



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

BEATRIZ CAMPANHÃ CRUZ

**O HIPOTIREOIDISMO EXPERIMENTAL PROMOVE
LEVE HIPERGLICEMIA, SINAIS ANÁLOGOS A
ANSIEDADE E DEPRESSÃO E ALTERAÇÕES
ELÉTRICAS CARDÍACAS IN VIVO E EX VIVO EM
RATOS WISTAR MACHOS.**

SEROPÉDICA

2025



BEATRIZ CAMPANHÃ CRUZ

O HIPOTIREOIDISMO EXPERIMENTAL PROMOVE LEVE HIPERGLICEMIA, SINAIS
ANÁLOGOS A ANSIEDADE E DEPRESSÃO E ALTERAÇÕES ELÉTRICAS
CARDÍACAS IN VIVO E EX VIVO EM RATOS WISTAR MACHOS.

Dissertação apresentada ao curso de Programa de
Pós Graduação Multicêntrico em Ciências
Fisiológicas da Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Fisiologia Gera,
Área de concentração: Fisiologia Endócrina.

Orientador(a): Prof. Dr. Emerson Lopes Olivares

Coorientador(a): Prof. Dr. Fábio Fagundes da
Rocha

SEROPÉDICA

2025

BEATRIZ CAMPANHÃ CRUZ

- C955h CRUZ, BEATRIZ CAMPANHÃ, 1995-
O hipotireoidismo experimental promove leve hiperglicemia, sinais análogos a ansiedade e depressão e alterações elétricas cardíacas in vivo e ex vivo em ratos wistar machos. / BEATRIZ CAMPANHÃ CRUZ.
- Seropédica, 2025.
59 f.: il.
- Orientador: Emerson Lopes Olivares.
Coorientador: Fábio Fagundes da Rocha.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, 2025.
1. Alterações causadas pelo hipotireoidismo experimental em ratos Wistar machos. 2. Alterações cardiovasculares in vivo e ex vivo. 3. Alterações cognitivas e comportamentais . I. Olivares, Emerson Lopes, 1973-, orient. II. Rocha, Fábio Fagundes da, , coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas. IV. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS



TERMO Nº 550/2025 - PPGMCF (12.28.01.00.00.00.41)

Nº do Protocolo: 23083.033623/2025-58

Seropédica-RJ, 30 de junho de 2025.

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

BEATRIZ CAMPANHÃ CRUZ

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 26/06/2025

Prof Dr Emerson Lopes Olivares (Orientador – UFRRJ)
(Orientador)

Prof Dr Andre de Souza Mecawi (Membro Externo – UNIFESP)

Prof Dr Wellington da Silva Côrtes (Membro Interno – UFRRJ)

Documento não acessível publicamente

(Assinado digitalmente em 30/06/2025 18:53)
EMERSON LOPES OLIVARES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DepCF (12.28.01.00.00.00.48)
Matricula: ###255#6

(Assinado digitalmente em 30/06/2025 18:59)
WELLINGTON DA SILVA CORTES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
PPGMCF (12.28.01.00.00.00.41)
Matricula: ###69#0

(Assinado digitalmente em 30/06/2025 18:42)
ANDRE DE SOUZA MECAWI
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.127-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: 550, ano: 2025, tipo: TERMO, data de emissão: 30/06/2025 e o código de verificação: 7ba29241a7

AGRADECIMENTOS

Agradeço, com sincera e profunda gratidão, a todos os professores que tive a honra de encontrar ao longo da minha formação. Aos mestres da graduação, que me apresentaram, com entusiasmo e rigor, o fascinante mundo da pesquisa — despertando em mim a curiosidade e o desejo de compreender mais profundamente o mundo ao nosso redor. Aos professores da pós-graduação, meu reconhecimento por acreditarem em meu potencial e por me incentivarem, mesmo nos momentos mais difíceis, a persistir nesse caminho exigente, porém tão enriquecedor.

Expresso meu mais genuíno e caloroso agradecimento ao meu orientador, que foi muito mais do que um guia acadêmico. Com paciência inabalável, dedicação generosa e sabedoria silenciosa, caminhou ao meu lado nas inúmeras etapas deste percurso, ajudando-me a enfrentar os inevitáveis tropeços, as decepções e os desafios que marcam, de forma tão peculiar, a trajetória de quem escolhe a pesquisa científica como vocação, sobretudo no contexto da universidade pública brasileira.

Estendo meu agradecimento às pessoas que encontrei ao longo dessa caminhada: amigas e amigos que se tornaram porto seguro nas tempestades, colegas de trabalho que dividiram comigo não apenas tarefas e responsabilidades, mas também sonhos, angústias, aprendizados e conquistas. Cada conversa, cada apoio silencioso, cada gesto de solidariedade foi essencial para que eu seguisse em frente. Ninguém percorre esse caminho sozinho — e eu tive a sorte de estar cercado por pessoas incríveis, generosas e inspiradoras.

Por fim, e de maneira especial, agradeço à minha família. Foram eles que estiveram ao meu lado em todos os momentos — nas longas viagens entre Seropédica e São Paulo, nas despedidas silenciosas e nos reencontros cheios de afeto. Foram eles que me apoiaram incondicionalmente na escolha de uma vida dedicada à pesquisa e ao ensino, mesmo quando isso significava abrir mão de tantas certezas. Com amor e coragem, me ensinaram, desde muito cedo, o valor da educação, da curiosidade, do compromisso com o conhecimento e da esperança num futuro mais justo por meio da ciência e da formação humana.

A todas essas pessoas, meu mais sincero e emocionado "muito obrigado". Este trabalho é, também, fruto de cada gesto, cada palavra e cada presença ao longo do caminho.

Agradeço pelo apoio recebido durante o desenvolvimento do projeto, por meio de agências de fomento à pesquisa, tais como o CNPq (Processo: 307173/2019-4) e a FAPERJ (Processo SEI-260003/015002/2021 - APQ1).

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 88887.718397/2022-00.

RESUMO

CRUZ, Beatriz Campanhã. **O hipotireoidismo experimental promove leve hiperglicemia, sinais análogos a ansiedade e depressão e alterações elétricas cardíacas *in vivo* e *ex vivo* em ratos wistar machos**. 2025. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas, Fisiologia Endócrina), Instituto de Ciências Biológicas e de Saúde, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2025.

O hipotireoidismo é uma endocrinopatia caracterizada pela deficiência na produção dos hormônios tireoidianos, afetando diversos sistemas fisiológicos. Suas manifestações incluem alterações metabólicas, cognitivas, cardiovasculares e distúrbios do humor, como depressão e ansiedade. Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (2022), uma em cada oito pessoas apresenta algum transtorno mental, sendo que no Brasil, dados da Organização Pan-Americana de Saúde (2017) registraram aproximadamente 11,5 milhões de indivíduos com depressão e 18,6 milhões com transtornos ansiosos. Considerando que uma parcela significativa desses pacientes apresenta disfunções tireoidianas, torna-se relevante investigar a associação entre hipotireoidismo e alterações comportamentais e fisiológicas. Neste contexto, o presente estudo avaliou os efeitos do hipotireoidismo experimental induzido por tireoidectomia total em ratos Wistar machos, com ênfase em alterações comportamentais, metabólicas e cardiovasculares. Trinta e sete animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: SHAM (falso-operado) e TX (tireoidectomizado). O protocolo experimental teve duração de 32 dias, com aferição semanal da massa corporal. Entre os dias 21 e 30 foram realizados testes comportamentais, nos dias 30 e 31 o registro eletrocardiográfico, e no dia 32 procedeu-se à eutanásia e coleta de sangue para dosagem de glicemia, TSH e T4, além da análise cardíaca pelo método de Langendorff. A eficácia do modelo foi confirmada por redução de 96% nos níveis de T4 e aumento de 545% no TSH no grupo TX. A glicemia apresentou elevação discreta (23%) nesse grupo. Quanto à massa corporal, os animais tireoidectomizados exibiram um platô de crescimento a partir da segunda semana, com diferença de ganho de peso total de aproximadamente 87% em relação ao grupo SHAM. Nos testes comportamentais, o campo aberto não revelou diferenças significativas. No labirinto em cruz elevado, houve redução de 30% no número de entradas e de 49% nos episódios de head dipping, sugerindo comportamento ansioso. No teste de preferência por sacarose, o grupo TX consumiu 16% menos sacarose, indicando anedonia, um comportamento compatível com quadro análogo à depressão. No reconhecimento de objetos, apesar de maior tempo total de interação, o grupo TX apresentou 35% mais interações negativas, indicando prejuízo na motivação exploratória e possível déficit cognitivo. No teste de esQUIVA passiva, a latência foi 308% maior no grupo TX na fase de curta duração, mas não se manteve após 24 horas, sugerindo déficit na consolidação da memória aversiva. Em relação aos parâmetros cardiovasculares, observou-se redução de 31% na massa cardíaca, bradicardia (queda de 10,4% na frequência cardíaca) e prolongamento dos intervalos QT e QTc, indicando maior risco de arritmias. A razão BF/AF não apresentou alterações significativas. A análise *ex vivo* confirmou as disfunções eletromecânicas não relacionadas à disautonomia apresentando redução da frequência cardíaca no grupo TX em relação ao grupo controle (11%), além de apresentar aumento no tempo da sístole basal (36%) e após administração de adrenalina (29%) no grupo TX. Conclui-se que o hipotireoidismo experimental induz alterações comportamentais compatíveis com transtornos ansiosos e depressivos, incluindo anedonia, além de disfunções cardíacas e metabólicas. Esses achados reforçam a relevância do modelo animal para investigações translacionais e abordagens terapêuticas integradas para o hipotireoidismo.

Palavras-chave: hipotireoidismo; depressão; ansiedade; alterações cardiovasculares.

ABSTRACT

CRUZ, Beatriz Campanhã. **Experimental hypothyroidism induces mild hyperglycemia, signs analogous to anxiety and depression, and cardiac electrical changes in vivo and ex vivo in male Wistar rats.** 2025. Master's Thesis (Master's in Physiological Sciences, Endocrine Physiology), Instituto de Ciências Biológicas e de Saúde, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2025.

Hypothyroidism is an endocrinopathy characterized by a deficiency in the production of thyroid hormones, affecting various physiological systems. Its manifestations include metabolic, cognitive, cardiovascular alterations, and mood disorders such as depression and anxiety. According to estimates by the World Health Organization (2022), one in eight people presents some form of mental disorder, and in Brazil, data from the Pan American Health Organization (2017) reported approximately 11.5 million individuals with depression and 18.6 million with anxiety disorders. Considering that a significant portion of these patients presents thyroid dysfunctions, it becomes relevant to investigate the association between hypothyroidism and behavioral and physiological changes. In this context, the present study evaluated the effects of experimental hypothyroidism induced by total thyroidectomy in male Wistar rats, with emphasis on behavioral, metabolic, and cardiovascular alterations. Thirty-seven animals were randomly assigned to two groups: SHAM (sham-operated) and TX (thyroidectomized). The experimental protocol lasted 32 days, with weekly body mass measurements. Between days 21 and 30, behavioral tests were performed; on days 30 and 31, electrocardiographic recordings were made; and on day 32, euthanasia and blood collection for glucose, TSH, and T4 measurements were conducted, along with cardiac analysis using the Langendorff method. The model's effectiveness was confirmed by a 96% reduction in T4 levels and a 545% increase in TSH in the TX group. Blood glucose showed a slight increase (23%) in this group. Regarding body mass, thyroidectomized animals exhibited a growth plateau starting from the second week, with a total weight gain difference of approximately 87% compared to the SHAM group. In behavioral tests, the open field test revealed no significant differences. In the elevated plus maze, there was a 30% reduction in the number of entries and a 49% decrease in head dipping episodes, suggesting anxious behavior. In the sucrose preference test, the TX group consumed 16% less sucrose, indicating anhedonia, a behavior compatible with a depression-like state. In the object recognition test, despite longer total interaction time, the TX group showed 35% more negative interactions, indicating impaired exploratory motivation and possible cognitive deficits. In the passive avoidance test, latency was 308% higher in the TX group during the short-term phase but did not persist after 24 hours, suggesting impaired consolidation of aversive memory. Regarding cardiovascular parameters, a 31% reduction in cardiac mass, bradycardia (10.4% decrease in heart rate), and prolongation of QT and QTc intervals were observed, indicating a higher risk of arrhythmias. The BF/AF ratio did not show significant changes. Ex vivo analysis confirmed electromechanical dysfunctions unrelated to dysautonomia, showing reduced heart rate in the TX group compared to controls (11%), as well as increased basal systole duration (36%) and after adrenaline administration (29%) in the TX group. In conclusion, experimental hypothyroidism induces behavioral changes compatible with anxiety and depressive disorders, including anhedonia, as well as cardiac and metabolic dysfunctions. These findings underscore the relevance of the animal model for translational research and integrated therapeutic approaches for hypothyroidism.

Keywords: hypothyroidism; depression; anxiety; cardiovascular changes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Prevalência mundial de hipotireoidismo evidente com base em estudos epidemiológicos. O valor mediano foi calculado para países com dados disponíveis de vários estudos. (Adaptado de CHAKER, L., RAZVI, S., BENSON, 2022)..... 2

Figura 2: Representação esquemática dos efeitos estimuladores e inibidores do T3 sobre os mecanismos principais envolvidos na regulação do transiente de cálcio no cardiomiócito. As curvas abaixo representam curvas hipotéticas de desenvolvimento de força do cardiomiócito na ausência (-T3) ou presença (+T3) de T3. As ações do T3 em conjunto aumentam a concentração de cálcio na célula durante a sístole e diminuem durante a diástole o que leva ao aumento na velocidade e no desenvolvimento de força (inotropismo) e na velocidade de relaxamento (lusitropismo) respectivamente. A relação estequiométrica dos íons transportados foi preservada. I_{CaL} = canal para cálcio do tipo L, I_{Ca} = cálcio-ATPase do sarcolema, I_{Na/Ca} = trocador sódio-cálcio do sarcolema, I_{Na/K} = sódio-potássio ATPase, RyR = receptor de rianodina, SERCa2 = cálcio-ATPase do retículo, Csq = calsequestrina, PLB = fosfolambam. (Olivares EL, não publicado)..... 8

Figura 3: Representação esquemática da eficiência (velocidade, proporcional a espessura da seta) de hidrólise de ATP das diferentes isoenzimas ATPases de miosina (acima) e alterações hipotéticas na expressão das diferentes isoformas de miosina (V1, V2 e V3) de ventrículos de ratos na transição do eutireoidismo para o hipo ou hipertireoidismo (abaixo). (Olivares EL, não publicado)..... 9

Figura 4: Representação esquemática do efeito estimulador do T3 sobre algumas correntes iônicas envolvidas na gênese do potencial de ação rápido, encontrado nos cardiomiócitos, e lento, característico dos tecidos nodais (nodo sinusal e átrio-ventricular). I_{Na} = canal para sódio, I_{to} = canal para potássio transiente de efluxo, I_{CaL} = canal para cálcio do tipo L, I_K = canal para potássio retificador retardado, I_f = corrente marcapasso (“funny current”). (Olivares EL, não publicado)..... 11

Figura 5: Associação entre o hipotireoidismo adquirido e o desenvolvimento de distúrbios depressivos ou de ansiedade. Imagem I) Paciente com hipotireoidismo não tratado com L-T4 com baixos níveis de hormônios tireoidianos, demonstrando um risco aumentado de depressão e ansiedade. Imagem II) Paciente em tratamento com L-T4, evidenciando os riscos de distúrbios depressivos e ansiosos ainda persiste mesmo com o tratamento, mas em menor escala (modificado de OSNAVA-BRIZUELA et al., 2024) 14

Figura 6: 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). 17

Figura 7: Representação esquemática do protocolo experimental. 19

Figura 8: Localização da conexão dos eletrodos para registrar as derivações dos roedores no ECG. + e – representam os eletrodos positivos e negativos nas posições. RA: braço direito; LA: braço esquerdo e LL: perna esquerda. (Adaptado de JOUKAR, 2021). 26

Figura 9: Efeito da tireoidectomia no mass corporal dos animais. A) Ganho de massa em g. ** representa $p < 0,01$ em TX quando comparado ao grupo controle (SHAM). SHAM, falso operado; TX, animais tireoidectomizados. 29

Figura 10: Mensuração dos hormônios T4 e TSH. A) T4($\mu\text{g}/100\text{mL}$); B) TSH ($\text{ng}/100\text{mL}$). *** representa $p < 0,001$ TX quando comparado ao grupo controle (SHAM). SHAM, falso operado; TX, animais tireoidectomizados. 30

Figura 11: Níveis de glicemia (mg/dL) nos grupos SHAM e TX após o protocolo experimental. O gráfico apresenta elevação dos níveis de glicose nos grupos TX em comparação ao grupo SHAM. * $p < 0,05$. SHAM, falso operado; TX. 31

Figura 12: Parâmetros avaliados no teste de campo aberto nos grupos SHAM e TX. (A) Número de quadrantes totais (cruzamentos/5 min). (B) Número de quadrantes periféricos (cruzamentos/5 min). (C) Número de quadrantes centrais (cruzamentos/5 min). (D) Tempo em quadrantes centrais (segundos em 5min). (E) Tempo de grooming (segundos em 5min). (F) Tempo de rearing (segundos em 5min). SHAM, falso operado; TX, animais tireoidectomizados. 32

Figura 13: Parâmetros avaliados no teste do labirinto em cruz elevado nos grupos SHAM e TX. (A) Número total de entradas (entradas/5 min.); (B) Entrada no braço aberto (%); (C) Entrada no braço fechado (%); (D) Tempo no braço aberto (%); (E) Tempo no braço fechado (%); (F) Avaliação de risco (head dippings); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, TX e TX+T4 quando comparados ao grupo controle (SHAM). 34

Figura 14: Teste de preferência pela sacarose (%) nos grupos SHAM e TX. * $p < 0,05$. SHAM, falso operado; TX, animais tireoidectomizados. 37

Figura 15: Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste de Reconhecimento de objetos nos grupos SHAM, TX e TXT. (A) Reconhecimento Total de Objetos (tempo em segundos em 300 segundos). (B) Discriminação Absoluta (tempo em segundos em 300 segundos). (C) Discriminação Relativa (tempo em segundos dividido pelo tempo total em 300 segundos). Note que o grupo TX apresentou aumento significativo no tempo total de interação com os objetos (A), mas não foi capaz de interagir por mais tempo com os objetos novos (B e C) em relação ao grupo SHAM *representa $P < 0,05$. SHAM, falso operado; TX, animais tireoidectomizados..... 35

Figura 16: Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste de reconhecimento de objetos nos grupos SHAM e TX. Número percentual de animais que apresentaram interações positivas e negativas em 300 segundos de avaliação. Note que o grupo TX apresentou número maior de animais com interações negativas comparados ao SHAM. ** $p < 0,01$ em relação ao SHAM. SHAM, falso operado; TX, animais tireoidectomizados..... 36

Figura 17: Avaliação da latência para o animal descer da plataforma no teste de Esquiva-Passiva nos grupos SHAM e TX. Note que, o grupo TX apresentou diminuição significativa em relação ao grupo SHAM (*) na retenção da memória aversiva a curto prazo. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos SHAM e TX no prazo de 24 horas. $P > 0,05$). SHAM, falso operado; TX, animais tireoidectomizados. 38

Figura 18: Massa cardíaca em gramas em ambos os grupos. Note que a massa no grupo TX foi significativamente reduzida devido ao hipotireoidismo. SHAM = grupo falso-operado. TX = grupo tireoidectomizado. $**P < 0,01$ vs. SHAM. 38

Figura 19: Parâmetros eletrocardiográficos obtidos in vivo nos animais acordados de ambos os grupos. Frequência cardíaca em batimentos por minuto (bpm) (A), intervalo PR em ms (B), intervalo QT (em ms) (C) e intervalo QT corrigido (QTc) pela fórmula de Bazett em ms/ms^{1/2} (QTc) (D). Note que o hipotireoidismo experimental (grupo TX) induziu a bradicardia (A) e aumento do intervalo QT não corrigido (C) e corrigido (D) sem alterar o intervalo PR (B) quando comparado ao SHAM. SHAM = grupo falso-operado. TX = grupo tireoidectomizado. $*P < 0,05$ e $**P < 0,01$ vs. SHAM. 39

Figura 20: Parâmetros de variabilidade cardíaca no domínio da frequência em ambos os grupos: Baixa frequência (A), alta frequência (B) e a relação entre a baixa frequência (BF)/alta frequência (AF) (C). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. SHAM = grupo falso-operado. TX = grupo tireoidectomizado. 40

Figura 21: Frequência cardíaca (FC) basal (A), após a administração de adrenalina (B) e a variação (Δ) da FC pós-adrenalina/basal (C) em ambos os grupos obtida pela técnica de coração isolado de Langendorff. Note que a FC basal no grupo TX foi significativamente reduzida devido ao hipotireoidismo. Embora tenha ocorrido tendência de aumento da Δ FC no grupo TX (C), a resposta adrenérgica nesse parâmetro não foi diferente entre os grupos. SHAM = grupo falso-operado. TX = grupo tireoidectomizado. Bpm = batimentos por minuto. Adl = adrenalina. $*P < 0,05$ vs. SHAM. 41

Figura 22: Duração da sístole basal (A), após a administração de adrenalina (B) e a variação (Δ) da duração da sístole pós-adrenalina/basal (C) em ambos os grupos obtida pela técnica de coração isolado de Langendorff. Note que a duração da sístole no grupo TX foi significativamente maior devido ao hipotireoidismo tanto em níveis basais (A) como estimulada com adrenalina (B). Não houve diferença na Δ da duração sistólica entre os grupos após a adrenalina (C). SHAM = grupo falso-operado. TX = grupo tireoidectomizado. Adl = adrenalina. $*P < 0,05$ e $**P < 0,01$ vs. SHAM. 42

Figura 23: Duração da diástole basal (A), após a administração de adrenalina (B) e a variação (Δ) da duração da diástole pós-adrenalina/basal (C) em ambos os grupos obtida pela técnica de coração isolado de Langendorff. Note que a duração da diástole não foi diferente entre os grupos tanto em níveis basais (A) como estimulada com adrenalina (B). No entanto, houve redução significativa na Δ da duração da diástole entre os grupos após a adrenalina (C). SHAM = grupo falso-operado. TX = grupo tireoidectomizado. Adl = adrenalina. $*P < 0,05$ e $**P < 0,01$ vs. SHAM 42

Figura 24: Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (A), após a administração de adrenalina (B) e a variação (Δ) da duração da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo pós-adrenalina/basal (C) em mmHg/s em ambos os grupos obtida pela técnica de coração isolado de Langendorff. Note que não houve diferença significativa em nenhum dos parâmetros mecânicos entre os grupos. SHAM = grupo falso-operado. TX = grupo tireoidectomizado. PDVE = Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo. Adl = adrenalina..... 43

Figura 25: Taxa de variação de pressão no tempo (1ª derivada temporal positiva máxima da pressão ventricular esquerda, dP/dt positiva) basal (A), após a administração de adrenalina (B) e a variação (Δ) da dP/dt positiva pós-adrenalina/basal (C) em mmHg/s em ambos os grupos obtida pela técnica de coração isolado de Langendorff. Note que, embora a dP/dt positiva basal (A) e o Δ da dP/dt positiva (C) não tenham sido diferentes entre os grupos, houve tendência de aumento na resposta adrenérgica na dP/dt positiva (B). SHAM = grupo falso-operado. TX = grupo tireoidectomizado. Adl = adrenalina. 43

Figura 26: Taxa de variação negativa de pressão no tempo (1ª derivada temporal negativa máxima da pressão ventricular esquerda, dP/dt negativa) basal (A), após a administração de adrenalina (B) e a variação (Δ) da dP/dt negativa pós-adrenalina/basal (C) em mmHg/s em ambos os grupos obtida pela técnica de coração isolado de Langendorff. Note que não houve diferença significativa em nenhum dos parâmetros diastólicos entre os grupos. SHAM = grupo falso-operado. TX = grupo tireoidectomizado. Adl = adrenalina. 44

