



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

NÚCLEO DE TEORIA E PESQUISA DO COMPORTAMENTO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO

**Investigação eletrofisiológica e comportamental da função visual  
em camundongos suíços com hipotireoidismo congênito induzido  
por metimazol**

**Antonio Carlos Bastos da Silva**

**Belém – Pará**

**Janeiro**

**2017**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

NÚCLEO DE TEORIA E PESQUISA DO COMPORTAMENTO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO

**Investigação eletrofisiológica e comportamental da função visual em camundongos suíços com hipotireoidismo congênito induzido por metimazol**

**Antonio Carlos Bastos da Silva**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de mestre em Neurociências e Comportamento, sob a orientação do Prof. Dr. Fernando Allan de Farias Rocha e coorientação do Prof. Dr. Paulo Roney Kilpp Goulart.

**Belém – Pará**

**Janeiro**

**2017**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

UFPA/Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento/Biblioteca

---

Silva, Antonio Carlos Bastos da, 1981-

Investigação eletrofisiológica e comportamental da função visual em camundongos suíços com hipotireoidismo congênito induzido por metimazol / Antonio Carlos Bastos da Silva. — 2017.

Orientador: Fernando Allan de Farias Rocha  
Co-orientador: Paulo Roney Kilpp Goulart

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento, Belém, 2017.

1. Psicologia: pesquisa experimental. 2. Análise do comportamento. 3. Hipotireoidismo congênito. 4. Metimazol. 5. Eletrorretinograma. 6. Psicofísica visual. I. Título.

---

CDD - 23. ed. 150.724

## **Dados da Defesa e Banca**

### **Investigação eletrofisiológica e comportamental da função visual em camundongos suíços com hipotireoidismo congênito induzido por metimazol**

Candidato: Antonio Carlos Bastos da Silva

Data da defesa: 02/02/2017

Resultado:

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr Fernando Allan de Farias Rocha  
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará

---

Prof. Dr. Paulo Roney Killp Goulart  
Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento, Universidade Federal do Pará

---

Prof<sup>a</sup>. Dr. Bruno Duarte Gomes (Titular)  
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará

---

Prof. Dr. Erik Artur Cortinha Alves (Titular)  
Universidade do Estado do Pará

## **Dedicatória**

*Para minha mãe, Mirian Bastos da Silva*

## **Agradecimentos**

Agradeço a minha mãe, por todo amor, carinho, dedicação e incentivo para novas conquistas, além de ser o meu maior referencial humano. Essas palavras não retratam o quão grande é a minha gratidão;

A minha irmã Ana Carla, pelo convívio diário e por ter nos presenteado com o maior amor da família, que é o meu sobrinho Guilherme;

Ao meu sobrinho, por animar meus dias com seu universo de criança;

A minha namorada, Patrícia Medeiros, por todos os momentos juntos, durante os momentos de tensão nos últimos meses e por estar ao meu lado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Rocha, que a cada conversa e orientação me mostra novas ideias sobre ciência, além da sua paciência e dedicação em falar sobre eletrofisiologia.

Ao meu co-orientador prof. Dr. Paulo Goulart, por todos os momentos de orientação auxiliando na descoberta de um novo caminho que é a Análise do Comportamento;

A Luana Gomes, amiga e parceira de turma e laboratório. Muito obrigado pelas trocas de ideias, auxílios e sugestões para o delineamento deste trabalho, além dos momentos de descontração nos dias sobrecarregados no laboratório;

Aos colegas do Laboratório de Neurofisiologia Eduardo Oswaldo Cruz:, Edwiges Oliveira, Hanna Katarine, Matheus Rosa e Tamara Maués pelos momentos de descontração e companheirismo, por terem sido um grande suporte nesta jornada. E que a amizade continue;

Aos professores do programa de pós-graduação em Neurociências e Comportamento da Universidade Federal do Pará, pelas contribuições diretas e indiretas no delineamento e desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, principalmente os senhores Reginaldo e Amarildo, pelos momentos dedicados no auxílio com o manejo dos animais de nosso trabalho

A CNPq e FAPESPA pelo apoio financeiro.

## Resumo

SILVA, A.C.B. Investigação eletrofisiológica e comportamental da função visual em camundongos suíços com hipotireoidismo congênito induzido por metimazol. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de pós-graduação em Neurociências e comportamento. Universidade Federal do Pará. 2017. 77 páginas

O hipotireoidismo é uma das doenças hormonais de maior ocorrência mundial, com causas relacionadas às alterações morfológicas da tireoide ou à problemas na expressão gênica dos receptores dos hormônios tireoideanos. Esta doença caracteriza-se pela diminuição dos níveis dos hormônios produzidos na tireoide: o Triiodotironina (T3) e o Tiroxina (T4), presente no plasma sanguíneo. Estes hormônios tireoidianos apresentam importantes funções para o crescimento e a maturação de diversos órgãos e tecidos, exibindo ação observada no período embrionário e pós-natal, onde alguns órgãos e tecidos ainda se apresentam imaturos após o nascimento. Em se tratando de sistema nervoso, os hormônios são importantes para o desenvolvimento em diversas regiões deste sistema, dentre elas, as regiões que compõem o sistema visual. Atualmente, técnicas modernas de indução do hipotireoidismo, através do uso de drogas que inibem a ação da glândula tireoide têm sido aplicadas em diversos trabalhos que investigam os efeitos da doença. Nosso estudo investigou alterações visuais em camundongos suíços albinos com hipotireoidismo congênito, ocasionado pelo metimazol (MMI), através de técnicas de eletrofisiologia e avaliação do comportamento visual. Para isso, foram utilizados 12 animais, distribuídos entre o grupo experimental HC-MMI (Hipotireoidismo Congênito por Metimazol) com seis indivíduos nascidos de uma fêmea tratada com MMI durante a gestação, e o grupo controle, com os outros seis animais gerados por uma fêmea que não recebeu a droga. Os animais com 60 dias de vida foram submetidos aos testes de eletrorretinograma (ERG), para avaliar o desempenho funcional da retina, e a psicofísica visual utilizando um software adaptado a partir do *Cambridge Colour Test*, permitindo aplicá-lo em animais não humanos, com o propósito de observar o desempenho dos animais diante de estímulos cromáticos. Assim, como resultados, encontramos diferenças nas análises do ERG, onde observamos alterações estatisticamente consideráveis na amplitude da onda b, sendo menor em animais com hipotireoidismo congênito ( $51,082 \pm 24,848$ ) em relação aos animais do grupo controle ( $99,592 \pm 26,520$ ). Já a latência da onda b não apresentou dados com diferenças significativas, porém, nos animais do grupo experimental os valores foram maiores ( $37,881 \pm 7,419$ ) em relação ao controle ( $31,506 \pm 11,386$ ). Em se tratando de onda-a, a amplitude deste componente do ERG foi maior em animais com hipotireoidismo congênito, em comparação ao controle, também com significância estatística. Já o tempo implícito para a formação da onda-a não apresentou diferenças significativas. Dessa forma, concluímos que a redução dos níveis dos hormônios da tireoide estão diretamente ligados a alterações funcionais na retina dos animais nascidos de fêmeas que receberam o metimazol durante a gestação,

Palavras-chave: Hipotireoidismo Congênito, Metimazol, Eletrorretinograma, Psicofísica Visual

## Abstract

SILVA, A.C.B. Electrophysiological and behavioral investigation of visual function in Swiss mice with congenital hypothyroidism induced by methimazole. Master's Dissertation presented to the Graduate Program in Neurosciences and Behavior. Federal University of Pará, 2017. 92 pages.

Hypothyroidism is one of the most frequent hormonal diseases worldwide, with causes related to thyroid morphological changes or problems in the gene expression of thyroid hormone receptors. This disease is characterized by a decrease in the levels of hormones produced in the thyroid: Triiodotironine (T3) and Thyroxine (T4), present in the blood plasma. These thyroid hormones present important functions for the growth and maturation of various organs and tissues, exhibiting action observed in the embryonic and postnatal period, where some organs and tissues are still immature after birth. In the case of the nervous system, hormones are important for the development in several regions of this system, among them, the regions that make up the visual system. Currently, modern techniques of induction of hypothyroidism through the use of drugs that inhibit the action of the thyroid gland have been applied in several studies investigating the effects of the disease. Our study investigated visual changes in albino Swiss mice with congenital hypothyroidism, caused by methimazole (MMI), through electrophysiology techniques and evaluation of visual behavior. For this, 12 animals were used, distributed among the experimental group HC-MMI (Congenital Hypothyroidism by Methimazole) with six individuals born of a female treated with MMI during gestation, and the control group, with the other six animals generated by a female who did not receive the drug. The 60-day-old animals were submitted to electroretinography examination (ERG), to evaluate the functional performance of the retina, and visual psychophysics using a software adapted from the Cambridge Color Test, allowing to apply it in non-human animals, with the purpose of observing the performance of the animals before chromatic stimuli. As results, we found differences in the ERG analysis, where we observed statistically significant changes in the amplitude of the b wave, being lower in animals with congenital hypothyroidism ( $51,082 \pm 24,848$ ) in relation to the animals of the control group ( $99,592 \pm 26,520$ ). However, the b wave latency did not present data with significant differences, but in the experimental group the values were higher ( $37,881 \pm 7,419$ ) in relation to the control ( $31,506 \pm 11,386$ ). In the case of wave-a, the amplitude of this component of ERG was greater in animals with congenital hypothyroidism, in comparison to the control, also with statistical significance. However, the implicit time for wave formation did not show significant differences. Thus, we conclude that the reduction of thyroid hormone levels are directly related to functional alterations in the retina of the nasal animals of females receiving methimazole during gestation.

Key words: Congenital Hypothyroidism, Methimazole, Electroretinogram, Visual Psychophysics



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura retina	5
<b>Figura 2:</b> Estrutura de bastonetes e cones	6
<b>Figura 3:</b> Curva de sensibilidade espectral de cones e bastonetes humanos	8
<b>Figura 4:</b> Curva de sensibilidade espectral dos cones de ratos	9
<b>Figura 5:</b> Eletrorretinograma em resposta a diferentes estímulos luminosos	15
<b>Figura 6:</b> Estímulo apresentado originalmente pelo <i>Cambridge Colour Test</i>	18
<b>Figura 7:</b> Tipos de eletrodo	23
<b>Figura 8:</b> Equipamentos utilizados no eletrorretinograma	25
<b>Figura 9:</b> Parâmetros do ERG de campo total analisados	26
<b>Figura 10:</b> Estímulos cromático	28
<b>Figura 11:</b> Caixa de condicionamento operante e as modificações	30
<b>Figura 12:</b> Tempo implícito da onda-b em resposta escotópica	39
<b>Figura 13:</b> Amplitude da onda-b em resposta escotópica	39
<b>Figura 14:</b> Tempo implícito da onda-a em resposta escotópica mista 1	41
<b>Figura 15:</b> Tempo implícito da onda-b em resposta escotópica mista 1	41
<b>Figura 16:</b> Amplitude da onda-a em resposta escotópica mista 1	43
<b>Figura 17:</b> Amplitude da onda-b em resposta escotópica mista 1	43
<b>Figura 18:</b> Tempo implícito da onda-a em resposta escotópica mista 2	45
<b>Figura 19:</b> Tempo implícito da onda-b em resposta escotópica mista 2	45
<b>Figura 20:</b> Amplitudes da onda-a em resposta escotópica mista 2	46
<b>Figura 21:</b> Amplitudes da onda-a em resposta escotópica mista 2	46
<b>Figura 22:</b> Tempo implícito da onda-a em resposta fotópica 1Hz	48
<b>Figura 23:</b> Tempo implícito da onda-b em resposta fotópica 1Hz	49
<b>Figura 24:</b> Amplitude da onda-a em resposta fotópica 1Hz	50
<b>Figura 25:</b> Amplitude da onda-b em resposta fotópica 1Hz	50
<b>Figura 26:</b> Tempo implícito da onda-b em resposta fotópica de <i>flickers</i> na ordem de 12, 18, 24 e 30 Hz	52
<b>Figura 27:</b> Amplitude da onda-b em resposta fotópica de <i>flickers</i> na ordem de 12, 18, 24 e 30 Hz	53
<b>Figura 28:</b> Tempo implícito da onda-a em resposta fotópica de cone S	54
<b>Figura 29:</b> Tempo implícito da onda-b em resposta fotópica de cone S	55
<b>Figura 30:</b> Amplitude da onda-a em resposta fotópica de cone S	56
<b>Figura 31:</b> Amplitude da onda-b em resposta fotópica de cone S	57
<b>Figura 32:</b> Tempo Implícito da onda-a em resposta fotópica de cone M	58
<b>Figura 33:</b> Tempo Implícito da onda-b em resposta fotópica de cone M	58
<b>Figura 34:</b> Amplitude da onda-a em resposta fotópica de cone M	60
<b>Figura 35:</b> Amplitude da onda-b em resposta fotópica de cone M	61

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Mass corporal e comprimento dos grupos estudados	<b>36</b>
<b>Tabela 2:</b> Concentração sérica de T3 sanguíneo dos animais testados	<b>37</b>
<b>Tabela 3:</b> Tempo implícito e amplitude da onda-b em resposta escotópica	<b>38</b>
<b>Tabela 4:</b> Tempo implícito da onda-a e onda-b em resposta escotópica mista 1	<b>40</b>
<b>Tabela 5:</b> Amplitude da onda-a e onda-b em resposta escotópica mista 1	<b>42</b>
<b>Tabela 6:</b> Tempo implícito da onda-a e onda-b em resposta escotópica mista 1	<b>44</b>
<b>Tabela 7:</b> Amplitude da onda-a e onda-b em resposta escotópica mista 2	<b>46</b>
<b>Tabela 8:</b> Tempo implícito da onda-a e onda-b em resposta fotópica de cones a 1Hz	<b>48</b>
<b>Tabela 9:</b> Amplitude da onda-a e onda-b em resposta fotópica de cones a 1Hz	<b>49</b>
<b>Tabela 10:</b> Tempo implícito da onda-b em resposta fotópica de flickers em 12, 18, 24 e 30Hz.	<b>51</b>
<b>Tabela 11:</b> Amplitude da onda-b em resposta fotópica de flickers em 12, 18, 24 e 30Hz	<b>52</b>
<b>Tabela 12:</b> Tempo implícito da onda-a e onda-b em resposta fotópica de cone S com filtro azul	<b>54</b>
<b>Tabela 13:</b> Amplitude da onda-a e onda-b em resposta fotópica de cone S com filtro azul	<b>55</b>
<b>Tabela 14:</b> Tempo implícito da onda-a e onda-b em resposta fotópica de cone M com filtro verde	<b>58</b>
<b>Tabela 15:</b> Amplitude da onda-a e onda-b em resposta fotópica de cone M com filtro verde	<b>59</b>

## LISTA DE SIGLAS E SIMBOLOS

**μV** Microvolt

**CB** Células bipolares de cones, do inglês *bipolar cells*

**CCG** Camada de células ganglionares

**CCT** *Cambridge Colour Test*

**CFT** Camada de fotorreceptores

**CNE** Camada nuclear externa

**CNI** Camada nuclear interna

**CPE** Camada plexiforme externa

**CPI** Camada plexiforme interna

**CRF** Reforço contínuo de cada resposta

**DP** Desvio padrão

**ERG** Eletrorretinograma

**ERGcc** Eletrorretinograma de campo total

**EXT** Extinção

**FI** Intervalo Fixo

**g** Gramas

**HC** Hipotireoidismo Congênito

**HC-MMI** Grupo Hipotireoidismo Congênito causado por Metimazol

**Hz** Hertz

**ISCEV** Sociedade Internacional de Eletrofisiologia Clínica da Visão, do inglês *International Society for Clinical Electrophysiology of Vision*

**mg** Miligrama

**mg/dl** Miligrama por decilitro

**mg/Kg** Miligrama por kilograma

**MMI** Metimazol

**ms** Milissegundo

**RB** Célula bipolar de bastonetes, do inglês *rod bipolar cell*

**RPB** Resposta de pressão à barra

**T3** Triiodotironina

**T4** Tetraiodotironina ou Tiroxina

**TR $\beta$ 2** Receptor tireoidiano Beta 2, do inglês *thyroid Receptor Beta 2*

## Sumário

1. Resumo	vii
2. Abstract	viii
3. Introdução	1
3.1 A Tireoide e os Hormônios T3 e T4	2
3.2 Fisiologia e morfologia da retina de roedores	3
3.2.1 As células fotorreceptoras	6
3.3 Os hormônios tireoidianos e o desenvolvimento do sistema visual	10
3.4 O hipotireoidismo	11
3.5 Modelo de hipotireoidismo congênito causado por metimazol	13
3.6 A investigação de alterações visuais relacionadas ao hipotireoidismo congênito	14
3.6.1 O eletrorretinograma de campo total (ERG campo total)	15
3.6.2 O eletrorretinograma na investigação de alterações visuais	16
3.6.3 A psicofísica na investigação de alterações visuais	17
3.6.4 O <i>Cambridge Colour Test</i> (CCT)	18
4. Objetivos	20
4.1. Objetivo Geral	20
4.2. Objetivos Específicos	20
5. Métodos	21
5.1 Os sujeitos	21
5.1.1 Os grupos experimentais	21
5.2 A indução do hipotireoidismo congênito	23
5.3 A mensuração de massa corporal e comprimento	23
5.4 A dosagem de hormônios tireoidianos no sangue	23
5.5 A medida eletrofisiológica da visão de cores em camundongos com hipotireoidismo congênito através do eletrorretinograma de campo total (ERG campo total)	23
5.5.1 Preparação do animal para o ensaio eletrofisiológico	23
5.5.2 Registro eletrofisiológico	25
5.5.3 Equipamentos para Eletrofisiologia	25

5.5.4 Mensuração dos componentes do ERG de campo total	26
5.5.5 Protocolos do Eletrorretinograma de Campo Total	28
5.6 Medida Psicofísica da Visão de Cores em Camundongos com Hipotireoidismo Congênito	29
5.6.1 Equipamento	30
5.6.2 Os Estímulos	31
5.6.3 Preparo do animal	32
5.6.4 Procedimento geral	33
6. Análise dos resultados e estatística	36
6.1 Resultados dos testes de eletrorretinograma de campo total	36
6.2 Resultados dos testes de psicofísica visual	36
7 Resultados	37
7.1 Parâmetros Clínicos para caracterização do modelo experimental	37
7.1.1 Peso e comprimento dos animais	37
7.1.2 Níveis séricos de T3	38
7.2 Eletrorretinograma de campo total	39
7.2.1 Resposta Escotópica (Bastonetes)	39
7.2.3 Resposta Mista 1 (Cones e Bastonetes)	41
7.2.4 Resposta Mista 2	45
7.2.5 Resposta fotópica de cones em 1Hz	49
7.2.6 Resposta fotópica de <i>flickers</i> de 12, 18, 24 e 30Hz	52
7.2.7 Resposta fotópica de cone S	55
7.2.8 Resposta fotópica de cone M	59
7.3 Psicofísica Visual	63
7.3.1 Avaliação do desempenho com as adaptações da caixa de condicionamento operante	64
7.3.2 Número de sessões para a transição das etapas	65
7.3.3 Pressão à barra	65
7.3.4 Ingestão de água	66
8. Discussão	68

9. Conclusão	73
10. Referências	75

### **3. Introdução**

Os hormônios da tireoide, conhecidos como Triiodotironina (T3) e Tetraiodotironina ou Tiroxina (T4), são importantes para o desenvolvimento e amadurecimento de órgãos nos diversos sistemas, desde o período embrionário até o pós-natal. Dentre os sistemas dependentes dos hormônios tireoidianos, o visual recebe grande destaque em nosso trabalho. A presença destes hormônios é importante para a diferenciação de células fotorreceptoras da retina.

O hipotireoidismo é uma das principais doenças da tireoide, ocorrendo em grande parte da população mundial e com alta prevalência no Brasil, sendo caracterizado pela redução dos níveis sanguíneos de hormônio T3 ou por redução de proteínas receptoras deste hormônio, o que inviabiliza o seu aproveitamento no organismo. Assim, com a diminuição do hormônio T3 existe a ocorrência de modificações na expressão das opsinas dos fotorreceptores do tipo cone, acarretando em alterações no funcionamento destas células.

Diante da abordagem do hipotireoidismo congênito, o nosso trabalho propôs investigar alterações visuais relacionados à patologia em questão utilizando modelo animal exposto ao metimazol para ocasionar o hipotireoidismo congênito. Dentre seu diversificado quadro de sinais e sintomas, os danos visuais são pouco avaliados por ferramentas eletrofisiológicas e testes comportamentais - como o eletrorretinograma e a psicofísica visual respectivamente. Para isso, nós investigamos o comportamento da resposta eletrofisiológica retiniana através do eletrorretinograma (ERG) e a visão de cores, pelo Cambridge Color Test, em camundongos acometidos de hipotireoidismo congênito pela exposição ao metimazol, visto que a síntese de hormônios tireoidianos é crucial para a diferenciação de fotorreceptores durante o desenvolvimento embrionário da retina.



