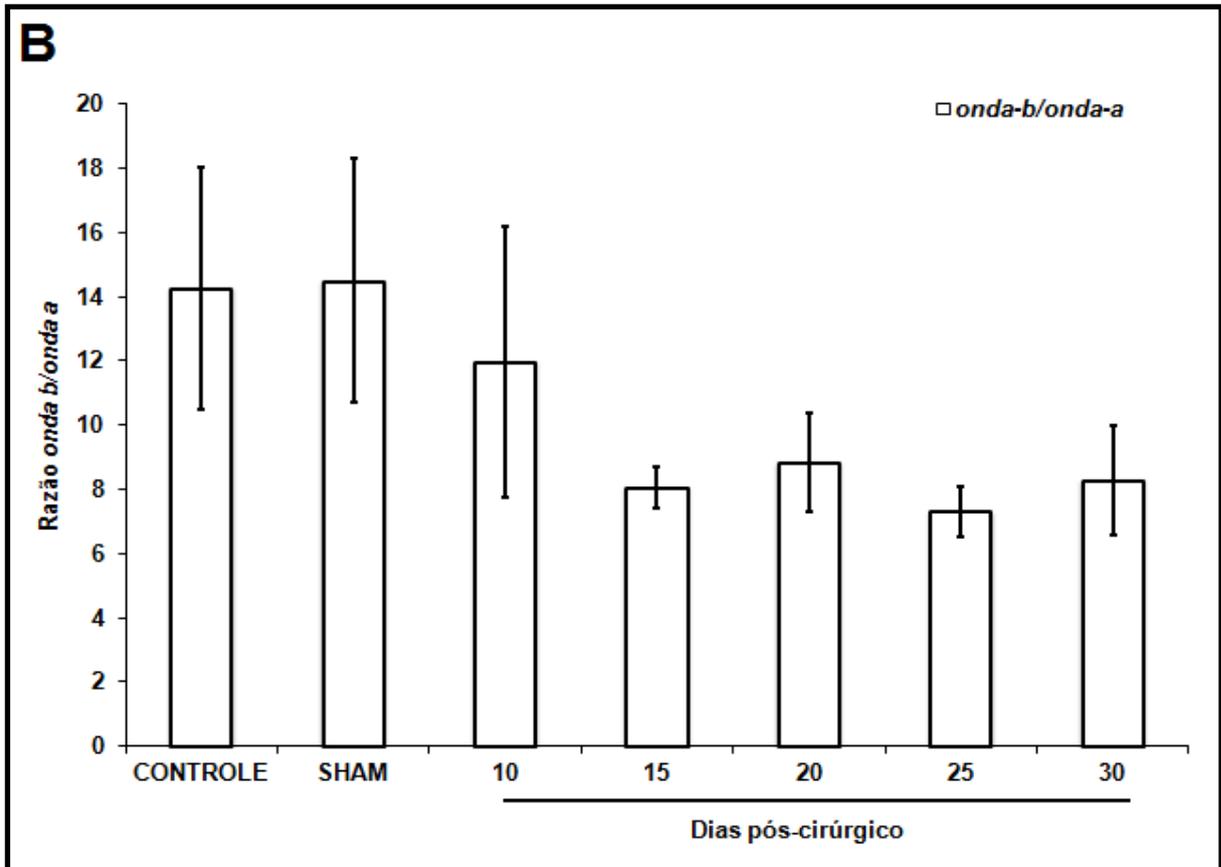
Ao analisarmos a amplitude da *onda-a* utilizando o filtro verde, o controle exibiu média de  $5,7 \pm 0,5 \mu\text{V}$ , enquanto que o grupo com dez dias após a cirurgia apresentou uma diminuição significativa, com média de  $1,5 \pm 0,3 \mu\text{V}$  e o último grupo expressou uma redução ainda maior, com média de  $0,8 \pm 0,2 \mu\text{V}$ .

Ao avaliarmos a amplitude da *onda-a* utilizando o filtro azul, o controle apresentou média de  $6,3 \pm 0,8 \mu\text{V}$ , ocorrendo uma redução na amplitude em comparação aos grupos que sofreram tireoidectomia, uma vez que o grupo com dez dias pós-cirúrgico exibiu média de  $2,1 \pm 0,8 \mu\text{V}$  e o com trinta dias apresentou média de  $1,1 \pm 0,7 \mu\text{V}$ .

Na avaliação da *onda-b*, a amplitude da mesma sofreu diminuição em sua magnitude nos grupos tireoidectomizados, pois os valores do controle com o filtro verde ficaram em torno de  $55,3 \pm 12,9 \mu\text{V}$ , já nos animais tireoidectomizados, o grupo com dez dias pós-cirúrgico tinha valores de  $15 \pm 4,9 \mu\text{V}$  e no grupo de trinta dias os valores eram de  $6,7 \pm 1,9 \mu\text{V}$ . O grupo controle com o filtro azul exibiu média de  $57,2 \pm 13,1 \mu\text{V}$ , enquanto que, o grupo com dez dias pós-cirúrgico apresentou média de  $16,6 \pm 1,9 \mu\text{V}$  e o de trinta dias apresentou média de  $8,9 \pm 3,0 \mu\text{V}$ .

Quando avaliamos a razão da *onda-b* pela *onda-a* (figura 16d) utilizando-se o filtro verde, verificamos uma redução significativa da amplitude nos grupos tireoidectomizados a partir do vigésimo dia pós-cirúrgico (Controle  $10,4 \pm 1,7 \mu\text{V}$  VS grupo 20 dias pós-cirúrgico  $6,5 \pm 0,7 \mu\text{V}$ ), com uma redução ainda maior no grupo com trinta dias pós-cirúrgico ( $5,4 \pm 0,9 \mu\text{V}$ ) (Figura 17e). Por outro lado, ao utilizarmos o filtro azul, não verificamos diferença estatística significativa entre os grupos (Figura 17e).