SUMÁRIO

O HIPOTIREOIDISMO EXPERIMENTAL PROMOVE LEVE HIPERGLICEMIA, SINAIS ANÁLOGOS A ANSIEDADE E DEPRESSÃO E ALTERAÇÕES ELÉTRICAS CARDÍACAS IN VIVO E EX VIVO EM RATOS WISTAR MACHOS.	0
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Tireoide e regulação de hormônios tireoidianos	1
1.2 Hipotireoidismo.....	1
1.2.1 Aspectos epidemiológicos.....	1
1.2.3 Efeitos do hipotireoidismo sobre o metabolismo energético e glicídico.....	3
1.2.4 Transtornos de Ansiedade e Depressão e sua relação com o hipotireoidismo.	4
1.2.5 Memória declarativa, memória aversiva e sua relação com o hipotireoidismo.....	5
1.2.6 Efeitos do hormônio tireoidiano no cardiomiócito.....	7
1.2.7 Efeitos do hormônio tireoidiano na eletrogênese e condução do estímulo cardíaco	10
1.2.8 Relação entre o hormônio tireoidiano e o sistema adrenérgico.....	11
1.2.9 Tratamento do Hipotireoidismo	12
2 JUSTIFICATIVA	15
3 OBJETIVOS	16
3.1 Objetivo Geral.....	16
3.2 Objetivos Específicos.....	16
4 MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1 Animais	16
4.2 Tireoidectomia	17
4.3 Tratamento pós-operatório e protocolo experimental	18
4.4 Massa Corporal.	19
4.5 Dosagens hormonais de TSH e Tiroxina.....	19
4.6 Dosagem de glicose no sangue.....	20
4.7 Testes comportamentais	20

4.7.1 Teste do Campo Aberto.....	20
4.7.2 Teste do Labirinto em Cruz Elevado.....	21
4.7.3 Teste de reconhecimento de objetos.....	22
4.7.4 Teste de preferência por sacarose.....	23
4.7.5 Teste de esquiva passiva	24
4.8 Registro Eletrocardiográfico (ECG) <i>in vivo</i>	24
4.9 Análise de variabilidade da frequência cardíaca (VFC).....	26
4.10 Avaliação cardíaca ex vivo para avaliação de sensibilidade adrenérgica	27
4.11 Análise estatística.....	28
5 RESULTADOS.....	28
5.1 Massa corporal.....	28
5.2 Dosagens Hormonais de TSH e Tiroxina.....	29
5.3 Dosagem de glicose no sangue.....	30
5.4 Testes Comportamentais	31
5.4.1 Teste do campo aberto.....	31
5.4.2 Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	33
5.4.3 Teste de reconhecimento de objetos.....	34
5.4.4 Teste de preferência pela sacarose.	36
5.4.5 Teste de esquiva passiva	37
5.5 Avaliação cardiovascular e autonômica.	38
5.5.1 Morfometria cardíaca.	38
5.5.2 Estudo eletrocardiográfico <i>in vivo</i>	39
5.5.3 Estudo da modulação autonômica sobre o coração de ratos acordados.	40
5.5.4 Estudo eletromecânico <i>ex vivo</i> basal e em resposta a administração de adrenalina no coração isolado pela técnica de Langendorff.	40
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tireoide e regulação de hormônios tireoidianos

A glândula da tireoide secreta os hormônios tiroxina (T4), principalmente, e triiodotironina (T3), que são produzidos e liberados graças ao estímulo da tirotrófina (hormônio estimulador da tireoide, TSH), produzida por ativação do eixo hipotálamo-hipófise atuando na regulação do metabolismo e desenvolvimento de células e órgãos (CHAKER, L. *et al.*, 2022).

O hormônio tireoidiano (HT) é sintetizado nos folículos tireoidianos através da iodação de resíduos de tirosina na tireoglobulina. O TSH, secretado pela hipófise anterior em resposta aos níveis circulantes de hormônios tireoidianos, atua no receptor de TSH na célula folicular da tireoide, regulando a captação de iodeto e a subsequentemente a síntese e secreção do hormônio. Assim, a deficiência do hormônio durante o desenvolvimento pode levar a déficits neurológicos graves e retardo de crescimento (BRENT, 2012).

O hormônio T4 quando produzido pela glândula tireoide, serve como precursor para T3, configurando como forma biologicamente ativa. As alterações nos níveis de T3 e T4 impactam em manifestações clínicas. Estudos apontam que o hormônio T3 é fundamental no metabolismo energético, promovendo o crescimento neuronal, a mielinização e a formação de sinapses, além de participar de processos de aprendizado e memória, na regulação de neurotransmissores como serotonina, impactando diretamente no humor e no bem-estar do indivíduo (WILLIAMS *et al.*, 2017).

1.2 Hipotireoidismo

1.2.1 Aspectos epidemiológicos

Quando a produção de hormônios tireoidianos é insuficiente instala-se o hipotireoidismo, que pode ser classificado como primário, havendo a diminuição do nível sérico de tiroxina livre e elevação do TSH, e quando há problemas no eixo hipotálamo-hipofisário, classificado como secundário, resultando em baixos níveis de TSH e consequentemente estimulação insuficiente da tiroide. (CAMPOS *et al.*, 2024).

O hipotireoidismo afeta o desenvolvimento de vários sistemas de neurotransmissores em várias regiões encefálicas, incluindo o córtex pré-frontal e o sistema colinérgico do

hipocampo, e alterações na plasticidade sináptica do córtex pré-frontal medial e da via do hipocampo posterior, vias neurais críticas na aprendizagem e na memória (SUI *et al.*, 2006). Além disso, pode-se observar diminuição no metabolismo sistêmico e comprometer a função cognitiva levando a anormalidades de humor. (BATHLA *et al.*, 2016). Em relação ao sistema cardiovascular, o hipotireoidismo afeta significativamente a contratilidade, o ritmo cardíaco e a resistência vascular, aumentando assim a pressão arterial. (UDOVIC M. *et al.*, 2017). Os pacientes hipotireoideos também apresentam ganho de peso moderado, constipação intestinal, pele seca, diminuição da acuidade auditiva e parestesia (sensação de formigamento). (SILVA, A. S. *et al.*, 2011).

Os distúrbios da tireoide podem afetar cerca de 5% a 10% da população sendo o hipotireoidismo o distúrbio mais comum e com prevalência de até dez vezes maior em mulheres do que em homens, enquanto o hipertireoidismo ocorre com uma frequência três vezes menor. (STANIC G, *et al.*, 2022). No Brasil, uma pesquisa transversal em São Paulo revelou que 6,6% dos adultos apresentavam a doença (DA SILVA *et al.*, 2011; DE CASTRO *et al.*, 2015). Destacando sintomas isolados ou combinados, como a fadiga, depressão ansiedade, perda de memória e concentração, constipação e alteração do reflexo de Aquiles (SBEM 2005; NOGUEIRA *et al.*, 2011; WIERSINGA, 2014).

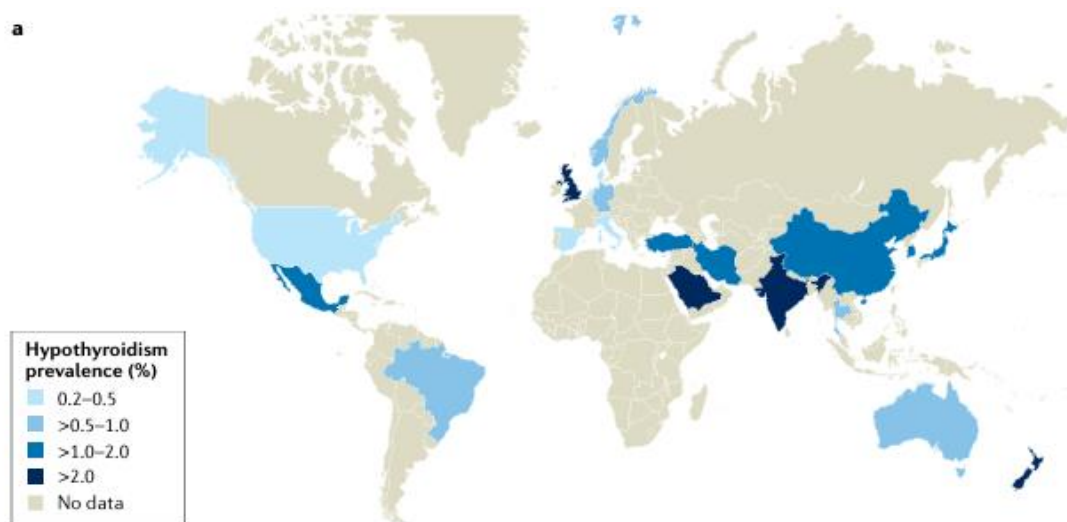


Figura 1 Prevalência mundial de hipotireoidismo evidente com base em estudos epidemiológicos. O valor mediano foi calculado para países com dados disponíveis de vários estudos. (Adaptado de CHAKER, L., RAZVI, S., BENSON, 2022).

Como observada na Figura 1, a prevalência mundial de hipotireoidismo com base em estudos epidemiológicos, na população em geral da Europa varia entre 0,2% e 5,3%, quando se considera o hipotireoidismo não diagnosticado, incluindo tanto as formas sintomáticas quanto subclínicas essa prevalência sobe para cerca de 5%. As taxas de hipotireoidismo sintomático e

subclínico, nos Estados Unidos, variam entre 0,3% e 4,3%, respectivamente. (CHAKER, L.*et al.*, 2022).

Em mulheres, o hipotireoidismo primário é mais frequente em comparação aos homens, com incidência entre 30 e 50 anos. O hipotireoidismo está presente, nos Estados Unidos, em cerca de 4 % das mulheres entre 18 e 24 anos e 21% das mulheres com mais de 74 anos e entre os homens cerca de 3% e 16%. Pesquisas apontam que no Reino Unido, o hipotireoidismo prevalece em 7,5% das mulheres e, apenas, 2,8% dos homens. (CHAKER, L., *et al.*, 2022).

1.2.2 Efeitos do hipotireoidismo sobre o ganho de massa corporal.

Em ratos o hipotireoidismo se relaciona com queda na massa corporal, visto que os hormônios tireoidianos agem na homeostase do peso corporal, pois a secreção do hormônio do crescimento é extremamente sensível ao T3. Dessa forma a ausência desses hormônios influencia o ganho de massa, e o platô do ganho de massa corporal por duas semanas é considerado padrão-ouro para admissão de hipotireoidismo nesse modelo animal (BIANCO *et al.*, 2014).

O hipotireoidismo afeta diretamente a função renal, levando à diminuição da reabsorção de sódio e água nos túbulos proximais. Essa patologia pode causar hiponatremia, que é definida como uma concentração plasmática de sódio inferior a 135 mmol/L, que pode não refletir uma deficiência de sódio, mas sim retenção de água livre gerada por uma secreção elevada de vasopressina, com hiposmolalidade dos fluidos corporais. (JEDRAS, *et al.*, 2013).

O tratamento do hipotireoidismo com L-T4 pode causar uma perda de peso considerável graças a excreção do excesso de líquidos corporais, por conta de um mixedema não tratado (KARNISHOLT, *et al.*, 2011). No entanto, outros estudos reportam que a reposição de tiroxina não provoca perda de peso e que alguns pacientes podem continuar engordando, mesmo fazendo uso dessa terapia farmacológica (JONKLAAS, *et al.*, 2011).

1.2.3 Efeitos do hipotireoidismo sobre o metabolismo energético e glicídico

O desenvolvimento da função tireoidiana pode afetar muitos órgãos devido aos hormônios tireoidianos serem reguladores críticos do metabolismo em diversas células do organismo, inclusive nas células beta pancreáticas. A isoforma alfa 1 do receptor do hormônio tireoidiano foi identificada em ilhotas pancreáticas adultas, sugerindo que esses hormônios desempenham um estímulo fisiológico para maturação pós-natal das células beta funcionais.

Nas ilhotas pancreáticas isoladas em humanos suas funções são claramente demonstradas, mas em modelos animais indicam que a secreção de insulina é prejudicada, e não aumentada, em respostas à glicose no hipotireoidismo. Esse aumento observado em alguns casos pode ser relacionado à resistência à insulina, alterações na depuração, diferenças sexuais ou ao grau de redução dos hormônios tireoidianos. Além disso, o receptor mitocondrial T3 p43 também regula a secreção de insulina e sua deficiência causa defeitos na secreção de insulina estimulada por glicose. Ainda assim, os mecanismos relacionados ao hipotireoidismo à secreção de insulina permanecem incertos, incluindo a possível influência da triiodotironina na expressão de GLUT2 e glucoquinase, que são sensores de glicose nas células beta pancreáticas (GODINI, A., 2015).

1.2.4 Transtornos de Ansiedade e Depressão e sua relação com o hipotireoidismo.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) registrou em 2022 que uma a cada oito pessoas apresenta algum tipo de transtorno mental. Aproximadamente 280 milhões de casos de depressão foram registrados mundialmente - um total de 3,8% da população mundial e 5% da população mundial adulta (OMS, 2023). Em 2019, a OMS registrou 301 milhões de pessoas vivendo com ansiedade mundialmente. Apenas no Brasil, cerca de 11,5 milhões de pessoas (5,8% da população) sofrem de depressão, enquanto 18,6 milhões (9,3%) lidam com distúrbios de ansiedade (Organização Panamericana de Saúde, 2017). A depressão é a principal causa de incapacidade no mundo, e embora existam tratamentos eficazes, menos da metade dos afetados recebe atendimento adequado devido ao estigma e à falta de recursos. (OMS - MENTAL HEALTH GAP ACTION PROGRAMME, 2023).

A Classificação Internacional de Doenças (CID-11) define depressão como uma condição em que o paciente experimenta “um rebaixamento do humor, redução da energia e diminuição da atividade” Os episódios depressivos podem ser leves, moderados ou graves, dependendo da complexidade dos fatores sociais, psicológicos e biológicos que acometem o indivíduo. A primeira busca de um tratamento é a o acompanhamento psicológico combinados ou não com medicamentos antidepressivos. Cerca de 280 milhões de pessoas no mundo sofrem de depressão, sendo mais comum em mulheres do que em homens e mais de 7.000.000 pessoas morrem devido ao suicídio todos os anos, sendo esse a quarta principal causa de morte entre os 15 e os 29 anos (OMS,2023).

A décima primeira revisão da Classificação Internacional de Doenças (CID-11) define ansiedade como um estado de apreensão ou antecipação que permite o indivíduo estar em alerta

a perigos ou eventos futuros desfavoráveis remetendo ao sentimento de preocupação, desconforto ou sintomas sintomáticos de tensão. Observa-se diversos aspectos clínicos que englobam os sintomas de ansiedade como: transtorno de pânico, agorafobia, transtorno de ansiedade social e outros (FROTA *et al.*, 2022). A ansiedade é prevalente em 301 milhões da população mundial, sendo 18,1% afetando os Estados Unidos (OSNAYA-BRIZUELA *et al.*, 2024).

O transtorno de ansiedade e a depressão são condições psiquiátricas que podem estar relacionadas, e muitas vezes exacerbadas, por fatores fisiológicos como o hipotireoidismo. A função normal do hipocampo depende de hormônios tireoidianos, tanto em fases de desenvolvimento, quanto na fase adulta, podendo induzir vias amiloidogênicas no mesmo, processo que ocorre também na doença de Alzheimer (GHENIMI *et al.*, 2010). A deficiência destes hormônios também pode reduzir a plasticidade neuronal no córtex, levando a *down regulation* de receptores de 5HT_{2A}, afetando a função do córtex pré frontal (JIN *et al.* 2021). Além disso, estudos demonstram que pacientes com a condição de hipotireoidismo apresentam prevalência de sintomas depressivos. (SANTIS, L.; CREMONEZI, I. 2023). Em casos graves, os sintomas podem se assemelhar à depressão melancólica e à demência, enquanto sintomas como aumento da sensação de fadiga e redução da atividade psicomotora, então relacionados ao desenvolvimento de ansiedade crônica em associação ao hipotireoidismo. (HAGE *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2022).

1.2.5 Memória declarativa, memória aversiva e sua relação com o hipotireoidismo

A memória declarativa envolve a recordação consciente de informações factuais ou de eventos. Este tipo de memória pode ser subdividido em memória episódica, que se refere a lembranças de eventos específicos e experiências pessoais, e a memória semântica, que se refere ao conhecimento geral sobre o mundo. A memória declarativa é mediada por estruturas cerebrais como o hipocampo e o córtex pré-frontal (MURTY, *et al.*, 2009; WANG, *et al.*, 2021). Este tipo de memória pode ser afetado por fatores emocionais, sendo apresentado frequentemente um desempenho de reconhecimento melhor quando há estímulos aversivos quando comparado com estímulos neutros (MURTY, *et al.*, 2009).

Já a memória aversiva refere-se à capacidade de lembrar de eventos ou estímulos que são percebidos como negativos ou ameaçadores. Este tipo de memória é frequentemente estudado em contextos de condicionamento ao medo, onde um estímulo neutro é associado a um evento aversivo, como um choque elétrico, resultando em uma resposta de medo quando o

estímulo neutro é apresentado posteriormente (BAUCH, *et al.*, 2014; XIA, *et al.*, 2023). Estudos mostram que eventos estressantes e aversivos são bem lembrados devido à ativação de sistemas neurais específicos, como o sistema mesolímbico e o hipocampo, que modulam a formação e a retenção dessas memórias (BAUCH, *et al.*, 2014).

O hipotireoidismo afeta o desenvolvimento de vários sistemas de neurotransmissores em várias regiões encefálicas, incluindo o córtex pré-frontal e o sistema colinérgico do hipocampo, e alterações na plasticidade sináptica do córtex pré-frontal medial e da via do hipocampo posterior, vias neurais críticas na aprendizagem e na memória (SUI *et al.*, 2006). Além disso, pode-se observar a diminuição no metabolismo sistêmico e comprometimento da função cognitiva levando a anormalidades de humor. (BATHLA *et al.*, 2016).

Pacientes com hipotireoidismo manifesto apresentam déficits significativos na memória espacial, associativa e verbal, que são funções fortemente dependentes das áreas hipocampal e frontal. O hipotireoidismo subclínico também prejudica a memória espacial e verbal, embora em menor extensão. O tratamento com levotiroxina (L-T4) pode normalizar a memória verbal em ambos os grupos, mas a recuperação da memória espacial é incompleta no hipotireoidismo manifesto (CORREIA *et al.*, 2009).

Embora os estudos fornecidos não mencionem explicitamente a "memória aversiva", ela pode ser afetada indiretamente por fatores comuns em pacientes com hipotireoidismo, como alterações no humor e na cognição (SAMUELS, *et al.*, 2007). Essas alterações emocionais e cognitivas são conhecidas por influenciar a forma como memórias aversivas são processadas e armazenadas, pois tais memórias são altamente sensíveis a estados emocionais.

Além disso, estudos em modelos animais sugerem que é possível que o hipotireoidismo intensifique a memória de medo, uma forma de memória aversiva, atrasando o processo de extinção dessa memória. Esse efeito parece estar relacionado ao aumento na liberação de corticosterona, bem como a maior expressão de receptores de glicocorticoides e mineralocorticoides na amígdala. Essas mudanças indicam uma maior vulnerabilidade a memórias emocionais e sugerem que o hipotireoidismo pode dificultar o desapego emocional de eventos traumáticos ou ameaçadores (MONTERO-PEDRAZUELA, *et al.*, 2011).

Portanto, em função das inúmeras questões apresentadas acima, torna-se imperativa a realização de protocolos experimentais que possam identificar as possíveis alterações na memória e analisar, no futuro, a eficácia da terapia com L-T4 para a reversão/prevenção dos sinais e sintomas de hipotireoidismo em um modelo de hipotireoidismo em ratos Wistar.

1.2.6 Efeitos do hormônio tireoidiano no cardiomiócito

O ciclo cardíaco é composto por uma sístole (contração) e uma diástole (relaxamento). O T3 encurta drasticamente o tempo de diástole, i.e., o coração hipertireoideo relaxa mais rapidamente (efeito lusitrópico), ao passo que a diástole é claramente prolongada em estados hipotireoideos em todas as espécies de mamíferos (Mintz et al., 1991). A velocidade com que a concentração de cálcio livre citosólico diminui, tornando-o menos disponível para a interação com a subunidade C da troponina dos miofilamentos leves, é um dos eventos cruciais para o estabelecimento do processo de diástole. Vários mecanismos de transporte envolvendo trocadores e bombas iônicas (ATPases) contribuem para a diminuição da concentração citosólica de cálcio, no entanto, a bomba de cálcio localizada no retículo sarcoplasmático SERCa2 (*sarcoplasmatic reticulum Ca^{++} ATPase*) é o mecanismo mais importante. O gene que codifica a SERCa2 é altamente responsivo ao T3 e tanto experimentos *in vivo* como em cultura de cardiomiócitos corroboram a ideia de que a expressão dessa proteína deve ser um efeito direto do T3. Curiosamente, o estímulo $\alpha 1$ -adrenérgico inibe esse efeito do T3 em corações de ratos (W et al., 1997).

Outra molécula importante na regulação do transiente de cálcio, i.e., os ciclos de liberação e remoção do cálcio citosólico a cada ciclo cardíaco, é o polipeptídeo denominado fosfolambam (PLB), que inibe diretamente a atividade da SERCa2 e é modulado negativamente pelo T3. O RNAm que codifica o canal de rianodina (RyR) e o canal para cálcio do retículo sarcoplasmático, também são modulados pelo T3. Por outro lado, a calsequestrina, uma proteína ligadora de cálcio do retículo, não sofre qualquer influência do HT. Em conjunto, o aumento da expressão/atividade da SERCa2 e da expressão dos canais de rianodina aumentam proporcionalmente a quantidade de cálcio liberada pelo retículo durante a sístole. Isto pode explicar, em grande parte, o aumento da força de contração do coração hipertireoideo.

Além do principal mecanismo de remoção citosólica de cálcio durante a diástole (SERCa2), outros mecanismos secundários, como o trocador Na^+/Ca^{++} ($I_{Na/Ca}$) e a Ca^{++} -ATPase do sarcolema, também são regulados pelo T3 em nível transcricional e pós-transcricional. Experimentos utilizando fração de membranas isoladas demonstraram ainda que a modulação sobre a Ca^{++} -ATPase do sarcolema deve ser em nível não-nuclear (ação não-genômica) (DAVIS, P.; DAVIS F., 1996).

Outros transportadores no sarcolema, como a Na^+/K^+ -ATPase ($I_{Na/K}$) que influencia indiretamente a concentração de cálcio citosólico, sofrem influência do T3. Assim, as

subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ e β da $I_{Na/K}$ sofrem *up-regulation* na transição do hipo para o eutireoidismo. A Figura 2 representa de forma simplificada alguns mecanismos básicos relacionados ao transiente de cálcio no cardiomiócito e a modulação desse processo pelo T3 que culmina nos efeitos inotrópico e lusitrópico positivos.

