



GLEND A FIGUEIRA GUIMARÃES

**ELETROFISIOLOGIA DA VISÃO EM MODELO EXPERIMENTAL DE
RATOS COM DIABETES E HIPOTIREOIDISMO**

BELÉM
2014

GLEND A FIGUEIRA GUIMARÃES

**ELETROFISIOLOGIA DA VISÃO EM MODELO EXPERIMENTAL DE
RATOS COM DIABETES E HIPOTIREOIDISMO**

Dissertação de Mestrado
apresentado ao Programa de Pós-
graduação em Neurociências e
Biologia Celular da Universidade
Federal do Pará como requisito para
obtenção do grau de Mestre em
Neurociências e Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Fernando
Allan de Farias Rocha.

Co-orientador: Prof. Dr. Bruno
Duarte Gomes.

Belém

2014

GLEND A FIGUEIRA GUIMARÃES

**ELETROFISIOLOGIA DA VISÃO EM MODELO EXPERIMENTAL DE
RATOS COM DIABETES E HIPOTIREOIDISMO**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Orientador:

Prof. Dr. Fernando Allan Farias Rocha

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará

Co-orientador:

Prof. Dr. Bruno Duarte Gomes.

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará

Examinadores:

Profª Dra. Dora Fix Ventura

Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo (membro titular)

Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano de Oliveira

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará (membro titular)

Profª. Dra. Karen Renata Matos Oliveira

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará (membro titular)

Dr. Daniel Valle Vasconcelos Santos

Instituto Evandro Chagas (Membro Suplente)

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Guimarães, Glenda Figueira, 1988-

Eletrofisiologia da visão em modelo experimental de ratos com diabetes e hipotireoidismo / Glenda Figueira Guimarães. - 2014.

Orientador: Fernando Allan de Farias Rocha; Coorientador:
Bruno Duarte Gomes.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2014.

1. Retina Doenças. 2. Eletrofisiologia. 3. Diabetes. 4. Hipotireoidismo. 5. Visão. I. Título.

CDD 22. ed. 617.732

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as conquistas.

Ao meu orientador Professor Dr. Fernando Allan de Farias Rocha por aceitar me orientar e sempre acreditar na viabilização e concretização deste trabalho.

Ao meu co-orientador Professor Dr. Bruno Gomes Duarte pela contribuição no trabalho e pelas observações sempre coerentes.

Ao Professor Dr. Anderson Manoel Herculano de Oliveira da Silva, Professora Dra. Karen Renata Matos Oliveira e aos colegas do Laboratório de Neuroendocrinologia, em especial as Alunas Luana Leão e Monica Lima pela ajuda sempre que necessária e por disponibilizarem o material utilizado na realização desse trabalho.

Ao professor Dr. Moises Hamoy pela contribuição na fase inicial deste trabalho, bem como os seus alunos Rodrigo Borges e Luis Batista.

Ao professor Dr. Manoel da Silva Filho pelos ensinamentos da importância da carreira científica.

À Natielle Ferreira Rabelo, parceira em todos os momentos na realização deste trabalho, pelo apoio e pela amizade.

Às amigas do mestrado, Alódia Brasil, Danielle Santana e Tayana Carvalho, pelo apoio e companheirismo.

À minha família, sempre presente me apoiando.

Ao meu namorado, pelo apoio e compreensão.

A Capes e ao CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

O diabetes mellitus constitui um problema de saúde pública mundial devido ao seu potencial de morbidade e mortalidade. Esta patologia é caracterizada como uma desordem metabólica com hiperglicemia crônica, resultado de uma deficiência absoluta ou relativa na secreção e/ou ação da insulina. Associado a esse quadro, problemas com a tireoide são frequentemente encontrados em pacientes acometidos por diabetes, principalmente com o avançar da idade. Além disso, há um corpo de conhecimento que descreve que tanto o diabetes quanto o hipotireoidismo provocam isoladamente perdas visuais, no entanto, não há muitas publicações acerca da fisiologia envolvendo em conjunto ambas patologias com as complicações visuais. O presente trabalho objetivou investigar questões relevantes para uma compreensão mais detalhada do quadro de evolução do comprometimento retiniano em modelos animais acometidos concomitantemente por duas doenças: diabetes e hipotireoidismo. Para isso, foram utilizados 50 ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*), com dois meses de idade, pesando entre 80 a 120 gramas, divididos em quatro grupos: um grupo controle sem procedimentos; um grupo com hipotireoidismo optando por um modelo experimental de tireoidectomia bilateral; um grupo com diabetes, com aplicação de 200 mg/Kg a 2% de Aloxana; e dois grupos com as duas patologias, adotando ambos os procedimentos experimentais, alterando a sequência das patologias em questão. Nos grupos estudados foi utilizado para avaliar as alterações visuais, um método não invasivo amplamente utilizado no meio acadêmico que é o eletrorretinograma (ERG) em diferentes períodos de 30, 45 e 60 dias. Assim, encontramos uma diminuição da amplitude média da onda-a dos animais nos grupos com diabetes e com as duas patologias em todos os registros realizados, os que apresentaram maiores diferenças estatísticas foram em relação ao registro de estocópica máxima, como também diferença no potencial oscilatório de ambos os grupos com as duas patologias. Os resultados obtidos dão suporte à hipótese que as duas patologias concomitantes (diabetes e hipotireoidismo) diminuem significativamente as respostas do ERG.

Palavras-chave: Eletrorretinograma; Diabetes; Hipotireoidismo; Ratos *Wistar*.

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a worldwide public health problem because of its potential morbidity and mortality. This pathology is characterized as a metabolic disorder with chronic hyperglycemia, results from an absolute or relative deficiency in the secretion and/or insulin action. Associated to this case, problems with the thyroid are often found in patients with diabetes, especially with advancing age. Furthermore, there is a body of knowledge describing that both diabetes and hypothyroidism cause visual loss, however, there are not many publications on the physiology involving both pathologies in conjunction with the visual complications. Therefore, this work aimed to investigate issues relevant to a more detailed understanding of the framework for the evolution of retinal impairment in animal models simultaneously affected by two diseases: diabetes and hypothyroidism. For this, 50 male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were used, two-months-old, weighing between 80 to 120 grams, divided into four groups: a control group without procedures; a group with hypothyroidism opting for a bilateral experimental model of thyroidectomy; a group with diabetes, with application of 200 mg/kg to 2% Aloxana; and two groups with both pathologies, adopting both experimental procedures by changing the sequence of the pathologies in question. In the studied groups, it was used the electroretinogram (ERG), a non-invasive method widely used in academia to evaluate the visual changes, in different periods of 30, 45 and 60 days. We found a decrease in the average amplitude of the wave-a of the animals in the groups with diabetes and with both pathologies in all the realized registrations, the ones that showed the highest statistical differences were in relation to the registration of maximum estocópica, as well as difference in oscillatory potential of both groups with both pathologies. These results support the hypothesis that both concomitant pathologies (diabetes and hypothyroidism) significantly diminish the ERG responses.

Keywords: Electroretinogram; Diabetes; hypothyroidism; Wistar rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho esquemático da disposição da glândula tireoide (BOGLIOLLO & BRASILEIRO FILHO, 2000).....	4
Figura 2. Esquema para elucidação do controle neuroendócrino da glândula tireoide, mostrando a influência do hipotálamo na liberação de TRH estimulando positivamente a hipófise na liberação de TSH estimulando positivamente a tireoide na liberação de T3 e T4 para realizar suas devidas funções, da mesma forma o esquema mostra o braço de alimentação negativa que o T3 e T4 exercem sobre o hipotálamo e a hipófise. T4 (tiroxina); T3 (3,5,´- triiodotironina); TSH (Hormônio estimulante da tireoide); TRH (Hormônio liberador de tireotrofina).....	6
Figura 3. Organização celular da retina, mostrando a disposição das células em lamina (Adaptado de PURVES, 2004).....	10
Figura 4. Curvas de absorção espectral dos diferentes tipos de cones UV e M encontrados na retina de ratos (Adaptado de JACOBS; FENWICK; WILLIAMS, 2001).....	14
Figura 5. Disposição das células bipolares na retina de ratos. Nove (1-9) são células bipolares de cones (CB) e uma é célula bipolar de bastonetes(RB). OPL: camada plexiforme externa, INL: camada nuclear interna, IPL: camada plexiforme interna, GCL: camada de células ganglionares (EULER; WÄSSLE, 1998).....	16
Figura 6. Respostas do ERG avaliadas no laboratório, seguindo padrão do ISCEV. As setas indicam o início do estímulo. Escala Amplitude 100 µV x Tempo 100 ms, com exceção com flicker.....	19
Figura 7. Resposta do Potencial oscilatório, seguindo padrão do ISCEV. As setas indicam o início do estímulo. Escala Amplitude 20 µV x Tempo 50 ms.....	19
Figura 8. Disposição dos equipamentos para realização dos registros eletrorretinográficos.....	27
Figura 9. Disposição dos eletrodos: (a) Posicionamento dos eletrodos no animal. (b) eletrodos utilizados para o registro (b1) ativo; (b2) referência; (b3) terra.....	28
Figura 10. Esquema da obtenção das respostas eletrorretinográficas.....	29
Figura 11. Cronograma da Obtenção dos Registros.....	29
Figura 12. Padronização das medidas das respostas do eletrorretinograma.....	30
Figura 13. À esquerda, resposta escotópica máxima de um rato <i>Wistar</i> , à direita a mesma resposta filtrada com filtro passa-baixa de 100 Hz.....	30
Figura 14. Esquema da mensuração do potencial oscilatório.....	31
Figura 15. Esquema da mensuração do Flicker de 12 Hz.....	31

Figura 16. Massa corporal dos animais estudados em diferentes tempos (30, 45 e 60 dias). Massa corporal em gramas. O asterisco significa diferença estatística em relação ao controle, (*) quando o $p < 0.05$ e (**) quando o $p < 0.01$	34
Figura 17. Glicemia dos animais estudados em diferentes tempos (30, 45 e 60 dias). Glicose em mg/dl. O asterisco significa diferença estatística em relação ao controle, (*) quando o $p < 0.05$ e (**) quando o $p < 0.01$	35
Figura 18. Campo Aberto. Gráfico mostrando a movimentação nos quadrantes dos animais estudados em 60 dias. Asterisco representa diferença estatística.....	36
Figura 19. Resposta escotópica de bastonetes. À direita as amplitudes médias da onda-b; à esquerda o tempo implícito médio da onda-b. O asterisco significa diferença estatística em relação ao controle.....	38
Figura 20. Resposta escotópica máxima. À direita as amplitudes médias da onda a; a esquerda as amplitudes médias da onda b. O asterisco significa diferença estatística em relação ao controle.....	41
Figura 21. Resposta escotópica máxima. À direita o tempo implícito médio da onda a; a esquerda o tempo implícito médio da onda b. O asterisco significa diferença estatística em relação ao controle.....	42
Figura 22. Resposta de cones. À direita as amplitudes médias da onda a; a esquerda a amplitude da onda b. O asterisco significa diferença estatística em relação ao controle.....	43
Figura 23. Resposta de cones. À direita o tempo implícito médio da onda a; a esquerda o tempo implícito médio da onda b. O asterisco significa diferença estatística em relação ao controle.....	44
Figura 24. Resposta de cones UV. À direita as amplitudes médias da onda a; a esquerda a amplitude médias da onda b. O asterisco significa diferença estatística em relação ao controle.....	47
Figura 25. Resposta de cones UV. À direita o tempo implícito da onda a; a esquerda o tempo implícito da onda b. O asterisco significa diferença estatística em relação ao controle.....	48
Figura 26. Resposta de cones S. À direita as amplitudes médias da onda a; a esquerda as amplitudes médias da onda b. O asterisco significa diferença estatística em relação ao controle.....	50
Figura 27. Resposta de cones S. À direita o tempo implícito médio da onda a; a esquerda o tempo implícito médio da onda-b. O asterisco significa diferença estatística em relação ao controle.....	51
Figura 28. Resposta dos potenciais oscilatórios. À direita as amplitudes médias da terceira onda; a esquerda o tempo implícito médio da terceira onda. O asterisco significa diferença estatística em relação ao controle.....	53

Figura 29. Resposta de flicker de 12 e 15 Hz. À direita amplitude média do flicker de 12 Hz; à esquerda a amplitude média do flicker de 15 Hz. O asterisco significa diferença estatística em relação ao controle.....	55
Figura 30. Resposta escotópica de bastonetes. A seta indica o início do estímulo. Amplitude (μV) x Tempo (ms).....	56
Figura 31. Resposta escotópica máxima. A seta indica o início do estímulo. Amplitude (μV) x Tempo (ms).....	57
Figura 32. Resposta do Flicker de 12 Hz.. Amplitude (μV) x Tempo (ms).....	58
Figura 33. Resposta d potencial oscilatório.. A seta indica o inicio da estímulo. Amplitude (μV) x Tempo (ms).....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos do Estudo.....	22
Tabela 2. Padrões de respostas obtidos no ERG.....	27
Tabela 3. Massa corporal dos grupos estudados.....	34
Tabela 4. Médias dos valores de glicemia dos ratos antes de cada registro.....	35
Tabela 5. Tabela de concentração de T3 sanguíneo dos animais testados após 60 dias.....	35
Tabela 6 . Médias e Desvio padrão as amplitudes da onda b.....	37
Tabela 7 . Médias e Desvio padrão do tempo implícito da onda b.....	37
Tabela 8. Médias e Desvio padrão das amplitudes de onda a.....	39
Tabela 9. Médias e Desvio padrão das amplitudes de onda b.....	39
Tabela 10. Médias e Desvio padrão do tempo implícito de onda a.....	39
Tabela 11. Médias e Desvio padrão do tempo implícito de onda b.....	40
Tabela 12. Médias e Desvio padrão das amplitudes de onda a.....	43
Tabela 13. Médias e Desvio padrão das amplitudes de onda b.....	43
Tabela 14. Médias e Desvio padrão do tempo implícito de onda a.....	43
Tabela 15. Médias e Desvio padrão do tempo implícito de onda b.....	43
Tabela 16. Médias e Desvio padrão das amplitudes de onda a.....	46
Tabela 17. Médias e Desvio padrão das amplitudes de onda b.....	46
Tabela 18. Médias e Desvio padrão do tempo implícito de onda a.....	46
Tabela 19. Médias e Desvio padrão do tempo implícito de onda b.....	46

Tabela 20. Médias e Desvio padrão das amplitudes de onda a.....	49
Tabela 21. Médias e Desvio padrão das amplitudes de onda b.....	49
Tabela 22. Médias e Desvio padrão do tempo implícito de onda a.....	49
Tabela 23. Médias e Desvio padrão do tempo implícito de onda b.....	49
Tabela 24. Médias e desvio padrão das amplitudes do potencial oscilatório.....	52
Tabela 25. Médias e desvio padrão do tempo implícito do potencial oscilatório.....	52
Tabela 26. Médias e desvio padrão das amplitudes do Flicker de 12 Hz.....	54
Tabela 27. Médias e desvio padrão das amplitudes do Flicker de 15 Hz.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

AD	Doença de Addison, do inglês <i>Addison disease</i>
AIT	Doença auto-imune da tireoide, do inglês <i>autoimmune thyroid disease</i>
CB	Células bipolares de cones, do inglês <i>bipolar cells</i>
CD	Doença celíaca, do inglês <i>celiac disease</i>
DB	Diabetes mellitus
ERG	Eletrorretinograma
GCL	Camada de células ganglionares, do inglês <i>ganglion cell layer</i>
GCO	Grupo controle
GDB	Grupos diabéticos
GDH	Diabéticos e Hipotireoidismo
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
INL	Camada nuclear interna, do inglês <i>Inner nuclear layer</i>
IPL	Camada plexiforme interna, do inglês <i>inner plexiform layer</i>
ISCEV	Sociedade Internacional de Eletrofisiologia Clínica da Visão, do inglês <i>International Society for Clinical Electrophysiology of Vision</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPL	Camada plexiforme externa, do inglês <i>outer plexiform layer</i>
PDE	Fosfodiesterase
PO	Potenciais Oscilatórios
T3	3,5,´- triiodotironina
T4	Tiroxina
TRH	Hormônio liberador de tireotrofina, do inglês <i>thyrotropin-releasing hormone</i>
TRβ2	Receptor tireoidiano Beta 2, do inglês <i>thyroid Receptor Beta 2</i>
RB	Célula bipolar de bastonetes, do inglês <i>rod bipolar cell</i>
RPM	Rotação por minutos
SS	Somatostatina

LISTA DE SÍMBOLOS

Hz	Hertz
mg/dl	Miligramma por decilitro
mg/Kg	Miligramma por kilograma
mg	Miligramma
ms	Milissegundo
mV	Milivolts
μg	Microgramma
μV	Microvolt

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Diabetes.....	1
1.2. Hipotireoidismo.....	4
1.3. Diabetes e Hipotireoidismo	8
1.4. Fisiologia Visual	9
1.5. Fisiologia visual dos ratos	13
1.6. O Eletrorretinograma.....	17
2. OBJETIVO	20
2.1. GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3. METODOLOGIA.....	21
3.1. Amostra.....	21
3.2. Modelo da Diabetes experimental.....	22
3.2.1. Aferição da glicemia	22
3.3. Modelo hipotireoidismo	23
3.3.1. Dosagem de T3 sanguíneo	24
3.4. Modelo Diabetes + Hipotireoidismo	24
3.5. Modelo Hipotireoidismo + Diabetes	24
3.7. Eletrorretinograma	25
3.7.1.Equipamentos	25
3.7.2.Eletrodos	27
3.7.3.Mensuração dos componentes do ERG.....	30
3.8. Análise dos dados.....	32
4. RESULTADOS.....	33
4.1. Parâmetros clínicos para caracterização do modelo experimental	33

4.1.1. Peso Corporal	33
4.1.2. Níveis Hormonais.....	34
4.1.2.2. Dosagem de T3	36
4.2 Respostas Eletroretinográficas	38
4.2.1. Respostas Estocópicas (Bastonetes).....	38
4.2.2. Respostas Estocópicas Máxima (Bastonetes e Cones).....	40
4.2.3. Resposta do Cone	44
4.2.5. Resposta de Cone S	50
4.2.6. Potencial Oscilatório	53
4.2.7 Flicker de 12 e 15 Hz	55
4.3. Padrão dos registros dos animais estudados.....	57
4.3.1. Registro das respostas estocópicas em 60 dias.....	57
4.3.2. Registro das respostas estocópicas em 60 dias.....	58
4.3.3. Resposta do Flicker de 12 Hz.....	59
4.3.4. Respostas do potencial oscilatório	60
5. DISCUSSÃO	61
6. CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
ANEXOS	

1. INTRODUÇÃO

1.1. Diabetes

O diabetes mellitus (DB) constitui um problema de saúde pública mundial devido ao seu potencial de morbidade e mortalidade. Conforme dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), em todo o planeta, o diabetes acomete cerca de 194 milhões de pessoas, gerando consequências humanas, sociais e econômicas devastadoras, pois são 4 milhões de mortes por ano relacionadas com o diabetes e suas complicações, o que equivale a 9% do total de morte no mundo, evidenciando um número alarmante (CAVALLI *et al*, 2007).

A OMS estima que até 2025 o número de pacientes diabéticos chegue a 300 milhões, sendo que no Brasil projeta-se que esse número chegue a 12 milhões de diabéticos (LERCO *et al* 2003). Essa doença caracteriza-se por ser uma desordem metabólica crônica, resultante da deficiência relativa ou completa na secreção e/ou ação da insulina, propiciando distúrbios no metabolismo dos carboidratos, lipídeos e proteínas, promovendo complicações vasculares, com ênfase na retinopatia (principal causa de cegueira no mundo), nefropatia e uma variedade de neuropatias debilitantes (SACKS *et al*, 2002; SCHEFFEL *et al*, 2004)

Dessa forma, ela pode ser classificada em diabetes do tipo 1, que é caracterizada como uma doença autoimune que provoca lesões nas células β do pâncreas, diminuindo ou até mesmo cessando a liberação de insulina, geralmente acontece na infância e na adolescência (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2011).

Este processo autoimune é detectado pela presença de autoanticorpos circulantes, tais como anti-descarboxilase, do ácido glutâmico (GAD 65), anti-tirosina fosfatase (IA 1 e IA 2B) e anti-insulina, que podem estar presentes meses ou anos antes do diagnóstico do DM (BAZOTTE, 2010).

Já o diabetes tipo 2 tem um início mais tardio, sendo mais provável comprometer pessoas com idade avançada. Existem dois fatores que provocam essa doença, tanto a redução da liberação da insulina pelo pâncreas, quanto uma resistência celular à insulina. Ela pode está ligada a traços genéticos e fatores de risco como

alimentação, falta de atividade física e tabagismo, mas a etiologia específica ainda não está clara (RIBEIRO, OLIVEIRA, MELO, 2007).

Ambos os tipos de diabetes estão associados com danos microvasculares que se acumulam em altas taxas e que dão origem a neuropatia diabética e retinopatia. Outras complicações incluem doenças cardiovasculares como arteriosclerose, infarto e acidente vascular cerebral (VILLENEUVE & NATARAJAN, 2010).

A explicação mais aceita na literatura para essas alterações na retina é a ativação da via aldose-redutase devido a altos índices de glicose circulante. Essa via é responsável por converter açúcar em álcool. Dessa forma as células vasculares da retina deixam de desempenhar suas funções normais, acarretando num quadro de fragilidade capilar da parede do vaso que evolui para o extravasamento sanguíneo (LAWRENSON, 2000).

Dentre uma das complicações do diabetes está o déficit da visão de cores, que é um dos primeiros danos visuais causados nessa doença (EWING *et al*, 1998; FLETCHER *et al*, 2007). Em geral, a perda se inicia na discriminação de cores azul-amarelo, portanto, no eixo tritan (perda de discriminação de cores no eixo azul/amarelo medida em um dado espaço de cores). Isso pode ser explicado por uma maior susceptibilidade dos cones S da retina, com pico de máxima absorvância na faixa de comprimento de onda curto (CHO *et al*, 2000), quanto por uma maior opacificação do cristalino (TREGGAR *et al*, 1997).

No entanto, estudos como de Gualtieri e colaboradores (2013) mostraram que ambos os eixos vermelho / verde e azul / amarelo foram afetadas em pacientes diabéticos sem retinopatia, estes resultados divergem da noção predominante que os diabéticos têm defeitos tritan preferenciais ou exclusivos.

A visão espacial também pode ser alterada pelo diabetes e isso tem sido demonstrado em estudos de sensibilidade ao contraste (HYVÄRINEN *et al*, 1983; TRICK *et al*, 1988; DI LEO *et al*, 1992; RODRIGUEZ-GALIERO *et al*, 2005). As alterações na sensibilidade ocorrem em frequências espaciais baixas e médias e nem sempre acompanha comprometimentos da acuidade visual (HYVÄRINEN *et al*, 1983). Funções de sensibilidade ao contraste cromático mostraram perdas no eixo azul-amarelo (RODRIGUEZ-GALIERO *et al*, 2005).

Fong *et al* (2004) reportam que a retinopatia diabética causada por diabetes é a principal causa de cegueira adquirida em adultos com idade variando entre 24 e 70 anos. A incidência é particularmente alta nas duas primeiras décadas da doença onde quase a

totalidade de pacientes com diabetes tipo 1 e mais de 60% de pacientes com diabetes tipo 2 desenvolvem complicações visuais devido retinopatia diabética. Portanto, a duração do diabetes corresponde a um forte fator intensificador do desenvolvimento e progressão da retinopatia (KLEIN *et al*, 1984).

Assim, o diabetes pode danificar neurônios, a glia e tecidos vasculares dentro da retina. Evidências de alterações neuronais incluem a presença de apoptoses no interior das camadas da retina e nos fotorreceptores em animais diabéticos. Essa perda de células leva a uma redução da espessura da retina, a qual foi demonstrada na histopatologia. As alterações histológicas para a retina parecem ser mais severas (KOHZAKI *et al*, 2008).

Dessa forma, o rigoroso controle glicêmico, bem como o tratamento precoce tem mostrado resultado no controle das complicações do diabetes. Embora os exames clínicos se concentrem na visualização das lesões da retina, no entanto, algumas alterações eletrofisiológicas têm se mostrado antes do início clínico da retinopatia. Assim, uma avaliação eletrofisiológica é de suma importância na avaliação de pacientes diabéticos (HANCOCK & KRAFT , 2006).

Luu (2008) propôs em seus estudos que os neurônios e a vasculatura da retina estão envolvidos na patogenia da retinopatia diabética, comprometendo principalmente estruturas neurais nas camadas médias e internas da retina, Sendo o ERG uma ferramenta de grande auxílio na avaliação dessas alterações, antes da retinopatia diabética ser detectada clinicamente. As alterações mais encontradas são a redução na amplitude e aumento do tempo implícito do potencial oscilatório, bem como a redução da amplitude da onda b, no entanto algumas pesquisas mostram alterações na onda a.

Da mesma forma Wu (2000) mostrou que outras patologias podem contribuir para o agravamento do quadro já instalado do diabetes, comprometendo ainda mais a função fisiológica de hormônios como é o caso da insulina, doenças endócrinas como o hipotireoidismo podem acarretar na exacerbação dos sintomas do diabetes.