### 3.1 A Tireoide e os Hormônios T3 e T4

A tireoide é uma glândula endócrina, caracterizada histologicamente por conter espaços esféricos limitados por epitélio cuboide formando os folículos tireoidianos, responsáveis por armazenar em seu interior uma proteína denominada tireoglobulina (Junqueira, & Carneiro, 2008). O desenvolvimento desta glândula, em humanos, se inicia aproximadamente na terceira semana de gestação e aproximadamente na sétima semana gestacional a tireoide já apresenta sua forma definida e se localiza em seu sítio final. Por volta da décima semana de gestação a tireoide já sintetiza e secreta seus hormônios (Mohebati, & Shaha, 2012; Rocha, Costa, Marçal, Moura, & Rodrigues, 2010; Moore, & Persaud, 2000; Fisher, 1997).

A tireoide sintetiza dois hormônios: o triiodotironina (T3) e o tetraiodotironina, conhecido também por tiroxina (T4) (Köhrle, 2000). O elemento iodo (I), consumido através de alimentos na forma de iodeto, é de grande importância para a produção destes hormônios tireoidianos (Dunn, 2001).

Na secreção dos hormônios da tireoide, o iodo reage com a tireoglobulina para a formação de monoiodotirosina (MIT) e diiodotirosina (DIT) (Medeiros-Neto *et al.*, 1996; Carvalho, Rosenthal, & Breitenbach, 1987). A etapa final consiste na união de dois resíduos de DIT, para formar a T4; e na formação de T3 acontece o acoplamento de um resíduo de MIT e um de DIT (Bernal, Guadano-Ferraz, & Morte, 2003; Dunn, & Dunn, 2001). Agora, já sintetizados, os hormônios T3 e T4 serão difundidos, entrando na corrente sanguínea (Kopp, 2005). Ao atingir as células alvo, o efeito geral dos hormônios tireoidianos é promover a transcrição gênica, por meio dos seus receptores nucleares, classificados como, TR $\alpha$  e TR $\beta$  (Flamant, & Samarut, 2003).

Diversos trabalhos investigaram as funções dos hormônios tireoidianos, e através de seus resultados, sabemos hoje que eles desempenham um papel fundamental no crescimento e

desenvolvimento de vários órgãos e tecidos, exibindo ação durante o período embrionário e no período pós-natal, já que alguns apresentam-se imaturos neste período, como o sistema nervoso central, no qual os hormônios tireoidianos atuam participando do crescimento e diferenciação neuronal (Farwell, & Braverman, 2006; Kok, Briet, & Van Wassenaer, 2001; Moura, Trentin, Lima, Gomes, Gonçalves, & Chamas, 1996, Moura *et al.*, 1996).

### 3.2 Fisiologia e morfologia da retina de roedores

A retina é um fino tecido nervoso, localizada no fundo do globo ocular, e composta por um conjunto de células nervosas que apresentam sensibilidade à luz. Sendo, este tecido, a primeira etapa no processo de captação e transformação do estímulo luminoso. As células retinianas estão organizadas em dez camadas dispostas de forma laminar, sendo bem conservada no decorrer do processo evolutivo dos vertebrados (Ahnelt & Kolb, 2000; Jacobs, 2001 e Kolb, 2004). Compreender sobre os diferentes tipos celulares e a estrutura do mosaico que compõe a retina, nos permite entender melhor as diferentes vias que um sinal gerado pode seguir, bem como a percepção visual de cada espécie.

As camadas que compõem a retina dos vertebrados, tomando como base a região mais externa do globo ocular são (Wässle & Boycott, 1991; Mey, 2000; Klassen *et al.*, 2004, Kolb, 2004):

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

2. A segunda camada é constituída pelo segmento externo das células fotorreceptoras, responsáveis pelo fenômeno da fototransdução.

3. A terceira camada é denominada de membrana limitante externa e separa o segmento externo dos fotorreceptores de seus corpos celulares.

4. A quarta camada recebe o nome de nuclear externa, e é formada pelos núcleos e corpos celulares dos fotorreceptores dos tipos cone e bastonete.

5. A quinta camada, denominada plexiforme externa, é o local onde ocorre a interação entre os axônios dos fotorreceptores e os dendritos dos interneurônios (como células bipolares e horizontais, por exemplo).

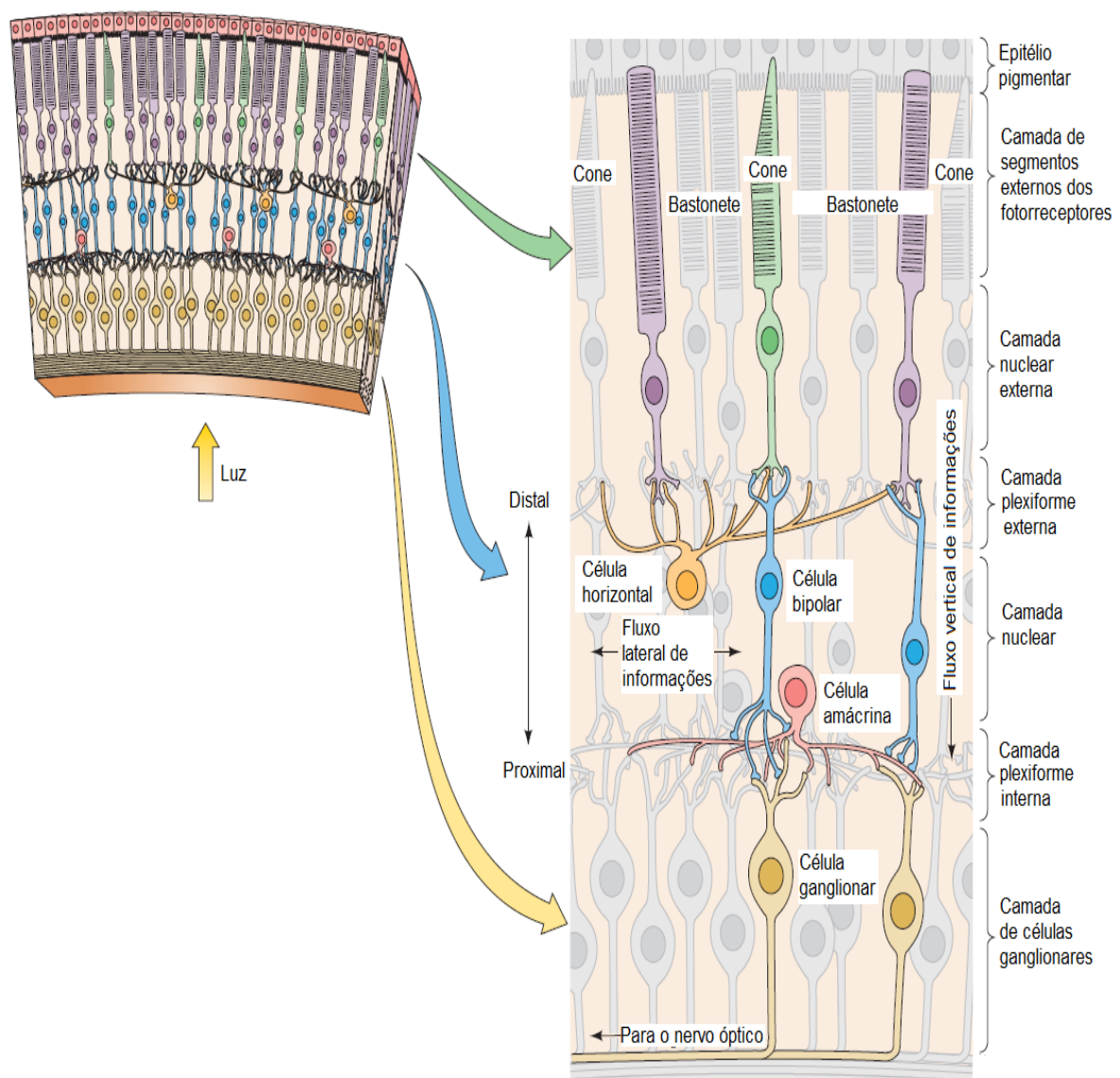
6. A sexta camada é a nuclear interna, que apresenta os corpos e núcleos dos neurônios de segunda ordem (ou interneurônios), que são as células bipolares, horizontais e amácrinas.

7. Segue-se a sétima camada, denominada plexiforme interna, que contempla o local das sinapses formadas pelos axônios dos interneurônios e os dendritos das células ganglionares.

8. A oitava camada, de células ganglionares, abriga os corpos celulares dessas células.

9. A nona camada, de fibras nervosas, é formada pelos axônios das células ganglionares, que darão origem ao nervo óptico. Este conduz as informações visuais captadas pela retina até o quiasma óptico, e daí até os centros superiores do processamento visual.

10. A décima, e última camada, é formada pela membrana limitante interna, formada pelas células de Muller, que têm como principal função a manutenção da forma da retina e o fornecimento dos substratos essenciais à manutenção dos neurônios.

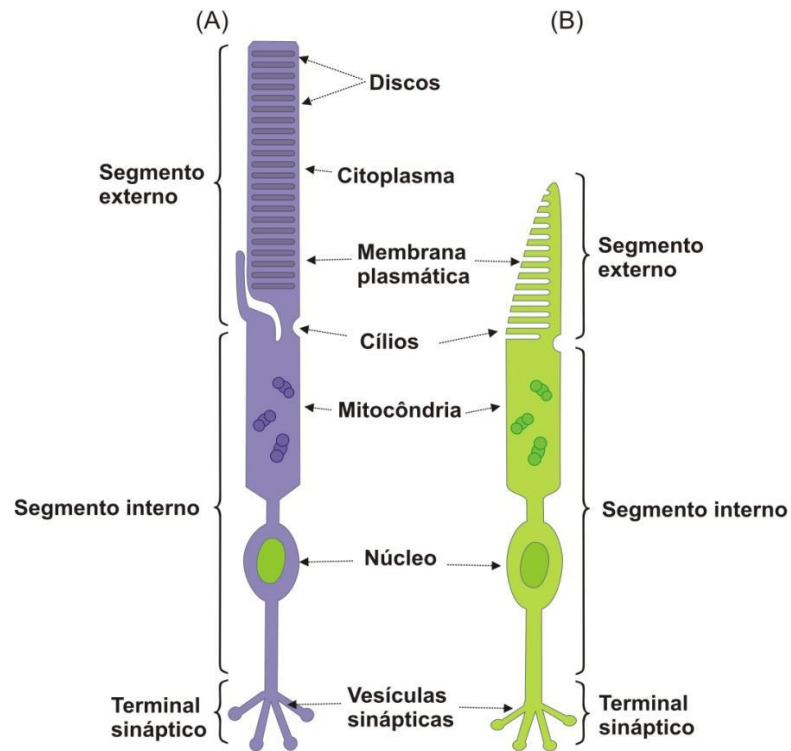


**Figura 1.**

Representação das camadas que compõem a organização laminar da retina de mamíferos, com suas respectivas células. Primeiramente encontra-se o epitélio pigmentar, formado por uma camada de células cuboides, seguida da camada de fotorreceptores onde estão presentes os segmentos externos dos cones e bastonetes, camada nuclear externa formada pelos corpos celulares dos fotorreceptores, camada plexiforme externa, constituída pelo segmento final dos fotorreceptores e dendritos dos neurônios de segunda ordem (células bipolares e horizontais), seguida pela camada nuclear interna, formada pelas células bipolares, horizontais e amácrinas, a camada seguinte constitui a camada plexiforme interna, seguida da camada de células ganglionares e camada de fibras nervosas. Fonte: Purves, 2004.

### 3.2.1 As células fotorreceptoras

O conjunto de células responsável pela fototransdução da energia luminosa em energia eletroquímica são os fotorreceptores. Esses tipos celulares podem ser classificados em duas categorias: os bastonetes e os cones (Figura 2), que são diferenciados pela sua morfologia, distribuição espacial, características bioquímicas e pela diferença na absorção do espectro de luz (Wässle & Boycott, 1991).



**Figura 2.** Diferenças morfológicas entre os fotorreceptores. (A) Estrutura do bastonete e (B) estrutura do cone. Fonte: Purves, 2004.

A morfologia dos fotorreceptores é bem característica, apresentando quatro regiões principais: 1) o segmento externo – que é formado por discos membranosos, sobrepostos e empacotados, apresentando proteínas responsáveis pela fototransdução, convertendo assim a energia luminosa em energia eletroquímica; 2) o segmento interno – que apresenta uma grande

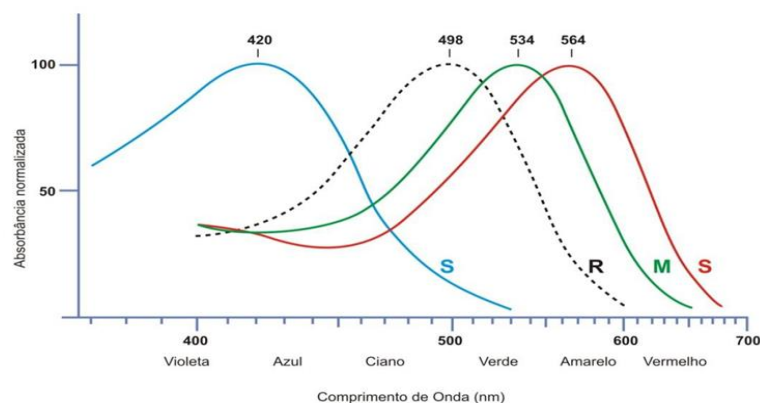
quantidade de organelas em seu interior, sendo responsável pela síntese e metabolismo de proteínas e pela produção de energia que será utilizada pela célula; 3) o pericário – que aloja o núcleo do fotorreceptor, situado na camada nuclear externa; 4) a terminação sináptica – situada logo abaixo do pericário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

Os fotorreceptores do tipo bastonete receberam essa denominação pela sua morfologia, sendo descritos com um formato de bastão ou cilindro no segmento externo. Funcionalmente, estas células apresentam alta sensibilidade a estímulos luminosos, atuando preferencialmente sob condições de baixa luminosidade (visão escotópica), porém com baixa acuidade visual, possuindo como fotopigmento a rodopsina. Já os cones, possuem um padrão morfológico cônico e alongado em seu segmento externo. São muito funcionais em ambiente com um maior índice de luminosidade (visão fotópica), porém com uma alta acuidade visual, estão relacionados ao detalhamento da imagem e a visão de cores, pois exibem sensibilidade a diferentes faixas espectrais, tendo como fotopigmento a opsina (Bowmaker & Hunt, 2006).

Neste contexto, gostaríamos de destacar o fenômeno da visão de cores, que é de extrema importância para a sobrevivência e obtenção de alimentos dos organismos que possuem essa propriedade, através de distintas proteínas que são estruturalmente modificadas quando ativadas por diferentes faixas do espectro luminoso, e que estão acopladas a um sistema nervoso capaz de processar constantemente os sinais captados, para processar as informações visuais captadas do ambiente. Os mamíferos apresentam a capacidade de colonizar uma gama de habitat, no qual o sistema visual apresenta-se como uma fonte importante de informações ambientais (Ahnelt & Kolb, 2000; Jacobs, 2001).

Na ocorrência da visão fotópica de vertebrados, a absorção da luz ocorre pelo fotopigmento dos cones, as opsinas. Os genes responsáveis pela formação deste grupo de proteínas pertencem a quatro famílias que especificam todos os pigmentos de cone de vertebrados, mas apenas duas destas famílias de genes estão expressas em mamíferos (SWS1 e LWS). Cada fotopigmento, por sua vez, foi classificado de acordo com sua resposta ao pico de sensibilidade espectral da luz em: ultravioleta (UV), comprimento de onda curto (S), comprimento de onda médio (M) e comprimento de onda longo (L) (Ahnelt & Kolb, 2000; Jacobs, 2001).

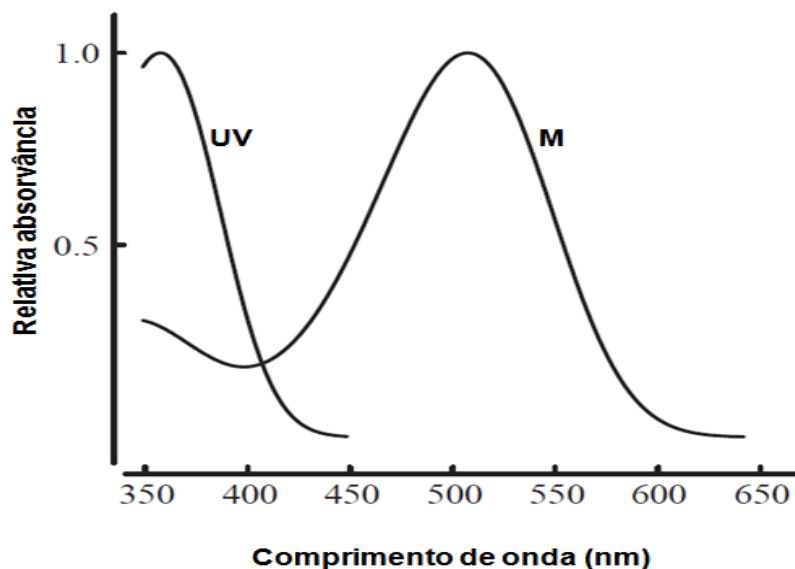
De forma geral, na retina de mamíferos são encontrados três tipos distintos de cones, que possuem sensibilidade a diferentes comprimentos de onda: curto, médio e longo. Cones S, sensíveis a comprimento de ondas curto, apresentam absorção de luz em comprimentos de onda situados na faixa de 420 nm (cones azuis); cones M, que demonstram sensibilidade a comprimento de ondas médio, na faixa de 531 nm (cones verdes); e de 558 nm para os cones L, para os comprimentos de onda longos (cones vermelhos) (Figura 8) (Wässle & Boycott, 1991; Kolb, 2004).



**Figura 3.**

Curva de sensibilidade espectral de cones e bastonetes de humanos. Bastonetes (R) e cones (S, M e L). Fonte: Adaptado de <http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Cone-response.png>, acesso em 20/11/2016.

No entanto, na retina de vários roedores, dentre eles o rato e o camundongo, encontramos apenas dois subtipos de fotorreceptores do tipo cone: os UV, com picos de sensibilidade espectral a 358 nm e os cones M, apresentando picos de sensibilidade em 510 nm (Figura 4). Estes animais apresentam visão dicromata, enquanto que humanos e primatas do velho mundo são tricromatas, pois apresentam três subtipos de cones (Szél e Rolich, 1992, Jacobs, 2001). Especialmente na retina de camundongos, foi observado que a distribuição topográfica de diferentes tipos espectrais de cones é bastante distinta. Na região superior da retina, os cones S e M/L distribuem-se em uma proporção de 1:10 semelhante ao encontrados nos demais mamíferos. Em contrapartida, na região inferior da retina foi surpreendentemente encontrado apenas a população de cones S, com total ausência de cones M/L (Szél e Rolich, 1992).



**Figura 4.**

Curva de sensibilidade espectral dos cones (UV e M) de ratos. (Fonte: modificado de JACOBS e colaboradores, 2001).



### 3.3 Os hormônios tireoidianos e o desenvolvimento do sistema visual

Os hormônios da tireoide são fundamentais no desenvolvimento do sistema nervoso central, principalmente as regiões que compõem o sistema visual, como as áreas corticais e a retina. Estas substâncias regulam a expressão de genes envolvidos principalmente com a mielinização de neurônios, migração, sinaptogênese e ramificação dendrítica além de diferenciação de células gliais e neuronais (Ambrogini *et al.*, 2005, Bernal, Guadano-Ferraz, & Morte, 2003, Bauer, London, Silverman, Rasgon, Kirchheiner, & Whybrow, 2003, Loosen, 1985). Para tanto, faz-se necessário que a expressão dos receptores tireoidianos em diferentes momentos nas células alvo, bem como a síntese e liberação destes hormônios, sejam altamente reguladas. Alguns trabalhos focaram em investigar a relação dos receptores dos hormônios da tireoide e os efeitos de suas funções nas estruturas celulares relacionadas á visão.

