

UFRRJ
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

DISSERTAÇÃO

**EFEITOS DA REPOSIÇÃO COM TIROXINA NAS ALTERAÇÕES
COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS PELO HIPOTIREOIDISMO EM
RATOS**

Phelipe Fontanezi Campos Garcia Fontes

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**EFEITOS DA REPOSIÇÃO COM TIROXINA NAS ALTERAÇÕES
COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS PELO HIPOTIREOIDISMO EM
RATOS**

PHELIPE FONTANEZI CAMPOS GARCIA FONTES

Sob a orientação do Professor

Emerson Lopes Olivares

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no curso de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas

Seropédica, RJ

Julho de 2015

616.444
F683e
T

Fontes, Phelipe Fontanezi Campos Garcia,
1987-

Efeitos da reposição com tiroxina nas alterações comportamentais induzidas pelo hipotireoidismo em ratos/ Phelipe Fontanezi Campos Garcia Fontes. - 2015.

40 f. : il.

Orientador: Emerson Lopes Olivares
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

Bibliografia: f. 35-40.

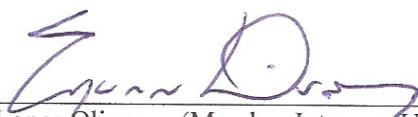
1. Hipotireoidismo - Teses. 2. Hormônio tireoidianos - Teses. 3. Hormônio - Efeito fisiológico - Teses. 4. Tiroxina - Teses. 5. Rato como animal de laboratório - Teses. 6. Rato - Comportamento - Teses. I. Olivares, Emerson Lopes, 1973- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

PHELIPE FONTANEZI CAMPOS GARCIA FONTES

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Fisiológicas**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Área de Concentração em Fisiologia e Farmacologia.

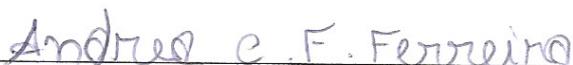
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 31/07/15



Prof. Dr. Emerson Lopes Olivares. (Membro Interno - UFRRJ)
(Orientador)



Prof. Dr. Wellington da Silva Côrtes. (Membro Interno - UFRRJ)



Profa. Dra. Andrea Cláudia Freitas Ferreira (Membro Externo - UFRJ)

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo apoio incondicional e pelo carinho recebido durante toda a minha vida.

À minha mãe Perina por tudo que me proporcionou, educação, carinho, amor, apoio e principalmente por ter sido a base de tudo.

À minha irmã e meu irmão por estarem sempre ao meu lado, em todos os momentos. Exemplos de companheirismo e lealdade.

Ao meu orientador Emerson Lopes Olivares por acreditar em mim e por ter sido fundamental nesta etapa de aprendizado que foi um marco para minha formação.

Aos amigos do DFC Roberto Laureano Melo, Cláudio da Silva Almeida, Rafael Sonoda Côrtes e Raquel Nascimento pelas colaborações de extrema importância no experimento, vocês foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Professor Wellington da Silva Côrtes pelos ensinamentos, auxílio e amparo nos momentos difíceis.

RESUMO

Fontes, Phelipe Fontanezi Campos Garcia. **EFEITOS DA REPOSIÇÃO COM TIROXINA NAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS PELO HIPOTIREOIDISMO EM RATOS**. 2015. 40p Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Instituto de Biologia, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

O hipotireoidismo é a patologia relacionada a deficiência hormonal mais comum, afetando mais de 10 milhões de pessoas nos Estados Unidos das Américas e cerca de 6,6 % da população adulta de São Paulo. Nesta doença é comum aparecerem sintomas de depressão e transtorno de ansiedade que são os distúrbios comportamentais mais comuns. Essas doenças comportamentais possuem alta comorbidade e podem agravar o quadro clínico quando ocorrem em indivíduos doentes. Sendo assim, a depressão aparece como a maior causa de incapacidade e acomete mais de 350 milhões de pessoas. Os transtornos de ansiedade possuem alta prevalência, por exemplo, 18,1% da população Norte Americana sofre deste transtorno. Neste contexto, cerca de 5-10% dos pacientes que sofrem de hipotireoidismo e são tratados com levotiroxina (L-T4) apresentam sintomas de depressão ou transtornos de ansiedade. Mesmo apresentando níveis de TSH e T4 dentro dos valores de referência a L-T4 parece não ser eficaz em reverter estes sintomas e isto pode estar associado ao fato desta abordagem farmacológica não reestabelecer o eutireoidismo em todos os tecidos. Somado a isto, há poucos estudos que avaliam estes transtornos comportamentais no hipotireoidismo e os respectivos efeitos da tiroxina. Portanto, o presente trabalho estudou as alterações comportamentais ocasionadas pelo hipotireoidismo através do protocolo de tireoidectomia total. Além disso, este estudo objetivou-se em verificar quais os efeitos da reposição com tiroxina sobre essas alterações. Para tanto, os animais foram divididos em 3 grupos: 1) Grupo controle/falso operado (SHAM); 2) Grupo tireoidectomizado (TX); 3) Grupo tireoidectomizado submetido a reposição hormonal (TX+T4). Estes animais foram submetidos a uma bateria de testes comportamentais para verificar comportamentos semelhantes à depressão e ansiedade. Também foi verificado o peso corporal dos animais durante o experimento, para verificar o aparecimento de hipotireoidismo, e o peso da adrenal. O grupo TX apresentou comportamentos análogos a depressão e ansiedade aumentados em relação ao SHAM. Já o tratamento com T4 reverteu tais comportamentos parcialmente. Diante destes resultados, observamos que a terapia convencional, monoterapia, falha em reverter todos os sintomas comportamentais ocasionados pelo hipotireoidismo. Estes dados estão em concordância com os apresentados na literatura que demonstram na clínica a ineficácia da L-T4 em reverter os referidos sintomas para uma parcela de pacientes.

Palavras-chaves: Hipotireoidismo, tiroxina, comportamento

ABSTRACT

Fontes, Phelipe Fontanezi Campos Garcia. **EFFECTS OF THYROXINE REPLACEMENT ON THE BEHAVIORAL ALTERATIONS INDUCED BY HYPOTHYROIDISM IN RATS.** 2015. 40p Dissertation (Master in Physiological Sciences). Instituto de Biologia, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

Hypothyroidism is the most common disease caused by hormone deficiency, affecting more than 10 million people in the United States of America and about 6.6% of the adult population of São Paulo. Symptoms of depression and anxiety often occurs in hypothyroid patients. Depression and anxiety disorders are the most common behavioral disorders. These behavioral disorders has high comorbidity and could aggravate the clinical progress when they occur in ill people. Thus, the depression is the major cause of disability and affects more than 350 million people. Anxiety disorders are highly prevalent, for example, 18.1% of the North American population suffers from this disorder. In this context, about 5-10% of hypothyroid patients shows symptoms depression and anxiety disorders even under treatment with levothyroxine (L-T4). Despite levels of TSH and T4 within the reference values L-T4 did not appear effective in reversing these symptoms and this can be linked to the fact that this pharmacological approach not restore euthyroidism in all tissues. Added to this, there are few studies that evaluate these behavioral disorders in hypothyroidism and effects of thyroxine. Therefore, this work studied the behavioral changes caused by hypothyroidism by total thyroidectomy protocol. Furthermore, this study aimed to verify in which the effects of replacement with thyroxine against these behavioral alterations. Therefore, the animals were divided into 3 groups: 1) Control group / false operated (SHAM); 2) thyroidectomized group (TX); 3) thyroidectomized Group receiving hormone replacement (TX + T4). These animals were subjected to a battery of behavioral tests to check behaviors similar to depression and anxiety. It was also observed body weight of the animals during the experiment to verify the onset of hypothyroidism, and adrenal weight. The TX group presented similar behavior to depression and anxiety increased when compared with the SHAM group. The treatment with T4 reversed partially these behaviors. Given these results, we found that conventional therapy alone, failure to reverse all the behavioral symptoms caused by hypothyroidism. These data are in agreement with data presented in the literature and it shows in clinical the L-T4 ineffectiveness in reverse the symptoms reported for a portion of patients.

Key words: Hypothyroidism, thyroxine, behavior

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 Transtornos de Ansiedade e Humor | 1 |
| 1.2 Tireoide, Síntese e Regulação dos Hormônios Tireoidianos | 3 |
| 1.3 Hipotireoidismo | 7 |
| 1.4 Hipotireoidismo e sintomas de transtornos de ansiedade e depressão | 9 |
| 1.5 Tratamento farmacológico do hipotireoidismo | 9 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 12 |
| 3 OBJETIVOS | 13 |
| 3.1 Objetivos Geral | 13 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 13 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 14 |
| 4.1 Animais | 14 |
| 4.2 Drogas | 14 |
| 4.3 Tireoidectomia | 14 |
| 4.4 Tratamento pós-operatório | 16 |
| 4.5 Ganho de peso corporal | 16 |
| 4.6 Peso relativo da adrenal | 16 |
| 4.7 Testes comportamentais | 17 |
| 4.7.1 Teste do campo aberto | 17 |
| 4.7.2 Caixa claro-escuro | 18 |
| 4.7.3 Teste do labirinto em cruz elevado | 19 |
| 4.7.4 Natação forçada | 20 |
| 4.7.5 Teste de preferência por sacarose | 21 |

| | |
|---|-----------|
| 4.8 Protocolo experimental | 22 |
| 4.9 Análise estatística | 22 |
| 5 RESULTADOS | 23 |
| 5.1 Peso Corporal | 23 |
| 5.2 Peso Relativo da Adrenal | 24 |
| 5.3 Campo Aberto | 24 |
| 5.4 Caixa Claro-Escuro | 25 |
| 5.5 Labirinto em Cruz Elevado | 26 |
| 5.6 Natação Forçada | 27 |
| 5.7 Preferência por Sacarose | 28 |
| 6 DISCUSSÃO | 29 |
| 7 CONCLUSÃO | 33 |
| 8 PERSPECTIVAS | 34 |
| 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 35 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Transtornos de humor e ansiedade

Dentre os distúrbios comportamentais mais comuns estão os transtornos de ansiedade e a depressão que possuem forte relação. A comorbidade entre depressão e ansiedade é muito marcante e implica na gravidade dos sintomas (APÓSTOLO *et al*, 2011).

A depressão que é a principal causa de incapacidade em todo o mundo, mais de 350 milhões de pessoas sofrem deste transtorno de humor. Casos mais severos de depressão podem levar ao suicídio, este aparece como causa de aproximadamente 1 milhão de mortes por ano (WHO, 2012). Vale ressaltar que a depressão é o transtorno de humor mais comum, e os transtornos de humor são alterações médicas com alta incidência dentro do cenário mundial acometendo indivíduos de todas as idades. São doenças de natureza crônica, na maioria das vezes, recorrentes, e que levam os indivíduos a perdas substanciais na capacidade de exercer suas atividades diárias (UEBELACKER *et al*, 2004). Além de estarem envolvidos com fatores psicossociais e capacidade cognitiva de um indivíduo, fatores genéticos e ambientais podem favorecer o aparecimento de sintomas em indivíduos já predispostos. Vale ressaltar que existe uma maior incidência desses transtornos em mulheres (FELDER *et al*, 2012).

A depressão maior é caracterizada pela perda de prazer (anedonia), apatia, alterações cognitivas (diminuição da capacidade de raciocinar adequadamente, de se concentrar ou/e de tomar decisões), psicomotoras (lentidão, fadiga e sensação de fraqueza), alterações do sono (mais frequentemente insônia, podendo ocorrer também hipersonolência), alterações do apetite (mais comumente perda do apetite, podendo ocorrer também aumento do apetite), redução do interesse sexual, retraimento social, ideação suicida e prejuízo funcional significativo (DEL PORTO *et al*, 1999; GORMAN, 2010). Segundo o manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais da associação norte-americana de psiquiatria, o que diferencia essa condição do humor “triste” é que se trata de uma condição persistente (a maior parte do dia, quase todos os dias, por, pelo menos, duas semanas), de maior intensidade ou mesmo por uma tristeza de qualidade diferente da tristeza habitual, acompanhada de sintomas específicos e que trazem prejuízo à vida (APA, 1994). Os principais fatores causadores da depressão são os psicossociais, relacionados principalmente com a qualidade de vida, como a

perda de entes queridos, solidão, alterações de convivência e em relacionamentos no ambiente de trabalho e vida pessoal, baixos níveis de socialização e o desamparo apreendido, caracterizado pela diminuição considerável no número de comportamentos “saudáveis”, resultando em vários tipos de “punições não contingentes” (SELIGMAN, 1992).