1.2. Hipotireoidismo

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

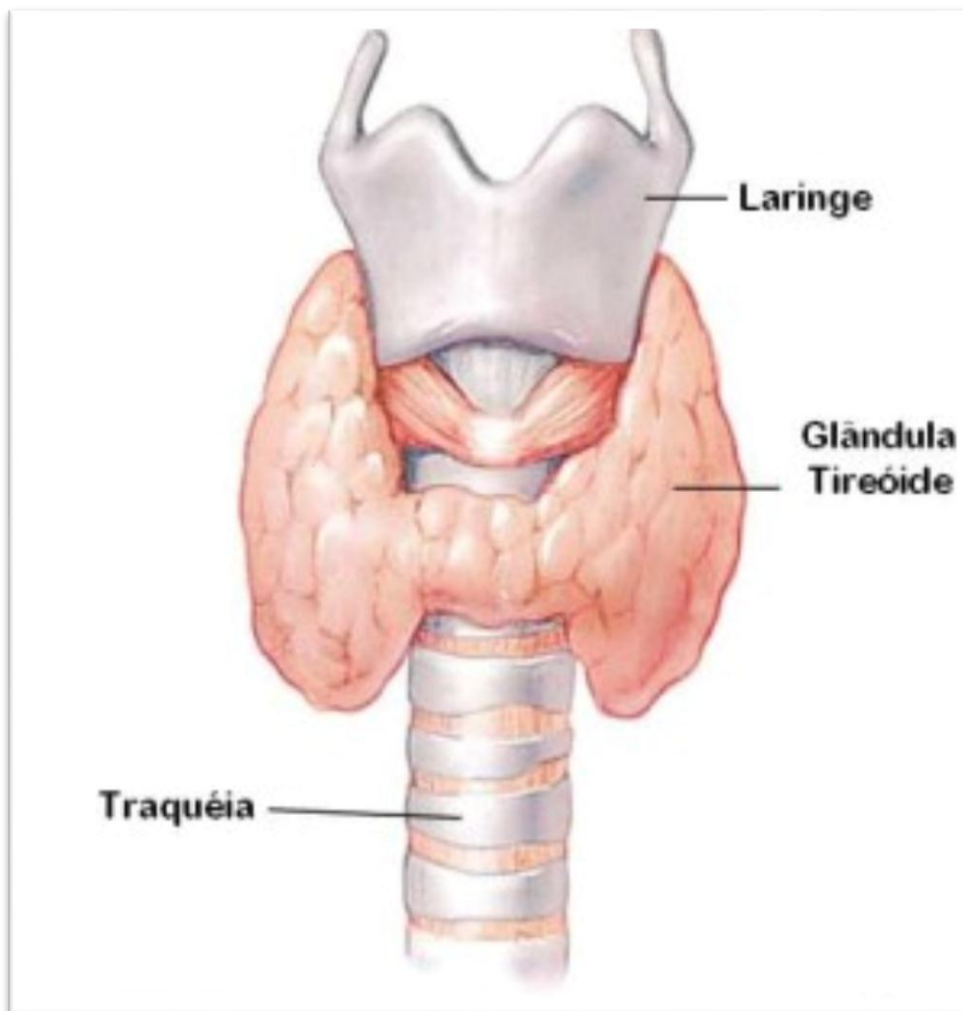


Figura 1. Desenho esquemático da disposição da glândula tireoide abaixo da laringe e acima da traquéia (BOGLIOLLO & BRASILEIRO FILHO, 2000).

Essa glândula constitui a fonte de dois hormônios fundamentalmente diferentes. Os hormônios de iodotironina incluem a tiroxina (T4) e a 3,5,´- triiodotironina (T3); esses hormônios são essenciais para o crescimento e o desenvolvimento normais e desempenham importante papel no metabolismo energético. A glândula secreta mais a tiroxina, no entanto a triiodotiroxina é quatro vezes mais potente que a tiroxina. O outro produto secretor conhecido da tireoide, a calcitonina, é produzido pelas células parafoliculares (BOGLIOLLO & BRASILEIRO FILHO, 2000).

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

O efeito geral do hormônio da tireoide é o de causar transcrição nuclear de grande número de genes. Como consequência, em virtualmente todas as células corporais ocorre aumento de grande número de enzimas proteicas estruturais, proteínas transportadoras e outras substâncias. O resultado final disso é um aumento generalizado da atividade funcional em todo o corpo (BOGLIOLLO & BRASILEIRO FILHO, 2000).

A função tireoidiana é controlada por um complexo sistema neuroendócrino, que envolve o eixo hipotálamo-hipófise-tireoide. 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).

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).

Assim, 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 (Figura 2) (FEKETE *et al.*, 2001).

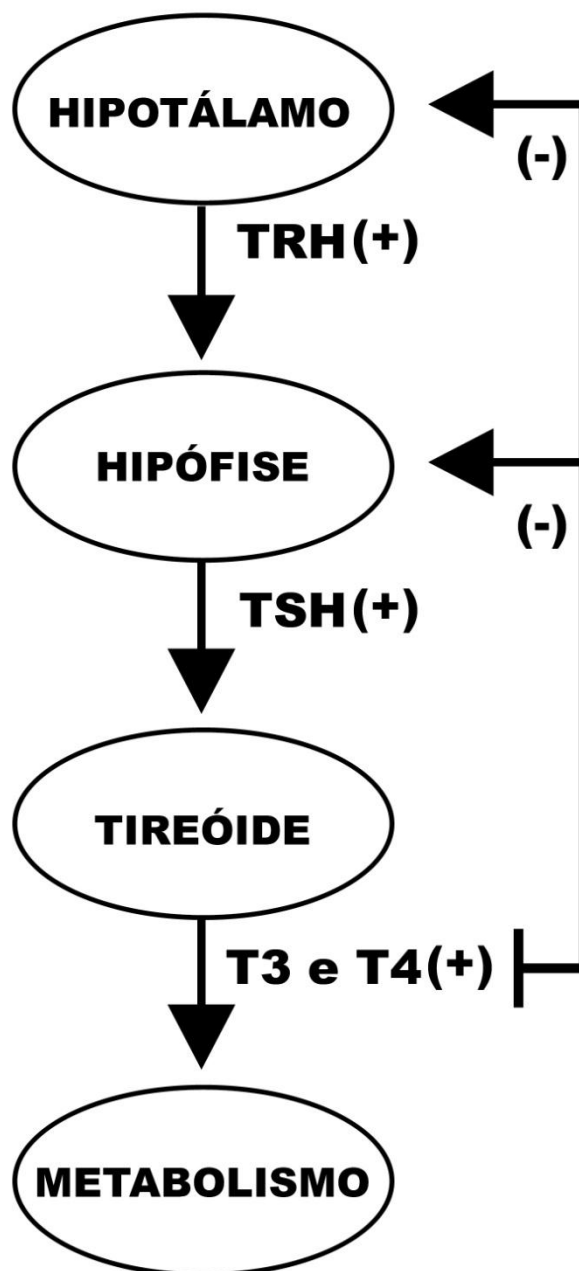


Figura 2. Esquema para elucidação do controle neuroendócrino da glândula tireoide, mostrando a influência do hipotálamo na liberação de TRH estimulando positivamente a hipófise na liberação de TSH estimulando positivamente a tireoide na liberação de T3 e T4 para realizar suas devidas funções, da mesma forma o esquema mostra o braço de alimentação negativa que o T3 e T4 exercem sobre o hipotálamo e a hipófise. T4 (tiroxina); T3 (3,5,,- triiodotironina); TSH (Hormônio estimulante da tireoide); TRH (Hormônio liberador de tireotrofina).

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).

O primeiro a reportar o que hoje conhecermos por hipotireoidismo foi William Withey Gull em 1874, que reconheceu a atrofia da glândula em determinados pacientes que apresentavam sintomas como, aumento de peso e cansaço excessivo (LINDHOLM & LAURBERG, 2011).

A partir daí, uma série de pesquisas foi realizada 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 (MOURA *et al.*, 1996; KOK *et al.*, 2001).

Hoje, o hipotireoidismo é de longe a doença mais comum da tireoide na população adulta e é mais comum em mulheres mais velhas. Geralmente tem origem auto-imune, e é chamado de hipotireoidismo atrófica primária ou tireoidite de Hashimoto. Pode ter também problemas secundários com a tireoide devido terapia com iodo radioativo ou cirurgia de tireoide. Raramente, distúrbios do hipotálamo ou hipófise podem resultar em hipotireoidismo secundário (WU, 2000).

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).

A sintomatologia dessa patologia está associada a sonolência excessiva; fadiga; lentificação muscular; aumento do peso corporal, diminuição da frequência cardíaca; mixedema (infiltração edematosa em todo o corpo); fala lenta e rouca, dismnésias (alterações da memória); lentidão dos reflexos; pele seca; maior sensibilidade ao frio; obesidade e ganho de peso; depressão; anemia; metabolismo lentificado; colesterol elevado; e entre outros. Todos eles atribuídos à diminuição ou ausência dos hormônios tireoidianos (BURMEISTER *et al.*, 2001).

Tendo em vista, a importância desses hormônios no desenvolvimento do sistema nervoso, para isso todas as isoformas dos receptores tireoidianos vão estar presentes durante o desenvolvimento e na vida adulta na retina de roedores (AZADI *et al.*, 2002). A presença do receptor tireoidiano Beta 2 (TR β 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).

Pessoa *et al* (2008), realizaram ERG em seus animais e concluíram que a diferenciação dos cones UV e M depende da quantidade de hormônio da tireoide durante o desenvolvimento em camundongos, e ainda evidenciaram a necessidade da integridade dos receptores tireoidianos, principalmente o TR β , para que haja a integridade da resposta eletrofisiológica da retina.

1.3. Diabetes e Hipotireoidismo

Tendo em vista que o diabetes e doenças envolvendo a tireoide são as patologias endócrinas mais comuns, assim os pacientes diabéticos têm uma maior prevalência de distúrbios da tireoide em comparação com a população normal. Pois pacientes com uma doença auto-imune órgão-específica têm risco de desenvolver outras doenças auto-imunes, como é o caso do hipotireoidismo. Assim, cerca de 30% dos pacientes diabéticos tipo 1 do sexo feminino têm doenças da tireoide. A taxa de tireoidite pós-parto em pacientes diabéticos é três vezes maior que em mulheres normais. Uma série de relatórios indicaram também uma maior prevalência de distúrbios da tireoide em pacientes diabéticos tipo 2 (WU, 2000).

Queiroz (2008) em estudos mostrou que o diabetes tipo 1 está associado à doença auto-imune da tireoide (AIT), doença celíaca (CD), doença de Addison (AD) e outras doenças auto-imunes. Dessa forma, os distúrbios metabólicos do diabetes mellitus interferem na função da glândula tireoide, assim como as disfunções desta influenciam o metabolismo de carboidratos, gordura e proteínas. Mais recentemente, têm surgido evidências de que o T3, sinergicamente com a insulina, influenciariam a expressão gênica de enzimas do metabolismo da glicose e dos lipídios. Ainda, o DM tipo 1, que é uma doença autoimunológica, tem uma associação maior com outras resultantes do mesmo processo, principalmente com a tireoidite de Hashimoto (SOUZA, 2005).

Pacientes com DB do tipo 1 podem apresentar auto-anticorpos contra diversos antígenos da célula beta pancreática, bem como para antígenos da tireoide, adrenais e células parietais do estômago, dentre outros (SOUZA, 2005).

Wu (2000), relata que a disfunção da tireóide é comum em pacientes diabéticos e podem produzir distúrbios metabólicos significativos. Portanto, o rastreamento regular de anormalidades da tireóide em todos os pacientes diabéticos vai permitir o tratamento precoce de disfunção tireoidiana.

1.4. Fisiologia Visual

Durante o processo evolutivo os animais desenvolveram conjuntos de células que apresentavam sensibilidade à luz. Muitos destes também adquiriram percepção cromática, que lhes permitiram 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).

Assim, a citoarquitetura da retina está organizada da camada mais externa para a mais interna (Figura 3), em: epitélio pigmentar (envolve os segmentos externos dos fotorreceptores promovendo a nutrição dessas células e contínua reciclagem dos segmentos externos); camada de segmentos externos dos fotorreceptores; camada nuclear externa (possui os corpos celulares dos fotorreceptores); camada plexiforme externa (onde os fotorreceptores estabelecem sinapses com as células bipolares e horizontais); camada nuclear interna (contém os corpos celulares das células horizontais, bipolares, amácrinas e núcleo das células de Müller); camada plexiforme interna (onde bipolares e amácrinas estabelecem contato sináptico com as células ganglionares); camada de células ganglionares (CAJAL, 1972; WÄSSLE, 2004).

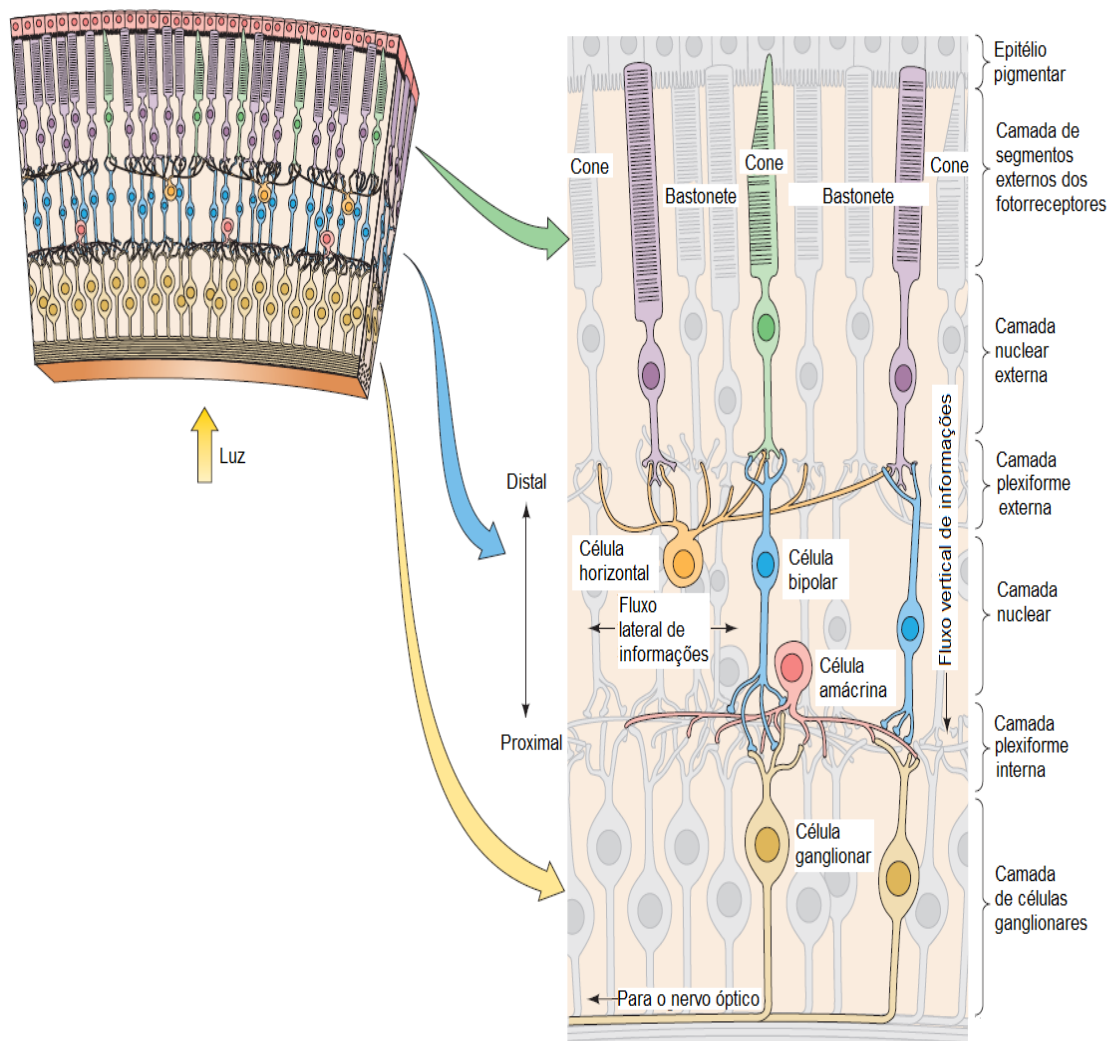


Figura 3. Organização celular da retina, mostrando a disposição das células em lamina. Disposição de externa para interna: epitélio pigmentar; camada do fotorreceptores; camada plexiforme externa com as sinapses das células bipolares e horizontais com os fotorreceptores; camada plexiforme interna das sinapses das células bipolares com as células ganglionares (Adaptado de PURVES, 2004).

A retina é a camada de tecido ocular, que converte a luz em códigos neurais transmitidos para o cérebro. Este processo é iniciado por dois tipos principais de fotorreceptores, bastonetes e cones, que se distinguem em vários aspectos, tais como: morfologia; tipo de fotopigmento; a distribuição na retina; e padrão de ligações sinápticas. Estas propriedades refletem o fato de que os sistemas de bastonetes e do cone são especializados para diferentes aspectos da visão. O sistema de bastonetes tem uma baixa resolução espacial, mas é extremamente sensível à luz de modo que é especializado para a sensibilidade à custa da resolução (BURN, 2007).

Por outro lado, o sistema de cone tem uma elevada resolução espacial, mas é menos sensível à luz que os bastonetes (BURN, 2007). As diferenças entre características morfológicas e bioquímicas dos diferentes tipos de fotorreceptores permitem mapear a distribuição espacial dos cones e bastonetes em toda a retina. Este tipo de mapeamento já revelou, por exemplo a existência de uma área central com maior número de cones e menor densidade de bastonetes. Essa área é chamada de centro visual fotópico altamente especializado no primata, a fóvea, com exclusão total ou parcial de bastonetes (SZÉL, 2000).

Os cones contém o fotopigmento opsina e apresentam segmento externo em forma cônica, mais curto e estreito que os bastonetes, são menos sensíveis à luz e ativados em condições de iluminação superior à que ativa os bastonetes, ou seja, são necessários mais fótons para ativá-los. São responsáveis pela visão fotópica ou diurna e visão de cores (FU; YAU, 2007).

Na retina de mamíferos podem-se encontrar até três tipos distintos de cones, que possuem sensibilidade máxima a diferentes comprimentos de onda. Em primatas, por exemplo, existe a presença dos seguintes cones: Cones S, (“*short wavelength-sensitive*”), sensíveis a comprimento de ondas curtos, com picode absorção de luz em comprimentos de onda situados na faixa de 420 nm; cones M, (“*middle wavelength-sensitive*”), que demonstram sensibilidade a comprimento de ondas médios, com pico na faixa de 534 nm; e os cones L, (“*long wavelength-sensitive*”) maximamente sensíveis aos comprimentos de onda longos, na faixa de 564 nm (WÄSSLE & BOYCOTT, 1991; KOLB, 2004).

Já os bastonetes contém como fotopigmento a rodopsina e apresentam segmento externo alongado com muitos discos membranosos, têm alta sensibilidade à luz com

baixo limiar de ativação, e são capaz de detectar um único fóton, mas têm lenta resolução temporal, ou seja, não são bons na detecção de objetos em movimento rápido. Atuam principalmente na visão escotópica ou noturna (em baixas condições de iluminação) e acromática (FU; YAU, 2007).

Esses dois tipos fotorreceptores fazem a conversão da estimulação luminosa em resposta eletroquímica, através de um processo chamado fototransdução, o mecanismo de ambos os fotorreceptores é semelhante, iniciando com ativação do pigmento fotossensível rodopsina ou opsina presente nos segmentos externos dos fotorreceptores. Com a ativação do pigmento que muda sua isomeria passando para a forma *all-trans* que por sua vez ativa a transducina, uma proteína G localizada na membrana do segmento externo dos fotorreceptores, a qual ativa a fosfodiesterase (PDE), enzima que hidrolisa o segundo mensageiro guanosina monofosfato cíclica (GMPc), diminuindo suas concentrações no fotorreceptor, o que induz o fechamento dos canais de cátions ativados por GMPc, interrompendo a entrada de íons Na⁺, gerando hiperpolarização graduada do fotorreceptor. Todo esse processo é seguido pelo fechamento dos canais de cálcio no terminal sináptico da célula, e consequente diminuição da liberação de glutamato na sinapse (BURNS, 2007).

Apartir daí, os fotorreceptores transmitem informações para as células bipolares da retina e para as células horizontais. A diferença marcante entre os circuitos de bastonetes e cones é o grau de sua convergência. Cada célula bipolar de bastonetes é conectada por uma série de bastonetes, e muitas dessas células bipolares se conectam a uma dada célula amacrina. Em contraste, o sistema de cone é muito menos convergente. Assim, cada uma das células ganglionares da retina que domina a visão central recebe a entrada a partir de um único cone. Essa maior convergência dos bastonetes, proporciona a essas células uma melhor detecção da luz. No entanto, tal convergência também reduz a resolução espacial do sistema de bastonetes (MUSTAFI, 2009).

Logo após todo esse processo, as células bipolares, por sua vez, transmitem os sinais para as células ganglionares, de maneira direta ou através de conexões com as células amácrinas. As células ganglionares geram potenciais de ação conduzidos pelo nervo óptico, formado pelos axônios dessas células, para os centros de processamento visual no cérebro (DACEY, 2000; GEGENFURTNER; WÄSSLE, 2004).

1.5. Fisiologia visual dos ratos

Há diferenças marcantes entre a retina de humanos e de ratos. Dentre elas está principalmente a quantidade de cones e bastonetes, tendo em vista que o rato é um animal noturno, apresenta maior número de bastonetes, aproximadamente 99%, essa maior densidade de bastonetes é necessária em condições escópicas, essencial para sua sobrevivência em seu habitat composto de pouca luminosidade. A distribuição espacial de cones e bastonetes é relativamente uniforme por toda a retina, e não contém uma região delimitada com mais cones, como a fóvea, presente nos humanos (SZEL; ROHLICH, 2000).

A discriminação de cores na retina de mamíferos não primatas é feita em geral por dois tipos diferentes de cones com pigmentos sensíveis a comprimentos de onda médios (cones M) e cones sensíveis aos comprimentos de onda curtos (cones S ou UV). Nos primatas há um terceiro tipo de cone sensível a comprimento de onda longo (cones L), o qual surgiu a partir dos cones M (SZÉL, 2000; JACOBS, 1991). No rato foram encontrados cones UV com sensibilidade espectral máxima em 358 nm e cones M com sensibilidade máxima em 510 nm (Figura 4) (JACOBS *et al.*, 2001).

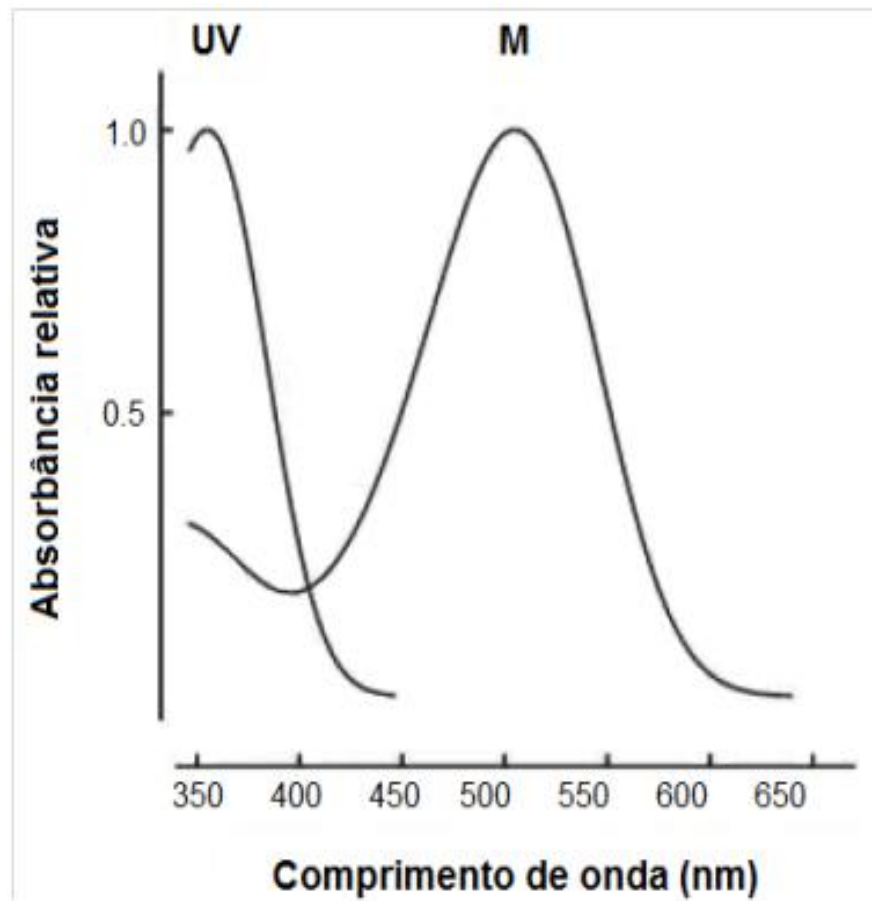


Figura 4. Curvas de absorção espectral dos diferentes tipos de cones UV e M encontrados na retina de ratos (Adaptado de JACOBS; FENWICK; WILLIAMS, 2001).