Lily Ng e colaboradores (2001) utilizaram camundongos transgênicos para o gene *Thrb*, responsável em codificar o receptor TR $\beta$ 2, e identificaram mudanças fenotípicas no desenvolvimento dos fotorreceptores, apresentando diminuição da subpopulação de cones M (responsáveis por respostas à comprimentos de ondas médios, na faixa espectral da luz verde, em torno de 500 nanômetros), com um aumento significativo de cones S (responsáveis por respostas à comprimentos de ondas curtos, na faixa da luz azul, em torno de 430 nm). Azadi, Zhang, Caffè, Holmqvist, e Vanveen (2002) descreveram que todos os receptores tireoidianos estão presentes durante o desenvolvimento e vida adulta na retina de roedores, e a presença do receptor TR $\beta$ 2 é essencial no desenvolvimento da visão de cores. Roberts, Srinivas, Forrest, Escobar, e Reh (2006), através de estudos *in vitro* e *in vivo* de células progenitoras retinianas de camundongos, demonstraram que a ativação deste receptor promove a diferenciação dos

fotorreceptores tipo cones, na retina. Pessoa e colaboradores (2008) observaram que a diferenciação dos cones UV e M depende da quantidade de hormônio da tireoide durante o desenvolvimento em camundongos.

### 3.4 O hipotireoidismo

A ocorrência na diminuição dos níveis de T3 e T4 no sangue do indivíduo é sinal da ocorrência de hipotireoidismo. Essa doença provoca uma série de alterações no organismo decorrente da carência dos hormônios tireoidianos (Devdhar, Ousman, & Burman, 2007).

O hipotireoidismo é a doença mais comum dentre as deficiências hormonais, e caracteriza-se pela diminuição dos níveis plasmáticos dos hormônios T3 e T4, ocasionando uma série de alterações no indivíduo, devido às diversas funções relacionadas a esses hormônios (Devdhar, *et al.* 2007). A sintomatologia e os sinais mais frequentes apresentados por indivíduos humanos com hipotireoidismo são: intolerância ao frio, ganho de peso, constipação, pele seca, bradicardia, rouquidão, retardamento do processamento mental e prejuízo visual. Também podem manifestar sintomas menos frequentes, dentre eles: hipotermia, insuficiência cardíaca congestiva, derrame pleural, coagulopatia e manifestações neurológicas (como exemplo: depressão, psicose, ataxia, convulsões, coma, déficit de memória e demência) (Burmeister, Ganguli, Dodge, Toczek, Dekosky, & Nebes, 2001, Heymann, 1992, Klein, 1990, Shafer, Prentiss, & Bond, 1984, Gold & Pottash, 1981).

Essa doença apresenta distintas classificações de acordo com os seguintes critérios: (i) o período de aquisição, sendo congênito ou adquirido; (ii) o nível da disfunção endócrina, sendo primário ou secundário; e (iii) sua gravidade, sendo evidente (quando apresentar sinais e sintomas clínicos) ou leve (quando for subclínico) (Roberts & Ladenson, 2004). Em nosso

trabalho destacamos o hipotireoidismo congênito (HC), modelo patológico que tem como efeito promover alterações visuais, e diante disso, merece maior atenção.

O hipotireoidismo do tipo congênito tem a sua causa associada com a deficiência de iodo endêmico (Delange, de Benoist, Pretell e Dunn, 2001), agenesia ou disgenesia da glândula tireoide e biossíntese de hormônio tireoidiano defeituoso (Gillam e Kopp, 2001). A disgenesia da tireoide tem sido associada à mutações nos genes PAX e nos fatores de transcrição de tireoide 1 (TTF1) e 2 (FOXE1).

Os defeitos na biossíntese dos hormônios da tireoide têm sido relacionados a mutações em genes que codificam a peroxidase da tireoide, o simporte de iodeto de sódio, a pendrina, a tireoide oxidase 2 e a tireoglobulina. A transmissão transplacentária de anticorpos inibidores do receptor anti-tirotropino de uma mãe com doença tireoidiana auto-imune para o seu feto também pode causar hipotireoidismo neonatal transitório (Weiss e Refetoff, 2000)

O tratamento contra o hipotireoidismo é realizado através da administração de levotiroxina sódica (tiroxina), que apresenta um alto grau de eficácia e poucas reações adversas (Toft, 1994). Em situações onde ocorrem desordens hormonais devido à presença de tumores, é feita a remoção do tumor na glândula tireoide (Maia *et al.*, 2007).

### 3.5 Modelo de hipotireoidismo congênito causado por metimazol

Recentemente, diversos trabalhos com o intuito de investigar distintos efeitos do hipotireoidismo em organismos, têm usados drogas que inibem a ação da tireoide na síntese de seus hormônios, acarretando o desenvolvimento de hipotireoidismo. As tionomidas são drogas frequentemente utilizadas no tratamento do hipertireoidismo como terapia primária, no preparo

do paciente para procedimento cirúrgico da tireoide, ou então antecipando a terapia com iodo radioativo. Nestes grupos de drogas antitiroideanas existem o metimazol (MMI), o carbimazol e o propiltiouracil, que constituem modernos modelos experimentais de indução ao hipotireoidismo (O'hare, Kim, Page, & Reid, 2015).

O metimazol é uma droga com atividade antitiroidiana que inibe a síntese dos hormônios T3 e T4 nas células foliculares da tireoide, impedindo a incorporação do iodeto na tiroglobulina (proteína precursora dos hormônios tireoideanos). Assim, o hipotireoidismo pode ser induzido através da administração de drogas, e o MMI tem sido amplamente utilizado como um modelo eficaz para indução do hipotireoidismo de maneira não invasiva. (O'hare *et al.*, 2015, Navarro *et al.*, 2015)

Cooper, Kieffer, Saxe, Mover, Maloof, e Ridgway (1984), analisaram a farmacologia do metimazol em ratos e demonstraram que a concentração de 0,05% na água ofertada “*ad libitum*” era suficiente para induzir o hipotireoidismo em uma semana e que a droga era muito mais eficiente em humano que nos ratos. Jerrard (1993) fez uso do metimazol em ratas grávidas para provocar o hipotireoidismo congênito em seus filhotes na tentativa de investigar uma janela de tratamento eficaz com uso de T4, e com isso, observou importantes ramificações dendríticas no hipocampo (uma área do cérebro diretamente associada na aprendizagem e na memória).

Além das técnicas farmacológicas que podem ser aplicadas para indução do hipotireoidismo congênito, isentas de cirurgias, as investigações dos danos visuais relacionados à doença também podem ser realizadas através de modernas técnicas não invasivas, como o eletrorretinograma (ERG) e testes de psicofísica visual.

### 3.6 A investigação de alterações visuais relacionadas ao hipotireoidismo congênito

#### 3.6.1 O eletrorretinograma de campo total (ERG campo total)

O eletrorretinograma (ERG) é o registro elétrico da retina em resposta a um estímulo luminoso, que gera estimulação simultânea em todo o campo visual, permitindo uma avaliação das células de toda retina. É usado como teste eletrofisiológico ocular não invasivo e compreende cinco protocolos padronizados (Marmor, Holder, Seeliger, & Yamamoto, 2004):

1. Resposta devido à função dos bastonetes no olho adaptado ao escuro;
2. Resposta devido a bastonetes e cones (resposta máxima) no olho adaptado ao escuro;
3. Resposta devido à função dos cones no olho adaptado ao claro;
4. Potenciais oscilatórios, devidos à atividade das camadas mais internas da retina;
5. Respostas provocadas por estímulos periódicos de alta frequência (*flicker*).

A distinção das respostas eletrofisiológicas dos fotorreceptores no ERG foi realizada por Brown e Watanabe (1962), os quais isolaram a onda-a a partir do clampeamento da artéria retiniana central em macacos, procedimento que provoca redução da disponibilidade de oxigênio (anóxia) nas células da retina interna (como exemplos, células bipolares, horizontais, amácrinas e ganglionares). O clampeamento da artéria central não afeta as células fotorreceptoras, que são nutridas via circulação coroidal; dessa maneira atribuiu-se o surgimento da onda-a a atividade dos fotorreceptores. A onda-a (Figura 5) é uma onda negativa que surge logo após o estímulo. Sua ocorrência é atribuída à hiperpolarização dos fotorreceptores que ocorrem após a estimulação luminosa. A onda-b (Figura 5) é o componente mais sensível do ERG, e resulta da atividade de células bipolares tipo-ON e células de Muller. A onda-b resulta da liberação de íons potássio ( $K^+$ ) na camada plexiforme externa pelas células bipolares na presença da luz e a captação do íon  $K^+$  pelas células de Muller (Miller, & Downling, 1970).

Já a onda-b é um componente positivo observado nos registros de resposta de bastonetes, na resposta máxima e nas respostas fotópicas, e é atribuída à despolarização das células bipolares e das células de Müller que se seguem à hiperpolarização dos fotorreceptores provocada pela incidência de luz sobre a retina (Brown, 1969).

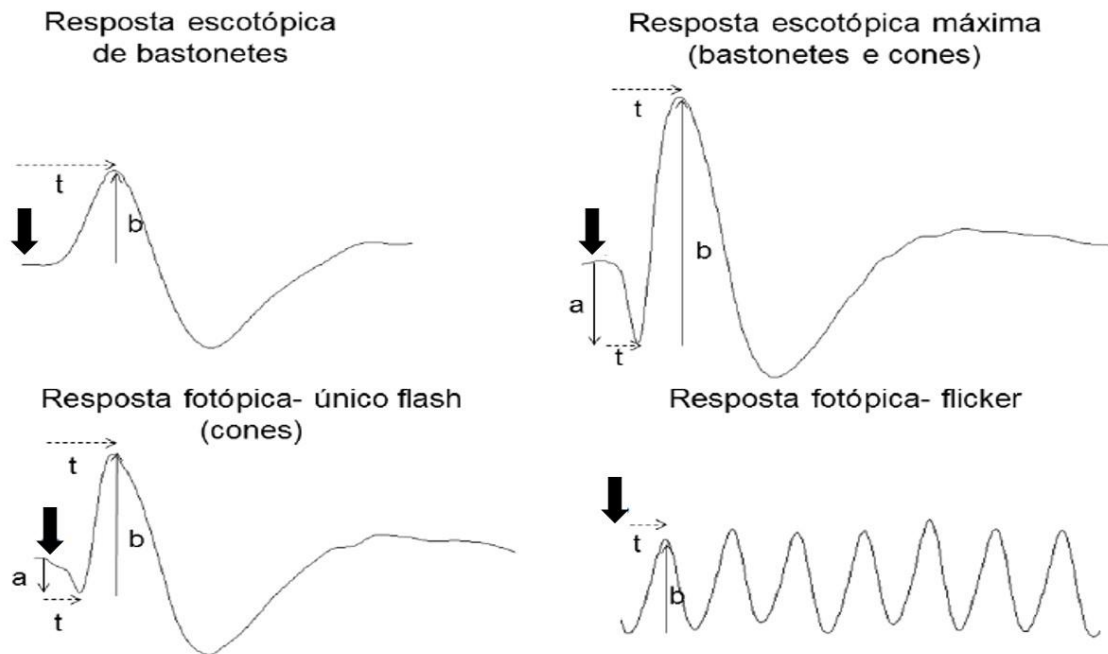


Figura 5

Imagem de eletrorretinogramas em resposta a diferentes estímulos luminosos. As setas largas indicam o momento do início do estímulo; as setas estreitas representam as amplitudes das ondas a e b e as setas tracejadas representam o tempo implícito das ondas a e b, conforme o modelo padrão da ISCEV.

A vantagem de usar o ERG para obtenção de registros da retina em indivíduos acometidos pelo hipotireoidismo congênito é que se trata de uma técnica não invasiva de registro, ou seja, não é necessário o sacrifício de animais nem intervenções cirúrgicas para o registro.

### 3.6.2 O eletrorretinograma na investigação de alterações visuais

Alguns trabalhos fizeram uso de técnicas de eletrofisiologia, com o intuito de estudar alterações visuais relacionadas aos quadros de hipotireoidismo, pois é um procedimento não invasivo, com pouco incômodo ao organismo investigado e muito bem aceito pela comunidade científica.

Holdew & Condon (1989) realizaram ERG e potencial cortical evocado (VEP) em indivíduos que apresentavam hipotireoidismo idiopático, e verificaram aumento no tempo implícito das respostas, o qual foi revertido em indivíduos tratados com tiroxina. Lily Ng e colaboradores (2001) realizaram eletrorretinograma (ERG) em camundongos transgênicos para o gene *Thrb*, responsável em codificar o receptor TR $\beta$ 2, que está envolvido no desenvolvimento de cones M, e verificaram diminuição na amplitude da *onda-b*, quando comparadas com camundongos do tipo selvagem. Pessoa e colaboradores (2008), também utilizaram ERG, em ratos transgênicos para o receptor de hormônios da tireoide (TR $\beta$ ) e observaram que a sensibilidade espectral medidas a partir dos ERGs apresentavam respostas somente aos comprimentos de onda curtos do espectro, além de não ter sido detectadas atividades de cones M nestas funções de sensibilidade espectral. Essa observação evidencia a necessidade da integridade dos receptores tireoidianos, principalmente o TR $\beta$ , para apresentar a integridade da resposta eletrofisiológica da retina.

### 3.6.3 A psicofísica na investigação de alterações visuais

Os testes psicofísicos são comumente usados na avaliação do comportamento visual, pois estes quantificam a resposta dada pelo sujeito frente a um estímulo físico pré-estabelecido e esta resposta, por sua vez, depende do processamento e integração das informações recebidas pelo sujeito. Os diferentes tipos de testes usados na avaliação psicofísica da visão de cores

podem ser separados em três classes: testes de pranchas, testes de ordenamento e anomaloscópio (Pokorny, Smith, Varriest, & Pinkers, 1979).

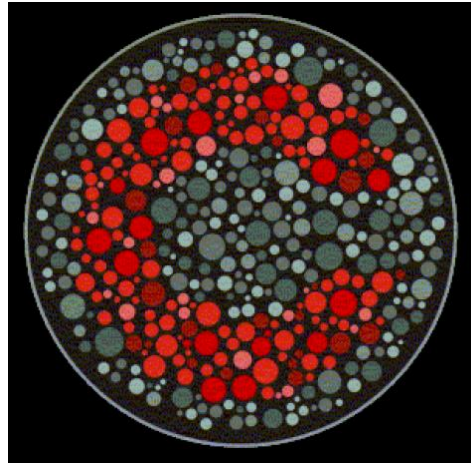
Para Jacobs (1984), a aplicação de testes psicofísicos para visão de cores, que envolvem o comportamento operante, foi frequente em estudos com mamíferos usando um aparelho no qual os painéis de estímulo eram transiluminados por um sistema óptico. Isto foi feito através de combinações para determinar a sensibilidade de um animal a vários estímulos espectrais e testar uma gama de variações de luminância para cada par de luzes de teste e, dessa maneira, determinar se o animal poderia fazer uma discriminação com base em diferenças de comprimento de onda (Jacobs, Neitz, & Deegan, 1991).

Atualmente, muitos testes de discriminação de cores podem ser aplicados através do uso de testes computacionais, como o *Cambridge Colour Test* (CCT).

#### 3.6.4 O *Cambridge Colour Test* (CCT)

O *Cambridge Colour Test* (CCT) é um teste psicofísico, computadorizado, utilizado para a discriminação de cores e desenvolvido por Mollon-Reffin (Mollon & Regan, 2000, Mollon & Reffin, 1989). Consiste na apresentação, a intervalos regulares de tempo, de estímulos coloridos na forma do C de *Landolt* em um monitor de vídeo. O estímulo é formado por círculos de tamanhos diferentes, distribuídos aleatoriamente e com luminância variável. Esta configuração, ruído de luminância mais ruído de forma, impede que o brilho e o contorno sejam usados como dicas para a tarefa de discriminação. A posição do estímulo muda a cada nova apresentação (C com abertura à direita, esquerda, para cima ou para baixo).





*Figura 6.*

Exemplo do estímulo apresentado originalmente pelo *Cambridge Colour Test* para discriminação cromática.

O sujeito submetido ao CCT informa suas respostas obedecendo a um método de escolha forçada com quatro alternativas (*4 Alternative Forced Choice, 4AFC*), já que a cada apresentação, a figura tem quatro posições possíveis e o sujeito deve escolher uma delas.

Mancuso, Neitz, e Neitz (2006) propuseram modificações do *Cambridge Colour Test* para aplica-lo em modelos animais, onde os estímulos eram semelhantes às placas de um teste pseudoisocromático tradicional, porém, eram apresentados em um monitor tradicional de Tubos de Raios Catódicos (CRT-). Na nova versão, a mudança mais expressiva é o alvo, que deixa de ser o C de *Landolt*, e passa a ser apresentado como um “quadrado”. O trabalho de Goulart, Bonci, Galvão, Silveira, e Ventura (2013) avaliou a eficiência da versão adaptada do teste de Mollon-Reffin para a investigação comportamental da visão de cores em macacos-prego (*Sapajus spp.*), e observou que a diferença de fenótipos observados confirma a eficácia do teste de *Mollon-Reffin* como uma ferramenta útil para avaliar a discriminação de cores em primatas não humanos, podendo ser abrangente para o uso de outros animais não primatas.

Em nosso trabalho, o CCT foi a inspiração para a utilização do software PCR que produz estímulos pseudoisocromáticos, porém, com arranjos de estímulos e métodos de apresentação diferentes, sendo estes apresentados em alvos semelhantes à forma de um quadrado.

É importante frisar que nosso trabalho visou atingir a etapa dos testes de discriminação, porém os dados relatados para este item ainda são preliminares.

## 4. Objetivos

### 4.1. Objetivo Geral

Este trabalho tem por objetivo identificar a existência de deficiências visuais na fisiologia retiniana, incluindo a visão de cores, através do eletrorretinograma e a percepção da visão de cores do animal em testes psicofísicos, em camundongos acometidos de hipotireoidismo congênito provocado pela exposição ao Metimazol.

### 4.2. Objetivos Específicos

- Testar o modelo de hipotireoidismo congênito em camundongos através de metimazol, como viabilidade para estudos de alterações na função visual;
- Estudar o padrão das respostas eletrofisiológicas na retina de camundongos com hipotireoidismo congênito causado pelo metimazol através de eletrorretinograma;
- Investigar os padrões de respostas aos testes psicofísicos para avaliar a discriminação cromática através de testes psicofísicos visuais
- Avaliar a eficácia das adaptações ocorridas na caixa de condicionamento operante.

## 5. Métodos

## 5.1 Os sujeitos

Os sujeitos participantes dos procedimentos de investigação foram camundongos albinos da espécie *Mus musculus*, conhecido popularmente como suíço, obtidos do biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.

Os camundongos foram mantidos em gaiolas plásticas, medindo 41x34x16 cm, sendo distribuídos em grupos de até 5 indivíduos, sob condições de controle de temperatura e um ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à água e ração.

O projeto de pesquisa que norteou este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.

### 5.1.1 Os grupos experimentais

Os sujeitos submetidos aos procedimentos de eletrorretinograma e teste psicofísico para visão de cores foram separados em dois grupos.

O grupo experimental foi composto por filhotes (n=6) de camundongos obtidos de 2 (duas) fêmeas submetidas ao tratamento com Metimazol durante a gestação para o desenvolvimento do quadro de hipotireoidismo congênito. Nessas condições, os animais foram submetidos aos testes eletrofisiológicos aos 60 dias de vida. Este grupo é indicado em nosso trabalho pela sigla HC-MMI (Hipotireoidismo Congênito – Metimazol).

O grupo controle foi constituído por sujeitos (n=6) nascidos de 2 (duas) fêmeas que não receberam Metimazol durante a gestação, e também foram submetidos aos testes eletrofisiológicos aos 60 dias.

Para os procedimentos dos testes psicofísicos, os animais dos dois grupos iniciaram as etapas de treino aos 45 dias.

## 5.2 A indução do hipotireoidismo congênito

Com o objetivo de gerar filhotes com hipotireoidismo congênito, duas (2) fêmeas de camundongo suíço grávidas, foram alojadas individualmente com ração e água à vontade, mantidas à temperatura de 23° C sob ciclos de 12 horas de claro-escuro.

O metimazol foi administrado nestas fêmeas através da ingestão de água potável, em uma concentração de 0,025% entre o 14° ou 16° dia gestacional (E14 ou E16) até o 25° dia após o nascimento.

O controle do período gestacional foi realizado através da observação do tampão vaginal, análise anatômica do corpo e observação do comportamento das fêmeas prenhas. Assim que a característica do tampão vaginal foi confirmada, consideramos primeiro dia de gestação (E1).

### 5.3 A mensuração de massa corporal e comprimento

Os animais constituintes dos dois grupos estudados foram pesados com auxílio de uma balança, e tiveram seus comprimentos medidos com uso de fita métrica. Todos os dois procedimentos ocorreram momentos que antecederam os testes eletrorretinográficos, quando alcançaram 60 dias de vida.

