



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

EDÊNIA DA CUNHA MENEZES

**MEMÓRIA, ANSIEDADE E FUNÇÃO MOTORA NA
PROLE DE RATAS COM HIPOTIREOIDISMO
GESTACIONAL**

**SÃO CRISTÓVÃO
2014**

EDÊNIA DA CUNHA MENEZES

**MEMÓRIA, ANSIEDADE E FUNÇÃO MOTORA NA
PROLE DE RATAS COM HIPOTIREOIDISMO
GESTACIONAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Badauê Passos Junior

**SÃO CRISTÓVÃO
2014**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Saúde/UFS

Menezes, Edênia da Cunha

M543m Memória, ansiedade e função motora na prole de ratas com hipotiroidismo gestacional / Edênia da Cunha Menezes ; Orientador Daniel Badauê Passos Junior – São Cristóvão, 2014.

73 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de Sergipe, 2014.

O

1. Sistema nervoso. 2. Hipotiroidismo gestacional. 3. Ansiedade. 4. Memória. I. Passos Junior, Daniel Badauê, orient. II. Título.

CDU: 612.8

EDÊNIA DA CUNHA MENEZES

**MEMÓRIA, ANSIEDADE E FUNÇÃO MOTORA NA
PROLE DE RATAS COM HIPOTIREOIDISMO
GESTACIONAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Badauê Passos Junior

Presidente da Banca: Prof. Dr. Daniel Badauê Passos Júnior

1º Examinador: Prof. Dr. Luís Felipe Souza da Silva

2º Examinador: Prof^a. Dr^a. Flávia Teixeira Silva

AGRACEDIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar presente iluminando meus passos e permitido alcançar muitos caminhos em minha vida.

Aos meus pais (Manoel Francisco e Maria Odete) por estarem sempre ao meu lado, vocês foram o alicerce para minha formação. Respeitando minhas decisões e por entender minha ausência durante este período, mesmo sem compreender o que de fato estava acontecendo.

Ao meu marido, Danilo que sempre esteve presente neste processo participando como um companheiro fiel. Obrigada pela força, participação na confecção dos aparatos e principalmente paciência durante este período. Te amo!

Aos meus irmãos: Maria Eliane, com suas palavras e cuidados trouxe força. Elaine, além de, uma irmã, uma grande amiga que proporciona sorrisos e João Vitor sempre como um parceiro apesar das poucas palavras.

Aos meus sobrinhos Maria Clara e Pedro Lucas, que estiverem presentes como participantes ativos, sejam tentando rasgar meus artigos (Pedro), ou questionando o que eu tanto fazia no computador e perguntado qual o horário que acabava (Maria Clara).

Aos meus avós maternos Maria e Antônio, que estavam ao meu lado, cuidando de mim, na ausência dos meus pais. Meus avós paternos Maria (*in memoriam*) e Bento, por fazer parte da minha vida como grandes exemplos. Á todos os familiares obrigada por entender que este momento precisava de “reclusão”.

Destaco e agradeço a meu orientador, Daniel Badauê, pela orientação prestada e paciência. Serei eternamente grata pela oportunidade e por me ajudar a trilhar este caminho com condutas éticas e coerentes, lapidando minhas ideias e refletindo sobre as possibilidades. Como também, pela inspiração no amadurecimento do conhecimento e conceitos que me levaram a conclusão deste trabalho.

Aos pós-graduandos do Laboratório de Neuroendocrinologia Básica e Comportamental (LANBAC), Patrícia, Cibelle, Iura, Daniele e Júlio por compartilharem as

alegrias e anseios gerados no mestrado. Em especial à Patrícia e Cibelle, por me ajudarem no amadurecimento da minha pesquisa na teoria e prática. Aos alunos de iniciação científica Tharcianny, Maurício, Loic, Timna, Erika e Franciele pela ajuda com a manutenção dos animais, escuta, confecção dos aparatos, padronização das técnicas e enfim nas coletas, as sextas-feiras à noite foram de muito trabalho e sem dúvida divertidas.

Aos professores, Ronaldo Santos e Flávia Teixeira, por participarem como ativos colaboradores, obrigada por permitirem fazer um pouco do que vocês fazem e pelo aprendizado que será contido durante minha caminhada acadêmica. Ao Prof. Murilo, por ser esta pessoa iluminada e solícita com os anseios, o senhor é um exemplo a ser seguido e agradeço muito por sua presença engrandecedora no dia-a-dia. A Prof. Rosana Givigi, que participa da minha formação desde a graduação e continua presente no amadurecimento do meu fazer e apoiando nas minhas decisões.

Aos membros do Laboratório de Neurofisiologia (LNFS) e Laboratório de Fisiologia do Comportamento (LAFICO), por permitirem que boa parte dos meus experimentos fossem realizados no ambiente de vocês, pelo respeito e compreensão nas práticas executadas. Em especial, Tiago Costa, por ter doado seu tempo, para minhas constantes indagações, apoio técnico importante para execução deste trabalho e diversos fins de semana à noite, para execução dos experimentos de ansiedade. Além de, participar deste projeto com ética e responsabilidade. A Katty Anne, que me doou suas sextas-feiras a noite durante cinco meses de coleta e participou como uma grande companheira deste processo. A Lívia Lins, por sempre ser um ponto de referência nos experimentos comportamentais de memória, pelas considerações importantes na escrita e no meu fazer durante este período. A Giordano por me ajudar na padronização do teste de reconhecimento de objetos, pelas discussões incansáveis sobre estatística que de fato me ajudaram nesta reta final do mestrado.

A Fabíula e Ana Carla por estarem presentes nas coletas, nos meus treinos de apresentações, na confecção dos slides, na escrita, por melhorar minha relação com o “zotero”, por abrirem as portas do Laboratório de Farmacologia do Processo Inflamatório (LAFAPI) e pelo apoio incondicional nos momentos de dificuldades. Agradecer, também, ao Prof. Enilton por esta permissão de acesso ao LAFAPI que foi importantíssima para execução deste trabalho.

Aos discentes e docentes do PROCFIS agradeço a todos pela boa relação. Trago em especial que direta ou indiretamente participaram durante este processo: Rachel Cintra, Marina Freire, Betânia Carvalho, Mateus Lima, Larissa Resende e Fabrício Macedo. Ao Sr. Osvaldo e Sr. Adilson, por me ajudarem na manutenção dos animais.

Aos pesquisadores do Grupo de Estudos em Linguagem e Comunicação Alternativa (GeLC) pela amizade, construções, sorrisos, escuta que trouxeram reflexões importantes para minha formação.

As minhas amigas, em especial, Flávia Lôbo, Márcia Barbosa, Dayseanne Rodrigues, Juliana Barbosa, Dayane Moraes, Jakeline Rocha, Marquise Oliveira, Rafaela Santos e Fernanda Mendonça, pelo apoio incondicional nos momentos de dificuldades. Vocês trouxeram muitos sorrisos e parceria acalentadora, pois estavam do meu lado entre idas e vindas, muitas vezes em distância física.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida.

Por fim, e com medo de ser injusta, agradeço a todos meus colegas e amigos que colaboraram de uma forma ou de outra nessa minha jornada. Foi engrandecedor ter vocês ao meu lado, neste momento de grande aprendizado e amadurecimento pessoal e profissional, este trabalho tem um pouco de todos vocês.

RESUMO

MEMÓRIA, ANSIEDADE E FUNÇÃO MOTORA NA PROLE DE RATAS COM HIPOTIREOIDISMO GESTACIONAL, Edênia da Cunha Menezes, São Cristóvão, 2014.

Os hormônios tireoidianos (HTs) maternos são essenciais para o desenvolvimento orgânico do feto, sobretudo na maturação do sistema nervoso central. Alterações na concentração dos HTs maternos durante a gestação podem implicar no aparecimento de distúrbios orgânicos diversos ao longo da vida da prole. O objetivo do estudo foi investigar as repercussões da carência dos hormônios tireoidianos maternos durante a gestação na memória, ansiedade e função motora na prole de ratas. O hipotireoidismo foi induzido pela administração *ad libitum* de metimazol 0,02% na água de beber, do 9º dia de gestação até o dia do parto. Aos 75 e 120 dias pós-natal (75 e 120 DPN), machos das proles de mães hipotireoidianas (PMH) e eutireoidianas (PME) foram submetidos aos testes de alternância espontânea (TAE), reconhecimento de objetos (RO), placa perfurada (PP), paradigma da exploração livre (PEL), teste de catalepsia (TC) e campo aberto (CA). Para avaliar memória de curto prazo foram utilizados TAE e RO. Ansiedade estado e traço foram avaliadas respectivamente pelo teste de PP e pelo PEL. A função motora foi acessada pelo TC e CA. Os dados obtidos foram analisados por meio dos testes de homocedasticidade (Levene) e de normalidade (Shapiro-Wilks). Para dados com distribuição normal e homocedásticos foram realizados os testes *t de Student* não pareado e de uma amostra. Dados não normais ou não homocedásticos foram analisados pelo teste não paramétrico de Mann Whitney. Quando sob influência de dois fatores de variação, os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni. O TAE e o RO mostraram que PMH têm comprometimento da memória de curto prazo. O TAE revelou que a PMH apresentou menor porcentagem de alternâncias completas quando comparada a PME, tanto aos 75 quanto aos 120 dias pós-natal (DPN), ($p < 0,001$; $p < 0,01$, respectivamente). Aos 75 e 120 DPN, a PMH não foi capaz de discriminar o objeto novo do antigo ($p = 0,26$; $p = 0,70$, respectivamente) no RO. Somente aos 120 DPN se observou menor tempo total de exploração de objetos na PMH, independente da sessão ($p < 0,01$). Menor estado ansioso foi evidenciado na PMH pelo maior número de *head-dip* na PP, tanto aos 75 DPN ($p < 0,05$) como aos 120 DPN ($p < 0,05$), bem como pelo maior tempo de permanência no *head-dip*, somente aos 120 DPN ($p < 0,01$). Por outro lado, não foram identificadas mudanças no perfil ansioso da PMH submetidas ao PEL em nenhuma das idades estudadas. Aumento do comportamento de catalepsia foi observado na PMH, que apresentou maior o tempo de permanência na barra do aparato, tanto aos 75 DPN ($p < 0,05$) quanto aos 120 DPN ($p < 0,01$). A ambulação no CA não diferiu entre os grupos. Assim, este trabalho demonstrou, pela primeira vez, que a carência de HTs maternos durante gestação reduz a memória de curto prazo, a função motora e a ansiedade estado da prole de ratas. O aumento do comportamento de catatonia na PMH aventa ainda a possibilidade de perda de motivação e/ou anedonia.

Palavras chave: hipotireoidismo gestacional; sistema nervoso; memória; ansiedade; função motora; rato.

ABSTRACT

MEMORY, ANXIETY AND MOTOR FUNCTION IN OFFSPRING OF RATS WITH GESTATIONAL HYPOTHYROIDISM, Edênia da Cunha Menezes, São Cristóvão, 2014.

Maternal thyroid hormones (THs) are crucial for fetal development, especially to the central nervous system. Changes in maternal THs levels during pregnancy can result in many organic disorders over the life of the offspring. We aimed to investigate the impact of the lack of maternal THs during the pregnancy in the memory, anxiety and motor function in the offspring. Hypothyroidism was induced by *ad libitum* administration of 0.02% methimazole (MMI) in drinking water, from 9th day of pregnancy until delivery day. At 75 and 120 postnatal day (75 and 120 PND), the offspring (males) from MMI-treated dams (OMTD) and water-treated dams (OWTD) were subjected to different tests: i. spontaneous alternation (SAT), object recognition (OR), hole board (HB), free exploration paradigm (FEP), catalepsy (CT) and open field (OF). To evaluate short term memory we used SAT and OR. State and trait anxiety were evaluated by HB and FEP, respectively. The motor function was accessed by CT and OF. Statistical test for homoscedasticity (Levene) and normality (Shapiro-Wilks) were applied. Data with normal distribution and homoscedastic were analyzed by unpaired one sample t-test. Non-normal and non-homoscedastic data were analyzed by non-parametric Mann Whitney test. When required, two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc was used. Both, SAT and OR showed that OMTD had lower short term memory. In SAT, OMTD presented lower percentage of complete alternations compared to OWTD, at 75 and 120 PND, ($p < 0.001$; $p < 0.01$, respectively). At 75 and 120 PND, OMTD were not able to discriminate new and old objects ($p = 0.26$; $p = 0.70$) in OR test. OMTD spent less time exploring both objects, but only at 120 PND, regardless of the session ($p < 0.01$). A decreased anxiety state was evidenced in OMTD by the increased number of head-dip on the HB test, both at 75 ($p < 0.05$) and 120 PND ($p < 0.05$), as well as by the increase in time spent in head-dip, only at 120 PND ($p < 0.01$). Moreover, no changes were observed on the anxiety profile of OMTD subjected to FEP in both studied ages. We also observed an increase on the cataleptic behavior on OMTD, by the greater time spent in the apparatus bar, both at 75 ($p < 0.05$) and 120 PND ($p < 0.01$). The ambulation on OF didn't differed between the groups. Thus, this study demonstrated, for the first time, that the lack of maternal THs during the pregnancy reduces the short-term memory, motor function and state anxiety of offspring of rats. The increased catatonic behavior in OMTD suggests loss of motivation and/or anhedonia.