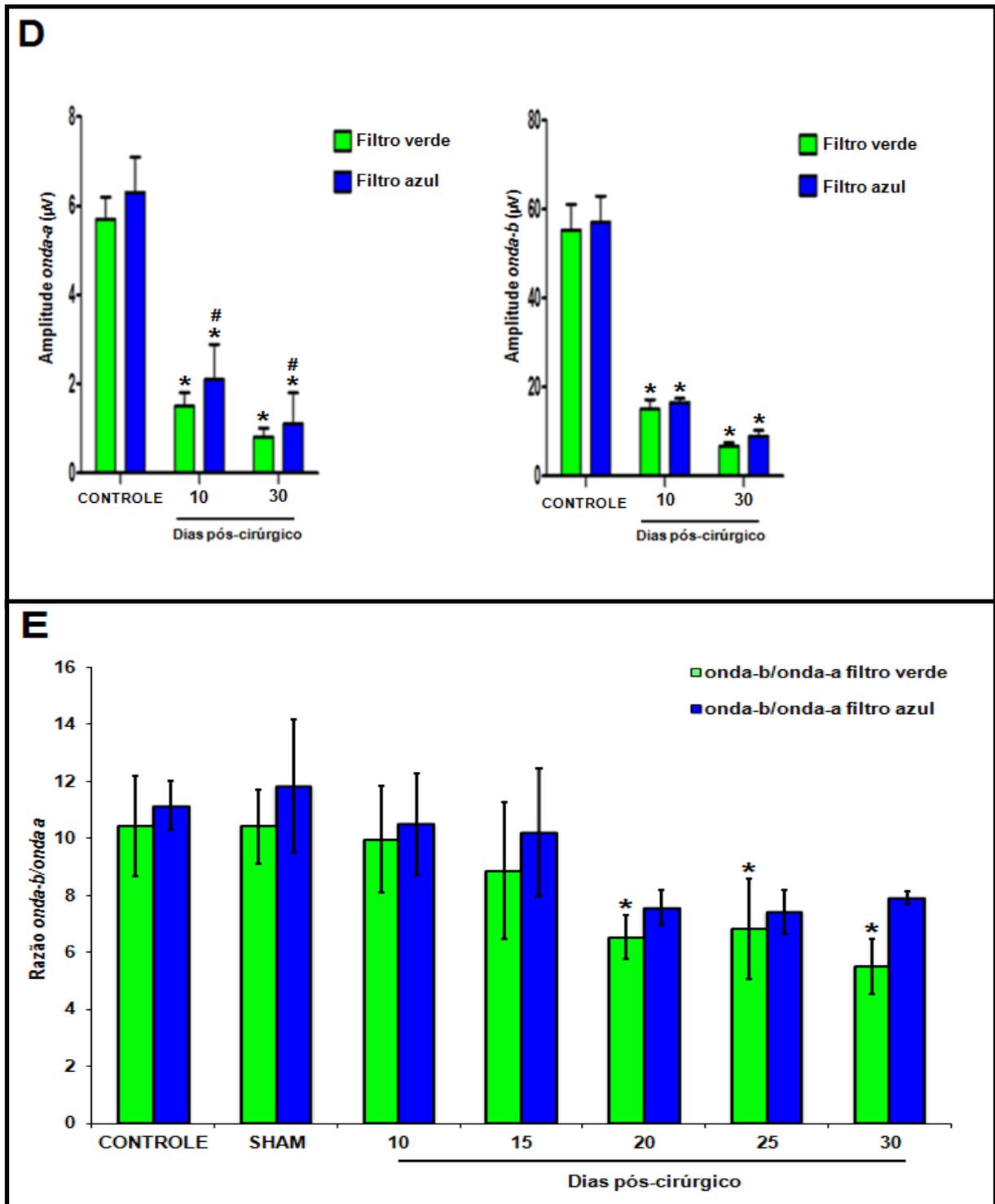


Figura 17. Valores do registro monocular do ERG de campo total dos animais de estudo. (A) Amplitude da *onda-a*, *onda-b* em  $\mu\text{V}$ . (B) Razão entre *onda-b* e *onda-a* na resposta fotópica, utilizando o protocolo de adaptação ao claro por um período de 10 minutos. (C) Amplitude da *onda-a* e *onda-b* em  $\mu\text{V}$  na resposta fotópica, com a utilização de filtros de luz, empregando o mesmo protocolo de adaptação ao claro. (D) Razão entre *onda-b* e *onda-a*. Os valores são expressos em média e desvio padrão (ANOVA-Tukey  $*p < 0.05$  em relação ao controle *onda-a*, *onda-b* e razão entre *onda-b* e *onda-a*;  $n = 8$ ).

## 5.6 AVALIAÇÕES DA AMPLITUDE DA *onda-b* NA RESPOSTA FOTÓPICA, COM ESTÍMULOS INTERMITENTES E DIFERENTES FREQUÊNCIAS TEMPORAIS

A estimulação do cone e a transmissão do sinal à célula bipolar geram uma resposta como um potencial graduado, que possui um limiar de resposta. Dessa forma, buscamos identificar até que frequência as células seriam capazes de responder ao estímulo. Na avaliação da amplitude da *onda-b* gerada com estímulos intermitentes (*flicker*), a partir de diferentes frequências temporais, visualizamos uma diminuição da amplitude da *onda-b* com o aumento da frequência de apresentações do *flash* de luz (Figura 18), o que já era esperado.

Na comparação entre os grupos experimentais identificamos uma diminuição na magnitude da resposta nos grupos que passaram pela remoção da glândula tireoide. No grupo controle a amplitude da *onda-b* para o flicker de 12 Hz apresentou média de  $50,8 \pm 8,1 \mu\text{V}$ , contudo nos grupos tireoidectomizados ocorreu um decréscimo da amplitude da onda, dez dias após a cirurgia os animais já apresentavam diferença estatisticamente significativa ( $22,2 \pm 7,4 \mu\text{V}$ ) e no trigésimo dia a diminuição era ainda mais evidente ( $12,6 \pm 2,6 \mu\text{V}$ ). Para o flicker de 15 Hz, o controle apresentou média de  $31,6 \pm 5,0 \mu\text{V}$ , enquanto que o grupo de dez dias pós-cirúrgico apresentou média de  $13 \pm 4,3 \mu\text{V}$  e no grupo com trinta dias  $7,8 \pm 2,4 \mu\text{V}$ . No flicker de 18 Hz a média da amplitude da *onda-b* no grupo controle foi de  $22,7 \pm 4,9 \mu\text{V}$ , enquanto que dez e trinta dias após a remoção da glândula, observamos uma diminuição significativa na amplitude da mesma, com valores médios de  $8,2 \pm 2,4 \mu\text{V}$  e  $4,5 \pm 1,9 \mu\text{V}$ , respectivamente. Fizemos também frequências temporais de 30 Hz, todavia a amplitude da *onda-b* gerada em todos os grupos experimentais aproximou-se da linha de base não sendo possível realizar sua mensuração.