Além disto, a associação entre depressão e outras doenças é muito frequente, levando a pior evolução tanto do quadro psiquiátrico como das outras doenças associadas, com menor aderência às orientações terapêuticas, além de maior morbidade e mortalidade. (TENG *et al.*, 2005). Frequentemente observa-se que pacientes com depressão podem apresentar alterações tireoidianas, sendo a mais comum o hipotireoidismo, que pode ocorrer em formas subsindrômicas em até 17% dos pacientes com transtornos do humor (TENG *et al.*, 2005). Foi observado que no hipotireoidismo subclínico os sintomas de depressão são cerca de 2,3 vezes mais frequentes que entre os eutireoidianos.

Não menos impactante, os transtornos de ansiedade são os que têm maior prevalência tanto em adultos quanto em crianças (CASTILLO *et al.* 2000) como é mostrado neste grupo de pacientes dos quais cerca de 22,6% apresentam sintomas de transtorno de ansiedade (WHO, 2001). A alta incidência destes transtornos também se distribui em outros países, por exemplo, alguns estudos estimam que 26,2% da população dos Estados Unidos da América apresentam sintomas de transtornos psiquiátricos classificados segundo o Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, e que cerca de 18,1% da população Norte Americana apresentam sintomas de transtornos de ansiedade, obviamente não excluindo os casos em que essas doenças estão em comorbidade com outras condições psiquiátricas (KESSLER *et. al.* 2005).

Em relação à ansiedade, considera-se que é um sentimento natural assim como o medo e ocorrem naturalmente em resposta à ameaça. Porém enquanto o medo está associado com a presença de um estímulo aversivo real e há apenas o estímulo para o afastamento deste, a ansiedade ocorre quando há um potencial risco, seja pela novidade ou pela memória de outras situações de risco. Além disso, na ansiedade ocorre o conflito entre aproximação e afastamento do perigo (GRAEFF, 2007). Levando em conta que a ansiedade é uma resposta fisiológica alguns autores estabelecem que a ansiedade só é patológica quando é exagerada e interfere na qualidade de vida do indivíduo (SINGEWALD, 2007; CASTILLO *et al.* 2000).

Os transtornos de ansiedade são caracterizados por um conjunto de transtornos heterogêneos que incluem diferentes condições patológicas, tais como transtorno do pânico, fobia específica, fobia social, estresse pós-traumático, transtorno de ansiedade generalizada (TAG), transtorno obsessivo compulsivo, transtorno de estresse agudo, transtorno de ansiedade devido a condições médicas e transtorno de ansiedade induzido por substâncias (APA, 1994; GASCÓN *et al*, 2011; FARRIS *et al*, 2012;) . O TAG é caracterizado por ansiedade e preocupação excessiva à situações novas e persistentes, dificuldade de descontração e de controle das preocupações (VAN DER HEIDEN *et al*, 2011). Todas estas, na maioria das vezes, são acompanhadas por três dos sintomas: inquietação, fadiga, irritabilidade, perturbação do sono, dificuldade de concentração e tensão muscular (APA, 1994). Além disso, a TAG caracteriza-se por ser o transtorno de humor de maior concomitância com a Depressão maior (STOOP *et al*, 2011)..

Da mesma forma, sintomas de ansiedade também são mais frequentes no hipotireoidismo subclínico (ALMEIDA *et al.*, 2007) . Recentemente nosso grupo demonstrou relação entre alterações do eixo tireoidiano e aumento de comportamentos análogos a depressão em modelos animais. Neste protocolo foi utilizado estresse psicossocial e observou-se redução de hormônios tireoidianos no plasma, bem como, da atividade da desidase do tipo 2. Vale salientar que os animais com estas alterações apresentam comportamentos que são relacionados a anedonia em humanos (OLIVARES *et al.* 2012). Para um melhor entendimento aqui se faz necessária uma explanação sobre a economia de hormônios tireoidianos, antes que se fale da influência da desregulação destes hormônios sobre o comportamento.

1.2 Tireoide, Síntese e Regulação dos Hormônios Tireoidianos

A tireoide é uma glândula endócrina, localizada na região cervical sobre os primeiros anéis da traqueia. Produz dois hormônios, o T4 (3,5,3',5'-tetraiodo-L-tiroxina ou tiroxina) e o T3 (3,5,3'-triiodo-L-tironina), os hormônios tireoidianos (HT) que participam de etapas críticas da diferenciação, crescimento e metabolismo. Os HT controlam o funcionamento de diversos órgãos como cérebro, coração, fígado, rins, ovários, e outros, por isso, interferem diretamente em processos como: crescimento, ciclo menstrual, fertilidade, sono, raciocínio, memória, temperatura do corpo, batimentos cardíacos, eliminação de líquidos, funcionamento

intestinal, força muscular e controle do peso corporal. A tireoide é constituída histologicamente pelos folículos tireoidianos preenchidos com colóide e revestidos por células epiteliais. Estas células, denominadas células foliculares, são responsáveis pela captação de iodo para o folículo e secreção dos HT. (MAZZAFERRI, 1980; NUNES, 2003).

A síntese dos HT ocorre no folículo e depende da captação de Iodeto pela célula folicular. Para que estes processos ocorram normalmente deve haver uma ingestão satisfatória de iodo. A necessidade diária de iodo é de 90 µg para recém-nascidos e crianças, 120-150 µg para crianças em idades escolar e adolescência, 150-200 µg para adultos e 250-300 µg para gestantes e lactantes. Desta forma, uma baixa ingestão de iodo acarreta em uma baixa produção de HT e uma alta ingestão pode levar à uma elevada produção de HT ou até mesmo na baixa produção de HT por consequência de um efeito chamado de Wolff-Chaikoff que diminui a função tireoidiana e secreção de HT (NUNES, 2003, SCHOMBURG, 2011). A síntese dos HT seguem os eventos descritos: Inicialmente ocorre captação do Iodeto (I⁻), pela célula folicular, através da proteína NIS (sodium iodide symporter) que se localiza na membrana basolateral. Este transporte para o interior da célula ocorre contra um gradiente negativo pois, a célula tem uma concentração de I⁻ maior no seu interior em comparação com o meio extracelular. E este processo de captação ocorre graças à atividade da Na⁺/ K⁺ - ATPase que através de um transporte ativo promove o efluxo de 2 Na⁺ e o influxo de 1 K⁺ e concomitantemente a NIS transporta para o interior da célula 2 Na⁺ e 1 I⁻, sendo que o influxo sódio ocorre a favor do gradiente proporcionado pela Na⁺/ K⁺ - ATPase. O Iodeto captado se difunde para a membrana apical e é transportado para o lúmen, concentrado com colóide. Quando no lúmen o Iodeto é oxidado pela tireoperoxidase (TPO) e esta etapa é catalizada pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) que é gerado pela enzima Dual Oxidase ou DUOX. Em seguida ocorre a incorporação do iodo à tireoglobulina (TG), organificação do iodo ou iodação da TG, etapa também catalizada pela TPO. Ocorre a formação de diiodotirosina (DIT), quando duas moléculas de iodo são incorporadas à (TG), e monoiodotirosina (MIT), quando uma molécula de iodo é incorporada à (TG). Posteriormente ocorre o acoplamento de iodotirosinas, etapa também dependente de H₂O₂ e catalizada pela TPO. O acoplamento de MIT com DIT leva à formação de dois tipos de tironinas: a T3 e a triiodotironina reversa (ou T3 reversa ou rT3) que diferem quanto à posição de iodação, enquanto o acoplamento de duas DIT resulta na geração de tiroxina (T4, ou tetraiodotironina). Por fim, o acoplamento de duas

MIT dá origem à diiodotironina (T2), que, como o rT3, não apresenta efeito biológico reconhecido. O coloide contendo tireoglobulinas ligadas a DIT, MIT, T4 e T3 é absorvido por micropinocitose ou macropinocitose, quando há o estímulo do hormônio tireotrófico ou hormônio estimulador da tireoide (TSH). A TG será degradada por um processo enzimático liberando DIT, MIT, T4 e T3 e rT3. O iodo de MIT e DIT são removidos pela enzima desalogenase de tirosina e serão reutilizados em sínteses futuras de HT. Aproximadamente 10% do T4 sofre desiodação, sendo convertido em T3. Ao final do processo, glândula tireoide de um adulto normal libera cerca de 100 µg de T4/dia e 10 µg de T3/dia na circulação.(NUNES, 2003, SCHOMBURG, 2011). O processo de síntese dos HT está demonstrado na Figura 1, abaixo.

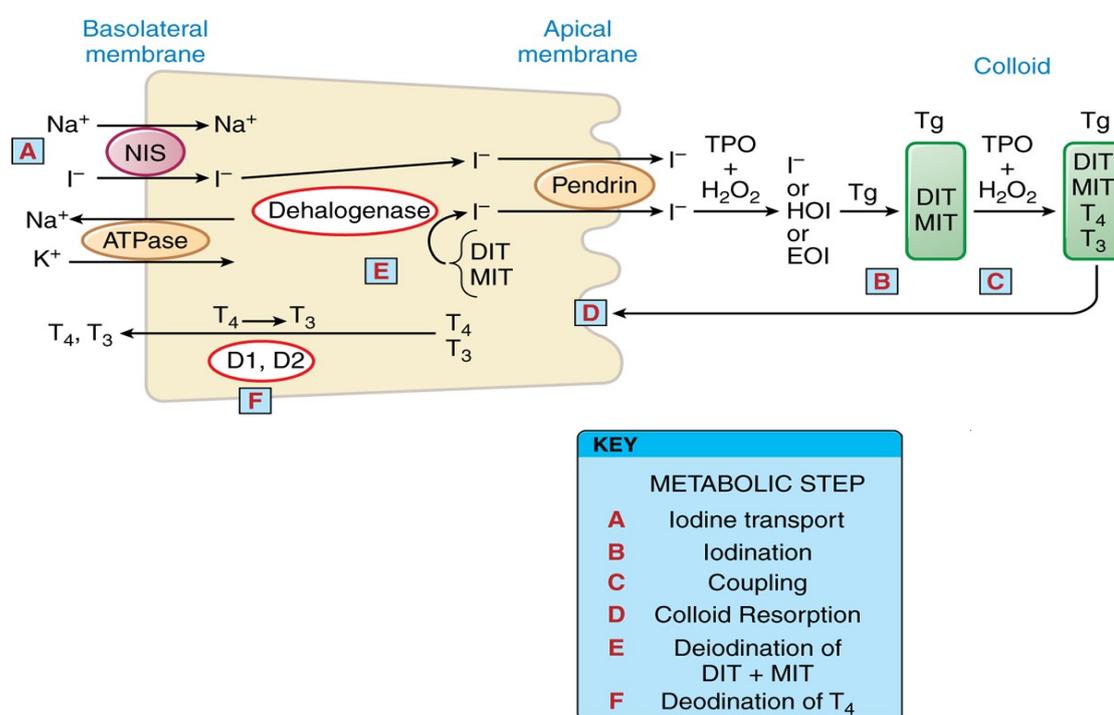


Figura 1. Etapas na síntese e secreção dos HT. As etapas estão representadas pelas letras em vermelho: A: Captação de iodo, B: Iodação da TG, C: Acoplamento de iodotirosinas, D: Reabsorção de coloide, E: Desiodação de DIT e MIT, F: Desiodação de T₄. Adaptado de GOODMAN e GILMAN, 2012.

A regulação da glândula tireoide se dá principalmente pelo eixo HPT (Hipotálamo-pituitária-tireoide) ou HHT (Hipotálamo-hipófise-tireoide). O TRH, hormônio liberador de

tireotrofina, é expresso em neurônios parvicelulares dos núcleos paraventriculares do hipotálamo, sendo armazenado nos axônios e liberado sob condições específicas, ao sistema porta hipotálamo-hipofisário, participando, assim, da regulação da atividade tireotrófica. A região promotora do gene do pré-pró-TRH apresenta elementos responsivos a vários hormônios e fatores transcricionais, o que revela a complexa regulação da sua expressão (NUNES, 2003, SCHOMBURG, 2011).

O TRH atua em receptores de membrana nos tireotrofos da glândula hipófise estimulando a transcrição gênica e a secreção de TSH . O hormônio tireotrófico ou tireotrofina (TSH) é sintetizado e secretado pelos tireotrofos, que compõem cerca de 5 a 10% das células da adeno-hipófise. O TSH é o principal regulador do crescimento e da função da glândula tireóide. Ele interage com receptores presentes na membrana da célula folicular ativando simultaneamente as proteínas Gs e Gq levando à ativação de vias intracelulares envolvidas na indução de seus efeitos proliferativos e na biossíntese e secreção de hormônios tireoidianos. Os principais reguladores da atividade do eixo HPT são os próprios hormônios tireoidianos que atuam no hipotálamo e hipófise, modulando tanto a síntese quanto a secreção de TRH e de TSH. Além da regulação neuroendócrina, os efeitos fisiológicos dos hormônios tireoidianos são regulados pelo metabolismo periférico dos hormônios exercido pela ação enzimática das selenioproteínas desiodases e da disponibilidade de iodo no organismo. Outros fatores, são capazes de alterar a atividade desse eixo, como: temperatura e luz ambiente, estado alimentar e estresse, levando à ajustes homeostáticos que confirmam a importante função desse sistema na adaptação ao frio, e às alterações no metabolismo energético e ao estresse (NUNES, 2003, SCHOMBURG, 2011).