Key words: gestational hypothyroidism; nervous system; memory; anxiety; motor function; rats

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Efeito do hipotireoidismo gestacional experimental na memória de curto prazo, avaliada pelo teste de alternância espontânea.....	43
Figura 2. Efeito do hipotireoidismo gestacional experimental na memória de curto prazo, avaliada pelo teste de reconhecimento de objetos	45
Figura 3. Efeito do hipotireoidismo gestacional experimental na ansiedade estado, avaliada pelo teste de placa perfurada	46
Figura 4. Efeito do hipotireoidismo gestacional experimental na ansiedade traço, avaliada pelo paradigma da exploração livre.....	47
Figura 5. Efeito do hipotireoidismo gestacional experimental na catalepsia, avaliada pelo teste de catalepsia.....	48
Figura 6. Efeito do hipotireoidismo gestacional experimental na função motora, avaliada pelo campo aberto.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE - acetilcolinesterase

AMPC - monofosfato cíclico de adenosina

ANOVA – análise de variância

ATPase – enzima adenosina trifosfato

BDNF – fator neurotrófico derivado do cérebro (*brain-derived neurotrophic factor*)

CA – Campo Aberto

Cam - Calmodulina

CEPA – Comitê de Ética em Pesquisa com Animais

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

D1 – deiodase tipo 1

D2 – deiodase tipo 2

D3 – deiodase tipo 3

DBCA – Diretriz Brasileira Para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos

DG – dias de gestação

DNA – ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)

DNPM – Desenvolvimento neuropsicomotor

DPN – dia pós-natal

EGF – fator de crescimento epidermal (*epidermal growth factor*)

GABA - ácido gama-aminobutírico

HGE – hipotireoidismo gestacional experimental

HHT – hipotálamo pituitária tireóide

HTs – Hormônios Tireoideanos

I - iodeto

LTP – Long-term potentiation

ME – mães eutireoidianas

MH – mães hipotireoidianas

MTZ – metimazol

PEL – paradigma da exploração livre

PKC – proteína cinase C

PME – prole de mães eutireoidianas
PMH – prole de mães hipotireoidianas
PP – Placa Perfurada
PTU – propiltiouracil
QI – quociente de inteligência
r'T3 – T3 reverso
RO – Reconhecimento de Objeto
TC – Teste de Catalepsia
TDP – total de distância percorrida
SN – sistema nervoso
SNC – sistema nervoso central
T3 – triiodotironina
T4 – tiroxina
TAN - Tempo no ambiente novo
TAE – Teste de Alternação Espontânea
TBG - globulina transportadora da tiroxina
TG – tireoglobulina
TRH – hormônio liberador de tireotropina
TRs – receptores tireoideanos
TSH – hormônio estimulante da tireoide
UFS – Universidade Federal de Sergipe

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	14
2.	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1.	Programação Intrauterina.....	17
2.2.	Síntese dos hormônios tireoidianos	18
2.3.	Atividade das deiodases	19
2.4.	Receptores tireoidianos	21
2.5.	Regulação neuroendócrina do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide	22
2.6.	Função tireoidiana e gestação	22
2.7.	Hipotireoidismo e sistema nervoso	24
2.8.	Hormônios tireoidianos e memória.....	25
2.9.	Hormônios tireoidianos e ansiedade	27
2.10.	Hormônios tireoidianos e função motora.....	28
3.	OBJETIVOS.....	30
3.1.	Objetivo geral.....	30
3.2.	Objetivos específicos	30
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1.	Animais utilizados	31
4.2.	Aspectos éticos.....	31
4.3.	Procedimentos experimentais	32
4.4.	Acasalamento.....	34
4.5.	Drogas utilizadas.....	34
4.6.	Método de eutanásia	35
4.7.	Testes comportamentais.....	35
4.7.1.	Avaliação da memória.....	35
4.7.1.1.	Teste de alternância espontânea (TAE).....	35
4.7.1.2.	Teste de reconhecimento de objetos (RO)	37
4.7.2.	Avaliação da ansiedade traço e ansiedade estado.....	39
4.7.2.1.	Paradigma da exploração livre (PEL)	39
4.7.2.2.	Teste da placa perfurada (PP).....	40

4.7.3.	Avaliação de parâmetros motores	41
4.7.3.1.	Teste de catalepsia (TC).....	41
4.7.3.2.	Atividade geral em campo aberto (CA)	41
4.8.	Análise estatística.....	42
5.	RESULTADOS	43
5.1.	Teste de Alternação Espontânea	43
5.2.	Teste de Reconhecimento de Objeto.....	44
5.3.	Teste de Placa Perfurada.....	46
5.4.	Paradigma da exploração livre.....	47
5.5.	Teste de Catalepsia	48
5.6.	Atividade geral em campo aberto	49
6.	DISCUSSÃO.....	50
7.	CONCLUSÃO.....	60
8.	PERSPECTIVAS	61
9.	REFERÊNCIA	62

1. INTRODUÇÃO

Inúmeros distúrbios orgânicos e comportamentais, comumente diagnosticados, não têm suas etiologias seguramente determinadas. Neste contexto, recentes abordagens experimentais têm imputado valor aos eventos ocorridos durante a vida intrauterina como decisivos no aparecimento destas doenças em diferentes momentos da vida pós-natal (ENTRINGER et al., 2011; FOWDEN; FORHEAD, 2004a).

O desenvolvimento intrauterino é um processo complexo e dinâmico que se caracteriza como o resultado da interação de fatores ambientais (maternos) e fetais em mamíferos. O desenvolvimento fetal adequado depende de condições ideais para a manutenção da biodisponibilização de fatores pró-proliferativos, de crescimento e diferenciação celular, característicos desse processo (FOWDEN et al. 2006; KANAKA-GANTENBEIN et al. 2010).

Os hormônios tireoidianos (HTs) exercem ações fisiológicas essenciais na regulação do crescimento e desenvolvimento dos diversos sistemas orgânicos, sobretudo no sistema nervoso central e, ativamente, das funções motoras, memória e ansiedade (VENERO et al., 2005). Os HTs também afetam a síntese e degradação de outros hormônios e fatores de crescimento e, assim, indiretamente, influenciam a sinalização endócrina (SMITH et al., 2002). A carência na produção ou na atuação dos hormônios tireoidianos (HTs) leva ao quadro de hipotireoidismo (PATEL et al., 2011).

Dados epidemiológicos recentes (BLATT, 2011), utilizando o mais novo critério de diagnóstico do hipotireoidismo, que considera valores de corte mais baixos para a normalidade de TSH, têm apontado, que em humanos, o hipotireoidismo é mais prevalente do que descrito em estudos anteriores. De acordo com este estudo, ele ocorre em 15,5% das mulheres norte-americanas gestantes, entre 18 e 40 anos. Dentro desta prevalência estão agrupados os hipotireoidismos clínico e subclínico (BLATT, 2011; KLEIN et al., 1991; LI et al., 2010; VAIDYA et al., 2007). Neste contexto, ressalta-se que, em períodos críticos da gestação, o feto de mamíferos encontra-se inapto a suprir, sozinho, as suas necessidades de HTs. Assim, os HTs maternos são essenciais para o adequado desenvolvimento do feto (KLEIN et al., 1991; VAIDYA et al., 2007).

As baixas concentrações de HTs promovem alterações generalizadas no desenvolvimento e maturação do sistema nervoso (SN) (FOWDEN; SILVER, 1995). As ações moleculares desses hormônios modificam a expressão de receptores, de canais iônicos, de transportadores e de proteínas do citoesqueleto (PASCUAL; ARANDA, 2012).

A ocorrência dessas alterações devido a insuficientes quantidades dos HTs, durante a vida intrauterina, juntamente com fatores ontogenéticos, por exemplo, a ansiedade materna, podem predispor o feto a manifestar diversos distúrbios orgânicos e comportamentais mais tardiamente, ao longo de toda a vida da prole (FOWDEN; FORHEAD, 2004b).

Ademais, deve-se destacar que já é bem conhecida a influência da carência severa de HTs maternos sobre o desenvolvimento orgânico do feto, que em geral produz aborto, malformação, deslocamento prévio da placenta, prematuridade, baixo peso ao nascer, hipertensão materna, entre outros distúrbios (BUCKSHEE et al., 1992; WASSERSTRUM; ANANLA, 1995).

Porém, pouco se sabe a respeito da carência mais branda, e muitas vezes subclínica, do aporte materno de HTs ao feto. Soma-se a isto, a existência de diversos distúrbios funcionais cognitivos, mnemônicos, motores e emocionais, ainda sem etiologia conhecida em humanos. Sendo assim, estariam estes distúrbios implicados com a carência mais branda de HTs maternos durante este período crítico (i.e.: vida intrauterina) para o desenvolvimento fetal?

É sabido que diversos protocolos experimentais estão disponíveis para indução de hipotireoidismo clássico em roedores. Dentre eles a tireoidectomia total ou parcial, a restrição de iodo na dieta, a administração de iodo radioativo, e a administração de diferentes concentrações de drogas antitireoidianas como metimazol e propiltiouracil (PTU) (ARGUMEDO; SANZ; OLGUÍN, 2012). No entanto, um modelo experimental que mimetizasse o hipotireoidismo mais brando, ou seja, sem a presença de sinais clínicos aparentes na gestante e sem impedir o curso da gestação e o desenvolvimento “aparentemente normal” dos fetos, poderia ser de grande valia para o estudo dos reais impactos da hipofunção tireoidiana subclínica no desenvolvimento funcional da prole (ALVES et al., 2013).

Neste contexto, estudos têm demonstrado que a oferta de metimazol *ad libitum*, a 0,02% na água de beber, portanto bem abaixo das concentrações utilizadas em estudos clássicos de indução de hipotireoidismo, poderia atender a esta demanda. Nestes estudos, em que MMI foi ofertado a partir do nono dia de gestação, observou-se que a inexistência de prejuízos aparentes para a gestante, que não sofre mudança no seu escore corporal, e tampouco para a gestação, que dura o mesmo tempo da observada em gestantes eutireoidianas, e produz ninhadas de mesmo tamanho. Além disso, os filhotes nascem com peso corporal semelhantes aos das ninhadas controle (ALVES et al., 2013). Deve-se destacar ainda, que no protocolo utilizado neste estudo, a administração de MMI produz hipotireoidismo que progride lentamente até o final da gestação, quando coincide com o início da função tireoidiana fetal (DE CARO et al., 2012; HASEBE et al., 2008).

Contrariamente, protocolos que induzem hipotireoidismos mais severos elevam o número de natimortos, a incidência de anormalidades anatômicas e/ou morfológicas ao nascer, menor peso ao nascer (HAPON et al., 2003). Ademais, não faltam dados na literatura sobre os impactos negativos aparentes de hipotireoidismos considerados severos não compensados (não tratados) sobre o desenvolvimento da prole. Portanto, este não é o objetivo do presente estudo.

Portanto, este estudo se fez necessário pelas poucas evidências acerca das repercussões do hipotireoidismo gestacional menos severo na memória, ansiedade e função motora, além da alta prevalência de hipotireoidismo materno durante a gestação e da conhecida influência dos HTs maternos no desenvolvimento fetal.

Este modelo experimental pode permitir identificar os mecanismos biológicos afetados e fornecer subsídios teóricos que permitam um delineamento de abordagens terapêuticas mais adequadas para os distúrbios observados na prole de mães com hipotireoidismo. Além disso, os achados obtidos no presente estudo devem reforçar a recente ideia de instituição compulsória do rastreamento da função tireoidiana materna nas políticas públicas de saúde, o que ainda não é mandatório em muitos países, inclusive no Brasil.

Neste contexto, o presente estudo avaliou as repercussões do hipotireoidismo gestacional experimental na memória, ansiedade e função motora da prole de ratas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Programação Intrauterina

O desenvolvimento do feto durante o período gestacional corresponde a um processo complexo e que envolve múltiplos mecanismos em um curto período. Para que ocorra o crescimento fetal ideal é necessária a interação de fatores maternos e fetais, dentre eles os hormônios. Em condições normais tem-se um ambiente que mantém os índices ideais de proliferação, crescimento e diferenciação, característicos desse momento (WARNER; OZANNE, 2010).

Assim, distúrbios que prejudiquem a interação de fatores fetais e maternos, podem comprometer o desenvolvimento do feto e resultar em consequências na vida pós-natal. Portanto, o comprometimento da plasticidade característica da vida intrauterina pode permanentemente influenciar o binômio saúde-doença a curto, médio e longo prazo. Por exemplo, há evidências de que a restrição do crescimento intrauterino, devido tanto a fatores maternos, como placentários e genéticos, podem alterar o desenvolvimento do cérebro do feto (KANAKA-GANTENBEIN, 2010).

A hipótese da *origem fetal das doenças nos adultos* foi inicialmente proposta por Barker (1989) que realizou estudo epidemiológico nas cidades inglesas de Hertfordshire, Preston e Sheffield. No estudo foi demonstrado que a mortalidade por doença coronariana na vida adulta era duas vezes maior nos indivíduos que se localizavam no limite inferior da curva de distribuição do peso ao nascimento, o que ficou conhecido como “Hipótese de Barker”.

Períodos de rápida divisão celular ocorrem durante o desenvolvimento do feto, conhecido como períodos críticos, nos quais são formados os diversos órgãos e tecidos. De acordo com Barker (1993), eventos ocorridos durante estes períodos podem alterar a estrutura e função dos sistemas em desenvolvimento gerando consequências precoces e/ou tardias.

Após a proposição de Barker (1989), ganha força o conceito que estabelece a influência do ambiente, especialmente o ambiente perinatal, sobre o genótipo. Este campo do saber é denominado de epigenética (RAO; PADMAVATHI; RAGHUNATH, 2012; SUTER; ANDERS; AAGAARD, 2013). Desde então, diversos pesquisadores têm se dedicado ao estudo das bases moleculares da epigenética. Atualmente, é sabido que mudanças conformacionais nas fitas de DNA, decorrentes de reações, por exemplo, metilação e modificação das histonas dos mesmos, impedem a adequada expressão gênica dos segmentos de DNA acometidos, ainda que a genotipagem não seja capaz de detectar qualquer alteração na sequência de bases de nucleotídeos (RUCHAT; HIVERT; BOUCHARD, 2013).

Quando em concentrações plasmáticas maternas inadequadas, os HTs, que atravessam facilmente a barreira placentária e exercem importante função na regulação do crescimento e desenvolvimento orgânicos, apresentam alto potencial para reprogramar os sistemas biológicos fetais, que podem passar a funcionar indevidamente desajustados. Adicionalmente, o momento da vida intrauterina em que o insulto ocorre, afeta de modo diferente os sistemas biológicos. Isto porque a organogênese dos diferentes tecidos ocorre de acordo com padrões de desenvolvimento próprios (GICQUEL; EL-OSTA; LE BOUC, 2008).

2.2. Síntese dos hormônios tireoidianos

A glândula tireoide é constituída por uma grande quantidade de folículos preenchidos por substância colóide. As células que compõem esta glândula são as células foliculares, tireócitos, o lúmen folicular é composto de tireoglobulina. Cada molécula de tireoglobulina contém o aminoácido tirosina em sua composição, sendo esta a base de construção para os hormônios tireoidianos (KIRSTEN, 2000). A tireoglobulina, produzida no citoplasma da célula da tireoide, é depositada no lúmen folicular, servindo como matriz para a síntese e o armazenamento dos hormônios tireoidianos (BERNAL; GUADAÑO-FERRAZ; MORTE, 2003a).

A síntese de hormônios tireoidianos está diretamente ligada ao iodo e envolve alguns passos básicos (CARAYANNIOTIS, 2007). Primeiramente, o iodo proveniente da dieta é absorvido pelo trato digestório e transportado para a corrente sanguínea onde é captado para o interior da glândula tireoide, através da membrana basolateral dos tireócitos (COLIN et al., 2013). O iodo captado pela célula folicular será oxidado e convertido para sua forma ativa (I⁻) pela enzima tireoperoxidase (COLIN et al., 2013; COOPER, 1984).

A tireoperoxidase é responsável pela catálise da incorporação do I⁻ aos resíduos tirosina e pela ligação das moléculas de iodotirosina na tireoglobulina, o qual determinará a formação dos hormônios tireoidianos. As moléculas de tirosina iodinadas são agrupadas formando as moléculas dos hormônios tireoidianos. Uma diiodotirosina acrescida de uma monoiodotirosina resultará na 3,5,3' triiodotirosina (T3), já duas diiodotirosinas irão formar a tiroxina (T4) (GHAFOOR, 2006).

Após a sua formação, uma parte dos HTs fica armazenada e uma parte é liberada pela ação do hormônio estimulante da tireoide (TSH). A produção diária de T3 é de aproximadamente 20% do total de hormônios produzidos pela glândula tireoide, a qual é liberada diretamente na circulação pela glândula tireoide, já que a maior parte da conversão de T4 em T3 se dá em tecidos periféricos (CASSIO et al., 2003). Este processo no qual o precursor do T4 é convertido na forma ativa do hormônio T3 é conhecido como deiodinação central e periférica (WU et al., 2005).