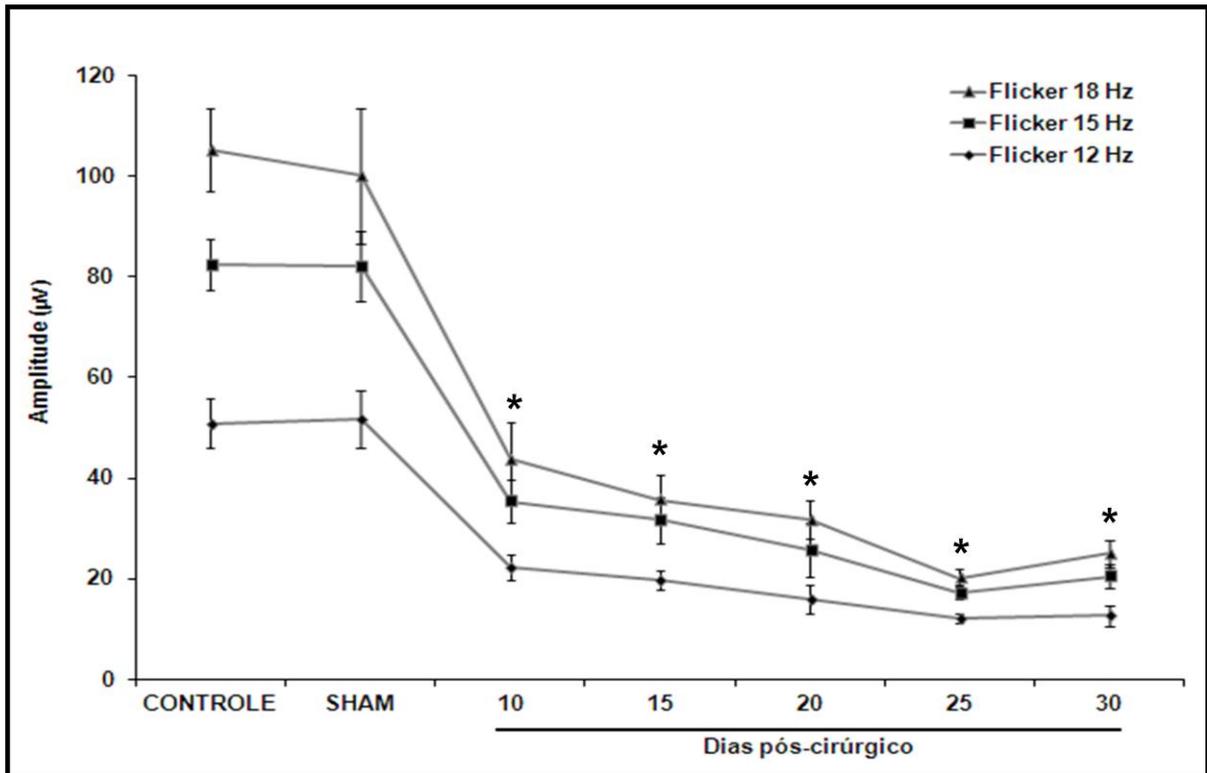


Figura 15. Valores do registro monocular do ERG de campo total dos animais de estudo. Amplitude da *onda-b* em  $\mu\text{V}$  na resposta fotópica de flicker, com estimulação intermitente com variação na frequência de apresentação. Utilizando o protocolo de adaptação ao claro por um período de 10 minutos. Os valores são expressos em média e desvio padrão (ANOVA-Tukey  $*p < 0.01$  em relação ao controle;  $n = 8$ ).

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 VALIDAÇÃO DO MODELO DE HIPOTIREOIDISMO

Para tentar caracterizar o modelo de hipotireoidismo vários trabalhos foram desenvolvidos com base no uso de drogas que levam à redução dos níveis dos hormônios tireoidianos. Um dos primeiros estudos foi desenvolvido por Barnett (1950) que avaliou a prole de ratas tratadas com tiouracil, tanto no período de gestação como no de lactação, verificando que sua prole apresentou redução nas curvas de ganho de peso e tamanho. Resultados similares foram obtidos com o uso de metil-mercaptopimidazol em ratas, em que o ganho ponderal de peso e tamanho diferiram após seis e nove meses de tratamento quando comparadas com animais eutireoideos (SOUKUP *et al.*, 2001). Em ratos tratados com metimazol, a redução dos níveis dos hormônios tireoidianos está relacionada à diminuição do peso total, bem como do peso da gordura retroperitoneal e total comparados com animais eutireoideos (SYED *et al.*, 1999)

O método usado em nossa pesquisa difere dos utilizados nas pesquisas anteriores, pois nelas os animais são tratados com drogas, que muitas vezes ocasionam efeito tóxico (BARNETT, 1950), podendo ocasionar uma perda considerável no número de animais. Ademais, essas drogas podem gerar resultados dúbios, uma vez que, existe certa dificuldade em se definir se as alterações apresentadas se relacionam com o fármaco ou com a própria doença. Desta forma, realizando-se a ablação da glândula (animais tireoidectomizados) e também havendo um grupo que passa por todos os procedimentos cirúrgicos, porém sem a

remoção da glândula (grupo sham), podemos inferir com maior exatidão que as alterações observadas estão correlacionadas à ablação da glândula.