Os HT são secretados em menor parte na forma biologicamente ativa, T3, aproximadamente 20%. Deste modo, a maior parte do T3 circulante é originado da desiodação do anel externo da molécula de T4 nos tecidos periféricos, através da ação de enzimas denominadas iodotironinas desiodases (BIANCO et al., 2002). Considerando a meia-vida longa do T4, uma semana em humanos, o papel do eixo HPT em regular a disponibilidade de T3 é complementado pela ação das iodotironinas desiodases, enzimas que ativam ou inativam os hormônios tireoidianos (BIANCO et al., 2002; BIANCO & KIM, 2006). Como demonstrado na figura 2, essas enzimas são divididas em duas classes: as

ativadoras (desiodase tipo 1, D1; desiodase tipo 2, D2) e a inativadora (desiodase tipo 3, D3 ; desiodase tipo 1, D1) dos hormônios tireóideos. A diferença quanto ao papel ativador ou inativador dessas enzimas sobre T3 e/ou T4 está no local de desiodação, mais especificamente, no anel interno ou externo. As enzimas D1 e D2 retiram o iodo da posição 3' ou 5' do anel externo da tiroxina, enquanto que a D3 remove o iodo do anel interno do T4 e do T3 (BIANCO & KIM, 2002; GEREBEM et al., 2007). A desiodase tipo 1 (D1) é expressa no fígado, tireóide e rim e catalisa conversão de T4 em T3. A desiodase tipo 2 (D2), que também converte T4 em T3, é expressa na tireoide, tecido adiposo marrom, pituitária e no cérebro onde se considera que são importantes locais para a manutenção estável da concentração dos hormônios tireoidianos (BIANCO & KIM, 2006).

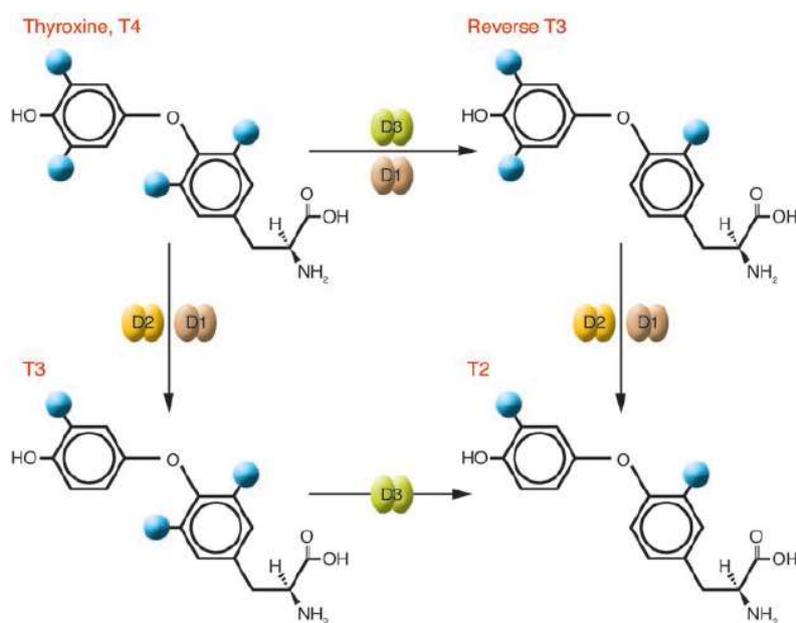


Figura 2. Reações básicas de desiodação (Adaptado de BIANCO & KIM, 2006)

1.3 Hipotireoidismo

O hipotireoidismo é a patologia mais comum dentre as patologias ocasionadas por deficiência hormonal, dados mostram que o hipotireoidismo afeta mais de 10 milhões de

norte-americanos. No Brasil, um estudo transversal realizado em São Paulo verificou que 6,6% dos indivíduos adultos analisados apresentavam a doença (DA SILVA et al., 2011 ;DE CASTRO et al., 2015)

Esta condição é definida como um estado clínico resultante de quantidade insuficiente de hormônios circulantes da glândula tireoide para suprir uma função orgânica normal. As manifestações clínicas desta doença é composta por uma extensa variedade de sinais e sintomas: fadiga/exaustão, sonolência, perda de concentração/memória, intolerância ao frio, constipação, depressão, ganho de peso, aumento de volume da tireoide, menstruação irregular, síndrome do túnel do carpo, déficit de audição, pele seca, unhas quebradiças, edema palpebral/ pretibial não compressivo, bradicardia, pressão alta e alteração do reflexo de aquiles (NOGUEIRA et al., 2011)

A forma mais comum é a doença tireoidiana primária, denominada de hipotireoidismo primário e é ocasionado por uma falência da própria glândula, mas também pode ocorrer hipotireoidismo devido à doença hipotalâmica ou hipofisária, denominado hipotireoidismo central (MULLER et al., 2008). E suas causas são: doença autoimune da tireoide, também denominada de Tireoidite de Hashimoto, deficiência de iodo, redução do tecido tireoidiano por iodo radioativo ou por cirurgia usada no tratamento de Doença de Graves ou do câncer da tireoide. Raramente a etiologia é relacionada a doença infiltrativa ou infecciosa da tireoide (NYS et al., 2009).

O hipotireoidismo central ocorre por estímulo insuficiente da glândula tireoide pelo TSH, por prejuízo na secreção ou hipofunção hipotalâmica (hipotireoidismo terciário) ou hipofisária (hipotireoidismo secundário). A ocorrência de hipotireoidismo central é menos frequente que do hipotireoidismo primário (PIMENTEL et al., 2005)

Já o hipotireoidismo subclínico, também denominado de doença tireoidiana mínima, é diagnosticado quando os níveis de hormônios tireoidianos estão dentro do valor de referência. No entanto, o hormônio tireotrófico (TSH) aparece elevado (FALASCHI et al., 2004). É importante destacar que não existe na literatura nível de TSH definido para o diagnóstico de hipotireoidismo subclínico. Esta condição pode representar uma falência inicial da glândula tireoide, principalmente por tireoidite autoimune e pode ocorrer na ausência de sintomas. O

hipotireoidismo subclínico pode progredir para o hipotireoidismo clínico e manifesto, manter-se relativamente estável por longos períodos ou regredir para normalização da função tireoidiana (NYS et al., 2009; SGARBI et al., 2013).

1.4 Hipotireoidismo e sintomas de transtornos de ansiedade e depressão

Doenças como depressão ou transtornos de ansiedade afetam cerca de 5-10% pacientes que sofrem de hipotireoidismo, em tratamento com levotiroxina (L-T4), apesar de níveis normais de Hormônio Tireotrófico (TSH). Essas queixas podem estar relacionada o aumento da razão tiroxina (T4) livre / triiodotironina (T3) livre, que ocorre em 30% dos indivíduos tratados em levotiroxina. Além disso, há evidências de que a levotiroxina não reestabelece o eutireoidismo em todos os tecidos e os níveis de TSH normalizados refletem apenas o eutireoidismo hipofisário (WIERSINGA, 2014). Isto pode estar relacionado com o fato das enzima desidase do tipo 2 sofrer inativação pelo T4. Portanto a elevada concentração de tiroxina em indivíduos tratados pode resultar na inativação da D2 levando à menor produção de T3.

No entanto é possível que este fato não ocorra em todos os tecidos. Assim, a ubiquitinação, que leva a inativação da D2 pode estar ocorrendo de forma distinta nos diferentes tecidos. Neste contexto, De Castro et al. (2015) descreveram que a D2 hipotalâmica é menos sensível a ubiquitinação (DE CASTRO et al., 2015).

1.5 Tratamento farmacológico do hipotireoidismo

Inicialmente, o tratamento padrão para o hipotireoidismo era a administração de preparações de extratos de tireoide. No entanto, o uso destes extratos foram substituídos por uma outra opção, a levotiroxina. Três fatores foram os prováveis responsáveis para a levotiroxina ter se tornando a terapia predominante: em primeiro lugar, o isolamento de T4 em 1927 por Kendall; em segundo lugar, a síntese de T4 e a seu sal sódico que apresentava melhor absorção; e em terceiro lugar, a demonstração de que T4 é largamente convertido para 3,5,3'-tri-iodotironina, fora do parênquima tireoidiano, em humanos. Estes fatores fizeram com que a levotiroxina e a normalização dos níveis de TSH se tornassem a abordagem padrão

no tratamento do hipotireoidismo. Já a utilização da liotironina não mostrou vantagens devido sua curta meia-vida, aparecimentos de efeitos adversos e necessidade de se utilizar uma posologia de difícil aderência, três doses diárias. (DE CASTRO et al., 2015; JONKLAAS et al., 2014)

Apesar de ser considerada a droga padrão ouro para o tratamento do hipotireoidismo, a levotiroxina falha em reestabelecer melhoras nos sintomas de alguns pacientes. Provavelmente por não atingir o eutireoidismo em todos os tecidos e órgãos (DANZI & KLEIN., 2005) Ademais, alguns pacientes apresentam melhora dos sintomas quando se adiciona liotironina (L-T3) ao tratamento (GRABENSTEIN., 2005; NYGAARD *et al.*, 2009). Em um estudo duplo-cego com pacientes hipotireoideos foi constatado que 49% preferiu a terapia combinada (L-T4 + L-T3) enquanto 15% preferiu a monoterapia. Ademais, foi observado que os pacientes que preferem a terapia combinada são os que apresentam maior incidência de sintomas de depressão (NYGAARD et al., 2009). Estes resultados estão em concordância com outro estudo clínico duplo-cego em que objetivou-se a comparar a efetividade da monoterapia e a terapia combinada em reverter esses sintomas (SAWKA et al., 2003).

Portanto, considerando que a depressão e o transtorno de ansiedade estão associados ao hipotireoidismo (MILLER *et al.*, 2006; ITTERMANN *et al.*, 2015) e levando em conta que uma parcela de pacientes não responder adequadamente à monoterapia com levotiroxina, postulou-se a hipótese de que a terapia combinada, isto é L-T4 + L-T3, pudesse ser mais efetiva nestes pacientes.

No entanto, pouco se sabe sobre as alterações comportamentais induzidas pelo hipotireoidismo em ratos. Quando se usa a base de dados “hipotireoidismo”, “ratos” e “comportamento” no portal <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> encontram-se poucos trabalhos que objetivaram caracterizar tais alterações. Além disso, não foram encontrados estudos aprofundados de avaliação comportamental de ansiedade/depressão no modelo de hipotireoidismo induzido por tireoidectomia em ratos.

Assim, considera-se imperativo estudos que caracterizem tais alterações em nível experimental, para servirem de base para estudos futuros comparando a eficácia dos dois tipos de abordagem farmacológica.

2 JUSTIFICATIVA

Atualmente o tratamento padrão para o hipotireoidismo é a reposição hormonal com levotiroxina. Apesar deste tratamento normalizar os níveis de TSH e T4, parâmetros principais utilizados na clínica, em alguns casos o tratamento padrão não é capaz de reverter os sintomas. Dentre os sintomas destacam-se o aparecimento de transtornos de ansiedade e depressão. Nestes casos é comum que se aumente a dose diária da droga, atitude a qual pode trazer efeitos adversos importantes e indesejáveis, como osteoporose e eventos cardiovasculares.

Neste contexto se fazem necessários estudos visando o melhor entendimento dos aspectos fisiopatológicos, comportamentais e comparativos entre a monoterapia e terapia combinada (T4 + T3). No entanto, devido a escassez de trabalhos na literatura sobre as alterações comportamentais induzidas pelo hipotireoidismo, é imperativo que se desenvolva estudos pré-clínicos para servirem de base aos estudos supracitados.

Dessa forma o presente estudo através de um protocolo de indução de hipotireoidismo pela remoção cirúrgica da tireoide (tireoidectomia) visa pesquisar inicialmente o possível efeito do hipotireoidismo no comportamento análogo a depressão/ansiedade e, em um segundo momento, o papel da tiroxina no controle de tais alterações.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Geral

Estudar as alterações comportamentais induzidas pelo hipotireoidismo e avaliar a eficácia da reposição de tiroxina na reversão de tais alterações em ratos Wistar.