2.3. Atividade das deiodases

As reações de deiodinação são catalisadas por três enzimas, denominadas iodotironinas deiodases tipo 1 (D1), tipo 2 (D2) e tipo 3 (D3). Essas enzimas possuem características distintas baseadas na distribuição tecidual, substrato de preferência, cinética e sensibilidade a inibidores (BIANCO et al., 2002; ST GERMAIN; GALTON, 1997).

A atividade coordenada das deiodases nos diferentes tecidos confere homeostase plasmática dos HTs, assim como uma adequada exposição dos tecidos a esses hormônios. A concentração tecidual de T3 varia conforme o transporte do hormônio para o tecido e a atividade local das deiodases, capazes de aumentar ou diminuir o T3, independente das concentrações séricas dos HTs (DONALD L. GERMAIN; GALTON; HERNANDEZ, 2009; SILVA; LARSEN, 1983).

A D1 é uma proteína integral de membrana. Em ratos, essa enzima é encontrada principalmente na tireoide, fígado, rim, hipófise, SNC, intestino e músculo (BIANCO et al., 2002; CHOPRA; TAING; MIKUS, 1996; LISBOA et al., 2003) . Sua expressão aumenta em resposta aos HTs, tanto em ratos como em humanos (BIANCO et al., 2002). A D1 apresenta sua atividade aumentada no hipertireoidismo, diminuída no hipotireoidismo, sendo bloqueada pelo uso de propiltiouracil (PTU), um composto antitireoidiano que também inibe a atividade da tireoperoxidase e, por conseguinte, a biossíntese dos HTs (GEREBEN et al., 2008).

Da mesma forma, a D2 é uma proteína transmembrana, também localizada no retículo endoplasmático. Essa enzima é altamente expressa no sistema nervoso central (SNC), na hipófise, no tecido adiposo marrom e placenta. A D2 regula a concentração intracelular de T3 (SILVA; LARSEN, 1985).

A D3 é a principal enzima inativadora dos HTs, localizada na membrana plasmática, com maior parte de sua molécula na face extracelular. Essa enzima é muito expressa nos tecidos em desenvolvimento, principalmente no SNC, embora também seja detectada em tecidos como pele, placenta e fígado de humanos e em ratos (BATES et al., 2000). A D3 apresenta sua atividade aumentada no hipertireoidismo e diminuída no hipotireoidismo. No entanto, gera apenas produtos inativos, rT3 e 3,3'T2, a partir do T4 e T3, pois atua removendo o iodo da posição 5 destas iodotironinas (CROTEAU et al., 1995).

2.4. Receptores tireoidianos

As ações biológicas dos HTs dependem de forma importante de sua interação com receptores de alta afinidade (receptores tireoidianos - TRs), localizados no núcleo das suas células alvo. Os TRs são fatores de transcrição dependentes de ligante codificados por dois genes diferentes α e β (THOMPSON; EVANS, 1989; FLAMANT; SAMARUT, 2003). Cada um destes genes codifica várias proteínas (TR α 1, TR α 2, TR β 1, TR β 2, TR β 3) que são resultado do processamento alternativo do ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) (FLAMANT; SAMARUT, 2003; ROBERTS; LADENSON, 2004)

O TR α 1 e TR β 1 seriam as formas biologicamente ativas desses receptores, enquanto o TR α 2 é o único que não tem capacidade de ligar-se ao hormônio e ao sítio de ligação no ácido desoxirribonucleico (DNA), assim, atua como antagonista da transcrição gênica mediada pelos outros TRs (BAXTER; TYRRELL, 1994; ROBERTS; LADENSON, 2004).

Os receptores TR β 1 e TR β 2 contribuem na regulação da liberação do hormônio liberador de tireotropina (TRH), pois estas isoformas são expressas no hipotálamo e na hipófise. O TR β 3 é também uma forma biologicamente ativa e está expresso, em ratos, no fígado, rim e pulmão. Esses receptores possuem papel chave no mecanismo de *feedback* negativo que os HTs circulantes desempenham sobre a produção hipotalâmica e pituitária de TRH e TSH, respectivamente (DUPRÉ et al., 2004).

Os HTs classicamente regulam a expressão gênica ao se ligar a receptores tireoidianos de alta afinidade que reconhecem elementos de respostas específicas por meio de genes alvos. Tal efeito resulta na ativação ou inibição da transcrição desses genes. Entretanto, alguns efeitos dos HTs ocorrem rapidamente e não são afetados por inibidores de transcrição e tradução, devido à mediação do T3 em ações não-genômicas. Esses efeitos já foram descritos em muitas células e tecidos, incluindo tecido adiposo marrom, coração e hipófise (BASSETT; HARVEY; WILLIAMS, 2003).

A ação não-genômica ocorre pela regulação de canais iônicos, fosforilação oxidativa e transcrição gênica mitocondrial que envolve a geração de segundos

mensageiros intracelulares e indução de cascata de sinalização levando a um aumento da concentração de cálcio intracelular, AMP-c e ação das proteínas cinases (BASSETT; HARVEY; WILLIAMS, 2003).

2.5. Regulação neuroendócrina do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide

O eixo hipotálamo-hipófise-tireóide (HHT) é o principal regulador da função tireoidiana. Neurônios hipotalâmicos produtores de TRH possuem seus pericários localizados predominantemente no núcleo paraventricular (BAXTER; TYRRELL, 1994; VOLPATO; NUNES, 2001). Seus terminais axonais fazem contatos sinápticos com capilares da capsula externa da eminência média do hipotálamo onde liberam o TRH.

Após a captação capilar, o neuropeptídeo alcança os tireotrofos hipofisários pelo sistema porta hipotálamo-hipofisário, promovendo a produção e a secreção de tireotropina, ou hormônio tireoestimulante da tireoide (TSH). O TSH estimula a síntese de tireoglobulinas, o processo de sequestro de iodeto e todas as etapas subsequentes para a formação de T3 e T4 (BAXTER; TYRRELL, 1994).

As ações que os HTs desencadeiam nas células alvo repercutem em efeitos biológicos marcantes na atividade dos vários tecidos e sistemas, o qual, eleva a expressão e a atividade de várias enzimas do metabolismo oxidativo, ATPases, transportadores iônicos e proteínas importantes (VOLPATO; NUNES, 2001).

2.6. Função tireoidiana e gestação

A gestação induz alterações funcionais na glândula tireoide interferindo, assim, na fisiologia tireoidiana por diversas vias. Durante a primeira metade da gestação até o termo há o aumento da concentração da globulina transportadora da tiroxina (TBG) decorrente dos níveis elevados de estrógeno que aumenta a síntese hepática e diminui a

depuração da TBG (GLINOER, 1997). Como consequência, os níveis de T3 e T4 total aumentam durante a gestação com tendência a situar-se no limite superior da normalidade (DAVID HOTELLING; SHUERWOOD, 1971).

Em humanos, a tireoide fetal começa a se desenvolver durante na décima semana de gestação é totalmente funcional na vigésima sexta semana de gestação. Em ratos, começa a se formar no décimo sexto dia gestacional e finaliza no sexto dia pós-natal. Atualmente é bem aceito que o desenvolvimento fetal, particularmente a maturação neuronal de mamíferos, é dependente de uma adequada concentração de T4 disponível nos tecidos fetais, que é então convertido a T3 para iniciar a ação dos HTs (MORREALE DE ESCOBAR; OBREGÓN; ESCOBAR DEL REY, 2000; HERC, 2013).

Basicamente, a fonte hormonal do embrião durante a gestação em mamíferos é materna. Assim, experimentos em ratos demonstraram que até mesmo pequenas deficiências de iodo materno são capazes de diminuir as concentrações de T4 do feto. Isto implica que as concentrações adequadas de T4 no soro materno são fundamentais para a manutenção das concentrações adequadas deste hormônio no embrião e para adequada conversão local em T3 (KLEIN et al., 1991).

Então, a maior mudança no funcionamento da tireoide associada ao período gestacional é no requerimento do aumento da produção dos HTs que são dependentes diretamente de um adequado suprimento na dieta de iodo e da integridade da glândula tireoide. Deste modo, a insuficiente ingestão de iodo pode modificar a homeostase dos de HTs (GLINOER, 2007; PEARCE, 2009a; SMALLRIDGE et al., 2005).

Dados epidemiológicos recentes (BLATT, 2011), utilizando o mais novo critério de diagnóstico do hipotireoidismo, que considera valores de corte mais baixos para a normalidade de TSH, têm apontado, que em humanos, o hipotireoidismo é mais prevalente do que descrito em estudos anteriores. De acordo com este estudo, ele ocorre em 15,5% das mulheres norte-americanas gestantes, entre 18 e 40 anos. Dentro desta prevalência estão agrupados os hipotireoidismos clínico e subclínico (BLATT, 2011; KLEIN et al., 1991; LI et al., 2010; VAIDYA et al., 2007).

Deve ser notado, entretanto, que áreas endêmicas de hipotireoidismo gestacional estão em regiões com acentuada deficiência na provisão de iodo,

destacando-se no contexto de prevalência mundial deste distúrbio (CASEY et al., 2005; NEGRO; MESTMAN, 2011). Essa deficiência de iodo em crianças pode levar a danos cerebrais, anomalias e produzir sequelas neurológicas severas (FENZI et al., 1990; GLINOER, 1999; VERMIGLIO et al., 1990). O hipotireoidismo na gestação é uma alteração no funcionamento da tireoide que se torna mais acentuada pelo aumento do requerimento na produção de HTs, levando a hipotiroxinemia e aumento sérico nos níveis de TSH (KRASSAS; POPPE; GLINOER, 2010).

No período gestacional, é fundamental o diagnóstico precoce do hipotireoidismo, uma vez que este pode trazer consequências para o concepto e para a própria gestante (LAZARUS, 2005). Nesse período, o organismo materno sofre uma série de modificações hormonais e metabólicas e a ocorrência de alguma falha na adaptação dessas mudanças fisiológicas que pode resultar em disfunções tireoidianas (MÄNNISTÖ et al., 2010).

2.7. Hipotireoidismo e sistema nervoso

Vários fenômenos do desenvolvimento do sistema nervoso são influenciados pelos HTs, como: crescimento axonal e neurítico, sinaptogênese, migração e sobrevivência neuronal, mielinização e eficácia sináptica (FENZI et al., 1990). Na ontogênese cerebelar, por exemplo, experimentos demonstraram que os hormônios tireoidianos atuam pela mediação do fator de crescimento epidermal (EGF), propiciando um aumento no número de astrócitos (GLINOER, 1999).

A regulação da liberação de neurotransmissores no hipocampo também se mostrou influenciada pela presença de HTs (THOMPSON; POTTER, 2000). Estudo sobre a proliferação celular na zona sub-ventricular do hipocampo demonstrou que o T3 e seu receptor alfa (TRa) desempenham um importante papel na neurogênese desta região (MARTINEZ; GOMES, 2002). Efeitos sobre a síntese de matriz extracelular também foram observados no cerebelo. A ausência dos hormônios tireoidianos, no cerebelo, foi responsável por atraso na expressão de laminina (proteína da lâmina basal) e redução nos seus níveis, quando comparado ao grupo controle (VARA et al., 2002).

A deficiência dos HTs durante a vida intrauterina e no período pós-natal mantém a imaturidade do SNC, leva a hipoplasia dos neurônios corticais, atrasa a mielinização e reduz a vascularização encefálica. Se a reposição hormonal não se fizer de imediato após o nascimento, essas lesões podem tornar-se irreversíveis, com prejuízo no desenvolvimento neuropsicomotor (DNPM) em humanos (GOODMAN; GILBERT, 2007; LEMKINE et al., 2005; SARLIÈVE; RODRÍGUEZ-PEÑA; LANGLEY, 2004).

Ademais, neonatos expostos a níveis consideravelmente reduzidos de HTs durante a vida uterina e durante a vida neonatal apresentaram, posteriormente, retardo no crescimento, defeitos neurológicos e desempenho reduzido em diversas habilidades cognitivas (CHAN; ROVET, 2003; MORREALE DE ESCOBAR; OBREGÓN; ESCOBAR DEL REY, 2000; PEARCE, 2009b; SHIBUTANI et al., 2009). A ação dos hormônios da tireoide sobre o sistema nervoso central ocorre, principalmente, do período intrauterino até os dois primeiros anos de vida em humanos. As consequências específicas da deficiência dependem do período e severidade da exposição (KOIBUCHI; CHIN, 2000).

Diferentemente do que ocorre em humanos, em ratos, parte do desenvolvimento do cérebro ainda ocorre após o nascimento, ao passo que em humanos este desenvolvimento é praticamente concluído durante a vida intrauterina (OWEN; BRENNER, 2012). Assim, possíveis implicações funcionais observadas na vida pós-natal em ratos, decorrentes da carência de HTs durante a vida intrauterina, poderiam ser, *a priori*, extrapoladas de modo ainda subestimados para humanos, que são aparentemente mais dependentes dos hormônios tireoidianos maternos no que diz respeito ao desenvolvimento do SN.

2.8. Hormônios tireoidianos e memória

O homem, entre outros animais, tem a capacidade notável de armazenar informações que são mediadas através da experiência, a memória. Esta, por sua vez, descreve as alterações comportamentais trazidas durante a vida (KANDEL; SQUIRE, 2000). A aprendizagem entra como processo para a aquisição dos conhecimentos,

enquanto a memória é o funcionamento pelo qual o conhecimento é codificado, armazenado e, posteriormente, recuperado (MOZZACHIODI; BYRNE, 2010).

Os mecanismos empregados pelo SNC para formar e armazenar diferentes tipos de memórias são múltiplos. As memórias podem ser didaticamente separadas pelo tempo compreendido entre a sua formação e a sua evocação. Desta forma podem ser classificadas como memória de curto prazo ou memória de longo prazo. O processo para a formação da memória de longo prazo requer eventos moleculares que duram várias horas e podem estar susceptíveis à influências durante este período de formação (IZQUIERDO et al., 1999, 2002).

A memória de curto prazo é encarregada de manter a informação disponível enquanto se consolida lentamente o traço de longa duração. Constitui somente a etapa inicial desse mecanismo consolidatório, e, muitas vezes, representa um processo mnemônico independente, mesmo que vinculada à memória de longo prazo. Trata-se de eventos por vezes paralelos. Ambas as memórias são processadas nas mesmas regiões: hipocampo, córtex entorrinal e o córtex parietal associativo (IZQUIERDO et al., 1999, 2002).

Em ratos, estudos moleculares e celulares revelam que a aprendizagem e memória são induzidas pela modulação de atividade sináptica que proporcionam alterações nas modalidades de transmissão química/elétrica entre os neurônios, ou seja, plasticidade sináptica (IZQUIERDO; MEDINA, 1997; IZQUIERDO et al., 2006). O descobrimento destes fenômenos neurais de curto prazo e o aumento da eficiência sináptica são mecanismos necessários para a consolidação da memória de longo prazo (COOKE; BLISS, 2006).

Essa estimulação por longo prazo, referenciada como um dos mecanismos para formação da memória de longo prazo, proporciona a modulação heterosináptica, que necessita de neurotransmissores, como a serotonina, proveniente de interneurônios modulatórios. Dentre outras proteínas, estão envolvidas na formação da LTP (*Long-term potentiation*), a proteína cinase C (PKC) e calmodulina (Cam) (COOKE; BLISS, 2006).