Os resultados obtidos pelo modelo de hipotireoidismo adotado no presente trabalho estão de acordo com dados previamente descritos (BARNETT, 1950; SYED *et al.*, 1999; SOUKUP *et al.*, 2001), observando-se redução no ganho de peso e do tamanho de animais tireoidectomizados. Duas hipóteses podem explicar a redução no ganho de peso e tamanho. A primeira descreve que, a redução dos níveis dos hormônios tireoidianos ocasiona diminuição dos níveis dos hormônios do crescimento (GH), gerando estagnação no tamanho (ABOU-ELGHAIT *et al.*, 2011). A segunda propõe que os hormônios tireoidianos estão envolvidos na homeostase da gordura corporal, reduzindo ou aumentando seu conteúdo no organismo (BURGI *et al.*, 1990; SYED *et al.*, 1999). Por este motivo, também é possível se observar um resultado contrário, com aumento de peso corporal, como observado em humanos com hipotireoidismo (ESCRIVÃO *et al.*, 2000; KROTKIEWSKI, 2002; LORDELO *et al.*, 2007).

A eficácia de nosso protocolo para induzir o hipotireoidismo fica ainda mais evidente quando dosados os níveis de T3, pois seus níveis apresentaram-se mais baixos nos animais que foram submetidos à tireoidectomia, quando comparados aos grupos controle e sham. Resultados semelhantes foram obtidos realizando-se a extirpação da glândula tireoide de ratos adultos (TAKEDA *et al.*, 1994), bem como no tratamento com drogas (SCHUUR *et al.*, 1997; SYED *et al.*, 1999; CHANDRA *et al.*, 2012).

## 6.2 TEMPO IMPLÍCITO DAS RESPOSTAS ESCOTÓPICA E FOTÓPICA

Na análise dos resultados dos registros eletrofisiológicos obtidos a partir das respostas escotópicas, observamos que o tempo implícito de ambas as *ondas-a e b*, mantiveram-se inalteradas em todos os grupos. Contudo, Takeda *et al.*, (1994) demonstrou um aumento no tempo implícito da *onda-b* nas respostas fotópicas de ratos adultos com hipotireoidismo. Resultados similares no tempo implícito das *ondas-a e b* foram observadas em cachorros com hipotireoidismo (DURIEUX *et al.*, 2008). Da mesma forma pacientes com hipotireoidismo idiopático apresentaram aumento no tempo implícito das *ondas-a e b* (HOLDEW & CONDON, 1998).

Uma das hipóteses para o tempo implícito não apresentar alterações em nosso modelo, pode estar relacionada ao curto tempo de supressão dos hormônios tireoidianos (30 dias), bem como, à fase de desenvolvimento de nosso modelo (ratos jovens). Talvez esse período não tenha sido suficiente para que possamos observar alterações no padrão de resposta para o tempo implícito. O tratamento com metimazol, droga que deprime os níveis dos HT, mostrou mudança no padrão de distribuição de cones S e M de roedores adultos após o tratamento por um período de quatro meses (GLASCHKE *et al.*, 2011). Um tratamento feito por um período de seis a doze meses com o uso de metimazol foi utilizado para induzir hipotireoidismo em ratas adultas (SOUKUP *et al.*, 2001).

### 6.3 ALTERAÇÕES NA AMPLITUDE DAS RESPOSTAS ESCOTÓPICAS

Os resultados obtidos a partir das respostas escotópicas para amplitude das *ondas-a* e *b* demonstraram uma redução na amplitude das ondas nos animais que sofreram ablação da glândula. Achados semelhantes foram obtidos em pacientes com hipotireoidismo idiopático, verificando redução da amplitude principalmente do componente positivo (HOLDEW & CONDON, 1998). Resultados similares para a amplitude das *ondas-a* e *b* foram observados em cachorros com hipotireoidismo (DURIEUX *et al.*, 2008). Abou-elghait *et al.*, (2011) demonstrou redução no número de fotorreceptores e de células bipolares em ratos jovens com hipotireoidismo. Dessa forma, a redução desses tipos celulares pode explicar a diminuição na amplitude das *ondas-a* e *b*, observadas em nossa pesquisa.

### 6.4. ALTERAÇÕES NA AMPLITUDE DAS RESPOSTAS FOTÓPICAS

Nossos resultados mostraram uma redução na amplitude das *ondas-a* e *b* na resposta fotópica nos animais tireoidectomizados. Bem como, observamos declínio da amplitude das *ondas-a* e *b* com o uso dos filtros nos animais que tiveram a glândula tireoide extirpada.

Identificamos um declínio mais acentuado na resposta fotópica dos animais tireoidectomizados quando utilizamos o filtro que permitia a passagem de comprimentos de onda que sensibilizavam os cones M. Lilyng *et al.*, (2001) observou que ocorreu uma redução nas *ondas-a* e *b* e também uma diminuição da

subpopulação de cones M em camundongos que apresentavam alteração no receptor para o hormônio tireoidiano TR $\beta$ 2, envolvido no desenvolvimento de cones do tipo M. Resultados semelhantes foram obtidos por Pessoa *et al.* (2008), demonstrando que a expressão de cones S e M são dependentes dos níveis normais do hormônio tireoidiano durante o desenvolvimento da retina de camundongos. Glaschke *et al.*, (2011) demonstrou que a supressão dos hormônios tireoidianos em roedores gera uma alteração na quantidade de cones S e M, promovendo redução da subpopulação de cones M nas regiões dorsal e ventral da retina. Diante do exposto, é possível que uma redução nas subpopulações de cone M esteja relacionada à diminuição significativa nas respostas associadas à subpopulação de cones verdes observadas no presente estudo.