3.2 Objetivos Específicos

I. Avaliar os efeitos do hipotireoidismo induzido por tireoidectomia total:

- No ganho de peso corporal;
- Na atividade exploratória;
- Na emocionalidade;
- Na indução de comportamentos análogos a ansiedade/depressão.

II. Avaliar os efeitos da reposição com tiroxina nas alterações comportamentais observadas no hipotireoidismo induzido por tireoidectomia total em ratos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram obtidos 27 ratos Wistar machos do biotério de criação da Universidade de São Paulo (USP) – Ribeirão Preto – SP. Os Ratos foram alocados no biotério experimental do departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em caixas (4 -5 animais por caixa). Todos animais foram mantidos em temperatura controlada (22 ± 2 °C), com ciclo claro-escuro 12/12 h (luz 7:00 às 19:00 horas) e ração e água *ad libitum*.

Todos os procedimentos realizados neste estudo estavam de acordo com as normas e princípios éticos preconizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/IB/UFRRJ), n. 6436/2015.

Após os protocolos de tireoidectomia, tratamento e testes comportamentais, os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação. Imediatamente após a eutanásia, foram recolhidas amostras de tecido e sangue para análises posteriores.

4.2 Drogas

Para indução da anestesia durante o procedimento cirúrgico foi utilizado cetamina 10% (Cetamin[®], Syntec) e xilazina 2% (Xilazin[®], Syntes). Após o procedimento cirúrgico foi utilizado, para antibioticoterapia profilática (Pencivet PPU Plus[®], MSD Saúde animal), contendo: benzilpenicilina procaína 10.000.000 UI, benzilpenicilina benzatina 10.000.000 UI, sulfato de dihidroestreptomicina 10.500 mg e piroxicam 1.000 mg em 100 mL. Para o tratamento de ratos tireoidectomizados foi utilizado metimazol (Sigma-Aldrich), visando à garantia da indução do hipotireoidismo, e para reposição hormonal tiroxina (Sigma-Aldrich). Vale destacar que o fármaco foi diluído em solução salina fisiológica e permaneceu sob refrigeração em alíquotas contendo 3 ml e concentração de 10µg/ml.

4.3 Tireoidectomia

Animais pesando 200-320g foram anestesiados por injeção intraperitoneal com uma mistura de cetamina e xilazina contendo 60 mg/kg e 8 mg/kg, respectivamente. Todo o

procedimento cirúrgico seguiu as recomendações da Associação Americana de Tireoide (ATA) (BIANCO et al., 2014), e de DE CASTRO et al., 2015 e ALZOUBI et al., 2009. E foram procedidos da seguinte forma: foi feita assepsia e tricotomia da região cervical anterior do animal. Após estes procedimentos iniciais uma incisão foi feita, em seguida foi procedida a abertura e, cuidadosamente, o afastamento das glândulas salivares e divulsão das metades do músculo esterno-hioideo que foi separado e afastado lateralmente, assegurando a visualização completa da glândula tireoide (figura 3). Em seguida a tireoide foi removida, bilateralmente, com o auxílio de uma tesoura Castroviejo. Vale ressaltar que todo o procedimento de remoção foi realizado com extremo cuidado para não danificar o nervo laríngeo.

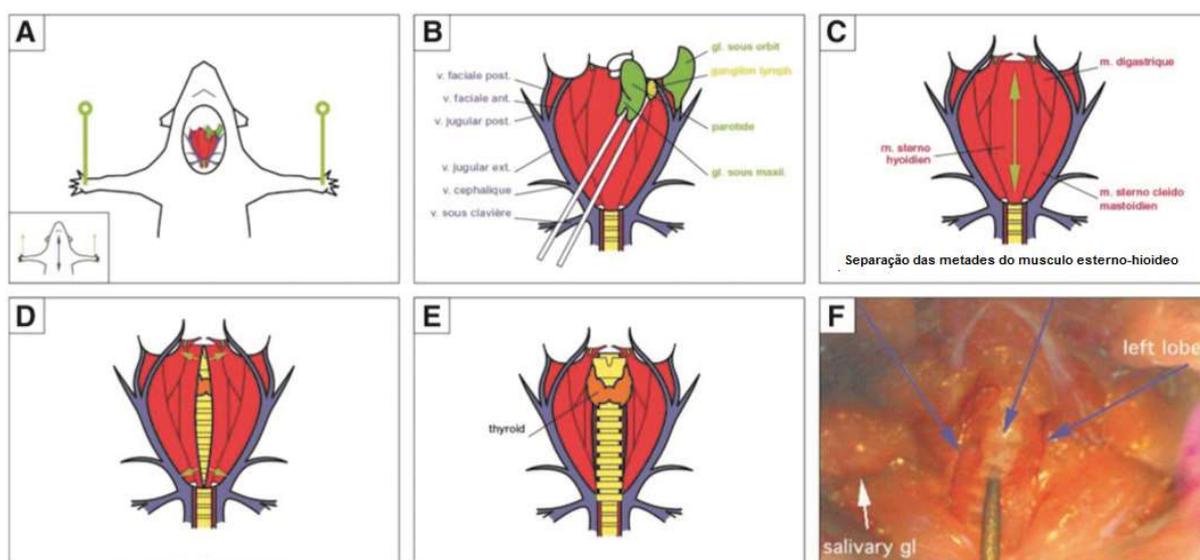


Figura 3. Representação esquemática do acesso à glândula tireoide. A: Incisão e abertura da pele. B: Afastamento das glândulas salivares. C: Separação do músculo esterno-hioideo. D: Afastamento lateral dos músculos. E e F: Visualização da tireoide. (Adaptado de BIANCO et al., 2014)

Após a remoção da tireoide os músculos e as glândulas salivares foram acomodados nas suas respectivas posições anatômicas originais. Posteriormente, foi realizada sutura simples e imediatamente após isto, foi administrado por via intramuscular uma droga (Pencivet PPU Plus[®]) a fim de proceder a profilaxia antimicrobiana. Para tal, foi utilizada a dose de 0,1ml/100g de peso corporal.

O mesmo procedimento foi realizado com o grupo controle (SHAM) com exceção da remoção da tireoide. Este grupo permaneceu com a glândula tireoide intacta sendo submetido

apenas à falsa cirurgia. Todos os animais foram observados até a recuperação da anestesia e foram tomados cuidados referentes à higienização da sutura até a cicatrização total destas.

4.4 Tratamento pós-operatório

Após procedimento cirúrgico os animais tireoidectomizados foram mantidos com metimazol 0,05% na água de beber e foram divididos em dois grupos: 1) Grupo (Tx+T4): Tratados com tiroxina, por gavagem, na dose de 1µg/100g de peso corporal/ dia, preconizada por DE CASTRO et al., 2015. Portanto, foi administrado 0,1 ml para cada 100g de peso corporal, tendo em vista que a concentração da solução de tiroxina é de 10µg/mL. 2) Grupo (TX) submetidos à gavagem com NaCl 0,9% 0,1ml /100g de peso corporal/ dia.

Os ratos do grupo controle (SHAM) obedeceram ao mesmo procedimento de tratamento do grupo TX, ou seja, gavagem com NaCl 0,9% 0,1ml /100g de peso corporal/ dia. É importante salientar que o tratamento dos animais foi iniciado no dia posterior a cirurgia e se manteve até o dia da eutanásia.

4.5 Ganho de peso corporal

O ganho de peso dos animais foi verificado a cada 2-3 dias com o auxílio de uma balança de mesa. O ganho de peso está diretamente ligado ao funcionamento da glândula tireoide, em ratos, quando se atinge um platô no acréscimo de peso pode-se definir um estado de hipotireoidismo sistêmico (BIANCO et al., 2014). As diversas pesagens realizadas a cada 2 -3 dias também serviram para manter uma dose adequada ao animal, conforme este vinha ganhando massa corporal.

4.6 Peso relativo da adrenal

Após a decapitação, as adrenais foram coletadas e pesadas. Através deste e do peso corporal final (peso obtido no dia da eutanásia), foi calculado o índice adrenal, com o intuito de avaliar a influência do estresse no aparecimento de hipertrofia adrenal (por atuação no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal). O cálculo foi feito normalizando-se o peso dos órgãos dividindo o peso do órgão pelo peso corporal, permitindo assim a comparação entre os resultados.

$$\text{Peso relativo da adrenal} = \text{Peso do órgão (g)} / \text{Peso Corporal (g)}$$

4.7 Testes comportamentais

Após 21 dias, da cirurgia e do início do tratamento, foram iniciados os protocolos de testes comportamentais listados: campo aberto, caixa claro-escuro, labirinto em cruz elevado, natação forçada e preferência por sacarose. Entre cada teste foi dado intervalo de um dia. Os testes foram realizadas entre 18:00 e 21:30 horas, exceto o teste da caixa claro-escuro que foi realizado entre 8:00 e 12:00 e o teste de preferência por sacarose, iniciando 8:00 e realizado por 24h. Durante cada teste, os experimentadores ficavam do lado de fora da sala de comportamento. No entanto, no intervalo entre os testes, os mesmos entravam na sala, retiravam os animais e higienizavam devidamente os aparatos com álcool 10%. Para o teste de preferência por sacarose o procedimento realizado será abordado detalhadamente adiante. Ademais, é importante salientar os testes foram realizados em sala escura (luz vermelha), isolada acusticamente e com temperatura ideal (~22°C), sendo monitorados e gravados por câmera infravermelho.

4.7.1 Teste do campo aberto

Este teste é um simples protocolo, cuja avaliação dos seus componentes têm sido amplamente utilizada para determinação de emocionalidade (ROTH & KATZ, 1980) e da atividade locomotora espontânea e exploratória em roedores (WALSH & CUMMINS, 1976). Além disso, este teste também é considerado um modelo confiável para se testar drogas com propriedades ansiolíticas (PRUT & BELZUNG, 2003).

Cada animal foi inserido individualmente no centro de uma caixa de acrílico (80 cm x 80 cm x 30 cm) dividida igualmente em 25 quadrantes distribuídos em três diferentes zonas (central, intermediária e periférica), onde os mesmos foram permitidos a explorar o ambiente por 5 minutos (figura 4). Nesse protocolo, foi avaliada a distância, ou quadrantes, total percorrida, distância, quadrantes, percorrida na zona central, o número de rearings (levantamento das patas dianteiras apoiadas contra a parede da arena), o tempo de permanência na zona central, razão central (relação entre distância percorrida no centro e distância total). Terminado o ensaio, o número de bolos fecais na arena é contabilizado. Neste teste, a atividade locomotora/exploratória é indicado pela distância total percorrida e pelo número de rearings, enquanto o tempo de permanência nos cantos e o número de bolos fecais

são utilizados para avaliar o grau de emocionalidade. Por fim, as respostas semelhantes à ansiedade estão ligadas ao tempo de permanência no centro e pela razão central (MCILWAIN et al., 2001).



Figura 4. Teste do campo aberto (Acervo próprio).

4.7.2 Caixa claro-escuro

Este teste se baseia na aversão inata que os roedores possuem em relação a ambientes muito iluminados e no comportamento exploratório espontâneo dos roedores a fatores estressores moderados, como, ambientes novos e luz (CRAWLEY & GOODWIN, 1980). Para a realização do referido teste foi utilizado uma caixa de acrílico com tampa e divisória preta entre lado claro e lado escuro, de dimensões: lado claro A x C x L (cm) 210 x 450 x 410 e lado escuro: A x C x L (cm) 210 x 350 x 410 (figura 5). A tampa do lado escuro é opaca, dessa forma somente um lado é iluminado. Na divisória entre os lados há uma pequena abertura (12,5 cm de comprimento x 8 cm de altura) que permite que os animais transitem de um lado para outro. Os animais foram colocados individualmente na caixa, do lado claro e de modo que foi permitido mover-se livremente entre os dois lados, durante 5 min. Durante este tempo, foram verificados o tempo que o animal permaneceu no lado da claro da caixa, latência para primeira entrada no lado escuro, o número de transições, extensões das patas posteriores (SAP), levantamentos (rearing) e bolos fecais.

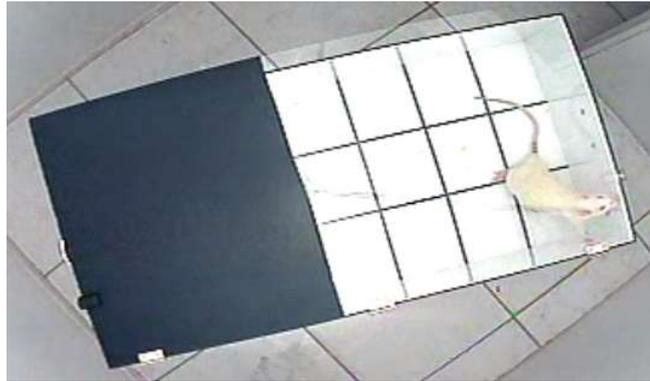


Figura 5. Caixa claro-escuro (Acervo próprio).