Em relação ao desenvolvimento dos fotorreceptores da retina do rato, sabe-se a partir de investigações em camundongo, animal próximo filogeneticamente ao rato, que inicialmente surgem os bastonetes que emergem centralmente na retina no primeiro ou segundo dia pós-natal, e posteriormente surge na periferia. Os primeiros cones a aparecerem são do tipo UV no quarto ou quinto dia pós-natal, o último a aparecer são os cones do tipo M, no nono ou décimo dia (SZÉL, 1993).

A retina do rato é semelhante à da maioria dos mamíferos, com densidades extremamente baixas de cone S ou UV, nas primeiras semanas, após as outras 2 semanas atingi o pico de desenvolvimento e diminuem em número. Os cones M que emergem um pouco mais tarde, também mostram um aumento na densidade, no entanto, eles atingem um patamar sem um pico agudo e permanecem relativamente elevados ao longo da vida deste roedor. Notavelmente, a queda acentuada dos cones S ou UV coincide com o aumento do número de cones M, enquanto que a densidade celular total de cone não está sujeita a mudanças consideráveis (JACOBS, 2001).

As outras diferenças são relativas ao número e a morfologia das células, às células horizontais em humanos há dois tipos morfologicamente distintos, em ratos há apenas um tipo, chamadas células horizontais do tipo B (CHU; HUMPHREY; PEICHL; GONZÁLEZ-SORIANO, 1994). Na retina de ratos há nove tipos morfologicamente diferentes de células bipolares de cones e um tipo de célula bipolar de bastonete (Figura 5) classificados com base no padrão das ramificações e no nível da estratificação das terminações dos axônios na camada plexiforme interna (EULER; WÄSSLE, 1995).

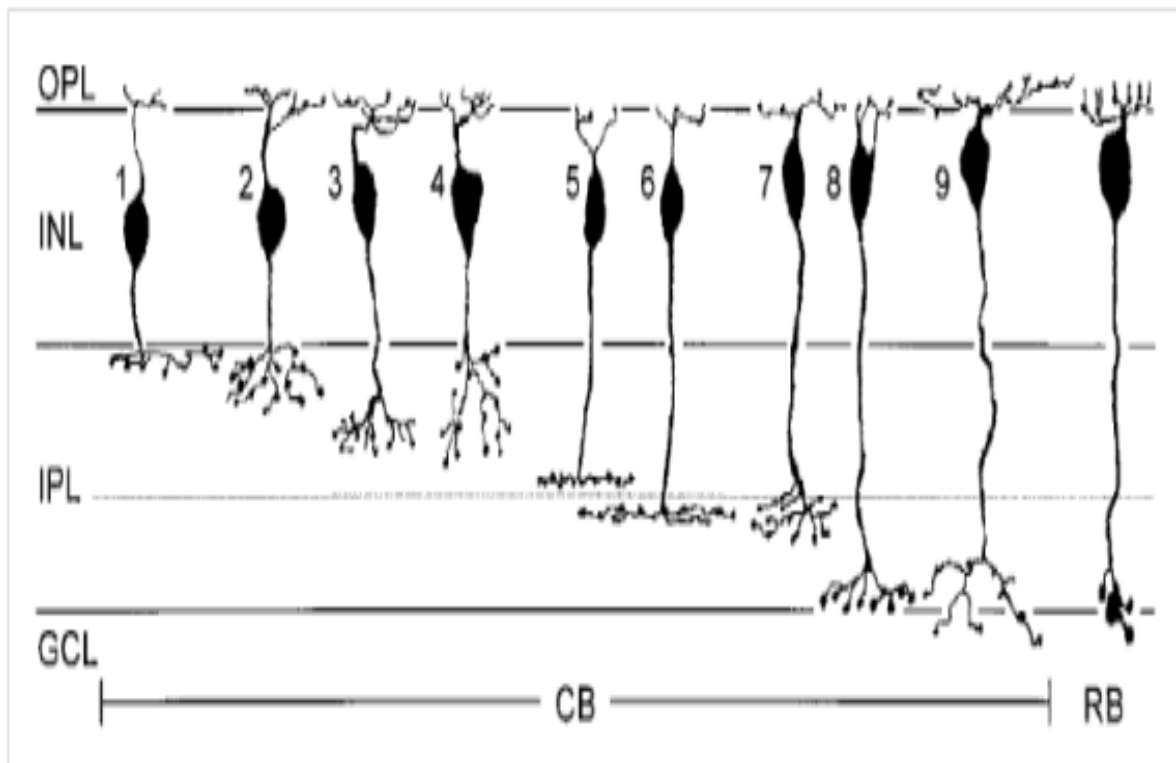


Figura 5. Disposição das células bipolares na retina de ratos. Nove (1-9) são células bipolares de cones (CB) e uma é célula bipolar de bastonetes(RB). OPL: camada plexiforme externa, INL: camada nuclear interna, IPL: camada plexiforme interna, GCL: camada de células ganglionares (EULER; WÄSSLE, 1998).

A despeito das diferenças entre a retina de roedores e humanos, a utilização de ratos como modelos biológicos é eficaz, tendo em vista a ampla utilização desses animais no meio científico, e mais especificamente nessa pesquisa devido à aproximação da fisiologia visual do rato com a dos mamíferos em geral, principalmente os humanos. Outro ponto de grande relevância é a facilidade do manejo e reprodução. Assim esse modelo têm sido de grande auxílio para a compreensão da fisiopatogenia de algumas patologias.

1.6. O Eletrorretinograma

O eletrorretinograma (ERG) de campo total é o registro elétrico da retina em resposta da retina a um estímulo luminoso que gera estimulação simultânea em todo o campo visual permitindo uma avaliação das células de toda retina. Esse teste é utilizado como uma ferramenta no mundo inteiro para avaliar a fisiologia das doenças oculares em pacientes humanos e em animais de laboratório utilizados como modelos de doenças da retina (HOLMGREN, 1980; MARMOR; *et al.*, 2009).

A eletrorretinografia de campo total é usada como exame eletrofisiológico ocular e compreende cinco protocolos padronizados pela ISCEV (International Society for Clinical Electrophysiology of Vision) (Marmor *et al.*, 2004): (1) resposta devida à função dos bastonetes no olho adaptado ao escuro; (2) uma resposta máxima no olho adaptado ao escuro; (4) uma resposta devida à função dos cones no olho adaptado ao claro; (3) potenciais oscilatórios, devidos à atividade das camadas mais internas da retina; (5) respostas provocadas por estímulos periódicos de alta frequência (*flicker*) (Figura 6).

A descoberta de que a onda-a origina-se da atividade de células fotorreceptoras é atribuída a Brown e Watanabe (1962), os quais isolaram a onda-a a partir do grampeamento da artéria retiniana central em macacos, procedimento que provoca anoxia nas células da retina interna (células bipolares, horizontais, amácrinas e ganglionares). O grampeamento da artéria central não afeta as células fotorreceptoras as quais são nutridas via circulação coroidal; dessa maneira atribuiu-se o surgimento da onda-a a atividade dos fotorreceptores.

A onda-b é o componente mais sensível do ERG, e resulta da atividade de células bipolares tipo-ON e células de Muller. A onda-b resulta da liberação de íons potássio (K^+) na camada plexiforme externa pelas células bipolares na presença da luz e a captação do íon K^+ pelas células de Muller (MILLER & DOWNLING, 1970).

Atualmente, um índice tem sido utilizado para a avaliação da integridade funcional da retina. Este índice quantifica a relação entre a onda-a e a onda-b obtidas na resposta máxima adaptada ao escuro (PERLMAN, 1983). Tal análise é baseada na fisiologia da retina e na origem do ERG, pois, sabendo-se que a onda-a reflete as atividades de fotorreceptores e que a onda-b é originada de neurônios pós-sinápticos, ela pode ser utilizada como um indicador funcional da integridade retiniana. Em patologias que afetam os fotorreceptores a onda-a é de menor amplitude, o que acarreta como consequência a redução da onda-b, entretanto a relação b/a é frequentemente normal. Alterações da transmissão de sinais originadas na camada plexiforme externa irão causar uma relação b/a anormal (PERLMAN, 1983). Em sujeitos normais, a relação b/a é maior do que 2 (dois). Quando este valor apresenta valores menores do que 1 (um), recebe o nome de ERG negativo (PASCUAL *et al.*, 1998; PERLMAN, 1983; PILLERS, 1999).

Os potenciais oscilatórios (PO) são componentes adicionais do ERG, os quais foram primeiramente observados em 1937 por Granit e Münshterhjelm, como duas oscilações (O1 e O2) na região ascendente da onda-b. Posteriormente em 1953, Cobb e Morton observaram que estas duas oscilações correspondiam, após a filtragem do sinal, a quatro ou seis pequenas ondas do ERG registrado no olho humano. Estudos posteriores mostraram que os POs são indicadores mais sensíveis de função retiniana central do que periférica, refletindo principalmente a atividade de células das regiões para- e perifoveal. Esta condensação da somação dos sinais dos POs (Figura 7) para as regiões centrais é, possivelmente, mediada pelas células amácrinas. Estudos em pombos e macacos revelaram que os POs são gerados na camada plexiforme interna, presumivelmente pelos axônios terminais das células bipolares, pelos processos das células amácrinas e pelos dendritos das células ganglionares. Estruturas mais profundas da retina como fotorreceptores e células horizontais muito provavelmente não participam nos POs (WACHTMEISTER, 1980).

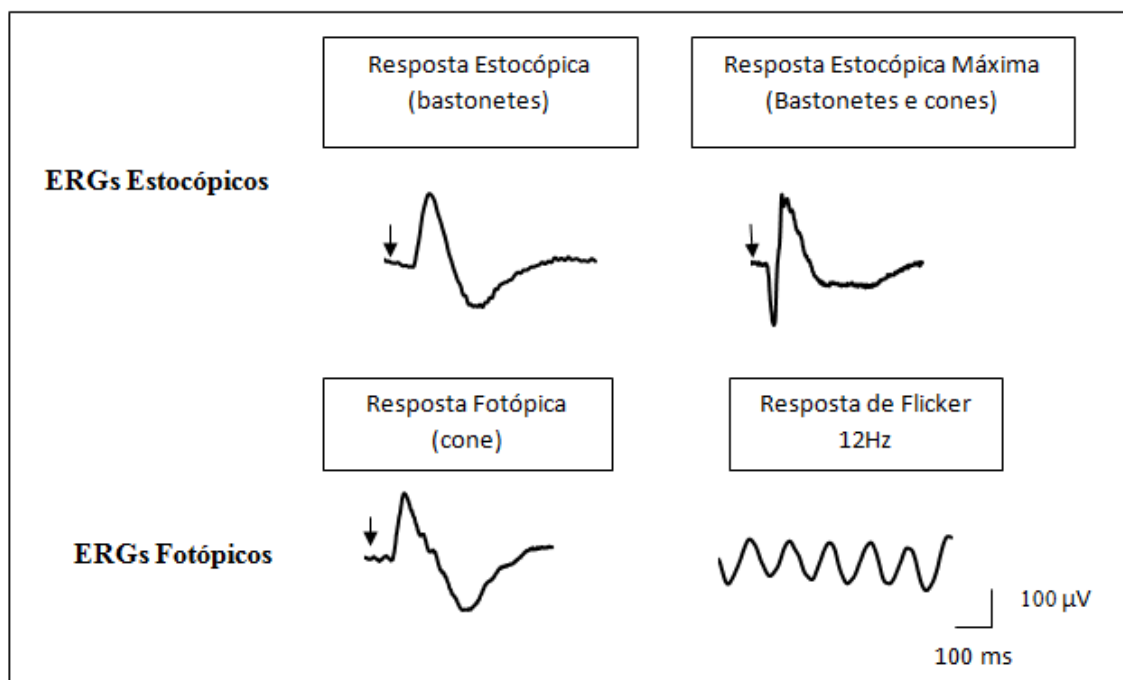


Figura 6. Respostas do ERG avaliadas no laboratório de Neurofisiologia Eduardo Oswaldo Cruz – LNEOC, seguindo padrão do ISCEV. As setas indicam o início do estímulo. Escala Amplitude $100 \mu\text{V}$ x Tempo 100 ms , com exceção com flicker.

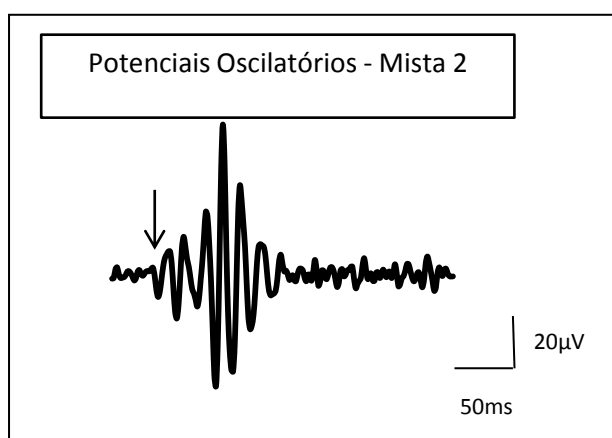


Figura 7. Resposta dos Potenciais oscilatórios, seguindo padrão do ISCEV. A seta indicam o início do estímulo. Escala Amplitude $20 \mu\text{V}$ x Tempo 50 ms .

2. OBJETIVO

2.1. GERAL

Investigar a evolução do comprometimento retiniano em modelos experimentais de ratos com diabetes e hipotireoidismo e em modelos com as doenças separadamente.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validação do modelo experimental de ambas as patologias, diabetes e hipotireoidismo.
- Determinar durante o desenvolvimento se o diabetes e hipotireoidismo juntos, comprometem mais a visão dos ratos do que separadamente;
- Analisar, entre o sistema de cones e bastonetes, qual é mais afetado por ambas as doenças;
- Investigar as possíveis alterações funcionais em neurônios de segunda ordem na fisiologia da retina durante ambas as doenças.

3. METODOLOGIA

3.1. Amostra

Foram utilizados 50 ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*), com dois meses de idade, pesando entre 80 a 120 gramas, obtidos do biotério central do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFPA, mantidos em gaiolas plásticas medindo 41x34x16cm, distribuídos quatro animais por gaiola, com alimentação e águas disponíveis *ad libitum*, e ciclo claro/escuro de 12 horas. Todos os procedimentos de manutenção e experimentação animal foram aprovados pelo comitê de ética do Instituto de Ciências Biológicas da UFPA (CEPAE-UFPA: BIO089-12 – Anexo A).

Os animais foram divididos em quatro grupos com 10 animais cada, sendo 1 grupo controle; 1 diabéticos; 1 e hipotireoideo; e 2 grupos com ambas as patologias mudando a ordem, um grupo com o diabetes primeiro e 15 posteriores o hipotireoidismo e um grupo com hipotireoidismo primeiro e seguido do diabetes em 15 dias. A tabela 1 mostra a distribuição dos grupos.

Tabela 1. Grupos do Estudo

Grupos	Procedimentos	Número
Controle (GC)	Sem procedimentos	10 animais
Diabético (DB)	Aplicação de Aloxano	10 animais
Hipotireoidismo (HP)	Extração da Tireoide	10 animais
Diabetes + Hipotireoidismo (DB/HP)	Aplicação do Aloxano + Extração da Tireoide	10 animais
Hipotireoidismo + Diabetes (HP/DB)	Extração da Tireoide + Aplicação de Aloxano	10 animais

3.2. Modelo da Diabetes experimental

Optou-se por esse método na indução do modelo do diabetes nos animais estudados, devido à larga utilização da aloxana como agente diabetogênico. Essa droga possui citotoxicidade específica para as células β do pâncreas, levando a morte das células e a aparecimento do quadro clínico de diabetes mellitus tipo I (LENZEN, 2008).

O efeito da droga após a injeção é uma liberação maciça de insulina, presumidamente em virtude do influxo de íons cálcio ao citosol das células β . Esse evento ocorre rapidamente, e é seguido por uma completa supressão da resposta das ilhotas pancreáticas à glicose, devido à necrose das células β (SZKUDELSKI, 2001).

Muitos fatores interferem na ação da Aloxana, entre eles estão a dose e a via de administração da droga. Por isso, foi escolhida a via intraperitoneal por apresentar segurança a manutenção da vida do animal, bem como uma dose de 200 mg/Kg a 2%, diluída em cloreto de sódio 0,9%, para evitar a necessidade de uma segunda dose, achamos essa dose em um projeto piloto realizado com várias doses unitárias em que os animais permanecessem vivos por 2 meses.

No 7^o dia após a aplicação, foi aferidas a taxa glicêmica de cada animal. Foi utilizado como ponto de corte o valor de glicose acima de 200 mg/dl, evidenciando o quadro de diabetes. E os animais com valores menores de 200 mg/dl foram excluídos da pesquisa.

Esse modelo foi baseado em um estudo piloto e achados na literatura, com o intuito de diminuir a mortalidade dos animais e possibilitar a manutenção dos animais vivos até o término dos experimentos totalizando 2 meses.

3.2.1. Dosagem de glicemia

No 7^o dia após a aplicação da droga foi medido o índice glicêmico em jejum de 12 horas, por processo automatizado com uso de medidor glicêmico (On Call® Plus, marca ACON Laboratories, Inc) no sangue (Figura 8). A coleta de sangue foi realizada uma leve incisão na cauda do animal para a coleta de sangue, e posteriormente realizar a

dosagem glicêmica. Esse procedimento foi realizado de 7 em 7 dias até o término da pesquisa, buscando fazer o controle glicêmico do animal.

3.3. Modelo hipotireoidismo

A escolha por esse modelo de hipotireoidismo foi devido o reconhecimento em muitos trabalhos científicos da validação do modelo com características similares ao hipotireoidismo em humanos, e por já ser realizado com sucesso em nosso laboratório.

A excisão cirúrgica da glândula tireoidea foi feita sob anestesia do animal por inoculação intraperitoneal de uma associação farmacológica de Quetamina a 10% e Xilazina a 2%, com dose de 0,1 ml/100g. Após confirmação do plano anestésico adequado para a cirurgia, com ausência dos reflexos corneal e doloroso, iniciava-se a tricotomia da face ventral da região cervical, com o auxílio do bisturi, por meio de movimentos contínuos, cortando os pelos no sentido contrário ao seu crescimento. Prosseguia-se então com a realização da antisepsia, com álcool iodado a 70%, da área exposta e, em seguida, realizava-se a incisão de 1 cm sobre a linha alba na face ventral da região cervical. O acesso à glândula tireoidea era alcançado após a dissecação sucessiva da pele, aponeurose, e rebatimento dos músculos esternocleidomastóideo, esternoióideo, omoióideo, tireoideo, possibilitando, deste modo, a exposição da traqueia e glândula tireoide. Realizava-se assim a ressecção da glândula com auxílio de pinça anatômica. Para a síntese dos diferentes planos seccionados, utilizava-se a sutura contínua do tipo chuleio simples para os planos profundos e sutura com ponto simples para a derme e a epiderme.

Após o procedimento cirúrgico, os animais foram submetidos periodicamente à limpeza, troca de gaiola e assepsia da ferida cirúrgica com álcool iodado a 70% com frequência de três vezes por semana.

3.3.1. Dosagem de T3 sanguíneo

Para confirmação do quadro de hipotireoidismo nos ratos estudados, após os experimentos, totalizando os 60 dias, os animais foram decapitados segundo as recomendações descritas em *AVMA Guidelines on euthanasia*, 2007. Foram coletadas as amostras de sangue em tubos de ensaio, mantidos em 4°C. Esperou-se por um período de 15 minutos 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 e encaminhado para o laboratório de análises clínicas. Os níveis séricos de T3 foram dosados pelo método de quimiluminescência. Os resultados que foram aceitos em nosso trabalho apresentavam concentração sanguínea de T3 inferior a 1 mg/dl, nível esse aceito pela literatura para evidenciar o quadro de hipotireoidismo experimental em ratos.

3.4. Modelo Diabetes + Hipotireoidismo

Após a aplicação do Aloxano, no 15º dia foi confirmado o quadro de diabetes e realizada a cirurgia para a retirada da glândula tireoide, com os mesmos procedimentos do grupo com hipotireoidismo somente.

3.5. Modelo Hipotireoidismo + Diabetes

Primeiramente foi realizada a cirurgia para a extração da glândula tireoide, e após 15 dias foi realizado a aplicação do Aloxano, com intuito dos animais ficarem diabetes. Essa opção para a mudança na ordem das patologias, foi para tentar mostrar se alguma patologia interferia mais que a outra inicialmente.

3.6. Campo Aberto

O campo aberto foi realizado em um aparato com formato circular com diâmetro de 83 cm e 52cm de altura, no qual o tempo de exploração foi de 3 minutos, iniciando com o animal no centro do aparato. Nesse período, o animal pode utilizar-se do espaço para realizar sua atividade exploratória e de habituação livremente. O teste foi filmado e as imagens foram analisadas utilizando o *software* X-PLO RAT 2005. O teste objetiva avaliar a atividade exploratória do animal, através da contabilização do cruzamento de quadrantes, nós dividimos o campo em 9 quadrantes (GRALEWICZ; *et al*, 2009; CALVIN HALL, 1934). Nosso objetivo com esse teste foi avaliar a movimentação, e correlacionar os resultados deste teste com os resultados do eletrorretinograma, visando mostrar que a possível diminuição das respostas do eletrorretinograma seria uma alteração propriamente visual.

3.7. Eletrorretinograma

3.7.1. Equipamentos

Todos os registros de ERG realizados neste trabalho utilizaram estímulos com flahs acromáticos produzidos por um fotoestimulador (Grass Technolgies, Modelo PS133-Plus). Os estímulos foram modulados em relação à intensidade e a frequência. Para a maioria dos testes utilizamos um flash padrão de intensidade de aproximadamente $10 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ (Tabela 2).

Será utilizado filtro de densidade neutra, que reduz a intensidade luminosa em até 2,0 unidades log. Bem como, para investigar se há dano seletivo em algum sistema específico de cones do rato serão realizados testes espectrais com o ERG, para tanto, serão utilizados filtros de cor (Model – 5CF, Grass Instruments) na faixa do azul e do verde.

Os registros das respostas foram captados com um amplificador AC (Grass Technolgies, Modelo P511) e ajustados com filtragem passa-alta de 0,3 Hz e passa-baixa de 300 Hz (Figura 9), amplificadas em 50.000 vezes e monitorados com um osciloscópio (Protek, Modelo 6510), e continuamente digitalizados em uma taxa de 1

KHz por um computador equipado com uma placa de aquisição de dados (National Instruments, Austin, TX).

Tabela 2. Padrões de respostas obtidos no ERG

Tipo de resposta	Escotópica de bastonetes	Escotópica máxima	Fotópica de cones (UV e M)	Fotópica de Flicker (12 Hz e 15 Hz)
Adaptação	Escotópica (≥ 12 h)	Escotópica (≥ 12 h)	Fotópica (10 m)	Fotópica (10 m)
Intensidade do estímulo	$<0,09$ cd.s/m ²	10, 21 cd.s/m ²	10, 21 cd.s/m ²	10, 21 cd.s/m ²
Duração do estímulo	10 ms	10 ms	10 ms	10 ms
Intervalo entre estímulos	10 s	10 s	10 s	0,2 s
Resposta	Bastonetes	Cones + Bastonetes	Cones	Cones

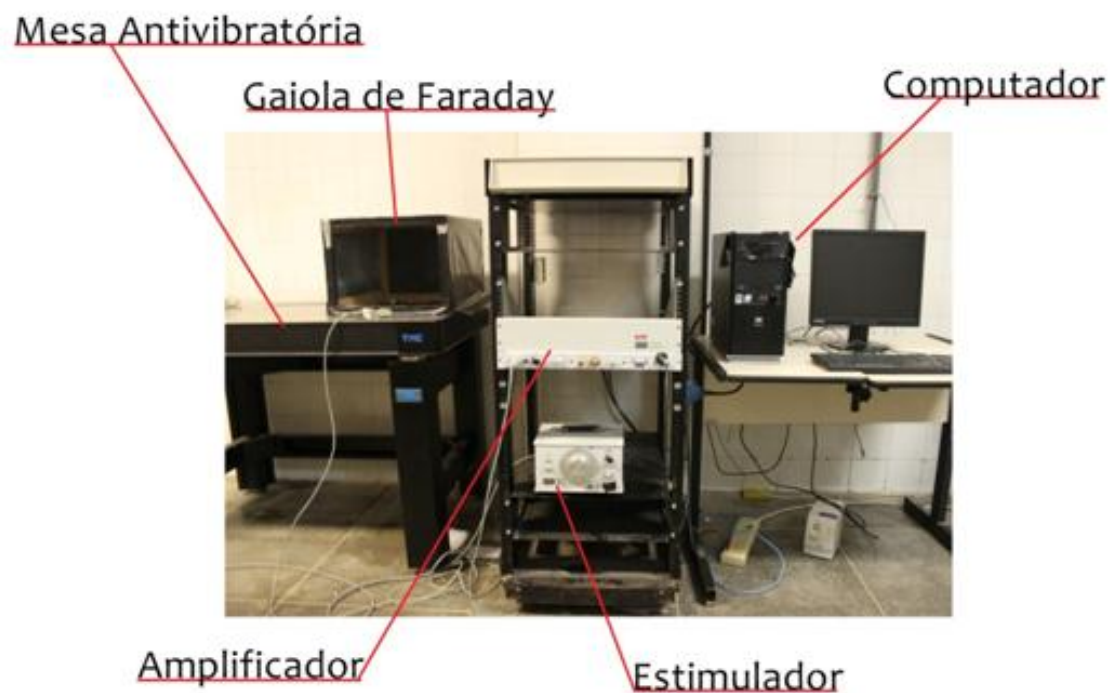


Figura 8. Disposição dos equipamentos para realização dos registros eletroretinográficos no Laboratório de Neurofisiologia Eduardo Oswaldo Cruz.