### 5.4 A dosagem de hormônios tiroidianos no sangue

Para confirmação do quadro de hipotireoidismo nos camundongos estudados, totalizando os 60 dias de nascimento, os animais tiveram amostras de seus sangues coletadas em tubos de ensaio, que foram mantidos sob refrigeração e encaminhado para o laboratório de análises clínicas. Os níveis séricos de T3 são dosados pelo método de quimiluminescência. Os resultados aceitos em nosso trabalho apresentaram concentração sanguínea de T3 inferior a 1 mg/dl, nível esse aceito pela literatura para evidenciar o quadro de hipotireoidismo experimental em ratos e camundongos.

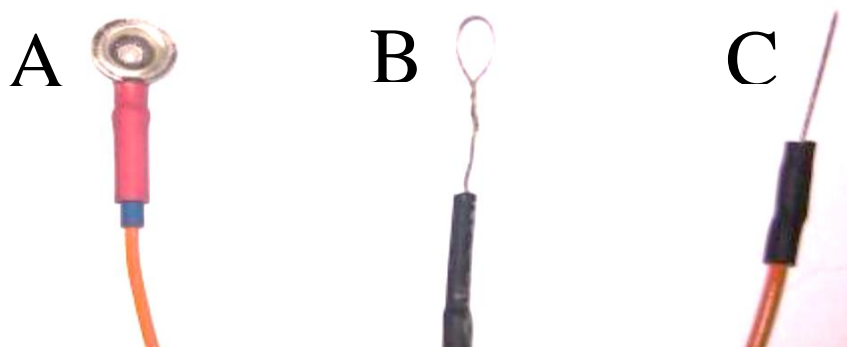
### 5.5 A medida eletrofisiológica da visão de cores em camundongos com hipotireoidismo congênito através do eletrorretinograma de campo total (ERG campo total)

#### 5.5.1 Preparação do sujeito para o ensaio eletrofisiológico

Inicialmente, os animais foram anestesiados através da administração de uma injeção intraperitoneal utilizando a associação Cetamina 10% (50mg/kg) e Xilazina (5 mg/kg) 2%, numa proporção de 3:1. Após observar a ausência de reflexos, os animais foram posicionados na gaiola de *Faraday* e colocados para anestesia monocular: cloridrato de proximetacaína 0,5 % (anestesia local); tropicamida 1 % (dilatação pupilar) e metil-celulose 2 %.

Em seguida ao procedimento inicial, um eletrodo terra (com formato de uma cúpula) foi posicionado, instalando-o na região interna do lóbulo da orelha do animal, após escarificação (esfoliação) local para retirada de pelos presentes, resíduos de fluidos corporais, diminuindo possíveis interferências. Para tal procedimento, foi utilizada uma pasta escarificadora (NuPrep, D.O.WEAVER). Para fixação do eletrodo terra, foi utilizada uma pasta eletrolítica (Tem 20 D.O. Weaver), que auxilia na captação dos sinais elétricos.

O eletrodo referência, em forma de agulha, foi instalado na região subpalpebral, no qual sua extremidade será posicionada adjacente à córnea. Finalmente, o eletrodo registro, constituído com uma adaptação com DTL (Downson, Trick e Litzkow), que consiste num fio de prata, que posicionado sobre a retina é capaz de captar os sinais provenientes da mesma. A figura 7 exemplifica a estrutura de cada eletrodo citado.



*Figura 7.*

Fotografia dos três tipos de eletrodos utilizados nos procedimentos eletrofisiológicos: (A) terra, (B) registro e (C) referência. Fonte: Acervo pessoal.

### 5.5.2 Registro eletrofisiológico

Os registros do eletrorretinograma de campo total foram realizados em diferentes condições de adaptação, sendo possível isolar ou combinar respostas de diferentes tipos celulares (cones ou bastonetes), das quais obtivemos respostas, por meio da manipulação da intensidade da luz e o nível de adaptação do animal (adaptado ao claro ou escuro), para obtenção de registros fotópicos e escotópicos.

Para que as medições fossem realizadas na condição escotópica (baixa luminosidade), foi necessário realizar a adaptação do animal por pelo menos 14h em ambiente sem nenhum tipo de iluminação. Após esse período, foram apresentados estímulos luminosos (flashes) com filtros de densidade neutra, reduzindo a intensidade luminosa em 1,5 e outro em 2,0 unidades log, em seguida filtros de densidade máxima e mínima, para obtenção de resposta escotópica mista de cones e bastonetes.

Na condição fotópica (presença de luz), o animal foi adaptado durante 10 minutos em ambiente com alta luminosidade (após os procedimentos escotópicos) para anular a participação dos bastonetes. Durante os testes foram utilizados flashes com intensidade de 30 cd/m<sup>2</sup>.

### 5.5.3 Equipamentos para Eletrofisiologia

Para a apresentação dos estímulos luminosos foi utilizado um fotoestimulador modelo PS33-PLUS, posicionado a 30 cm do animal.

A captação do registro foi realizada com um amplificador diferencial de alta impedância de entrada AC (Grass Technologies modelo P511), ajustado com filtragem de 0,3 Hertz (Hz) (passa alta) e 300 Hertz (passa baixa). Os registros foram monitorados por um osciloscópio (Protek, modelo 6510) e continuamente digitalizados numa faixa de 1 KHz, por um computador

com uma placa de aquisição de dados A/D (National Instruments, Austin, TX). O software utilizado para os registros das respostas do ERG é o Labview 3.0 (National Instruments, Austin, TX). A figura 9 apresenta o a disposição dos equipamentos referenciados.

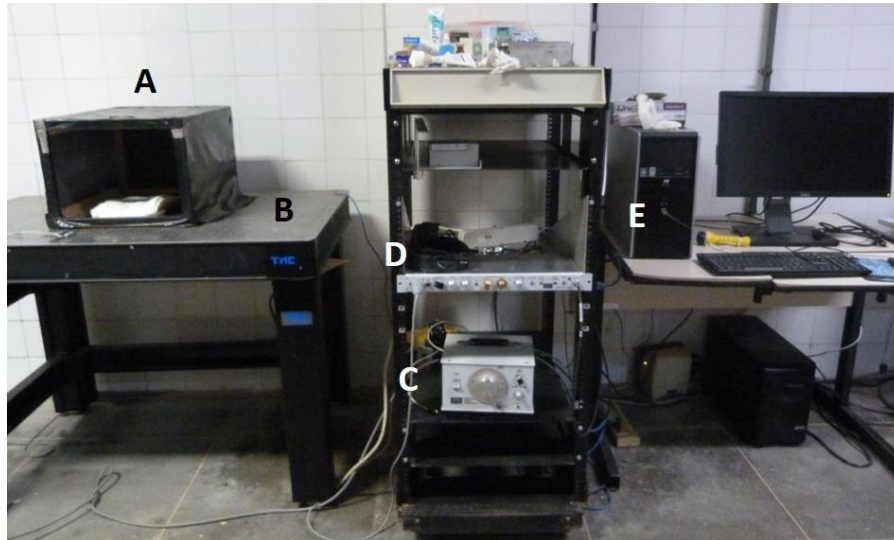


Figura 8.

Fotografia da disposição dos equipamentos utilizados em eletrorretinograma. (A) Gaiola de Faraday, (B) mesa antivibratória, (C) estimulador, (D) amplificador e (E) computador. Fonte: Acervo pessoal.

#### 5.5.4 Mensuração dos componentes do ERG de campo total

Os parâmetros do ERG de campo total que foram mensurados são o tempo implícito e a amplitude da *onda-a* e *onda-b*, descritas da seguinte maneira:

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



- d) Amplitude da *onda b*: é medida pico a pico, corresponde à distância entre o pico da *onda a* (negativa) e o pico da *onda b* (positiva), expressa em  $\mu\text{V}$ ;

Para registros de respostas de flicker:

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

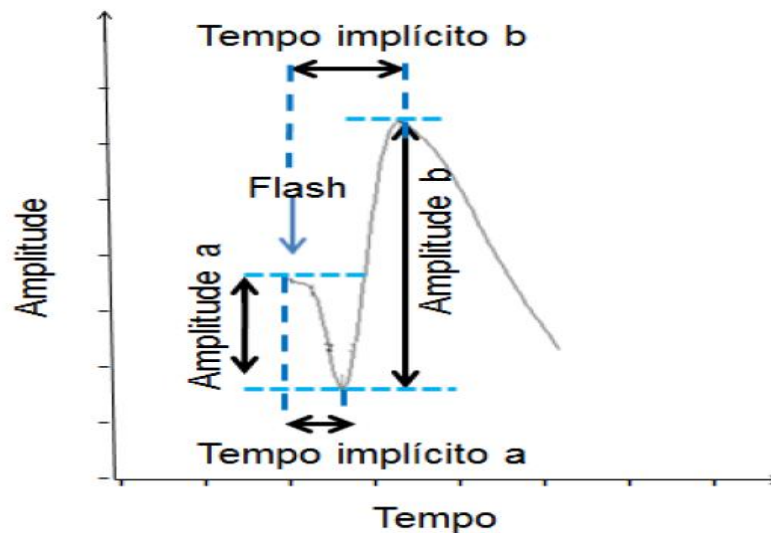


Figura 9.

Parâmetros do ERG de campo total analisados. A amplitude da onda-a medida a partir da linha de base até o pico máximo da onda-a. A amplitude da onda-b medida a partir do pico máximo da onda-a ao pico máximo da onda-b. O tempo implícito de ambas as ondas determinado do início do estímulo ao pico máximo de cada onda.

### 5.5.5 Protocolos do Eletroretinograma de Campo Total

O protocolo utilizado foi uma modificação do protocolo proposto pela *International Society for Clinical Electrophysiology of Vision* (ISCEV), baseado em pesquisas anteriores

realizadas com animais que também se utilizaram deste protocolo (Rodrigues, 2012, Costa, 2013 e Guimarães, 2014)

O protocolo seguido no experimento consta das seguintes etapas:

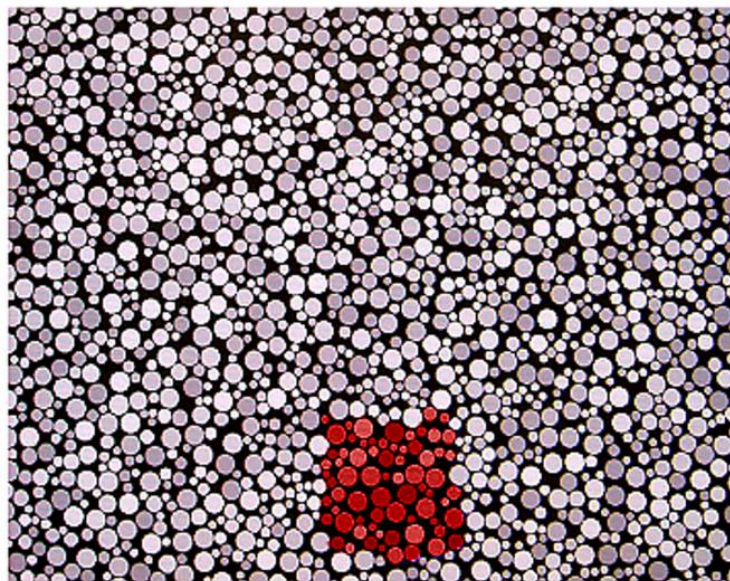
- 1) Estímulos com filtro de densidade neutra com duração de 10 ms por um período de dois minutos para as respostas escotópica de bastonete;
- 2) Estímulos com filtro de densidade máxima com duração de 10 ms por um período de dois minutos para as resposta mista 1, de cones e bastonetes;
- 3) Estímulos com filtro de densidade mínima com duração de 10 ms por um período de dois minutos para as resposta mista 2, de cones e bastonetes;
- 4) Em seguida, foi avaliada a resposta fotópica, realizando-se a adaptação do animal por aproximadamente 10 minutos, de acordo com as seguintes etapas:
  - a) Estímulo com flash único com duração de 10 ms por um período de um minuto;
  - b) Estímulo com flash único com duração de 10 ms por um período de um minuto, com a utilização de filtros de luz (verde e azul);
  - c) Estímulos de *flicker* com 12, 18, 24 e 30 Hz de flashes com duração de 10 ms, por um período de 15s.

## 5.6 Medida Psicofísica da Visão de Cores em Camundongos com Hipotireoidismo Congênito

Para a investigação comportamental da visão de cores dos camundongos com hipotireoidismo congênito nós utilizamos um *software* inspirado no *Cambridge Colour Test* (desenvolvido por Marcio L. Bandeira, Paulo R. K. Goulart, Nestor N. Oiwa, Marcelo F. Costa

e Dora F. Ventura, 2008), adaptado para o uso sem instruções em crianças e em primatas não humanos (Goulart *et al.*, 2008; Goulart *et al.* 2013).

A preparação para os testes psicofísicos consistiu em um treino discriminativo em uma câmara de condicionamento operante, no qual a resposta de pressão à barra (RPB) foi reforçada diferencialmente na presença de contraste cromático entre alvo e fundo em estímulos pseudoisocromáticos, como apresentado na figura a seguir.



*Figura 10.*

Exemplo de disposição de estímulo cromático adotado. A área de aproximadamente quadrado com um matiz diferente do fundo é o alvo. (Goulart *et al.*, 2013)

Os matizes de treino foram escolhidos de forma a não coincidir com as linhas de confusão previstas para camundongos. Os testes consistiram na introdução de tentativas de teste, totalizando 8 novos matizes, incluindo matizes localizados em potenciais linhas de confusão dicromata.

### 5.6.1 Equipamento

Os testes comportamentais para correlação com os dados fisiológicos para visão de cores foram realizados em uma câmara de condicionamento operante (caixa de Skinner), adaptada para camundongos, associada a um monitor *Catodic Ray Tube* (CRT) Diamond Pro 2070SB (*Mitsubishi*, Cypress, USA) no qual foram apresentados os estímulos cromáticos.

A caixa de condicionamento operante foi modificada para trabalhos realizados com camundongos, tendo sua barra rebaixada em 06 cm com uma placa de alumínio, para facilitar a resposta pressão à barra e o imediato reforço. A área da caixa foi reduzida para aproximadamente 50% do tamanho original, com o propósito de diminuir o deslocamento do animal. O coletor de água também sofreu modificação, tendo a sua estrutura de coleta, que tem aspecto de concha, reduzida para fornecer um volume de aproximadamente 6 microlitros de água. Na porta de acrílico frontal, nós acoplamos o monitor a uma distância de aproximadamente 10 cm em relação à barra, que foi usado para apresentar os estímulos gerados através do *Cambridge Color Test*. A figura 11 apresenta o arranjo espacial da caixa, com as devidas modificações.

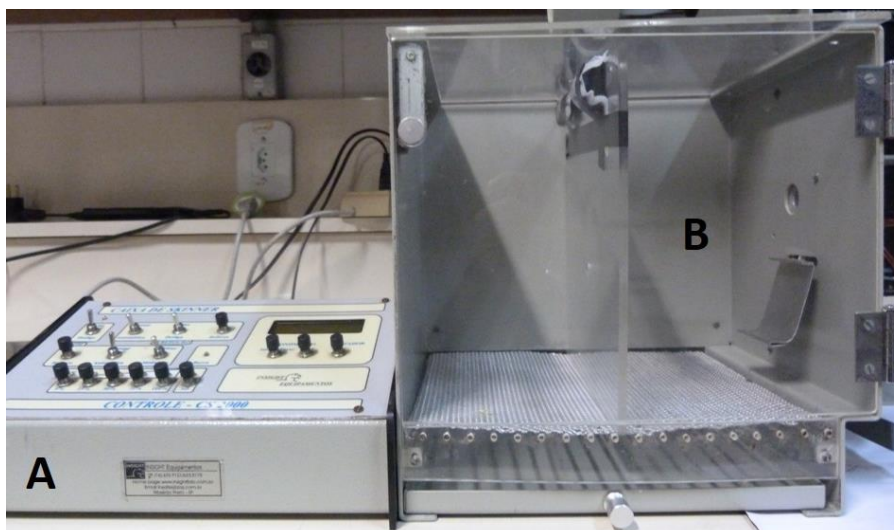


Figura 11.

Fotografia apresentando a caixa de condicionamento operante (caixa de Skinner) e as devidas modificações adotadas neste trabalho. (A) Caixa de controle dos comandos e (B) a caixa com a área de reduzida e o alongamento da barra com uma placa de alumínio. Fonte: Acervo pessoal.

Para o controle dos parâmetros experimentais, utilizamos um software inspirado no *Cambridge Colour Test*, em linguagem *Object Pascal (Borland's Delphi 7.0)*. A geração e controle dos arranjos de estímulo será feita por meio do sistema *ViSaGe (Cambridge Research Systems, Rochester, UK)*, que permite resolução de cor de 16-bits e controle de luminância. As tentativas foram apresentadas através do monitor CRT de alto desempenho. O monitor foi mantido calibrado por meio do fotômetro *ColorCAL (Minolta, Osaka, Japão)* usando a rotina padrão de calibração da biblioteca *VSG Desktop (versão 8)*.

### 5.6.2 Os Estímulos

O arranjo de estímulos consistiu de um mosaico de círculos de tamanho e luminância variáveis, apresentados sobre um fundo preto. A luminância de cada círculo variou de forma

randômica de tentativa para tentativa, podendo assumir qualquer um de seus valores entre 8 cd/m<sup>2</sup> e 18 cd/m<sup>2</sup>.

Um subconjunto de círculos definido com um matiz diferente dos demais círculos constitui um alvo. A luminância média do alvo e do fundo foi mantida constante, de maneira que a única variável relevante para a resolução da tarefa fosse a diferença cromática entre ambos.

A cromaticidade do alvo foi modificada de uma tentativa para outra. A principal modificação em relação ao teste original foi o alvo, que originalmente consiste de um C de Landolt e, com a modificação, foi alterado para uma área colorida definida com a forma aproximada de um quadrado de lado 5cm (Figura 10). O alvo apareceu em uma posição central fixa na tela, sem variações em relação ao fundo, de uma tentativa para a outra.

Os matizes do alvo e do fundo foram definidos em termos de coordenadas do diagrama de cromaticidade da *Comission Internationale de l'Eclairage* (CIE) 1976 u'v'. Os limites da gama de cores (gamut) do monitor serão u'= 0,416; v'= 0,522 (fósforo vermelho); u'=0,117; v'=0,559 (fósforo verde); u'=0,159; v'=0,177 (fósforo azul). O arranjo mudava dinamicamente de uma tentativa para outra, com o matiz do alvo variando tanto entre os eixos de variação cromática (que correspondem à linha que liga as coordenadas do fundo às coordenadas do alvo) quanto dentro deles, com a excursão ao longo de cada eixo variando entre 0,110 e 0,002 unidades u'v'.

### 5.6.3 Preparo do animal

Para a avaliação do desempenho visual dos camundongos através do teste psicofísico, os animais do grupo de hipotiroidismo congênito (HC-MMI) e os controles foram privados da

ingestão de água por 24 horas antecedentes aos procedimentos, sendo este o fator de reforçamento.

Os animais iniciaram os procedimentos de treino ao bebedouro (1ª etapa) com 45 dias de vida.

#### 5.6.4 Procedimento geral

Com o propósito de observarmos o efeito do treino discriminativo, precisávamos que o animal respondesse intensamente. O reforço contínuo de cada resposta (CRF) não produz uma taxa elevada de respostas, sendo assim, foi necessário reforçar intermitentemente. Porém, o reforço intermitente logo de início é ineficaz. Por esse motivo, a modelagem iniciou em CRF e o treino seguiu em esquema intermitente, com Intervalo Fixo (FI), e começando a partir do momento em que o animal estabilizar o desempenho desejado. Os intervalos iniciaram em valores mais baixos, e foram ampliados progressivamente, o que justifica mais um momento de treino.

O treino discriminativo consistiu em reforçar a resposta de pressão à barra quando o estímulo cromático estivesse em vigor, e não reforçar quando o fundo acromático fosse apresentado. Essa alternância é denominada de esquema múltiplo.

As sessões experimentais foram realizadas diariamente, cinco dias por semana, sendo que cada sessão de coleta de dados teve duração máxima de 10 minutos. Como protocolo de preparação para os testes, os animais foram submetidos à seguinte sequência de procedimentos: modelagem da resposta de pressão à barra (Fase 1), treino em esquema de reforçamento intermitente (Fase 2) e treino discriminativo com estímulos cromáticos (Fases 3 e 4). Quando o desempenho estiver estável, os sujeitos seriam submetidos aos testes com novos matizes (Fase 5).