4.7.3 Teste do labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado reflete um conflito entre a preferência dos roedores por áreas protegidas e sua motivação natural de explorar novos ambientes. Dessa forma, este teste presta-se à avaliação de aspectos relacionados à ansiedade e medo (PELLOW et al., 1985). Além disso, durante este teste é possível avaliar aspectos que envolvem a tomada de decisão dos animais, que está diretamente relacionado à análise de risco e, conseqüentemente, com o status de ansiedade (MIKICS et al., 2005). O aparato utilizado no teste do labirinto em cruz elevado consiste em dois braços abertos (50 x 10 cm) cruzados por dois braços opostos fechados com as mesmas dimensões, situados a 40 cm de altura em uma sala com luz vermelha. Os braços são conectados por uma plataforma central (10 x 10 cm), cuja estrutura é semelhante a uma cruz (figura 6). Desse modo, os ratos foram inseridos individualmente na plataforma central da cruz com a cabeça voltada para um dos braços fechados, sendo permitida a exploração do aparato por 5 minutos. Durante este período, parâmetros relacionados ao comportamento semelhante à ansiedade tais como: o tempo de permanência e a frequência de entradas nos braços abertos e fechados foram registrados. No entanto, é importante frisar que somente era contabilizado como entrada aquela tentativa em que os animais posicionavam todas as patas em um dos quatro braços. Após a avaliação dos parâmetros anteriores, a percentagem de entradas nos braços abertos e o tempo de permanência na plataforma central foram calculados. Além disso, a atividade exploratória e o comportamento de tomada de decisão foram avaliados, respectivamente, pelos seguintes

parâmetros: número de imersões de cabeça (head-dipping), movimentos verticais (rearing) e número de extensões das patas posteriores (SAP) e bolos fecais.



Figura 6. Teste do labirinto em cruz elevado (Acervo próprio).

4.7.4 Natação forçada

Este teste baseia-se na observação de que os roedores após a execução inicial de movimentos orientados de escape desenvolvem uma postura imóvel quando colocado numa situação estressante inevitável (PORSOLT et al., 1977). Neste teste, os ratos foram introduzidos individualmente em um cilindro de polipropileno de 25 cm de diâmetro contendo água a 25°C a uma profundidade de 50 cm (figura 7). Dessa maneira, os animais eram incapazes de escapar ou tocar no fundo do cilindro. Para reconhecimento e adaptação do teste, vinte e quatro horas antes, os ratos foram submetidos a sessões de treinamento por 15 minutos. Já no dia seguinte, os mesmos animais foram submetidos ao teste válido da natação forçada por 5 minutos. Durante esse período, foram contabilizados os seguintes parâmetros: o tempo de imobilidade e o tempo de escalada. Sabe-se que a imobilidade pressupõe uma baixa capacidade de resiliência e, por conseguinte, um elevado status de comportamento semelhante

à depressão (PORSOLT et al., 1979). Vale ressaltar que após os testes os ratos eram enxugados com uma toalha seca para posteriormente retornarem a suas caixas de origem.

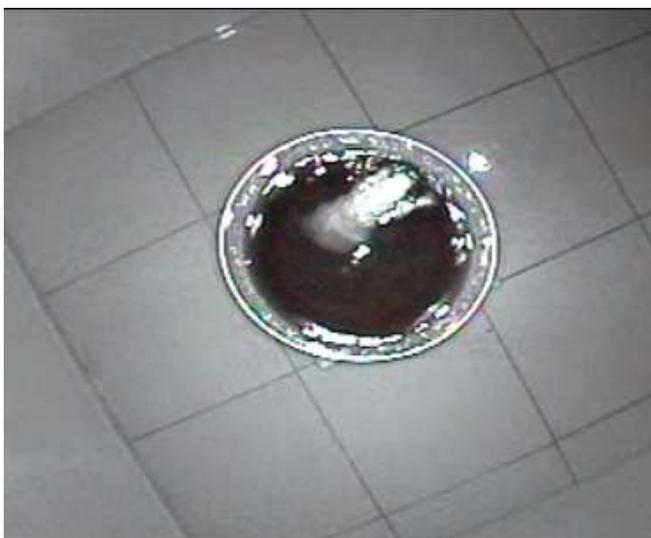


Figura 7. Natação forçada (Acervo próprio).

4.7.5 Teste de preferência por sacarose

Para avaliação de comportamento análogo a depressão, neste caso anedonia, os animais foram separados em gaiolas individuais e foram oferecidas duas garrafas, uma contendo água e outra solução de sacarose 0,08%. Inicialmente as garrafas de água pura e solução de sacarose foram pesadas (peso inicial) para em seguida, serem oferecidas ambas as garrafas para os ratos, por um período de 24 horas, e depois estas eram novamente pesadas (peso final). O consumo, tanto de água como de sacarose foi calculado pela diferença entre os pesos inicial e final (OLIVARES et al., 2012). A preferência foi calculada em valores percentuais, pela razão entre o consumo de sacarose (peso inicial menos o peso final em gramas das garrafas de sacarose) e o consumo total (consumo de água (peso inicial menos o peso final em gramas das garrafas de água) + consumo de sacarose (peso inicial menos o peso final em gramas das garrafas de sacarose)) e multiplicando-o por 100.

4.8 Protocolo experimental

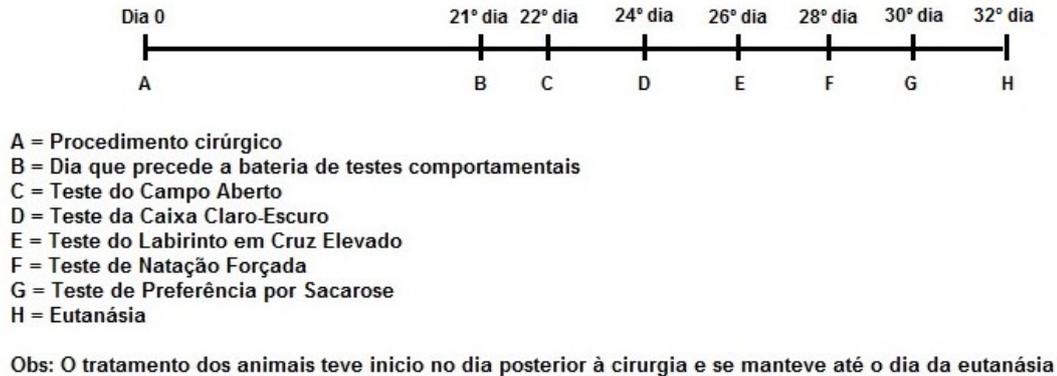


Figura 8. Representação esquemática do protocolo experimental.

4.9 Análise estatística

Todos os resultados obtidos foram apresentados em valores de média \pm erro padrão. A suposição da distribuição normal dos dados foi avaliada com o teste Shapiro-Wilk. Dessa forma, se os dados passassem no teste de normalidade, comparações paramétricas foram realizadas. Nesse caso, foi utilizado a ANOVA de uma via ou de duas vias, seguido do teste de Tukey. Caso as amostras não tivessem distribuição normal, o teste escolhido foi o Kruskal-Wallis. Não obstante, foi usado a estatística robusta e o teste de Grubbs para detecção de valores aberrantes. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando os valores de $p < 0,05$. Vale destacar que o software GraphPad Prism 5 (La Jolla, CA, EUA) foi utilizado para todas as análises estatísticas.

5 RESULTADOS

5.1 Peso Corporal

O peso corporal dos animais foi mensurado ao longo de todo o experimento. De acordo com teste ANOVA de duas vias, foi verificado um efeito fortemente significativo do tratamento [$F(2,24) = 19,45$; $p < 0,001$], do tempo [$F(15,360) = 307,8$; $p < 0,001$] e da interação entre ambas as variáveis experimentais [$F(30,360) = 95,34$; $p < 0,001$]. Além disso, ao realizar o teste Tukey, a partir do 12º dia de experimento, foi observada a redução do peso corporal dos animais do grupo TX em relação ao grupo Sham, que se manteve até o final do protocolo experimental. Além disso, observou-se que o tratamento com T4 (grupo TX + T4) atenuou a queda do peso corporal, uma vez que, embora os valores de peso corporal tenham sido menores em relação ao grupo Sham ($P < 0,05$), esta queda ocorreu somente a partir do 30º dia pós-cirurgia e apresentou-se sempre maior do que o grupo TX até o fim do experimento. (Figura 9).

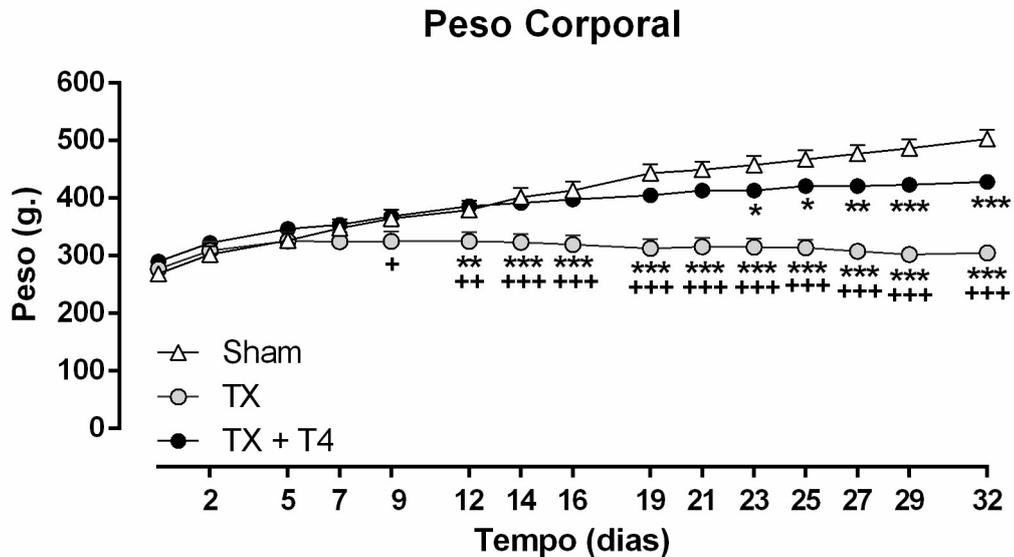


Figura 9: Efeito da tireoidectomia e da reposição com T4 no peso corporal dos animais ao longo do experimento. * representa $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, quando comparados ao grupo controle. + representa $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$ e +++ $p < 0,001$, quando comparados ao TX+T4.

5.2 Peso Relativo da Adrenal

O peso relativo da adrenal dos animais (Figura 10) foi mensurado ao término do experimento. De acordo com teste ANOVA de uma via, foi verificada uma diferença significativa nesse parâmetro ($F = 4,01$; $p < 0,05$). Ao realizar o teste Tukey, ainda foi observado que a reposição com T4 reduz o peso relativo da adrenal quando comparado ao grupo TX ($p < 0,05$).

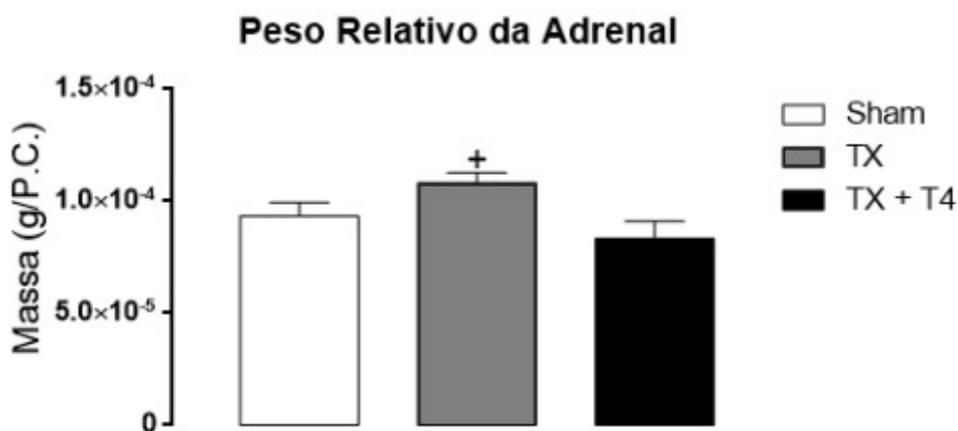


Figura 10: Efeito da tireoidectomia e da reposição com T4 no peso relativo da adrenal dos animais ao término do experimento. + representa $p < 0,05$ quando comparados ao TX+T4.