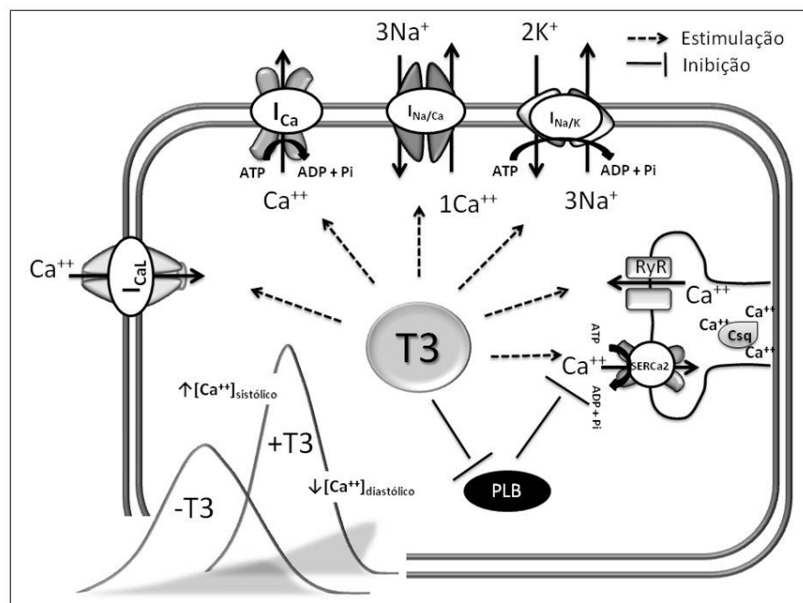


Figura 2: Representação esquemática dos efeitos estimuladores e inibidores do T3 sobre os mecanismos principais envolvidos na regulação do transiente de cálcio no cardiomiócito. As curvas abaixo representam curvas hipotéticas de desenvolvimento de força do cardiomiócito na ausência ($-T3$) ou presença ($+T3$) de T3. As ações do T3 em conjunto aumentam a concentração de cálcio na célula durante a sístole e diminuem durante a diástole o que leva ao aumento na velocidade e no desenvolvimento de força (inotropismo) e na velocidade de relaxamento (lusitropismo) respectivamente. A relação estequiométrica dos íons transportados foi preservada. I_{CaL} = canal para cálcio do tipo L, I_{Ca} = cálcio-ATPase do sarcolema, $I_{Na/Ca}$ = trocador sódio-cálcio do sarcolema, $I_{Na/K}$ = sódio-potássio ATPase, RyR = receptor de rianodina, SERCa2 = cálcio-ATPase do retículo, Csq = calsequestrina, PLB = fosfolambam. (Olivares EL, não publicado).

Além da modulação indireta da contractilidade miocárdica, i.e., a ação sobre a expressão/atividade de proteínas-chave para a regulação do transiente de cálcio no cardiomiócito, o T3 pode ainda interferir diretamente na maquinaria contrátil do coração. Exemplos típicos de alterações diretas induzidas pelo T3 sobre contractilidade cardíaca são as alterações das isoenzimas de miosina e nas isoformas da cadeia pesada de miosina (*myosin heavy chain*, MHC) observadas em estudos realizados principalmente em corações de ratos e coelhos. A holoenzima miosina consiste de duas MHCs e quatro cadeias leves. A miosina V1, que predomina em corações normais, consiste de duas α -MHC enquanto a V3 consiste de duas β -MHC e o heterodímero V2 de uma α -MHC e outra β -MHC. A velocidade ATP-ásica dessas

isoformas depende, portanto, das MHCs que a constituem e tem a seguinte ordem de velocidade: $V1 > V2 > V3$. A alteração no predomínio de uma determinada isoenzima MHC a despeito de outra, irá determinar a velocidade de contração do miocárdio. Portanto, o T3 tem papel de destaque nessas alterações uma vez que ele regula positivamente a expressão do gene que codifica a α -MHC e negativamente a β -MHC. Isso explica o predomínio da isoforma V3 e baixas atividade ATP-ásica e velocidade de contração em corações hipotireoideos. Por outro lado, em corações hipertireoideos, onde a miosina é composta quase exclusivamente pela α -MHC, o *turnover* no movimento da cabeça globular de miosina ao longo dos filamentos de actina é mais rápido, o que garante maior velocidade de contração (Figura 3).

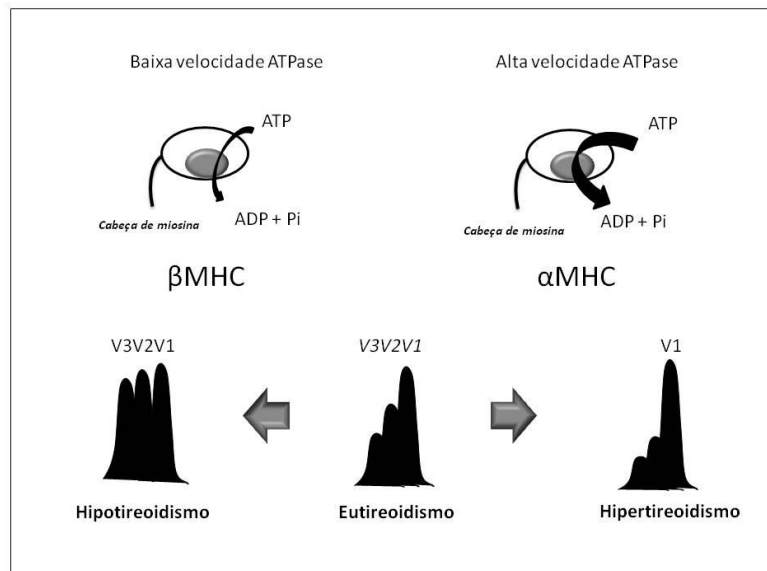


Figura 3: Representação esquemática da eficiência (velocidade, proporcional a espessura da seta) de hidrólise de ATP das diferentes isoenzimas ATPases de miosina (acima) e alterações hipotéticas na expressão das diferentes isoformas de miosina (V1, V2 e V3) de ventrículos de ratos na transição do eutireoidismo para o hipo ou hipertireoidismo (abaixo). (Olivares EL, não publicado).

Vale lembrar que, essa modulação do T3 sobre a expressão das isoenzimas MHCs foi observada principalmente em animais experimentais e que, em seres humanos, por outro lado, a β -MHC constitui mais de 95% das isoenzimas de miosina e não sofre influência significativa do *status* tireoidiano. No entanto, já foi descrito em um paciente hipotireoideo portador de insuficiência biventricular grave, aumento de 14 a 44% da fração de ejeção ventricular esquerda após nove meses de terapia com T4. Curiosamente, após a análise do RNAm por reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) antes e após a terapia, houve aumento de 11 vezes na concentração de MHC com diminuição mínima nos níveis de β -MHC (LADENSON *et al.*, 1992). Portanto, é possível que o T3 possa modular a expressão das isoenzimas de MHC e a contractilidade miocárdica também em seres humanos.

Os cardiomiócitos representam 1/3 das células do coração, no entanto devido ao seu grande tamanho, eles possuem 2/3 das proteínas totais do órgão. Por outro lado, os fibroblastos cardíacos, células muito menores que as células contrácteis, representam 2/3 das células totais do coração e possuem somente 1/10 do número de TR por célula comparados aos cardiomiócitos. O sistema vascular do miocárdio contribui com um número pequeno de células, incluindo células endoteliais e células musculares lisas principalmente. Assim, no hipertireoidismo, ocorre aumento na síntese proteica total nos cardiomiócitos o que resulta no aumento na massa do coração e hipertrofia cardíaca moderada. Além disso, a hipertrofia cardíaca induzida pelo T3 é completamente revertida com o restabelecimento do *status* eutireoidiano. É possível que o HT em elevadas concentrações possa agir diretamente no miocárdio causando hipertrofia, porém, acredita-se que a atividade dos sistemas nervoso simpático e renina-angiotensina possam estar aumentadas no hipertireoidismo, e que ambos possam contribuir de forma importante na indução da hipertrofia cardíaca em animais tiroxêmicos.

1.2.7 Efeitos do hormônio tireoidiano na eletrogênese e condução do estímulo cardíaco

Os eventos moleculares que caracterizam os efeitos do T3 sobre a atividade elétrica cardíaca não são amplamente conhecidos. No entanto, sabe-se que o HT induz ao aumento no recrutamento de canais para sódio de inativação lenta e que o *status* tireoidiano também influencia a atividade/expressão dos canais para potássio dependentes de voltagem (K_v) do sarcolema, como o $K_v1.5$, $K_v4.2$ e $K_v4.3$. A atividade de um canal para potássio específico, o I_{to} (canal para potássio transiente de efluxo), que participa da repolarização precoce (fase 1 do potencial de ação rápido) nas células de Purkinje, é reduzida no hipotireoidismo em ratos. Quando esses animais são tratados com T3, essa alteração é revertida (SHIMONI *et al.*, 1995). Por outro lado, já foi demonstrado que em corações de coelhos hipertireoideos a corrente de potássio aumenta o que leva ao encurtamento do potencial de ação no cardiomiócito.

Muitas das alterações nos canais iônicos do sarcolema são baseadas em alterações na expressão de algumas subunidades constituintes desses canais. Por exemplo, o efeito do T3 no aumento da frequência cardíaca pode ser também explicado pelo aumento da corrente i_f (*funny current*) no nodo sinusal (NSA) que, devido ao fato de ser dependente de hiperpolarização para se tornar completamente ativa, também é conhecida por *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated current* (HCN), uma das correntes mais importantes para a atividade

marcapasso do NSA. As proteínas que constituem o canal i_f são produtos dos genes HCN1, HCN2 e HCN4 expressos no NSA e modulados positivamente pelo T3. Os canais para cálcio do tipo L (I_{CaL}), além de contribuírem para a fase 2 (platô) do potencial de ação rápido no cardiomiócito, gera a corrente de influxo (despolarização, fase 0 do potencial de ação lento) nos tecidos nodais (nodos sinusal e átrio-ventricular) e também sofrem a influência positiva do T3. Provavelmente, isso contribui para o efeito cronotrópico positivo induzido pelo T3. Os efeitos estimuladores do T3 sobre algumas correntes iônicas constituintes do potencial de ação rápido (dos cardiomiócitos) e lento (dos nodos) estão representados na Figura 4.

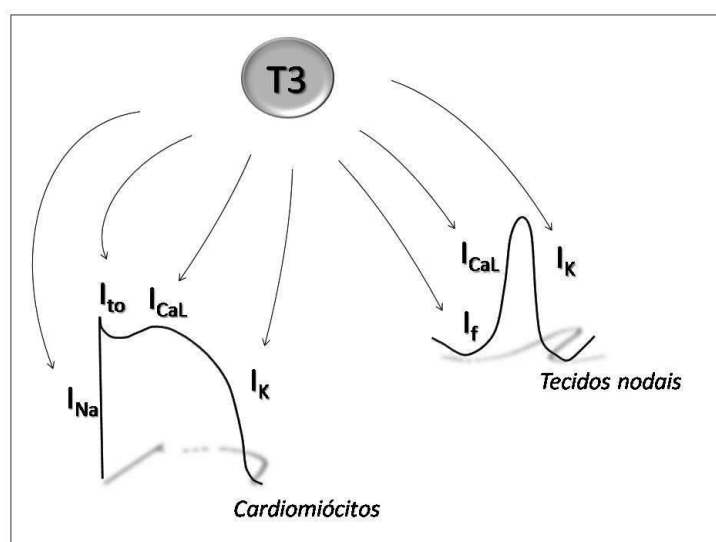


Figura 4: Representação esquemática do efeito estimulador do T3 sobre algumas correntes iônicas envolvidas na gênese do potencial de ação rápido, encontrado nos cardiomiócitos, e lento, característico dos tecidos nodais (nodo sinusal e átrio-ventricular). I_{Na} = canal para sódio, I_{to} = canal para potássio transiente de efluxo, I_{CaL} = canal para cálcio do tipo L, I_K = canal para potássio retificador retardado, I_f = corrente marcapasso ("funny current"). (Olivares EL, não publicado).

1.2.8 Relação entre o hormônio tireoideano e o sistema adrenérgico

Muitas das manifestações cardiovasculares do excesso de hormônio tireoideano se assemelham àquelas produzidas pela estimulação simpatoadrenal. Como os níveis plasmáticos de catecolaminas e as taxas de turnover não aumentam no hipertireoidismo (OSUNA, P. *et al.*, 2017), tem sido argumentado que os efeitos do hormônio tireoideano resultam em parte do aumento da responsividade às catecolaminas. Esta hipótese é apoiada por estudos que indicam que o número e a sensibilidade do receptor β -adrenérgico (β AR) aumentam em corações

isolados e células cultivadas de animais experimentais (geralmente o rato) tratados com hormônio tireoidiano (WILLIAMS *et al.*, 1977; MORKIN *et al.*, 1983).

A influência do hormônio tireoidiano na responsividade adrenérgica é particularmente controversa em grandes animais e humanos, mas Hoit *et al.* (1997) sugerem que os efeitos mecânicos cardíacos do hipertireoidismo não podem ser explicados pela sensibilidade aumentada às catecolaminas. Apesar de aumentos significativos na frequência cardíaca basal e nas taxas de contração e relaxamento do ventrículo esquerdo (VE), a resposta aos agonistas β -adrenérgicos não aumentou em babuínos hipertireoideos. Índices basais aumentados de contração e relaxamento do VE neste modelo estão mais claramente relacionados a mudanças na expressão da isoforma da cadeia pesada da miosina e à abundância relativa das bombas de cálcio do retículo sarcoplasmático, seu inibidor (Fosfolambam), embora outros efeitos mediados pelo hormônio tireoidiano como aqueles relatados para canais de cálcio do tipo L e bombas de Na^+/K^+ -ATPase, não possam ser excluídos.

O hormônio tireoidiano potencializa o efeito do sistema adrenérgico no coração, mas os níveis de catecolaminas estão normais ou diminuídos na tireotoxicose (OSUNA, P. *et al.*, 2017). A facilitação da ação das catecolaminas é feita pelo aumento da sensibilidade do tecido pelo aumento da transcrição de receptores beta-adrenérgicos e pela similaridade estrutural com as catecolaminas. O hipertireoidismo está associado à atividade vagal reduzida e à variabilidade reduzida da frequência cardíaca, que pode persistir apesar da restauração do eutireoidismo (OSUNA, P. *et al.*, 2017). Ojamaa *et al.* indicam que uma análise confinada às mudanças na expressão do receptor β_1 -adrenérgico é insuficiente para averiguar o papel das catecolaminas como mediadoras dos efeitos dependentes do hormônio tireoidiano na responsividade autonômica do coração. É importante considerar todos os três componentes, o receptor β_3 -adrenérgico, a proteína acoplada G e a expressão da subunidade catalítica na avaliação da responsividade adrenérgica dos tecidos-alvo.

1.2.9 Tratamento do Hipotireoidismo

O tratamento padrão do hipotireoidismo consiste na reposição hormonal com levotiroxina (L-T4), geralmente eficaz na normalização dos níveis de TSH e na melhoria dos sintomas em muitos pacientes (GULLO *et al.*, 2011). Quando administrado o L-T4 na forma farmacêutica de comprimidos por via oral, a digestão ocorre através das enzimas intestinais acarretando a desintegração e dissolução no estômago, por ser um ambiente ácido. Posteriormente, é absorvido pelo intestino delgado e metabolizado em T3 pelas desidases D1

e D2, enquanto a D3 desativa os hormônios tireoidianos formando T3 reverso (GUNASEKARAN *et al.*, 2024). O T3, age nos receptores nucleares de células-alvo, modulando a transcrição de genes e regulando funções metabólicas essenciais como o crescimento, o desenvolvimento, manutenção da homeostase energética, dentre outros (LADENSON *et al.*, 2000).

Para um tratamento bem-sucedido com o L-T4, é importante destacar fatores que impactam na adesão ao tratamento, podendo ser intencional ou não. A administração do L-T4 com alimentos pode atrasar e reduzir a absorção, sendo necessário tomar o medicamento com estômago vazio, antes do café da manhã. Além disso, as interações medicamentosas também podem interferir na absorção e eficácia do L-T4, especialmente os antibióticos, hidróxido de alumínio, sulfato e alguns multivitamínicos. Portanto, recomenda-se fortemente educar os pacientes e monitorar regularmente as funções tireoidianas. Certas condições genéticas, ou não, podem influenciar na eficácia do T4, como gastrites associadas a *Helicobacter pylori* ou cirurgias bariátricas que afetam a dosagem do T4. Nesses casos, é necessário ajustar a dose, aumentando ou diminuindo dependendo da circunstância (GUNASEKARAN *et al.*, 2024).

Pesquisas apontam que pacientes diagnosticados com hipotireoidismo e tratados com T4 podem enfrentar sintomas de depressão por longos períodos, mesmo com níveis de TSH considerados normais (ETTLESON *et al.*, 2020). Além disso, uma pesquisa em larga escala, realizada para compreender melhor a insatisfação com o tratamento padrão, revelou que 50% dos participantes acreditam na possibilidade de novos tratamentos que possam reduzir os efeitos adversos persistentes da doença (ETTLESON *et al.*, 2020). Essa insatisfação reflete que uma parcela considerável de pacientes continua a apresentar sintomas relacionados ao hipotireoidismo, mesmo com boa adesão ao tratamento. Esses dados sugerem que a reposição hormonal exclusiva com T4 pode não ser totalmente eficaz em todos os casos, destacando a necessidade de considerar abordagens terapêuticas adicionais ou alternativas (GULLO *et al.*, 2011).

Norma Osnaya-Brizuela *et al.* (2024), compararam pacientes adultos com hipotireoidismo em dois casos: sem tratamento e com tratamento com L-T4, relacionando esses grupos com a prevalência de depressão e ansiedade (Figura 5). Pacientes com hipotireoidismo não tratados com L-T4, apresentam níveis de TSH elevados e baixos níveis de T3 e T4, com aproximadamente 79% dos pacientes sendo diagnosticados com depressão. Por outro lado, pacientes com hipotireoidismo em tratamento com L-T4, e TSH normal ou próximo do normal

apresentaram sintomas de depressão, mesmo com tratamento, em aproximadamente 12,1% a 66,7% dos casos.

Portanto, estudos mostram que um número significativo de pacientes ainda sofre com sintomas neuropsiquiátricos residuais, como depressão e ansiedade, mesmo após a normalização do TSH, que é considerado objetivo principal do tratamento de reposição hormonal com LT4. A persistência desses sintomas sugere que a monoterapia com levotiroxina pode não ser suficiente para restaurar plenamente o bem-estar psicológico, por estar relacionado a alterações na ativação do T4 em T3, um processo mediado principalmente pela enzima desidase do tipo 2 (D2), sugerindo que a D2 poderia estar sofrendo inativação pelo T4 exógeno, principal mecanismo de inativação da D2 por ubiquitinação enzimática (DE CASTRO *et al.*, 2015). Como consequência, esses indivíduos podem não alcançar os níveis de T3 necessários para uma função cerebral ideal, o que pode justificar a continuação dos sintomas de natureza psicológica (WIERSINGA, 2014).

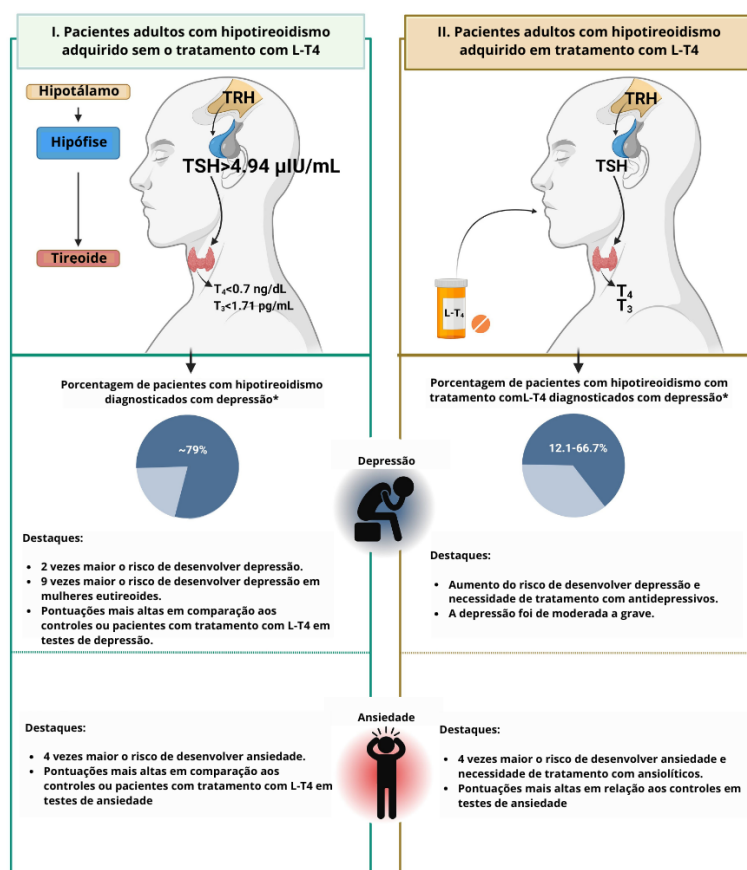


Figura 5: Associação entre o hipotireoidismo adquirido e o desenvolvimento de distúrbios depressivos ou de ansiedade. Imagem I) Paciente com hipotireoidismo não tratado com L-T4 com baixos níveis de hormônios tireoidianos, demonstrando um risco aumentado de depressão e ansiedade. Imagem II) Paciente em tratamento com L-T4, evidenciando os riscos de distúrbios depressivos e ansiosos ainda persiste mesmo com o tratamento, mas em menor escala (modificado de OSNAVA-BRIZUELA *et al.*, 2024)

2 JUSTIFICATIVA

O hipotireoidismo é a doença mais prevalente entre as condições causadas por deficiência hormonal, afetando milhões de pessoas globalmente. No Brasil, um estudo transversal realizado na cidade de São Paulo identificou que 6,6% dos adultos analisados apresentavam a doença (DA SILVA *et al.*, 2011; DE CASTRO *et al.*, 2015). Os sintomas associados ao hipotireoidismo podem se manifestar de forma isolada ou combinada, com graus variados de intensidade. Dentre os principais sintomas, destacam-se fadiga, depressão, ansiedade, perda de memória e concentração, constipação e alterações no reflexo de Aquiles (NOGUEIRA *et al.*, 2011; WIERSINGA, 2014).

Apesar dos avanços no entendimento dos aspectos metabólicos do hipotireoidismo, ainda existem lacunas significativas em relação aos seus efeitos sobre as funções cognitivas e comportamentais, particularmente em modelos experimentais com animais. Uma pesquisa na base de dados PubMed, utilizando os descritores "hipotireoidismo", "ratos" e "comportamento", revelou um número limitado de estudos focados na caracterização dessas alterações. Além disso, são escassos os estudos que avaliam a aquisição de memória em modelos de hipotireoidismo induzido por tireoidectomia em ratos. Por fim, não há estudos que combinem as avaliações comportamentais e cardiovasculares e estudos multissistêmicos são raros em modelo de hipotireoidismo induzido por tireoidectomia. Há também uma carência de estudos que utilizem o mesmo grupo de animais para diferentes abordagens (protocolos) experimentais.

Dada a escassez de pesquisas que investiguem os déficits cognitivos e as alterações metabólicas e cardíacas induzidas pelo hipotireoidismo experimental, este estudo se mostra de grande relevância, pois visa contribuir para um entendimento mais integrada da fisiopatologia do hipotireoidismo. Para testar futuras alternativas farmacoterapêuticas, é essencial caracterizar antes, os parâmetros alterados no modelo experimental de hipotireoidismo, utilizando um grupo único de animais para todas as abordagens experimentais.

Por fim, este estudo justifica-se pela necessidade de gerar novos conhecimentos que ampliem a literatura científica sobre o hipotireoidismo. A relevância deste projeto reside na sua capacidade de delinear de forma mais precisa as alterações cognitivas, comportamentais e cardíacas observadas em ratos e traçar paralelos com aquelas observadas em pacientes hipotireoideos, contribuindo para um melhor entendimento dessas condições em um contexto clínico.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar as repercussões do hipotireoidismo induzido experimentalmente sobre as funções cognitivas e a função cardíaca, além de avaliar o impacto dessa condição no metabolismo glicêmico. Hipótese: O hipotireoidismo experimental em ratos Wistar leva às mesmas alterações clínicas vistas em humanos.

3.2 Objetivos Específicos

Buscou-se avaliar os efeitos do hipotireoidismo induzido por tireoidectomia total sobre:

1. Ganho de massa corporal, glicemia e concentração de TSH e T4 Total.
2. Parâmetros comportamentais semelhantes a ansiedade e depressão, assim como alterações em memória declarativa e aversiva.
3. Eletrogênese e condução elétrica do estímulo cardíaco *in vivo* e *ex vivo*, e modulação autonômica da frequência cardíaca.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto seguiu todas as normas éticas de utilização de animais de laboratório conforme publicado (*Guide for the care and use of laboratory animals published by the US National Institutes of Health – NIH Publication N°.85-23, revised 1996*) e aprovado pelo comitê de ética do ICBS/UFRRJ, sob o de número: 01/2023.