Os HTs estão diretamente relacionados com a regulação das bases moleculares da gênese das memórias. A carência de HTs determina o aumento na expressão da

Na⁺/K⁺-ATPase (CARAGEORGIU et al., 2005). Além disso, os HTs também afetam a liberação e síntese de neurotransmissores, por exemplo, serotonina e glutamato (AHMED; ABD EL-TAWAB; AHMED, 2010). Desta forma, participam diretamente da consolidação da memória, como demonstrado em estudo realizado em ratos (SCHMITT; MCDONOUGH, 1988a).

2.9. Hormônios tireoidianos e ansiedade

Genericamente, as emoções são constituídas por dois componentes, uma sensação física e um sentimento consciente. Estas percepções são mediadas por estruturas corticais cerebrais, especificamente pelo córtex cingulado e pelos lobos frontais. Porém, dada a complexidade destas circuitarias, deve-se considerar em similar grau de importância a interferência de componentes periféricos, autônomos, endócrinos e do sistema motor. Estas respostas envolvem, também, estruturas subcorticais tais como, a amígdala, o hipotálamo e o tronco encefálico (KANDEL; SQUIRE, 2000).

A ansiedade, por sua vez, é uma modalidade de emoção que pode ser constitutiva (ansiedade traço) ou adaptativa evocada por condições estressoras, ou seja, em resposta a uma ameaça potencial (ansiedade estado). A ansiedade estado representa, portanto, um estado emocional transitório e consiste em sensações de tensão, apreensão, nervosismo e aumento da atividade do sistema nervoso autônomo, em constante variação. O surgimento desta ansiedade pode estar relacionado a estímulos externos, mas pode abranger também eventos internos. Por outro lado, ansiedade traço provém de manifestações ansiosas estáveis ao longo do tempo (ENDLER; KOCOVSKI, 2001; SPIELBERGER, 1966).

Um estudo com ratos evidenciou aumento da ansiedade em animais na vida adulta com mutação no receptor tireoidiano TR α 1, provavelmente decorrente da redução do número de interneurônios GABAérgicos na região CA1 do hipocampo que foi observada. Assim, uma diminuição da atividade inibitória GABAérgica poderia levar à hiperatividade de neurônios hipocampais, resultando no aumento da emotividade e da ansiedade (VENERO et al., 2005). Em conjunto, alterações na excitabilidade

neuronal e na liberação de neurotransmissores, pela deficiência de hormônios tireoidianos, causam o aumento da ansiedade na vida adulta de ratos (SCHMITT; MCDONOUGH, 1988).

É sabido que o hipotireoidismo no período gestacional determina alterações importantes em diversos circuitos neurais da prole. Por exemplo, contrariamente ao já evidenciado em animais adultos, o hipotireoidismo em estágio inicial do desenvolvimento induz o aumento da concentração do GABA no cérebro (córtex cerebral), cerebelo e medula espinhal da prole de ratas (AHMED; ABD EL-TAWAB; AHMED, 2010). Neste sentido, no hipotireoidismo perinatal, se observa em ratos a diminuição da ansiedade estado (DARBRA et al., 2004).

2.10. Hormônios tireoidianos e função motora

Os hormônios tireoidianos, sobretudo durante a vida fetal, são críticos para o desenvolvimento do sistema locomotor como um todo. No SNC, de maneira abrangente, como foi dito previamente, são importantes para a diferenciação celular, migração e maturação neuronal de estruturas responsáveis pela função motora (ALVES et al., 2013; BERNAL; GUADAÑO-FERRAZ; MORTE, 2003b).

Ratos que tiveram hipotireoidismo perinatal apresentaram disfunção motora. Isso pode ser observado pelo atraso no desenvolvimento cerebelar destes animais. Vale destacar que essa alteração pode ser prevenida por meio de tratamento com T3 durante o período de desenvolvimento do cerebelo (HASEBE et al., 2008). Similarmente, o hipotireoidismo congênito promove prejuízo no desempenho locomotor de ratos machos (VENERO et al., 2005).

Em estudo clínico no qual se avaliou 57 crianças com diagnóstico de hipotireoidismo congênito, foi demonstrado um déficit importante nas suas habilidades motoras, particularmente em relação ao equilíbrio (FUGGLE et al., 1991). É conhecido que o controle de equilíbrio exato requer processamento central eficiente para gerar respostas motoras adequadas. Além destes aspectos, o fator neurotrófico derivado do

cérebro (BDNF), que eleva o tempo de viabilidade funcional dos neurônios motores, está menos expresso na prole quando da ocorrência do hipotireoidismo gestacional. Por isto, pode estar relacionado com atraso no desempenho motor durante o período pós-natal da prole (SINHA et al., 2009).

Portanto, neste estudo experimental de hipotireoidismo gestacional dentro do contexto de programação fetal, a prole possivelmente não apresenta hipotireoidismo na vida adulta, uma vez que esses ratos possuem níveis de T3 e T4 totais adequados, com 15 e 30 dias pós-natal, em estudo que utiliza o protocolo de indução de hipotireoidismo durante exclusivamente a gestação (ALVES et al., 2013). O presente trabalho se fez necessário pelas poucas evidências acerca das repercussões do hipotireoidismo gestacional na memória, ansiedade e função motora, além da alta prevalência de hipotireoidismo materno durante a gestação e da conhecida influência dos HTs maternos no desenvolvimento fetal.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar as repercussões da carência dos hormônios tireoidianos durante a vida intrauterina, nas funções cognitivas, motora e emoções na prole de ratas.

3.2. Objetivos específicos

Investigar, comparativamente, em machos adultos da prole de ratas eutireoidianas e hipotireoidianas:

- i. A memória de curto prazo;
- ii. A ansiedade estado;
- iii. A ansiedade traço;
- iv. A catalepsia; e,
- v. A deambulação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais utilizados

Foram utilizados 200 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, sendo 56 provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe –UFS e 144 prole das ratas adquiridas, como previsto no procedimento experimental deste projeto (prole de mães eutireoidianas e prole de mães hipotiroidianas). Tais animais foram mantidos na sala de manutenção e experimentação do Laboratório de Neuroendocrinologia Básica e Comportamental / DFS / UFS.

Durante todo o período, os animais tiveram livre acesso à água de torneira e ração específica para roedores (Labina, da marca Presence). As salas de manutenção dos animais e experimentação, localizadas no Laboratório de Neuroendocrinologia Básica e Comportamental (LANBAC, UFS), tiveram luminosidade controlada com ciclo claro-escuro de 12/12h (luz das 6 às 18h00), e temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

4.2. Aspectos éticos

Todos os procedimentos aos quais os animais foram submetidos estavam de acordo com as normas e princípios éticos preconizados pela Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização De Animais Para Fins Científicos e Didáticos – DBCA, bem como pelas Diretrizes da Prática de Eutanásia, ambas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Toda a equipe executora deste projeto estava ciente do conteúdo da lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 (Lei Arouca), em tempo para a execução do mesmo. O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPA) da Universidade Federal de Sergipe (UFS), sob o nº 39/13 (Anexo A). Todos os esforços foram feitos para minimizar o

número de animais a serem utilizados, bem como a geração de desconforto e sofrimento.

4.3. Procedimentos experimentais

Os experimentos seguiram o delineamento experimental a seguir.

Os animais foram separados em 3 categorias:

A **Categoria I**, composta por 56 fêmeas adultas (150 a 200g) acompanhadas para acasalamento programado. Cerca de 65% das ratas possuíram ciclo estral regular e emprenharam de modo programado. Confirmadas 36 gestações, 18 ratas foram submetidas ao protocolo de indução de hipotireoidismo durante a gestação (grupo de mães hipotireoidianas; MH) e 18 receberam veículo (grupo de mães eutireoidianas; ME), as quais foram acompanhadas para a produção dos ratos da **Categoria III**.

A **Categoria II**, por sua vez, foi composta por 15 ratos machos adultos (250 a 300g) para acasalamento com as fêmeas adultas da **Categoria I**. Estes machos foram utilizados em séries de acasalamento programado, em intervalos que variaram de 15 a 30 dias.

A **Categoria III** foi composta por 144 ratos, prole das ratas da Categoria I, sendo 72 ratos prole de mães eutireoidianas (PME) e 72 ratos prole de mães hipotireoidianas (PMH).

Assim, foram realizados os passos como descritos a seguir:

1. As 56 ratas da **Categoria I** foram acompanhadas para detecção do proestro e acasalamento com os ratos da **Categoria II**.

2. O dia da cópula foi confirmado através da detecção de espermatozoides pela análise colpocitológica, realizada com uma micropipeta feita de ponteira de polietileno acoplada a uma pipeta Pasteur contendo NaCl 0,9%. Este dia foi chamado dia zero de gestação (0 DG). As ratas foram posicionadas ventralmente na bancada, a cauda foi elevada e a vagina visualizada para posterior infusão da solução salina e sucção do lavado. A confirmação da gestação, foi realizada pela observação do diestro permanente

durante toda a primeira semana pós-cópula. Desta forma, das 56 ratas, 36 fêmeas ficaram prenhas.

3. No 9º dia de gestação, 18 ratas foram submetidas ao protocolo de indução do hipotireoidismo gestacional experimental (HGE, grupo de mães hipotireoidianas), e outras 18 receberam apenas veículo (i.e.: água de torneira) (grupo de mães eutireoidianas).

4. Ao final da gestação (dia do parto, ou seja, entre o 20º e o 22º dia de gestação), foi interrompida a administração da droga indutora do HGE (metimazol, vide capítulo “Drogas utilizadas” para maiores informações).

No dia 3 após o nascimento, os filhotes (**Categoria III**) foram sexados e mantidos até o desmame em ninhadas compostas sempre por 8 animais, sendo invariavelmente 4 fêmeas e 4 machos. Este procedimento visou evitar o efeito da composição da ninhada (relação machos/fêmeas) sobre o grau de requerimento das mães, uma vez que foi demonstrado que filhotes machos requerem mais cuidados maternos, o que pode afetar consideravelmente o comportamento das mães, e conseqüentemente dos seus filhotes (WEINSTOCK, 2011).

Os animais sobressalentes foram eutanasiados no momento da sexagem. No desmame, todas as fêmeas das Categorias I e III foram eutanasiadas conforme descrito em item específico, já que apenas os machos da Categoria III foram utilizados nos experimentos previstos neste projeto. Da mesma forma, os machos da Categoria II foram utilizados para acasalamentos em outros estudos em andamento no laboratório ou em outros laboratórios. Não havendo essa necessidade, eles foram eutanasiados após a realização dos acasalamentos. No dia 21 após o nascimento, a ninhada foi desmamada e os filhotes transferidos para caixas coletivas, com até 5 animais por caixa.

Os machos da **Categoria III** foram submetidos a procedimentos experimentais realizados em duas diferentes idades (aos 75 e 120 dias pós-natal; DPN). Cada procedimento teve em torno de 12 ratos controle (prole de mães eutireoidianas, PME) e 12 ratos prole de mães hipotireoidianas (PMH).

Aos 75 e 120 DPN, machos PME e PMH foram utilizados para os estudos comportamentais de memória, ansiedade e função motora. Para tanto, os mesmos

animais foram utilizados nos seguintes testes: **A) Memória e Função motora:** teste de alternância espontânea, teste de reconhecimento de objetos, teste de catalepsia e atividade geral em campo aberto; e **B) Ansiedade:** testes de ansiedade estado e ansiedade traço (respectivamente, placa perfurada e Paradigma da Exploração Livre – PEL).

4.4. Acasalamento

Enquanto não estavam gestantes, as fêmeas da **Categoria I** foram mantidas em caixas de policarbonato coletivas, com dois animais por caixa. Diariamente, por no mínimo uma semana antes do acasalamento, as ratas foram submetidas à análise colpocitológica para confirmação da regularidade de seu ciclo reprodutivo (ciclo estral). Quando estiveram na fase apropriada para acasalamento (Proestro), as fêmeas foram colocadas na presença de machos (**Categoria II**), na proporção de duas fêmeas para cada macho. Na manhã seguinte, as ratas foram novamente submetidas à análise colpocitológica para a verificação da presença de espermatozóides e, desta forma, confirmação da ocorrência de cópula. Em caso positivo, este foi determinado como sendo o dia zero da gestação (0 DG).

4.5. Drogas utilizadas

Para a indução de HGE foi utilizado o inibidor da iodoperoxidase, metimazol (MTZ), um metabólico ativo do carbimazol, pertencente ao grupo de tiocarbamidas com meia-vida plasmática entre 6-15 horas (ABRAHAM et al., 2005; DE CARO et al., 2012). O MTZ foi administrado *ad libitum* na concentração de 0,02% na água de beber (água de torneira) a partir do nono dia de gestação (DG) até o dia do parto (SALAROCCA et al., 2002). Esta concentração ofertada por 10 dias é capaz de gerar hipotireoidismo em ratas prenhas, visto que se evidencia redução nos níveis circulantes de T3 total e T4 total (ALVES et al., 2013). Esta solução foi protegida da luminosidade

e trocada a cada três dias. As fêmeas controle (ME) receberam água de torneira *ad libitum*, durante toda a gestação.

4.6. Método de eutanásia

Os animais utilizados nos estudos comportamentais de memória, ansiedade e função motora da **Categoria III**, e os animais da **Categoria I** e **II** foram eutanasiados através do método de dessangramento sob anestesia geral com tiopental sódico (40 mg/kg, *i.p.*).

4.7. Testes comportamentais

4.7.1. Avaliação da memória

4.7.1.1. Teste de alternância espontânea (TAE)

Este teste foi realizado em um labirinto, constituído de quatro braços fechados nas dimensões de 10 cm de largura e 40 cm de comprimento, com paredes de 40 cm de altura e teto aberto. A plataforma central tinha as dimensões de 10 x 10 cm. O labirinto estava elevado a uma altura de 50 cm da superfície do solo. Os ratos foram colocados no centro do labirinto para explorar livremente, durante dez minutos os 4 braços. Nesse tempo eles alternam espontaneamente entre os quatro braços utilizando informações dos braços previamente visitados e pistas ambientais (externas ao labirinto). Os braços do labirinto foram individualmente nomeados A, B, C e D. Dessa forma, para a realização do teste de alternância espontânea, foram registradas manualmente as sequências de entradas nos braços (Ex: ABCDBACDB).

Para avaliação do desempenho foi calculada a porcentagem de alterações (total de alterações realizadas/máximo de alterações possíveis x 100). O número

máximo de alterações completas possíveis corresponde ao total de entradas nos braços menos três. Foi considerada alteração quando o animal, após uma sequência de quatro entradas nos braços, não retornou a nenhum braço anteriormente visitado, ou seja, quando o animal entra em quatro braços distintos seguidamente sem repetir nenhum deles. Por exemplo, considere-se as situações a seguir:

EXEMPLO 1: Alteração perfeita

Durante todo o tempo do experimento o animal estabelece a seguinte sequência de entradas: **ABCDABCD**.

Para este caso foram realizadas 5 alterações completas das 5 possíveis, a saber: **ABCD**; **BCDA**; **CDAB**; **DABC** e **ABCD** novamente. Assim, calculando-se o índice de desempenho, este animal apresentaria 100% de desempenho.