5.3 Campo Aberto

Nesse clássico teste de avaliação locomotora e exploratória (Figura 11), não foram encontradas diferenças significativas no número de quadrantes totais percorridos ($p = 0,84$) e no número de rearings ($p = 0,13$). Também não houveram diferenças nas variáveis relacionadas ao comportamento semelhante à ansiedade, dentre as quais destacamos: tempo na zona central ($p = 0,55$), quadrantes centrais percorridos ($p = 0,90$) e razão central ($p = 0,93$). Todavia, houve diferença significativa no número de bolos fecais ($F = 12,27$; $p = 0,0002$). Ao realizar o teste Tukey, foi demonstrado que tanto o grupo TX quanto o grupo TX+T4 tiveram uma redução significativa desse parâmetro quando comparados ao controle ($p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente).

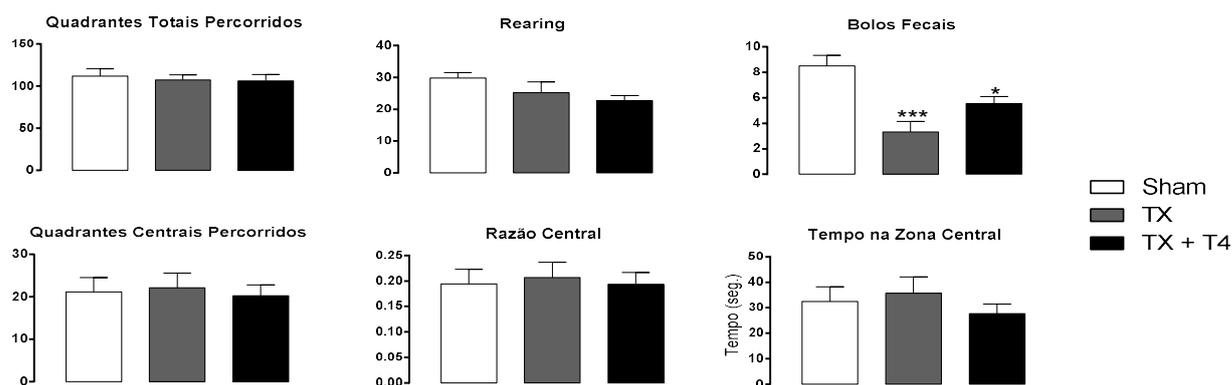


Figura 11: Efeito da tireoidectomia e da reposição com T4 nos parâmetros comportamentais do teste do campo aberto. * representa $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$, quando comparados ao grupo controle.

5.4 Caixa Claro-Escuro

Nesse teste, que aborda o medo natural dos roedores por ambiente intensamente luminosos e brilhantes (Figura 12), não foram observadas diferenças significativas nos seguintes parâmetros referentes ao comportamento semelhante à ansiedade: transições ($p = 0,77$), tempo de permanência no lado claro ($p = 0,64$) e SAP ($p = 0,32$). Também não foram verificadas diferenças significativa no número de rearings ($p = 0,60$) e bolos fecais ($p = 0,30$). Todavia, houve diferença significativa na latência para entrada no lado escuro ($F = 7,98$; $p = 0,002$).

Ao realizar o teste Tukey, foi demonstrado que tanto o grupo TX quanto o grupo TX+T4 tiveram uma redução significativa desse parâmetro quando comparados ao controle ($p < 0,01$). Vale ressaltar que esse parâmetro sobretudo indica uma alteração no comportamento natural dos animais em resposta a ambientes aversivos.

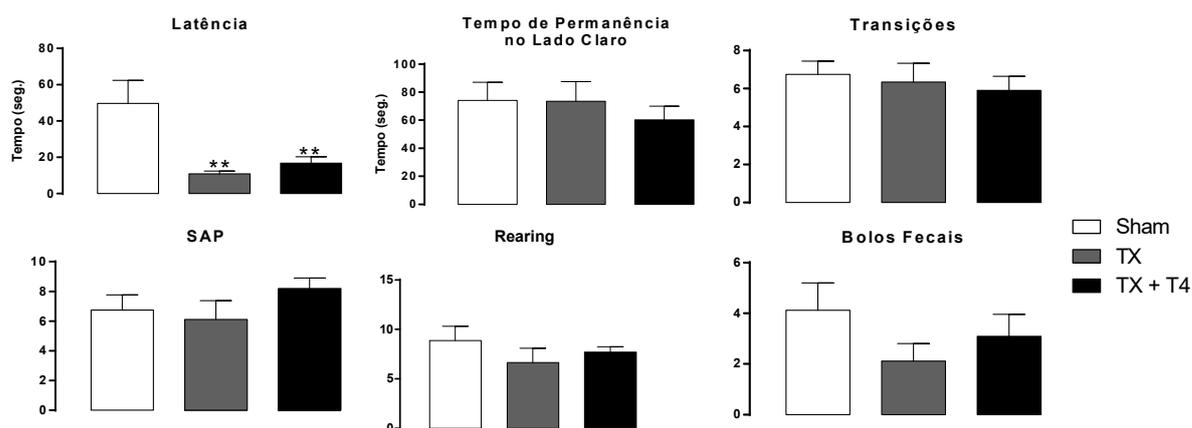


Figura 12: Efeito da tireoidectomia e da reposição com T4 nos parâmetros comportamentais do teste da caixa claro-escuro. ** representa $p < 0,01$, quando comparados ao grupo controle.

5.5 Labirinto em Cruz Elevado.

Nesse teste, que aborda o medo natural dos roedores por ambientes elevados e desprotegidos (Figura 13), foram observadas diferenças significativas no tempo de permanência nos braços fechados ($F = 3,91$; $p = 0,03$) e na porcentagem de entradas nos braços abertos ($F = 5,42$; $p = 0,01$). Ao realizar o teste Tukey, foi observado que o grupo TX apresentou aumento significativo no tempo de permanência nos braços fechados e redução na porcentagem de entrada nos braços abertos quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$). Embora não tenha sido caracterizada uma diferença estatística, foi constatada uma forte tendência à significância no tempo de permanência nos braços abertos ($F = 3,16$; $p = 0,06$). Também foi verificada diferença significativa no parâmetro de exploração head dipping ($F = 7,45$; $p = 0,0033$), claramente reduzido no grupo TX quando comparado ao grupo Sham ($p < 0,01$). É necessário destacar que o tratamento com T4 reverte as variáveis ansiogênicas observadas no grupo TX.

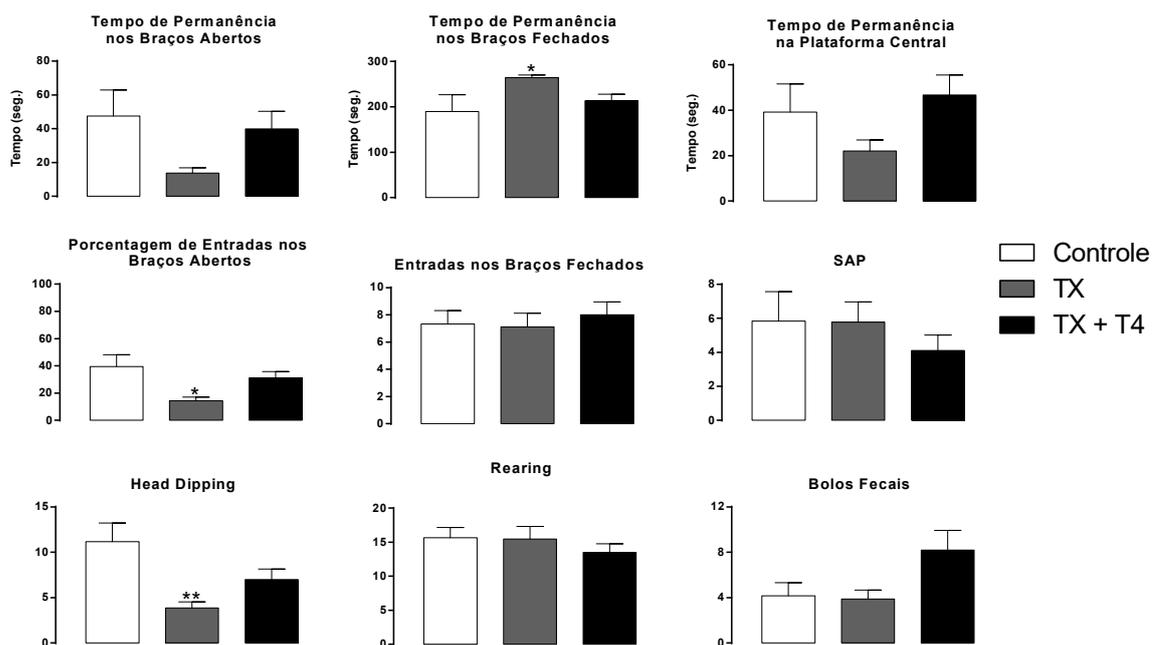


Figura 13: Efeito da tireoidectomia e da reposição com T4 nos parâmetros comportamentais do teste labirinto em cruz elevado. * representa $p < 0,05$ e **, $p < 0,01$, quando comparados ao grupo controle.

5.6 Natação Forçada

Nesse clássico teste de avaliação de comportamento semelhante à depressão (Figura 14), foram verificadas diferenças significativas tanto no tempo de imobilidade ($F = 6,92$; $p = 0,004$) quanto no tempo de escalada ($F = 7,35$; $p = 0,003$). Ao realizar o teste Tukey, foi verificado que o grupo TX teve maior tempo de imobilidade do que o grupo controle ($p < 0,05$) e à reposição com T4 foi efetiva em evitar esta alteração, pois não observou-se diferença no grupo TX + T4 em relação ao SHAM ($p > 0,05$).

Em relação ao tempo de escalada, também foi observado que o grupo TX teve menor tempo de escalada do que o grupo submetido à reposição com T4 ($p < 0,01$). Mais uma vez, não observou-se diferença no grupo TX + T4 em relação ao SHAM reforçando a eficácia da reposição com T4 em evitar ao surgimento de alterações comportamentais afetivas.

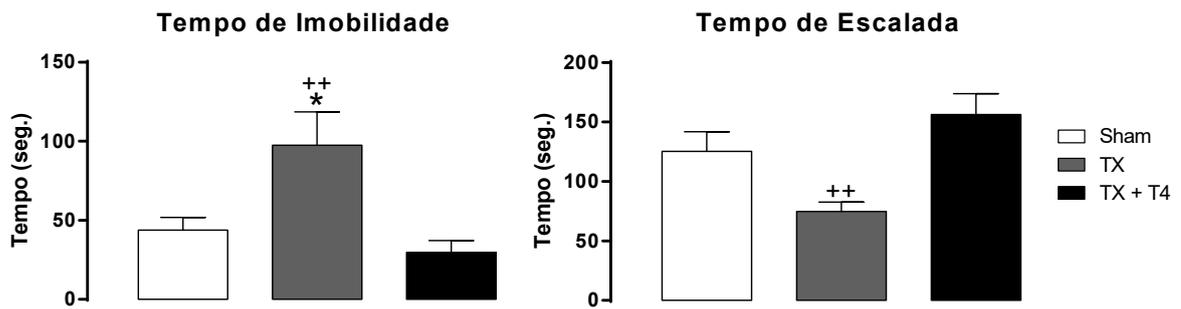


Figura 14: Efeito da tireoidectomia e da reposição com T4 nos parâmetros comportamentais do teste da natação forçada. * representa $p < 0,05$, quando comparados ao grupo controle. ++ representa $p < 0,01$, quando comparados ao grupo TX+T4.

5.7 Preferência por Sacarose

Esse teste é capaz de indicar um dos principais sinais de comportamento semelhante à depressão: a anedonia (Figura 15). Embora tenham sido caracterizadas diferenças significativas no teste da natação forçada, o mesmo não foi observado no teste de preferência à sacarose em nenhum dos grupos experimentais ($p = 0,60$).

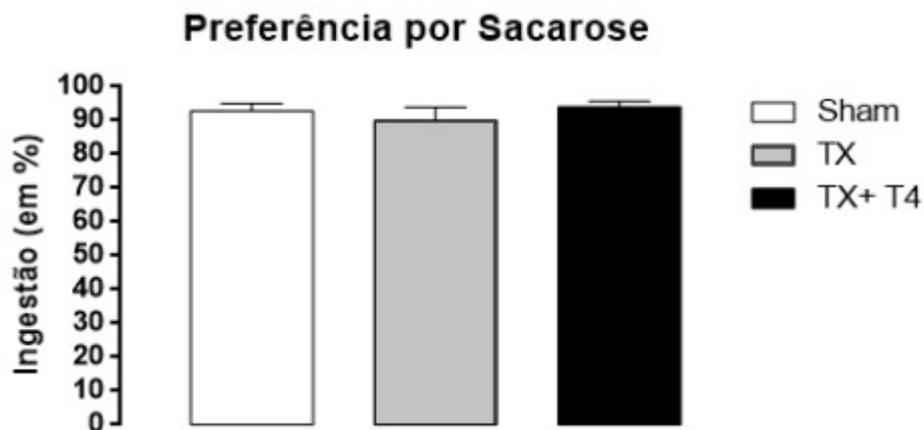


Figura 15: Efeito da tireoidectomia e da reposição com T4 nos parâmetros comportamentais do teste de preferência à sacarose.