4.1 Animais

Foram obtidos 40 ratos Wistar machos recém desmamados do Biotério de criação do núcleo de animais de laboratório da Universidade Federal Fluminense/RJ e alocados no biotério experimental do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCFis) da UFRRJ, em caixas contendo, no máximo, 5 animais cada. Todos os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), com ciclo claro-escuro de 12/12 horas (luz das 7:00 às 19:00 horas) e ração e água *ad libitum*. Foram mantidos em um período de adaptação de 15 dias, prévios a qualquer experimento.

4.2 Tireoidectomia

O hipotireoidismo sistêmico pode ser induzido em ratos ou camundongos por tireoidectomia total (Figura 6) devido ao fácil acesso à glândula tireoide, alcançando-se o quadro desejado (que substancial dos níveis de HT e aumento do TSH) geralmente entre 5 e 8 semanas após a cirurgia. Em roedores submetidos à hemi-tireoidectomia, desenvolve-se uma forma branda de hipotireoidismo (BIANCO *et al.*, 2014).

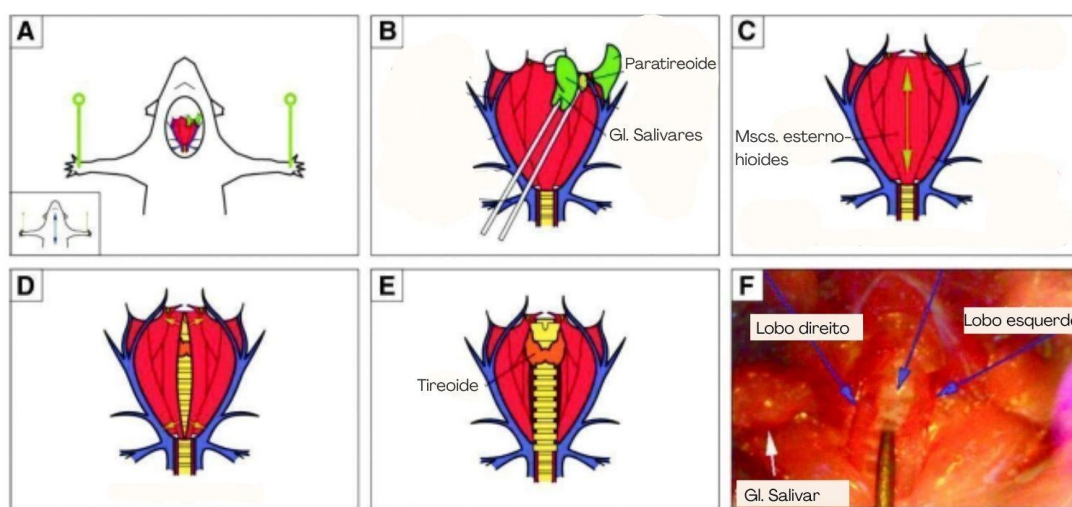


Figura 6: Representação esquemática do acesso à glândula tireoide. A: Incisão e abertura da pele. B: Afastamento das glândulas salivares. C: Separação do músculo esterno-hioideo. D: Afastamento lateral dos músculos. E e F: Visualização da tireoide. (Adaptado de BIANCO *et al.*, 2014).

Todo o procedimento cirúrgico seguiu as recomendações da Associação Americana de Tireoide (BIANCO *et al.*, 2014), de De Castro *et al.*, 2015 e Alzoubi *et al.*, 2009. Os animais com 200-320g, de massa corporal, foram anestesiados por injeção intraperitoneal com uma mistura de cetamina e xilazina contendo 60mg/Kg e 8mg/Kg, respectivamente, sendo divididos entre grupo controle (SHAM, n= 20) e grupo tireoidectomizado (TX, n=20). O procedimento cirúrgico foi iniciado com a assepsia e tricotomia da região cervical anterior, em seguida, foi realizado uma incisão na pele, afastando cuidadosamente as glândulas salivares e separando os músculos esterno-hioideos lateralmente obtendo uma visualização completa da glândula tireoide (Figura 6F). A remoção da tireoide foi feita bilateralmente, com extremo cuidado para não danificar o nervo laríngeo e evitar a remoção das paratireoides. Após a remoção, as glândulas salivares e os músculos foram reposicionados nas suas respectivas posições originais e a pele foi suturada. Por fim, foi administrado o antibiótico Pencivet PPU Plus na dose de 0,1mL/100g de massa corporal por via intramuscular, com amplo espectro de ação, para

prevenção de infecções bacterianas em animais, assim como Meloxicam 0,2% na dose de 0,05ml/100g de massa corporal por via subcutânea para controle algico. Todos o procedimento anestésico e cirúrgico foi repetido no grupo controle (SHAM), com a diferença de que a glândula tireoide não foi removida. Ou seja, esse grupo passou por uma cirurgia simulada, onde todas as etapas foram realizadas, exceto a retirada da tireoide.

Após a cirurgia, todos os animais foram monitorados até a completa recuperação da anestesia/cirurgia e foram adotadas medidas de higienização da sutura até a cicatrização total, garantindo o bem-estar dos animais e a integridade do processo experimental, sendo que durante a recuperação anestésica, três ratos do grupo SHAM apresentaram parada cardiorrespiratória, seguida de morte.

4.3 Tratamento pós-operatório e protocolo experimental

Após o procedimento cirúrgico de tireoidectomia, os ratos do grupo TX foram mantidos com metimazol 0,05%, um fármaco anti-tireoidiano (bloqueador da síntese de HT) da classe das tionamidas, na água para induzir e manter o estado de hipotireoidismo. Os animais foram divididos em grupos com o objetivo de avaliar as alterações comportamentais induzido por tireoidectomia total e a avaliação da glicemia.

A Figura 7 ilustra resumidamente o protocolo experimental adotado nesse estudo. No dia seguinte à tireoidectomia ou à falsa-cirurgia (dia 1), os animais foram tratados conforme o estabelecido para cada grupo até o término do estudo (dia 30). Os testes comportamentais foram realizados entre os dias 21 e 30, enquanto a avaliação cardíaca *in vivo* ocorreu entre os dias 31 e 32, com o intuito de avaliar os parâmetros cardíacos em condições fisiológicas estáveis e com os efeitos do hipotireoidismo estabelecidos a longo prazo. Após os protocolos experimentais, os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação e, logo em seguida, amostras de tecidos foram recolhidas para futuros projetos envolvendo estudos de expressão gênica em diversos tecidos e amostras de sangue foram coletadas para análises posteriores de TSH e T4.

Todos os tecidos foram colocados em eppendorfs identificados e armazenados sob resfriamento a -80°C. As amostras de sangue foram centrifugadas e os soros das amostras de cada animal foram retirados e armazenados em eppendorfs a -20°C. Para as dosagens séricas hormonais, os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação e o sangue foi coletado e centrifugado (1000×g por 20 minutos, a 2-8°C).

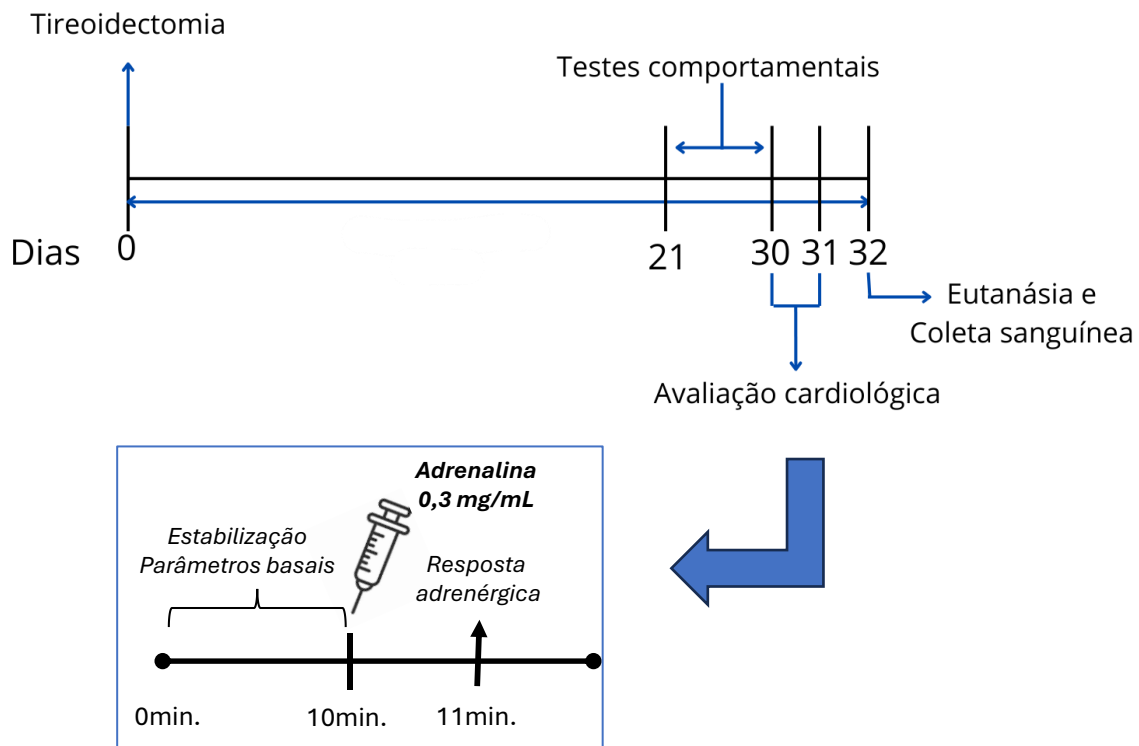


Figura 7: Representação esquemática do protocolo experimental.

4.4 Massa Corporal.

O ganho de massa corporal dos animais foi avaliado 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 ganho de massa, é possível definir um estado de hipotireoidismo sistêmico.

4.5 Dosagens hormonais de TSH e Tiroxina.

As dosagens hormonais foram realizadas por MILLIPLEX® *Rat Thyroid Hormone Panel* que consta de um kit de 3 complexos para ser usado para a quantificação simultânea de qualquer um ou todos os seguintes analitos em amostras de soro, plasma e cultura de tecidos: T4 total e TSH. Este kit utiliza um formato de 96 poços, contém um coquetel padrão liofilizado, dois controles internos de qualidade de ensaio e pode medir até 38 amostras em duplicata. Nesse estudo, foram realizadas dosagens de TSH e T4 no soro dos ratos de todos os grupos.

4.6 Dosagem de glicose no sangue

Para determinação de glicose no sangue foram utilizadas “Tiras de testes Wellion® LUNA” para testar os níveis de glicose em sangue capilar. Após a eutanásia por decapitação, foi coletada uma gota da amostra total e a tira-teste foi posicionada de modo que a gota de sangue preenchesse toda a superfície da tira destinada a leitura. Assim, a tira foi introduzida no aparelho (monitor) com leitura instantânea da glicemia.

4.7 Testes comportamentais

Os testes comportamentais foram realizados para avaliar comportamentos análogos à ansiedade e à depressão, memória declarativa e aversiva, e mobilidade de todos os ratos. Estes testes foram realizados na ordem do menos invasivo ao mais invasivo, considerando que o estresse causado por um teste mais invasivo poderia causar alterações não relacionadas ao hipotireoidismo em testes subsequentes.

Todos os testes foram realizados com intervalo de 24 horas entre eles, com exceção do campo aberto e do labirinto em cruz elevado – realizados no mesmo dia, com intervalo de 6 horas.

4.7.1 Teste do Campo Aberto

Em 1934, Hall descreveu o teste de campo aberto, que basicamente consiste em submeter um animal experimental em um ambiente desconhecido cercado por paredes, impedindo sua fuga. Esse teste permite analisar e estudar a emocionalidade dos roedores por meio de diversos parâmetros comportamentais, como: locomoção horizontal (número de cruzamentos das linhas marcadas no chão), frequência de levantamento ou inclinação (*rearing ou leaning*) e aliciamiento dos pelos (grooming). Esses comportamentos foram avaliados em um período de 5 minutos. De modo geral, os animais preferem a periferia do campo, desenvolvendo o comportamento chamado de tigmotaxia. Já a permanência prolongada na área central indica um efeito de ansiólise (PRUT, L.; BELZUNG, C., 2003).

Além disso, é considerado um modelo confiável para se testar drogas com propriedades ansiolíticas, por fornecer uma indicação geral do nível de atividade do animal e poder avaliar as condições de comportamento, como o estresse, sobre a mobilidade (PRUT, L.; BELZUNG, C., 2003).

Em nosso estudo, cada animal foi colocado individualmente no centro de uma caixa de acrílico (80cm x 80cm x 30cm), dividida em 25 quadrantes de tamanho igual, distribuídos em três zonas distintas: central, intermediária e periférica. Os animais exploraram o ambiente livremente por 5 minutos, durante esse período foi registrado o número de quadrantes totais, número de quadrantes periféricos, o número de quadrantes centrais, o tempo gasto na zona central, número de levantamentos das patas dianteiras contra as paredes da arena (rearings) e o tempo de grooming. (MCILWAIN *et al.*, 2001). Entre as trocas de animais era feita a limpeza do ambiente utilizando álcool 70% para garantir a confiabilidade do teste.

4.7.2 Teste do Labirinto em Cruz Elevado

O teste do Labirinto de Cruz Elevado (LEC) é um método que proporciona avaliar o comportamento associado a ansiedade através de respostas na exploração e aversão ao risco. A estrutura do aparelho foi conduzida para que esses comportamentos fossem projetados da melhor maneira, primeiramente Montgomery apresentou um aparelho em formato de Y, com um braço aberto e um braço fechado, com o intuito do animal escolher um caminho expondo a um conflito. Posteriormente, Handley e Mithani, modificaram a estrutura do teste para um labirinto com dois braços fechados e dois braços abertos, e apresentaram estímulos nocivos proporcionando um comportamento aversivo de risco e ansiedade, quando posicionado mais tempo nos braços fechados, e indicando uma redução na ansiedade e maior disposição para explorar, quando posicionado mais tempo nos braços abertos (WALF *et al.*, 2007).

O teste proporciona diversas aplicabilidades para a pesquisa, pode-se realizar estudos de pré-triagem de agentes farmacológicos, efeitos ansiolíticos, efeitos de senescência e para ensaios comportamentais avaliando regiões límbicas, por exemplo. Utilizado, também, para insights sobre condições como transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) e outros sintomas associados a ansiedade (KRAEUTER A. *et al.*, 2019; WALF *et al.*, 2007).

O aparelho utilizado neste estudo no teste do labirinto em cruz elevado é composto por dois braços abertos (50 x 10cm) e dois braços fechados, com as mesmas dimensões, posicionados de maneira aposta e situados a 4 cm de altura. Os braços são conectados por uma plataforma central (10 x 10cm), formando uma estrutura em forma de cruz.

No experimento, os ratos foram colocados individualmente na plataforma central com a cabeça voltada para um dos braços fechados, e tiveram 5 minutos para explorar o aparato. Durante esse período, foram registrados parâmetros indicativos de comportamento ansioso, como o tempo de permanência e a frequência de entradas nos braços abertos e fechados. Entre

as trocas de animais era feita a limpeza do ambiente utilizando álcool 70% para garantir a confiabilidade do teste.

Após a coleta dos dados, calculou-se a porcentagem de entradas nos braços abertos e o tempo de permanência na plataforma central. Além disso, a atividade exploratória e o comportamento de tomada de decisão dos ratos foram avaliados por meio de parâmetros como o número de imersões de cabeça (*head dipping*), movimentos verticais (*rearing*), número de extensões das patas traseiras (SAP) e a produção de bolos fecais.

4.7.3 Teste de reconhecimento de objetos

O Teste de Reconhecimento de Objetos é um teste frequentemente empregado para avaliar a memória declarativa em roedores, aproveitando a tendência inata desses animais de explorar mais intensamente objetos novos em relação aos objetos velhos (BEVINS, R; BESHEER, J., 2006).

Na realização do experimento, utiliza-se uma caixa de acrílico com 80 cm x 80 cm x 30 cm de dimensão, dividida em 25 quadrantes. No dia anterior ao teste, cada animal é habituado ao aparelho, que fica sem objetos por 5 minutos, permitindo que eles se familiarizem com o aparato. No dia seguinte, realiza-se uma fase de treinamento, na qual o animal é colocado no aparato na presença de dois objetos idênticos para livre exploração. O treinamento durou 3 minutos ou terminou quando o animal somou 20 segundos de exploração dos objetos.

Após o intervalo de 6 horas, o animal foi colocado novamente na caixa para o teste. Agora, o aparelho possuía um objeto familiar (um dos objetos apresentados na fase do treinamento) e um objeto novo. Esta fase tem como intuito avaliar a retenção de memória e durou 5 minutos. Neste período, registrou-se o tempo que o animal gastou de exploração de cada um dos objetos. (LEGER, 2013).

Para garantir a confiabilidade dos resultados, entre cada teste, a caixa e os objetos são limpos com álcool 70%, eliminando pistas olfativas que possam influenciar a escolha do animal.

Para os resultados desse teste são utilizados 3 índices de discriminação, que auxiliam a definir o interesse do animal pelo objeto novo em relação ao objeto familiar. Sendo eles o tempo de reconhecimento total de objetos (e2), que é a soma dos tempos de que o animal interage com o objeto conhecido (a) e com o objeto novo (b) e representa a interação geral do animal com os

objetos; índice de discriminação absoluta ($d1$), que é a diferença entre o tempo de exploração do objeto novo (b) e o do objeto conhecido (a), sendo calculado como $d1=b-a$ e mede a preferência pelo objeto novo sem considerar o tempo total de exploração; e índice de discriminação relativa ($d2$), obtido ao dividir o índice $d1$ pelo tempo total de exploração $e2$, como $d2=d1/e2$.

4.7.4 Teste de preferência por sacarose

A depressão apresenta diversos sintomas, entre eles, é possível destacar o humor deprimido ou a diminuição acentuada do interesse ou prazer nas atividades diárias (anedonia). Este último, é passivo de simulação em animais e medida por meio de diferentes parâmetros comportamentais (MOREAU, 1992).

Katz e colaboradores de suas pesquisas, em 1981, desenvolveram procedimentos em que os animais, especificamente os ratos, eram expostos a diversos estressores, como choque elétricos e imersão em água fria, com o intuito de causarem déficits comportamentais e alterações hormonais, efeitos esses que foram revertidos com antidepressivos. Com o estresse crônico apresentado pelos ratos, apresentaram disfunção no sistema de recompensa, evidenciada pela falta de aumento no de álcool, mesmo quando a água potável era adoçada (MOREAU, 1992).

Posteriormente, o pesquisador Willner, adaptou o procedimento com o objetivo de tornar os estressores mais leves e, conseqüentemente, obtendo uma redução progressiva da sensibilidade à recompensa, um sinal de anedonia. Como um dos paradigmas comportamentais para avaliação dos animais, foi utilizado o consumo de sacarose para demonstrar que o estresse leve reduziu o consumo ou a preferência por soluções de sacarose, refletindo uma diminuição da sensibilidade à recompensa (MOREAU, 1992).

Para avaliar o comportamento análogo à depressão nesse estudo, especificamente a anedonia, os animais foram alojados individualmente em gaiolas com disposição de duas garrafas: uma contendo água e outra, uma solução de sacarose a 0,08%, durante 24 horas. O consumo de água e de sacarose foi determinado pela diferença entre os pesos inicial e final de cada garrafa (OLIVARES *et al.*, 2012). A preferência pela sacarose foi expressa em valores percentuais, calculados pela razão entre o consumo de sacarose (diferença de peso da garrafa de sacarose) e o consumo total (soma da diferença de peso das garrafas de água e sacarose), multiplicando-se o resultado por 100.

4.7.5 Teste de esquivas passiva

Este teste foi realizado para avaliação da memória aversiva e foi conduzido em um aparato que consiste em uma caixa metálica com medidas de 50 cm x 25 cm x 25 cm, essa caixa contém em seu piso, uma grade com barras com espaçamento de 1 cm entre elas e uma plataforma elevada em relação à grade, que funciona como área de escape e o animal permanece protegido da aplicação de estímulo elétrico. A grade é conectada a um circuito elétrico, permitindo a aplicação de estímulos elétricos quando há um animal posicionado sobre ela.

O protocolo teve duração de três dias. No primeiro dia, o animal foi colocado na plataforma, e o tempo até que ele descesse com as quatro patas sobre a grade foi cronometrado. Assim que o animal posicionava as quatro patas sobre a grade, o cronômetro era pausado, e aplicava-se um estímulo elétrico de 1,0 mA por 2 segundos, com três repetições consecutivas. Após 4 horas, o procedimento foi repetido, mas com apenas um estímulo elétrico.

Nos dois dias subsequentes, o animal era novamente colocado sobre a plataforma, e o tempo que ele levava para descer era cronometrado. Caso o animal permanecesse na plataforma durante os três minutos de observação, o teste era finalizado. Como em todos os outros testes, a limpeza do aparato era feita com álcool 70%. Nesses dias, não havia aplicação de estímulo elétrico; a avaliação consistia apenas na mensuração do tempo de latência de descida, para análise da retenção de memória em curto e longo prazo. Esse protocolo segue as diretrizes estabelecidas por ROESLER *et al.* (1998; 2000).

A evitação passiva caracteriza-se pelo comportamento do animal de evitar retornar ao ambiente onde foi submetido ao estímulo aversivo, preferindo manter-se no local considerado mais seguro. Esse comportamento de esquivas passiva, que inclui aspectos similares ao medo contextual descrito por Pavlov, envolve uma resposta mensurável de aversão a uma área punitiva (ÖGREN *et al.*, 2010).

4.8 Registro Eletrocardiográfico (ECG) *in vivo*.

O registro eletrocardiográfico (ECG) permite o estudo da atividade elétrica do coração fornecendo as características funcionais e estruturais do coração. Os registros em modelo animal experimental são semelhantes em humanos, portanto, os parâmetros

eletrocardiográficos têm sido explorados em pesquisas sobre o desempenho do coração em condições fisiológicas (KONOPELSKI, *et al.*, 2016).

É possível observar alterações em cada parâmetro do ECG obtendo um diagnóstico final, incluindo frequência cardíaca, intervalo PR, duração da onda P, complexo QRS, duração do intervalo QT e QTc, onda R e amplitude da onda T (SVORC, P.; SVORC, Jr, P., 2022).

Os animais foram anestesiados com Isoflurano por via aérea, em proporção de 4% para indução e proporção de 2 a 2,5% para manutenção da cirurgia, de O₂, em seguida, foi realizado tricotomia e assepsia da região da parede anterior externa do tórax para então a implantação dos eletrodos para o registro do ECG. Através da incisão no dorso do animal os fios determinados como 1 e 2, foram transpassados subcutaneamente abaixo da axila esquerda do animal, com cautela devido a presença dos vasos dessa região, e foram suturados junto à musculatura peitoral.

O fio 1 foi suturado junto ao terço lateral do músculo peitoral esquerdo e o fio 2, suturado junto ao terço lateral do músculo peitoral direito, os dois fios determinaram uma linha reta na horizontal, formando uma derivação do triângulo de Einthoven (Figura 8). O fio 3, remanescente do eletrodo não transpassado para região peitoral, foi fixado junto à musculatura da perna esquerda posterior funcionando assim, como um fio terra.

Os animais foram acondicionados em gaiolas após despertarem da anestesia até a passagem completa do efeito dormente. Posteriormente os animais foram mantidos na sala de 31 do Instituto de Química da UFRRJ sob condições monitoradas de temperatura, luminosidade e níveis de ruídos controlados até o momento dos experimentos, assim como a alimentação, de acordo com o protocolo previamente estabelecido e água purificada *ad libidum*.