EXEMPLO 2: Alteração sub-máxima

Aqui, suponha-se que durante todo o tempo do experimento o animal estabelece a seguinte sequência de entradas: **ABCCDABC**. Assim, da mesma forma, calcula-se que para 8 entradas, 5 alterações seriam possíveis.

Já neste caso, foram realizadas apenas 02 alterações completas dentre as 5 possíveis, a saber: **CDAB** e **DABC**. Assim, calculando-se o índice de desempenho, este animal apresentaria 40% de desempenho.

Interpretando o teste, parte-se do pressuposto que, quanto menor o índice de desempenho, medido pela porcentagem de alterações completas dentre as possíveis, maior será o déficit de memória de curto prazo, pois assume-se que este índice infere a propensão natural do rato em buscar sempre um novo braço, a despeito do braço recém visitado na sequência de alterações em andamento, ao longo de sucessivas sequências. Este teste é amplamente utilizado para esta finalidade por diferentes grupos de pesquisadores (DUDCHENKO, 2004; KOTERMANSKI; JOHNSON; THIELS, 2013).

Assim, neste teste foi analisada apenas a variável porcentagem de alterações realizadas, dentre as possíveis, durante os 10 min de realização do teste.

4.7.1.2. Teste de reconhecimento de objetos (RO)

O RO foi realizado em um aparato de campo aberto circular feito em polietileno com fundo preto de 99 cm de diâmetro e paredes na altura de 60 cm, sem teto. A ausência de um teto no campo aberto permitiu aos animais o uso de pistas distais na realização da tarefa. Foi posicionada uma câmera sobre o campo aberto a uma altura de 230 cm. A câmera foi conectada a um computador e foram utilizados dois cronômetros, para o registro temporal de exploração dos objetos, registro realizado por um pesquisador, sentado próximo ao aparato.

Foram utilizados quatro objetos diferentes, cada um com uma cópia, sendo do mesmo material e diferindo apenas quanto à forma e tamanho. Os objetos eram pesados o suficiente para não serem deslocados pelos animais ou, caso contrário, foram fixados no campo aberto. Após cada série, os objetos, assim como o campo aberto, foram limpos com álcool a 10% para evitar a presença de dicas olfativas. Nenhum objeto possuía significado etológico, ou seja, eram feitos de plástico nas cores verde e azul, um par com um formato cilíndrico, medindo 18 cm de altura e 8 cm de largura, denominados garrafas. Um outro par tinha um formato circular, com 18 cm de altura e 20 cm largura, denominados cantis. Ambos os pares tinham tampas na extremidade superior na cor branca.

Foi, inicialmente, realizada uma tarefa de memória de reconhecimento padrão, para avaliar se os animais já apresentavam alguma preferência pelos objetos selecionados, e se eles seriam capazes de discriminá-los. Os animais foram apresentados a dois objetos iguais na fase de treino e, após um intervalo de retenção (1h depois da primeira apresentação), foram apresentados a um objeto familiar, no mesmo local da fase de treino, e um objeto novo posicionado no mesmo local do objeto que fora removido. Os objetos utilizados na fase de treino e teste foram diferentes entre os animais. As fases de treino e teste tiveram duração de cinco minutos (SANTOS et al., 2013).

O RO constitui uma importante ferramenta complementar para acessar com segurança a memória de curto prazo. Ademais, podem também ser exploradas a habilidade discriminativa e exploratória - componente inato do roedor, a preferência de

novidade, estes diferentes dados, podem fornecer dados sobre a influência de diferentes regiões do cérebro no processo de reconhecimento (ANTUNES; BIALA, 2012; ENNACEUR; DELACOUR, 1988). A tarefa do reconhecimento de objetos é atraente porque não exige recompensa ou punição externa, mas é necessária um pouco de habituação para que exista efeitos apetitivos de receber acesso a novos estímulos (objeto novo) (BEVINS et al., 2002).

Para tanto, foram medidas as seguintes variáveis: **i.** taxa de exploração do objeto novo, **ii.** o índice de discriminação do objeto novo, bem como, **iii.** o tempo total de exploração de ambos os objetos.

Foi considerado como tempo de exploração de um objeto aquele durante o qual o animal se posiciona diante do mesmo e com o focinho e membros anteriores interagem com ele. Assim, o tempo de exploração de cada objeto foi registrado em segundos pelo observador.

A partir destes dados brutos, foi possível se calcular as variáveis de interesse. A primeira delas, taxa de exploração do objeto novo, que reflete a memória de curto prazo, foi expressa como porcentagem do tempo de exploração do objeto novo em relação ao tempo total de exploração de ambos os objetos $[(\text{Tempo no Objeto Novo} / \text{Tempo Total de Exploração dos Objetos}) \times 100]$. Estes dados foram analisados pelo Teste *t de Student* de uma amostra, onde se estabeleceu o pressuposto de que a distribuição na exploração de objetos igualmente novos deveria ser de 50% (MUMBY et al., 2002).

Adicionalmente, com o registro do tempo, foi possível ainda realizar a avaliação do índice de discriminação de objetos. Este foi calculado a partir da razão da medida da diferença entre os tempos de exploração do objeto novo e familiar, durante o período do teste, em relação ao tempo total de exploração de ambos os objetos. Este cálculo, para alcançar o índice de discriminação esta expresso na fórmula a seguir: $[(\text{Tempo no Objeto Novo} - \text{Tempo no Objeto Familiar}) / (\text{Tempo Total de Exploração})]$, no qual podemos inferir sobre a habilidade discriminativa do animal testado (AGGLETON et al., 2010).

Já a habilidade exploratória foi inferida pela medida do tempo total de exploração de objetos, contabilizado pelo tempo total de exploração dos pares de

objetos no momento do treino, comparativamente ao tempo despendido com a mesma tarefa durante a fase de teste, possibilitando assim perceber diferenças exploratórias entre os dois períodos (treino e teste) (MUMBY et al., 2002).

4.7.2. Avaliação da ansiedade traço e ansiedade estado

4.7.2.1. Paradigma da exploração livre (PEL)

O paradigma da exploração livre (PEL) é, atualmente, o único paradigma para roedores proposto e validado para mensuração de ansiedade-traço (ANTUNES et al., 2011). Este foi realizado em um aparato no qual o rato foi monitorado por um sistema automatizado controlado pelo software ©ANY-MAZE (Stoelting Co., EUA), que rastreia, em registro de vídeos, variáveis comportamentais de interesse neste paradigma.

O aparato consistiu numa caixa de madeira dividida em dois compartimentos, sendo que cada um destes subdividido em três unidades exploratórias (20 cm x 20 cm), interligados por aberturas que permitem a passagem do animal. Os dois compartimentos foram separados por divisória removível. A caixa foi colocada em um suporte a 40 cm do solo. Vinte e quatro horas antes do experimento, o rato foi mantido em uma das metades do aparato, para ambientação. O piso desta metade do aparato era recoberto com areia granulada sanitária comercial para gatos. O animal teve livre acesso à comida e água durante todo o procedimento (ANTUNES et al., 2011).

No dia do teste, foi dado acesso à outra metade (lado desconhecido) através da remoção da divisória. Este acesso foi limitado a 15 minutos, período no qual o animal foi monitorado através de câmera de vídeo para ambiente escuro (i.e.: com luz infravermelha).

Neste teste, o animal tem oportunidade de mover-se livremente dentro de um ambiente que tem duas partes: ambiente novo e familiar. Assim, o animal tem livre escolha entre a novidade e familiaridade. Animais com baixo traço ansioso irão

apresentar uma preferência por novidade, enquanto animais com alto traço ansioso preferem o ambiente familiar (ANTUNES et al., 2011; GRIEBEL et al., 1993). Dentre os dados coletados no PEL, aqueles que representam o traço ansioso, apresentam estabilidade durante o tempo, e portanto uma condição inerente e constitutiva de cada animal, caracterizando assim a ansiedade traço (TEIXEIRA-SILVA et al., 2009).

Neste aparato foram observados os seguintes parâmetros: a distância total percorrida e a porcentagem de tempo despendido no ambiente novo (TAN). Entre testes individuais, as caixas foram esvaziadas e limpas com álcool a 10% (MATOS et al., 2011). Para este teste, animais de mesma idade e provenientes de mães submetidas a diferentes tratamentos (controle e tratadas) foram testados simultaneamente a fim de eliminar possíveis influências do dia do experimento.

4.7.2.2. Teste da placa perfurada (PP)

Cada animal foi colocado, individualmente, no aparato de placa perfurada (*hole board*), por um período de cinco minutos. O aparato consiste em uma caixa de teste nas dimensões de 68 x 68 cm de arestas e paredes de 40 cm de altura, com um fundo de cor preta contendo perfurações circulares de 4 cm de diâmetro. A caixa foi elevada à 50 cm do piso em um suporte de madeira. A câmera para registro da movimentação do animal foi montada verticalmente sobre a caixa de teste e os ratos observados em um monitor na sala adjacente (FILE; LISTER; NUTT, 1982).

O aparato da placa perfurada baseia-se no pressuposto de que o número de *Head-dip*, mergulho nas perfurações da placa, e o tempo de permanência dos animais nos orifícios da placa é inversamente proporcional ao estado de ansiedade dos mesmos. Outro ponto observado foi a atividade motora, mensurada pela distância total percorrida durante os 5 minutos do teste (FILE; WARDILL, 1975).

Desta forma, foram coletadas as seguintes variáveis: distância percorrida, número de *Head-Dip* e tempo de permanência no *Head-Dip*. Estes parâmetros foram

medidos através do sistema informatizado para rastreamento de animais (Anymaze ®, Stoelting Co., Wood Dale, Illinois, EUA).

4.7.3. Avaliação de parâmetros motores

4.7.3.1. Teste de catalepsia (TC)

O comportamento de catalepsia foi avaliado posicionando-se o animal com ambas as patas dianteiras sobre uma barra cilíndrica horizontal de vidro, elevada a 9,0 cm da superfície de apoio das patas traseiras. O tempo que cada animal permaneceu nessa posição foi quantificado em segundos, até um limite de 180 segundos em apenas uma exposição. Neste único dia de exposição, foram realizadas três medidas do tempo de permanência em cada uma e em seguida foi calculada a média destes valores, sendo esta utilizada como valor obtido do referido animal (SANTOS et al., 2013). Assim, o alto tempo de permanência na barra serve como um indicador do aumento da catalepsia (SANBERG et al., 1988), ou, em outras palavras, como indicador de prejuízo da função motora.

4.7.3.2. Atividade geral em campo aberto (CA)

O campo aberto é um aparato circular de polietileno com fundo preto, medindo 95 cm de diâmetro e 60 cm altura, sem teto. Foi posicionada uma câmera sobre o campo aberto a uma altura de 230 cm. A câmera foi conectada a um computador equipado com um programa de rastreamento de animais (Anymaze, Stoelting, USA) para registro dos parâmetros comportamentais. O fundo do campo aberto tinha a cor preta para aumentar o contraste, favorecer o desempenho do programa e com baixa luz para não proporcionar ansiogênese.

Os animais foram colocados no centro do campo circular e tiveram seus comportamentos avaliados durante 15 minutos. Este teste em baixa luminosidade tem como principal pressuposto a avaliação o comportamento exploratório, através da medida da ambulação e orientação quanto ao espaço e tempo, pois existe uma tendência de diminuição exploratória ao longo do tempo (GENARO; SCHMIDEK, 2002)

A avaliação comportamental incluiu a distância percorrida total (distância em metros do percurso realizado pelo animal) e a distância percorrida em períodos, durante 0-5 minutos; 5-10 minutos e 10-15 minutos. Cada animal foi avaliado separadamente e o aparato foi limpo com solução de álcool 10% ao final de cada uso.

4.8. Análise estatística

Após a obtenção dos dados, foram realizados os testes de Levene, para verificação da homocedasticidade, e o de Shapiro-Wilks, para verificação da normalidade. Os resultados obtidos e destinados à análise paramétrica, foram expressos em valores de média \pm erro padrão da média. Para comparação entre dois grupos, sob influência de um único fator de variação, foi realizado o teste *t de Student* não pareado. Também foi utilizado o teste *t de Student* de uma amostra em que se estabeleceu um nível crítico de 50% para considerar um desempenho adequado daquele na variável exploração de objetos no teste de reconhecimento de objetos (MUMBY et al., 2002)

Os resultados obtidos, destinado a análise não paramétrica, foram expressos em valores de mediana e intervalo interquartil. Para comparação entre dois grupos, sob influência de um único fator de variação, foi realizado o teste de *Mann Whitney*.

Quando sob influência de dois fatores de variação, independente da normalidade ou da homocedasticidade, os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni.

O nível crítico fixado foi de 5% ($p < 0,05$). Para realização dos testes estatísticos foi utilizado o programa Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

5. RESULTADOS

5.1. Teste de Alternação Espontânea

No teste de alternação espontânea, que acessa a memória de curto prazo, observou-se que, o Teste *t de Student* não pareado revelou diferença estatisticamente significativa, com a prole de mães hipotireoidianas (PMH) apresentando menor porcentagem de alternações completas no aparato de quatro braços fechados quando comparada à prole de mães eutireoidianas (PME). Isso foi observado tanto aos 75 dias pós-natal (DPN), ($29,90 \pm 3,0$ versus $44,43 \pm 2,1\%$, $t = 3,295$, $p < 0,001$), como também aos 120 DPN ($28,69 \pm 3,17$ versus $42,62 \pm 2,78 \%$, $t=3,295$, $p < 0,01$) (Figuras 1A e 1B, respectivamente).

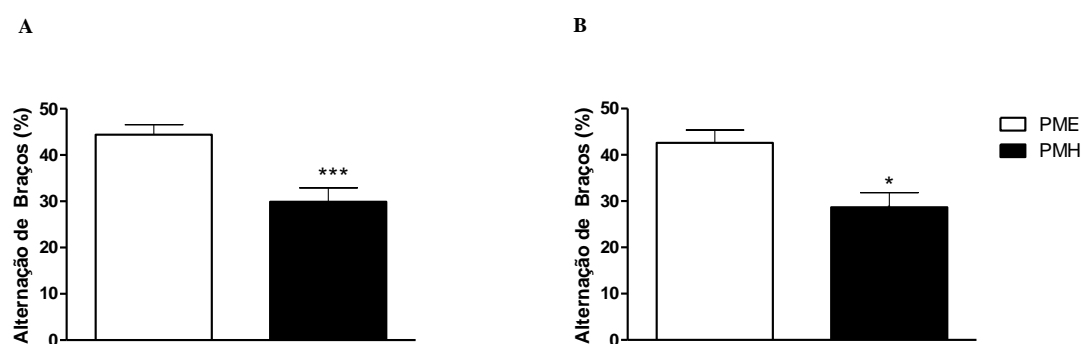


Figura 1. Efeito do hipotireoidismo gestacional experimental na memória de curto prazo, avaliada pelo teste de alternação espontânea, na prole aos 75 DPN (Painel A) e 120 DPN (Painel B). Painel A: PME: n=11; PMH: n=12. Painel B: PME: n=13; PMH: n=13. Análise estatística: Teste *t de Student* não pareado. (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$, comparados aos respectivos controles. DPN: dia pós-natal; PME: prole de mães eutireoidianas; PMH: prole de mães hipotireoidianas

5.2. Teste de Reconhecimento de Objeto

No teste de reconhecimento de objetos, que traduz a memória de curto prazo, constatou-se que a PMH, explorou menos o objeto novo, tanto aos 75 como aos 120 DPN (Figuras 2A e 2B, respectivamente). Esta análise foi feita por meio do teste *t de Student* de uma amostra, comparado ao valor fixo de 50%, o que não ocorreu com a PMH nestas idades (PME 75 DPN: $0,631 \pm 0,02\%$, $t= 6,18$, $p < 0,001$; PMH 75 DPN: $0,549 \pm 0,04\%$, $t=1,91$, $p=0,261$; PME 120 DPN: $0,671 \pm 0,02\%$, $t= 7,053$, $p<0,001$ e PMH 120 DPN: $0,481 \pm 0,04\%$, $t=0,3846$, $p=0,707$).