3.7.2. Eletrodos

Os eletrodos utilizados foram: eletrodo de aço tipo agulha modelo F-E3-48, posicionados na córnea (eletrodo ativo) e na pálpebra inferior (eletrodo referência); eletrodo de prata tipo disco de 6 mm, modelo F-E6SHC-12, posicionado no lobo da orelha do animal (eletrodo terra), com uma pasta eletrolítica (Ten20, D.O. WEAVER) aplicada no eletrodo, para facilitar a condução elétrica (Figura 10).

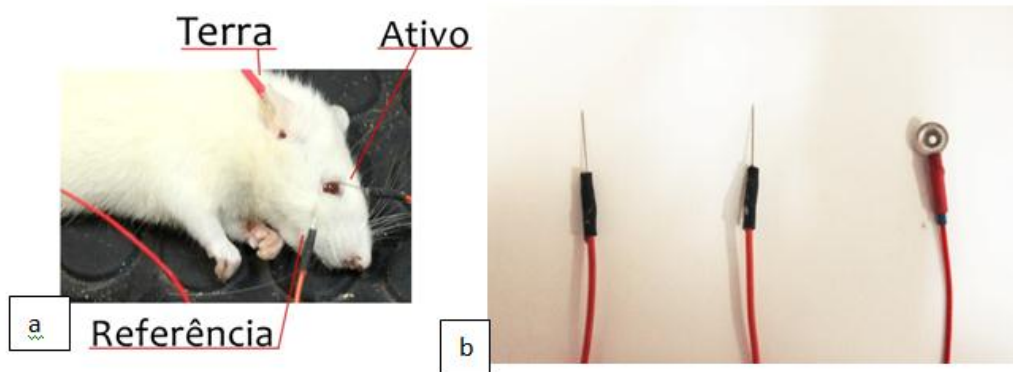


Figura 9. Posicionamento dos Eletrodos: (a) Posicionamento dos eletrodos no animal; (b) eletrodos utilizados para o registro.

O registro eletrorretinográfico foi realizado nos animais após 15 dias da confirmação de cada patologia. Os animais serão adaptados ao escuro por, no mínimo 14 horas (“overnigh”) na sala de experimentação. Dando sequencia, eles serão anestesiados com injeção intraperitoneal de quetamina e xilasina (1:3). Posteriormente o animal foi posicionado em uma gaiola de Faraday (46,5x40,3x30cm) a 30 centímetros do aparelho, com intuito de diminuir ruídos externos ao sistema, os mesmos tiveram sua pupila previamente dilatada com uma gota de colírio tropicamida a 1% (Mydriacyl Alcon®) para que o estímulo luminoso alcançasse maior área possível do tecido retiniano, e também foi utilizado um colírio com propriedade anestésica para que qualquer incômodo seja evitado, logo após os eletrodos foram posicionados e colocado o colírio de metilcelulose a 2% para proteção da superfície da córnea, com o intuito de evitar ressecamento da córnea e interferir na resposta do registro (Figura 11).

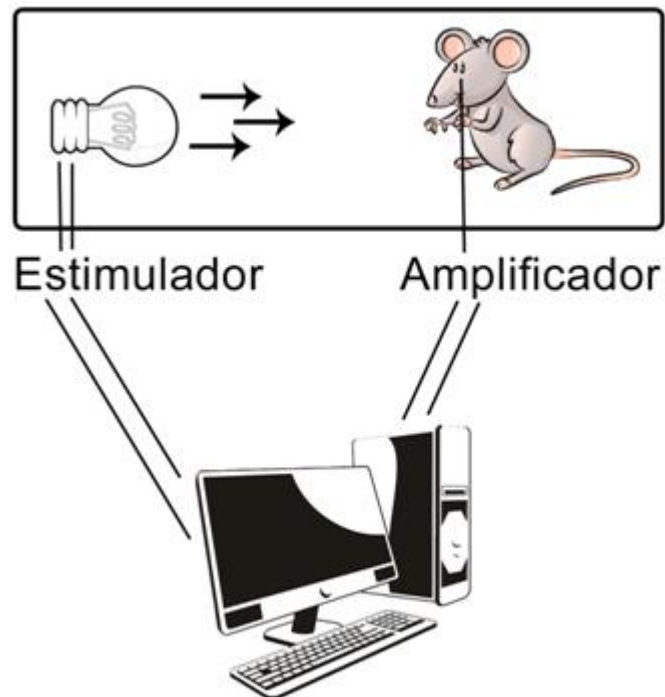


Figura 10. Esquema da obtenção das respostas eletroretinográficas.

O registro foi realizado na seguinte ordem: primeiro, com o filtro de densidade neutra, e em seguida sem filtro, caracterizando as respostas escotópicas. Após os dois registros, os animais foram adaptados ao claro por 10 minutos, para obtenção dos registros de cone isolados, com filtro azul, com o filtro verde, e flicker com frequências de 12, 15 e 20 Hz, respectivamente. Na figura 12 mostramos a sequência de adaptações e testes eletroretinográficos.



Figura 11. Protocolo da sessão dos registros de ERG.

3.7.3. Mensuração dos componentes do ERG

A resposta final do ERG em cada tipo de teste foi obtida a partir de promediação realizada com a auxílio do programa Signal 3.0. As medidas feitas nos registros obtidos foram: (1) amplitude da onda-a, medida feita da linha de base do registro até o pico máximo da onda-a; (2) amplitude da onda-b, medida entre o pico máximo da onda-a e o pico máximo da onda-b; (3) tempo implícito, medido entre o início do estímulo e o pico máximo da onda-a e onda b. Um esquema mostrando um registro do ERG e as medidas que foram realizadas é mostrado na figura 13. Antes do processamento foi realizada filtragem passa-baixa de 100 Hz (Figura 14).

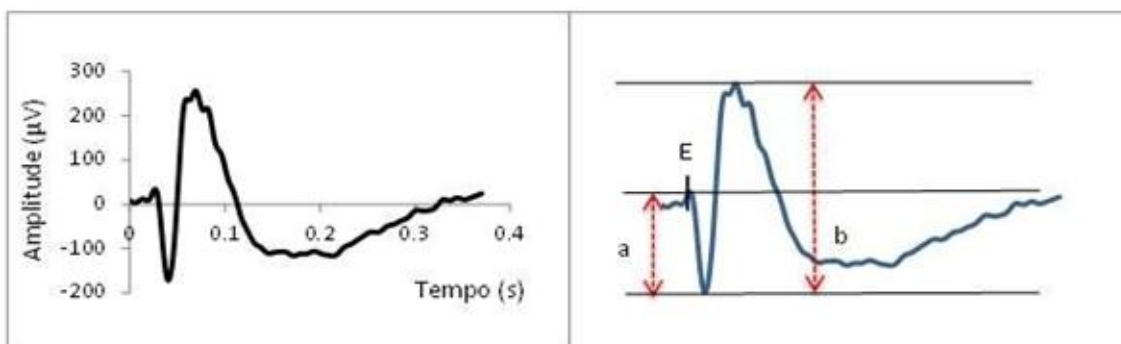


Figura 12. Padronização das medidas das respostas do eletrorretinograma.

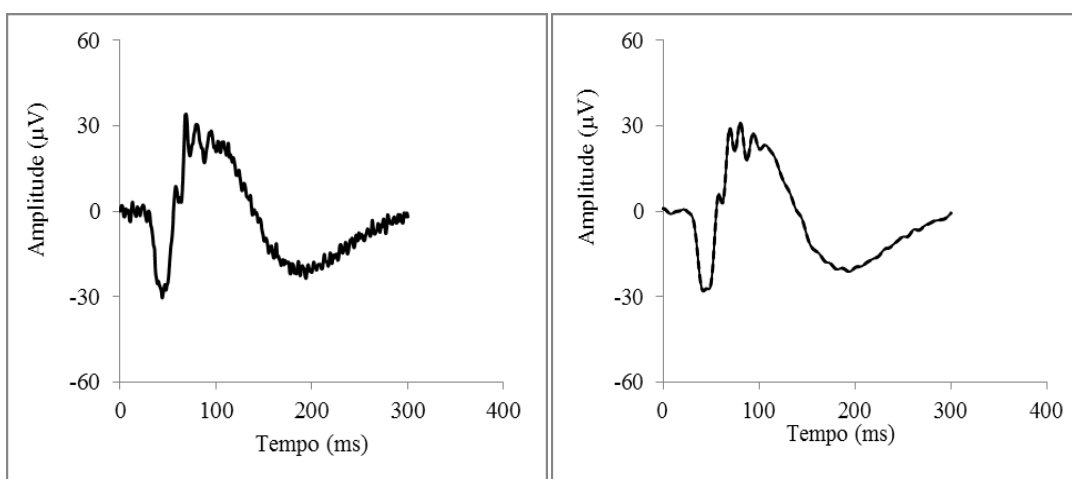


Figura 13. À esquerda, resposta escotópica máxima de um rato *Wistar*, à direita a mesma resposta filtrada com filtro passa-baixa de 100 Hz.

A análise dos potenciais oscilatórios foi realizada medindo-se a amplitude do terceiro pico: OP3 (Figura 15), o tempo implícito correspondente. Para eliminar ruído de alta frequência, as respostas foram submetidas a um filtro passa-baixa de 100 Hz, exceto para análise dos potenciais oscilatórios, cuja filtragem foi realizada com filtro passa-banda na faixa de 80 a 300 Hz.

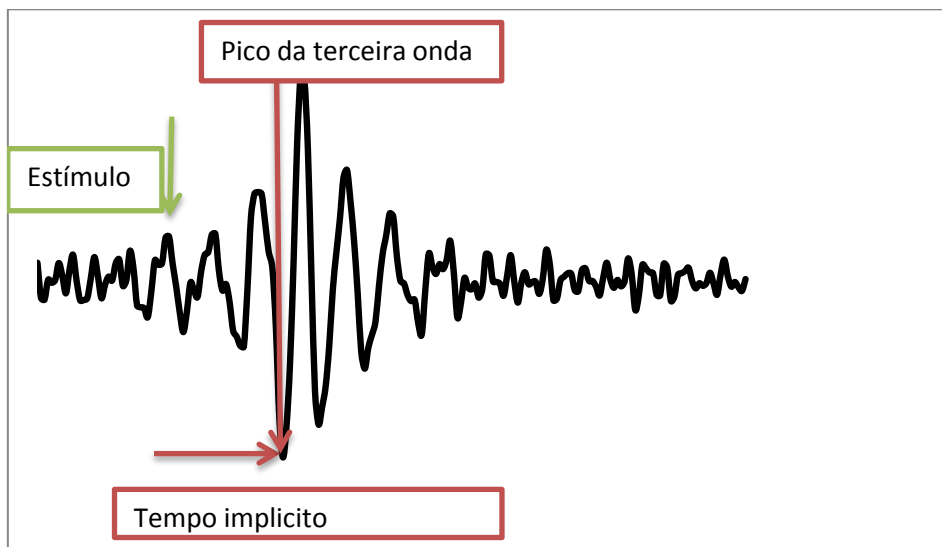


Figura14. Esquema da mensuração do potencial oscilatório

Os parâmetros temporais da resposta ao estímulo do flicker do ERG foram medidos calculando-se a amplitude pico-a-pico da onda-b de três respostas consecutivas, e obtendo-se a média dessas três amplitudes para cada animal, nas frequências de 12 e 15 Hz (Figura 16).

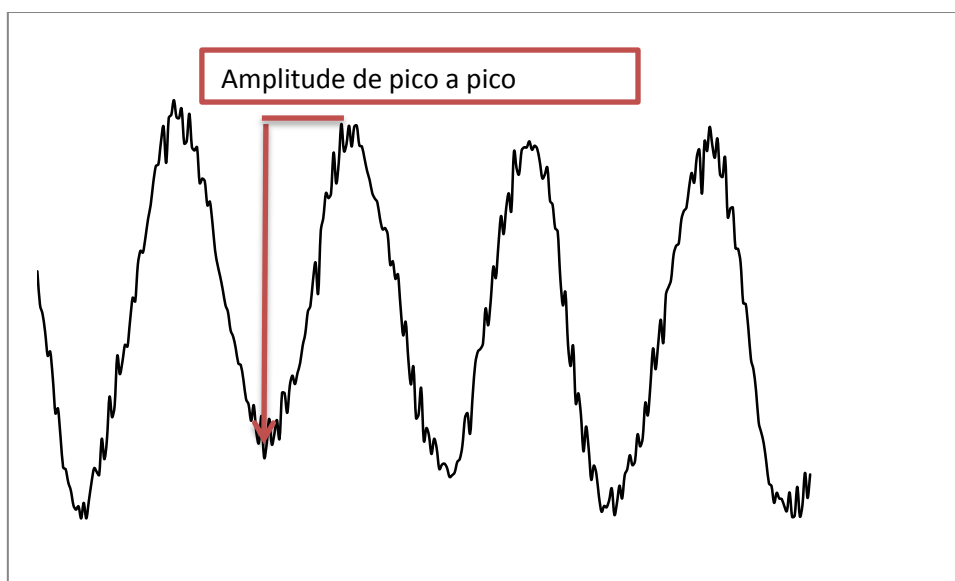


Figura15. Esquema da mensuração do Flicker de 12 Hz

3.8. Análise dos dados

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística utilizando o programa GraphPad Prism 5, onde foram determinados a média e o desvio-padrão dos grupos experimentais. Os dados foram, então, comparados pelo teste de Análise de Variância (ANOVA) um critério, seguido pelo pós-testes Bonferroni. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1. Parâmetros clínicos para caracterização do modelo experimental

A partir da análise do peso corporal, do nível hormonal e do comportamento, podemos mostrar a caracterização do modelo experimental de cada grupo estudado.

4.1.1. Massa Corporal

Os animais foram pesados nos dias dos registros eletrorretinográficos, obtendo-se as seguintes medidas:

Tabela 3. Massa corporal médias e os desvios padrão dos grupos estudados (em gramas)

	Controle	Hipotireoidismo	Diabético	Db + Hp	Hp + Dd
30 dias	194.3±5.3	214.5±4.3	197.9±1.4	216.2±8.3	218.0±6.6
45 dias	247.2±6.9	272.1±9.5	250.3±8.2	267.1±9.4	273.9±11.2
60 dias	300.7±10.8	324.6±17.9	292.0±8.8	333.9±12.5	339.4±16.6

Esses dados apresentam a evolução da massa corporal de cada grupo, mostrando que os grupos que apresentam hipotireoidismo são mais suscetíveis ao aumento na massa corporal, segundo a literatura explica a fisiologia da patologia.

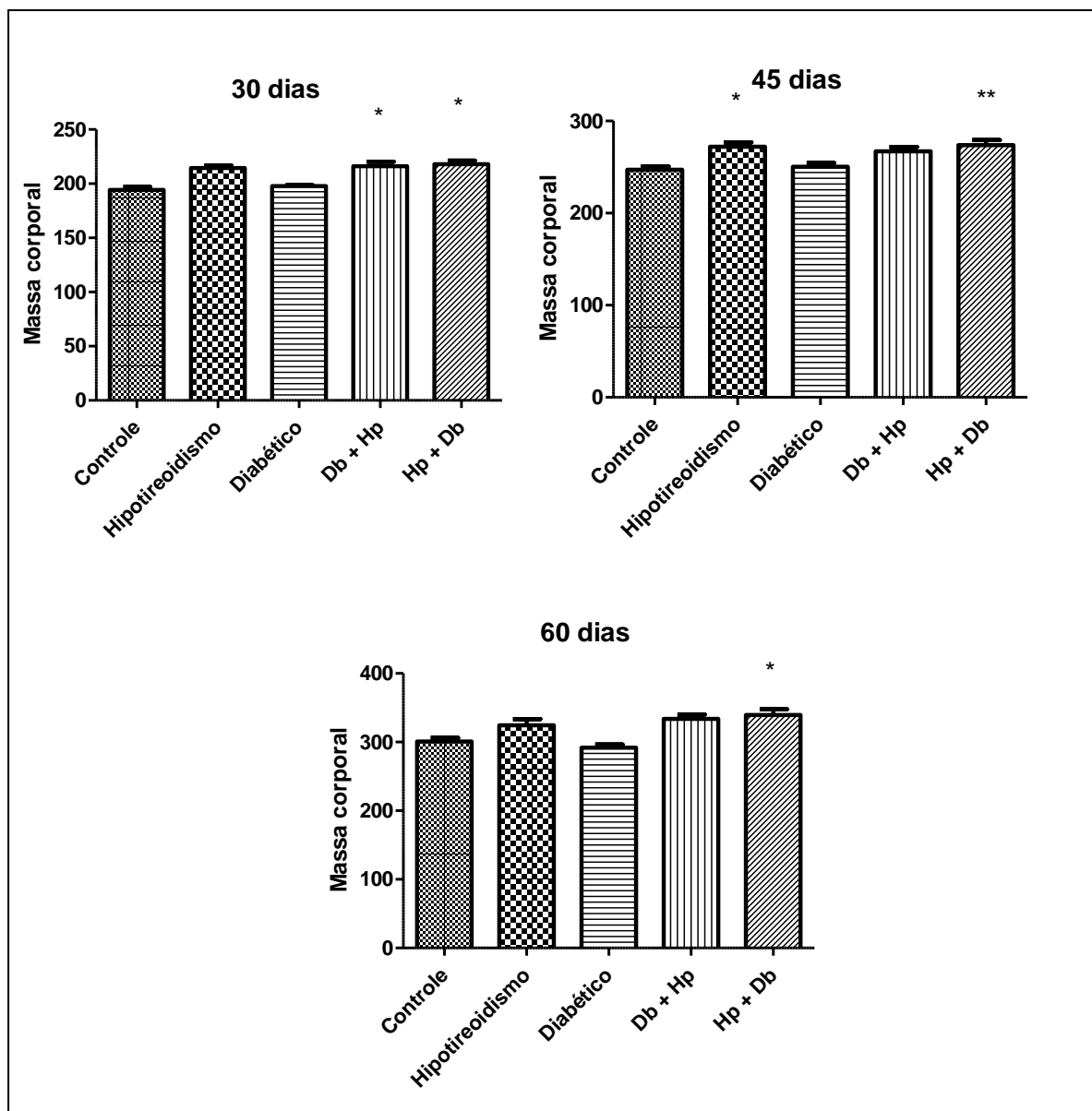


Figura 16. Massa corporal dos animais estudados em diferentes tempos (30, 45 e 60 dias). Massa corporal em gramas. O asterisco significa diferença estatística em relação ao controle, (*) quando o $p < 0.05$ e (**) quando o $p < 0.01$.

4.1.2. Níveis Hormonais

4.1.2.1. Glicose

Foi monitorada a taxa glicêmica dos animais estudados, segundo o protocolo descrito na metodologia.

Tabela 4. Médias dos valores de glicemia e os desvios padrão dos ratos antes de cada registro (em mg/dl)

	Controle	Hipotireoidismo	Diabético	Db + Hp	Hp + Db
30 dias	70.35±1.46	72.81±2.30	336.7±12.64	355.4±4.50	336.9±5.17
45 dias	89.33±6.66	84.88±4.16	371.0±25.82	400.0±16.35	388.7±19.64
60 dias	88.96±6.26	90.29±4.57	408.4±25.03	410.2±26.22	390.7±21.65

Os dados da Tabela 4 mostram o aumento da glicemia nos animais estudados nos grupos em que foram aplicados o Aloxano, evidenciando um quadro similar ao diabetes, com valores bem acima de 200 mg/dl. Assim como a Figura 17 mostra as médias e os desvios padrão dos grupos estudados, com significância estatística os grupos em que foram injetados a droga.

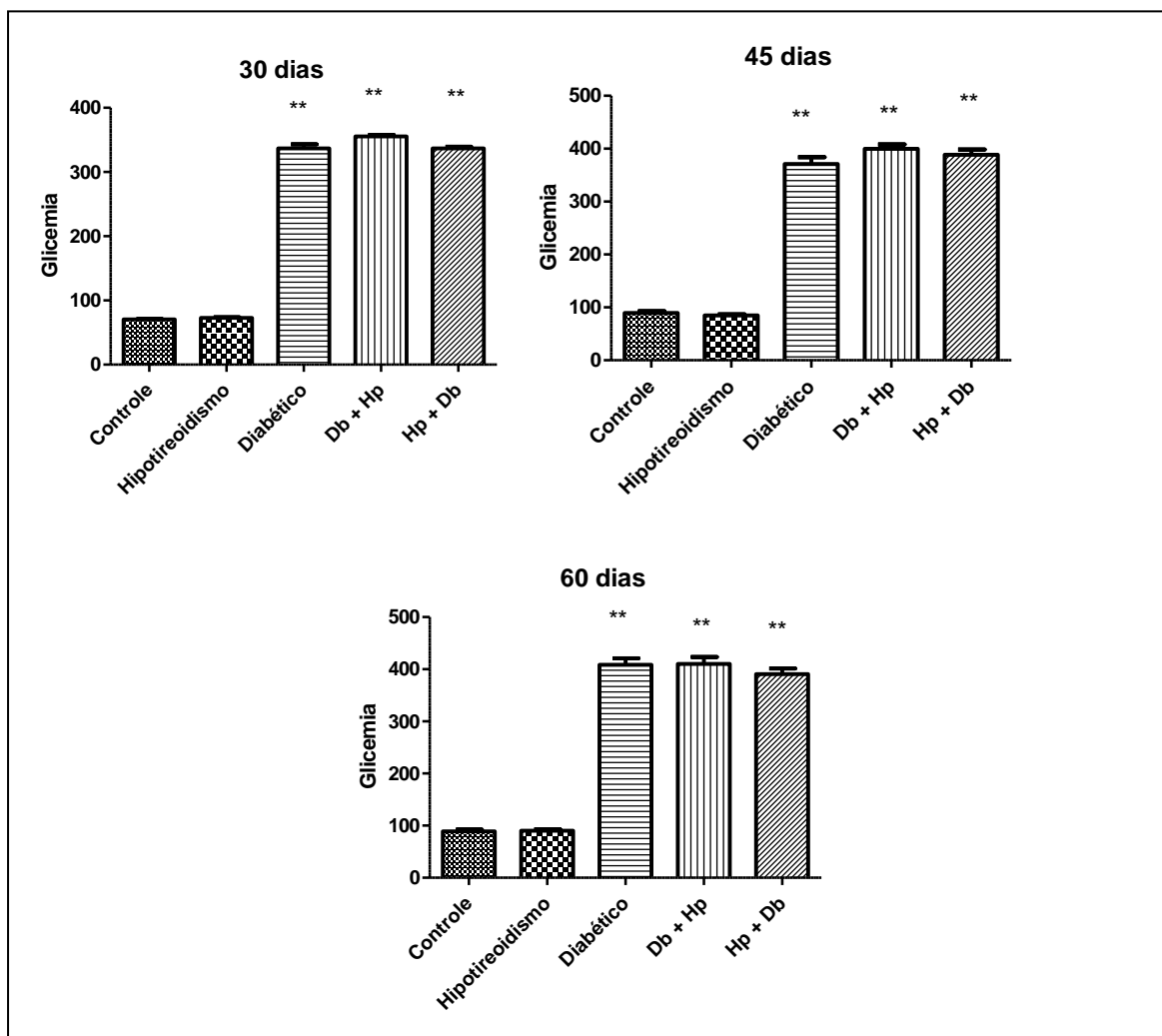


Figura 17. Glicemia dos animais estudados em diferentes tempos (30, 45 e 60 dias). Glicose em mg/dl. O asterisco significa diferença estatística em relação ao controle, (*) quando o $p < 0.05$ e (**) quando o $p < 0.01$.

4.1.2.2. Dosagem de T3

Ao final dos 60 dias do estudo os animais foram sacrificados e foi analisado o nível de T3 sanguíneo.

Tabela 5. Tabela de concentração de T3 sanguíneo dos animais testados após 60 dias

Grupos	Concentração de T3 sanguíneo
Hipotireoidismo	0,732 mg/dl
Db + Hp	0,632 mg/dl
Hp + Db	0.542 mg/dl

Podemos mostrar que os grupos apresentaram valores menores que 1mg/dl, caracterizando quadro de hipotireoidismo.

4.1.2.3. Comportamental

Para avaliarmos a mobilidade dos animais estudados realizamos o campo aberto, porém os resultados mostraram que somente o grupo hipotireoidismo e diabetes apresentaram uma diminuição na movimentação durante o teste após 60 dias. Isso demonstra que a patologia influencia diretamente no sistema visual indiferentemente do comportamento do animal.