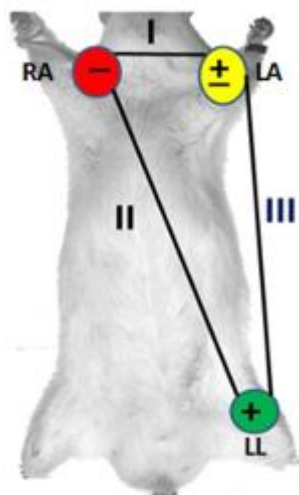


Figura 8: Localização da conexão dos eletrodos para registrar as derivações dos roedores no ECG. + e – representam os eletrodos positivos e negativos nas posições. RA: braço direito; LA: braço esquerdo e LL: perna esquerda. (Adaptado de JOUKAR, 2021).

Para o registro de ECG, os eletrodos foram conectados ao sistema de aquisição conectado a um computador através de um cabo USB. Utilizado o software PowerLab 400, ADInstruments, em uma frequência de amostragem de 100 Hz, calculando a frequência cardíaca e analisando a arritmia cardíaca. Os registros eletrocardiográficos foram realizados durante 10 minutos. Os dados de ECG foram analisados com o software Lab Chart 8 Pro (ADInstruments).

4.9 Análise de variabilidade da frequência cardíaca (VFC).

Para o estudo do controle autonômico cardíaco, foi utilizada a análise da variabilidade da frequência cardíaca. Posteriormente a obtenção do ECG (como descrito acima), foi realizada a contagem dos picos R-R sucessivos em um intervalo de 10 minutos, gerando a série temporal em pontos de 100 ms usando uma frequência de interpolação de 10 Hz. Antes do cálculo da densidade do poder espectral, os segmentos foram inspecionados visualmente para a detecção de segmentos de ruídos para que os mesmos pudessem ser desprezados da análise. As séries interpoladas foram divididas em segmentos de 512 pontos (51,2 s). O espectro de potência foi obtido com uma decomposição rápida baseada no método de Fourier que requer intervalos iguais de tempo, e integrados em bandas de baixa (BF: 0,20 – 0,75 Hz) ou alta (AF: 0,75 – 3,0 Hz) frequências, e a janela Hamming (Método de Welch: 256 pontos (duração 25,6 s), 50% de sobreposição e resolução de 0,039 Hz) foi utilizada para minimizar os efeitos secundários (AUBERT *et al.*, 2009, PEREIRA-JUNIOR *et al.*, 2010).

Após a detecção do pico da onda R, foram gerados tacogramas de 10 minutos contando todas as flutuações cardíacas dentro deste período. Foi feita a análise do intervalo PR medindo-

se o tempo do início da onda P até o início do complexo QRS, sendo importante para o diagnóstico de bloqueios atrioventriculares. Também foi feita a análise do intervalo QT, determinado pelo tempo de início da onda Q até o final da onda T, representando o tempo de despolarização e repolarização dos cardiomiócitos ventriculares. Para uma análise mais objetiva de despolarização e repolarização dos ventrículos foi analisado também o intervalo QT corrigido (QTc), correção que leva em consideração as alterações da frequência cardíaca.

Para análise espectral da VFC (domínio da frequência), os tacogramas foram redimensionados para intervalos iguais pelo método de interpolação cúbica, a 10 Hz, e a tendência linear foi removida. A potência (ms²) foi estimada como a área sob o espectro dentro dessas amplitudes de frequência (AUBERT *et al.*, 2009, PEREIRA-JUNIOR *et al.*, 2010). A medida relação BF/AF foi realizada para estudo do balanço entre o SNA simpático e parassimpático. A variabilidade da frequência cardíaca (VFC) contextualiza o grau de diferença nos intervalos entre os batimentos cardíacos sucessivos e fornece informações sobre o sistema nervoso autônomo, onde a estimulação simpática e parassimpática, diminui e aumenta, respectivamente, a VFC, por meio da modulação da atividade do nodo sinoatrial (JOUKAR *et al.*, 2021; PIZZO *et al.*, 2022).

4.10 Avaliação cardíaca ex vivo para avaliação de sensibilidade adrenérgica

A análise morfofuncional foi realizada após a eutanásia por decapitação seguida da remoção imediata dos corações. Os corações foram colocados em uma placa de Petri com volume suficiente de perfusato para cobrir o coração, em temperatura entre 0 e 3 °C. Em seguida, foram canulados através da aorta para um aparato Langendorff (Panlab, ADInstruments, EUA) e submetidos à limpeza, removendo as maiores estruturas ao redor que permaneciam com a amostra. A cânula foi inserida e fixada até perto do óstio coronário. O fluxo de perfusão, desde o momento da canulação aórtica até o primeiro minuto, foi de 5 ml/min e foi aumentado para 10 ml/min durante o segundo minuto. A solução de perfusão artificial utilizada foi a solução modificada de Krebs-Henseleit (KHS), contendo (em mM): 118 NaCl, 4,7 KCl, 1,2 MgSO₄, 1,2 KH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 10 glicose, 1,8 CaCl₂, saturada com uma mistura carbônica de 95% O₂ e 5% CO₂. A solução foi preparada sem CaCl₂, e este foi adicionado de forma fracionada à solução mãe já gasificada. A solução foi ajustada para pH 7,4 e mantida aquecida a 37 °C, sendo bombeada através do circuito pela bomba de perfusão.

O próximo passo foi inserir, por meio de uma incisão no átrio esquerdo, um balão de látex no VE conectado a uma cânula e a um transdutor de pressão. O balão foi previamente

preenchido com água destilada e ajustado para manter a pressão final diastólica (PFD) em 10 mmHg. O transdutor de pressão foi conectado a um amplificador ML110 (ADInstruments, EUA) e a função ventricular esquerda foi registrada por 10 min em condições basais e em seguida desafiados pela administração de adrenalina (Adl) a 0,3 mg/mL por meio de uma seringa acoplada a uma torneira de três vias. As gravações de pressão foram digitalizadas utilizando uma interface analógica-digital (PowerLab 400, ADInstruments, EUA) e armazenadas em um computador para análise offline com o software Lab Chart 8 Pro (ADInstruments, EUA). Ao final do protocolo de coração isolado, os corações foram coletados e devidamente pesados em uma balança eletrônica semi-analítica (AD 200, Marte Científica, Brasil).

4.11 Análise estatística

Os resultados obtidos foram apresentados em valores de média \pm erro padrão da média. A suposição da distribuição normal dos dados foi avaliada com o teste Shapiro-Wilk. Se os dados passassem no teste de normalidade, comparações paramétricas seriam realizadas. Foi utilizado o teste t para amostras independentes. Caso as amostras não exibissem distribuição normal, o teste escolhido foi o teste de Welch's. Contudo foi usado o teste de Grubbs para detecção de valores aberrantes. As diferenças serão consideradas estatisticamente significativas quando os valores de p forem menores a 0,05. O software GraphPad Prism 8 (La Jolla, CA, EUA) foi utilizado para todas as análises estatísticas.

5 RESULTADOS

5.1 Massa corporal

A massa corporal dos animais foi monitorada ao longo de todo o experimento, desde o dia 0 até o dia 32 (Figura 9). Durante a primeira semana, o grupo SHAM apresentou aumento no ganho de massa conforme o esperado, com um crescimento contínuo, típico de ratos não afetados por disfunções hormonais. No grupo TX, o ganho de massa também ocorreu, mas de forma mais lenta, sem diferenças significativas em relação ao grupo SHAM ($P > 0,05$). A partir da semana 2, o ganho de massa no grupo TX ($M 1,04 \pm 0,13$) foi significativamente menor ($P < 0,01$) em comparação ao grupo SHAM ($M 1,26 \pm 0,15$), representando uma redução de 17% no ganho de massa corporal. Na semana 3, a diferença no ganho de massa entre os dois grupos se

ampliou, com redução de 21% no ganho de massa corporal no grupo TX em relação ao grupo controle. O grupo TX ($M 1,04 \pm 0,13$) continuou a apresentar um ganho de massa substancialmente menor ($p < 0,001$) em comparação ao grupo SHAM ($M 1,33 \pm 0,14$), com uma desaceleração contínua. O grupo SHAM, por outro lado, manteve o ganho de massa normal, alinhado com as expectativas para a espécie. Na última semana, o grupo TX ($M 1,02 \pm 0,13$) ainda apresentava ganho de massa significativamente menor ($P < 0,001$) com 25% de redução no ganho de massa corporal em comparação ao grupo SHAM ($M 1,37 \pm 0,16$). Essa diferença no crescimento e no ganho de massa se manteve constante até o término do protocolo.

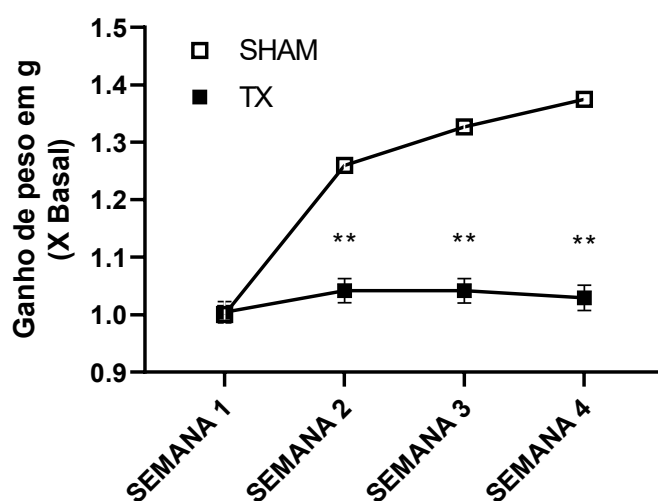


Figura 9: Efeito da tireoidectomia na massa corporal dos animais em g; ** representa $P < 0,01$, TX quando comparado ao grupo controle (SHAM). SHAM, falso operado; TX, animais tireoidectomizados.

5.2 Dosagens Hormonais de TSH e Tiroxina

A análise dos níveis de T4 e TSH no plasma, revelou diferenças significativas ($P < 0,001$) entre os dois grupos experimentais. O grupo TX apresentou níveis significativamente menores de T4 ($M 0,44 \pm 0,79$) (Figura 10A) e significativamente maiores de TSH ($M 317,4 \pm 67,84$) em comparação ao grupo SHAM (T4: $M 11,35 \pm 3,67$; TSH: $M 49,2 \pm 10,5$) (Figura 10B). Esses resultados indicam que a cirurgia foi bem-sucedida e confirmam que o grupo TX apresentou um quadro de hipotireoidismo intenso, havendo aumento de 545% da concentração de TSH no grupo tireoidectomizado, e redução de 96% da concentração de T4.

Especificamente, a redução nos níveis de T4 observada no grupo TX em relação ao grupo SHAM, é um indicativo claro da diminuição na produção de hormônios tireoidianos,

característica fundamental do hipotireoidismo. Paralelamente, o aumento dos níveis de TSH no grupo TX em comparação com o grupo SHAM, reflete a desregulação no feedback hormonal entre a tireoide e a hipófise. Esses achados não apenas confirmam o diagnóstico de hipotireoidismo no grupo TX, mas também fornecem fortes evidências de que a intervenção cirúrgica foi eficaz, induzindo a condição desejada, caracterizada pela redução de T4 e o aumento compensatório de TSH.

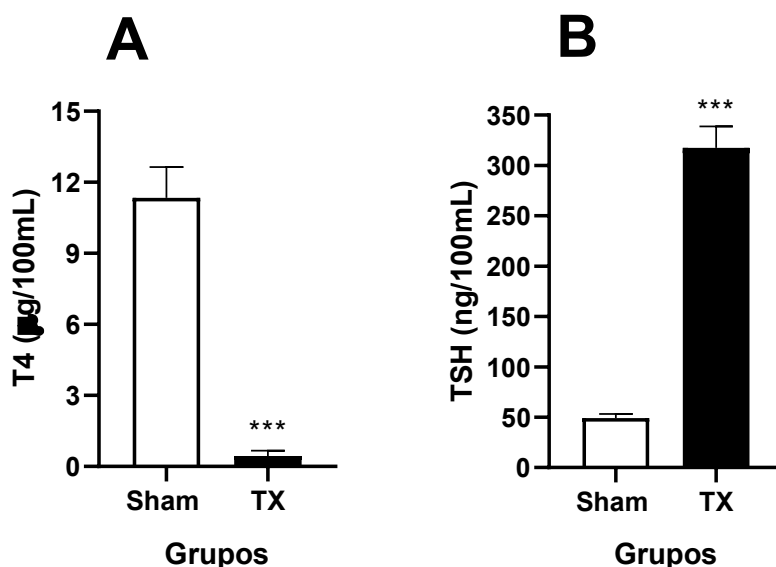


Figura 10: Mensuração dos hormônios T4 e TSH. A) T4(µg/100mL); B) TSH (ng/100mL). *** representa $P < 0,001$ TX quando comparado ao grupo controle (SHAM). SHAM, falso operado; TX, animais tireoidectomizados.

5.3 Dosagem de glicose no sangue

A Figura 11 ilustra os níveis de glicose no sangue (mg/dL) em ambos os grupos analisados. Foi observada elevação discreta (23%), porém significativa ($P < 0,05$) nos níveis de glicose no grupo TX ($M 117,4 \pm 41,35$) em comparação ao grupo SHAM ($M 95,08 \pm 15,1$). Esse aumento significativo sugere que o hipotireoidismo induzido afetou diretamente a regulação do metabolismo glicêmico, como já era esperado.

O hipotireoidismo é conhecido por alterar o equilíbrio da glicose no organismo, comprometendo tanto a homeostase glicêmica quanto o metabolismo energético. Essa alteração pode refletir mecanismos fisiológicos subjacentes, como resistência à insulina ou disfunções nas vias regulatórias da glicose, frequentemente observados em modelos experimentais de hipotireoidismo.

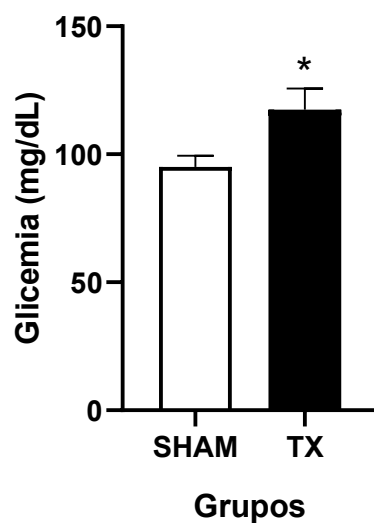


Figura 11: Níveis de glicemia (mg/dL) nos grupos SHAM e TX após o protocolo experimental. O gráfico apresenta elevação dos níveis de glicose nos grupos TX em comparação ao grupo SHAM. * $P < 0,05$. SHAM, falso operado; TX.

5.4 Testes Comportamentais

5.4.1 Teste do campo aberto

Como mostrado na Figura 12, não foi observada diferença significativa em nenhum dos parâmetros analisados durante o teste. Esses dados indicam que, apesar da indução do hipotireoidismo no modelo experimental, a condição não teve impacto sobre a atividade locomotora e exploratória dos ratos Wistar no período de observação utilizado.

Portanto, pode-se concluir que, no modelo de hipotireoidismo induzido empregado neste estudo, não houve alterações significativas no comportamento motor e exploratório dos animais, sugerindo que a disfunção tireoidiana não interferiu diretamente nessas funções musculoesqueléticas dentro do tempo de avaliação. Isso implica que o hipotireoidismo induzido não afetou a capacidade dos ratos de se locomover ou explorar o ambiente de maneira mensurável, dentro das condições experimentais adotadas.

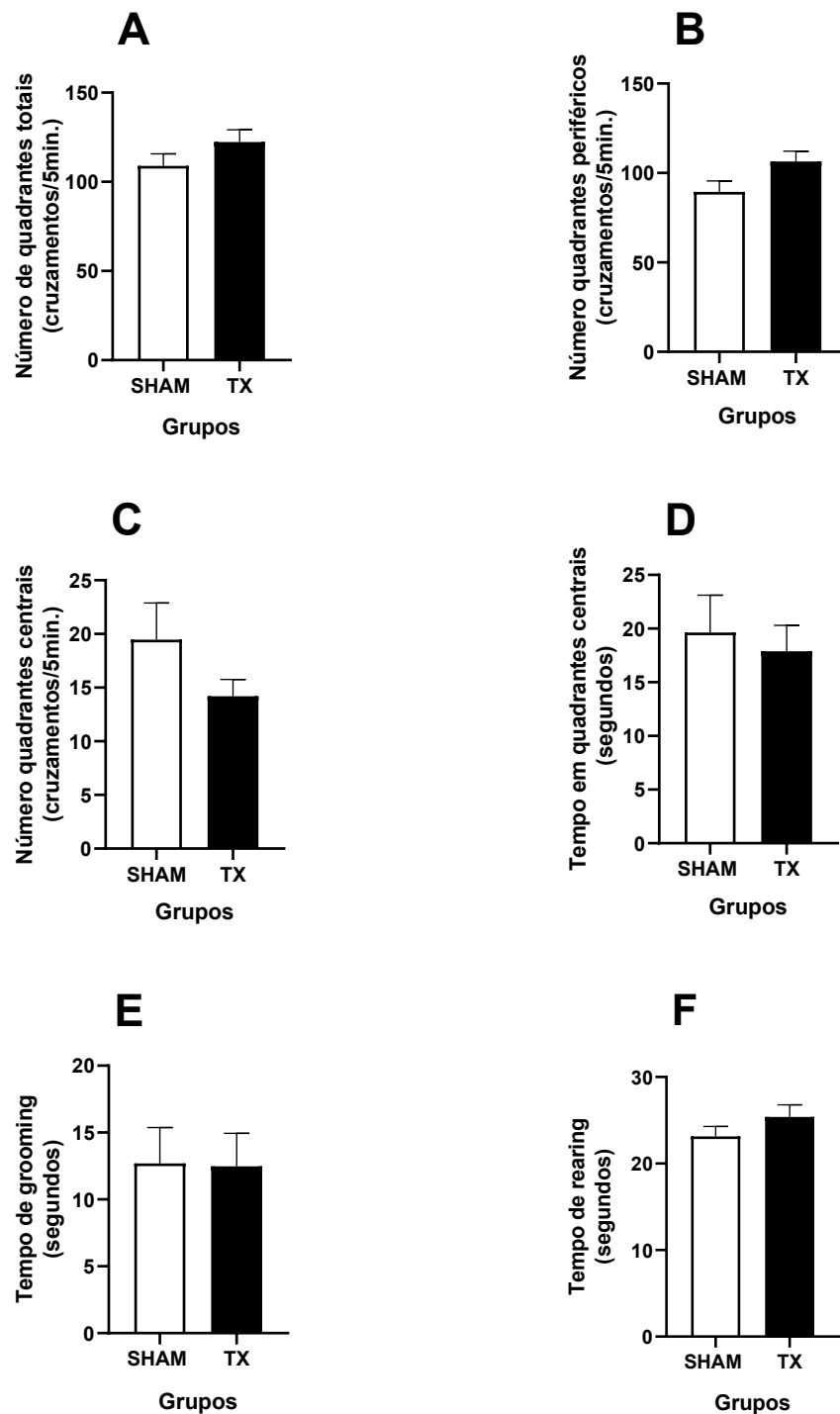


Figura 12: Parâmetros avaliados no teste de campo aberto nos grupos SHAM e TX. (A) Número de quadrantes totais (cruzamentos/5 min). (B) Número de quadrantes periféricos (cruzamentos/5 min). (C) Número de quadrantes centrais (cruzamentos/5 min). (D) Tempo em quadrantes centrais (segundos em 5min). (E) Tempo de grooming (segundos em 5min). (F) Tempo de rearing (segundos em 5min). SHAM, falso operado; TX, animais tireoidectomizados.

5.4.2 Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

A Figura 13 apresenta os resultados do Teste de Labirinto em Cruz Elevado (LCE), utilizado para avaliar a atividade exploratória e o comportamento de risco dos animais. A Figura 13A mostra o número total de entradas, e a análise revelou diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos, tendo uma redução de 30% no grupo TX. O grupo TX ($M 6,9 \pm 4,3$) apresentou um número significativamente menor de entradas em comparação ao grupo SHAM ($M 9,8 \pm 6,1$). Esse resultado sugere que o grupo TX teve uma menor motivação para explorar, possivelmente devido a alterações comportamentais, relacionadas ao hipotireoidismo.

Na Figura 13B, são apresentados os dados sobre a porcentagem de entradas nos braços fechados. Embora tenha sido observada uma tendência de diferença entre os grupos, não houve diferença significativa entre o grupo SHAM e o grupo TX. Na figura 13C, são mostradas as entradas nos braços abertos do labirinto. Similar aos resultados observados nas entradas nos braços fechados, não houve diferença significativa entre o grupo TX o grupo controle SHAM, portanto apesar das diferenças nas entradas totais, a distribuição das entradas entre os braços fechados não foi influenciada pela condição hipotireoideana.

A Figura 13D ilustra o tempo de permanência nos braços fechados, e a análise revelou que não houve diferença estatística significativa entre os grupos TX e SHAM. Da mesma forma, a Figura 13E, que representa o tempo gasto nos braços abertos, também não demonstrou diferença significativa entre os grupos.

Por outro lado, na Figura 13F é mostrado o número de mergulhos de cabeça (*head dippings*), um parâmetro utilizado para avaliar o comportamento de avaliação de risco dos animais. Neste caso, houve diferença significativa ($P < 0,001$) entre os grupos. O grupo TX ($M 8,3 \pm 3,28$) apresentou redução de 49% no número de *head dippings* em comparação ao grupo SHAM ($M 16,5 \pm 8,17$).

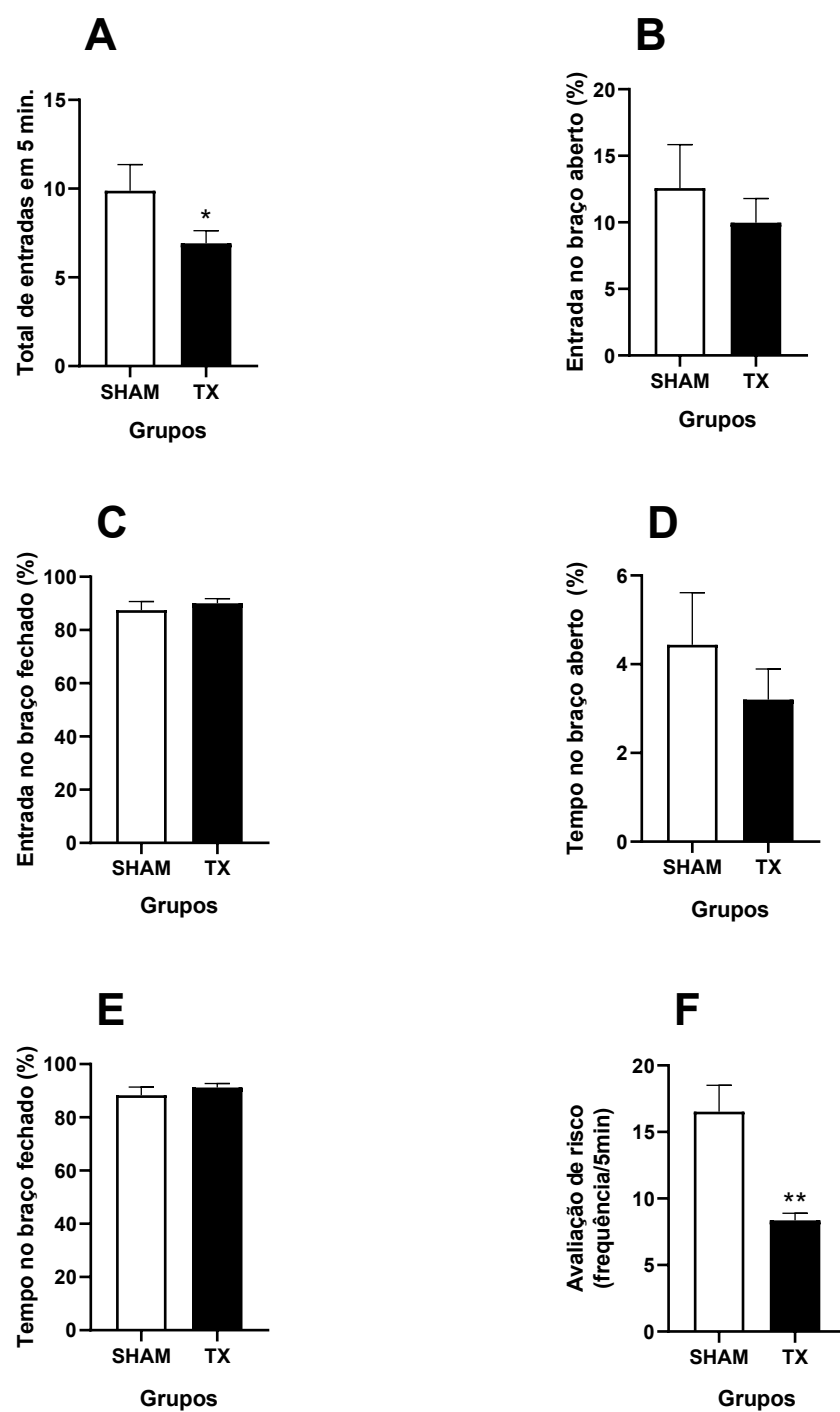


Figura 13: Parâmetros avaliados no teste do labirinto em cruz elevado nos grupos SHAM e TX. (A) Número total de entradas (entradas/5 min.); (B) Entrada no braço aberto (%); (C) Entrada no braço fechado (%); (D) Tempo no braço aberto (%); (E) Tempo no braço fechado (%); (F) Avaliação de risco (head dippings); *P < 0,05, ***P < 0,001, TX e TX+T4 quando comparados ao grupo controle (SHAM). SHAM, falso operado; TX, animais tireoidectomizados.