### Fase 1 – Modelagem de Pressão à Barra e Reforçamento Contínuo (CRF)

Os sujeitos passaram por um treino preliminar que consistiu de uma sessão de modelagem, na qual a resposta de pressionar a barra (RPB) fosse reforçada diferencialmente por aproximações sucessivas com a liberação de uma gotícula de água para o animal. Instalada a resposta, os sujeitos foram expostos a três sessões de CRF, com 60 reforçadores cada, objetivando fortalecer a resposta anteriormente modelada. A apresentação do estímulo cromático diante da caixa de comportamento operante pelo monitor permanecia presente no decorrer de todas as sessões dessa fase.

### Fase 2 – Treino do Responder sob Esquema de Intervalo Fixo (FI)

Nessa segunda fase, foi realizada uma sessão de 10 minutos em esquema FI 4 s, uma sessão de 10 min de FI 8s e, finalmente, duas sessões de 10 min cada de FI 10 s. A apresentação do estímulo cromático diante da caixa de comportamento operante pelo monitor permaneceu presente no decorrer de todas as sessões dessa fase.

### Fase 3 – Treino Discriminativo em Esquema Múltiplo

Na terceira fase, para colocar as respostas de pressão à barra sob controle discriminativo, os animais foram expostos a um esquema múltiplo FI 10s e extinção (EXT) com componentes de 30 segundos.

Durante o componente de FI 10s, o estímulo cromático (S+) era apresentado e, durante o componente de extinção, o fundo acromático era exibido (S-). Cada um dos componentes foi apresentado 15 vezes por sessão, constituindo sessões de 10 min de duração. A ordem de apresentação dos componentes foi semi-randômica, com repetição de cada componente em, no máximo, duas vezes consecutivas (ou seja, 2 minutos no mesmo componente).



Esta fase foi encerrada quando o sujeito atingiu três sessões consecutivas em que o Índice Discriminativo ( $ID = \text{razão entre a taxa de respostas em S+ e a taxa total de respostas}$ ) foi maior ou igual a 80% em cada sessão.

#### Fase 4 - Treino com múltiplos matizes

Na penúltima fase, seriam mantidas as condições gerais da fase anterior, com a diferença de que, em cada sessão, cinco matizes distintos seriam apresentados como estímulo cromático durante os componentes de FI. Cada matiz seria apresentada quatro vezes por sessão, aleatoriamente. O critério de encerramento dessa fase seria de duas sessões consecutivas com ID maior ou igual a 80% por sessão, com taxas de resposta equitativas em todos os matizes.

#### Fase 5 - Testes de discriminação de cores

Na última fase, seriam mantidas as condições gerais das fases 3 e 4, com a inclusão de oito matizes de teste compondo o conjunto de estímulos cromáticos. Seriam realizadas duas sessões de teste, cada uma apresentando quatro matizes teste. Cada matiz teste apareceria quatro vezes por sessão, totalizando 16 componentes de FI com novos matizes.

Como é esperado que o sujeito seja incapaz de discriminar uma parcela dos matizes de teste, nas sessões dessa fase o número de componentes EXT seria reduzido, de modo a não alterar significativamente o consumo de água em relação às sessões das fases anteriores. A composição geral das sessões seria de 12 componentes FI com matizes de linha de base, 16 componentes FI com matizes de teste, 12 componentes EXT.

## 6. Análise dos resultados e estatística

### 6.1 Resultados dos testes de eletrorretinograma de campo total

Para a análise dos resultados dos testes eletrofisiológicos, foi utilizado o programa Signal 3.0 (Cambridge Electronic Designer), que permitiu avaliar e mensurar as ondas a e b produzidas em respostas das células retinianas ao estímulo luminoso. Em seguida, os dados foram calculados pelo programa Calc (Apache OpenOffice Calc).

O programa estatístico usado para análise dos experimentos foi o BioEstat 5.0, onde foram comparados os resultados entre os dois diferentes grupos por Teste T de *Student*. Os valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

### 6.2 Resultados dos testes de psicofísica visual

As análises de resultados e dados estatísticos dos testes psicofísica visual envolveu a comparação dos índices discriminativos com os obtidos nas sessões de linha de base. Os matizes que produziram taxas de respostas semelhantes às obtidas nos períodos de Intervalo Fixo (FI) da fase 4 (nossa linha de base) foram matizes que o animal reconheceu visualmente. Matizes com taxas semelhantes às dos períodos de extinção foram matizes que o animal não visualizou.

## 7. Resultados

### 7.1 Parâmetros clínicos para caracterização do modelo experimental

Buscamos conferir os parâmetros clínicos entre os grupos experimentais e controle, para que pudéssemos estabelecer alterações compatíveis com o desenvolvimento de hipotireoidismo congênito. Realizando a análise do peso corporal, do nível hormonal plasmático e do comportamento, podemos apresentar a caracterização do modelo experimental dos grupos estudados.

#### 7.3.5 Peso e comprimento dos sujeitos

Os animais tiveram a sua massa corporal e medidas de comprimento mensurados nos dias dos testes de registro eletrorretinográfico, obtendo as medidas apresentadas na tabela a seguir:

Tabela 1.

*Massa corporal e comprimento dos grupos estudados*

	<b>Controle</b>	<b>Hipotireoidismo Congênito</b>
<b>Massa (g)</b>	30,72 $\pm$ 3,10	24,77 $\pm$ 7,8
<b>Comprimento (cm)</b>	19,43 $\pm$ 2,42	17,34 $\pm$ 2,15

Esses dados apresentam a média e desvio padrão da massa corpórea e comprimento dos animais dos grupos controle e hipotireoidismo congênito, aos 60 dias de vida, durante a fase de

testes de ERG. Os animais do grupo experimental apresentaram estatisticamente menor massa, em comparação aos indivíduos controle. Já a observação do comprimento não mostra diferença significativa entre os grupos.

#### 7.1.2 Níveis séricos de T3

Ao final dos 60 dias, após os testes de eletrofisiologia, os animais foram submetidos à coleta sanguínea, realizada através de punção cardíaca e a amostra serviu para analisar o nível sérico de T3, apresentados na tabela 2.

Tabela 2.

*Concentração sérica de T3 sanguíneo dos animais testados após 60 dias*

<b>Grupo</b>	<b>Concentração de T3 sanguíneo</b>
<b>Hipotiroisdismo Congênito</b>	0,742 mg/dl
<b>Controle (Valor de Referência)</b>	≥1 mg/dl

Dessa maneira, podemos evidenciar através da análise plasmática de T3 que os animais experimentais apresentaram em média valores menores que 1mg/dl, caracterizando o hipotiroidismo.

## 7.4 Eletrorretinograma de campo total

### 7.4.1 Resposta Escotópica (Bastonetes)

Baseados na padronização da ISCEV, realizamos as análises dos registros de tempo implícito e amplitude da onda-b captados nos testes com animais de 60 dias de vida em condição escotópica, onde ocorreu a adaptação prévia ao escuro durante 12 horas.

Avaliando o tempo implícito e a amplitude da onda-b, notamos que não ocorreu diferença estatística entre as respostas dos animais com hipotiroidismo congênito e do grupo controle, com valores de  $P=0,683$  para tempo implícito e  $P=0,561$  para amplitude, apresentados na tabela 3 e figuras 12 e 13.

Tabela 3.

*Médias e desvio padrão do tempo implícito e amplitude da onda-b em resposta escotópica*

	<b>Controle</b>	<b>Hipotiroidismo Congênito</b>
<b>Tempo Implícito (ms)</b>	19,047 $\pm$ 6,002	17,429 $\pm$ 6,097
<b>Amplitude (<math>\mu</math>V)</b>	47,158 $\pm$ 8,807	42,723 $\pm$ 15,822

### Tempo implícito da onda-b em resposta escotópica

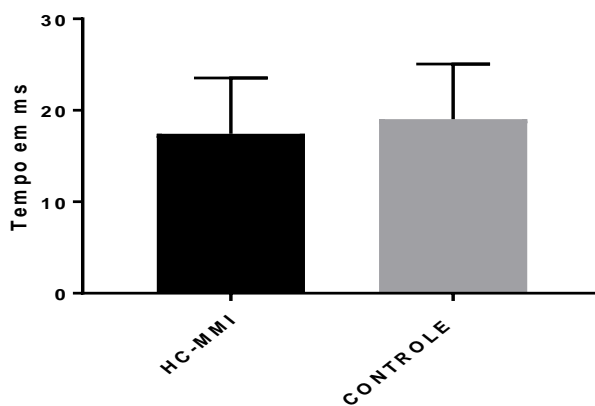


Figura 12.

Valores do registro do ERG de campo total dos animais de estudo apresentando o tempo implícito da *onda-b* em ms, na resposta escotópica, após adaptação ao escuro por 12 horas. Resultados expressos em média e DP (n=6), teste T de *Student*, com  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.

### Amplitude da onda-b em resposta escotópica

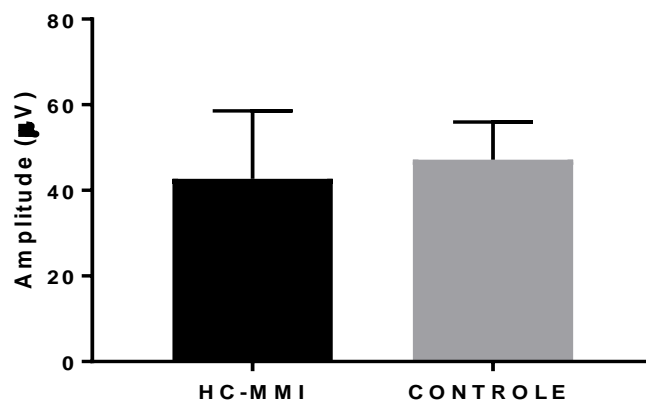


Figura 13.

Valores do registro do ERG de campo total dos animais de estudo apresentando a amplitude da *onda-b* em  $\mu V$ , na resposta escotópica, após adaptação ao escuro por 12 horas. Resultados expressos em média e DP (n=6), teste T de *Student*, com  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.

### 7.2.3 Resposta Mista 1 (Cones e Bastonetes)

Os animais testados foram expostos à estímulos luminosos gerados pelo fotoestimulador com filtragem máxima, o qual pode gerar respostas de cones e bastonetes. A tabela 4 apresenta os valores de média e desvio padrão do tempo implícito para as ondas a e b, nesta condição.

Tanto para a onda-a quanto para a onda-b, não foram observadas diferenças significativas para o tempo implícito das ondas, com valor de  $P=0,052$  para onda-a e  $P=0,324$  para onda-b, onde o grupo controle apresentou valores menores que o grupo HC-MMI.

Tabela 4.

*Média e desvio padrão do tempo implícito da onda-a e onda-b em resposta mista 1 (cones e bastonetes).*

<b>Tempo Implícito (ms)</b>	<b>Controle</b>	<b>Hipotiroidismo Congênito</b>
<b>Onda-a</b>	12,503 $\pm$ 2,962	16,059 $\pm$ 1,840
<b>Onda-b</b>	31,506 $\pm$ 11,386	37,881 $\pm$ 7,419

### Tempo implícito da onda-a em resposta mista 1

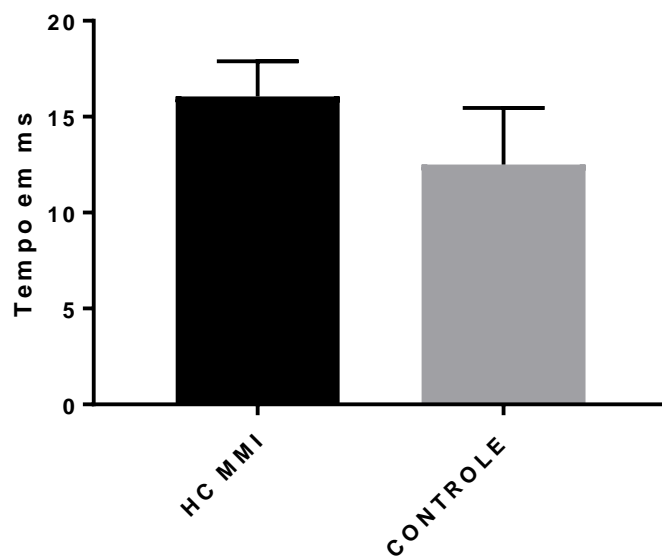


Figura 14.

Valores do registro do ERG de campo total dos animais de estudo apresentando o tempo implícito da *onda-a* em ms, na resposta mista 1. Resultados expressos em média e DP (n=6), teste T de *Student*, com  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.

### Tempo implícito da onda-b em resposta mista 1

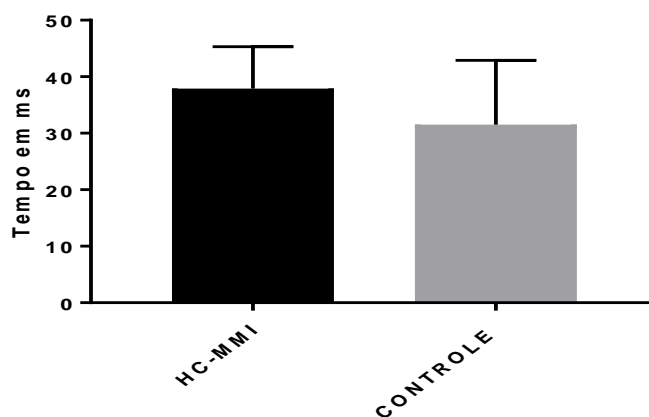




Figura 15.

Valores do registro do ERG de campo total dos animais de estudo apresentando o tempo implícito da *onda-b* em ms, na resposta mista 1. Resultados expressos em média e DP (n=6), teste T de *Student*, com  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.

A tabela 5 apresenta os resultados obtidos da avaliação da amplitude da *onda-a* e *onda-b* em resposta mista 1. Para a componente *onda-a*, a média da amplitude observada nos animais do grupo experimental não apresentou diferença significativa em relação ao controle ( $P=0,220$ ). Já a amplitude de *onda-b* do grupo HC-MMI teve diferença estatística em relação aos do grupo controle, com o valor de  $P=0,008$  observado na figura 17.

Tabela 5.

*Média e desvio padrão da amplitude da onda-a e onda-b em resposta mista 1 (cones e bastonetes)*

<b>Amplitude (<math>\mu V</math>)</b>	<b>Controle</b>	<b>Hipotiroidismo Congênito</b>
<b>Onda-a</b>	22,935 $\pm$ 2,272	20,125 $\pm$ 4,143
<b>Onda-b</b>	99,592 $\pm$ 26,520	51,082 $\pm$ 24,848

Na figura 16 evidenciamos os dados gráficos dos valores de amplitude de *onda-a* em resposta mista, que envolve cones e bastões, onde percebemos uma redução nas respostas do grupo experimental em relação ao controle, sem diferença estatística.

### Amplitude da onda a em resposta mista 1

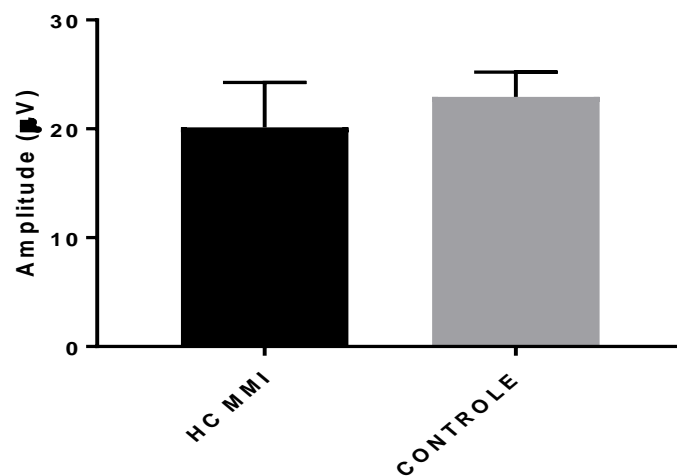
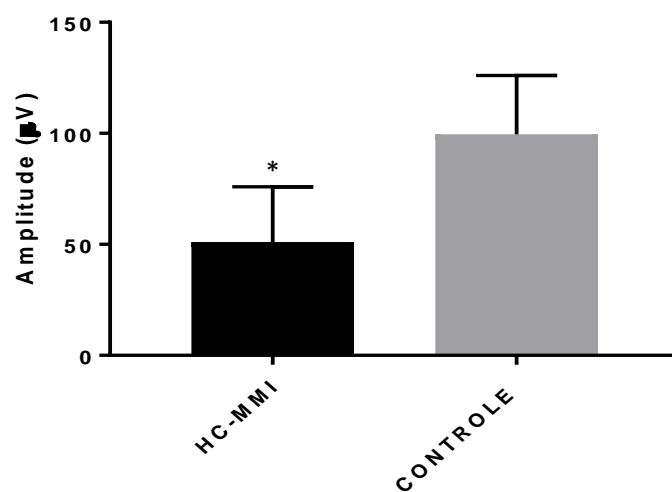


Figura 16.

Valores do registro do ERG de campo total dos animais de estudo apresentando o amplitude da *onda-a* em  $\mu V$ , na resposta mista 1. Resultados expressos em média e DP (n=6), teste T de *Student*, com  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.

A próxima figura, nos mostra os gráficos dos grupos HC-MMI e Controle com os valores obtidos da amplitude da onda-b em resposta mista 1, com diferença estatística significativa.

### Amplitude da onda-b em resposta mista 1



*Figura 17.*

Valores do registro do ERG de campo total dos animais de estudo apresentando o amplitude da *onda-b* em  $\mu V$ , na resposta mista 1. Resultados expressos em média e DP (n=6), teste T de *Student*, com  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.

#### 7.2.4 Resposta Mista 2

Em condições semelhantes às aplicadas para a resposta mista 1, os animais dos dois grupos foram expostos à estímulos luminosos gerados pelo fotoestimulador porém, com filtragem mínima. Os dados obtidos são apresentados nas tabelas 6 e 7.

A tabela 6 apresenta os valores de média e desvio padrão do tempo implícito para as ondas a e b em resposta mista 2 de cones e bastonetes. Os resultados não foram significativos estatisticamente, tanto para a onda-a ( $P=0,306$ ) quanto para a onda-b ( $P=0,719$ ).

Tabela 6.

*Média e desvio padrão do tempo implícito da onda-a e onda-b em resposta mista 2.*

<b>Tempo Implícito (ms)</b>	<b>Controle</b>	<b>Hipotiroidismo Congênito</b>
<b>Onda-a</b>	16,242 $\pm$ 2,642	14,522 $\pm$ 2,323
<b>Onda-b</b>	35,453 $\pm$ 6,644	34,251 $\pm$ 2,861

A figura 18 mostra os gráficos dos grupos HC-MMI e Controle após a leitura dos resultados de tempo implícito para a formação da onda-a em resposta mista 2, onde evidenciamos valores menores para o grupo experimental em comparação ao controle.

### Tempo Implícito de onda a em resposta mista 2

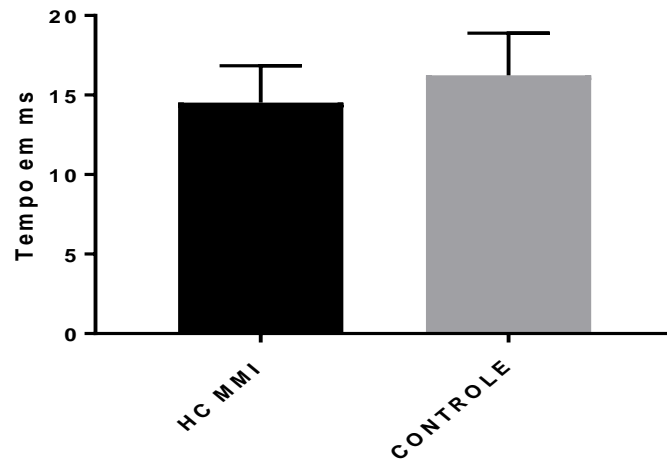
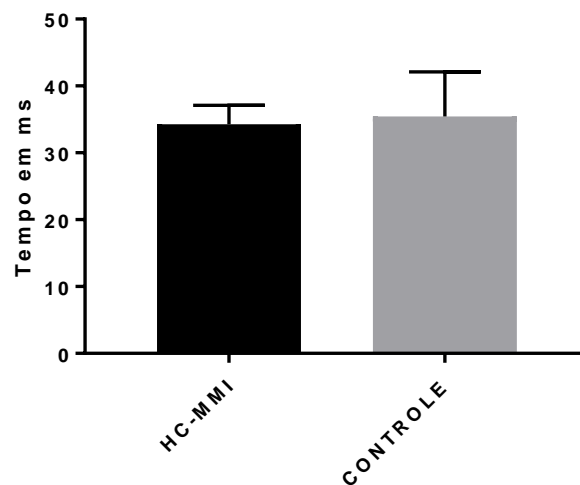


Figura 18.