6 DISCUSSÃO

A metodologia utilizada para indução do hipotireoidismo mostrou-se eficaz, mesmo sem dados referentes às dosagens de TSH, T4 e T3. Para confirmar a eficácia dos procedimentos cirúrgicos utilizamos como parâmetro o ganho de peso corporal até o dia da eutanásia. Nossos resultados demonstram que o grupo TX apresentou redução do peso corporal em relação ao grupo SHAM e TX-T4 a partir do 12º enquanto o grupo TX+T4 e SHAM continuaram a exibir aumentos no peso corporal. Estes dados estão em concordância com o Guia da Associação Americana de Tireoide para investigação da economia e ação do hormônio tireoidiano em roedores e modelos de celulares (BIANCO et al., 2014).

Primeiramente, sabe-se que o aumento do TSH e a queda dos níveis de T4 no soro representam as primeiras alterações na disfunção do funcionamento da tireoide. No entanto, um tempo maior é necessário para que os níveis de T3 baixem, levando em conta que o T3 é o hormônio biologicamente ativo, o hipotireoidismo sistêmico se instalará quando este apresentar uma queda considerável, metade do valor de referência. Não obstante, esta queda pode não se traduzir em um hipotireoidismo tecidual pelo fato de que a redução da atividade tecidual do T3 pode não ocorrer na mesma velocidade em que as taxas de T3 no soro caem.

Considerando estas questões e sabendo que os ratos apresentam um contínuo crescimento e o hormônio do crescimento é extremamente sensível ao T3 em ratos, o crescimento, mensurado através do ganho de peso, é um parâmetro muito sensível para avaliação da atividade dos hormônios tireoidianos em ratos (BIANCO et al., 2014).

Além disso, autores destacam a redução do ganho de peso corporal por duas semanas como padrão ouro para definir hipotireoidismo sistêmico severo (LARSEN & FRUMESS., 1977). Outro resultado obtido com esta análise foi a diminuição do ganho de peso do grupo TX+T4 em relação ao grupo SHAM, a partir do 30º dia. Este dado sugere que a reposição com tiroxina provavelmente não foi eficaz em reestabelecer os níveis de T3 no soro e tecidual. Corroborando o estudo de Escobar-Morreale e colaboradores que demonstraram que a normalização da concentração sérica de T4, T3, e TSH, bem como o conteúdo do tecidual de T4 e T3 só pode ser alcançado ao se utilizar a terapia combinada (ESCOBAR-MORREALE et al., 1996)

Nossos resultados também indicam que os animais submetidos à tireoidectomia e que não receberam tratamento, grupo TX, apresentaram aumento do peso relativo da adrenal. Este achado está relacionado com efeitos do estresse (RYGULA et al., 2005). Na literatura há diversos trabalhos que relacionam o aumento do peso da adrenal em indivíduos depressivos, indivíduos que cometeram suicídio, (NEMEROFF et al., 1992; RUBIN et al., 1995; SZIGETHY et al., 1994). Portanto, corroborando dados anteriormente descrito, pode-se reforçar a hipótese de que o hipotireoidismo manifesto está relacionado a alterações importantes relacionadas ao estresse intenso. O aumento da adrenal no grupo TX pode também estar relacionado com o fato deste grupo ter apresentado comportamentos análogos à depressão. Ademais. É importante destacar que a reposição com T4 reverteu este efeito.

Em relação aos testes comportamentais, os resultados encontrados indicam que os ratos tireoidectomizados apresentaram comportamentos análogos à ansiedade e depressão, quando comparados com os ratos controles (SHAM). Nosso estudo também demonstrou que a reposição hormonal com tiroxina foi capaz de reverter estes comportamentos em quase todos os testes.

No teste do campo aberto nenhum comportamento semelhante à ansiedade e diferenças motivacionais e da atividade exploratória foram observados. No entanto, o número de bolos fecais apresentou diferenças entre os grupos, sendo que o grupo TX apresentou redução deste parâmetro. O número de bolos fecais estão relacionados à emocionalidade, portanto o número de bolos fecais reduzidos poderia ser indicativo de que o animal estaria menos ansioso (MCILWAIN et al., 2001). Apesar do número de bolos fecais ser considerado um parâmetro de emocionalidade há autores que não consideram este parâmetro confiável para avaliar ansiedade em ratos no teste do campo aberto (STAM *et al.*, 1997) Vale ressaltar que, nos outros testes, estes mais confiáveis (específicos) para avaliação da ansiedade (discutidos posteriormente), mostraram resultados opostos. Ademais, considerando o papel dos HT na modulação da ingestão de alimentos e na fisiologia gastrointestinal geral (motilidade gastrointestinal por exemplo), fica difícil atribuir este achado isolado na possível alteração emocional. Sabe-se que o hipotireoidismo pode ocasionar constipação e conseqüentemente influenciar neste parâmetro (NOGUEIRA et al., 2011). A ingestão de alimentos também aparece reduzida em ratos hipotireoideos pelo fato destes apresentarem maior expressão de

leptina, conseqüentemente, níveis mais elevados de leptina e menor ingestão de alimentos (PINEDA-REYNOSO et al., 2010) Mais importante, foi o fato da ineficácia do tratamento com T4, pelo menos no protocolo utilizado, na reversão desta alteração, seja lá a sua origem.

No que se refere ao teste da caixa claro/escuro, ambos grupos operados Tx e Tx-T4 apresentaram latência para lado escuro diminuído. Este resultado está relacionado com aumento de comportamento análogo à ansiedade, demonstrando que o grupo Tx-T4 apresentou comportamento análogo á ansiedade aumentado (CHAOULOFF *et al.*, 1997). Esse resultado indica que a monoterapia não reverteu totalmente comportamentos análogos à ansiedade, o que corrobora outros trabalhos com pacientes humanos que demonstraram que indivíduos tratados com levotiroxina podem apresentar sintomas de transtornos de ansiedade (DANZI & KLEIN., 2005;GRABENSTEIN., 2005; NYGAARD et al., 2009; WIERSINGA, 2014)..

No teste do labirinto em cruz elevado os animais TX apresentaram redução na porcentagem de entradas nos braços abertos. Este parâmetro é considerado como um dos principais índices de ansiedade neste teste (WEISS et al. 1998). Somado a isso, os animais TX tiveram redução do parâmetro head dipping, tal fato demonstra a diminuição da atividade exploratória. A atividade exploratória no referido teste em ratos é inversamente relacionada à ansiedade (CRUZ *et al.*, 1997; PELLOW et al. 1985). Além disso, o grupo TX também apresentou redução no tempo de permanência nos braços fechados, mais um indicativo de aumento de comportamentos semelhantes à ansiedade nestes animais (CRUZ *et al.*, 1997; PELLOW et al. 1985). Estes resultados divergem dos resultados encontrados por Pineda-Reynoso et al. (2010), que não observaram diferenças entre o grupo controle e hipotireoideo. Vale lembrar que os protocolos de indução ao hipotireoidismo foram diferentes e o protocolo adotado por nosso grupo é conhecido por induzir hipotireoidismo mais intenso.

Os resultados obtidos no teste da natação forçada demonstraram aumento nos comportamentos semelhante à depressão nos ratos TX e o tratamento com T4 foi capaz de reverter estes comportamentos. O aumento do tempo de imobilidade está associado à redução motivacional e ao comportamento de desespero. Este teste também é considerado altamente específico para drogas antidepressivas. Portanto, quando há aumento da imobilidade, há também, aumento do comportamento análogo à depressão (RYGULA *et al.*, 2005). A

diminuição da escalada é outro parâmetro relacionado a comportamentos análogos à depressão e neste parâmetro o grupo TX também apresentou diminuição significativa (PINEDA-REYNOSO *et al.*, 2010). Em relação ao grupo tireoidectomizado sem reposição hormonal, TX, nossos resultados estão em concordância com o trabalho de Kulikov e colaboradores e com o grupo de Pineda-Reynoso (KULIKOV *et al.*, 1997, PINEDA-REYNOSO *et al.*, 2010). Ambos trabalhos demonstraram que o hipotireoidismo implica no aumento do tempo de imobilidade. É importante ressaltar que Kulikov e colaboradores induziram o hipotireoidismo pelo mesmo método que utilizamos, tireoidectomia. Já Pineda-Reynoso e colaboradores utilizaram um protocolo de hipotireoidismo durante o período perinatal, em que foram utilizados filhotes de ratas tireoidectomizadas. Curiosamente, os nossos resultados acerca do grupo TX-T4 diferem dos resultados de Kulikov e colaboradores que demonstraram aumento na imobilidade de ratos tireoidectomizados, sob reposição hormonal (15µg/Kg). Isto pode ter ocorrido pelo período de tratamento utilizado, 14 dias, ser insuficiente para reverter este efeito sobre o comportamento, já que em nosso protocolo utilizando doses menores (10µg/Kg), por um período maior, revertermos esta condição. A diminuição da escalada é outro parâmetro análogo à depressão observado no grupo TX em que novamente nossos dados corroboram com outros trabalhos (PINEDA-REYNOSO *et al.*, 2010).

Em relação ao teste da preferência por sacarose não foi observada nenhuma diferença entre os grupos. O referido teste reflete principalmente anedonia e este é um parâmetro para se avaliar comportamento análogo a depressão (OLIVARES *et al.*, 2012). Mesmo sem nenhum resultado neste teste, sobretudo para observação de comportamento análogo à depressão no grupo TX, obtivemos dois indicativos de comportamentos análogos de depressão no teste da natação forçada. O que sugere que os animais TX desenvolveram um estado semelhante a depressão tendo em vista a sensibilidade deste teste para tal (RYGULA., 2005)

Diante destes resultados faz necessário estudar os efeitos da terapia combinado sobre os efeitos comportamentais observados neste trabalho para se comparar as duas abordagens farmacológicas.

7 CONCLUSÃO

- O protocolo de hipotireoidismo através da tireoidectomia total em ratos produz comportamentos semelhantes à ansiedade e depressão.
- O ganho de peso corporal foi significativamente diminuído nos animais submetidos à tireoidectomia e não tratados.
- Não houve diferença na atividade locomotora entre os grupos experimentais.
- O protocolo de hipotireoidismo utilizado foi capaz de promover redução do número de bolos fecais. Este dado pode estar relacionado com respostas fisiológicas alteradas pela falta de HT. Portanto, este resultado pode não refletir uma alteração comportamental de diminuição de comportamento semelhante à ansiedade.
- O hipotireoidismo em ratos acarreta no aumento de comportamentos análogos à depressão e ansiedade e a reposição com tiroxina é capaz de reverter quase todos os comportamentos induzidos pelo hipotireoidismo no protocolo em questão.
- A tiroxina falhou em reverter todas as alterações ocasionadas pelo hipotireoidismo. O peso corporal apresentou diminuição na 30ª semana. O tratamento monoterápico com tiroxina, pelo menos no protocolo utilizado neste estudo, é parcialmente efetiva em reverter as alterações de ansiedade e depressão em ratos.

8 PERSPECTIVAS

- Avaliar em diferentes regiões encefálicas o efeito do hipotireoidismo através da dosagem das enzimas desidases, BDNF, e T3.
- Verificar a expressão de enzimas desidases nos seguintes tecidos: fígado, tecido adiposo marrom e rins.
- Verificar os níveis séricos de TSH, T4, T3 e corticosterona.
- Estudar o papel da reposição com tiroxina sobre essas alterações.
- Investigar a eficácia da terapia combinada (T4 + T3) e compará-la com a monoterapia (T4) na reversão das possíveis alterações supracitadas

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, Cloyra et al. Subclinical hypothyroidism: psychiatric disorders and symptoms. **Revista Brasileira De Psiquiatria**, v. 29, n. 2, p. 157-159, 2007.

ALZOUBI, Karem H. et al. Levothyroxin restores hypothyroidism-induced impairment of hippocampus-dependent learning and memory: Behavioral, electrophysiological, and molecular studies. **Hippocampus**, v. 19, n. 1, p. 66, 2009.

APA (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION) - *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (4th edition). Washington, DC: American Psychiatric Press, 1994.