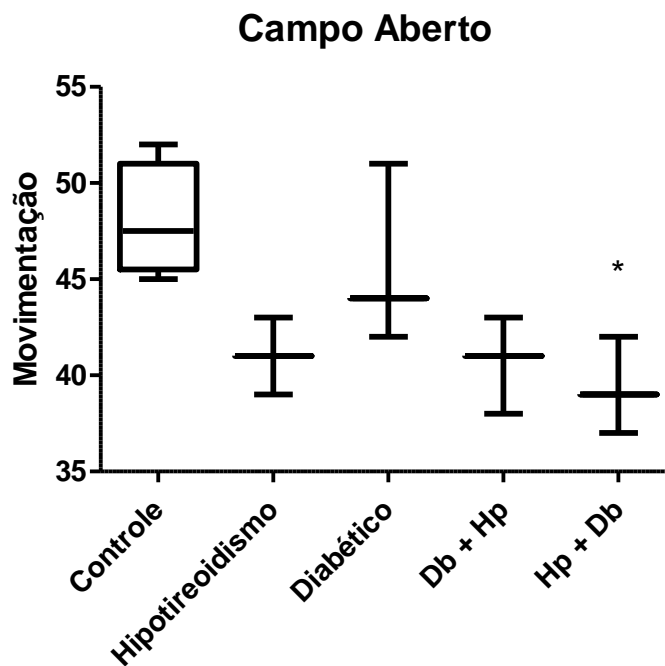


Figura 18. Campo Aberto. Gráfico mostrando a frequência de quadrantes cruzados dos animais estudados em 60 dias. Asterisco representa diferença estatística.

Dessa forma, podemos mostrar que o modelo de diabetes e hipotireoidismo é viável para avaliação de comprometimento visual, partindo desse pressuposto nossos resultados prévios foram aprovados como resumo no congresso anual da The Association for Research in Vision and Ophthalmology – ARVO (2014) – Anexo B (Aprovação do resumo na ARVO).

4.2 Respostas Eletroretinográficas

4.2.1. Respostas Estocópicas (Bastonetes)

As repostas desse grupo foram calculadas seguindo os padrões da Sociedade Internacional de Eletrofisiologia Clínica de Visão (ISCEV) e adaptadas para o nosso modelo experimental, sendo caracterizada com estocópica, isolando resposta de bastonetes, em relação à onda b desse grupo encontramos diferença nos grupos diabéticos (GDB); diabéticos e hipotireoidismo (GDH) e hipotireoidismo e diabéticos (GHD) quando comparados ao grupo controle (GCO), a partir de 45 dias.

Tabela 6. Médias e Desvios padrão das amplitudes da onda b

	Controle	Hipotireoidismo	Diabético	Db + Hp	Hp + Db
30 dias	67.18 ± 8.64	64.40 ± 7.29	62.06 ± 5.75	51.59 ± 8.80	58.15 ± 7.41
45 dias	61.05 ± 6.76	59.96 ± 4.71	46.27 ± 4.66	36.43 ± 3.51	37.64 ± 3.43
60 dias	58.89 ± 1.90	46.68 ± 4.04	30.57 ± 3.22	23.60 ± 3.86	22.80 ± 7.74

Tabela 7. Médias e Desvios padrão do tempo implícito da onda b

	Controle	Hipotireoidismo	Diabético	Db + Hp	Hp + Db
30 dias	57.40± 5.91	59.50± 5.54	65.10± 5.62	68.80± 4.68	55.10± 4.43
45 dias	58.67± 2.65	61.17±3.86	68.50 ± 5.68	68.17± 3.48	62.17±2.78
60 dias	59.75± 2.50	60.75 ±2.50	72.50±5.91	71.33±7.76	68.33±8.50

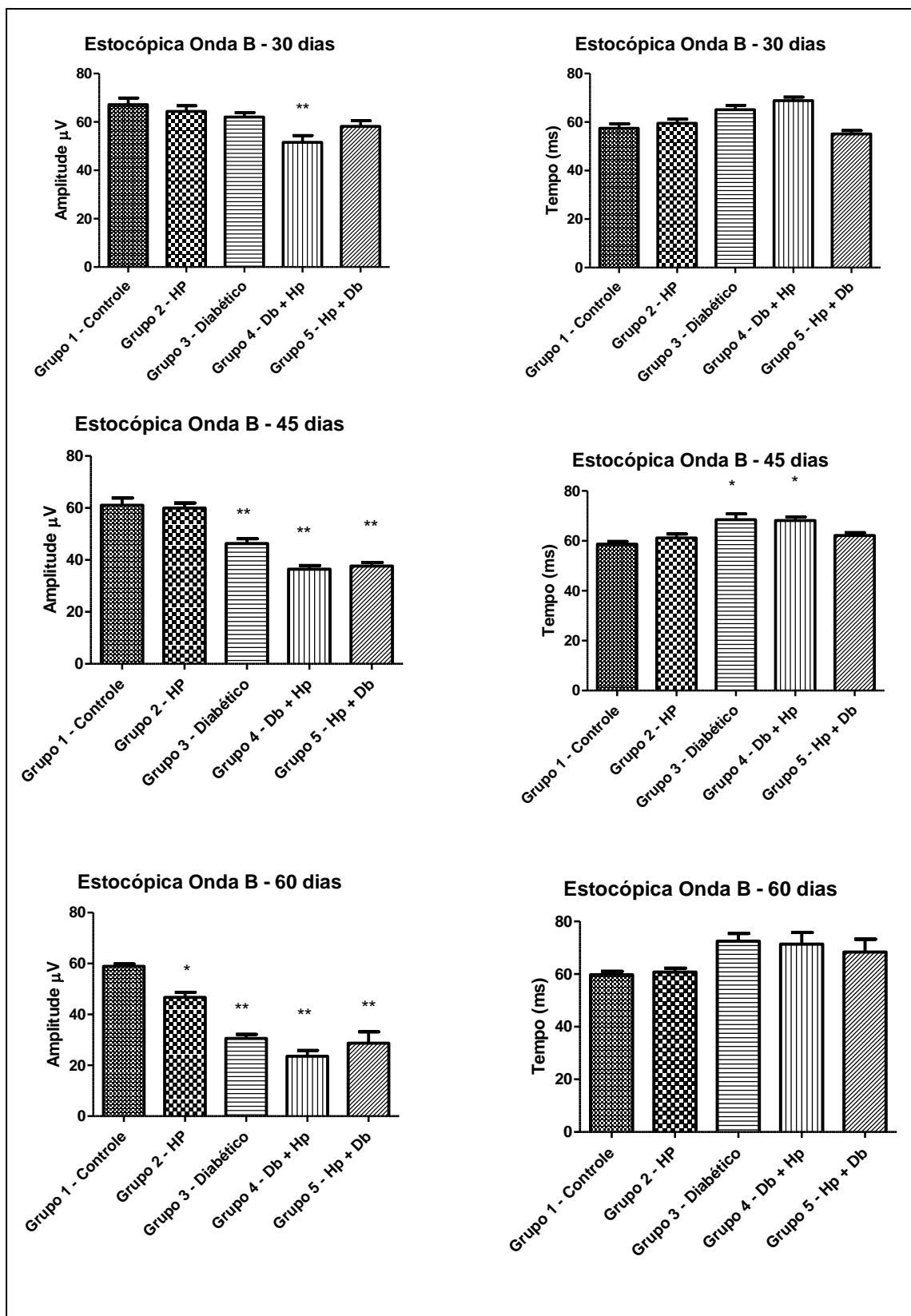


Figura 19. Resposta escotópica de bastonetes. À direita as amplitudes médias da onda-b e respectivos desvios padrão; à esquerda o tempo implícito médio da onda-b. O asterisco significa diferença estatística em relação ao controle, (*) quando o $p < 0.05$ e (**) quando o $p < 0.01$.

4.2.2. Resposta Estocópica Máxima (Bastonetes e Cones)

Esse tipo de resposta é referente aos bastonetes e cones, apresentando a maior diferença estatística das respostas estudadas. Em relação à amplitude das ondas a e b, a diferença está nos 3 períodos estudados. O grupo com hipotireoidismo apresenta-se alterado na última avaliação de 60 dias.

Tabela 8. Médias e Desvios padrão das amplitudes de onda a

	Controle	Hipotireoidismo	Diabético	Db + Hp	Hp + Db
30 dias	123.90± 21.79	108.7± 14.10	84.63± 14.10	83.24± 11.21	95.62± 10.55
45 dias	118.40± 23.59	92.68± 13.20	73.65± 11.13	44.25± 14.16	54.21± 14.82
60 dias	107.40± 11.33	93.47± 8.47	55.95± 10.43	21.98± 8.99	26.21± 6.25

Tabela 9. Médias e Desvios padrão das amplitudes de onda b

	Controle	Hipotireoidismo	Diabético	Db + Hp	Hp + Db
30 dias	234.0± 16.08	219.3± 13.05	179.5± 18.60	157.3± 18.60	173.3± 19.64
45 dias	164.8± 20.44	154.9± 15.23	137.1± 25.27	83.76± 13.61	103.2± 29.83
60 dias	163.6± 15.90	129.1± 5.688	92.94± 10.80	55.63± 5.204	59.49± 5.204

Tabela 10. Médias e Desvios padrão do tempo implícito de onda a

	Controle	Hipotireoidismo	Diabético	Db + Hp	Hp + Db
30 dias	11.50± 1.43	12.10± 1.44	13.60± 2.27	13.20± 1.68	12.90± 1.79
45 dias	12.33± 1.50	13.67± 1.75	15.33± 1.96	17.00± 2.36	14.50± 3.27
60 dias	12.00± 0.816	12.50± 1.00	15.50± 1.29	17.00± 1.00	15.67± 2.08

Tabela 11. Médias e Desvios padrão do tempo implícito de onda b

	Controle	Hipotireoidismo	Diabético	Db + Hp	Hp + Db
30 dias	45.30± 2.05	44.90± 2.28	46.40± 2.11	46.50± 2.12	46.30± 2.31
45 dias	46.83± 2.04	46.83± 2.04	50.83± 2.22	51.17± 3.86	50.83± 3.31
60 dias	48.50± 1.73	48.25± 1.70	52.75± 0.95	53.00± 0.95	53.00± 1.73

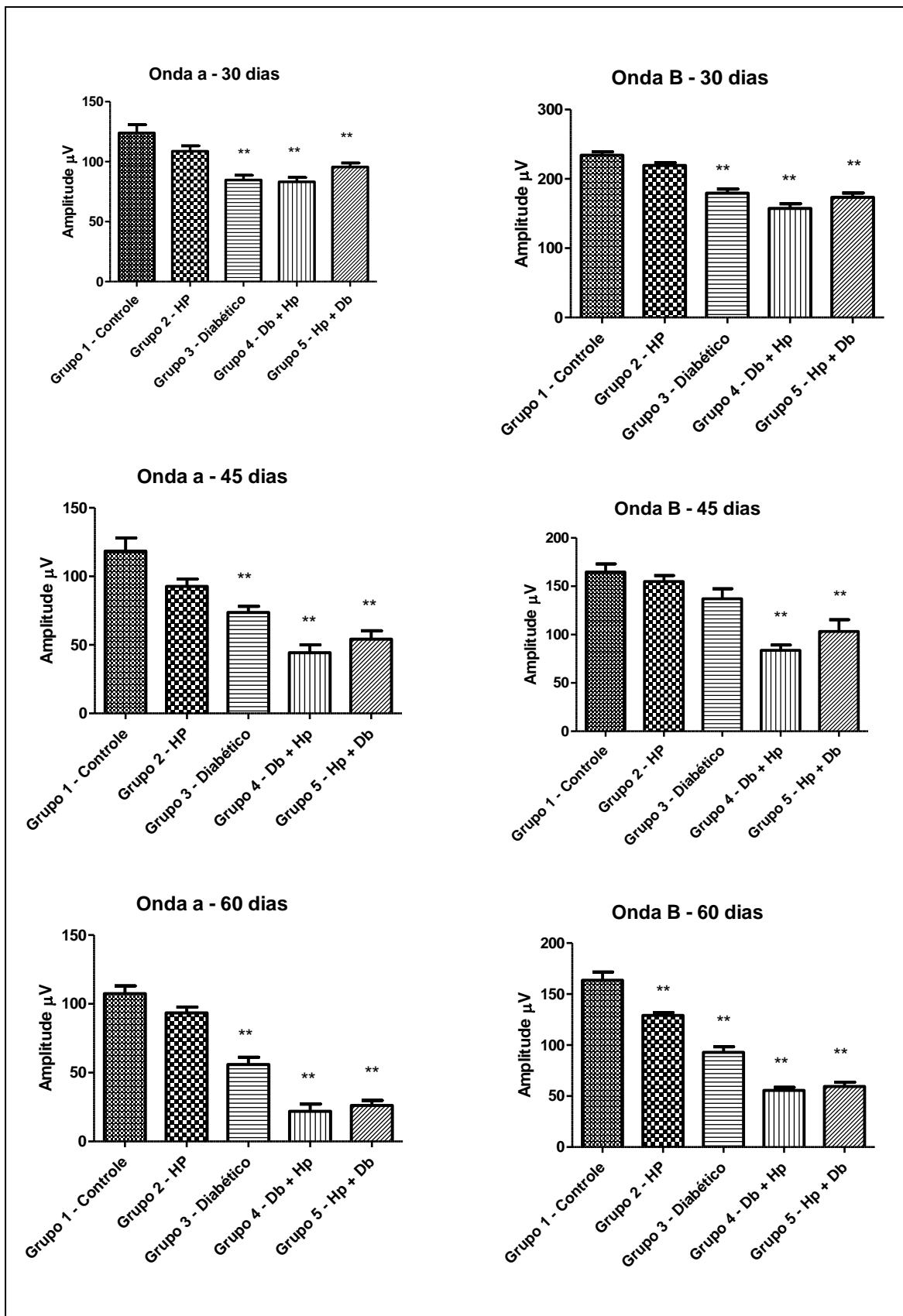


Figura 20. Resposta escotópica máxima. À direita as amplitudes médias da onda a; à esquerda as amplitudes da onda b. O asterisco significa diferença estatística em relação ao controle, (*) quando o $p < 0.05$ e (**) quando o $p < 0.01$.

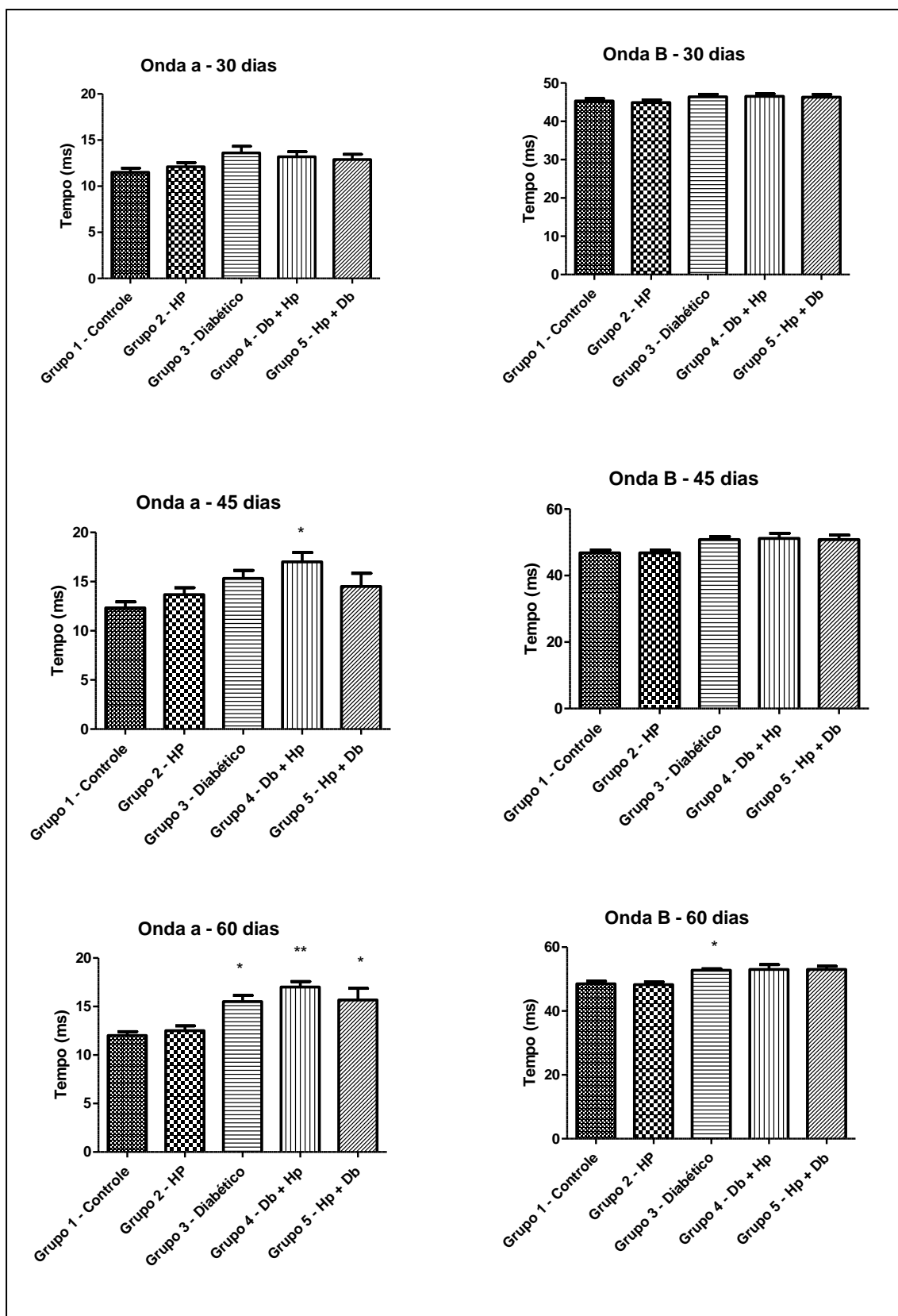


Figura 21. Resposta escotópica máxima. À direita o tempo implícito da onda a; à esquerda o tempo implícito da onda b. O asterisco significa diferença estatística em relação ao controle, (*) quando o $p < 0.05$ e (**) quando o $p < 0.01$.

4.2.3. Resposta de Cones

Nessas respostas encontramos diferenças estatísticas tanto na onda a quanto na onda b desde o 30° dia até o 60° dia, nos grupos diabéticos e nos dois grupos com ambas as patologias, em relação ao tempo implícito somente no 60° dia de avaliação os dois grupos com ambas as patologias apresentavam um atraso.

Tabela 12. Médias e Desvios padrão das amplitudes de onda a

	Controle	Hipotireoidismo	Diabético	Db + Hp	Hp + Db
30 dias	13.38± 2.78	12.10± 1.50	8.947 ±1.72	7.734± 1.32	9.841± 1.01
45 dias	10.64± 2.00	10.40±1.95	6.149± 1.85	5.264± 1.77	4.090± 1.17
60 dias	9.935± 1.08	8.301± 0.28	4.467± 0.60	3.216± 1.48	2.766± 0.25

Tabela 13. Médias e Desvios padrão das amplitudes de onda b

	Controle	Hipotireoidismo	Diabético	Db + Hp	Hp + Db
30 dias	45.83± 7.70	39.11± 5.62	33.02± 6.11	28.26± 3.88	31.30± 3.04
45 dias	40.09± 5.01	37.64± 3.84	21.74± 3.26	19.55± 5.08	20.91± 4.80
60 dias	34.77± 4.63	28.14± 4.49	16.61± 2.53	12.22± 2.20	11.07± 1.78

Tabela 14. Médias e Desvios padrão o tempo implícito de onda a

	Controle	Hipotireoidismo	Diabético	Db + Hp	Hp + Db
30 dias	11.50± 1.43	12.10± 1.44	13.60± 2.27	13.20± 1.68	12.90± 1.79
45 dias	17.83± 1.47	17.50± 1.64	19.00± 1.67	19.50± 0.83	19.33± 1.50
60 dias	18.50± 0.57	19.50± 0.57	21.00± 1.82	21.67± 1.15	21.67± 1.52

Tabela 15. Médias e Desvios padrão o tempo implícito de onda b

	Controle	Hipotireoidismo	Diabético	Db + Hp	Hp + Db
30 dias	57.20± 2.65	56.50± 2.59	60.00± 1.82	59.60± 2.11	59.10± 2.72
45 dias	58.50± 3.72	58.50± 1.22	59.50± 2.42	63.00± 2.75	61.50± 3.50
60 dias	59.00± 2.94	59.50± 2.94	62.00± 1.63	65.67± 1.52	65.00± 1.00

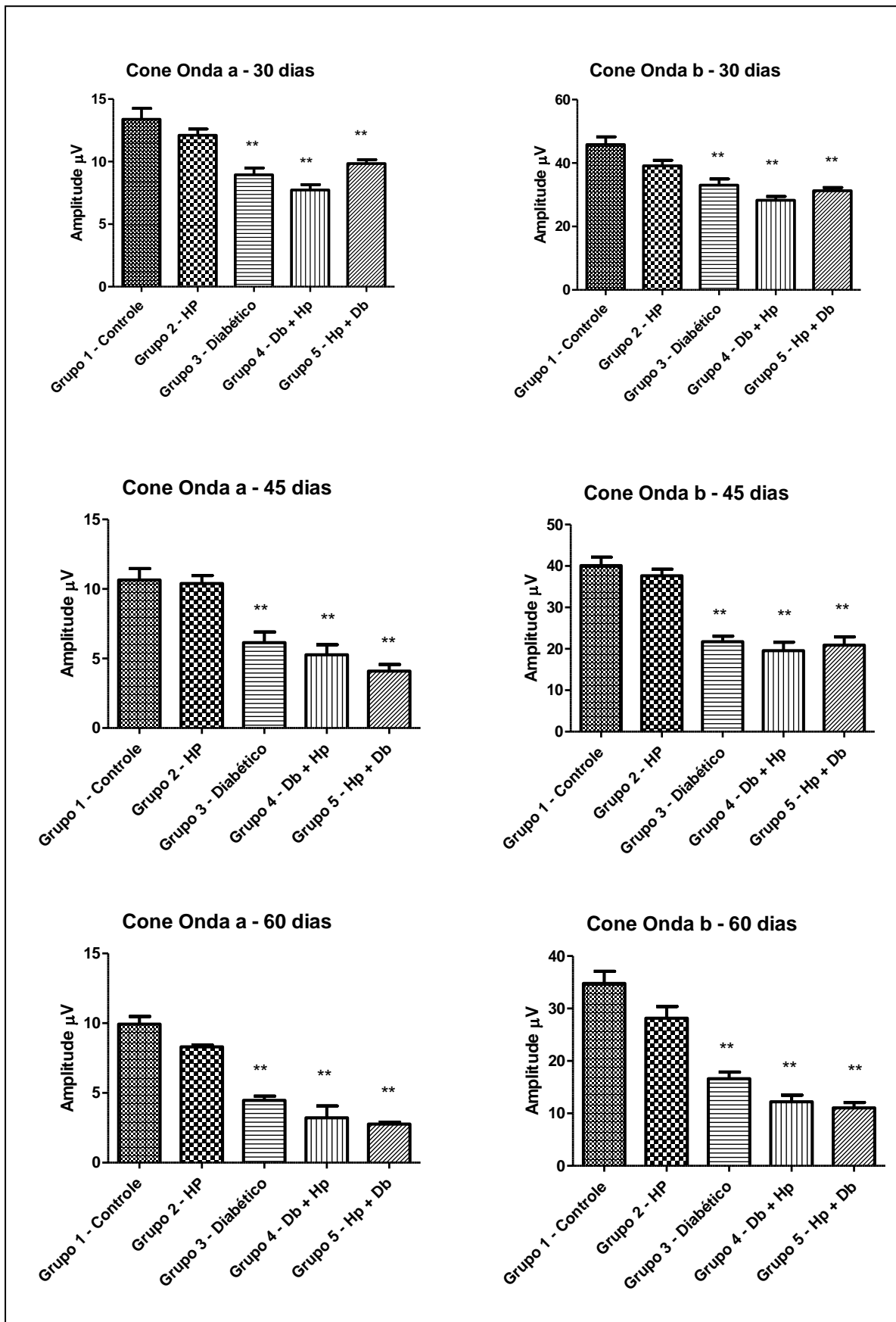


Figura 21. Resposta de cone. À direita a amplitude da onda a; à esquerda a amplitude da onda b. O asterisco significa diferença estatística em relação ao controle, (*) quando o $p < 0.05$ e (**) quando o $p < 0.01$.