No que diz respeito ao índice de discriminação de objetos, avaliado no mesmo aparato, como um outro indicador de memória, observou-se que, aos 75 DPN (Figura 2C), o teste Mann-Whitney mostrou não haver diferença estatística neste índice entre a PMH e a PME (Figura 2D). Porém, este mesmo índice apresentou-se menor aos 120 DPN para o PMH, quando comparado ao seu controle ($0,36 (0,22 - 0,48)$ versus $-0,61 (-0,23 - -0,25)$ %, $U= 24,00$, $p< 0,01$).

A análise de variância de duas vias dos valores de tempo total de exploração de objetos, durante o teste de reconhecimento de objetos, no treino e no teste, evidenciou, aos 75 DPN (Figura 2E), efeito significativo isolado do fator sessão ($F_{(1, 20)} = 4,588$, $p=0,04$). Já, aos 120 DPN (Figura 2F), foi observado efeito significativo tanto para o fator sessão ($F_{(1, 22)} = 39,56$, $p<0,001$) quanto para o fator tratamento ($F_{(1, 22)} = 10,12$, $p=0,0043$). Demonstrando assim, que aos 120 DPN, a PMH tem menor tempo total de exploração do objeto independente da sessão (treino ou teste). E ainda que, em ambas as idades, independentemente do tratamento, os animais apresentaram maior tempo total de exploração na sessão treino que na sessão teste.

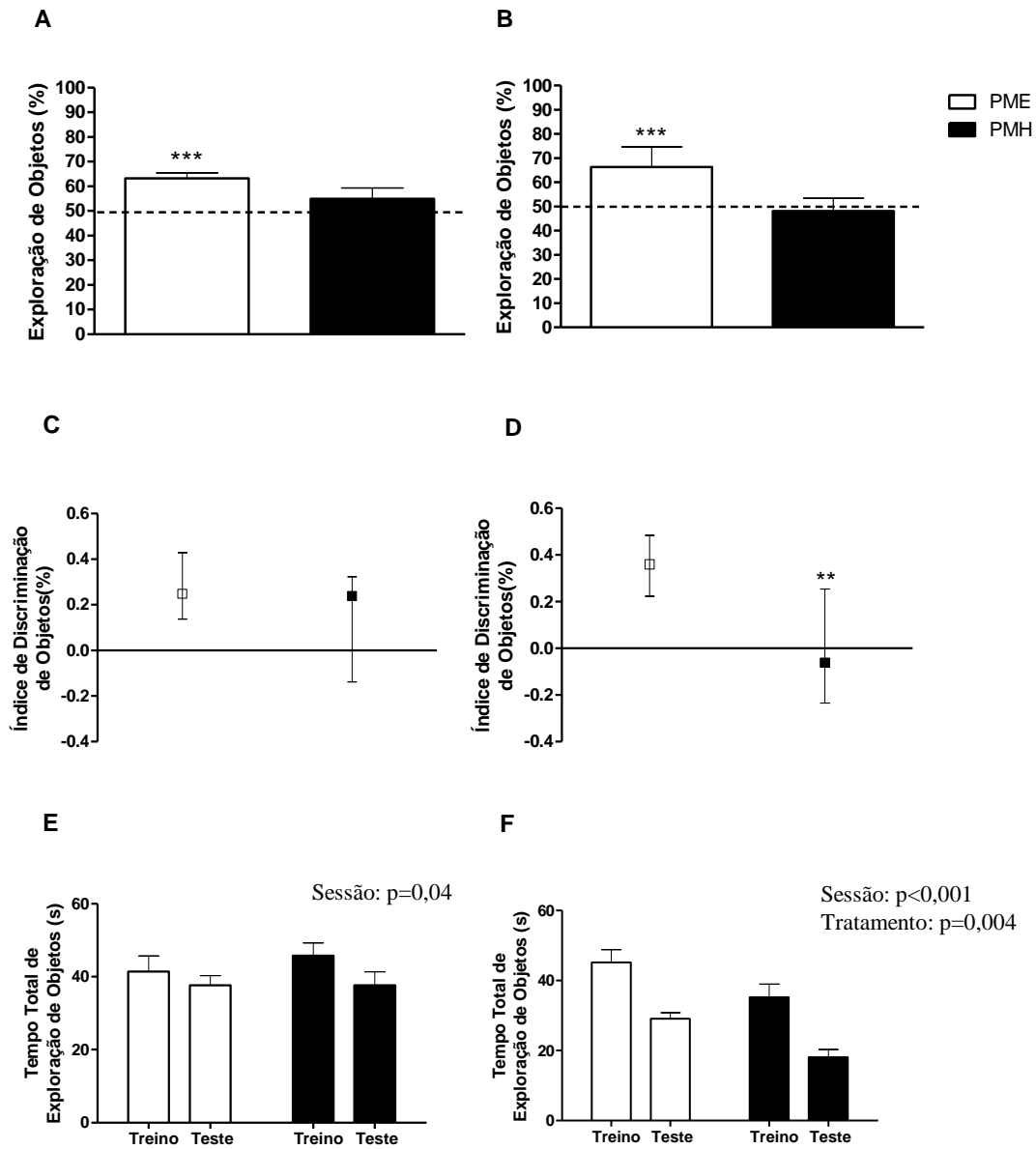


Figura 2. Efeito do hipotireoidismo gestacional experimental na memória de curto prazo, avaliada pelo teste de reconhecimento de objetos, na prole com 75 DPN (Painéis A, C e E) e 120 DPN (Painéis B, D e F). Painéis A, C e E: PME: $n=11$; PMH: $n=11$. Painéis B, D e F: PME: $n=12$; PMH: $n=12$. Análise estatística: Painéis A e B: Teste t de *Student* de uma amostra; Painéis C e D: Teste de Mann Whitney; Painel E e F: ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. Painéis A e B: (***) $p < 0,001$ comparado a 50%; Painel D (**) $p < 0,01$ comparado ao respectivo controle. DPN: dia pós-natal; PME: prole de mães eutireoidianas; PMH: prole de mães hipotireoidianas.

5.3. Teste de Placa Perfurada

A distância percorrida durante o teste de placa perfurada (Figura 3A e 3B) não diferiu estatisticamente entre os grupos aos 75 DPN e 120 DPN. Na análise do *Head-Dip* (Figuras 3C e 3D), uma medida de ansiedade estado, a PMH apresentou maior número de entradas da cabeça, quando comparada ao seu controle. Isso ocorreu tanto aos 75 DPN (13,5 (11,2 – 16,0) *versus* 17,0 (14,0 – 19,0) n, U= 48,00, $p < 0,05$) quanto aos 120 DPN (14,0 (9,0 – 17) *versus* 17,5 (15,25 – 20,5) n, U=38,00, $p < 0,05$). No tempo total de permanência em *Head-Dip*, a PMH apresentou maior tempo de permanência (em segundos, s) em relação à PME apenas aos 120 DPN (12,0 (8,3 – 20,2) *versus* 20,2 (17,76 – 29,18) s, U= 28,00, $p < 0,01$) (Figuras 3E e 3F).

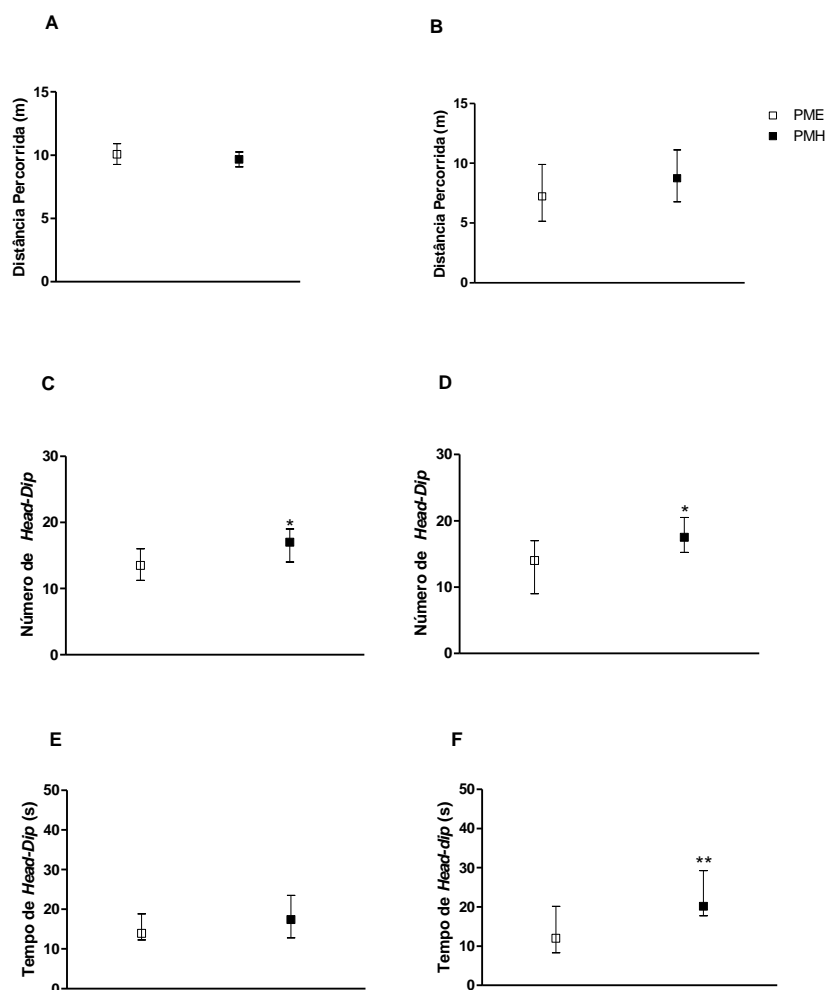


Figura 3. Efeito do hipotireoidismo gestacional experimental na ansiedade estado, avaliada pelo teste de placa perfurada, na prole com 75 DPN (Painéis A, C e E) e 120 DPN (Painéis B, D e F). Painéis A, C e E: PME: n=12; PMH: n=15. Painéis B, D e F: PME: n=13; PMH: n=12. Análise Estatística: Teste de Mann Whitney. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ comparado ao respectivo controle. DPN: dia pós natal; PME: prole de mães eutireoidianas; PMH: prole de mães hipotireoidianas.

5.4. Paradigma da exploração livre

No paradigma da exploração livre (PEL), na variável distância percorrida (Figuras 4A e 4B) e na variável porcentagem de Tempo de Exploração no Lado Novo (TAN) (Figuras 4C e 4D) não foram evidenciadas diferenças significativas em nenhuma das idades estudadas.

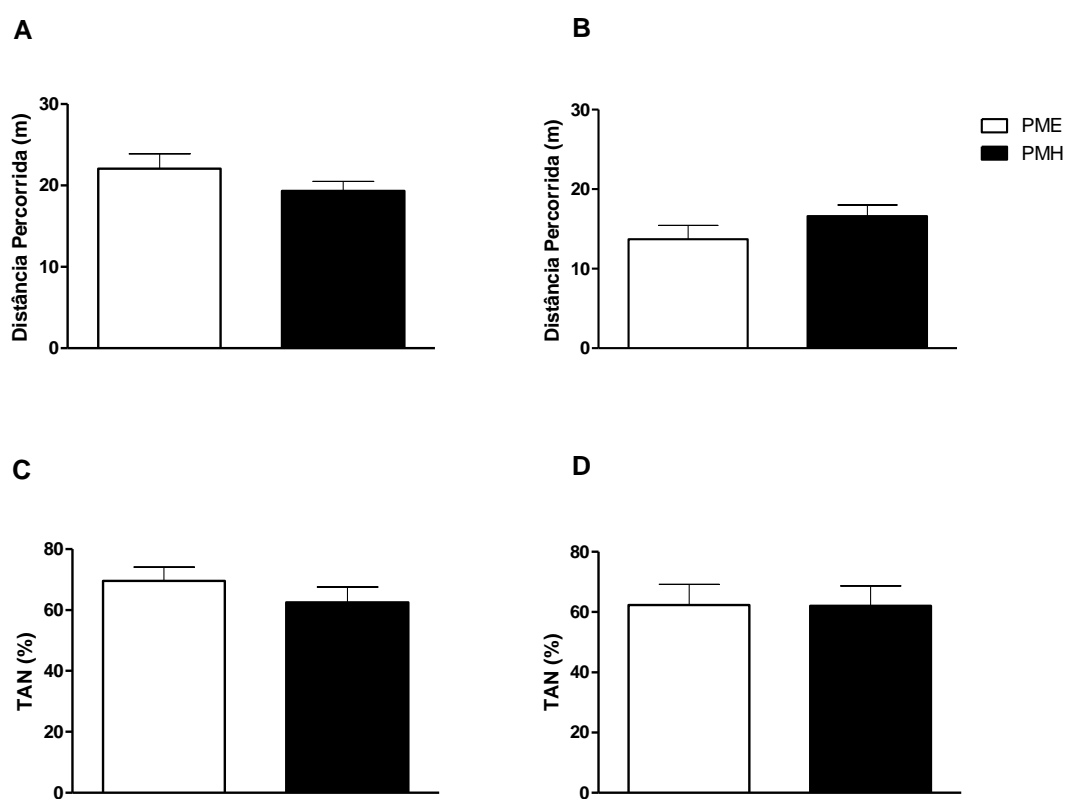


Figura 4. Efeito do hipotireoidismo gestacional experimental na ansiedade traço, avaliada pelo paradigma da exploração livre, na prole com 75 DPN (Painéis A e C) e 120 DPN (Painéis B e D). Painéis A e C: PME: n=13; PMH: n=16. Painéis B e D: PME: n=13; PMH: n=13. Análise Estatística: Teste *t de Student* não pareado. DPN: dia pós natal; PME: prole de mães eutireoidianas; PMH: prole de mães hipotireoidianas; TAN: Tempo no ambiente novo.

5.5. Teste de Catalepsia

Na Figura 5 pode-se observar que, no teste de catalepsia, o tempo de permanência na barra, para a PMH, foi superior quando comparada ao seu respectivo controle, tanto aos 75 DPN [Painel A, (2,76 (2,1 – 3,6) *versus* 4,76 (3,35 – 15,79) s, U= 21,50, $p < 0,05$)] quanto aos 120 DPN [Painel B, (0,83 (0,73 – 1,01) *versus* 2,44 (1,0 – 17,91) s, U= 19,50 $p < 0,01$)].