Valores do registro do ERG de campo total dos animais de estudo apresentando o tempo implícito da *onda-a* em ms, em resposta mista 2. Resultados expressos em média e DP (n=6), teste T de *Student*, com  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.

A próxima figura apresenta os valores em gráfico do tempo implícito da *onda-b*, que tem um comportamento semelhante ao da *onda-a*, descrito anteriormente. As respostas do grupo HC-MMI também são menores que as observadas em animais do grupo controle.

### Tempo implícito da onda-b em resposta mista 2



*Figura 19.*

Valores do registro do ERG de campo total dos animais de estudo apresentando o tempo implícito da *onda-b* em ms, em resposta mista 2. Resultados expressos em média e DP (n=6), teste T de *Student*, com  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.

A tabela 7 apresenta os resultados da análise da amplitude das ondas a e b em condições para resposta mista 2, onde destacamos o aumento das amplitudes de onda-a em relação aos dados do grupo controle, com diferenças significativas. Já para a onda-b, os resultados não foram estatisticamente significativos comparados aos animais controle.

Tabela 7.

*Média e desvio padrão da amplitude da onda-a e onda-b em resposta mista 2 (cones e bastonetes)*

<b>Amplitude (<math>\mu\text{V}</math>)</b>	<b>Controle</b>	<b>Hipotiroidismo Congênito</b>
<b>Onda-a</b>	20,622 $\pm$ 6,540	32,268 $\pm$ 5,297
<b>Onda-b</b>	89,006 $\pm$ 35,326	63,540 $\pm$ 31,665

A figura 20 evidencia os valores da amplitude da onda-a em resposta mista 2 de cones e bastonetes. Dessa vez, os valores de onda-a encontrados nos dados do grupo experimental são significativos em relação aos do grupo controle, com valor de  $P=0,014$ .

### Amplitude da onda-a em resposta mista 2

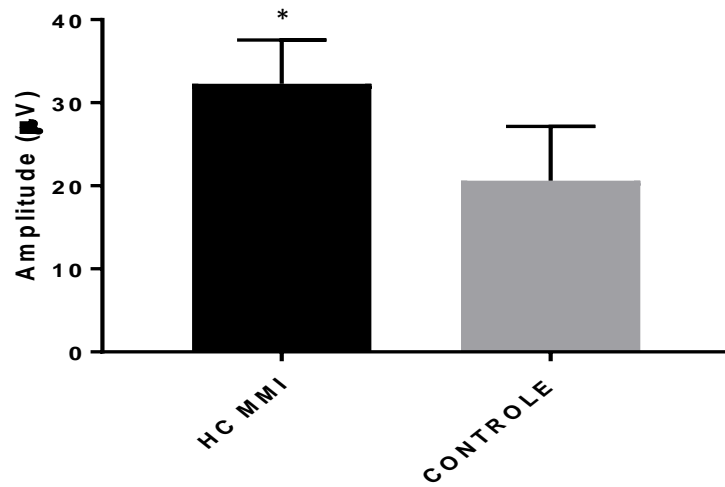
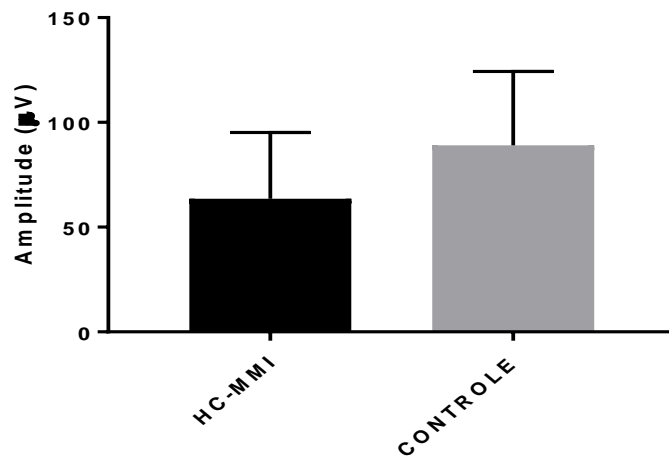


Figura 20.

Valores do registro do ERG de campo total dos animais de estudo apresentando a amplitude da *onda-a* em  $\mu\text{V}$ , na resposta mista 2. Resultados expressos em média e DP (n=6), teste T de *Student*, com  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.

Na figura 21, a amplitude da onda-b se mantém em níveis mais baixos em relação ao controle.

### Amplitude da onda-b em resposta mista 2



*Figura 21.*

Valores do registro do ERG de campo total dos animais de estudo apresentando a amplitude da *onda-b* em  $\mu\text{V}$ , na resposta mista 2. Resultados expressos em média e DP (n=6), teste T de *Student*, com  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.

### 7.2.5 Resposta fotópica de cones em 1Hz

Para obter respostas fotópicas, os animais foram submetidos a uma adaptação à luz por 10 minutos, e em seguida receberam estímulos luminosos do fotoestimulador sem uso de filtros.

O tempo implícito das ondas a e b foi mensurado, e os valores de média e desvio padrão obtidos não apresentam diferenças significativas, e estão dispostos na tabela 8.

Tabela 8.

*Média e desvio padrão do tempo implícito da onda-a e onda-b em resposta fotópica de cones a 1Hz.*

<b>Tempo Implícito (ms)</b>	<b>Controle</b>	<b>Hipotiroidismo Congênito</b>
<b>Onda-a</b>	14,073 $\pm$ 2,187	18,539 $\pm$ 6,564
<b>Onda-b</b>	43,622 $\pm$ 12,394	33,335 $\pm$ 10,790

Nas figuras 22 e 23, observamos os gráficos de tempo implícito da onda-a e onda-b na resposta fotópica a 1Hz. Podemos notar que as ondas a e b dos animais do grupo HC-MMI apresentaram maior tempo em relação aos dados dos animais controle.

### Tempo Implícito de onda-a em resposta fotópica de cone 1Hz

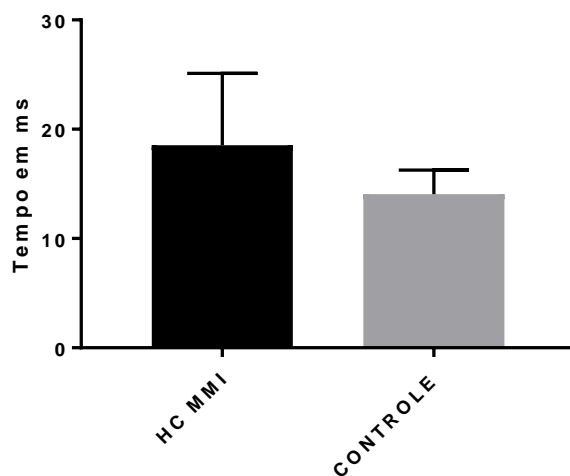


Figura 22.

Valores do registro do ERG de campo total dos animais de estudo apresentando o tempo implícito da *onda-a* em ms, em resposta fotópica de 1Hz. Resultados expressos em média e DP (n=6), teste T de *Student*, com  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.

### Tempo implícito da onda-b em resposta fotópica de cone 1Hz

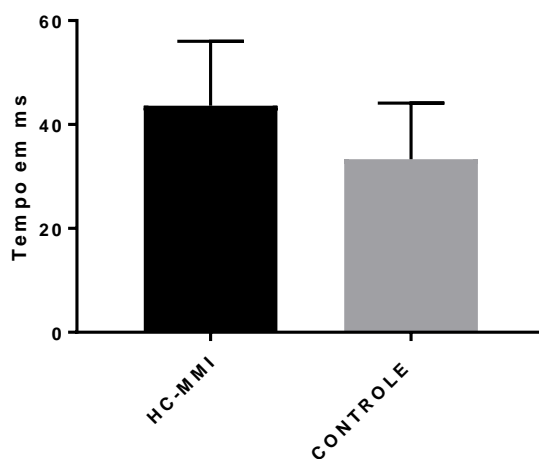


Figura 23.

Valores do registro do ERG de campo total dos animais de estudo apresentando o tempo implícito da *onda-b* em ms, em resposta fotópica de 1Hz. Resultados expressos em média e DP (n=6), teste T de *Student*, com  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.



Para a amplitude das ondas a e b em condições fotópicas de 1Hz, os dados estão expostos na tabela 9, onda média e desvio padrão podem ser observados. Nestas registros, também não houve diferença significativa.

Tabela 9.

*Média e desvio padrão da amplitude da onda-a e onda-b em resposta fotópica de cones em 1Hz*

<b>Amplitude (<math>\mu\text{V}</math>)</b>	<b>Controle</b>	<b>Hipotiroidismo Congênito</b>
<b>Onda-a</b>	21,488 $\pm$ 7,275	23,914 $\pm$ 6,969
<b>Onda-b</b>	47,536 $\pm$ 13,183	63,892 $\pm$ 14,245

As figuras 24 e 25 apresentam os dados gráficos das amplitudes das ondas a e b, respectivamente. Tanto para a onda-a e b (figura 24 e 25, respectivamente), a amplitude dos sujeitos do grupo HC-MMI foi maior em relação aos controles.

**Amplitude da onda-a em resposta fotópica de cone 1Hz**

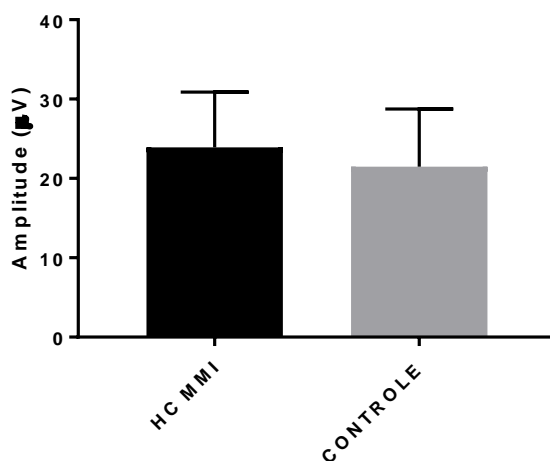


Figura 24.

Valores do registro do ERG de campo total dos animais de estudo apresentando amplitude da *onda-a* em  $\mu\text{V}$ , em resposta fotópica de 1Hz. Resultados expressos em média e DP (n=6), teste T de *Student*, com  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.

### Amplitude da onda-b em resposta fotópica de cone 1Hz

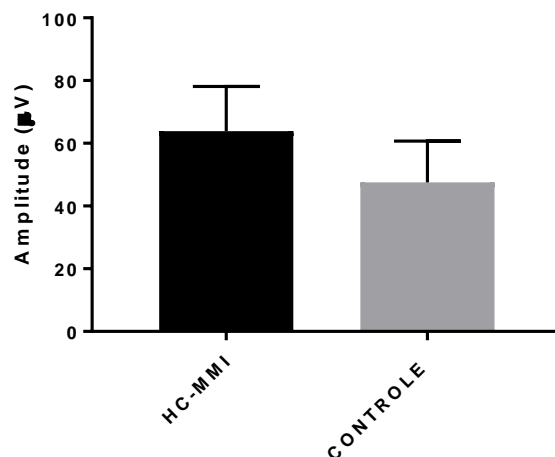


Figura 25.

Valores do registro do ERG de campo total dos animais de estudo apresentando amplitude da *onda-b* em  $\mu\text{V}$ , em resposta fotópica de 1Hz. Resultados expressos em média e DP (n=6), teste T de *Student*, com  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.

#### 7.2.6 Resposta fotópica de *flikers* de 12, 18, 24 e 30Hz

Estas respostas foram obtidas a partir de estímulos luminosos intermitentes, denominados de *flikers*, onde ocorreu variação na frequência emitida, nos valores de 12, 18, 24 e 30Hz.

A tabela 10 apresenta os dados em média e desvio padrão do tempo implícito da *onda-b* obtidos após a leitura dos registros de resposta fotópica de *flikers*, com valores sem diferença estatística significativa.

Tabela 10.

Média e desvio padrão do tempo implícito da onda-b em resposta fotópica de flickers em 12, 18, 24 e 30Hz.

Tempo Implícito		
da onda-b (ms)	Controle	Hipotiroidismo Congênito
12Hz	19,272 ±10,523	15,669 ±1,139
18Hz	15,782 ±3,841	16,987 ±3,950
24Hz	17,473 ±4,877	13,312 ±5,484
30Hz	17,056 ±3,262	15,142 ±2,457

A figura 26 apresenta valores gráficos desses registros de flickers, onde o tempo implícito da onda-b para os animais com hipotiroidismo apresenta valores menores em 12 (P=0,468), 24 (P=0,240 ) e 30Hz (P=0,325) em relação ao grupo controle. Já no caso dos *flickers* de 18Hz, o tempo implícito do grupo HC-MMI apresentou valor maior que o observado nos animais controle, com P=0,638 não sendo significativo.

Tempo implícito da onda-b em resposta de *flicker*

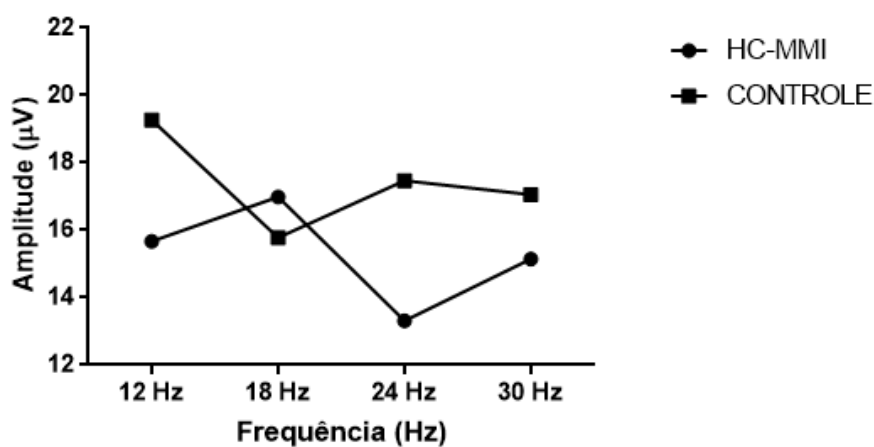


Figura 26.

Valores do registro do ERG de campo total dos animais de estudo apresentando o tempo implícito da *onda-b* em ms, em resposta fotópica de *flikers* na ordem de 12, 18, 24 e 30Hz. Resultados expressos em média e DP (n=6), teste T de *Student*, com  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.

Abaixo, a tabela 10 mostra resultados da análise da amplitude da *onda-b* em resposta fotópica de *flikers*, com valores de média e desvio padrão apresentando diferença significativa estatisticamente para as respostas em 12Hz ( $P=0,003$ ), 18Hz ( $P=0,026$ ) e 24Hz (0,0008).

Tabela 11.

*Média e desvio padrão da amplitude da onda-b em resposta fotópica de flikers em 12, 18, 24 e 30Hz.*

<b>Amplitude da onda-b (<math>\mu V</math>)</b>	Controle	Hipotiroidismo Congênito
<b>12Hz</b>	57,331 $\pm$ 13,978	30,976 $\pm$ 10,149
<b>18Hz</b>	53,301 $\pm$ 19,236	27,366 $\pm$ 14,932
<b>24Hz</b>	41,352 $\pm$ 7,533	24,145 $\pm$ 4,632
<b>30Hz</b>	47,145 $\pm$ 19,143	33,398 $\pm$ 18,997

Já na figura 23 temos os gráficos apresentando o comportamento destes valores, onde podemos observar com estes dados que a amplitude de *onda-b* apresentou um comportamento semelhante dos animais do grupo HC-MMI em relação aos controles, no qual os animais com hipotiroidismo tiveram valores menores da amplitude em relação aos controle.

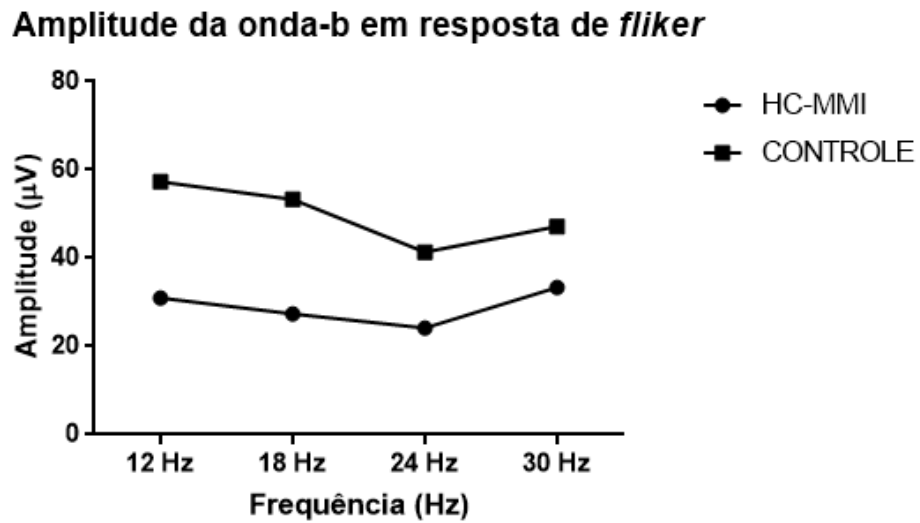


Figura 27.

Valores do registro do ERG de campo total dos animais de estudo apresentando a amplitude da *onda-b* em  $\mu\text{V}$ , em resposta fotópica de *flickers* na ordem de 12, 18, 24 e 30Hz. Resultados expressos em média e DP (n=6), teste T de *Student*, com  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.

### 7.2.7 Resposta fotópica de cone S

Com o propósito de observar as respostas fotópicas de cones S, foi utilizado um filtro de luz azul acoplado ao fotoestimulador, e os resultados de média e desvio padrão de *onda-a* e *onda-b* estão apresentados na tabela 11,

Tabela 12.

*Média e desvio padrão do tempo implícito da onda-a e onda-b em resposta fotópica de cone S com filtro azul.*

<b>Tempo Implícito (ms)</b>	<b>Controle</b>	<b>Hipotiroidismo Congênito</b>
<b>Onda- a</b>	17,314 ±5,172	15,686 ±3,026
<b>Onda-b</b>	35,888 ±14,626	40,048 ±11,094

Nas figuras 28 observamos os dados gráficos do tempo implícito de onda-a, onde podemos notar valores menores de resposta do grupo HC-MMI em comparação ao grupo controle.

**Tempo Implícito de onda-a em resposta fotópica de cone S**

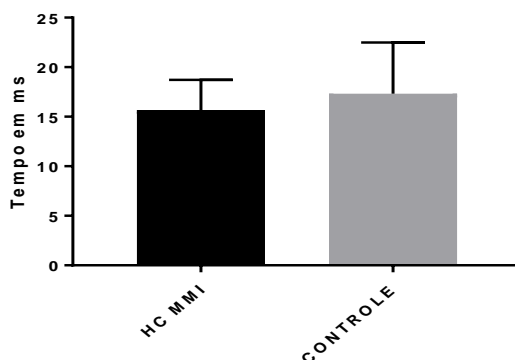


Figura 28.

Valores do registro do ERG de campo total dos animais de estudo apresentando o tempo implícito da *onda-a* em ms, em resposta fotópica de cone S. Resultados expressos em média e DP (n=6), teste T de *Student*, com  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.

Já a figura 29 nos mostra os dados da onda-b para o tempo implícito, e com uma alternância em relação a onda-a. Os resultados do grupo experimental passam a ser maiores que os comparados com o grupo controle.

#### Tempo Implícito da onda-b em resposta fotópica de cone S

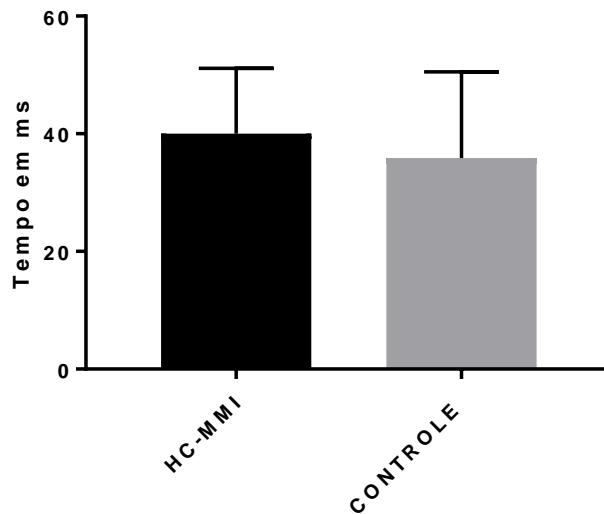


Figura 29.

Valores do registro do ERG de campo total dos animais de estudo apresentando o tempo implícito da *onda-b* em ms, em resposta fotópica de cone S. Resultados expressos em média e DP (n=6), teste T de *Student*, com  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.

Para apresentar os dados de amplitude das ondas a e b temos a tabela 13, com as médias e desvio padrão desses componentes do ERG.