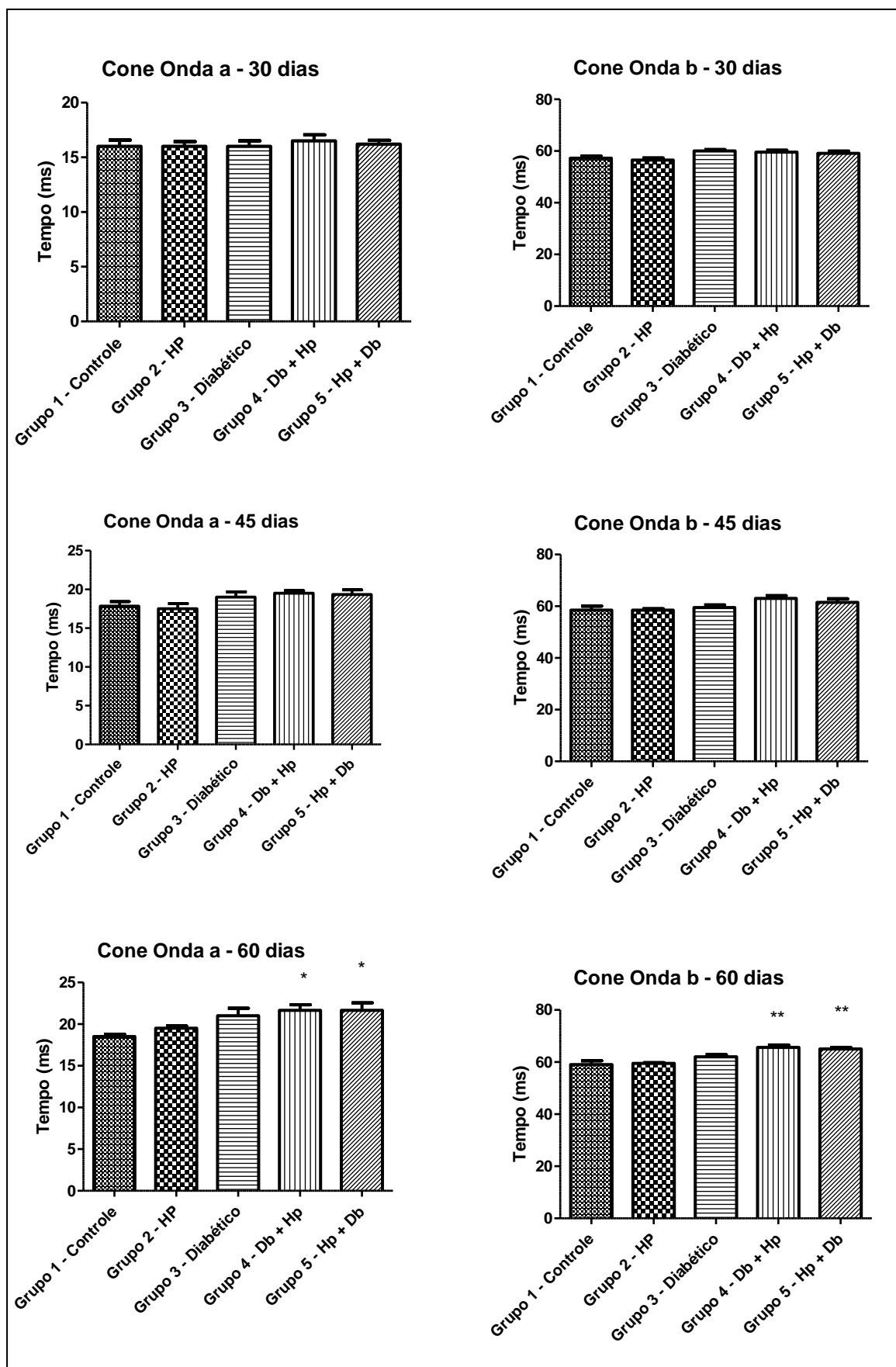


Figura 23 Resposta de cones. À direita o tempo implícito da onda a; á esquerda o tempo implícito da onda b. O asterisco significa diferença estatística em relação ao controle, (*) quando o $p < 0.05$ e (**) quando o $p < 0.01$.

4.2.4. Resposta de cones UV

Nesse grupo de respostas encontramos diferença estatística nas ondas a e b, nos grupos diabéticos, diabetes e hipotireoidismo e hipotireoidismo e diabetes, e sem grandes alterações no tempo implícito.

Tabela 16. Médias e Desvios padrão das amplitudes de onda a

	Controle	Hipotireoidismo	Diabético	Db + Hp	Hp + Db
30 dias	13.53± 2.28	11.93± 1.47	9.08±0.93	8.03± 0.97	9.23± 1.46
45 dias	10.84± 1.34	10.49± 1.74	6.54± 1.34	5.76±0.97	6.46± 1.57
60 dias	9.382± 1.26	9.789± 1.26	5.13± 1.22	3.27± 0.87	3.78± 0.66

Tabela 17. Médias e Desvios padrão das amplitudes de onda b

	Controle	Hipotireoidismo	Diabético	Db + Hp	Hp + Db
30 dias	39.63 ±6.66	36.69± 6.38	29.35± 6.64	25.76± 4.059	25.31± 2.34
45 dias	35.97± 4.44	32.38± 3.04	16.27± 4.52	17.13± 4.528	19.24± 3.45
60 dias	33.34± 4.87	25.89± 2.15	10.64±0.50	9.98± 0.90	12.27± 2.48

Tabela 18. Médias e Desvios padrão o tempo implícito de onda a

	Controle	Hipotireoidismo	Diabético	Db + Hp	Hp + Db
30 dias	16.30± 1.63	16.10± 1.72	16.80± 1.39	17.50± 1.43	18.40± 1.43
45 dias	17.83± 1.94	17.17± 1.72	19.33± 1.63	19.00± 1.89	19.50± 1.87
60 dias	19.50± 2.51	19.00± 0.81	21.25± 1.70	21.67± 1.52	21.33± 2.30

Tabela 19. Médias e Desvios padrão o tempo implícito de onda b

	Controle	Hipotireoidismo	Diabético	Db + Hp	Hp + Db
30 dias	56.90± 2.76	56.50± 2.01	59.30± 1.63	59.80± 2.39	59.10± 2.42
45 dias	56.90± 2.76	56.50± 2.01	59.30± 1.63	59.80± 2.39	59.10± 2.42
60 dias	56.50±2.38	58.75± 2.38	61.75± 0.957	63.00± 1.00	64.00± 1.00

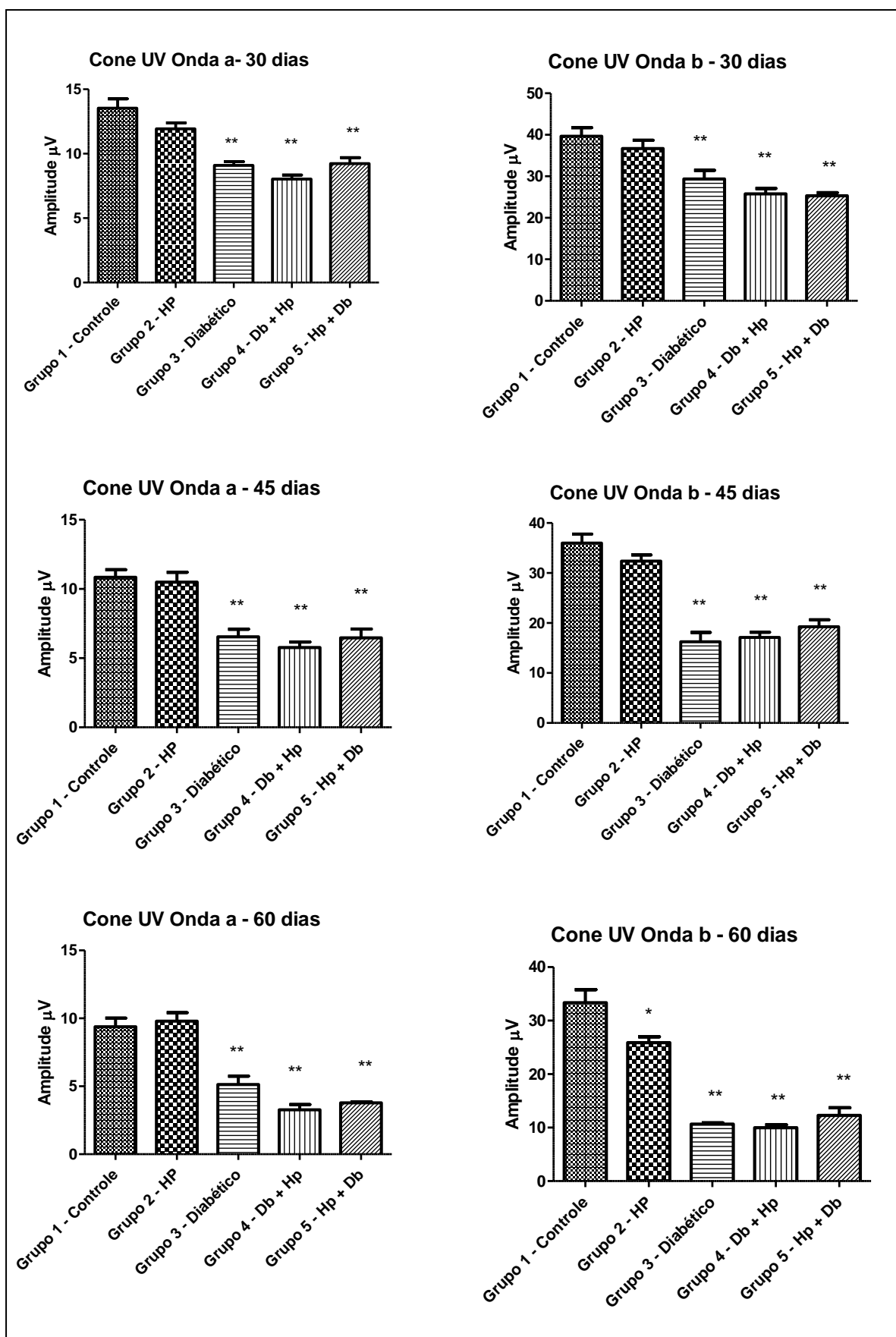


Figura 24. Resposta de cone UV. À direita a amplitude da onda a; à esquerda a amplitude da onda b. O asterisco significa diferença estatística em relação ao controle, (*) quando o $p < 0.05$ e (**) quando o $p < 0.01$.

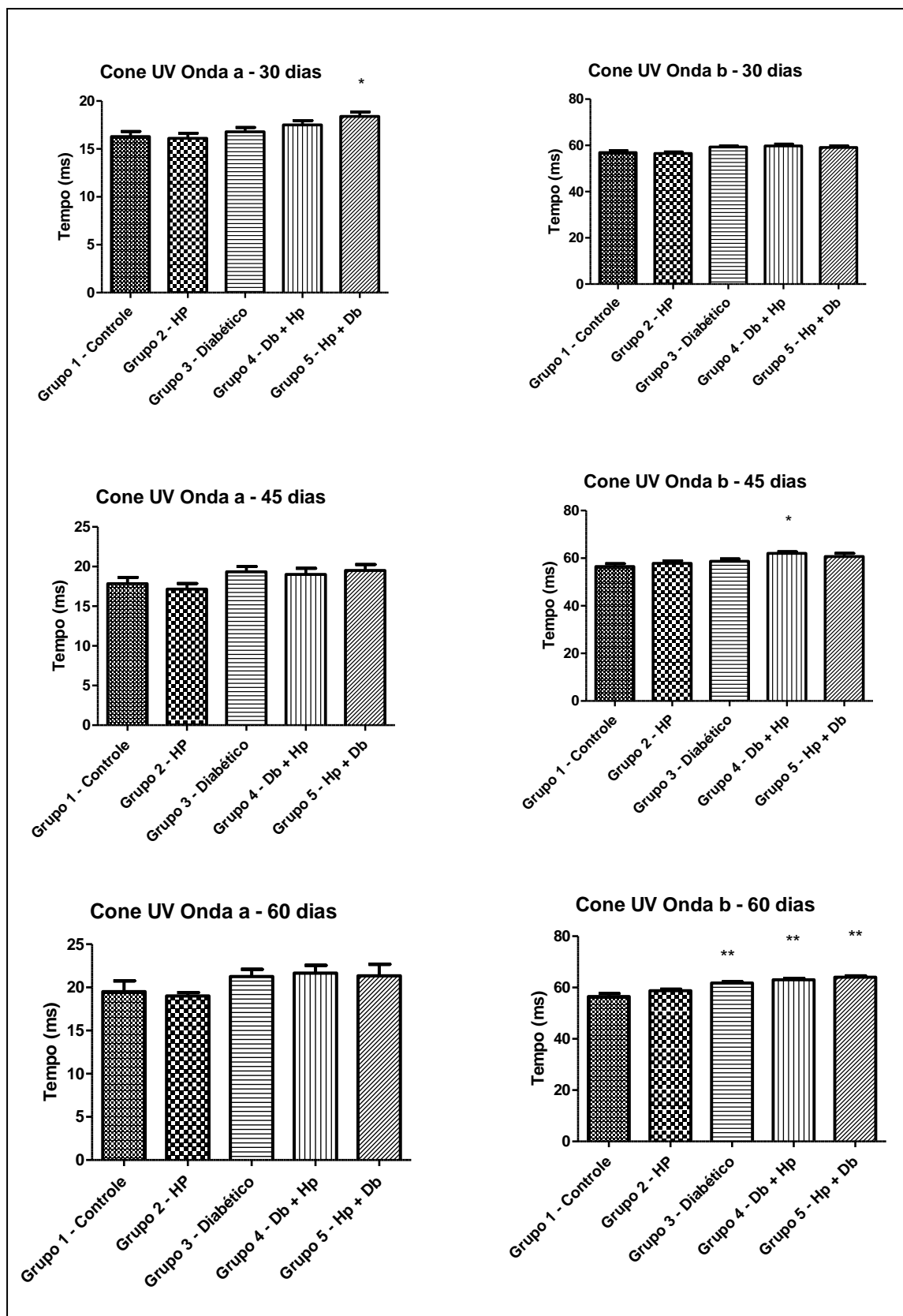


Figura 25. Resposta de cone UV. À direita o tempo implícito da onda a; à esquerda o tempo implícito da onda b. O asterisco significa diferença estatística em relação ao controle, (*) quando o $p < 0.05$ e (**) quando o $p < 0.01$.

4.2.5. Resposta de Cones M

As respostas do cone M se equiparam às respostas do cone UV, com diferenças na onda a e b nos grupos com diabetes, no entanto apresentam diferença estatística no tempo implícito após o 45° dia nos mesmos grupos.

Tabela 20. Médias e Desvios padrão das amplitudes de onda a

	Controle	Hipotireoidismo	Diabético	Db + Hp	Hp + Db
30 dias	12.24± 0.99	12.25± 0.72	9.18± 1.10	8.34± 1.08	8.76± 0.98
45 dias	10.79± 1.02	10.44± 1.34	6.36± 1.66	5.30± 1.09	5.75± 1.32
60 dias	9.09± 0.89	8.86± 1.66	5.06± 1.36	4.15± 1.13	3.71± 0.37

Tabela 21. Médias e Desvio padrão das amplitudes de onda b

	Controle	Hipotireoidismo	Diabético	Db + Hp	Hp + Db
30 dias	42.86± 6.98	39.95± 5.48	28.63± 5.24	24.65 ±4.14	24.99± 3.16
45 dias	34.09± 4.72	32.78± 3.31	16.85± 4.16	17.08± 3.16	18.74± 3.18
60 dias	32.93± 4.74	25.95± 2.40	10.44±0.449	10.01±0.58	12.74± 2.95

Tabela 22. Médias e Desvios padrão do tempo implícito de onda a

	Controle	Hipotireoidismo	Diabético	Db + Hp	Hp + Db
30 dias	16.20± 1.54	16.20± 1.68	17.30± 1.33	17.80± 1.22	17.90± 1.28
45 dias	18.17± 1.47	17.67± 1.96	19.83± 2.31	19.50± 2.31	19.50± 1.37
60 dias	19.00± 1.41	19.75± 1.25	21.75± 2.21	22.00± 2.00	22.67± 2.74

Tabela 23. Médias e Desvios padrão do tempo implícito de onda b

	Controle	Hipotireoidismo	Diabético	Db + Hp	Hp + Db
30 dias	55.60± 2.36	56.80± 2.04	59.20± 1.68	59.30± 2.62	58.50± 2.62
45 dias	55.60± 2.36	56.80± 2.04	59.20± 1.68	59.30± 1.68	58.50± 2.83
60 dias	59.25±0.95	59.50± 1.29	62.50± 0.577	63.00± 1.73	63.00±1.00

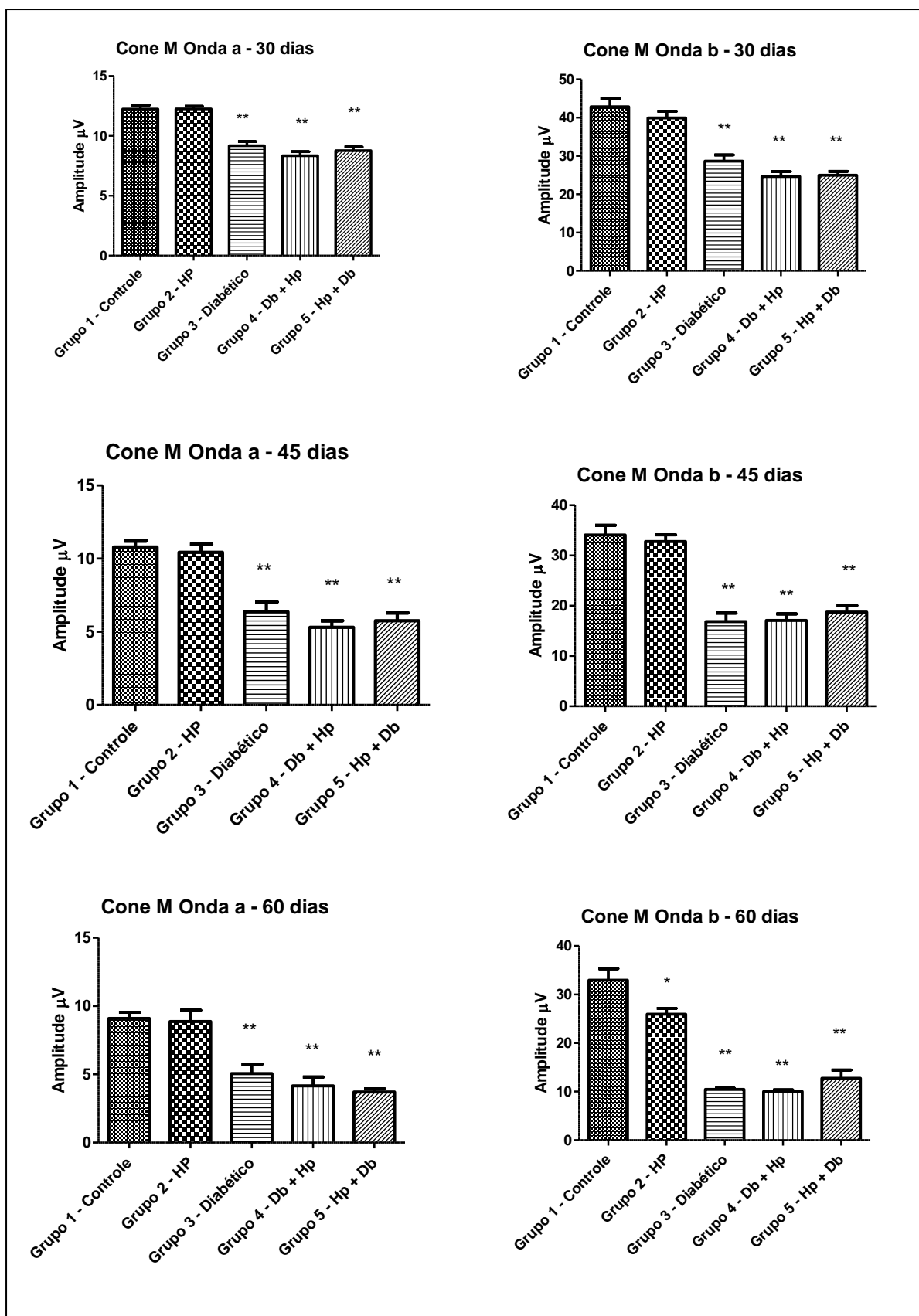


Figura 26. Resposta de cone M. À direita a amplitude da onda a; à esquerda a amplitude da onda b. O asterisco significa diferença estatística em relação ao controle, (*) quando o $p < 0.05$ e (**) quando o $p < 0.01$.

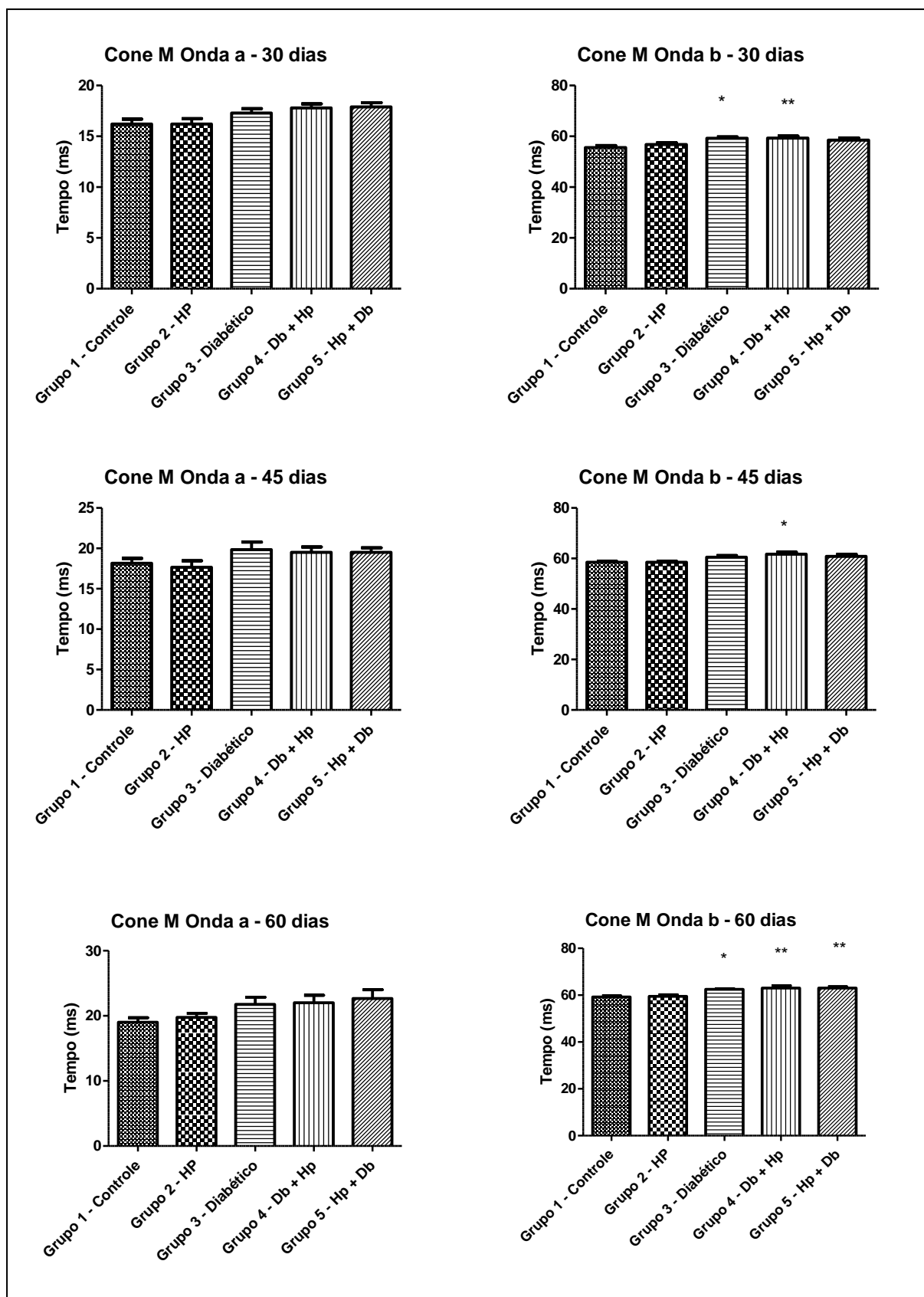


Figura 27. Resposta de cone M. À direita o tempo implícito da onda a; à esquerda o tempo implícito médio da onda-b. O asterisco significa diferença estatística em relação ao controle, (*) quando o $p < 0.05$ e (**) quando o $p < 0.01$.

4.2.6 Potencial Oscilatório

Os potenciais oscilatórios foram as que apresentaram maiores diferenças estatística, nos grupos diabéticos, diabetes e hipotireoidismo e hipotireoidismo e diabetes, e o tempo implícito só apresentou um atraso nos primeiros 30 dias quando comparado ao controle, no entanto nas avaliações de 45 e 60 dias não houve diferença, pois o valor do grupo controle também diminuiu.