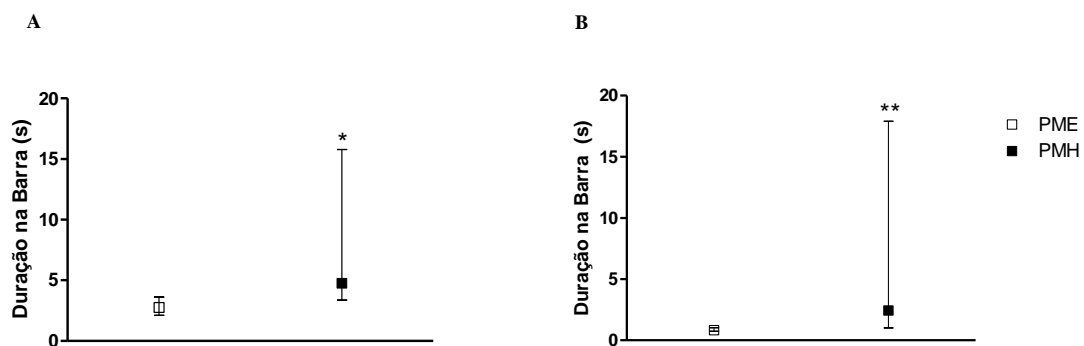


Figura 5. Efeito do hipotireoidismo gestacional experimental na catalepsia, avaliada pelo teste de catalepsia, na prole com 75 DPN (Painel A) e 120 DPN (Painel B). Painel A: PME: n=11; PMH: n=10. Painel B: PME: n=12; PMH: n=11. Análise estatística: Teste Mann Whitney. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ comparado ao respectivo controle. DPN: dia pós-natal; PME: prole de mães eutireoidianas; PMH: prole de mães hipotireoidianas.

5.6. Atividade geral em campo aberto

Na atividade geral em campo aberto, na variável distância percorrida (Figuras 6A e 6B) não foi evidenciada diferença estatisticamente significativa entre os grupos em nenhuma das idades estudadas. A análise de variância de duas vias dos valores de distância percorrida em períodos (0-5 min; 5-10 min; 10-15min), evidenciou-se aos 75 DPN (Figura 6C), efeito significativo isolado do fator período ($F_{(2, 44)} = 267,2$, $p = 0,001$). Da mesma forma, aos 120 DPN (Figura 6D), foi observado efeito isolado do fator período ($F_{(2, 48)} = 137,9$, $p < 0,001$). Demonstrando assim que aos 75 e aos 120 DPN, a PME e PMH vai diminuindo igualmente a atividade locomotora de acordo com o tempo do teste.

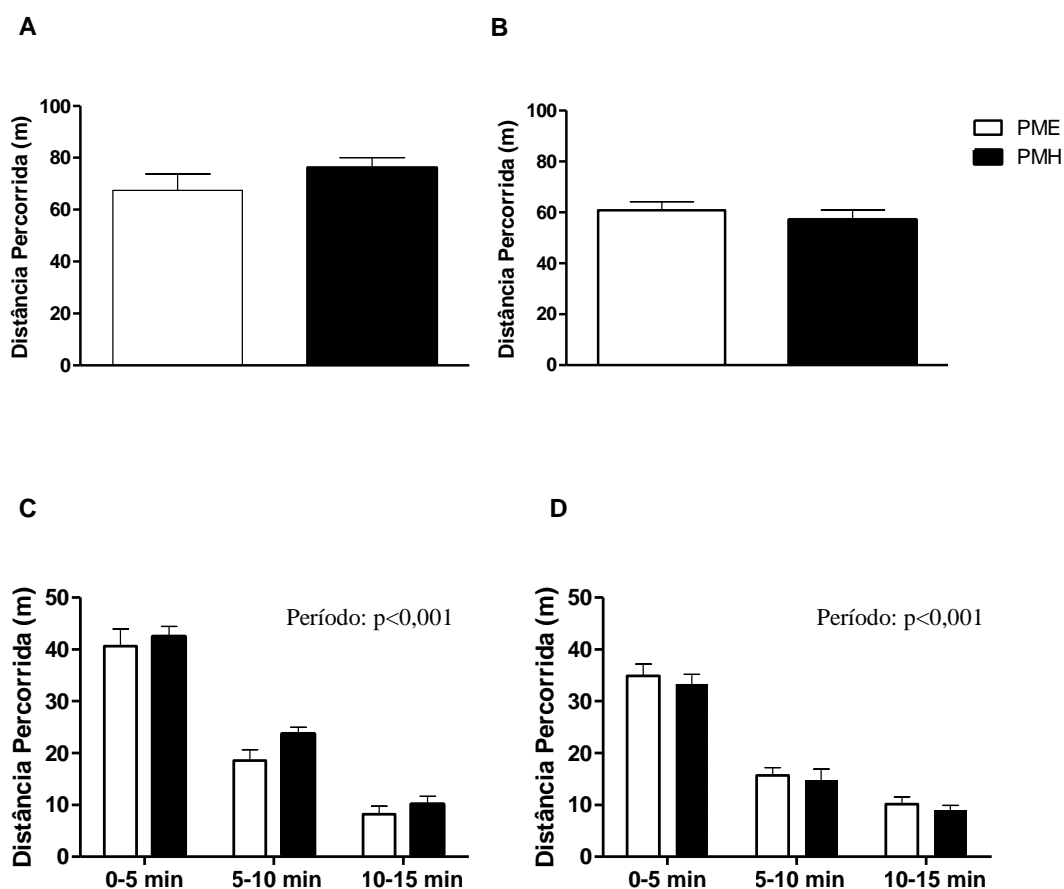


Figura 6. Efeito do hipotireoidismo gestacional experimental na função motora, avaliada pelo campo aberto, na prole com 75 DPN (Painéis A e C) e 120 DPN (Painéis B e D). Painéis A e B: PME: n=12; PMH: n=12. Painéis B e D: PME: n=13; PMH: n=13. Análise estatística: Anova de duas vias. DPN: dia pós-natal; PME: prole de mães eutireoidianas; PMH: prole de mães hipotireoidianas

6. DISCUSSÃO

Tendo em vista a crucial importância e dependência dos hormônios tireoidianos para o desenvolvimento intrauterino do feto, e a já confirmada participação destes no desenvolvimento e maturação do SNC (CHEN et al., 2012; FOWDEN; FORHEAD, 2004b), o presente estudo investigou as repercussões da indução do hipotireoidismo gestacional experimental na memória, ansiedade e função motora durante a vida pós-natal da prole.

Este trabalho demonstrou pela primeira vez, em modelo experimental com ratos, que a carência de hormônios tireoidianos maternos, exclusivamente durante a vida intrauterina, afeta parâmetros cognitivos, mnemônicos, motores e emocionais, em diferentes idades da vida pós-natal da prole de ratos. Sendo observado um significativo prejuízo na memória de curto prazo, redução no estado ansioso e aumento da catalepsia.

O papel crucial dos HTs no desenvolvimento do SNC tem sido reforçado por recentes investigações que têm evidenciado a participação desses hormônios na expressão e funcionamento de importantes componentes dos sistemas de gênese do sinal elétrico, neurotransmissão, bem como dos receptores e seus mecanismos de sinalização pós-sináptica. Sabidamente, alterações no status tireoidiano podem afetar vias colinérgicas, serotoninérgicas, gabaérgicas, dopaminérgicas e noradrenérgicas (AHMED; ABD EL-TAWAB; AHMED, 2010; NEGRO; MESTMAN, 2011). Todos estes constituem componentes neurobiológicos importantes envolvidos nos padrões comportamentais aqui estudados.

Dentre os eventos que acontecem no SNC na ausência de HTs destacam-se também a deficiência na migração e diferenciação celular, bem como na formação de sinapses. Além disso, também foi evidenciado o menor número de células no giro denteado do hipocampo e das células granulares no cerebelo (BERNAL; GUADAÑO-FERRAZ; MORTE, 2003).

No hipotireoidismo neonatal está demonstrada a redução da excitabilidade neuronal com efeitos severos sobre as funções neurológicas (GILBERT;

PACZKOWSKI, 2003). Tal fenômeno parece resultar, ao menos em parte, do aumento da atividade da bomba Na^+/K^+ ATPase, em ratos adultos e neonatos com hipotireoidismo, especialmente nas membranas sinápticas, sabidamente mantenedoras do potencial de repouso (LEGROW; FIELDING; PRESSLEY, 1999; SCHMITT; MCDONOUGH, 1988)

Esta mesma condição, hipotireoidismo neonatal, aumenta a concentração do neurotransmissor GABA (ácido gama-aminobutírico) no cérebro, cerebelo e bulbo. Adicionalmente, na condição oposta de hipertireoidismo gestacional, tem sido reportado a ocorrência do aumento no conteúdo de serotonina e dopamina na ponte, bulbo e diencéfalo da prole, ao passo que, no hipotireoidismo gestacional tem sido observada redução no conteúdo dessas monoaminas no cérebro, cerebelo e bulbo da prole (AHMED; ABD EL-TAWAB; AHMED, 2010).

Estudos têm demonstrado os efeitos deletérios do hipotireoidismo na cognição por disfunção de neurônios colinérgicos. Por exemplo, a administração de nicotina a animais com hipotireoidismo reverte o déficit de memória e aprendizado (ALZOUBI; ALEISA; ALKADHI, 2007; ALZOUBI et al., 2006). Recentemente, evidenciou-se que o hipotireoidismo gestacional induzido pelo tratamento com PTU aumenta significativamente a atividade de uma importante enzima envolvida na hidrólise da acetilcolina na fenda sináptica, a acetilcolinesterase (AChE). Estes autores observaram que isso ocorre no bulbo, cerebelo e hipocampo da prole de ratas, em diferentes momentos da vida pós-natal (KOROMILAS et al., 2014). Por outro lado, outro estudo afirma que a atividade AChE está significativamente diminuída no córtex frontal e aumentada no hipocampo de animais filhos de ratas hipotireoidianas (AHMED; ABD EL-TAWAB; AHMED, 2010).

Em contrapartida, Sawin et al. (1998) verificaram diminuição na atividade da colina-acetiltransferase no córtex pré-frontal e hipocampo da prole com hipotireoidismo perinatal. Como essa enzima é crítica para a síntese de acetilcolina e as vias colinérgicas estão envolvidas no aprendizado e memória, os autores especulam que alterações nestas vias durante o período perinatal podem repercutir diretamente na gênese da memória e do aprendizado.

Na aferição da memória, de curto prazo, observou-se no presente estudo que a prole de mães hipotireoidianas (PMH) apresentou menor número de alterações quando comparada à prole de mães eutireoidianas (PME), no teste de alternância espontânea (Figura 1). Akaike *et al.* (1991), ao induzirem a prole de ratas ao hipotireoidismo exclusivamente durante o período de lactação (0 DPN até 19 DPN), verificaram que os animais que receberam PTU (propiltiouracil), um indutor de hipotireoidismo, tiveram prejuízo no desempenho da memória de curto prazo quando comparado ao grupo controle, aos 90 DPN, no labirinto radial de oito braços.

Na avaliação de memória Chen *et al.* (2012), com indução de hipotireoidismo durante o período gestacional (PTU 500 mg/L, na água de beber), evidenciaram que a prole de mães hipotireoidianas, aos 60 DPN, teve déficit de aprendizado e memória na execução do teste de Labirinto aquático de Morris. Os dados do presente estudo corroboram os achados de Chen *et al.* (2012).

No teste de reconhecimento de objetos, que nos permite inferir à respeito da memória de curto prazo, observou-se que a PMH não explorou o objeto novo de forma aumentada como esperado, o que sugere a não identificação da novidade (Figura 2A e 2B). Darbra *et al.*, (2003, 2004) avaliaram a memória de ratos com hipotireoidismo perinatal (MTZ 0,02%, do 9º DG até o desmame) e verificaram que a prole de mães hipotireoidianas, em diferentes idades, 50 e 80 DPN, apresentou menor desempenho na memória e aprendizagem no teste de esquiva inibitória, numa caixa que possui um dos dois lados escuro.

Achados semelhantes foram obtidos por Tong *et al.* (2007). Ao realizar o teste de reconhecimento de objetos em ratos com hipotireoidismo instalado, estes autores verificaram que a exploração de objetos também se apresenta diminuída. Estes autores induziram e analisaram animais em diferentes fases do desenvolvimento, a saber, aos dois, oito e quinze meses de idade. Adicionalmente, os autores verificaram que o perfil diminuído de exploração do objeto novo apresentou um caráter progressivo com a idade.

Deve-se ressaltar aqui que, diferentemente do estudo de Tong *et al.*, (2007), onde os animais avaliados eram hipotireoidianos, no presente estudo os animais são prole de mães hipotireoidianas, e não necessariamente hipotireoidianos.

Interessantemente, dados já publicados pelo nosso grupo mostraram que a PMH tem *status* tireoideano igual ao controle, ao menos aos 15 e 30 DPN (ALVES et al., 2013). Sendo assim, pode-se estar diante de animais com eu-, hiper- ou hipotireoidismo tireoideano e/ou extratireoideano. Estas possibilidades precisam ainda ser investigadas.

Ainda neste contexto da avaliação de memória, o teste de reconhecimento de objetos permite a análise do índice de discriminação do objeto novo. Nesta abordagem, observou-se haver diminuição desse parâmetro na PMH, mas apenas aos 120 DPN (Figuras 2C e 2D). Estes achados corroboram os de Akaike et al., (1991) e Tong et al., (2007). O primeiro mostra que a prole de mães hipotireoidianas apresenta déficit na discriminação, quando submetido ao teste do labirinto radial de oito braços (AKAIKE et al., 1991). No mesmo sentido, o hipotireoidismo instalado reduz a capacidade discriminativa com perfil progressivo de perda desta habilidade com o avançar da idade (TONG et al., 2007). Como já citado anteriormente, estes autores utilizaram protocolos distintos do utilizado no presente estudo para a indução do hipotireoidismo.

Tendo em vista os achados do presente estudo, torna-se importante destacar as repercussões do modelo de hipotireoidismo gestacional sobre a habilidade discriminativa na vida pós-natal da prole. Neste contexto, alterações no hipocampo já demonstradas por outros autores (BERNAL, 2005; WILLOUGHBY; MCANDREWS; ROVET, 2014) podem embasar os distúrbios encontradas, uma vez que esta estrutura encefálica está fortemente envolvida na discriminação como habilidade crucial para a gênese da memória e da aprendizagem (OLTON; WERZ, 1978).

No mesmo contexto do teste de reconhecimento de objetos, foi calculado o tempo total de exploração dos objetos, nos momentos do treino e teste, e observou-se que o tempo total de exploração da PMH, aos 120 DPN, foi menor em relação à PME, independente da sessão, fato que não foi observado aos 75 DPN (Figura 2E e 2F). Isoladamente, este achado pode sugerir que a redução no padrão exploratório observada nos animais PMH decorra da presença de anedonia e/ou de déficit funcional do sistema de controle motor. Porém, tomado em conjunto a falta de diferença na distância total percorrida observada nos mesmos animais durante o paradigma da exploração livre, teste de placa perfurada e no campo aberto, podemos excluir a influência de alterações motoras capazes de afetar a realização das tarefas analisadas nos testes que avaliam memória. Isso, paralelamente, reforça a hipótese da influência de uma menor motivação

para executar a tarefa exploratória de ambos os objetos, durante as sessões treino e teste na idade de 120 DPN.