Tabela 13.

*Média e desvio padrão da amplitude da onda-a e onda-b em resposta fotópica de cone S com filtro azul.*

<b>Amplitude (<math>\mu\text{V}</math>)</b>	Controle	Hipotireoidismo Congênito
<b>Onda- a</b>	24,425 $\pm$ 7,325	38,828 $\pm$ 15,131
<b>Onda-b</b>	73,128 $\pm$ 30,302	57,963 $\pm$ 11,985

Na avaliação das amplitudes das duas ondas, não observamos diferença significativa entre a amplitude da onda-a dos animais do grupo HC-MMI em relação ao grupo controle (Figura 30).

**Amplitude da onda-a em resposta fotópica de cone S**

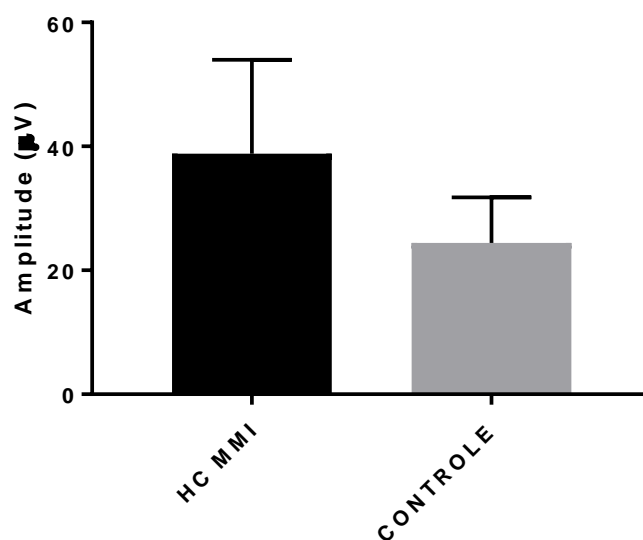


Figura 30.

Valores do registro do ERG de campo total dos animais de estudo apresentando a amplitude da *onda-a* em  $\mu\text{V}$ , em resposta fotópica de cone S. Resultados expressos em média e DP (n=6), teste T de *Student*, com  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.



Já a onda-b dos animais com hipotireoidismo apresentou resultados menores quando comparados aos do grupo controle (Figura 31), porém, sem significância estatística, com  $P=0,280$ .

#### Amplitude de onda-b em resposta fotópica de cone S

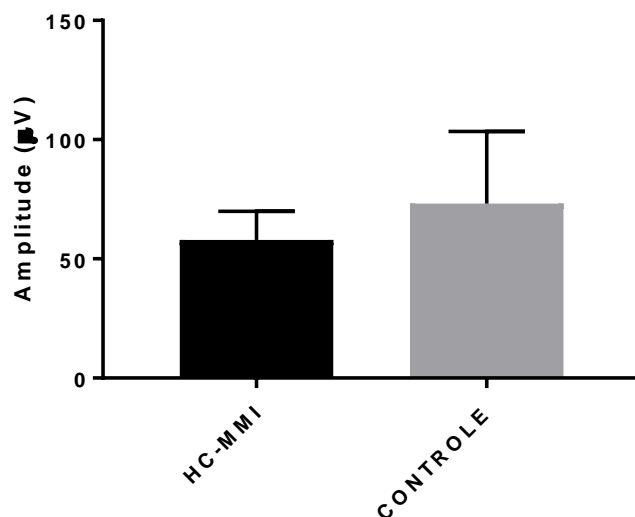


Figura 31.

Valores do registro do ERG de campo total dos animais de estudo apresentando a amplitude da *onda-b* em  $\mu\text{V}$ , em resposta fotópica de cone S. Resultados expressos em média e DP ( $n=6$ ), teste T de *Student*, com  $P<0,05$  em relação ao grupo controle.

#### 7.2.8 Resposta fotópica de cone M

Finalmente, a resposta fotópica de cone M oriunda de testes com uso de filtro verde acoplado ao fotoestimulador, com o objetivo de estimular respostas de cones do tipo M.

Média e desvio padrão do tempo implícito da onda-a e onda-b estão expostos na tabela 12, onde não vemos diferença significativa entre os dados de animais experimentais e relação aos controles.

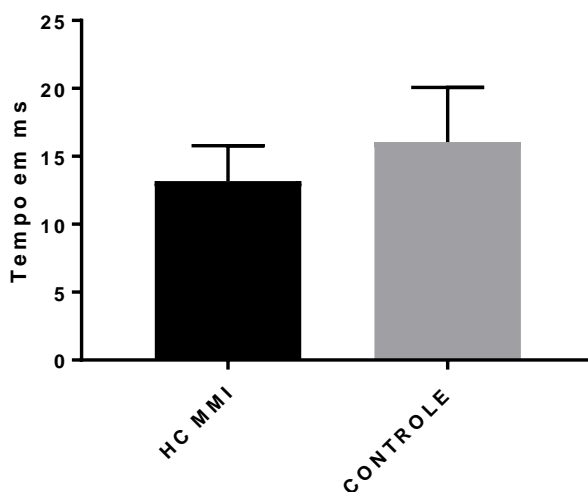
Tabela 14.

*Média e desvio padrão do tempo implícito da onda-a e onda-b em resposta fotópica de cone M com filtro verde.*

<b>Tempo Implícito (ms)</b>	Controle	Hipotireoidismo Congênito
<b>Onda- a</b>	16,062 ±4,005	13,171 ±2,601
<b>Onda-b</b>	39,565 ±10,039	31,381 ±5,799

Nas figuras 32 e 33, temos os gráficos de tempo implícito de onda-a e onda-b, respectivamente.

**Tempo Implícito de onda-a em resposta fotópica de cone M**



*Figura 32.*

Valores do registro do ERG de campo total dos animais de estudo apresentando o tempo implícito da *onda-a* em ms, em resposta fotópica de cone M. Resultados expressos em média e DP (n=6), teste T de *Student*, com  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.

### Tempo implícito da onda-b em resposta fotópica cone M

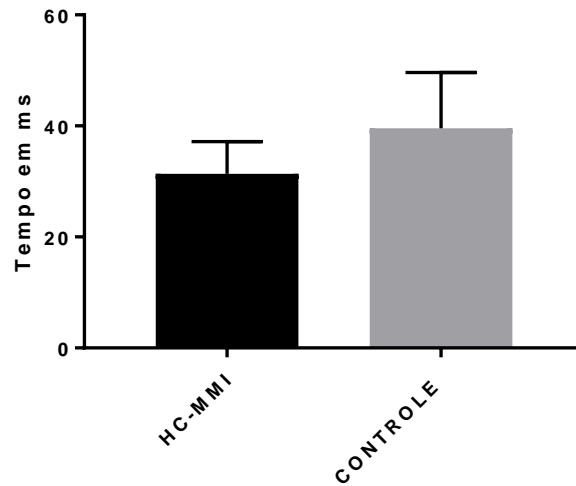


Figura 33.

Valores do registro do ERG de campo total dos animais de estudo apresentando o tempo implícito da *onda-b* em ms, em resposta fotópica de cone M. Resultados expressos em média e DP (n=6), teste T de *Student*, com  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.

A tabela 13 apresenta a amplitude de onda dos dois tipos (a e b), mensurados nas condições descritas anteriormente. Destacamos aqui a alternância de valores que ocorreram na amplitude de onda-a do grupo HC-MMI em relação ao controle, sendo estatisticamente significativo ( $P=0,018$ ).

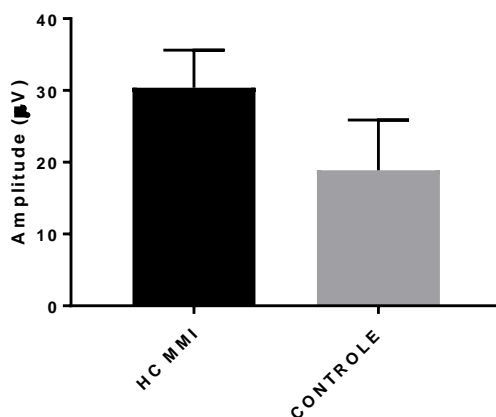
Tabela 15.

*Média e desvio padrão da amplitude da onda-a e onda-b em resposta fotópica de cone M com filtro verde.*

<b>Amplitude (<math>\mu\text{V}</math>)</b>	Controle	Hipotiroidismo Congênito
<b>Onda-a</b>	18,872 $\pm$ 7,015	30,393 $\pm$ 5,206
<b>Onda-b</b>	59,855 $\pm$ 19,498	39,243 $\pm$ 22,886

A amplitude de onda-a, em comparação ao controle pode ser observada graficamente na figura 34, onde ressaltamos os maiores valores que ocorreram nas respostas dos animais experimentais em relação ao grupo controle.

**Amplitude da onda-a em resposta fotópica de cone M**



*Figura 34.*

Valores do registro do ERG de campo total dos animais de estudo apresentando a amplitude da *onda-a* em  $\mu\text{V}$ , em resposta fotópica de cone M. Resultados expressos em média e DP (n=6), teste T de *Student*, com  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.

Finalizando os dados de ERG, temos a figura 35, com o gráfico da amplitude da onda-b com as respostas de cones M.

### Amplitude da onda-b em resposta fotópica de cone M

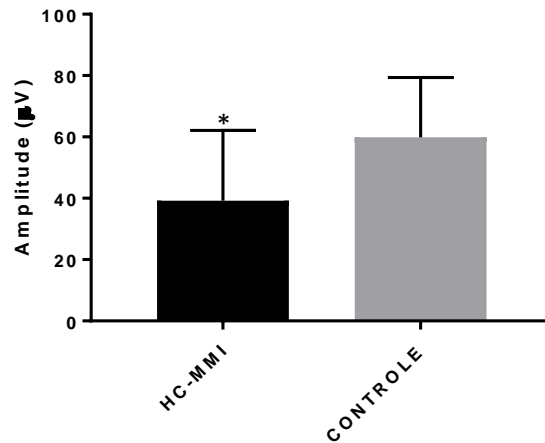


Figura 35.

Valores do registro do ERG de campo total dos animais de estudo apresentando a amplitude da *onda-b* em  $\mu\text{V}$ , em resposta fotópica de cone M. Resultados expressos em média e DP (n=6), teste T de *Student*, com  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.

### 7.3 Psicofísica Visual

No decorrer dos nossos testes de comportamentos, levantamos dados resultante da pressão à barra desempenhada pelos sujeitos experimentais, gerando a taxa de respostas de pressão a barra, no qual obtivemos dados referentes a razão entre os número de eventos brutos, com intervalos de 5 minutos, sendo a sessão totalizada em 10 minutos. O peso corporal também foi avaliado, a fim de investigar se há alguma correlação entre a massa corporal, as taxas e as fases dos testes comportamentais, totalizando 30 sessões.

Para os testes comportamentais, as taxas de resposta foram analisadas estatisticamente pelo teste T *Student*, atribuindo valores de  $p < 0,05$ .

#### 7.3.1 Avaliação do desempenho com as adaptações da caixa de condicionamento operante

Para viabilizar nosso estudo, precisamos adaptar a caixa de condicionamento operante para as dimensões do camundongo, que é consideravelmente menor em relação aos ratos. As principais modificações foram o alongamento da barra, ficando próxima à altura da cabeça dos animais, e a redução das dimensões da caixa, para minimizar o comportamento exploratório que é comum nesses animais.

Os desempenho dos animais nos dois estágios (antes e após as adaptações) foi mensurado, com média e DP 27,65 ±8,55 para a caixa tradicional, e 55,8±25,03 para a caixa modificada (Figura 36).

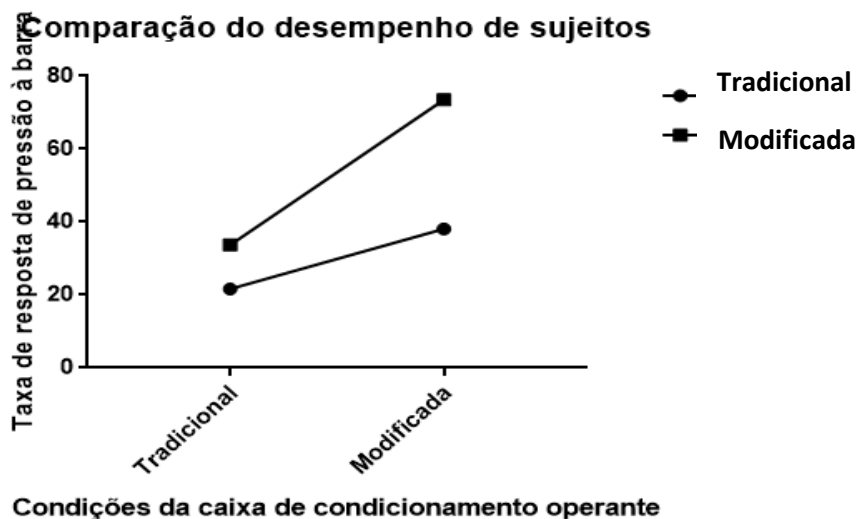


Figura 36.

Comparação do desempenho dos sujeitos em dois momentos da caixa de condicionamento operante. Resultados expressos em média e DP (n=6), teste T de *Student*, com  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.

### 7.3.2 Número de sessões para a transição das etapas

Um dos aspectos avaliados foi do número de sessões necessárias para a transição de uma às próximas fases, onde observamos na figura 36 diferenças significativas entre os grupos HC-MMI ( $3,8 \pm 0,83$ ) e Controle ( $6,2 \pm 1,30$ ), com  $P=0,031$ .

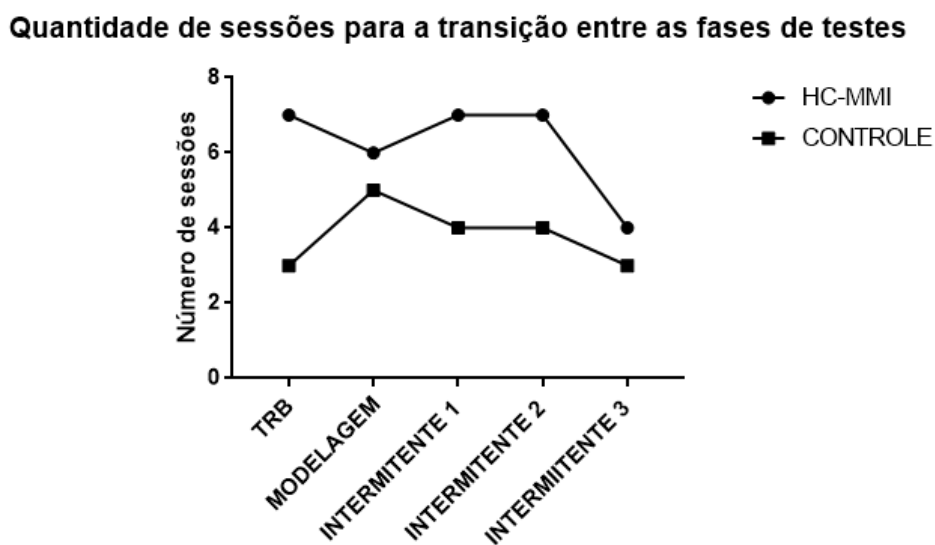


Figura 37.

Número de sessões necessárias para transição da fase de treino de resposta ao bebedouro (TRB) para intermitente 3. Resultados expressos em média e DP ( $n=6$ ), teste T de *Student*, com  $P<0,05$  em relação ao grupo controle.

### 7.3.3 Pressão à barra

Dados da taxa de pressão à barra estão apresentados na figura 38, onde temos a comparação da evolução dos desempenhos de animais do grupo com hipotireoidismo congênito

e o controle; e as etapas de treino. Tivemos diferenças significativas ocorrendo entre os grupos nos estágios de treino intermitente 1 e 2.

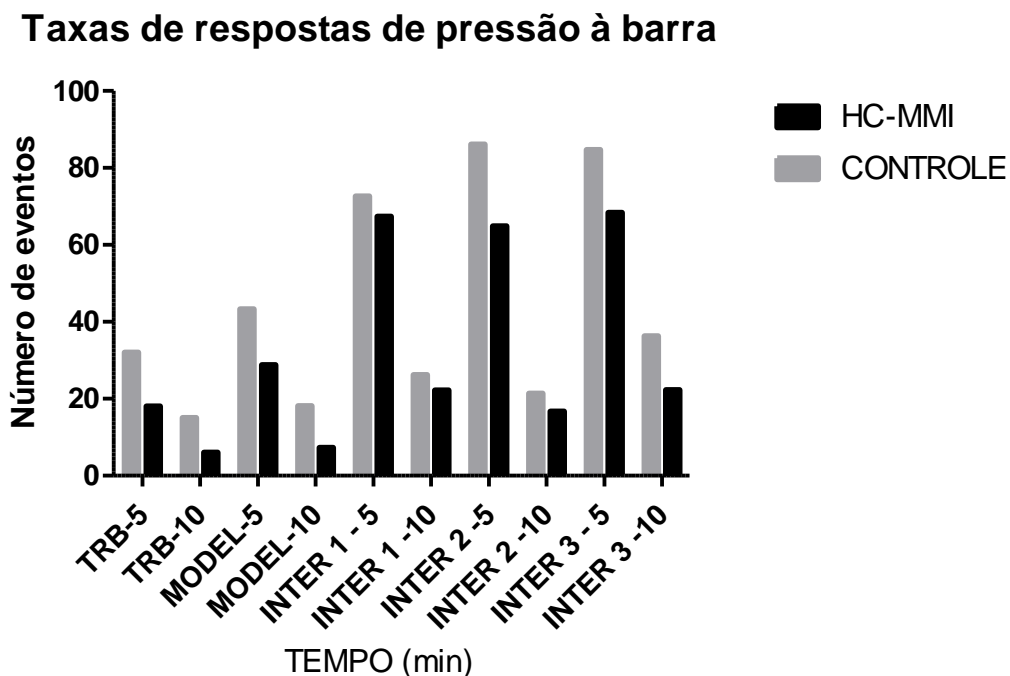


Figura 38.

Taxas de respostas de pressão a barra e grupos experimentais e os estágios treino ao bebedouro (TRB), modelagem (MODEL), intermitente de razão 1 (INTER 1), intermitente de razão 2 (INTER 2) e intermitente de razão 3 (INTER 3). Resultados expressos em média e DP (n=6), teste T de *Student*, com  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.

### 7.3.4 Ingestão de água

Outro fator avaliado foi a quantidade de vezes que os sujeitos, durante os testes, ingeriam água. Os resultados estão apresentados na figura 39, onde tivemos diferenças significativas nas fases de TRB e intermitentes 1, 2 e 3.



### Taxas de resposta de ingestão de água

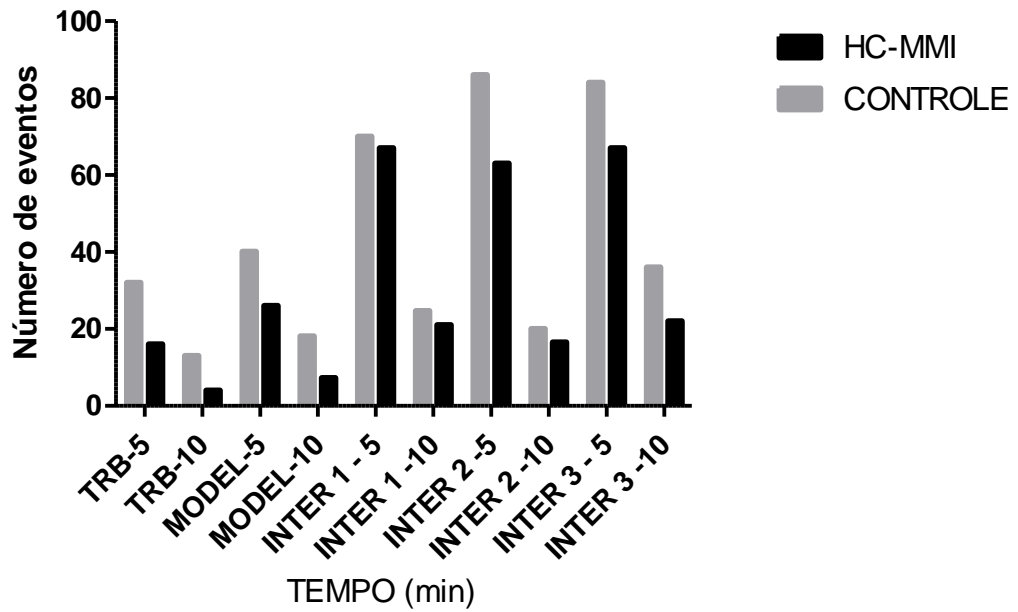


Figura 39.