Tabela 24. Médias e desvios padrão das amplitudes do potencial oscilatório

	Controle	Hipotireoidismo	Diabético	Db + Hp	Hp + Db
30 dias	81.90± 6.53	78.29± 4.81	63.56± 4.81	58.69± 11.85	60.71± 12.80
45 dias	71.55± 12.08	63.85± 10.90	46.67± 7.32	39.30± 4.77	43.24± 7.54
60 dias	61.19± 10.67	56.66± 5.47	33.79 5.47	28.63± 8.63	32.55± 5.68

Tabela 25. Médias e desvio padrão do tempo implícito do potencial oscilatório

	Controle	Hipotireoidismo	Diabético	Db + Hp	Hp + Db
30 dias	34.90± 2.23	37.44± 2.23	40.78± 3.15	41.25± 2.25	38.88± 2.10
45 dias	37.00± 1.41	37.57± 1.61	39.83± 1.47	39.33± 1.36	38.83± 1.16
60 dias	38.00± 1.41	39.25± 1.70	41.75± 2.63	41.67± 2.88	42.00± 2.88

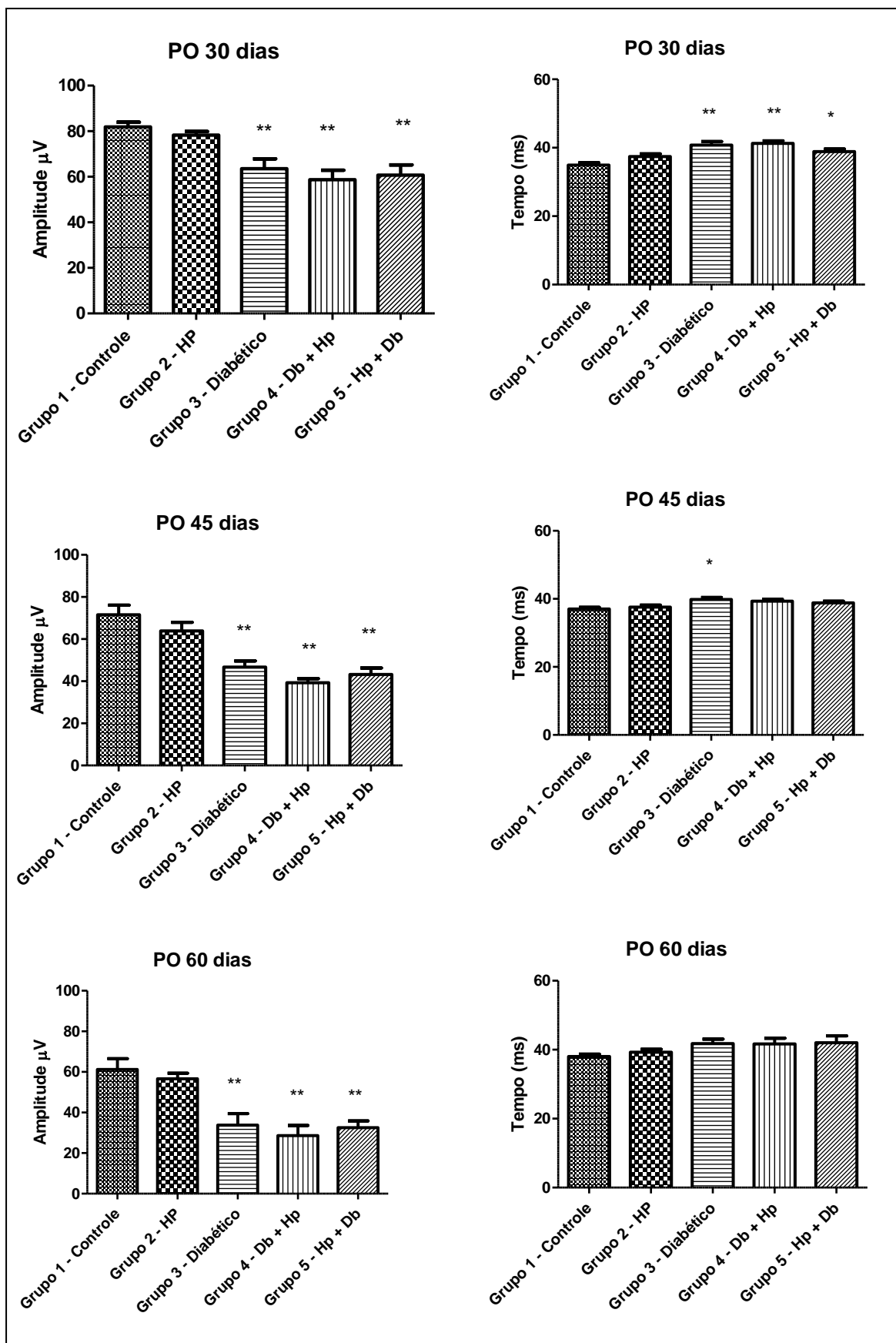


Figura 28. Resposta do potencial oscilatório. À direita a amplitude média da terceira onda; à esquerda o tempo implícito da terceira onda. O asterisco significa diferença estatística em relação ao controle, (*) quando o $p < 0.05$ e (**) quando o $p < 0.01$.

4. 2.7 Flicker de 12 e 15 Hz

As amplitudes do flicker mantiveram o padrão das outras respostas com diminuição na amplitude do grupo diabético; diabético e hipotireoidismo; hipotireoidismo e diabetes, sendo que essa alteração já foi vista desde 30º dia em ambas as frequências 12 e 15 Hz.

Tabela 26. Médias e desvios padrão das amplitudes do Flicker de 12 Hz

	Controle	Hipotireoidismo	Diabético	Db + Hp	Hp + Db
30 dias	31.44± 4.38	31.19± 3.64	24.16± 2.97	20.62± 2.97	23.93± 2.97
45 dias	20.98± 1.44	19.88± 2.46	14.05± 3.42	10.93± 3.42	13.67± 2.31
60 dias	19.64± 0.87	17.42± 1.67	9.93±0.85	7.96± 0.05	9.14± 1.44

Tabela 27. Médias e desvios padrão das amplitudes do Flicker de 15 Hz

	Controle	Hipotireoidismo	Diabético	Db + Hp	Hp + Db
30 dias	23.81± 3.15	22.21± 2.89	15.40± 2.74	17.15± 4.68	17.37± 2.49
45 dias	15.04± 1.36	14.21± 1.62	8.39± 1.15	7.41± 2.57	9.04± 2.33
60 dias	13.65± 2.12	12.12± 1.40	8.06±0.85	6.95± 2.68	7.10± 3.11

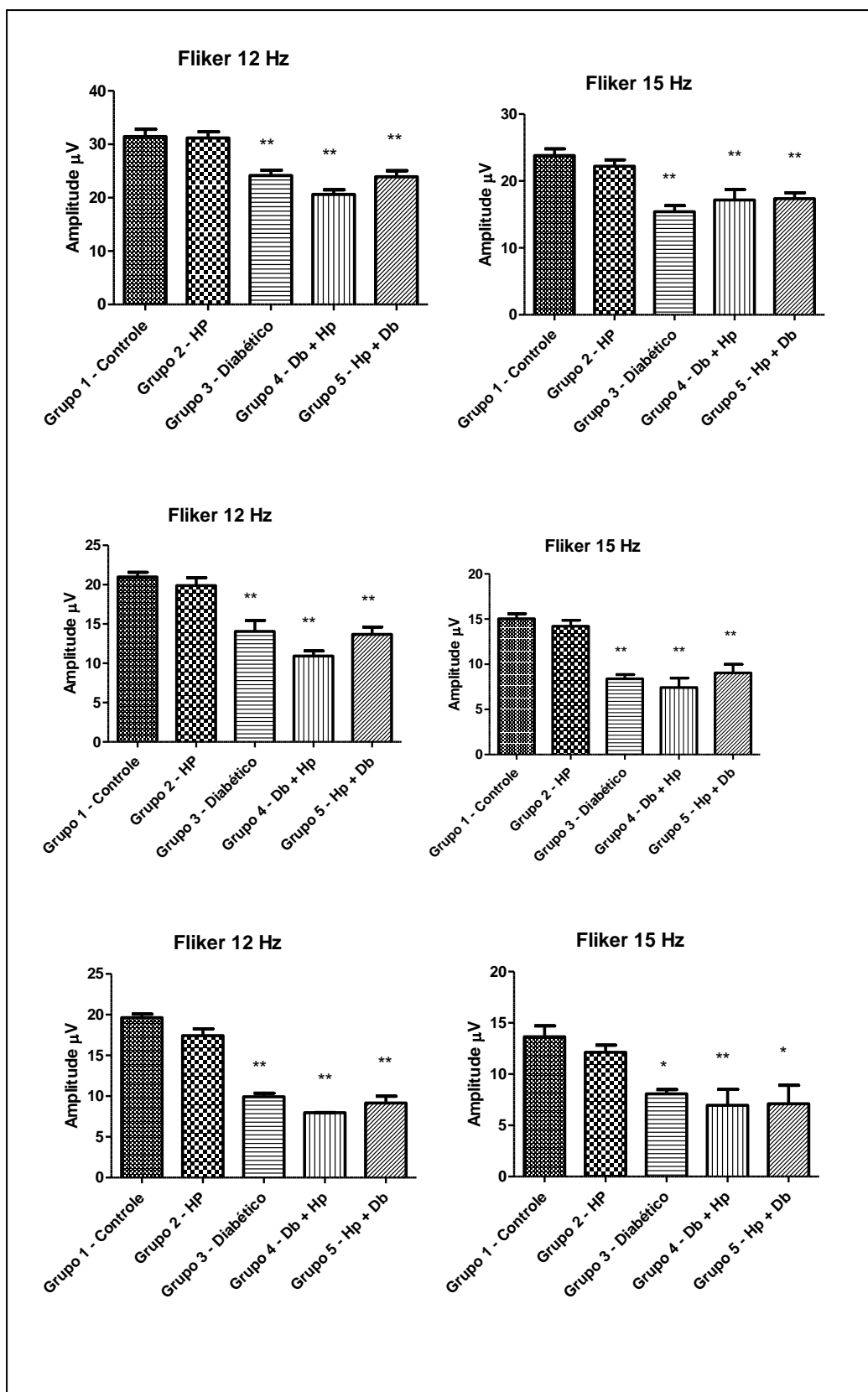


Figura 29. Resposta de flicker de 12 e 15 Hz. À direita amplitude média do flicker de 12 Hz; a esquerda a amplitude média do flicker de 15 Hz. O asterisco significa diferença estatística em relação ao controle, (*) quando o $p < 0.05$ e (**) quando o $p < 0.01$.

4.3. Padrão dos registros dos animais estudados

O padrão dos registros estudados mostrou amplitude reduzida e tempo implícito alterado principalmente no 60º dia, devido à evolução das patologias, por isso mostramos padrão dos registros nesse período.

4.3.1 Registro das respostas escópicas em 60 dias

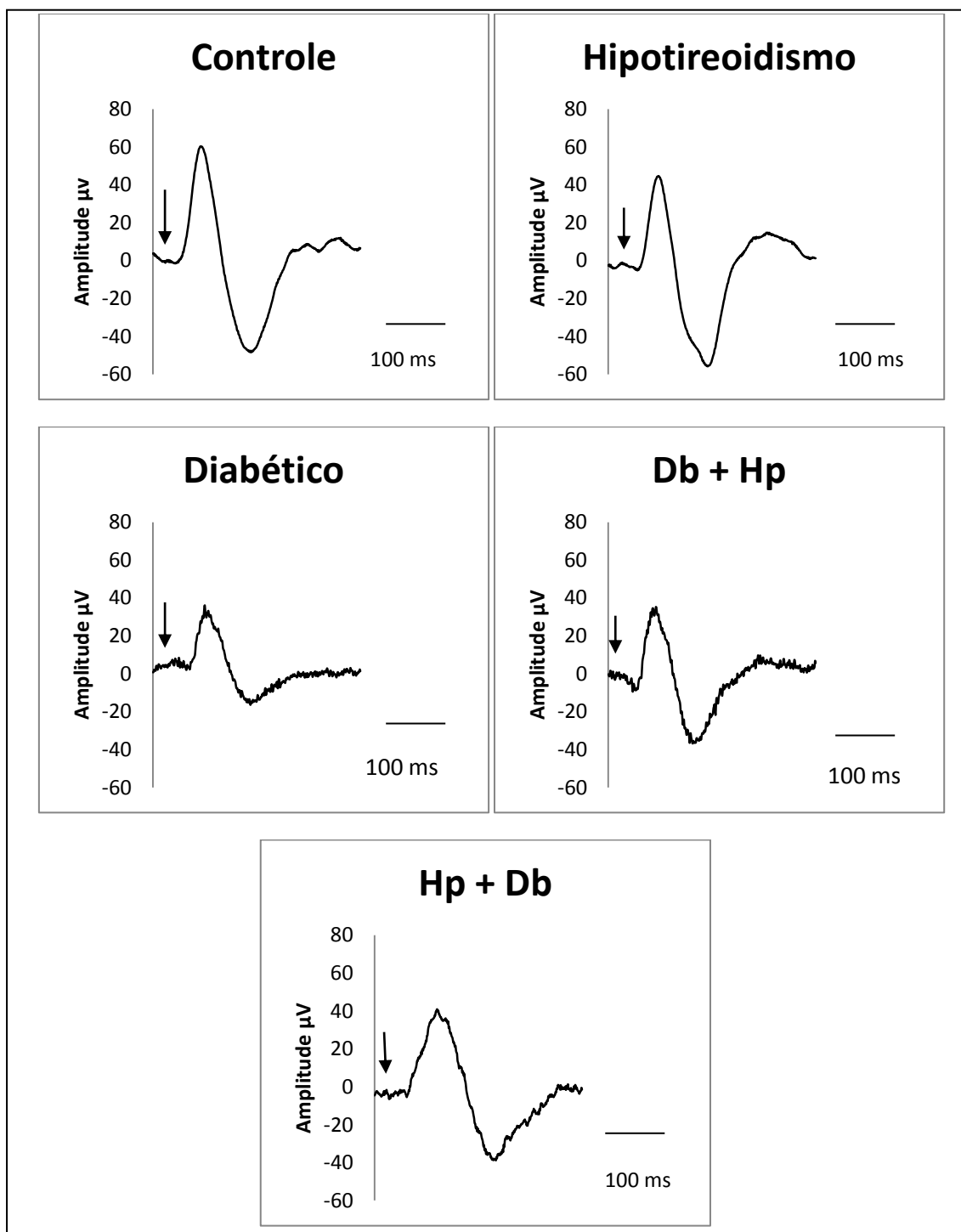


Figura 30. Resposta escópica de bastonetes. A seta indica o início do estímulo. Amplitude (μV) x Tempo (ms).

4.3.2 Registro da resposta escotópica máxima aos 60 dias

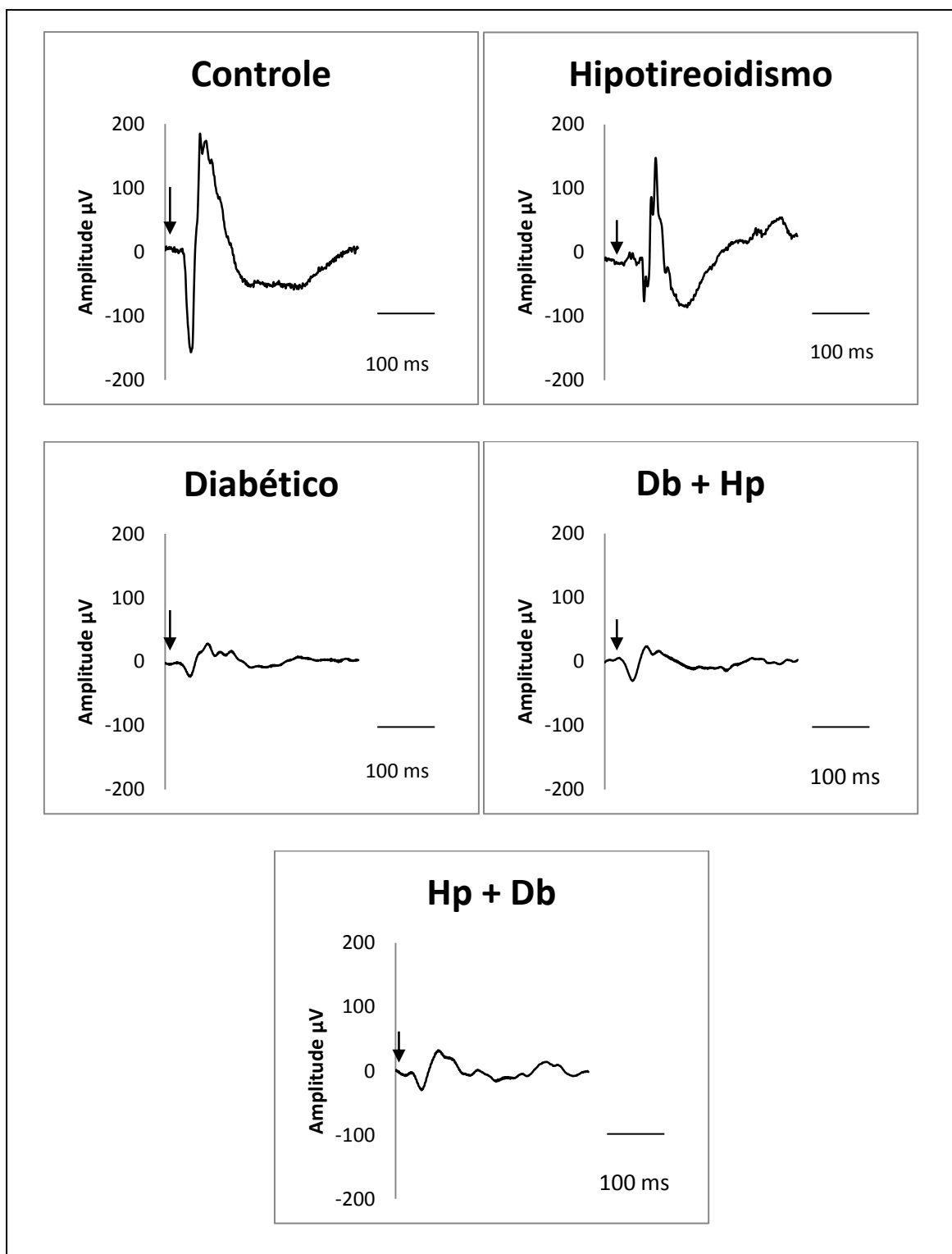
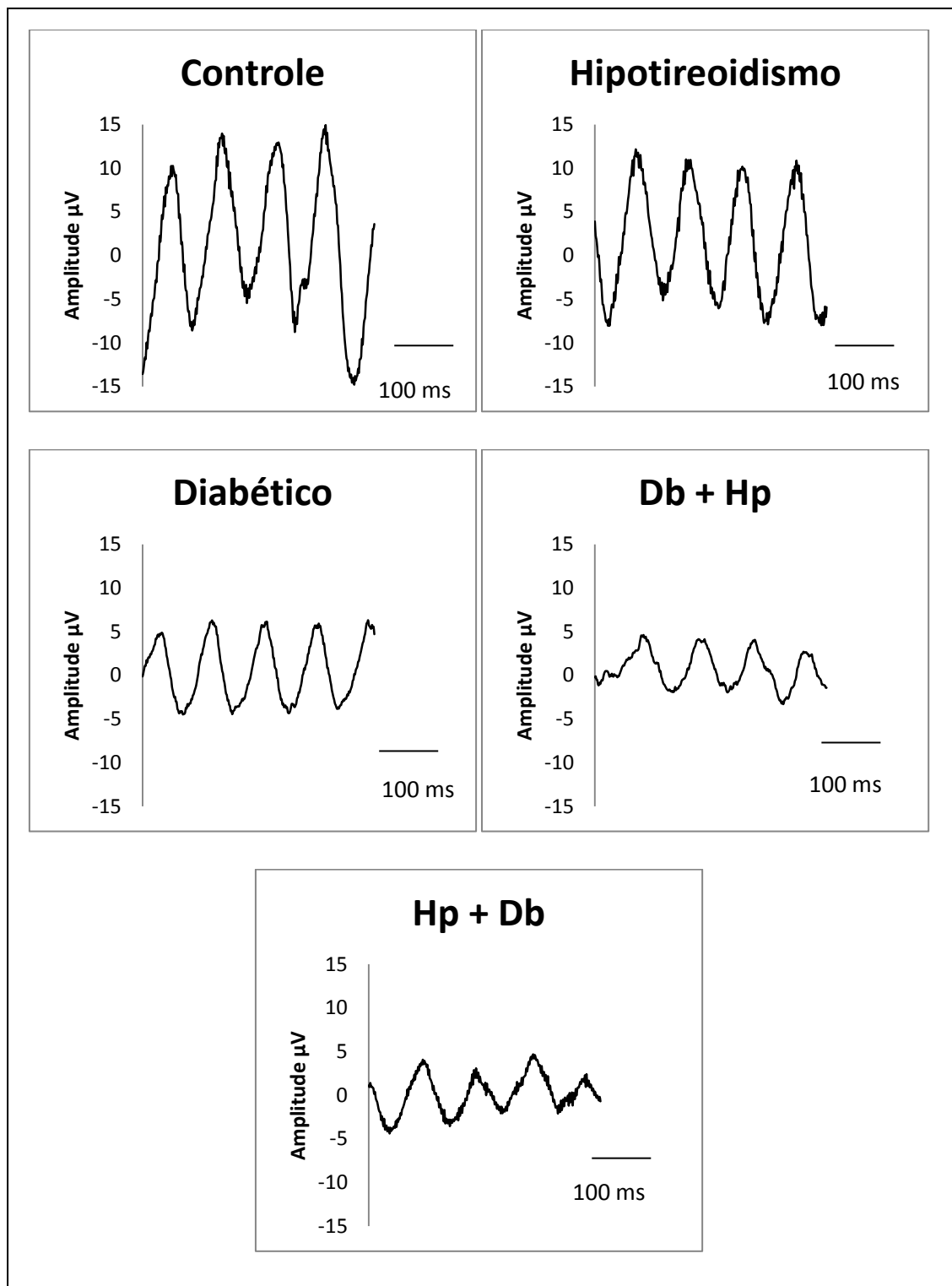
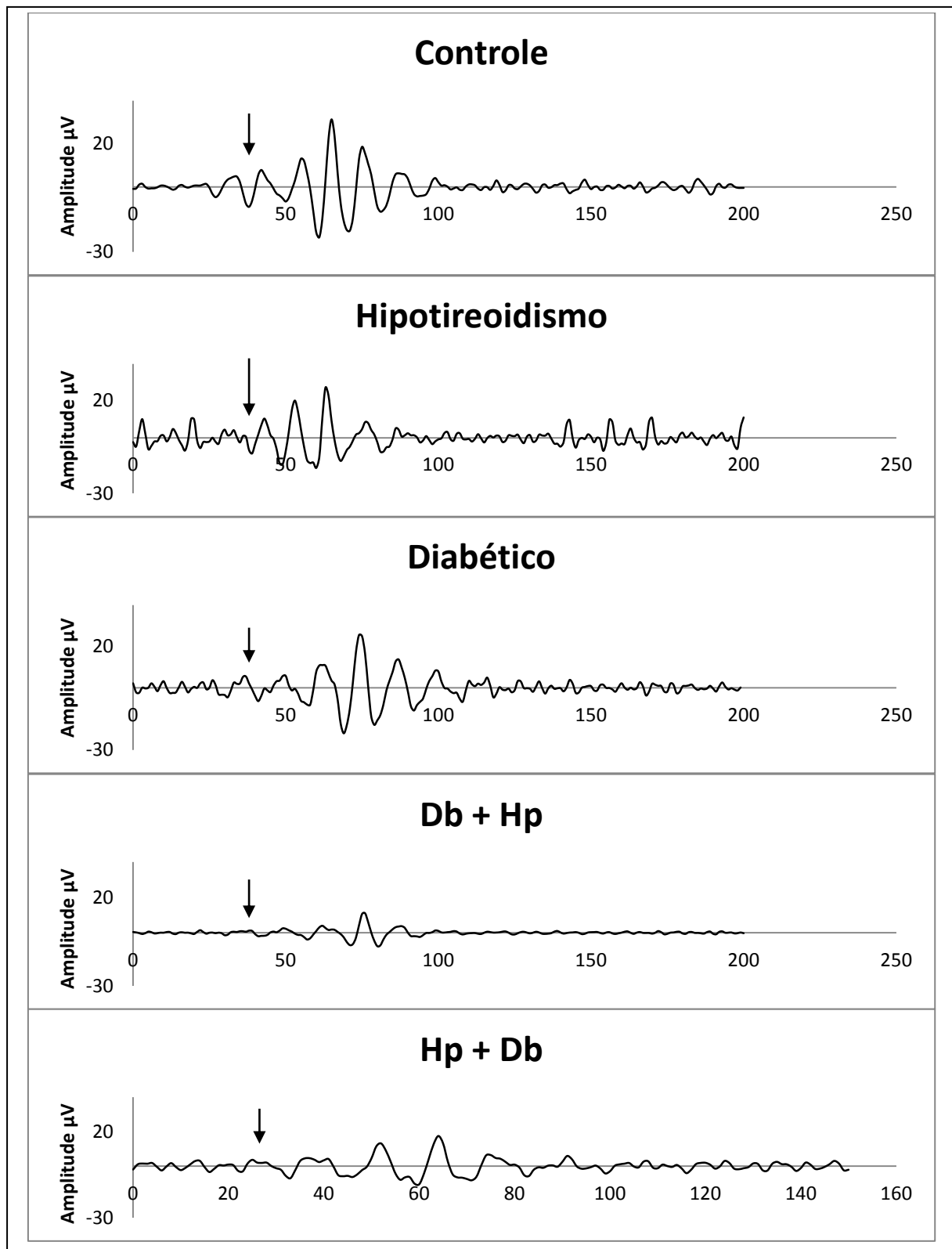


Figura 31. Resposta escotópica máxima. A seta indica o início do estímulo. Amplitude (μV) x Tempo (ms).

4.3.3 Resposta do Flicker de 12 Hz

Figura 32. Resposta do Flicker de 12 Hz. Amplitude (μV) x Tempo (ms).

4.3.4 Respostas do potencial oscilatório

Figura 33. Potenciais oscilatórios. A seta indica o início do estímulo. Amplitude (μV) x Tempo (ms).

5. DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstraram que o modelo experimental de ambas as patologias é viável, apesar de ainda não ser explorado pela literatura, pois as pesquisas utilizam os modelos experimentais isoladamente, principalmente em relação a roedores, que são muito utilizados para avaliar alterações vasculares na retina, como é o caso dos danos do diabetes a visão.

Nós evidenciamos que após 60 dias os níveis hormonais estavam alterados nos grupos estudados, tanto da glicose quanto de T3, mostrando que esse modelo pode ser utilizado para avaliar alterações que esses hormônios em excesso provocam.