## 7. CONCLUSÃO

- ✓ O presente modelo de hipotireoidismo, com a extirpação da glândula tireoide, é eficaz levando à diminuição no ganho de peso, no tamanho dos animais e redução nos níveis de T3.
- ✓ O modelo de hipotireoidismo em ratos jovens não altera o tempo implícito da *onda-a* e *onda-b*, na resposta escotópica máxima e fotópica e no flicker.
- ✓ O modelo de hipotireoidismo em ratos jovens reduz a amplitude da *onda-a*, *onda-b* e a *razão entre onda-b e onda-a*, na resposta escotópica máxima.
- ✓ A tireoidectomia em ratos jovens diminui a amplitude da *onda-a*, *onda-b*, na resposta fotópica, porém não altera a *razão entre onda-b e onda-a*.
- ✓ A extirpação da glândula tireoide em ratos jovens reduz a amplitude da *razão entre onda-b e onda-a* na resposta fotópica, com o uso do filtro de luz verde, mas não do azul.
- ✓ O quadro de hipotireoidismo leva à diminuição na amplitude da *onda-b*, na resposta fotópica de *flicker* quando variada a frequência de apresentação.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU-ELGHAIT, A. T.; RATEB, A.; MAHMOUD, F. Y.; GALAL, O. Effect of experimentally induced hypothyroidism during pregnancy and lactation on the retina of juvenile and adult albino rats and the possible role of thyroid hormone supplementation. **The Egyptian Journal of Histology**. 34: 28-45, 2011.
- AHNELT, P. K. & KOLB, H. The Mammalian Photoreceptor Mosaic-adaptive Design. **Progress in Retinal and Eye Research**. 19: 711-777, 2000.
- AMBROGINI, P.; CUPPINI, R.; FERRI, P.; MANCINI, C.; CIARONI, S.; VOICI, A.; GERDONI, E.; GALLO, G. Thyroid hormones affect neurogenesis in the dentate gyrus of adult rat. **Neuroendocrinology**. 81: 244-253, 2005.
- AZADI, S.; ZHANG, Y.; CAFFE, A. R.; HOLMQVIST, B.; VANVEEN, T. Thyroidbeta-2 and retinoid RAR-alpha, RXR-gamma and ROR-beta2 receptor mRNAs: expression profiles in mouse retina, retinal explants and neocortex. **Neuroreport**. 13: 745-750, 2002.
- BARNETT, R. J. Experimental production of cretin-like rats. **Yale journal of biology and medicine**. 22: 313-322, 1950.
- BAUER, M.; LONDON, E. D.; SILVERMAN, D. H.; RASGON, N.; KIRCHHEINER, J.; WHYBROW, P. C. Thyroid, brain and mood modulation in affective disorder: insights from molecular research and functional brain imaging. **Pharmacopsychiatry**. 36: 215-221, 2003.
- BERNAL, J.; GUADANO-FERRAZ, A.; MORTE, B. Perspectives in the study of thyroid hormone action on brain development and function. **Thyroid**. 13: 1005-12, 2003.
- BORGES, H. E.; MARTINS, A. C. P.; MATHIAS, P. C. F.; ESTERES, R. Z. Atividade Colinesterásica em Tireóide de Ratos: Resposta a Uma Sobrecarga de Iodo. **Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. 44: 347-35, 2000.
- BRENT, G. A. The Molecular-Basis of Thyroid-Hormone Action. **New England Journal of Medicine**. 331: 847-853, 1994.
- BRONSTEIN-SITTON, N. Somatostatin and the Somatostatin Receptors: Versatile Regulators of Biological Activity. **Spring**. 2: 25-27, 2006.
- BRONSTEIN-SITTON, N. The ether-a-go-go related Gene (erg) Voltage-Gated K<sup>+</sup> channels: A common Structure With Uncommon characteristics. **Modulator**. 21: 13-5, 2006.
- BROWMAKER, J. K. & HUNT, D. M. Evolution of vertebrate visual pigments. **Current biology**. 16: 484-489, 2006.
- BURGI, U.; BURGI-SAVILLE, M. E.; BURGHERR, J.; CLEMENT, M.; LAUBER, K. T3 plus high doses of beta-blockers: effects on energy intake, body composition, fat and heart in rats. **Int J Obes**. 14: 1023-1038, 1990.

- BURMEISTER, L. A.; GANGULI, M.; DODGE, H. H.; TOCZEK, T.; DEKOSKY S. T.; NEBES, R. D. Hypothyroidism and cognition: preliminary evidence for a specific defect in memory. **Thyroid** 11: 1177-1185, 2001.
- CARVALHO, D. P.; ROSENTHAL, D.; BREITENBACH, M. M. D. Analysis of thyroglobulin 27S and 19S and their hormonal content in human thyroid glands. **Braz J Med Biol Res.** 20:415-8, 1987.
- CASPER F. & HEGNER, M. D. A history of thyroid surgery. **Annals of surgery.** 4: 481-492, 1932.
- CHANDRA, A. K.; GOSWAMI, H. SENGUPTA, P. Dietary calcium induced cytological and biochemical changes in thyroid. **Environmental Toxicology and Pharmacology.** 34: 454-465, 2012.
- COHEN, A. I. The retina in: William, M. H. J. Ed Adler's Physiology of the eye. **Mosby Year Book.** 1992.
- CORVILAIN, B.; VAN SANDE, J.; DUMONT, J. E. Inhibition by iodide of iodide binding to proteins: the "Wolff-Chaikoff" effect is caused by inhibition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation. **Biochem Biophys Res Commun.** 154: 1287-92, 1988.
- DAÍ, G.; LEVY, O.; CARRASCO, N. Cloning and characterization of the thyroid iodine transporter. **Nature.** 379: 458-60, 1996.
- DEVDHAR, M.; OUSMAN, Y. H.; BURMAN, K. D. Hypothyroidism. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America.** 36: 595-615, 2007.
- DOHAN, O., DE LA VIEJA, A.; PARODER, V.; RIEDEL, C.; ARTANI, M.; REED, M. The sodium/iodide symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. **Endocr Ver.** 24: 48-77, 2003.
- DUNN J. T. Endemic goiter and cretinism: an update on iodine status. **J Pediatr Endocrinol Metab.** 14: 1469-73, 2001.
- DUNN, J. T. & DUNN, A. D. Update on intrathyroidal iodine metabolism. **Thyroid.** 11: 407-14, 2001.
- DURIEUX, P.; RIGAUDIÈRE, F.; LEGARGASSON, J. F.; ROSOLEN. S. G. ERG findings in three hypothyroid adult dogs with and without levothyroxine treatment. **Veterinary Ophthalmology.** 11: 406-411, 2008.
- EI-SHEIKH, S.; EL-BEHAIRYL, F.; TAHA ALJAWADI; HUMEIDA, A. K.; HARDY, M. J.; A provisional study on the pattern of thyroid disorders in infants and children in Saudi Arabia. **J Kau: Med science.** 4: 55-64, 1994.
- ENG, P. H.; CARDONA, G. R.; FANG, S. L.; PREVITI, M.; ALEX, S.; CARRASCO, N.; CHIN, W. W.; BRAVERMAN, L. E. Escape from acute Wolff-Chaikoff effect is associated with a decrease in thyroid sodium/iodide symporter messenger ribonucleic acid and protein. **Endocrinology.** 140: 3404-10, 1999.
- ESCRIVÃO, M. A. M. S.; OLIVEIRA, F. L. C.; TADDEI, J. A. A. C.; LOPEZ, F. A. Obesidade exógena na infância e na adolescência. **Jornal de Pediatria.** 76: 305-310, 2000.