Taxas de respostas da ingestão de água dos grupos experimentais e os estágios treino ao bebedouro (TRB), modelagem (MODEL), intermitente de razão 1 (INTER 1), intermitente de razão 2 (INTER 2) e intermitente de razão 3 (INTER 3). Resultados expressos em média e DP (n=6), teste T de *Student*, com  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle.

A análise dos parâmetros clínicos em nossos sujeitos de estudo mostrou que o protocolo adotado para administração do Metimazol resultou no desenvolvimento de hipotireoidismo congênito, identificado pela diminuição dos valores do hormônio triiodotironina no plasma sanguíneo. Notamos que após os 60 dias, os níveis séricos do hormônio T3 estavam alterados abaixo do valor de referência para os sujeitos estudados (camundongos), mostrando que esse modelo pode ser utilizado para avaliar alterações que a redução desse hormônio provoca no organismo.

Também ocorreu redução significativa no peso corporal dos animais que nasceram de mães tratadas com a droga antitireoidea, quando comparado com os demais animais do grupo controle. Nossos dados estão de acordo com resultados apresentados por Barnett (1950) que investigou efeitos da administração de tiouracil no desenvolvimento geral da prole de ratas que durante a gestação receberam a droga. Foi verificado que a partir do quarto dia pós-natal os animais apresentaram um decréscimo no ganho de peso e no crescimento corporal, após o desmame a taxa de crescimento diminuiu ainda mais quando comparados com a prole de ratas que não receberam nem um tipo de tratamento. Este mesmo trabalho também avaliou estes parâmetros em animais que receberam o tiouracil após o nascimento, durante o período de amamentação em uma prole normal. A taxa de peso corporal dos animais amamentados por ratas tratados com tiouracil foi comparada com animais normais amamentados por ratas que não recebam nem um tipo de tratamento. Verificou-se que a partir do décimo dia houve uma diferença aparente nas curvas de peso, com uma diferença mais acentuada no momento do desmame.

Syed (1999), em seu trabalho, descreve que a redução da massa total, assim como o volume da gordura retroperitoneal e total de ratos tratados com metimazol durante 20 dias está ligada à diminuição dos níveis dos hormônios tireoidianos.

Além disso, observamos resultados que mostram o modelo experimental de hipotireoidismo congênito causado pela administração do metimazol sendo promissor, pois permite o desenvolvimento de um quadro patológico que tem como reflexo alterações visuais ligadas ao padrão fisiológico da retina, e da expressão das opsinas de cones M, diminuindo a população deste tipo celular, como registrado no trabalho de Lily Ng e colaboradores (2001) e Pessoa e colaboradores (2008). Além de que o MMI é um interessante substituto para os procedimentos experimentais de tireoidectomia, pois diminui o sacrifício dos sujeitos experimentais por ser uma droga administrada via oral, através da água de beber.

Dessa forma, para avaliar as alterações retinianas, utilizamos as respostas do eletrorretinograma para comparar dois grupos, o HC-MMI (Hipotireoidismo Congênito causado por Metimazol) e o controle.

A análise dos resultados do tempo implícito da onda-a e onda-b não nos forneceu dados uniformes, pois notamos uma alternância dos valores obtidos nos animais do grupo experimental em relação aos controles, de um protocolo para o outro do ERG de campo total. Nossos dados são contrários aos apresentados por Takeda e colaboradores (1994), que demonstrou um aumento no tempo implícito da *onda-b* nas respostas fotópicas de ratos adultos com hipotireoidismo. Trabalhos realizados em outras espécies, como cachorros e humanos também observaram aumento do tempo implícito (Durieux, Rigaudière, LeGargasson e Rosolen, 2008 e Holdew e Condon, 1989).

Em nosso trabalho, observamos aumento da amplitude da onda-a em respostas escotópica e fotópicas dos animais tratados com metimazol em comparação aos animais

controle, com diferenças estatísticas significativas. A exceção foi na resposta mista 1, onde os resultados de onda-a foram maiores nos animais do grupo HC-MMI, porém esta diferença não foi significativa.

Observamos em nossos resultados a diminuição na amplitude da onda-b nas respostas escotópica e fotópicas, com exceção para o resultado obtido na resposta fotópica de 1Hz, no qual os valores da onda-b foram maiores nos animais com hipotireoidismo em relação aos controles, porém, sem significância estatística. Resultados semelhantes aos relatados por trabalhos como os de Pearlman e Burian (1964) e Holdew e Condon (1989) que identificaram anormalidades na amplitude da onda-b de pacientes com hipotireoidismo.

Notamos também, em relação às amplitudes de ondas, a elevação da amplitude de onda-a e o declínio para a onda-b na resposta fotópica dos animais com hipotireoidismo congênito quando utilizamos o filtro que permitia a passagem de comprimentos de onda que sensibilizavam os cones S e M.

Nossos resultados seguem de acordo com dados apresentados por Lilyng e colaboradores (2001) que realizaram eletrorretinograma em camundongos transgênicos para o gene *Thrb*, responsável por codificar o receptor TR $\beta$ 2, que está envolvido no desenvolvimento de cones M, e verificaram diminuição na amplitude da *onda-b*, quando comparadas com camundongos tipo selvagem. Nesse mesmo estudo identificaram a mudança fenotípica no desenvolvimento dos fotorreceptores, apresentando diminuição da subpopulação de cones M, com um aumento significativo de cones S. Pessoa e colaboradores (2008) apresentaram resultados semelhantes, ao avaliarem a sensibilidade espectral em ratos transgênicos para o receptor TR $\beta$  e observarem respostas oriundas dos comprimentos de onda curtos do espectro, ressaltando que a expressão de cones S e M são dependentes dos níveis normais do hormônio tireoidiano durante o desenvolvimento da retina de camundongos. Resultados semelhantes foram apresentados por Glaschke e colaboradores (2011) que também tratou ratos com

metimazol e mostrou alterações no padrão de distribuição de cones S e M desses roedores adultos, com diminuição da população de cone M.

No decorrer dos experimentos comportamentais foi necessário realizar algumas adaptações para ter condições de realizar os testes com um equipamento ideal. Esse delineamento de engenharia consumiu boas etapas da pesquisa, o que refletiu no baixo número de sessões experimentais efetivas durante o estudo. No entanto, se fez necessário, uma vez que também procuramos utilizar tecnologias de baixo custo e garantir que o experimento fosse replicável em estudos futuros. É notório que após as adaptações realizadas, as taxas de resposta de pressão à barra foram ampliadas. Consideramos que o principal fator para isso foi o alongamento da barra, que permitiu ao animal desempenhar a tarefa de responder com o mínimo de esforço.

Sobre o tempo de aprendizagem, o nosso trabalho apontou que os animais com hipotireoidismo necessitaram de um número maior de sessões para avançarem na etapa de modelagem para o treino intermitente de razão 2. Podemos relacionar este fato com déficit cognitivo associado à quadros de hipotireoidismo, porém precisamos de outros testes comportamentais para confirmar esta evidência.

Em nossos dados, não ocorreu diferença estatística entre as taxas de pressão a barra e ingestão de água, porém, notamos que as taxas são elevadas nos primeiros 5 minutos dos testes e diminuem nos últimos 5 minutos. As maiores taxas de ingestão de água ocorreram no período de treino intermitente, tendo valores maiores nos animais controle. Uma observação interessante era que nos minutos finais de cada teste, os sujeitos aumentavam a frequência de outros comportamentos, como o exploratório e a autolimpeza, além de acionarem a barra sem realizarem a ingestão da água em seguida. Levantamos a hipótese que o som emitido pela pressão da barra também serviu de reforçador durante a atividade na caixa. Tomarani (2000) afirma que eventos inicialmente neutros podem exercer um papel de função reforçadora, por

meio do processo de aprendizagem. Em determinadas condições específicas, a associação entre um estímulo reforçador inicialmente estabelecido e um estímulo inicialmente neutro pode fazer com que o segundo exerça uma função reforçadora e esse fenômeno.

O nosso trabalho alcançou apenas a etapa de treinos intermitentes, não sendo possível ultrapassar para a etapa de treino discriminativo, onde ocorreria a exibição dos estímulos S+ e S- para os sujeitos do estudo. Com o refinamento do experimento, incluindo a adaptação da caixa, o tempo de sessões experimentais e o fornecimento do estímulo, a pesquisa terá prosseguimento na investigação das modificações na psicofísica visual de camundongos com hipotireoidismo congênito causado pelo metimazol, o que também pode ser aprimorado para investigações futuras.

## 9 Conclusão

Com os resultados do nosso trabalho, podemos observar a redução no peso dos animais com hipotiroidismo congênito, porém sem mudanças na taxa de crescimento;

O modelo experimental utilizado em nosso laboratório é eficaz no estabelecimento da patologia, visualizando alterações nos registros de eletrorretinograma de campo total, sendo observados aos 60 dias de vida;

Não houve alteração significativa no tempo implícito da *onda-a* e *onda-b*, na respostas escotópica e fotópica;

Ocorreu diminuição na amplitude da *onda-b* nas respostas escotópica e fotópicas, com exceção para o registro fotópico de 1Hz;

Verificamos aumento da *onda-a* nas respostas mista 2 e fotópica de 1Hz, para cones S e M;

Notamos que as adaptações realizadas na caixa de condicionamento operante para o desenvolvimento dos protocolos de psicofísica foram satisfatórias para o desempenho da resposta dos animais;

Ocorreu o aumento na quantidade de sessões necessárias para a mudança de etapas nos animais do grupo experimental, acometidos do hipotiroidismo;

As taxas de pressão à barra e ingestão de água tiveram correlações em seus dados, sendo maiores nas etapas de treino intermitente, porém com os valores mais baixos para os animais com hipotireoidismo.



## 10 Referências

- Ambrogini, P., Cuppini, R., Ferri, P., Mancini, C., Ciaroni, S., Voci, A., Gerdoni, E., Gallo, G. (2005). Thyroid hormones affect neurogenesis in the dentate gyrus of adult rat. *Neuroendocrinology*, 81, 244-253
- Azadi, S., Zhang, Y., Caffè, A. R., Holmqvist, B., & Vanveen, T. (2002). Thyroidbeta- 2 and retinoid RAR-alpha, RXR-gamma and ROR-beta2 receptor mRNAs: expression profiles in mouse retina, retinal explants and neocortex. *Neuroreport*.13: 745–750
- Bauer, M., London, E. D., Silverman, D. H., Rasgon, N., Kirchheiner, J., & Whybrow, P. C. (2003). Thyroid, brain and mood modulation in affective disorder: insights from molecular research and functional brain imaging. *Pharmacopsychiatry*. 36: 215-221.
- Bernal, J., Guadano-Ferraz, A., & Morte, B. (2003). Perspectives in the study of thyroid hormone action on brain development and function. *Thyroid*. 13: 1005-12.
- Brown, K.T. (1968). The electroretinogram: its components and their origins. *Vision Research*, 8, 633–677.
- Burmeister, L. A., Ganguli, M., Dodge, H. H., Toczek, T., Dekosky S. T., & Nebes, R. D. (2001). Hypothyroidism and cognition: preliminary evidence for a specific defect in memory. *Thyroid*. 11, 1177-1185.
- Carvalho, D. P., Rosenthal, D., & Breitenbach, M. M. D. (1987) Analysis of thyroglobulin 27S and 19S and their hormonal content in human thyroid glands. *Brazilian Journal Medical Biology Research*. 20,415-8.
- Cooper, D., S., Kieffer, J., D., Saxe, V., Mover, H., Maloof, F., & Ridgway, E., C., (1984). Methimazole pharmacology in the rat: studies using a newly developed radioimmuno assay for methimazole. *Endocrinology*, 114, 786–793.
- Delange, F., de Benoist, B., Pretell, E., Dunn, J.T., (2001). Iodine deficiency in the world: where do we stand at the turn of the century? *Thyroid*. 11. 437–47.
- Devdhar, M., Ousman, Y. H., & Burman, K. D. (2007). Hypothyroidism. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 36. 595-615.

- Dunn J. T. (2001). Endemic goiter and cretinism: an update on iodine status. *Journal Pediatric Endocrinology Metabolism*. 14. 1469-73.
- Dunn, J. T., & Dunn, A. D. (2001). Update on intrathyroidal iodine methabolism. *Thyroid*. 11. 407-14.
- Durieux, P., Rigaudière, LeGargasson, F.J.F. & Rosolen, S. G. (2008). Veterinary Ophthalmology. 11, 6, 406–41.
- Farwell, A. P., & Braverman, L. E. (1996). Thyroid and antithyroid drugs. In: Goodman & Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics. Hardman Gilman A.G., J.G., Limbird L.E. 9 ed. New York: *McGraw-Hill*.
- Fisher, D. A. (1997). Fetal thyroid function: diagnosis and management of fetal thyroid disorders. *Clinical Obstetrics and Gynecology*. 40, 16–31.
- Flamant, F., & Samarut, J. (2003). Thyroid hormone receptors: lessons from knockout and knock-in mutant mice. *Trends Endocrinology Metabolic*. 14. 85-90.
- Gillam, M., Kopp, P, (2001). Genetic regulation of thyroid development. *Curr Opin Pediatr*. 13. 358–63. B
- Gillam, M., Kopp, P, (2001). Genetic defects in thyroid hormone synthesis. *Curr Opin Pediatr*. 13.364-72. A
- Gold, M. S., Pottash, A. L. C. (1981) Hypothyroidism and Depression: Evidence from Complete Thyroid-Function Evaluation. *The Journal of the American Medical*. 24, 1919-1922.
- Goulart, P. R. K., Bandeira, M. L., Tsubota, D., Oiwa, N. N., Costa. M. F., & Ventura, D. F. (2008). A computer-controlled color vision test for children based on the Cambridge Colour Test. *Visual Neuroscience*, 25, 445-450.
- Goulart, P.R.K., Bonci, D.M.O., Galvão, O.F., Silveira, L.C.L., & Ventura, D.F. (2013). Color discrimination in the tufted Capuchin Monkey, *Sapajus* spp. *PLoS ONE*. 8(4): e62255. doi:10.1371/journal.pone.0062255
- Heymann, W. R. (1992). Cutaneous manifestations of thyroid disease. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 26, 885-902.

- Holdew, G. E., & Condon, J. R. (1989). Pattern visual evoked potentials and pattern electroretinograms in hypothyroidism. *Documenta Ophthalmologica*. 73, 127-131.
- Jacobs, G. H. (1984). Within-species variations in visual capacity among squirrel monkeys (*Saimiri Sciureus*): Color vision. *Vision Research*, 24, 1267–1277.
- Jacobs, G. H., Neitz, J., & Deegan, J. F. (1991). Retinal receptors in rodents maximally sensitive to ultraviolet light. *Nature*, 353, 655–656.
- Jerrard, L. E. (1993). On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. *Behavior Neural Biology*. 60, 9–26.
- Junqueira, L. C. U., e Carneiro, J. (2008). Histologia básica. 11. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Klein, I. (1990). Thyroid hormone and the cardiovascular system. *American Journal of Medicine*. 88, 631-637.
- Klett M. (1997). Epidemiology of congenital hypothyroidism. *Exp Clin Endocrinol Diab*.105.19-23.
- Köhrle J.(2000). Thyroid hormone metabolism and action in the brain and pituitary. *Acta Medica Austriaca*. 27,1-7.
- Kok, J. H., Briet, J. M., Van Wassenaer, A. G. (2001). Postnatal thyroid hormone replacement in very preterm infants. 25, 417-425.
- Kopp, P. (2005). Thyroid hormone synthesis: thyroid iodine metabolism. In: Braverman L, Utiger R, editors. *Werner and Ingbar's the thyroid: a fundamental and clinical text*. 9 ed. New York: *Lippincott Williams Wilkins*.
- Lily, N. G., James, B. H., Dierks, B., Srinivas, M., Saltó, C., Vennström, V., Reh, T. A., & Forrest, D. A. (2001). Thyroid hormone receptor that is required for the development of green cone photoreceptors. *Nature Genetics*. 27, 94-98.
- Loosen, P. T. (1985). The Trh-Induced Tsh Response in Psychiatric-Patients - A Possible Neuro-Endocrine Marker. *Psychoneuroendocrinology*. 10, 237-260.

- Maia, A. L., Ward, L. S., Carvalho, G. A., Graf, H., Maciel, R. B. M., Maciel, L. M. Z., Rosário, P. W., & Vaisman, M. (2007). Nódulos de Tireoide e Câncer Diferenciado de Tireoide. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 51, 5-6.
- Mancuso, K., Neitz, M., & Neitz, J. (2006). An adaptation of the Cambridge Colour Test for use with primates. *Visual Neuroscience*, 34, 695-701.
- Marmor, M. F., Holder, G. E., Seeliger, M. W., & Yamamoto, S. (2004). Standard for clinical electroretinography. *Documenta Ophthalmologica*, 108, 107-114.
- Medeiros-Neto, G., Kim, P.S., Yoo, S. E., Vono, J., Targovnik, H.M., Camargo, R., Hossain, S. A., & Arvan, P. (1996). Congenital hypothyroid goiter with deficient thyroglobulin. Identification of an endoplasmic reticulum storage disease with induction of molecular chaperones. *Journal Clinical Investigation*. 98, 2838-44.
- Miller, R. F., & Dowling, J. E. (1970). Intracellular responses of the Müller (glial) cells of the mudpuppy retina: their relation to the b-wave of the electroretinogram. *Journal of Neurophysiology*, 33, 323-341.
- Mohebbati, A., & Shaha, A. R. (2012). Anatomy of thyroid and parathyroid glands and neurovascular relations. *Clinical Anatomy*. 25, 19–31.
- Mollon J. D. & Reffin J. P. (1989). A computer-controlled colour vision test that combines the principles of Chibret and Stilling. *Journal of Physiology*, 5, 414.
- Mollon, J. D. & Regan, J. P. (2000). Handbook of the Cambridge Colour Test. Ed: *Cambridge Research Systems*, London, UK.
- Moore, K. L., & Persaud, T. V. N. (2000). Embriologia clínica. 6. Ed. Rio de Janeiro: *Guanabara Koogan*.
- Moura, N. V., Trentin, A., Lima, F., Gomes, F., Gonçalves, N., Chamas, L. V. (1996) Effects of the thyroid hormone (T3) on astrocytes. *Revista Brasileira de Biologia*. 56: 123-34.
- Navarro, D., Alvarado, M., Navarrete, F., Giner, M., Obregon, M.J., Manzanares, J., & Berbel, P. (2015) Gestational and early post natal hypothyroidism alters VGluT1 and VGAT bout on distribution in the neocortex and hippocampus, and behavior in rats. *Frontiers in Neuroanatomy*, 9, 1 – 24.

- O'hare, E., Kim, E.-M., Page, D., & Reid, R. (2015). Effects of thyroxine treatment on histology and behavior using the methimazole model of congenital hypothyroidism in the rat. *Neuroscience*, 285, 128–138.
- Pessoa, C. N., Santiago, L. A., Santiago, D. A., Machado, D. S., Rocha, F. A. F., Ventura, D. F., Hokoc, J. N., Pazos-Moura, C. C., Wondisford, F. E., Gardino, P. F, Ortega-Carvalho T. M. (2008). Thyroid hormone action is required for normal cone opsin expression during mouse retinal development. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 49, 2039-2045.
- Pokorny J., Smith V. C., Varriest G., & Pinkers A. J. L. G. (1979). Congenital and acquired color vision defects. *Grune & Stratton*. New York, 66.
- Roberts, C. G. P. & Ladenson, P. W. (2004) Hypothyroidism. *The Lancet*. 363, 793–803.
- Roberts, M. R., Srinivas, M., Forrest, D., Escobar, M. G., Reh, T. A. (2006) Making the gradient: Thyroid hormone regulates cone opsin expression in the developing mouse retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103, 6218–6223.
- Rocha, T. F. A., Costa, R. V., Marçal, A. C., Moura, T. R., Rodrigues, T. M. A. (2010) A Study on maturation of thyroid gland in human fetuses. *Journal of Morphological Science*. 27, 112-115.
- Shafer, R. B., Prentiss, R. A., Bond, J. H. (1984). Gastrointestinal transit in thyroid disease. *Gastroenterology*. 86, 852-855.
- Szél, A., Rohlich, P. (1992). Two cone types of rat retina detected by antivisual pigment antibodies. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 55: 47–52.
- Tomanari, G. Y. (2000). Reforçamento condicionado. *Revista Brasileira de Terapia Comportamental e Cognitiva*, 2(1), 61-67.
- Toft, A. D. (1984). Thyroxine therapy. *New England Journal of Medicine*. 331, 174–80.
- Weiss, R.E. (2000). Refetoff S. Resistance to thyroid hormone. *Rev Endocr Metab Disord*. 1. 97–108.