Assim, para avaliar as alterações na retina utilizamos as respostas do eletrorretinograma para comparar os diferentes grupos experimentais. Encontramos principalmente alterações na amplitude da onda a e sobretudo da onda b. A partir dos nossos resultados podemos inferir que o somatório das duas patologias endócrinas investigadas, diabetes e hipotireoidismo, propicia o agravamento das complicações no funcionamento retiniano medido por meio da eletrorretinografia, e é maior que nos casos das doenças estudadas isoladamente. Além disso, os resultados mostraram que os registros do ERG de ratos diabéticos foram mais afetados que dos animais com hipotireoidismo, indicando assim que o diabetes deve causar maiores alterações no funcionamento retiniano.

A literatura evidencia que as alterações em modelos estudados aparecem precocemente. Phipps e colaboradores (2004) mostraram que após dois dias o início do quadro de diabetes já existia alteração na resposta do ERG, piorando até a 12^o semana. Estas alterações agudas refletem tanto toxicidade do STZ ou hiperglicemia, como resultado de pâncreas comprometido. Já a diminuição na 12^o semana, é consistente com uma neuropatia diabética generalizada, pois as funções da camada dos fotorreceptores e da retina interna estão comprometidas.

As perdas de função da retina foram relatadas tanto em pacientes diabéticos quanto em modelos animais de diabetes do tipo I. A redução da amplitude e frequência dos potenciais oscilatórios foram as alterações mais frequentes.

Essas alterações podem ter diversas causas, as quais duas são mais aceitas. Primeiramente, Ino-Ue *et al* (2000) e MacGregor *et al* (1986) explicam que o aumento

da ativação da via do poliol e acúmulo de sorbitol promove alterações na retina, e gera uma hipoxia tecidual evoluindo para morte celular.

A segunda hipótese aceita é a da excitotoxicidade do glutamato. Apesar deste ser o principal neurotransmissor da retina, elevados níveis de glutamato na retina ocasionam neurodegeneração. Li e Puro (2002) mostraram que o diabetes causa uma disfunção no transportador de glutamato na retina, principalmente nas células de Muller. Esse processo aumenta a concentração de glutamato levando ao aumento da atividade dos receptores NMDA, aumentando o influxo de cálcio na célula iniciando a cascata fosforilativa que culminará na morte celular (PLANELLS-CASES *et al*, 2006; ZENG e LING, 2004).

Seguindo essa linha, Martin *et al* (2004) mostraram que há uma significativa diminuição na população de células ganglionares após a sexta semana do início do diabetes. Eles evidenciaram também que a morte dessas células é por apoptose devido ativação da caspase 3.

Logo, nossos resultados estão de acordo o que a literatura propõe, mostrando que a fisiopatologia do diabetes ocasiona diminuição das ondas do ERG. Nossos resultados estão em consonância com os trabalhos de Kusari *et al* (2007) e Phipps *et al* (2004) com diminuição das ondas a e b; Kohzaki *et al* (2008), com diminuição apenas da onda b. Todos esses estudos comparam grupo de ratos doentes com o controle, observando uma perda das fibras axonais na retina desses ratos doentes.

Além disso, Aizu *et al* (2002) e Moller *et al* (2003) propõem que a resposta à luz do fotorreceptor, responsável pela onda a, está relacionada com atividade de uma ATPase, e como o diabetes afeta essa enzima, provoca uma redução na amplitude da onda a, interferindo na cascata da proteína G. Assim a redução na amplitude da onda a em nosso estudo pode estar relacionada com este mesmo mecanismo.

Outro ponto de importante discussão é acerca do tempo de evolução clínica das complicações retinianas. Alguns trabalhos se contrapõem acerca do tempo exato do início das disfunções. Nossos dados mostram que a partir de 30 dias já ocorre importante alteração na retina dos ratos doentes, observadas no ERG, que estão de acordo com os achados que Kusari *et al* (2007) mostrou em seu trabalho, detectando uma redução nos registros do ERG após 2 semanas do início do diabetes.

Li *et al*. (2005) relataram uma perda de 30% da onda-b em duas semanas, enquanto que Hancock e Kraft relataram uma perda da onda-b de 33% após 12 semanas, mostrando que a diminuição da onda b existe nos ratos diabéticos. No entanto necessita-

se descobrir o mecanismo exato e o que interfere para que o tempo de evolução da doença seja diferentes.

Nós observamos que 15 dias após a combinação das duas doenças sobretudo a onda b já se apresentava reduzida, e com o evoluir do tempo como era esperado ocorre uma redução significativa tanto de onda a como da onda b. Esse perfil foi observado também no grupo de ratos diabéticos, porém no grupo de ratos com hipotireoidismo essas alterações só começaram a ser vistas após 60 dias, com ligeira redução nas ondas.

Esse dado está de acordo com Glaschke et al 2011, que mostram em seus experimentos que apenas após 12 semanas se iniciava o quadro de morte celular, principalmente da subpopulação de cone M, quando se trata de ratos adultos, pois já passaram do período crítico do desenvolvimento.

Dessa maneira, em relação ao hipotireoidismo apesar de visualmente as respostas apresentarem menores valores, estatisticamente não houve diferença, isso pode estar relacionado com o pequeno tempo da retirada da glândula e conseqüentemente supressão dos hormônios tireoidianos. Outro ponto a ser considerado o fato de se tratar de ratos adultos, sendo menos sensíveis a alteração na diminuição desses hormônios, e nos quais a retina já está formada.

Todavia, isso confronta o que Takaeda *et al* (1994) mostraram em seu estudo um atraso no tempo implícito na onda b em ratos adultos, como também mostrado por Glaschke *et al.*, 2011, que tratou ratos com metimazol, droga que deprime os níveis dos hormônios tireoidianos, mostrando alteração no padrão de distribuição de cones S e M desses roedores adultos por um período de quatro meses.

Quando comparamos os tipos diferentes de cones, não houve diferenças quanto os dois tipos, mas sim diminuição da amplitude e um retardo no tempo implícito dos grupos doentes em comparação ao grupo controle.

No entanto alguns trabalhos como o de Cho *et al* (2000) mostram que no diabetes há uma diminuição da população dos cones S. Já no hipotireoidismo, Pessoa *et al* (2008) e Glaschke *et al.*, (2011) relatam que há uma diminuição da população de cone M, pois o hormônio tireoidiano seria responsável pela diferenciação dos cones na retina como um todo.

A função dos bastonetes também se encontrou alterada, em relação a resposta estocópica máxima, semelhante ao encontrado nos estudos de Phipps *et al* (2004) que mostraram respostas sensivelmente menores após duas semanas, e avaliaram até 12

semanas, mostrando uma diminuição das respostas com o passar do tempo. O tempo implícito também encontrava-se alterado de forma similar aos nossos dados.

Todavia, a resposta eletrorretinográfica que encontra-se mais alterada é o potencial oscilatório, e ele segue o mesmo padrão das outras respostas, diminuindo significativamente com o passar do tempo. Estudos anteriores em humanos mostraram que o potencial oscilatório é preditivo da retinopatia, e reflete a sensibilidade destes componentes ao stress hipóxico causada por diabetes (Bui et al, 2003).

Assim os potenciais oscilatórios estão relacionados a alterações nas células interna da retina, tais como o aumento do metabolismo do glutamato e aumento da expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) nas células de Muller (Kirwin, *et al* 2011).

A hipótese que pode ser levantada acerca das complicações das duas doenças é de que os hormônios tireoidianos são importantes na homeostase da glicose. Brenta (2011) em seu trabalho afirma que os hormônios tireoidianos exercem ambas as ações agonistas e antagonistas de insulina em diferentes órgãos. No entanto, isso ocorre em um delicado equilíbrio necessário para o metabolismo normal da glicose. Dessa forma o somatório da deficiência pode levar a complicações mais graves do que o acometimento de somente uma patologia, como pode ser o caso da retina. Contudo, necessita-se de mais estudos para elucidar corretamente o mecanismo sinérgico de ambas as doenças, visando diminuir sérias complicações a pessoas portadoras dessas patologias.

5. CONCLUSÃO

O modelo experimental realizado no nosso laboratório é eficaz no estabelecimento das patologias, visualizando alterações no eletrorretinograma semelhantes ao de pacientes diabéticos e com hipotireoidismo.

Assim, com os resultados do nosso trabalho, podemos observar que as patologias, diabetes e hipotireoidismo associadas, podem ocasionar a piora da função visual de ratos acometidos por ambas as doenças.

Essa diminuição no funcionamento visual nos animais acometidos por ambas as doenças foi mais evidente nos tempos de 45 e 60 dias, mostrando que a evolução das doenças agrava o sistema visual.

Comparando os modelos foi evidente que o diabetes acomete mais rapidamente e de maneira mais agressiva o sistema visual do que o hipotireoidismo.

Outro achado importante foi a diminuição significativa na amplitude do potencial oscilatório no grupo com ambas as patologias em seqüências diferentes, como também a diminuição da onda b é mais evidente e mais precoce, podendo ser explicado por um comprometimento inicial da retina interna.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHNELT, P. K. & KOLB, H. The Mammalian Photoreceptor Mosaic-adaptive Design. **Progress in Retinal and Eye Research**. 19: 711-777, 2000.

AIZU, Y; OYANAGI, K.; HU, J.; NAKAGAWA, H. Degeneration of retinal neuronal processes and pigment epithelium in the early stage of the streptozotocin-diabetic rats. **Neuropathology**. 2: 161, 2002.

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.

BOGLIOLO, L. BRASILEIRO FILHO, G. **Patologia**. 6. ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2000.

BRENTA, G. Why Can Insulin Resistance Be a Natural Consequence of Thyroid Dysfunction? **Journal of Thyroid Research** 11, 2011.

BROWN, K. T. & WATANABE, K. Isolation and identification dos a potential from the pure cone fovea of the monkey retina. **Nature**.193: 958-960, 1964.

BUI, B.V., KALLONIATIS M, VINGRYS AJ. The contribution of glycolytic and oxidative pathways to retinal photoreceptor function. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. 44:2708–2715, 2003.

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.

BURNS, M.E. *et al*. Dynamics of Cyclic GMP Synthesis in Retinal Rods. **Neuron**. 36: 81-91, 2002.

CAJAL, S.R. **The Structure of the Retina**. Thomas, Springfield, 1972.

CAVALLI, V.L.L.O.; SORDI, C.; TONINI, K.; GRANDO, A. *et al.* Avaliação in vivo do efeito hipoglicemiante de extratos obtidos da raiz e folha de *Bardana Arctium Minus* (Hill). **Revista Brasileira Farmacognosia**. 17: 64-70, 2007.

CHO N. C., POULSEN G. L., VER HOEVE J. N., NORK T. M. Selective loss of S-cones in diabetic retinopathy. **Archives of Ophthalmology**. 118: 10 1393-400, 2000.

CHU, Y.; HUMPHREY, M.F.; CONSTABLE, I.J. Horizontal Cells of The Normal and Dystrophic Rat Retina: A Wholemout Study Using Immunolabelling for the 28-kDa Calcium-binding Protein. **Investigative Ophthalmology Visual Science**. 57: 141-148, 1993.

DACEY, D.M. Parallel pathways for spectral coding in primate retina. **Reviews in Neuroscience**. 23:743–775, 2000.

DI LEO, MAS; CAPUTO, S; FALSINI, B; PORCIATTI, V; MINNELLA, A; GRECO, AV; GHIRLANDA, G. Nonselective Less of Contrast Sensitivity in Visual System Testing in Early Type I Diabetes. **Diabetes care**. 15: 620-625, 1992.

DUNN J. T. Endemic goiter and cretinism: an update on iodine status. **Journal of Pediatric Endocrinology**. 14: 1469-73, 2001.

DUNN, J. T. & DUNN, A. D. Update on intrathyroidal iodine methabolism. **Thyroid**. 11: 407-14, 2001.

EULER, T.; WÄSSLE, H. Immunocytochemical identification of cone bipolar cells in the rat retina. **Journal of Comparative Neurology**. 361 (3): 461–478, 1995.

EWING F. M. E., DEARY I. J., STRACHAN., W. J., FRIER B. M. Seeing Beyond Retinopathy in Diabetes: Electrophysiological and Psychophysical Abnormalities and Alterations in Vision. **Endocrine Reviews**. 19: 462 – 476, 1998.

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.

FLETCHER, E.L., PHIPPS, J.A., WARD, M.M., PUTHUSSERY, T., WILKINSON-BERKA, J.L. Neuronal and glial cell abnormality as predictors of progression of diabetic retinopathy. **Current Pharmaceutical Design**, 13: 2699-2712, 2007.

FISHER, D. A. Thyroid disease in the neonate and childhood. In: De Groot LJ, editor. **Endocrinology**. Philadelphia: **Saunders**; 1981.

FONG DS, BARTON FB, BRESNICK GH. Impaired color vision associated with diabetic retinopathy: Early treatment diabetic retinopathy study report no. **American Journal of Ophthalmology**.128: 612-617, 1999.

FU, Y.; YAU, K-W. Phototransduction in mouse rods and cones. **Archieve European Journal Physiology**. 454: 805-819, 2007.

GUALTIERI, MIRELLA ; FEITOSA-SANTANA, CLAUDIA ; LAGO, MARCOS ; NISHI, MAURO ; VENTURA, DORA FIX . Early visual changes in diabetic patients with no retinopathy, measured by color discrimination and electroretinography. **Psychology & Neuroscience (Online)**, v. 6, p. 227-234, 2013.

GEGENFURTNER, K.R.; KIPER, D.C. Color Vision. **Annu Reviews in Neuroscience** 26: 181–206, 2003.

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

HANCOCK, H.A.; KRAFT, T.W. Oscillatory Potential Analysis and ERGs of Normal and Diabetic Rats. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. 45 (3), 2004

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

HYVÄRINEN, L; LAURINEN, P.; ROVAMO, J. Contrast sensitivity in evaluation of visual impairment due to diabetes. **Acta Ophthalmologica**. 61: 94-101, 1983.

INOUE M, ZHANG L, NAKA H, KURIYAMA H, YAMAMOTO M. Polyol metabolism of retrograde axonal transport in diabetic rat large optic nerve fiber. **Investigative Ophthalmology Visual Science**. 41: 4055–4058, 2000

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.

KLEIN I. Thyroid hormone and the cardiovascular system. **Am Journal Medical**. 88: 631-637, 1990.

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.

KOLB, H. Amacrine cells of the mammalian retina: neurocircuitry and functional roles. **Eye**. 11: 904-923, 1997.

KOHZAKI, K.; VINGRYS, A.J.; BUI, B.V. Early Inner Retinal Dysfunction in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. 49 (8), 2008

KUSARI, J.; ZHOU, S.; PADILLO, E.; CLARKE, K.; GIL, D.W. Effect of Memantine on Neuroretinal Function and Retinal Vascular Changes of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, 48 (11), 2007.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, 51: 216-226, 2008.

LERCO, M.M.; SPADELLA, C.T.; MACHADO, JLM. et al. Determinants of the experimental Diabetes mellitus, induced by Alloxan in rats. Clinical and Laboratory. **Acta Cirurgia Brasileira**. 18: 132-142, 2003.

LESLIE C.; FRANZ M. Experimental Diabetes Mellitus Impairs the Function of the Retinal Pigmented Epithelium. **Metabolism**, 35 (4): 28-34, 1986.

LI, Q.; PURO, D.G. Diabetes-induced dysfunction of the glutamate transporter in retinal Muller cells. **Invest Ophthalmology**, 43: 3109–3116, 2002.

LI, Q; ZEMEL, E.; MILLER, B.; PERLMAN, I. Early retinal damage in experimental diabetes: electroretinographical and morphological observations. **Investigative Ophthalmology Visual Science**. 74: 615–625, 2002.

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

LUU, C. ;SZENTAL, J.A. YEN LEE, Y.. LAVANYA, R. WONG, T.W. Correlation between Retinal Oscillatory Potentials and Retinal Vascular Caliber in Type 2 Diabetes. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, 51 (1), 2010.

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

MACGREGOR, L.C.; ROSECAN, L.R.; LATIES, A.M; MATSCHINSKY, F.M. Altered retinal metabolism in diabetes. I. Microanalysis of lipid, glucose, sorbitol, and myo-inositol in the choroid and in the individual layers of the rabbit retina. **Journal Biology Chemical**, 261: 4046–4051, 1986.

MARTIN, P.M.; ROON, P.; TRACY, K.; ELLS, V.; GANAPATHY, V.; SMITH, S.B. Death of Retinal Neurons in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, 45 – 9, 2004.

MILLER, R. F. & DOWLING, J. E. (1970). Intracellular responses of the Müller (glial) cells of the mudpuppy retina: their relation to the b-wave of the electroretinogram. **Journal of Neurophysiology**, 33: 323-341.

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.

MASLAND, R.H. The fundamental plan of the retina. **Nature Neuroscience**. 4 (9): 877-886, 2001.

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

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.

NG, Y.K.; ZENG, X.X.; LING, E.A. Expression of glutamate receptors and calcium-binding proteins in the retina of streptozotocin-induced diabetic rats. **Brain Research**., 1018: 66–72, 2004.

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.

PASCUAL, S. I., MOLANO, J. & PASCUAL-CASTROVIEJO, I. Electroretinogram in Duchenne/Becker muscular dystrophy. **Pediatric neurology**, 18: 315-320, 1998.

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.

PEICHL, L.; GONZÁLEZ-SORIANO, J. Morphological types of horizontal cell in rodent retinae: A comparison of rat, mouse, gerbil, and guinea pig. **Visual Neuroscience**, 11(3): 501-17, 1994.

PERLMAN, I. Relationship between the amplitudes of the b wave and the a-wave as a useful index for evaluating the electroretinogram. **British Journal of Ophthalmology**, 67: 443-448, 1983.

PILLERS, D. A. M. Dystrophin and the retina. **Molecular Genetics and Metabolism** 68: 304-309, 1999.

PHIPPS, J.A.; FLETCHER, E.L.; VINGRYS, A.J. Paired-flash identification of rod and cone dysfunction in the diabetic rat. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. 45:4592–4600, 2004.

PLANELLS-CASES R, LERMA J, FERRER-MONTIEL A. Pharmacological intervention at ionotropic glutamate receptor complexes. **Current Pharmaceutical Design**. 12: 3583–3596, 2006.

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

RAMSEY, D. J.; RIPPES, H.; QIAN, H. An Electrophysiological Study of Retinal Function in the Diabetic Female Rat. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, 47 (11), 2006.

ROBERTS, C. G. P. & LADENSON, P. W. Hypothyroidism. **The Lancet**. 363: 793–803, 2004.

RODRÍGUEZ-GALIETERO, A; MONTÉS-MICÓ, R; MUNOZ, G; ALBARRÁN-DIEGO, C. Blue-light filtering intraocular lens in patients with diabetes: Contrast sensitivity and chromatic discrimination. **Journal Cataract Refract Surgery**, 31: 2088-2092, 2005.

RIBEIRO, C.; OLIVEIRA, C.A.; MELLO, M.A.R. Exercício e prevenção do diabetes mellitus: importância do modelo experimental utilizando ratos Motriz **Revista Educação Física**. 13: 72-77, 2007.

SACKS, D.B.; BRUNS D.E.; GOLDSTEIN, D.E. *et al.* Guidelines and Recommendations for Laboratory Analysis in Diagnosis and Management of Diabetes mellitus. **Clinical Chemistry**. 48: 436 -472, 2002.

SCHEFFEL, R.S.; BOROLANZA, D.;WEBER, C.S. *et al.* Prevalências de complicações micro e macrovasculares e de seus fatores de risco em pacientes com diabetes melito tipo 2 em atendimento ambulatorial. **Revista Associação Médica Brasileira**. 50: 263-267, 2004.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes da Sociedade brasileira de Diabetes: 2011. Jardim londrina, SP: **Ac Farmaceutica**, 2011.

SZÉL, A.; ROHLICH, P. Two cone types of rat retina detected by antivisual pigment antibodies. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. 55: 47-52, 1992.

SZÉL, A.; LUKÁTS, A.; FEKETE, T.; SZEPESSY, Z.; ROHLICH, P. Photoreceptor distribution in the retinas of subprimate mammals. **Journal of the Optical Society of America A**. 17, 2000.

TREGEAR, SJ KNOWLES, PJ; RIPLEY, LG, ET AL. Chromatic-contrast threshold impairment in diabetes. **Eye**, 11: 537-546. 1997.

TAKEDA, M.; ONODA, N.; SUZUKI, M. Characterization of Thyroid Hormone Effect on the Visual System of the Adult Rat. **Thyroid**. 4: 467-474, 1994.

VILLENEUVE, LM. & NATARAJAN, R. The role of epigenetics in the pathology of

diabetic complications. **American Journal of Physiology**: 299: 14-25. 2010.

WACHTMEISTER, L. Oscillatory potentials in the retina: what do they reveal. **Progress in Retinal and Eye Research**, 17: 485-521, 1998.

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

WU, P. Thyroid Disease and Diabetes. **Clinical Diabetes**, 18 (1), 2000.

Anexo A – Aprovação no Comitê de Ética em pesquisa com animais de experimentação



PARECER BIO089-12

Projeto: INVESTIGAÇÃO ELETROFISIOLÓGICA DO DESEMPENHO VISUAL EM MODELOS ANIMAIS ACOMETIDOS CONCOMITANTEMENTE COM DIABETES E HIPOTIREOIDISMO

Coordenador(a): Prof. Dr. Fernando Allan de Farias Rocha

Área Temática: Biologia

Vigência: 01/2012 a 12/2013

Nº na CEPAE-UFPA: BIO089-12

O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). O tema eleito para a investigação é de alto teor científico justificando a utilização do modelo animal proposto. Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria Nº 3988/2011 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR** a utilização de animais de experimentação nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido. As atividades experimentais fora do período de vigência devem receber nova autorização deste comitê.

Betém, 01 de janeiro de 2012


Prof. Dr. Wallace Gomes Leal
Presidente do CEPAE-UFPA

Anexo B – Aprovação no 2014 ARVO Annual Meeting

Dear Bruno Gomes,

Congratulations! The abstract on which you are First Author has been accepted as a Poster Presentation at the 2014 ARVO Annual Meeting, Leading Eye and Vision Research, May 4-8, 2014, in Orlando, Florida.

Presentation Number - Posterboard Number: 6181 - B0086

Abstract/Presentation Title: Electroretinogram Findings in Animal Model of Concurrent Diabetes and Hypothyroidism

Session Number: 542

Session Title: ERG and VEP animal models

Session Date/Start Time: May 8, 2014 from 12:00 PM to 1:45 PM

Electroretinogram Findings in Animal Model of Concurrent Diabetes and Hypothyroidism

Gomes, B. D.¹; Guimarães, G.F.¹; Rabelo, N.F.¹; Hamoy, M.¹; Silveira, L.C.L.^{1,2}; Herculano, A.M.¹; Rocha, F.A.F.¹

1. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Brazil.
2. Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, Belém, Brazil.

Purpose: To investigate the retinal functional impairment due to concurrent diabetes and hypothyroidism using electroretinogram (ERG).

Methods: 16 Wistar rats (*Rattus norvegicus*) with two-months-old, were divided in four groups: control (glucose: 80.7±15.2; weight: 165.1±9.2); group with hypothyroidism induced by bilateral thyroidectomy (glucose: 84.4±12.1mg/dl; weight: 157.2±9.7g); group with diabetes induced by injection of 2% alloxan (200 mg/kg) intraperitoneally (glucose: 389.6±87.3mg/dl; weight: 189.7±12.8g); group with both, diabetes and hypothyroidism (glucose: 412.1±70.04mg/dl; weight: 187.53±14g). After

30 days of treatment electroretinograms were obtained using flash stimuli to evaluate physiological changes in scotopic and photopic light adaptation. Rod driven ERGs were obtained with 10 cd/m^2 flash after two log units attenuation. Mixed rod-cone driven ERGs were elicited with 10 cd/m^2 stimulation after 12 hours scotopic adaptation. Cone driven ERGs were obtained with 10 cd/m^2 stimulation after 10 minutes photopic adaptation.

Results: There was a decrease in the average amplitude of the a- and b-wave in animals with diabetes and both metabolic diseases in all light adaptations. When comparing the group with diabetes and the group with hypothyroidism, it was clear that diabetes provoked greater decrease in ERG amplitude (one-way ANOVA, $p= 0.05$). Moreover, the animals with both diseases showed a synergistic action of diabetes and hypothyroidism as verified by ERG amplitude decrease. In combined response (rods and cones) the highest statistical differences among groups were found. The mean a- and b-wave amplitude values were a-79.71 μV (± 15.18) and b-99.95 μV (± 30.60) for the group with both diseases; a-100.4 μV (± 13.31) and b-165.7 μV (± 20.85) for the group with diabetes; a-160 μV (± 19.72) and b-280.3 μV (± 54.47) for the group with hypothyroidism; a-179.3 μV (± 22.79) and b-332.3 μV (± 57.53) for control group.

Conclusions: The results support the hypotheses that both, photoreceptors and inner layers of the retina were affected by both diseases, but remarkably by diabetes. All ERG responses were significantly impaired, mainly those recorded after scotopic adaptation.

Key words: Electroretinogram, retina, hypothyroidism, diabetes.

Support details: CNPq#479500, CAPES, FINEP, FAPESPA, UFPA. LCLS is a CNPq research fellow.