5.4.3 Teste de reconhecimento de objetos

Os resultados apresentados na Figura 15A indicam que, no teste de reconhecimento total de objetos, o grupo TX ($M 41,65 \pm 19,28$) demonstrou aumento significativo ($P < 0,05$) no tempo de reconhecimento total, quando comparado ao grupo SHAM ($M 29,71 \pm 12,39$). Este achado sugere que o grupo TX dedicou mais tempo à exploração dos objetos, refletindo um possível aumento no interesse pelo objeto.

Por outro lado, os índices de discriminação absoluta (d_1 , Figura 15B) e relativa (d_2 , Figura 15C) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Esses resultados indicam que, apesar do grupo TX demonstrar maior tempo de reconhecimento, ele não apresentou uma habilidade significativamente superior para distinguir entre o objeto novo e o objeto familiar em comparação com o grupo SHAM.

Foi notada grande dispersão intragrupal no grupo TX, o que sugere uma variabilidade maior no comportamento dentro do grupo, podendo influenciar na falta de diferença significativa nesses índices de discriminação.

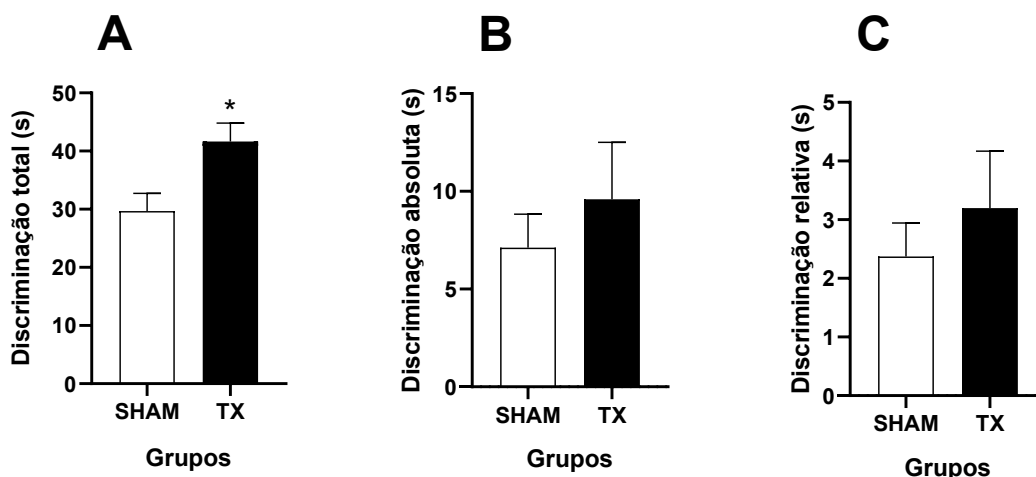


Figura 14: Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste de Reconhecimento de objetos nos grupos SHAM, TX e TXT. (A) Reconhecimento Total de Objetos (tempo em segundos em 300 segundos). (B) Discriminação Absoluta (tempo em segundos em 300 segundos). (C) Discriminação Relativa (tempo em segundos dividido pelo tempo total em 300 segundos). Note que o grupo TX apresentou aumento significativo no tempo total de interação com os objetos (A), mas não foi capaz de interagir por mais tempo com os objetos novos (B e C) em relação ao grupo SHAM *representa $P < 0,05$. SHAM, falso operado; TX, animais tireoidectomizados.

Quando avaliamos a discriminação de objetos considerando a frequência em percentual de animais que apresentaram discriminação positiva (interagiram por mais tempo com o objeto novo) ou discriminação negativa (interagiram por mais tempo com o objeto conhecido), em utilizando o teste qui-quadrado, observamos resultados interessantes.

Como ilustrado na Figura 16, o grupo TX apresentou maior frequência de animais, em termos percentuais, com interações negativas, quando comparado ao grupo SHAM. Esta diferença foi estatisticamente significativa ($P < 0,01$), conforme avaliado pelo teste de qui-quadrado.

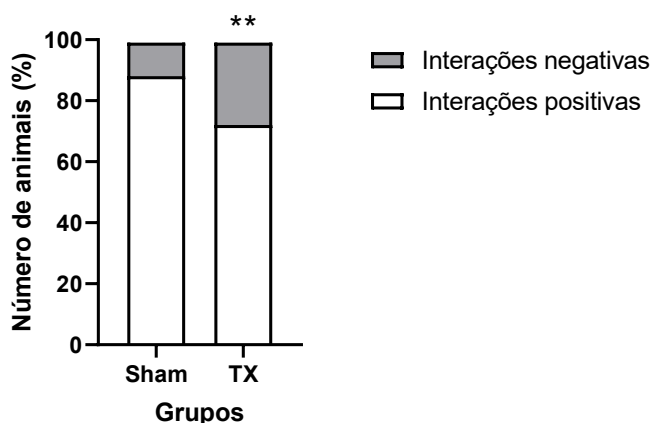


Figura 15: Avaliação dos parâmetros comportamentais no teste de reconhecimento de objetos nos grupos SHAM e TX. Número percentual de animais que apresentaram interações positivas e negativas em 300 segundos de avaliação. Note que o grupo TX apresentou número maior de animais com interações negativas comparados ao SHAM. $**P < 0,01$ em relação ao SHAM. SHAM, falso operado; TX, animais tireoidectomizados.

5.4.4 Teste de preferência pela sacarose.

Pode-se observar diferença significativa ($P < 0,05$) entre o grupo TX ($M 65,18 \pm 16,11$) e o grupo SHAM ($M 77,29 \pm 15,97$) na figura 14. Este comportamento, interpretado como anedonia, é uma característica comum em modelos de depressão, que se manifesta pela perda de interesse ou prazer em atividades que anteriormente eram recompensadoras, como a ingestão de alimentos palatáveis.

A redução na preferência por sacarose em 16% no grupo TX sugere que a condição hipotireoideana, induzida pela tireoidectomia, pode ter gerado alterações no comportamento alimentar dos animais, possivelmente refletindo aspectos de depressão ou desinteresse em recompensas naturais. Isso é consistente com a literatura que aponta o hipotireoidismo como um fator que pode desencadear sintomas semelhantes aos observados em transtornos depressivos, incluindo anedonia e apatia.

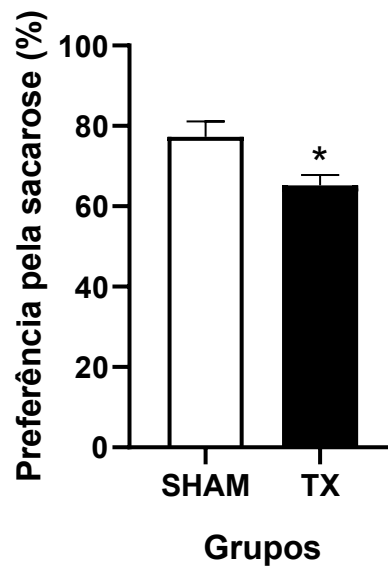


Figura 16: Teste de preferência pela sacarose (%) nos grupos SHAM e TX. * $P < 0,05$. SHAM, falso operado; TX, animais tireoidectomizados.

5.4.5 Teste de esquiva passiva

Na latência basal, o grupo TX ($M 14,27 \pm 18,64$) apresentou tempo de latência de descida significativamente maior ($P < 0,05$) do que o grupo SHAM ($M 3,5 \pm 3,31$), sugerindo que os animais do grupo TX, responderam mais rapidamente ao estímulo aversivo. Contudo, quando se avaliou a latência de descida após 24 horas, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. Embora o grupo TX tenha apresentado uma vantagem inicial na resposta, essa diferença não se manteve ao longo do tempo, indicando que a memória aversiva não foi sustentada após 24 horas.

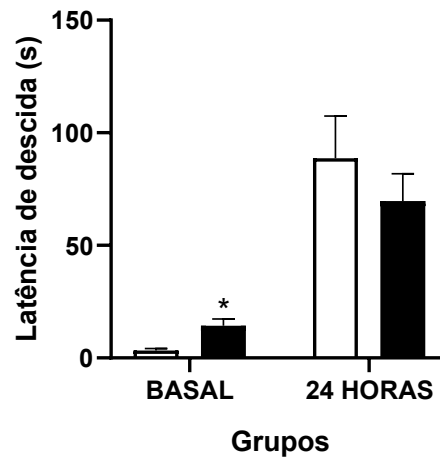


Figura 17: Avaliação da latência para o animal descer da plataforma no teste de Esquiva-Passiva nos grupos SHAM e TX. Note que, o grupo TX apresentou diminuição significativa em relação ao grupo SHAM (*) na retenção da memória aversiva a curto prazo. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos SHAM e TX no prazo de 24 horas. $P > 0,05$). SHAM, falso operado; TX, animais tireoidectomizados.

5.5 Avaliação cardiovascular e autonômica.

5.5.1 Morfometria cardíaca.

A Figura 18 mostra os valores da massa cardíaca obtida em ambos os grupos. Como esperado, o grupo TX ($M 0,93 \pm 1,35$) apresentou menores valores de massa cardíaca (31%) quando comparado ao SHAM ($M 1,35 \pm 0,14$) ($P < 0,01$).

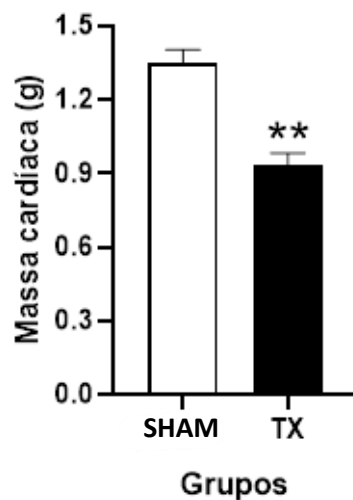


Figura 18: Massa cardíaca em gramas em ambos os grupos. Note que a massa no grupo TX foi significativamente reduzida devido ao hipotireoidismo. SHAM = grupo falso-operado. TX = grupo tireoidectomizado. ** $P < 0,01$ vs. SHAM.

5.5.2 Estudo eletrocardiográfico *in vivo*.

A Figura 19 representa os principais resultados obtidos pelo ECG *in vivo* nos animais acordados. De forma geral, o hipotireoidismo experimental alterou a maioria dos parâmetros eletrocardiográficos. Dessa forma, enquanto a frequência cardíaca reduziu em 10% ($P < 0,05$, TX: $M 358,5 \pm 30$; SHAM $M 400,1 \pm 53,52$), o intervalo QT aumentou de forma significativa ($P < 0,01$, TX: $M 63,17 \pm 11,14$; SHAM $M 43,47 \pm 10$), tanto na forma não corrigida, como na forma corrigida pela fórmula de Bazett ($P < 0,05$, TX: $M 155,3 \pm 29,14$; SHAM $M 113 \pm 30,71$), no grupo TX em relação ao SHAM. Não houve diferença significativa entre os grupos no intervalo PR (Figura 19B).

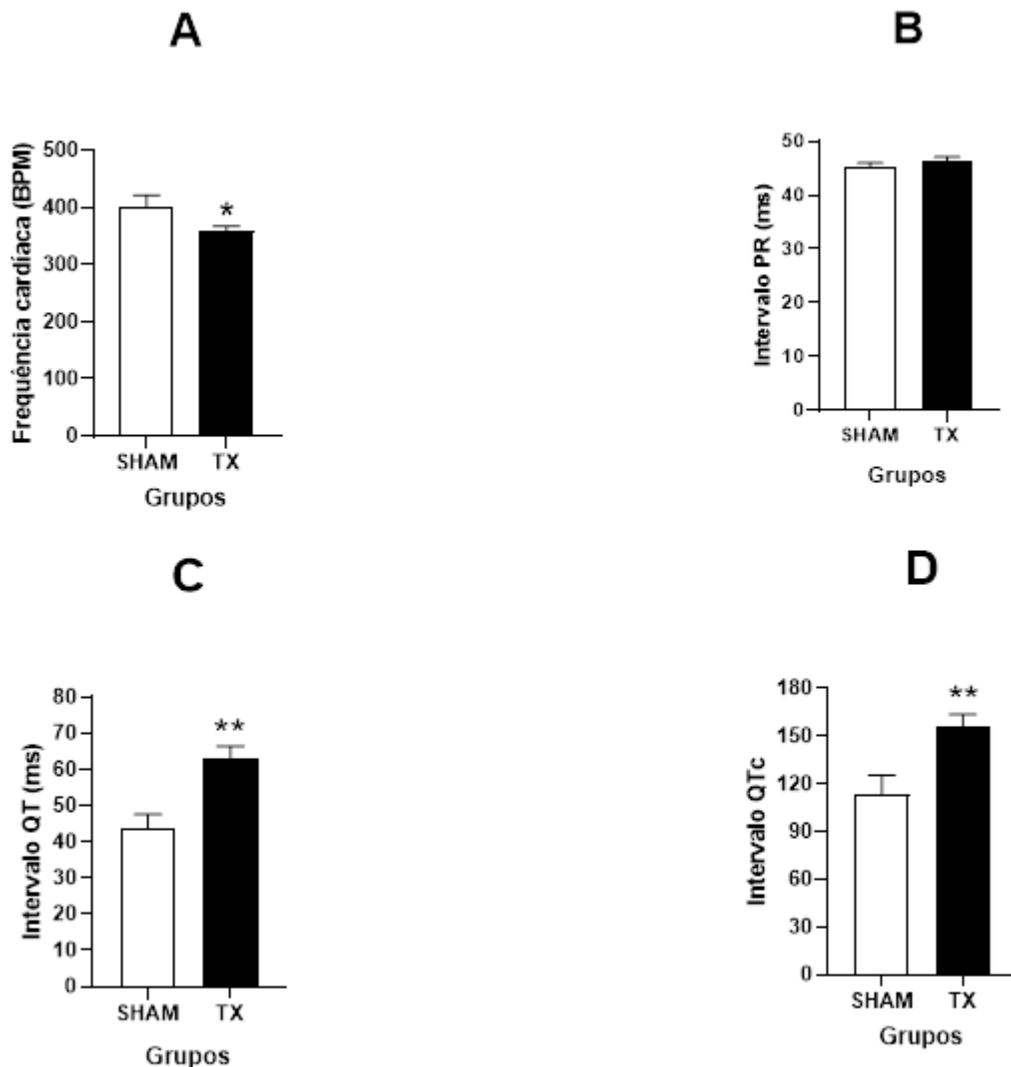


Figura 19: Parâmetros eletrocardiográficos obtidos *in vivo* nos animais acordados de ambos os grupos. Frequência cardíaca em batimentos por minuto (bpm) (A), intervalo PR em ms (B), intervalo QT (em ms) (C) e intervalo QT corrigido (QTc) pela fórmula de Bazett em ms/ms^{1/2} (QTc) (D). Note que o hipotireoidismo experimental (grupo TX) induziu a bradicardia (A) e aumento do intervalo QT não corrigido (C) e corrigido (D) sem alterar o intervalo PR (B) quando comparado ao SHAM. SHAM = grupo falso-operado. TX = grupo tireoidectomizado. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ vs. SHAM.

5.5.3 Estudo da modulação autonômica sobre o coração de ratos acordados.

Com o objetivo perspicuo de avaliar se as alterações elétricas cardíacas observadas no grupo TX foram mediadas por uma disautonomia cardíaca, isto é, alteração na modulação autonômica sobre o coração, procedeu-se a análise da variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência espectral. Assim, tanto a baixa frequência espectral, (Figura 20A), que está relacionada à modulação simpática, como a alta frequência espectral, relacionada a modulação parassimpática (Figura 20B) e o balanço simpatovagal (Figura 20C) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos ($P > 0,05$). Esses dados em conjunto sugerem que as alterações no cronotropismo e dromotropismo cardíacos, observadas no ECG, foram provavelmente mediadas diretamente pela ausência do hormônio tireoidiano no coração (hipotireoidismo cardíaco), e não pela alteração na modulação autonômica cardíaca.

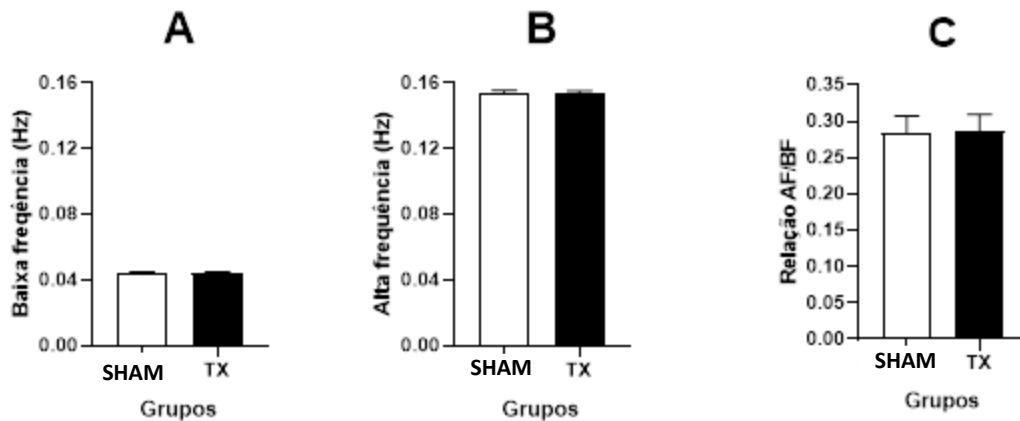


Figura 20: Parâmetros de variabilidade cardíaca no domínio da frequência em ambos os grupos: Baixa frequência (A), alta frequência (B) e a relação entre a baixa frequência (BF)/alta frequência (AF) (C). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ($P > 0,05$). SHAM = grupo falso-operado. TX = grupo tireoidectomizado.

5.5.4 Estudo eletromecânico *ex vivo* basal e em resposta a administração de adrenalina no coração isolado pela técnica de Langendorff.

A Figura 21 mostra os valores de frequência cardíaca basal (21A) após a administração de adrenalina (21B) e a variação (Δ) da FC pós-adrenalina/basal (21C) em ambos os grupos. Corroborando os achados *in vivo*, o grupo TX ($M 244,7 \pm 15,79$) exibiu 11% de redução da frequência cardíaca em relação ao SHAM ($M 273,7 \pm 32,17$) de forma significativa ($P < 0,05$). Embora tenha havido tendência de aumento da ΔFC no grupo TX em relação ao SHAM ($P =$

0,06, 20C), a resposta adrenérgica não foi estatisticamente diferente entre os grupos ($P > 0,05$, 21B).

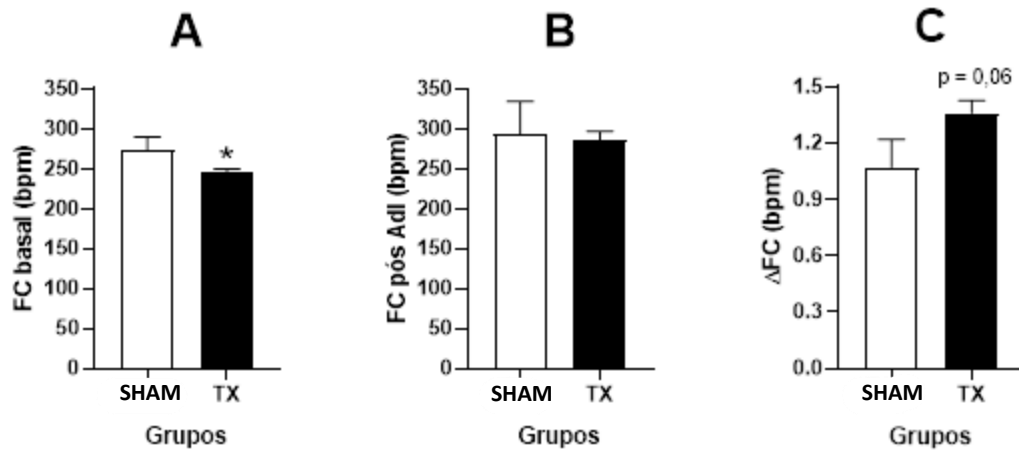


Figura 21: Frequência cardíaca (FC) basal (A), após a administração de adrenalina (B) e a variação (Δ) da FC pós-adrenalina/basal (C) em ambos os grupos obtida pela técnica de coração isolado de Langendorff. Note que a FC basal no grupo TX foi significativamente reduzida devido ao hipotireoidismo. Embora tenha ocorrido tendência de aumento da Δ FC no grupo TX (C), a resposta adrenérgica nesse parâmetro não foi diferente entre os grupos. SHAM = grupo falso-operado. TX = grupo tireoidectomizado. Bpm = batimentos por minuto. Adl = adrenalina. * $P < 0,05$ vs. SHAM.

Em relação a duração da sístole (em segundos), como observado na Figura 22, houve aumento significativo ($P < 0,01$) nesse parâmetro no grupo TX ($M 0,15 \pm 0,02$) em relação ao SHAM ($M 0,11 \pm 0,01$) tanto em níveis basais, como estimulado por adrenalina ($P < 0,05$, TX $M 0,09 \pm 0,01$; SHAM $M 0,07 \pm 0,02$), sem alteração significativa no delta de duração da sístole entre os grupos ($P > 0,05$).

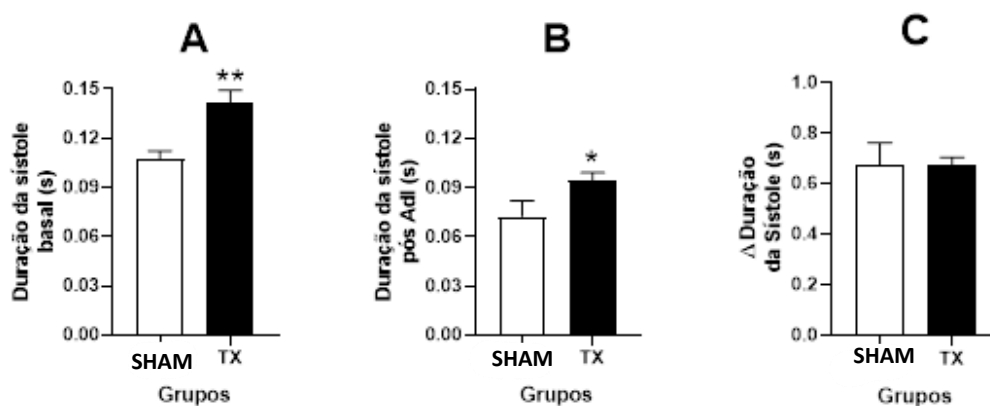


Figura 22: Duração da sístole basal (A), após a administração de adrenalina (B) e a variação (Δ) da duração da sístole pós-adrenalina/basal (C) em ambos os grupos obtida pela técnica de coração isolado de Langendorff. Note que a duração da sístole no grupo TX foi significativamente maior devido ao hipotireoidismo tanto em níveis basais (A) como estimulada com adrenalina (B). Não houve diferença na Δ da duração sistólica entre os grupos após a adrenalina (C). SHAM = grupo falso-operado. TX = grupo tireoidectomizado. Adl = adrenalina. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ vs. SHAM.