APÓSTOLO, João Luís Alves et al. Depressão, ansiedade e estresse em usuários de cuidados primários de saúde. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 19, n. 2, p. 348-353, 2011.

BIANCO AC, SALVATORE D, GEREBEN B, BERRY MJ AND LARSEN PR. Biochemistry, cellular and molecular biology and physiological roles of the iodothyronineseleno-deiodinases. **Endocrinology**. v. 23, p.38–89. 2002.

BIANCO AC & KIM BW. Deiodinases: Implications of the local control of thyroid hormone action. **Journal of Clinical Investigation**. 116: 2571–2579. 2006

BIANCO, Antonio C. et al. American Thyroid Association Guide to Investigating Thyroid Hormone Economy and Action in Rodent and Cell Models: Report of the American Thyroid Association Task Force on Approaches and Strategies to Investigate Thyroid Hormone Economy and Action. **Thyroid**, v. 24, n. 1, p. 88-168, 2014.

CASTILLO AR, RECONDO R, ASBAHR FR, MANFRO GG. Transtornos de ansiedade. **Rev Bras Psiquiatr**; 22(Supl II): 20-3, 2000.

CHAOULOFF, F.; DURAND, M.; MORMEDE, P. Anxiety-and activity-related effects of diazepam and chlordiazepoxide in the rat light/dark and dark/light tests. **Behavioural brain research**, v. 85, n. 1, p. 27-35, 1997.

CRAWLEY, Jacqueline; GOODWIN, Frederick K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 13, n. 2, p. 167-170, 1980.

CRUZ, A. P. M.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 49, n. 1, p. 171-176, 1994.

DANZI, Sara; KLEIN, Irwin. Potential uses of T 3 in the treatment of human disease. **Clinical cornerstone**, v. 7, p. S9-S15, 2005.

DA SILVA, Anderson Soares et al. Principais distúrbios tireoidianos e suas abordagens na atenção primária à saúde. **Revista da AMRIGS**, v. 55, n. 4, p. 380-388, 2011.

DE CASTRO, Joao Pedro Werneck et al. Differences in hypothalamic type 2 deiodinase ubiquitination explain localized sensitivity to thyroxine. **The Journal of clinical investigation**, v. 125, n. 2, p. 769, 2015.

DEL PORTO, José Alberto. Conceito e diagnóstico. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 21, p. 06-11, 1999.

GORMAN JM. Comorbid depression and anxiety spectrum disorders. **Depress Anxiety**; 4(4): 160-8, 1996-1997.

ESCOBAR-MORREALE HF, REY F, OBREGON MJ, ESCOBAR GM. Only the combined treatment with thyroxine and triiodothyronine ensures euthyroidism in all tissues of the thyroidectomized rat. **Endocrinology**. 1996;137(6):2490–2502.

FALASCHI P, MARTOCCHIO A, PROIETTI A, D'URSO R, GARGANO S, CULOSSO F, et al. The hypothalamic-pituitary-thyroid axis in subjects with subclinical thyroid diseases: the impact of the negative feedback mechanism. **Neuro Endocrinol Lett** 2004;25:292-6.

FARRIS, S. G., EPSTEIN, E. E., MCCRADY, B. S., & HUNTER-REEL, D. Do co-morbid anxiety disorders predict drinking outcomes in women with alcohol use disorders?. **Alcohol and alcoholism**, v. 47, n. 2, p. 143-148, 2012.

FRANCISCO, J. C. et al. The effects of total thyroidectomy on cardiac function in old rats using echocardiographic measures. **J Clin Exp Cardiol** S, v. 11, p. 2, 2013.

GASCÓN MR, CAPITÃO CG, CASSEB J, NOGUEIRA-MARTINS MC, SMID J, OLIVEIRA AC. Prevalence of anxiety, depression and quality of life in HTLV-1 infected patients. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 6, p. 578-582, 2011.

GEREBEN B, ZEÖLD A, DENTICE M, SALVATORE D, BIANCO AC. Activation and inactivation of thyroid hormone by deiodinases: local action with general consequences. **Cellular and Molecular Life Sciences**. n.65, v.4, p.570-90. 2007.

GRAEFF, F. G. Ansiedade, pânico e o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. **Rev. bras. psiquiatr**, v. 29, n. supl. 1, p. s3-s6, 2007.

GRABENSTEIN, Jeff. T3, the other thyroid hormone. **Clinical cornerstone**, v. 7, p. S16-S19, 2005.

ITTERMANN, Till et al. Diagnosed thyroid disorders are associated with depression and anxiety. **Social psychiatry and psychiatric epidemiology**, p. 1-9, 2015.

KESSLER, R.C.; CHIU, W.T.; DEMLER, O.; WALTERS, E.E. Prevalence, Severity, and Comorbidity of Twelve-month DSM-IV Disorders in the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). **Archives of General Psychiatry**, v. 62, n. 6, p. 617-627, 2005.

KULIKOV, A., TORRESANI, J., JEANNINGROS, R., 1997. Experimental hypothyroidism increases immobility in rats in the forced swim paradigm. **Neurosci. Lett.** 234, 111e114.

JONKLAAS, Jacqueline et al. Guidelines for the treatment of hypothyroidism: prepared by the American Thyroid Association Task Force on Thyroid Hormone Replacement. **Thyroid**, v. 24, n. 12, p. 1670-1751, 2014.

LARSEN, P. R.; FRUMESS, R. D. Comparison of the Biological Effects of Thyroxine and Triiodothyronine in the Rat*. **Endocrinology**, v. 100, n. 4, p. 980-988, 1977.

LORENZINI, Carlo Ambrogi; BUCHERELLI, Corrado; GIACHETTI, Aldo. Some factors influencing conditioned and spontaneous behavior of rats in the light-dark box test. **Physiology & behavior**, v. 36, n. 1, p. 97-101, 1986.

MALKESMAN O, BRAW Y, ZAGOORY-SHARON O, GOLAN O, LAVI-AVNON Y, SCHROEDER M, OVERSTREET DH, YADID G, WELLER A. Reward and anxiety in genetic animal models of childhood depression. **Behav Brain Res**; Oct 14; 164(1): 1-10, 2005.

MCILWAIN, K. L.; MERRIWEATHER, M. Y.; YUVA-PAYLOR, L. A.; PAYLOR, R. The use of behavioral test batteries: effects of training history. *Physiology & Behavior*, v. 73, n. 5, p. 705-717, 2001.

MIKICS, E; BARSY, B; BARSVÁRI, B; HALLER, J. Behavioral specificity of nongenomic glucocorticoid effects in rats: effects on risk assessment in the elevated plusmaze and the open-field. **Hormones & Behavior**, v. 48, n. 2, p. 152-62, 2005.

MORALES-MEDINA JC, DUMONT Y, BENOIT CE, BASTIANETTO S, FLORES G, FOURNIER A, QUIRION R. Role of neuropeptide YY 1 and Y 2 receptors on behavioral despair in a rat model of depression with co-morbid anxiety. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 200-208, 2012.

MULLER AF, BERQHOUT A, WIERSINGA WM, KOOY A, SMITS JW, HERMUS AR, et al. Thyroid function disorders – Guidelines of the Netherlands Association of Internal Medicine. **Neth J Med** 2008;66:134-42.

NEMEROFF, Charles B. et al. Adrenal gland enlargement in major depression: a computed tomographic study. **Archives of general psychiatry**, v. 49, n. 5, p. 384-387, 1992.

NOGUEIRA, C. R. et al. Hipotireoidismo: diagnóstico. **Associação Médica Brasileira e Agência Nacional de Saúde Suplementar**, p. 1-18, 2011.

NUNES MT. Hormônios Tireoideanos: Mecanismos de ação e importância biológica. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia** . v.47 nº 6. 2003.

NYGAARD, Birte et al. Effect of combination therapy with thyroxine (T4) and 3, 5, 3'-triiodothyronine versus T4 monotherapy in patients with hypothyroidism, a double-blind, randomised cross-over study. **European Journal of Endocrinology**, v. 161, n. 6, p. 895-902, 2009.

NYS P, CORDRAY JP., MERCERON, R. É. Etiologic discussion and clinical relevance of thyroid ultrasonography in subclinical hypothyroidism. A retrospective study in 1845 patients. **Ann Endocrinol** (Paris) 2009;70:59-63

OLIVARES, Emerson L. et al. Social stress-induced hypothyroidism is attenuated by antidepressant treatment in rats. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 446-456, 2012.

OLIVARES, Emerson L. et al. Administration of an anabolic steroid during the adolescent phase changes the behavior, cardiac autonomic balance and fluid intake in male adult rats. **Physiology & behavior**, v. 126, p. 15-24, 2014.

PELLOW, S; CHOPIN, P; FILE, S.E; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14 (3): 149-67, 1985.

PIMENTEL L, HANSEN KW. Thyroid disease in the emergency department: a clinical and laboratory review. **J Emerg Med** 2005;28:201-9.

PINEDA-REYNOSO, Marisol et al. Hypothyroidism during neonatal and perinatal period induced by thyroidectomy of the mother causes depressive-like behavior in prepubertal rats. **Neuropsychiatric disease and treatment**, v. 6, p. 137, 2010.

PORSOLT, R.D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, n. 5604, p. 730-2, 1977.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; BLAVET, N.; DENIEL, M.; JALFRE, M. Immobility induced by forced swimming in rats: effects of agents which modify central catecholamine and serotonin activity. **European Journal of Pharmacology**, v.57, n.2, p. 201-210, 1979.

PRUT, L & BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviour: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1-3, p. 3-33, 2003

ROTH, K. A. & KATZ, R. J. Stress, behavioral arousal, and open field activity—a reexamination of emotionality in the rat. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 3, n. 4, p. 247-263, 1980.

RUBIN, Robert T. et al. Adrenal gland volume in major depression: increase during the depressive episode and decrease with successful treatment. **Archives of general psychiatry**, v. 52, n. 3, p. 213-218, 1995.

RYGULA, Rafal et al. Anhedonia and motivational deficits in rats: impact of chronic social stress. **Behavioural brain research**, v. 162, n. 1, p. 127-134, 2005.

SAWKA, A. M. et al. Does a combination regimen of thyroxine (T4) and 3, 5, 3'-triiodothyronine improve depressive symptoms better than T4 alone in patients with hypothyroidism? Results of a double-blind, randomized, controlled trial. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 10, p. 4551-4555, 2003.

SCHOMBURG, Lutz. Selenium, selenoproteins and the thyroid gland: interactions in health and disease. **Nature Reviews Endocrinology**, 2011

SELIGMAN M.E.P. Helplessness. On development, depression and death, 1992. New York, W.H. Freeman and Company (Trabalho original publicado em 1975)

SGARBI, Jose A. et al. Consenso brasileiro para a abordagem clínica e tratamento do hipotireoidismo subclínico em adultos: recomendações do Departamento de Tireoide da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, p. 166-183, 2013

SINGER, Andrea J. Combination therapy in a hypothyroid patient intolerant of elevated thyroxine. **Clinical cornerstone**, v. 7, p. S20-S21, 2005.

SINGEWALD, Nicolas. Altered brain activity processing in high-anxiety rodents revealed by challenge paradigms and functional mapping. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 31, n. 1, p. 18-40, 2007.

STAM, Ruben et al. Behavioural and intestinal responses to novelty in rats selected for diverging reactivity in the open field test. **Behavioural brain research**, v. 88, n. 2, p. 231-238, 1997.

SZIGETHY, Eva et al. Adrenal weight and morphology in victims of completed suicide. **Biological psychiatry**, v. 36, n. 6, p. 374-380, 1994.

VAN DER HEIDEN C, MURIS P, VAN DER MOLEN HT. Randomized controlled trial on the effectiveness of metacognitive therapy and intolerance-of-uncertainty therapy for generalized anxiety disorder. **Behaviour research and therapy**, v. 50, n. 2, p. 100-109, 2012.

WALSH, R.N. & CUMMINS, R.A. The open field test: a critical review. **Psychological Bulletin**, v. 83, p. 481-504, 1976.

WEISS, S. M.; WADSWORTH, G.; FLETCHER, A.; DOURISH, C. T. *Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze models of anxiety*. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 23, 265–271, 1998.

WIERSINGA, Wilmar M. Paradigm shifts in thyroid hormone replacement therapies for hypothyroidism. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 10, n. 3, p. 164-174, 2014.

WHO 2001 - World Health Organization. Burden of mental and behavioural disorders. Chapter 2. Disponível em: URL: <<http://www.who.int/whr/2001/chapter2/en/index2.html>>. Acesso em: 29 junho de 2015

WHO - World Health Organization: Depression, 2012. Disponível em: URL: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs369/en/>>. Acesso em 29 junho de 2015