ESKANDARI, S.; LOO, D. D. F.; DAÍ, G.; LEVY, O.; WRIGHT, E. M. CARRASCO, N. Thyroid Na +/- symporter-mechanism, stoichiometry and specificity. **J Biol Chem.** 272: 27230-8, 1997.

EULLER, T. & WASSLE. H. Immunocytochemical identification of cone bipolar cells in the rat retina. **J comp Neurol.** 361: 461-78, 1995.

FARWELL, A. P. & BRAVERMAN, L. E. Thyroid and antithyroid drugs. In: Goodman & Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics. Hardman Gilman AG, JG, Limbird LE. 9 ed. New York: **McGraw-Hill**; 1996.

FEKETE, C.; KELLY, J.; MIHÁLY, E.; SARKAR, S.; RAND, W. M.; LÉGRÁDI, G.; EMERSON, C. H.; LECHAN. R. M. Neuropeptide Y Has a Central Inhibitory Action on the Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis. **Endocrinology.** 142: 2606-13, 2001.

FELING, P.; BAXTER, J. D.; FROHMEN, L. A. Endocrinology and metabolism. New York: **McGraw-Hill.** 1995.

FERNANDES, M. L. M. P.; FERRO, E. A. V.; RESENDE, E. S.; Spironolactone and Thyroxine on Myocardium Hypertrophy. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia.** 89: 360-364, 2007.

FISHER, D. A. Fetal thyroid function: diagnosis and management of fetal thyroid disorders. **Clinical Obstetrics and Gynecology.** 40: 16–31, 1997.

FLAMANT, F. & SAMARUT, J. Thyroid hormone receptors: lessons from knockout and knock-in mutant mice. **Trends Endocrinol Metab.** 14: 85-90, 2003.

FOX, S. I. Human Physiology. 8 ed. **McGraw-Hill**, 2003.

GLASCHKE, A.; WEILAND, J.; DEL TURCO, D.; STEINER, M.; PEICHL, L.; GLÖSMANN, M. Thyroid Hormone Controls Cone Opsin Expression in the Retina of Adult Rodents. **The Journal of Neuroscience.** 31: 4844-4851, 2011.

GOLD, M. S.; POTTASH, A. L. C. Hypothyroidism and Depression: Evidence from Complete Thyroid-Function Evaluation. **The Journal of the American Medical.** 24: 1919-1922, 1981.

GORMUS, G.; BAYRAMOGLU, A.; ALDUR, M. M.; CELIK, H. H.; MARAL, T.; SARGON, M. F.; DEMINRYUREK, D.; AKSIT, M. D. Vascular pedicles of infrahyoid muscles: An anatomical study. **Clinical Anatomy.** 17: 214–217, 2004.

GRIFFIN, J. E. The thyroid. In: GRIFFIN, J. E.; OJEDA, S. R. editors. Textbook of endocrine physiology. New York: **Oxford University Press.** 294-318, 2004.

GROSS, J. & PITT-RIVERS, R. 3:5:3'-Triiodothyronine: Isolation from thyroid gland and synthesis. **Biochem J.** 53: 645–652, 1953.

HARINGTON, C. R. & GEORGE BARGER, G. chemistry of thyroxine: Constitution and synthesis of thyroxine. **Biochemical Journal.** 20: 300-313, 1926.

HARINGTON, C. R. Physiology of the thyroid gland. **The Britis Medical Journal**. 26: 1320-1322, 1936.

HARUN-OR-RASHID, M.; ASAI, M.; SUN, X. Y.; HAYASHI, Y.; SAKAMOTO, J.; MURATA, Y. Effect of thyroid statuses on sodium/iodide symporter (NIS) gene expression in the extrathyroidal tissues in mice. **Thyroid Research**. 3: 1-6, 2010.

HEYMANN, W. R. Cutaneous manifestations of thyroid disease. **Journal of the American Academy of Dermatology**. 26: 885-902, 1992.

HOLDER, G. E.; CELESIA, G. G.; MIYAKE, Y.; TOBIMATSU, S.; WELEBER, R. G. International Federation of Clinical Neurophysiology: Recommendations for visual system testing. **Clinical Neurophysiology**. 121: 1393-1409, 2010.

HOLDEW, G. E. & CONDON, J. R. Pattern visual evoked potentials and pattern electroretinograms in hypothyroidism. **Documenta Ophthalmologica** 73: 127-131, 1989.

INGENBLEEK, Y. & YOUNG, V. Transthyretin (prealbumin) in health and diseases nutritional implications. **Annu Rev Nutr**. 14: 495-533, 1994.

JACOBS, G. H.; FENWICK, J. A.; WILLIAMS, G. A. Cone-based vision of rats for ultraviolet and visible lights. **The Journal of Experimental Biology**. 204: 2439–2446, 2001.

JUNQUEIRA, L. C. U. & CARNEIRO, J. Histologia básica. 11. Ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2008.

KENDALL, E. C. The isolation in crystalline form of the compound containing iodine which occurs in the thyroid: its chemical nature and physiologic activity. **JAMA**. 64: 2042-3, 1925.

KIRSTEN, D. The thyroid gland: physiology and pathophysiology. **Neonatal Netw**. 19: 11-26. 2000.

KLEIN, I. Thyroid hormone and the cardiovascular system. **Americana Journal of Medicine**. 88: 631-637, 1990.