Diferente da duração da sístole, a Figura 23 mostra que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) na duração da diástole tanto em níveis basais, como estimulado por adrenalina ($P > 0,05$), entre os grupos TX e SHAM respectivamente. Apesar disso, houve diminuição significativa ($P < 0,05$) no delta de duração da diástole entre os grupos TX ($M 0,83 \pm 0,25$) e SHAM ($M 1,2 \pm 0,42$).

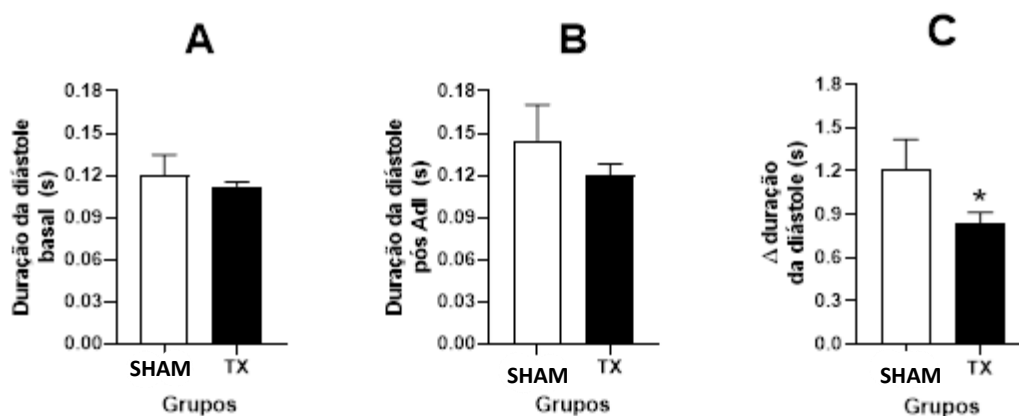


Figura 23: Duração da diástole basal (A), após a administração de adrenalina (B) e a variação (Δ) da duração da diástole pós-adrenalina/basal (C) em ambos os grupos obtida pela técnica de coração isolado de Langendorff. Note que a duração da diástole não foi diferente entre os grupos tanto em níveis basais (A) como estimulada com adrenalina (B). No entanto, houve redução significativa na Δ da duração da diástole entre os grupos após a adrenalina (C). SHAM = grupo falso-operado. TX = grupo tireoidectomizado. Adl = adrenalina. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ vs. SHAM

Em relação aos parâmetros pressóricos, a Figura 24 representa os dados de pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo em ambos os grupos. Nesse caso, não se observou diferença significativa tanto nos valores basais (A), como após a administração de adrenalina (B) e na variação (Δ) da duração da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo pós-adrenalina/basal (C) em ambos os grupos ($P > 0,05$).

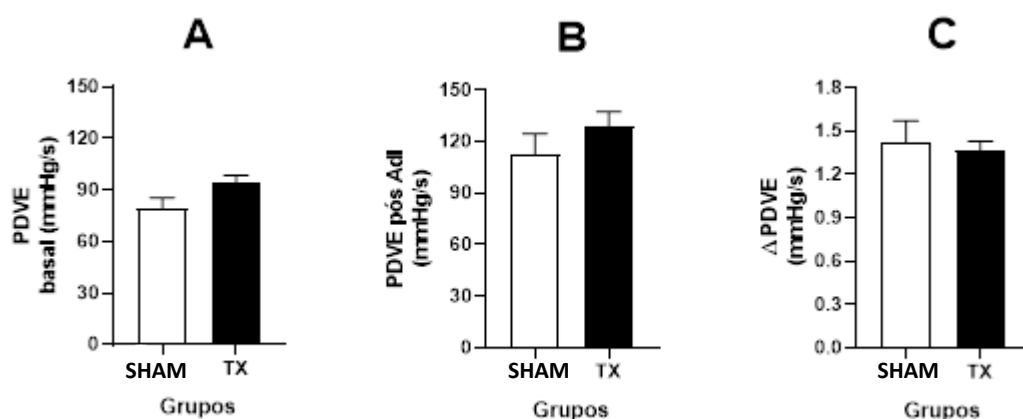


Figura 24: Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (A), após a administração de adrenalina (B) e a variação (Δ) da duração da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo pós-adrenalina/basal (C) em mmHg/s em ambos os grupos obtida pela técnica de coração isolado de Langendorff. Note que não houve diferença significativa em nenhum dos parâmetros mecânicos entre os grupos. SHAM = grupo falso-operado. TX = grupo tireoidectomizado. PDVE = Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo. Adl = adrenalina.

À exemplo da pressão desenvolvida, também não houve diferença significativa na taxa de variação de pressão vs. tempo entre os grupos, tanto nos valores basais como estimulados por adrenalina. Assim, como observado na Figura 25, embora tenha havido tendência de aumento da resposta adrenérgica na dP/dt positiva (B), não houve diferença significativa na dP/dt positiva basal (A) e no Δ da dP/dt positiva (C) entre os grupos ($P > 0,05$).

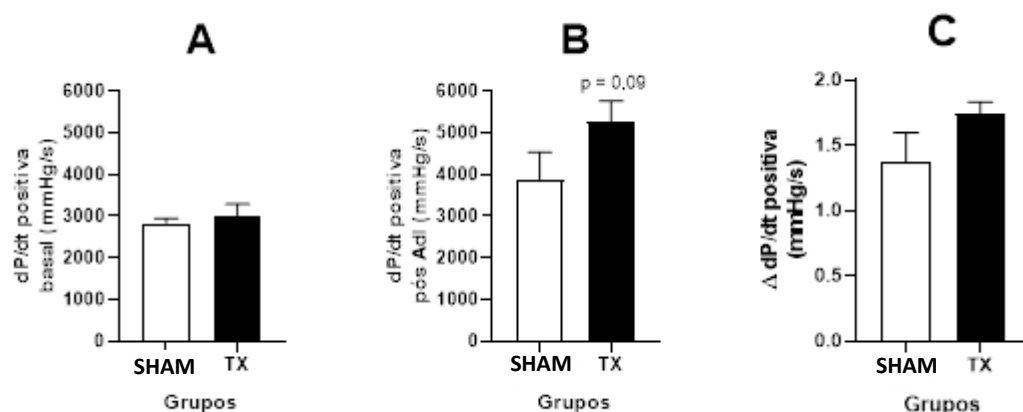


Figura 25: Taxa de variação de pressão no tempo (1ª derivada temporal positiva máxima da pressão ventricular esquerda, dP/dt positiva) basal (A), após a administração de adrenalina (B) e a variação (Δ) da dP/dt positiva pós-adrenalina/basal (C) em mmHg/s em ambos os grupos obtida pela técnica de coração isolado de Langendorff. Note que, embora a dP/dt positiva basal (A) e o Δ da dP/dt positiva (C) não tenham sido diferentes entre os grupos, houve tendência de aumento na resposta adrenérgica na dP/dt positiva (B). SHAM = grupo falso-operado. TX = grupo tireoidectomizado. Adl = adrenalina.

A Figura 26 mostra os valores da taxa de variação negativa de pressão no tempo (1ª derivada temporal negativa máxima da pressão ventricular esquerda, dP/dt negativa). Mais uma vez, não se observou diferença significativa tanto nos valores basais (A), como após a administração de adrenalina (B) e na variação (Δ) da duração da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo pós-adrenalina/basal (C) em ambos os grupos ($P < 0,05$)

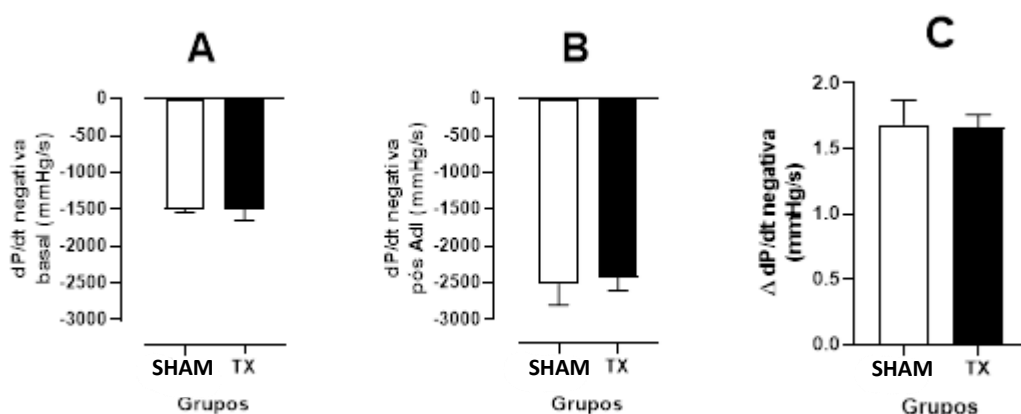


Figura 26: Taxa de variação negativa de pressão no tempo (1ª derivada temporal negativa máxima da pressão ventricular esquerda, dP/dt negativa) basal (A), após a administração de adrenalina (B) e a variação (Δ) da dP/dt negativa pós-adrenalina/basal (C) em mmHg/s em ambos os grupos obtida pela técnica de coração isolado de Langendorff. Note que não houve diferença significativa em nenhum dos parâmetros diastólicos entre os grupos. SHAM = grupo falso-operado. TX = grupo tireoidectomizado. Adl = adrenalina.

6 DISCUSSÃO

Os achados mais importantes desse estudo foram a constatação de que o hipotireoidismo experimental, induzido por tireoidectomia total em ratos machos, induz a comportamento análogo a ansiedade e depressão humanas e promove alterações elétricas relevantes que possivelmente estão relacionadas a ausência (diminuição) do hormônio tireoidiano no coração.

Soukup *et al.* (2001) sugere que, no hipotireoidismo, o ganho de massa corporal é muito baixo e, em alguns casos, pode ser negativo durante o processo experimental. Os hormônios tireoidianos atuam na homeostase de massa corporal, a ausência desses hormônios influencia na perda de massa dos animais submetidos ao processo cirúrgico de tireoidectomia. Durante o protocolo experimental, observamos ganho de massa normal somente no grupo SHAM, ou seja, no grupo eutireoideo, em comparação ao grupo TX, que apresentou redução do ganho de massa ao longo das semanas pós tireoidectomia. Tais resultados destacam que a redução de

crescimento de massa corporal por duas semanas é considerada como padrão-ouro para definir o estado de hipotireoidismo experimental sistêmico. (BIANCO, 2014).

Uma queda nos níveis séricos de T4 e uma elevação no TSH são sinais bioquímicos clássicos de hipotireoidismo. O T3, sendo o hormônio tireoidiano biologicamente ativo, geralmente apresenta redução em níveis séricos mais tarde, após a diminuição do T4. Um estado de hipotireoidismo sistêmico é considerado quando as concentrações de T3 caem abaixo da faixa normal, embora essa redução possa não refletir a concentração de T3 tecidual em estágios iniciais. Por isso, a maioria dos estudos define hipotireoidismo sistêmico quando há um efeito biológico significativo dependente do hormônio tireoidiano, como estabilização do ganho de massa corporal ou redução na expressão de genes e atividade de enzimas responsivas ao T3 (BIANCO, 2014).

Em roedores, a indução do hipotireoidismo, especialmente após tireoidectomia, resulta em níveis reduzidos de T3 séricos e em concentrações de T3 livre abaixo dos níveis fisiológicos em células cultivadas. A abordagem experimental para induzir o hipotireoidismo considera a idade dos animais e envolve a interrupção ou indução de desidases ou transportadores de hormônios tireoidianos. O hipotireoidismo sistêmico é geralmente alcançado entre 5 a 8 semanas após a cirurgia (BIANCO, 2014).

Após a análise da glicemia dos animais de cada grupo, observou-se que o grupo TX apresentou níveis de glicemia mais elevados em comparação ao grupo SHAM. Esse achado sugere que a tireoidectomia induziu aumento na glicemia, o que pode estar relacionado à redução da secreção de insulina e às alterações no metabolismo da glicose em condições de hipotireoidismo (GODINI, A., 2015). Embora o excesso de hormônio tireoidiano seja amplamente reconhecido por causar intolerância à glicose, devido ao aumento da produção hepática de glicose e da lipólise, fatores que diminuem a sensibilidade à insulina, os estados de hipotireoidismo também comprometem a captação e a utilização de glicose estimulada pela insulina. Isso ocorre porque, no hipotireoidismo, a expressão do gene GLUT4 e de diversas enzimas da via glicolítica é reduzida, uma vez que a ação do hormônio tireoidiano é essencial para a regulação positiva desses processos (PANVELOSKI-COSTA *et al.*, 2016). O hipotireoidismo pode afetar diversos sistemas metabólicos, incluindo o controle da glicose. O aumento da glicemia observado nos grupos pode ser consequência dessas alterações hormonais, o que corrobora com os resultados de estudos que indicam essa condição (CETTOUR-ROSE *et al.*, 2005).

O teste de campo aberto não revelou resultados consistentes com sintomas de ansiedade, assim como não houve diferenças significativas na atividade exploratória. Isso sugere que o hipotireoidismo induzido não teve impacto relevante no comportamento exploratório dos animais, em comparação com o grupo SHAM, reforçando a similaridade entre os grupos em nosso modelo experimental e neste método avaliativo (SESTAKOVA *et al.*, 2013). A ausência de alterações nesse teste corrobora os resultados obtidos nos outros testes comportamentais, indicando que as modificações observadas foram de natureza cognitiva, e não relacionadas a alterações musculoesqueléticas. Esses achados, portanto, indicam que as alterações observadas no teste do labirinto em cruz elevado, que avalia a ansiedade e o medo de espaços abertos e de altura nos roedores (WALF *et al.*, 2007), estão mais relacionadas a comportamentos análogos à ansiedade, e não a limitações físicas decorrentes do hipotireoidismo.

Os resultados do teste do labirinto em cruz elevado demonstraram que os animais do grupo TX apresentaram um número de entradas significativamente menor em comparação com o grupo SHAM, o que sugere um comportamento esperado, já que animais mais ansiosos tendem a explorar menos o labirinto. O número de *head dippings*, que também reflete o comportamento exploratório, apresentou redução significativa no grupo TX em relação ao grupo SHAM, indicando que o hipotireoidismo induzido pode ter provocado alterações no comportamento relacionadas à ansiedade. No entanto, o tempo de permanência nos braços fechados e abertos não mostrou diferenças significativas entre os grupos, o que sugere que o hipotireoidismo não afetou diretamente a resposta dos animais a esses estímulos. De acordo com Walf *et al.* (2007), a corticosterona plasmática aumenta com a exposição ao braço aberto, sendo diretamente relacionada à avaliação de risco, refletida pela postura de alongamento. Esse aumento de corticosterona pode estar relacionado às alterações observadas nos head dippings, sugerindo que, embora o tempo de permanência nos braços não tenha sido afetado, o grupo TX apresentou uma resposta comportamental alterada no que diz respeito à avaliação de risco e à ansiedade.

A preferência pela ingestão de sacarose foi reduzida no grupo TX, sendo que a diminuição da preferência por sacarose é um marcador confiável de anedonia, definida no DSM-V (American Psychiatric Association, 2013) como 'diminuição do interesse ou prazer em resposta a estímulos anteriormente percebidos como recompensadores', sendo um sintoma central da depressão (YU *et al.*, 2014). Esse achado, em conjunto com os resultados do teste do labirinto em cruz elevado, sugere que ratos hipotireoideos apresentam distúrbios comportamentais análogos à ansiedade e à depressão, alinhando-se com dados prévios que

indicam que o hipotireoidismo induz alterações emocionais e cognitivas semelhantes às observadas em transtornos psiquiátricos, como a depressão.

Os resultados do teste de reconhecimento de objetos, utilizado para avaliar a memória declarativa, mostraram aumento no tempo total de interação com os objetos (e2) no grupo TX, mas sem diferenças significativas nos índices de discriminação absoluta (d1) e relativa (d2), quando analisados em termos de média \pm erro da média. No entanto, ao avaliar os dados em termos de distribuição de frequência das interações positivas e negativas entre os grupos, observou-se aumento no número (percentual) de animais apresentando interações negativas no grupo TX em comparação com o grupo SHAM. Esses resultados sugerem que, embora o grupo TX tenha interagido por mais tempo com os objetos, não houve melhora na discriminação entre os objetos, inclusive, observando-se maior número de animais do grupo TX demonstrando comportamentos de interação negativa. Isso pode indicar uma motivação exploratória reduzida ou, até mesmo, aumento na ansiedade, refletindo possíveis distúrbios emocionais ou cognitivos associados ao hipotireoidismo. Esses dados em conjunto sugerem que o hipotireoidismo, influenciou o comportamento exploratório, entretanto, sem melhorar a capacidade de distinguir entre o objeto novo e o familiar e, quando se avalia a frequência, conclui-se que houve piora da capacidade discriminatória. Estudos prévios relatam déficits na memória declarativa em modelos de hipotireoidismo, atribuídos a alterações na plasticidade sináptica do hipocampo e do córtex pré-frontal (SUI *et al.*, 2006).

A memória aversiva refere-se à capacidade de identificar situações perigosas, quando certos estímulos desencadeiam a recuperação de memórias associadas a experiências de medo anteriores, como um estímulo doloroso (OZAWA *et al.*, 2017). No teste de esquiva passiva, utilizado para avaliar a memória aversiva, o grupo TX apresentou aumento significativo na latência de descida em comparação com o grupo SHAM, mas sem diferença significativa após 24 horas. Esses resultados sugerem que não houve alteração na retenção da memória aversiva a longo prazo entre os dois grupos. No entanto, a curto prazo, o aumento do tempo de descida no grupo TX pode estar mais relacionado à redução na exploração, possivelmente devido a um comportamento análogo à ansiedade, observado em outros testes, do que a uma retenção de memória mais eficaz.

Os sinais cardíacos mais comuns de hipotireoidismo em seres humanos são bradicardia, hipertensão leve, uma pressão de pulso estreita e uma atividade atenuada no exame precordial (KLEIN, I., OJAMAA, K., 2001). Em relação à frequência cardíaca, foram observadas diferenças significativas entre os grupos, indicando que a indução do hipotireoidismo exerce

um impacto direto na frequência cardíaca dos animais, resultando em sua redução. Essa diminuição na frequência cardíaca sugere que o hipotireoidismo pode afetar negativamente o funcionamento cardiovascular, elevando o risco de bradicardia, uma condição caracterizada por uma frequência cardíaca anormalmente baixa, compatível com estudos anteriores (KLEMPERER *et al.*, 1996; SCANLAN *et al.*, 2004; CHIELLINI *et al.*, 2007).

A hipótese de que tais alterações pudessem ser mediadas indiretamente por uma disautonomia cardíaca, isto é, um predomínio da modulação parassimpática sobre o coração por exemplo, foi descartada pelo estudo da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) no domínio da frequência espectral realizado nesse trabalho. A VFC avalia o grau de diferença nos intervalos entre os batimentos cardíacos sucessivos e fornece informações sobre a modulação do sistema nervoso autônomo, onde a estimulação simpática e parassimpática, diminui e aumenta, respectivamente, a VFC, por meio da modulação da atividade do nodo sinusal (JOUKAR *et al.*, 2021; PIZZO *et al.*, 2022).

Os resultados indicam que a VFC permaneceu semelhante entre os grupos, indicando que o hipotireoidismo não alterou a modulação autonômica, e, portanto, que a bradicardia pode ter sido induzida diretamente pela diminuição do hormônio tireoidiano no tecido nodal (nodo sinusal) e não indiretamente pela disautonomia, hipótese sustentada pela permanência de menor frequência cardíaca basal no grupo hipotireoideo em relação ao SHAM no coração isolado, isto é, sem a influência do sistema de integração neural.

Quanto a condução do estímulo elétrico cardíaco, pode-se concluir que a hipotireoidismo impacta de forma mais relevante na condução elétrica ventricular do que na supraventricular. Esta hipótese se sustenta pela análise dos intervalos PR e QT no ECG dos animais acordados. O intervalo PR é a medida do tempo do início da onda P até o início do complexo QRS. A análise do comprimento do intervalo PR é importante para o diagnóstico de bloqueios atrioventriculares e quando ocorre um intervalo prolongado diz-se que o paciente tem bloqueio atrioventricular incompleto de primeiro grau, por exemplo (HALL *et al.*, 2017). Nossos achados demonstraram que o intervalo PR se manteve similar entre os grupos experimentais, logo, a condução atrioventricular permaneceu inalterada.

Já o intervalo QT é determinado pelo tempo de início da onda Q até o final da onda T, representando o tempo de despolarização e repolarização dos cardiomiócitos ventriculares. A duração prolongada deste parâmetro indica distúrbios na atividade elétrica do coração, que pode desencadear arritmias ou taquicardias ventriculares, além de ser considerado um indicador de cardiotoxicidade de drogas (KONOPELSKI *et al.*, 2016).

Os resultados apresentados aqui sugerem que houve aumento significativo no intervalo QT no grupo TX quando comparado ao grupo SHAM, propondo que o hipotireoidismo induzido pode prolongar a fase de despolarização/repolarização ventricular. O intervalo QTc (intervalo QT corrigido), que leva em considerações as mudanças na FC, isto é, normaliza o intervalo QT pela frequência cardíaca (fórmula de Bazett: $\text{intervalo QT}/\sqrt{\text{RR}}$) é frequentemente usado como um parâmetro mais objetivo (confiável) de despolarização/repolarização dos ventrículos sem interferência da frequência cardíaca, que nesse caso, foi alterada pelo hipotireoidismo. Nossos achados demonstraram que o grupo TX apresentou maior intervalo QTc em relação ao grupo controle (SHAM), em concordância com a literatura que descreve que o hipotireoidismo pode causar um prolongamento no QTc (FERNANDEZ-RUOCCO *et al.*, 2019).

No sentido de fundamentar os achados acima, sabe-se que o hormônio tireoidiano induz ao aumento no recrutamento de canais para sódio de inativação lenta e que o status tireoidiano também influencia a atividade/expressão dos canais para potássio dependentes de voltagem (Kv) do sarcolema, como: Kv1.5, Kv 4.2 e Kv 4.3 (SHIMONI & SEVERSON, 1995). Além disso, a atividade de um canal para potássio específico, o Ito (canal para potássio transiente de efluxo), que participa da repolarização precoce (fase 1 do potencial de ação rápido) nas células de Purkinje, cardiomiócitos atriais e ventriculares epicárdicas, está diminuída em modelos de hipotireoidismo em ratos. Quando esses animais são tratados com T3, essa alteração é revertida (SHIMONI & SEVERSON, 1995).

Por outro lado, já foi demonstrado que em corações de coelhos hipertireoideos, a corrente de potássio aumenta, levando ao encurtamento do potencial de ação no cardiomiócito. Portanto, é plausível se pensar na redução dessas correntes e, portanto, um prolongamento do QT em nosso modelo, hipótese essa que será testada pelo nosso grupo em futuro próximo em experimentos de expressão gênica (RT-PCR) e/ou proteica (Western blot).