KÖHRLE J. Thyroid hormone metabolism and action in the brain and pituitary. **Acta Medica Austriaca**. 27:1-7, 2000.

KOK, J. H.; BRIET, J. M.; VAN WASSENAER, A. G. Postnatal thyroid hormone replacement in very preterm infants. **Seminars in Perinatology**. 25: 417-425, 2001.

KOLAKOWSKI, L. F. J.; JUNG, B. P.; NGUYEN, T.; JOHNSON, M. P.; LYNCH, K. R.; CHENG, R.; HENG, H. H.; GEORGE, S.R.; O'DOWD, B. F. Characterization of a human gene related to genes encoding somatostatin receptors. **FEBS Letters**. 398: 253-258, 1996.

KOLB, H. How the retina works. **American Scientist**. 91: 28-35. 2004.

KOPP, P. Thyroid hormone synthesis: thyroid iodine metabolism. In: Braverman L, Utiger R, editors. *Werner and Ingbar's the thyroid: a fundamental and clinical text*. 9 ed. New York: **Lippincott Williams Wilkins**; 2005.

KROTKIEWSKI, M. Thyroid hormones in the pathogenesis and treatment of obesity. **Eur J Pharmacol**. 440: 85-98, 2002.

LAZAR, M. A. Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. **Endocr Rev**. 14:184-93, 1993.

LEESON, P. D.; EMMETT, J. C.; SHAH, V.P.; SHOWELL, G. A.; NOVELLI, R.; PRAIN, H. D.; BENSON, M. G.; ELLIS, D.; PEARCE, N. J.; UNDERWOOD, A. H. Selective thyromimetics. Cardiac-sparing thyroid hormone analogues containing 3'-arylmethyl substituents. **Med. Chem**. 32: 320-336, 1989.

LIANG, H.; JUIZ-CE, A.; O'CONNELL, M.; BURGER, A. G. Organ-specific effects of 3,5,3-triiodothyroacetic acid in rats. **European Journal of Endocrinology**. 137: 537-544, 1997.

LILY, N. G.; JAMES, B. H.; DIERKS, B.; SRINIVAS, M.; SALTÓ, C.; VENNSTRÖM, V.; REH, T. A.; FORREST, D. A thyroid hormone receptor that is required for the development of green cone photoreceptors. **Nature Genetics**. 27: 94-98, 2001.

LINDHOLM, J. & LAURBERG, P. Hypothyroidism and Thyroid Substitution: Historical Aspects. **Journal of Thyroid Research**. 1-10, 2011.

LOOSEN, P. T. The Trh-Induced Tsh Response in Psychiatric-Patients - A Possible Neuro-Endocrine Marker. **Psychoneuroendocrinology**. 10: 237-260, 1985.

LOPES, H. J. J. Função tireoidiana: Principais restes laboratoriais e aplicações diagnósticas. Belo Horizonte (MG), 2002.

LORDELO, R. A.; MANCINI, M. C.; CERCATO, C.; HALPERN, A. Eixos Hormonais na Obesidade: Causa ou Efeito? **Arq Bras Endocrinol Metab**. 51: 34-41, 2007.

MACIEL, L. M. Z. O exame físico da tireoide. **Medicina Ribeirão Preto** 40: 72-77, 2007.

MAIA, A. L.; WARD, L. S.; CARVALHO, G. A.; GRAF, H.; MACIEL, R. B. M.; MACIEL, L. M. Z.; ROSÁRIO, P. W.; VAISMAN, M. Nódulos de Tireoide e Câncer Diferenciado de Tireoide. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia** 51: 5-6, 2007.

MANGELSDORF, D. J.; THUMMEL, C.; BEATO, M.; HERRLICH, P.; SCHUTZ, G.; UMESONO, K. The nuclear receptor superfamily: the second decade. **Cell**. 83:835-9, 1995.

MARMOR, M. F.; FULTON, A. B.; HOLDER, G. E.; MIYAKE, Y.; BRIGELL, M.; BACH, M. ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2008 update). **Doc Ophthalmol**. 118: 69-77, 2009.

MEDEIROS-NETO, G.; KIM, P.S.; YOO, S. E.; VONO, J.; TARGOVNIK, H.M.; CAMARGO, R.; HOSSAIN, S. A.; ARVAN, P. Congenital hypothyroid goiter with

deficient thyroglobulin. Identification of an endoplasmic reticulum storage disease with induction of molecular chaperones. **J Clin Invest.** 98: 2838-44, 1996.

MELMED. S. The Pituitary. 3ed, **Academic Press is an imprint of Elsevier.** 2011.

MENDEL, C. M.; WEISIGER, R. A.; JONES, A. L.; CAVALIERI, R. R. Thyroid hormone-binding protein in plasma facilitate uniform distribution of thyroxine within tissues: a perfused rat liver study. **Endocrinology.** 120: 1742-9, 1987.

MILLS, S. L. & MASSEY, S. C. A series of biotinylated tracers distinguishes three types of gap junction in retina. **Journal of Neuroscience.** 2002: 8629-8636, 2000.

MOHEBATI, A. & SHAHA, A. R. Anatomy of thyroid and parathyroid glands and neurovascular relations. **Clinical Anatomy.** 25: 19–31, 2012.

MOORE, K. L. & PERSAUD, T. V. N. Embriologia clínica. 6. Ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan,** 2000.

MORI, J.; SUZUKI, S.; KOBAYASHI, M.; INAGAKI, T.; KOMATSU, A.; TAKEDA, T.; MIYAMOTO, T.; ICHIKAWA, K.; HASHIZUME, K. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent cytosolic T(3) binding protein as a regulation for t(3)-mediated transactivation. **Endocrinology.** 143: 1538-44, 2002.

MOURA, N. V.; TRENTIN, A.; LIMA, F.; GOMES, F.; GONÇALVES, N.; CHAMAS, L. V. Effects of the thyroid hormone (T3) on astrocytes. **Revista Brasileira de Biologia.** 56: 123-34, 1996.

NUNES, M. T. Regulação Neuroendócrina da função tireoidiana. In: ANTUNES-RODRIGUES J.; MOREIRA A. C.; ELIAS L. L. K.; CASTRO M. Neuroendocrinologia Básica e Aplicada. RJ: **Guanabara Koogan.** 2005.

NUSSEY, S. AND WHITEHEAD, S. Endocrinólogo. **Oxford: BIOS Scientific Publishers.** 2001.

PATEL, J.; LANDERS, K.; LI, H.; MORTIMER, R. H.; RICHARD, K. Thyroid hormones and fetal neurological development. **Journal of Endocrinology.** 209: 1-8, 2011.

PESSOA, C. N.; SANTIAGO, L. A.; SANTIAGO, D. A.; MACHADO, D. S.; ROCHA, F. A. F.; VENTURA, D. F.; HOKOC, J. N.; PAZOS-MOURA, C. C.; WONDISFORD, F. E.; GARDINO, P. F.; ORTEGA-CARVALHO T. M. Thyroid hormone action is required for normal cone opsin expression during mouse retinal development. **Investigative Ophthalmology & Visual Science** 49: 2039-2045, 2008.

PUGH, E. N. & LAMB, T. D. Phototransduction in vertebrate rods and cones: molecular mechanisms of amplification, recovery and light adaptation. In: Elsevier Science. **Handbook of biological physics.** Molecular mechanisms of visual transduction. STAVENGA, D. G.; DE GRIP, W. J.; PUNG, E. N. 183-255, 2000.

PURVES, D. Neuroscience. 3ª ed. Sunderland: **Sinauer Associates,** 2004.

RASTOGI, V. M. & LAFRANCHI, S. H. Congenital hypothyroidism. **Orphanet Journal of Rare Diseases.** 5:1-17, 2010.

- ROBERTS, C. G. P. & LADENSON, P. W. Hypothyroidism. **The Lancet**. 363: 793–803, 2004.
- ROBERTS, M. R.; SRINIVAS, M.; FORREST, D.; ESCOBAR, M. G.; REH, T. A. Making the gradient: Thyroid hormone regulates cone opsin expression in the developing mouse retina. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 103: 6218–6223, 2006.
- ROCHA, T. F. A.; COSTA, R. V.; MARÇAL, A. C.; MOURA, T. R.; RODRIGUES, T. M. A. A Study on maturation of thyroid gland in human fetuses. **Journal of Morphological Science**. (27): 112-115, 2010.
- SAFATLE, A. M. V.; HVENEGAARD, A. P.; KAHVEGIAN, M.; MARTINS, T.; SHIMAMURA, G. M.; FANTONI, D. T.; BARROS, P. S. M. Padronização do eletrorretinograma de campo total em cães. **Pesq. Vet. Bras**. 30:763-769, 2010.
- SALADIN, K. Anatomy & Physiology: The Unity of Form and Function. 3 ed. **McGraw-Hill**, 2004.
- SANTIESTEBAN, R. P.; PLASENCIA, M. F.; FREIXAS, R. S.; SALGADO, M. C.; SANTIESTEBAN, C. E. M. Eletrorretinograma: Valores normales con diferentes protocolos de estudio. **Rev Cubana Oftalmol**. 18: 864-2176, 2005.
- SCHILLER, P. H.; SANDELL, J. H.; MAUNSELL, J. H. R. Funções dos canais *ON* e *OFF* do sistema visual. **Nature**. 322: 824-825, 1986.
- SCHUUR, A. G.; BOEKHORST, F. M.; BROUWER, A.; VISSER, T. J. Extrathyroidal Effects of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-Dioxin on Thyroid Hormone Turnover in Male Sprague-Dawley Rats. **Endocrinology**. 138: 3727-3734, 1997.
- SETIAN, N. Hypothyroidism in children: diagnosis and treatment. **Journal of Pediatrics**. 83: 209-216, 2007.
- SHAFER, R. B.; PRENTISS, R. A.; BOND, J. H. Gastrointestinal transit in thyroid disease. **Gastroenterology**. 86: 852-855, 1984.
- SOUKUP, T.; ZACHAŘOVÁ, G.; SMERDU, V.; JIRMANOVÁ, I. Body, Heart, Thyroid Gland and Skeletal Muscle Weight Changes in Rats with Altered Thyroid Status. **Physiol. Res**. 50: 619-626, 2001.
- SYED, M. A.; THOMPSON, M. P.; PACHUCKI, J.; BURMEISTER, L. A. The effect of thyroid hormone on size of fat depots accounts for most of the changes in leptin mRNA and serum levels in the rat. **Thyroid**. 9: 503-512, 1999.
- TAKEDA, M.; ONODA, N.; SUZUKI, M. Characterization of Thyroid Hormone Effect on the Visual System of the Adult Rat. **Thyroid**. 4: 467-474, 1994.
- TATA, J. R.; ERNSTER, L.; LINDBERG, O.; ARRHENIUS, E.; PEDERSEN, S.; HEDMAN, R. The Action of Thyroid Hormones at the Cell Level. **Biochem J**. 86: 408-428, 1963.

TOFT, A. D. Thyroxine therapy. **New England Journal of Medicine**. 331: 174–80, 1994.

TSUKAMOTO, Y.; MORIGIWA, K.; UEDA, M.; STERLING, P. Microcircuits for night vision in mouse retina. **Journal of Neuroscience**. 21:21: 8616-8623, 2001.

UHRMANN, S.; MARKS, K. H.; MAISELS, M. J.; FRIEDMAN, Z.; KAPLAN, M.; MURRAY, F. Thyroid function in the preterm infant: a longitudinal assessment. **J Pediatr**. 92:968-73, 1978.

WANG, R. C.; PUIG, C. M.; BROWN, D. J. Strap muscle neurovascular supply. **Laryngoscope**. 108: 973–976, 1998.

WASSLE, H. & BAYCOTT, B. B. Functional architecture of the mammalian retina. **Physiol Ver**. 71: 447-80, 1991.

WEINTRAUB, B. D. & GESUNDHEIT, N. Thyroid-Stimulating Hormone Synthesis and Glycosylation: Clinical Implications. **Thyroid today**. 10: 1-11, 1987.