Da mesma forma, em relação a frequência cardíaca, muitas das alterações nos canais iônicos do sarcolema são baseadas em alterações na expressão de algumas subunidades constituintes desses canais. Por exemplo, o efeito do T3 no aumento da frequência cardíaca pode ser também explicado pelo aumento da corrente *if* (funny current) no nodo sinusal (NSA) que, devido ao fato de ser dependente de hiperpolarização para se tornar completamente ativa, também é conhecida por hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated current (HCN), uma das correntes mais importantes para a atividade marcapasso do NSA. Assim, as proteínas que constituem o canal *if* são produtos dos genes HCN1, HCN2 e HCN4 expressos no NSA e

modulados positivamente pelo T3. Os canais para cálcio do tipo L (ICaL), além de contribuírem para a fase 2 (platô) do potencial de ação rápido no cardiomiócito, gera a corrente de influxo (despolarização, fase 0 do potencial de ação lento) nos tecidos nodais (nodos sinusal e átrio-ventricular) e também sofrem a influência positiva do T3. Portanto, também é plausível se pensar em uma redução na expressão dessas proteínas em nosso modelo de hipotireoidismo, hipótese esta, que também será testada em futuro próximo.

O estudo realizado no coração isolado foi importante em pelo menos quatro aspectos. A constatação da hipótese, pelo menos em nosso modelo, de que:

1. A bradicardia foi diretamente mediada pela ausência/redução do hormônio tireoidiano no coração, especialmente no nodo sinusal, uma vez que, a redução na frequência cardíaca observada no grupo TX se manteve mesmo quando o coração foi perfundido isoladamente *in vitro*, isto é, sem a influência dos sistemas de integração neuroendócrinos moduladores da atividade cronotrópica cardíaca.
2. A bradicardia tenha sido causada principalmente pela lentificação da sístole e não pelo prolongamento na diástole no grupo TX. Alterações na função sistólica já foram amplamente descritas em pacientes hipotireoideos, como o trabalho de Tafarshiku *et al.* (2020).
3. O hipotireoidismo não afeta de forma importante a mecânica do coração isolado.
4. A resposta adrenérgica no coração hipotireoideo isolado não é alterada de uma forma geral.

Vale lembrar que a redução significativa na resposta adrenérgica no tempo de diástole e a tendência de aumento na dP/dt positiva exibida pelo grupo TX em termos relativos, isto é, comparando cada grupo após com eles mesmos antes da administração de adrenalina, pode significar menor sensibilidade adrenérgica nas propriedades lusitrópicas e maior sensibilidade à adrenalina na contractilidade miocárdica respectivamente.

O T3 encurta drasticamente o tempo de diástole, i.e., o coração hipertireoideo relaxa mais rapidamente (efeito lusitrópico), ao passo que a diástole é claramente prolongada em estados hipotireoideos em todas as espécies de mamíferos (MINTZ *et al.*, 1991). Nossos achados no coração isolado não corroboram os dados da literatura, uma vez que, não se observou alteração neste parâmetro no grupo TX em relação ao SHAM. Embora não tenhamos fortes argumentos para justificar essa controvérsia, vale ressaltar que as avaliações no tempo de diástole foram realizadas no coração isolado e, portanto, sem a influência da pré-carga que pode

estar alterada no animal hipotireoideo “inteiro”. Estudos futuros devem ser realizados para testar essa hipótese.

A velocidade com que a concentração de cálcio livre citosólico diminui, tornando-o menos disponível para a interação com a subunidade C da troponina dos miofilamentos leves, é um dos eventos cruciais para o estabelecimento do processo de diástole. Vários mecanismos de transporte envolvendo trocadores e bombas iônicas (ATPases) contribuem para a diminuição da concentração citosólica de cálcio, no entanto, a bomba de cálcio localizada no retículo sarcoplasmático SERCa2 (*sarcoplasmatic reticulum* Ca^{++} ATPase) é o mecanismo mais importante.

O gene que codifica a SERCa2 é altamente responsivo ao T3 e tanto experimentos *in vivo* como em cultura de cardiomiócitos corroboram a ideia de que a expressão dessa proteína deve ser um efeito direto do T3. Curiosamente, o estímulo $\alpha 1$ -adrenérgico inibe esse efeito do T3 em corações de ratos (MINTZ *et al.*, 2001). Outra molécula importante na regulação do transiente de cálcio, i.e., os ciclos de liberação e remoção do cálcio citosólico a cada ciclo cardíaco, é o polipeptídio denominado fosfolambam (PLB), que inibe diretamente a atividade da SERCa2 e é modulado negativamente pelo T3. O RNAm que codifica o canal de rianodina (RyR), o canal para cálcio do retículo sarcoplasmático, também é modulado pelo T3. Portanto, em conjunto, o aumento da expressão/atividade da SERCa2 e da expressão dos canais de rianodina, bem como, a redução da expressão da PLB pelo T3 aumentam proporcionalmente a quantidade de cálcio liberada pelo retículo durante a sístole e, portanto, aumenta a força de contração do coração hipertireoideo.

Pode-se imaginar que, no hipotireoidismo o inverso ocorra. No entanto, nossos dados no coração isolado não sustentam essa hipótese, pois nenhuma alteração nos índices de contractilidade miocárdica, seja a PDVE seja o dP/dt positivo, não sofreram quaisquer alterações no grupo TX em relação ao SHAM. Mais uma vez, é importante ressaltar que, nossos dados foram obtidos no coração isolado e sem a influência de fatores externos, como por exemplo da pré-carga. Sabe-se que o T3 é importante para a redução da resistência vascular sistêmica (KLEIN, I., OJAMAA, K, 2001) e, portanto, o hipotireoidismo deve afetar sobremaneira a função contrátil do coração pelo aumento da pré-carga. Assim, as possíveis alterações moleculares cardíacas, se é que elas ocorrem, não devem ser suficientes para impactar nos índices de contractilidade miocárdica, pelo menos em nosso modelo de hipotireoidismo, isto é, ratos Wistar machos jovens com três semanas de hipotireoidismo.

Por fim, embora pareça paradoxal, os animais do grupo TX exibiram tendência de aumento ($P = 0,09$) na dP/dt positiva em resposta a adrenalina. Isso a princípio, vai na oposição ao apresentado acima. No entanto, considerando que o estímulo adrenérgico produz alterações similares ao T3 nas proteínas reguladoras do transiente de cálcio e, o conhecimento de mais de quatro décadas de que o T3 regula positivamente os receptores beta-adrenérgicos no coração (WILLIAMS *et al.*, 1977), pode-se especular que a redução na expressão de receptores beta1-adrenérgicos cardíacos, induzida pelo hipotireoidismo no cardiomiócito, deve ter aumentado a sinalização beta adrenérgica por meio do aumento da expressão *downstream* de mediadores da via adenilato ciclase/AMP cíclico e portanto levado a tendência de aumento da contratilidade em resposta a adrenalina.

Essa hipótese, embora precise ser testada em nosso modelo, já foi descrita por Ojamaa *et al.* (2000), onde o hipotireoidismo foi induzido em ratos Sprague-Dawley utilizando 6-n-propil-2-tiouracil (PTU). Neste estudo foi constatado que atividade das isoformas da adenil ciclase cardíaca induzidas por hormônios tireoidianos são uma forma de modulação importante da produção do AMP cíclico cardíaco, corroborando nosso estudo.

Esses dados são de extrema relevância, pois não só são pioneiros na literatura científica, mas também apresentam uma abordagem integrada ao explorar simultaneamente parâmetros comportamentais e cardíacos no mesmo estudo e com os mesmos animais. Tais resultados permitem uma caracterização detalhada das alterações cardiovasculares e comportamentais, aspectos essenciais para o entendimento mais aprofundado do hipotireoidismo. Além disso, esses achados abrem caminho para futuros estudos que busquem tratamentos mais eficazes para a patologia.

Estudos subsequentes realizados em nosso laboratório serão fundamentais para testar e identificar novas alternativas terapêuticas, o que poderá orientar futuras investigações clínicas e ajudar a aprimorar a qualidade de vida de pacientes hipotireoideos. Este avanço é crucial, pois a compreensão abrangente dos impactos do hipotireoidismo não só contribui para a melhoria do manejo clínico, mas também para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas mais direcionadas e eficazes.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os achados do presente estudo demonstram que o modelo experimental de hipotireoidismo induzido por tireoidectomia total em ratos Wistar é eficaz na reprodução de alterações comportamentais, metabólicas e cardiovasculares observadas clinicamente em

pacientes com hipotireoidismo, conferindo a este modelo elevado valor translacional. A utilização do mesmo grupo de animais em todas as abordagens experimentais — testes comportamentais, análises laboratoriais e avaliações cardíacas *in vivo* e *ex vivo* — permitiu uma análise integrada e sistemática dos efeitos da disfunção tireoidiana, reduzindo variáveis intergrupais e aumentando a consistência metodológica.

Os resultados evidenciaram hiperglicemia discreta, alterações comportamentais análogas à ansiedade e depressão, além de alterações cardíacas, como bradicardia e prolongamento dos intervalos QT e QTc e maior duração da sístole, corroborando com estudos anteriores.

A redução da massa cardíaca observada, em contraste com o aumento típico associado ao hipertireoidismo — decorrente do estímulo à síntese proteica nos cardiomiócitos — reforça a importância de investigações futuras para elucidar os mecanismos fisiológicos envolvidos na "hipotrofia" cardíaca evidenciada em nossos resultados. Para aprimorar a acurácia dessas análises, seria interessante, em estudos subsequentes, empregar a massa cardíaca relativa ao comprimento da tíbia, parâmetro amplamente reconhecido como padrão na avaliação de hipertrofia cardíaca e alterações morfofuncionais.

No que se refere à duração da diástole, que se manteve inalterada em nossos achados — em contraste com dados prévios da literatura — é importante destacar que as avaliações foram conduzidas em corações isolados, ou seja, sem a influência da pré-carga, a qual pode estar significativamente alterada em animais hipotireoideos *in vivo*. Logo, estudos futuros são necessários para testar essa hipótese e esclarecer o papel da pré-carga nas alterações diastólicas associadas ao hipotireoidismo.

Dessa forma, o presente trabalho contribui significativamente para o entendimento das repercussões sistêmicas do hipotireoidismo e reforça a importância de modelos experimentais que integrem diferentes esferas da fisiopatologia. A padronização e a reprodutibilidade dos achados aqui apresentados oferecem uma base sólida para futuras investigações voltadas ao desenvolvimento e à avaliação de estratégias terapêuticas mais eficazes, especialmente frente à persistência de sintomas residuais neuropsiquiátricos e cardiovasculares observados em parcela significativa dos pacientes.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AUBERT, A. E. et al. Complexity of cardiovascular regulation in small animals. *Philosophical Transactions. Series A, Mathematical, Physical, and Engineering Sciences*, v. 367, n. 1892, p. 1239-1250, 2009.
2. BATHLA, M.; SINGH, M.; RELAN, P. Prevalence of anxiety and depressive symptoms among patients with hypothyroidism. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, v. 20, n. 4, p. 468-474, 2016.
3. BEVINS, R. A.; BESHEER, J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nature Protocols*, v. 1, n. 3, p. 1306-1311, 2006.
4. BIANCO, A. C. et al. American Thyroid Association guide to investigating thyroid hormone economy and action in rodent and cell models. *Thyroid*, v. 24, n. 1, p. 88-168, 2014.
5. BOUSTANI, A. et al. Mild exercise plus levothyroxine ameliorates deficits of spatial navigation, anxiety profile, and hippocampal BDNF in hypothyroid male offspring rats. *Brain and Behavior*, v. 14, e3614, 2024.
6. BRENT, G. A. Mechanisms of thyroid hormone action. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 122, n. 9, p. 3035-3043, 2012.
7. CAMPOS, L. S.; LOPES, T. A.; SOUZA, E. F. Distúrbios metabólicos no hipotireoidismo: uma revisão. *Revista Brasileira de Endocrinologia*, v. 21, n. 2, p. 123-135, 2024.
8. CHAKER, L.; RAZVI, S.; BENSENOR, I. M. Hypothyroidism. *The Lancet*, v. 390, n. 10101, p. 1550-1562, 2022.
9. CHIELLINI, G. et al. Cardiac effects of 3-iodothyronamine: a new aminergic system modulating cardiac function. *FASEB Journal*, v. 21, n. 7, p. 1597-1608, 2007.
10. DA CONCEIÇÃO, R. R. et al. Metal coordinated poly-zinc-liothyronine provides stable circulating triiodothyronine levels in hypothyroid rats. *Thyroid*, v. 28, n. 11, p. 1483-1495, 2018.
11. Davis, P. J., et al. Membrane receptor for thyroid hormone: physiologic and pharmacologic implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **51**, 99-115, 2011.
12. DE CASTRO, J. P. W. et al. Differences in hypothalamic type 2 deiodinase ubiquitination explain localized sensitivity to thyroxine. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 125, n. 2, p. 769-780, 2015.
13. ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioral Brain Research*, v. 31, p. 47-59, 1988.

14. ETTLESON, M. D.; BIANCO, A. C. Individualized therapy for hypothyroidism: is T4 enough for everyone? *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 105, n. 9, p. e3090 e3104, 2020.
15. FERNANDEZ-RUOCCO, J. et al. Tirotrópina alta é crítica para remodelação elétrica cardíaca e vulnerabilidade à arritmia no hipotireoidismo. *Tireóide*, v. 29, n. 7, p. e934-e945, 2019.
16. FROTA, I. J. et al. Transtornos de ansiedade: histórico, aspectos clínicos e classificações atuais. *Journal of Health & Biological Sciences*, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2021.
17. GALIÑANES, M. et al. Early effects of hypothyroidism on the contractile function of the rat heart and its tolerance to hypothermic ischemia. *J Thorac Cardiovasc Surg*, v. 107, n. 3, p. 829-837, mar. 1994.
18. GHENIMI, N. et al. Adult-Onset Hypothyroidism Induces the Amyloidogenic Pathway of Amyloid Precursor Protein Processing in the Rat Hippocampus. *J. Neuroendocrinol.*, v. 22, p. 951–959, 2010.
19. GODINI, A.; GHASEMI, A.; ZAHEDIASL, S. The possible mechanisms of the impaired insulin secretion in hypothyroid rats. *PLoS One*, v. 10, n. 7, e0131198, 2015.
20. GULLO, D. et al. Levothyroxine monotherapy cannot guarantee euthyroidism in all athyreotic patients. *PLoS One*, v. 6, n. 8, e22552, 2011.
21. GUNASEKARAN, K.; CHUAN TAN, N. Otimizando a substituição de levotiroxina na prática de cuidados primários. *IntechOpen*, 2024.
22. HAGE, M. P.; AZAR, S. T. The link between thyroid function and depression. *Journal of Thyroid Research*, v. 2012, p. 590648, 2012.
23. HALL, John E. *Tratado de Fisiologia Médica*. Tradução da 12ª edição por Alcides Marinho Junior et al. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. ISBN 978-85-352-4980-4.
24. JEAN-LUC, M. Simulating the anhedonia symptom of depression in animals. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, v. 4, n. 4, p. 351-360, 2002.
25. JIN, Z. et al. Serotonin 2A receptor function and depression-like behavior in rat model of hypothyroidism. *Experimental Brain Research*, v. 239, n. 8, p. 2435-2444, 2021.
26. JOUKAR, S. A comparative review on heart ion channels, action potentials and electrocardiogram in rodents and humans: extrapolation of experimental insights to clinic. *Laboratory Animal Research*, v. 37, n. 1, p. 1-15, 2021.
27. KAHALY GJ, DILLMANN WH. Thyroid hormone action in the heart. *Endocr Rev*;26(5):704-28, 2005.

28. KLEIN, I.; OJAMAA, K. Thyroid hormone and the cardiovascular system. *New England Journal of Medicine*, v. 344, n. 7, p. 501-509, 2001.
29. KLEMPERER, J.; OJAMAA, K.; KLEIN, I. Thyroid hormone therapy in cardiovascular disease. *Progress in Cardiovascular Diseases*, v. 38, p. 329-336, 1996.
30. KONOPELSKI, P.; UFNAL, M. Electrocardiography in rats: a comparison to human. *Physiological Research*, v. 65, p. 717-725, 2016.
31. KRAEUTER, A. K. et al. The elevated plus maze test for measuring anxiety-like behavior in rodents. *Methods in Molecular Biology*, v. 1916, p. 69-74, 2019.
32. LADENSON, P. W. et al. American Thyroid Association guidelines for detection of thyroid dysfunction. *Archives of Internal Medicine*, v. 160, n. 11, p. 1573-1575, 2000.
33. LEGER, M. *et al.* Teste de reconhecimento de objetos em ratos. *Nat Protoc* 8, 2531–2537, 2013.
34. MCILWAIN, K. L. et al. The use of behavioral test batteries: effects of training history. *Physiology & Behavior*, v. 73, n. 5, p. 705-717, 2001.
35. MEHRAN, L. et al. Pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of the combined preparation of levothyroxine plus sustained-release liothyronine: a randomized controlled clinical trial. *BMC Endocrine Disorders*, v. 23, p. 1-10, 2023.
36. MIKICS, E. et al. Behavioral specificity of nongenomic glucocorticoid effects in rats: effects on risk assessment in the elevated plus maze and the open-field. *Hormones & Behavior*, v. 48, n. 2, p. 152-162, 2005.
37. MONTERO-PEDRAZUELA, A. *et al.* Modulation of adult hippocampal neurogenesis by thyroid hormones: implications in depressive-like behavior. *Molecular Psychiatry*, v. 11, n. 4, p. 361-371, 2006.
38. MOREAU J.L. *et al.* O tratamento antidepressivo previne a anedonia crônica imprevisível induzida por estresse leve, conforme avaliado pelo comportamento de autoestimulação do tegmento ventral em ratos. *Eur Neuropsychopharmacol.*;2:43–9, 1992.
39. ÖGREN, S. O.; STIEDL, Oliver. Passive avoidance. *Encyclopedia of psychopharmacology*, v. 2, p. 960-967, 2010.
40. OJAMAA, K. et al. Changes in adenylyl cyclase isoforms as a mechanism for thyroid hormone modulation of cardiac beta-adrenergic receptor responsiveness. *Metabolism*, v. 49, n. 2, p. 275-279, 2000.
41. OLIVARES, E. L. et al. Social stress-induced hypothyroidism is attenuated by antidepressant treatment in rats. *Neuropharmacology*, v. 62, n. 1, p. 446-456, 2012.

42. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Depression. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression> Acesso em: 10 abril 2025.
43. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Mental Health Gap Action Programme. Disponível em: <https://www.who.int/teams/mental-health-and-substance-use/treatment-care/mental-health-gap-action-programme>. Acesso em: 09 abril 2025.
44. ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. Aumenta o número de pessoas com depressão no mundo. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/23-2-2017-aumenta-numero-pessoas-com-depressao-no-mundo>. Acesso em: 10 abril 2025.
45. OSNAYA-BRIZUELA, N. et al. Is the acquired hypothyroidism a risk factor for developing psychiatric disorders? *Frontiers in Psychiatry*, v. 15, p. 1429255, 2024.
46. OSUNA, PM, *et al.* Hyperthyroidism and the Heart. *Methodist Debakey Cardiovasc J.* Apr-Jun;13(2):60-63, 2017.
47. OZAWA, T. et al. A feedback neural circuit for calibrating aversive memory strength. *Nature Neuroscience*, v. 20, p. 90–97, 2017.
48. PANVELOSKI-COSTA, A. C. et al. Thyroid hormone reduces inflammatory cytokines improving glycaemia control in alloxan-induced diabetic Wistar rats. *Acta Physiologica*, v. 217, p. 130–140, 2016.
49. PEREIRA-JUNIOR, P. P. et al. Noninvasive method for electrocardiogram recording in conscious rats: feasibility for heart rate variability analysis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 82, n. 2, p. 431-437, 2010.
50. PIZZO, E. et al. Heart rate variability reveals altered autonomic regulation in response to myocardial infarction in experimental animals. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, v. 9, 2022.
51. PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*, v. 463, p. 3-33, 2003.
52. ROESLER, R. *et al.* Intrahippocampal infusion of the NMDA receptor antagonist AP5 impairs retention of an inhibitory avoidance task: protection of impairment by pre training preexposure to the task apparatus. *Neurobiology of learning and memory*, v.69, n.2, p.87-91, 1998.
53. ROESLER, R. *et al.* Infusions of AP5 into the basolateral amygdala impairs the formation but not the expression, of the step-down inhibitory avoidance. *Brazilian Journal of medical an biological research*, v.33, n.7, p. 829-834, 2000.
54. SANTIS, L. A.; CREMONEZI, I. M. Associação entre as alterações do hipotireoidismo e o comportamento das células cardíacas. *Frontiers in Pharmacology*, v. 11, p. 1079, 2020.

55. SILVA, E. et al. Cognitive dysfunction in hypothyroidism: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Thyroid Research*, v. 2014, p. 890542, 2014.
56. SILVA, R. A.; CARRILHO, R. I. Neurobiologia da depressão: uma revisão. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 36, n. 2, p. 172-183, 2024.
57. SVORC, P., *et al.* Sex differences in HRV under general anesthesia in rat model. *Anesthesia and Pain Medicine*, 4(1), 1–6, 2020.
58. TSE, Y. et al. Central thyroid hormone regulation: effects of thyroxine treatment on memory consolidation in rats. *Journal of Neuroscience*, v. 30, p. 5072-5081, 2010.
59. VAN MEURS, M. et al. Effect of thyroid hormone treatment on emotional behavior in hypothyroid rats. *Neuroendocrinology Letters*, v. 28, p. 171–175, 2007.
60. WALF A.A, FRYE C.A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc*; 2(2):322-8, 2007.
61. WEISS, R. E. et al. Congenital hypothyroidism: from gene to therapy. *Thyroid*, v. 29, p. 1-11, 2019.
62. WISNIEWSKA-KNYCH, B. et al. Role of thyroid hormone in the regulation of hippocampal activity. *Psychoneuroendocrinology*, v. 69, p. 61-72, 2016.
63. YAO, S.; TANG, Z. Interactions between thyroid hormone and central nervous system in animal models of hypothyroidism. *Endocrine Journal*, v. 64, n. 8, p. 773-779, 2017.
64. ZOU, X. et al. Thyroid hormones and their receptors in the hippocampus: effects on memory and anxiety-like behavior. *Journal of Neuroscience Research*, v. 43, p. 42-56, 2024.
65. ZHANG, S. et al. Upregulation of the thyroid hormone receptor is involved in the antidepressant-like effects of chronic mild stress. *Journal of Neuroscience Research*, v. 35, p. 741-749, 2022.
66. ZHOU, J. et al. The role of thyroid hormones in the pathogenesis of mood disorders: an animal model study. *Neurobiology of Disease*, v. 64, p. 147-155, 2014.
67. ZHU, S. et al. The involvement of thyroid hormone signaling in brain metabolism and cognitive function. *Neurochemical Research*, v. 41, p. 365-372, 2016.
68. ZHANG, Y. et al. Effects of hypothyroidism on the physiology of the rat's nervous system. *Neuroendocrinology Letters*, v. 38, p. 456-466, 2017.
69. ZHU, Y. et al. Functional relevance of thyroid hormone receptors in central nervous system diseases. *Molecular Psychiatry*, v. 21, p. 46-53, 2016.

ANEXO A – CERTIFICADO CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA/ICBS

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFICÁCIA DA TERAPIA DUPLA COM L-TIROXINA E L-TRIIODOTIRONINA NO TRATAMENTO DO HIPOTIREOIDISMO EXPERIMENTAL" registrada com o nº CEUA 01/2023, sob a responsabilidade de Emerson Lopes Olivares, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal -CONCEA, e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA-ICBS-UFRRJ), em reunião de 15 de março de 2023.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/04/2023 a 01/06/2024
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus</i> /Wistar
Nº de animais	60
Peso/idade	150-200 gramas/8 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério de criação da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

We certify that the protocol CEUA number 01/2023, entitled "EFFECTIVENESS OF DUAL THERAPY WITH L-THYROXINE AND L-TRIIODOTHYRONINE IN THE TREATMENT OF EXPERIMENTAL HYPOTHYROIDISM" is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Institute of Biological Sciences and Health of Federal Rural University of Rio de Janeiro in March 15, 2023.

Ana Cláudia Ferreira Souza
Coordenadora CEUA-ICBS-UFRRJ