Estudo utilizando ratos tireoidectomizados demonstrou não existir diferença exploratória entre os grupos estudados, independentemente da sessão (treino e teste) no teste de reconhecimento de objeto. No entanto, os autores observaram padrões comportamentais característicos de depressão no teste de nado forçado. Isto, por sua vez, pode diminuir o comportamento exploratório destes animais (MONTERO-PEDRAZUELA et al., 2006).

Achados de Akaike et al. (1991) e Darbra et al (1995) contrapõem-se aos do presente estudo ao evidenciarem, em relação a característica exploratória, que ratos expostos ao hipotireoidismo perinatal aumentaram a exploração durante os testes comportamentais de ansiedade, tendo como exemplo o desempenho no teste de placa perfurada. Contrariamente, estudo que utilizou o modelo de estresse social em ratos, além de revelar diminuição na concentração sérica dos hormônios tireoidianos, mostrou que os animais apresentam anedonia e diminuição na atividade exploratória (OLIVARES et al., 2012). Ademais, outros estudos também relacionam alterações no status tireoidiano durante o período de desenvolvimento e vida adulta com distúrbios mentais, dentre elas, a depressão (BERENT et al., 2014; STEIN et al., 2009). Mais uma vez, deve-se destacar que os animais do presente estudo não necessariamente são hipotireoidianos, uma vez que somente as suas mães foram induzidas ao hipotireoidismo.

Os achados aqui demonstrados sugerem a influência dos hormônios tireoidianos maternos no desenvolvimento do encéfalo, especialmente de áreas envolvidas na consolidação da memória e do aprendizado, como também do padrão exploratório, o que pode implicar na origem de distúrbios do funcionamento do hipocampo, córtex pré-frontal, amígdala, entre outros (AKAIKE et al., 1991; MORREALE DE ESCOBAR; OBREGON; ESCOBAR DEL REY, 2004; VACCARI; TIMIRAS, 1981).

Em estudo recente, ao avaliar a memória de crianças, com 9 a 12 anos, filhos de mães com hipotireoidismo gestacional que não aumentaram a dose de tiroxina durante a gestação, verificou-se que alterações na memória estão associadas ao menor volume do hipocampo (WILLOUGHBY; MCANDREWS; ROVET, 2014). Somado a isto, outro

estudo revela que o desenvolvimento hipocampal sofre forte influência dos HTs maternos, sobretudo no terço final da gestação. Assim, a depender do momento da ocorrência da hipofunção da tireoide materna, regiões do encéfalo fetal, que se desenvolvem em momentos distintos da vida intrauterina, podem ser diferentemente acometidos (BERNAL; GUADAÑO-FERRAZ; MORTE, 2003).

Em outro estudo que utilizou modelo de indução do hipotireoidismo a partir do segundo terço da gestação, considerando-se que o hipocampo de ratos se desenvolve principalmente neste período, os autores especulam que prejuízos na função desta estrutura possam estar relacionados com os achados de déficit de memória e aprendizado nestes animais (BERNAL, 2005).

Além destas modificações ontogênicas promovidas pela carência de hormônios tireoidianos durante a gestação, outras repercussões comportamentais, como redução do estado ansioso, também foram observadas no presente estudo. Interessantemente, Shukla et al., (2010) mostraram que o hipertireoidismo na vida adulta é ansiogênico. Entretanto, outros autores mostraram que o hipotireoidismo em ratos tratados com MTZ à 0,05%, durante quatro semanas, tem ação também ansiogênica (BURAS et al., 2014). Portanto, ambos os achados divergem do encontrado neste estudo, uma vez que a falta de HTs maternos, exclusivamente durante a gestação, teve ação ansiolítica na prole.

Assim, embora isso pareça um paradoxo, deve-se destacar novamente que se trata de dois modelos distintos de abordagem, onde em um deles se avalia o estado ansioso em animais conhecidamente hipotireoidianos ou hipertireoidianos, ao passo que em nosso estudo, a ansiedade é avaliada em animais com função tireoidiana desconhecida, porém filhos de mães que estavam hipotireoidianas quando estes se encontravam em seus úteros.

Similarmente aos nossos achados, a ansiólise em paradigmas distintos de indução de ansiedade, foi observada em animais adultos previamente induzidos ao hipotireoidismo exclusivamente durante o período perinatal. Dentre estes paradigmas, foram utilizados os testes de campo aberto, placa perfurada e labirinto em cruz elevado (DARBRA et al., 1995, 2003, 2004). Além disso, observou-se que esses animais apresentam maior dificuldade de habituação nos testes, pelo aumento da atividade espontânea, o que sugere hiperatividade. Adicionalmente, os autores observaram que

esses animais também apresentam menor reatividade quando expostos a situações de estresses e condições conflituosas.

A diminuição da ansiedade estado da PMH observada no presente estudo pode ser justificada, ao menos parcialmente, pelo acometimento da neurotransmissão dopaminérgica e serotoninérgica, já que há relatos na literatura que sustentam que o hipotireoidismo perinatal diminui a expressão de receptores dopaminérgicos e o conteúdo encefálico de serotonina, aos 7, 14 e 21 dias pós-natal (AHMED; ABD EL-TAWAB; AHMED, 2010). Isto, conseqüentemente, promove hipoatividade de vias estriatais e alterações no funcionamento de vias serotoninérgicas (DARBRA et al., 1995; VAN PRAAG, 1996). Entretanto, outros autores têm demonstrado que a carência de monoaminas, induzida por manipulação farmacológica do SNC de animais já adultos, produz aumento do medo, da ansiedade estado e da catalepsia na vida adulta (COLOMBO et al., 2013; SANTOS et al., 2013).

No entanto, este último achado, não pode ser linearmente extrapolado para os do presente estudo, uma vez que a reprogramação do sistema dopaminérgico deve ter ocorrido durante a vida intrauterina. Esta reprogramação no sistema dopaminérgico, pode inferir em um hipo e/ou hiper funcionamento de receptores, na liberação do neurotransmissor, na receptação, entre outras compensações. Assim, é necessário investigar os mecanismos biológicos envolvidos nestas condições de hipotireoidismo durante a gestação. Portanto, num momento crítico para o desenvolvimento neuronal, e distante do momento da avaliação comportamental.

Porém, a literatura ainda é escassa no que se refere a relação da deficiência de hormônios tireoidianos durante a gestação e sua influência sobre as vias dopaminérgicas, além das vias GABAérgicas e serotoninérgicas, que também estão envolvidas com o estado de ansiedade na vida pós-natal.

Como observado no paradigma da exploração livre (PEL), não existiu diferença entre os grupos em nenhuma das variáveis (Figuras 4A e 4B). Este paradigma afere o traço de ansiedade próprio do animal. De modo geral, a ansiedade traço está relacionada a uma característica do indivíduo, ao tempo em que a ansiedade estado reflete uma situação momentânea evocada pela exposição a um agente ou ambiente

ansio gênico, como proporcionado pelo teste da placa perfurada (ANTUNES et al., 2011).

Nessa perspectiva, o presente estudo avaliou pela primeira vez a influência do hipotireoidismo gestacional na ansiedade traço na prole de ratas e mostrou que não há diferença do perfil de ansiedade entre os grupos. Em nenhum dos parâmetros avaliados se observou diferença.

A não observância de diferenças na distância total percorrida tanto no PEL, no teste de placa perfurada como também na atividade geral em campo aberto entre os grupos estudados, contrasta com as observações de Darbra et al., (2003), onde os autores demonstram que ratos submetidos previamente ao hipotireoidismo perinatal apresentam, na vida adulta, aumento na distância percorrida e da atividade locomotora no teste de placa perfurada aos 40 DPN. Há de se ressaltar mais uma vez as diferenças entre ambos os modelos de indução de hipotireoidismo, já detalhado anteriormente. O que pode justificar as diferenças entre os estudos.

Analisado sob outra perspectiva, os achados do presente estudo mostraram que a carência de HTs maternos na gestação não modificou a atividade locomotora no campo aberto (Figura 6) . Portanto, é sabido que mesmo na presença de distúrbios motores, como foi demonstrado por estudo de Alves et al., (2013), utilizando o mesmo protocolo de indução do HGE, é possível que a capacidade de ambulação não seja prejudicada. Desta forma, podemos afirmar que as alterações cognitivas e de ansiedade observadas neste estudo não devem estar sendo influenciadas alterações na deambulação nos aparatos utilizados para os diferentes testes (MORSE; GENE ERWIN; JONES, 1993; SCHIØRRING, 1979).

Também fez parte do escopo do presente estudo a investigação de aspectos relacionados à catalepsia. Neste contexto, foi observado que o presente modelo de HGE é capaz de elevar o tempo de permanência na barra, ou seja, de aumentar o comportamento de catalepsia. É sabido que este aumento pode estar relacionado a diferentes condições, tais como, redução na capacidade de tomada de decisão, anedonia, reduzida iniciativa motora, entre outros.

Tomado em conjunto com o outro parâmetro motor observado neste estudo, (i.e: atividade locomotora), e ainda com os obtidos por outro já publicado também por

nosso grupo, podemos concluir que a PMH apresenta redução na força de preensão, do equilíbrio e da coordenação motora (ALVES et al., 2013) que não afetam a capacidade de ambulação, mas que, por outro lado, podem ser causa do aumento no comportamento de catalepsia. Porém, há de se aventar a possibilidade de estarmos diante de um modelo de indução de Doença de Parkinson, também caracterizado pela catatonia.

Corroborando estes resultados, Barykina et al., (2002) verificaram que ratos hipotireoideos passaram mais tempo em posição vertical em uma barra, quando comparados aos controles. Isto sugere que, independentemente do momento em que faltou hormônio tireoidiano, se durante a vida intrauterina ou na vida adulta, o efeito observado é o aumento do comportamento de catalepsia, de onde se infere um possível prejuízo na função cortical pré-frontal, resultando em perda na capacidade de decidir adotar uma nova conduta. Outra possibilidade é a existência de desordens funcionais dos gânglios da base, que também contribuem para a gênese de movimentos.

A atividade de catalepsia é regulada, sobretudo, por dopamina e serotonina. Diminuição na concentração do primeiro está envolvida em reações catalépticas e redução na capacidade de tomada de decisão, enquanto redução do conteúdo de serotonina está relacionada com a predisposição genética para a catatonia (KLEMM, 1989; POPOVA; KULIKOV, 1995).

Segundo Shimokawa et al., (2014), o hipotireoidismo congênito em rato, reduz significativamente as concentrações de dopamina no núcleo estriado, que sugere uma alteração na liberação deste neurotransmissor na fenda sináptica. Estes autores sugerem que esta redução se deve, provavelmente, a menor expressão de β -tubulina 3 em neurônios dopaminérgicos do feixe nigroestriatal, em ratos hipotireoidianos. É sabido que esta proteína compõe parte importante do citoesqueleto responsável pelo transporte axonal da dopamina. Sabidamente, este circuito é importante na deflagração da iniciação de um movimento planejado. Portanto, pode-se elucubrar que a catatonia observada nos ratos PMH pode, ao menos em parte, se dever a um possível déficit na transmissão dopaminérgica nigroestriatal, o que, mais uma vez, os assemelha ao observado na doença de Parkinson.

Tomados em conjunto, os dados obtido neste trabalho mostram claramente que os HTs maternos são críticos para o desenvolvimento dos sistemas neurais de controle da memória aprendizado, ansiedade e função motora da prole.

Portanto, achados da literatura e do presente estudo reforçam a importância de levantar conhecimento a respeito da ação dos HTs durante o desenvolvimento fetal, principalmente no SNC, sobretudo em sistemas importantes na regulação de comportamentos críticos para a manutenção da vida do indivíduo e, conseqüentemente, da preservação da espécie.

Paralelamente, a observação da alteração destes comportamentos na PMH por si só, subsidia o fortalecimento de políticas públicas de incentivo ao rastreamento da função tireoidiana de mulheres gestantes, o que atualmente não é obrigatório na maioria dos países, incluindo-se o Brasil. A adoção desta medida permitirá o diagnóstico precoce de eventual hipotireoidismo gestacional, antecipando a abordagem terapêutica e conseqüentemente reduzindo a incidência de doenças mentais e cognitivas, dentre outras possíveis. Doenças estas que atualmente geram enormes despesas para o sistema público de saúde. Por fim, a elucidação dos mecanismos neurobiológicos que expliquem tais fenômenos poderão ainda subsidiar o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas de doenças resultantes da falta de HTs maternos durante a vida intrauterina, sem contar a possibilidade do impacto científico com proposta de uma nova estratégia de investigação de doenças neurodegenerativas como o Mal de Parkinson.

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente estudo podemos concluir que a carência de hormônios tireoidianos maternos, exclusivamente durante a vida intrauterina, afeta ontogênese comportamental da prole, promovendo:

- Déficit na memória de curto prazo;
- Déficit exploratório e de discriminação aos 120 DPN;
- Efeito ansiolítico na ansiedade estado;
- Aumento do comportamento de catalepsia.

Paralelamente, podemos concluir que o HGE não afeta o perfil de ansiedade e tampouco a habilidade locomotora em nenhuma das idades estudadas.

8. PERSPECTIVAS

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, constatou-se a necessidade do desenvolvimento de mais estudos a fim de identificar as possíveis regiões encefálicas e processos fisiológicos, envolvidos na memória, ansiedade e na função motora, que podem justificar os distúrbios comportamentais encontrados neste estudo da prole de ratas submetidas hipotireoidismo gestacional. Abordagens metodológicas que permitam entender, por exemplo, o processo de maturação neuronal, diferenciação e neurogênese no SNC destes animais, em estudos *in vitro*, podem complementar os achados do presente estudo.

Aliado a isto, a identificação de possíveis alterações no metabolismo de neurotransmissores e receptores presentes em regiões hipocâmpais, núcleo estriado, córtex pré-frontal, córtex entorrinal e amígdala forneceriam dados relevantes que permitiriam uma discussão mais fundamentada destes achados. Faz-se necessário também a quantificação e a mensuração da atividade das desidases presentes nestas mesmas estruturas. Adicionalmente, um teste específico para identificação da anedonia (teste da sacarose) poderá contribuir para uma melhor interpretação dos resultados que indicam a possibilidade da sua presença.

9. REFERÊNCIA

ABRAHAM, P. et al. A systematic review of drug therapy for Graves' hyperthyroidism. **European Journal of Endocrinology**, v. 153, n. 4, p. 489–498, 10 jan. 2005.

AGGLETON, J. P. et al. Lesions of the Rat Perirhinal Cortex Spare the Acquisition of a Complex Configural Visual Discrimination Yet Impair Object Recognition. **Behavioral Neuroscience**, v. 124, n. 1, p. 55–68, fev. 2010.

AHMED, O. M.; ABD EL-TAWAB, S. M.; AHMED, R. G. Effects of experimentally induced maternal hypothyroidism and hyperthyroidism on the development of rat offspring: I. The development of the thyroid hormones-neurotransmitters and adenosinergic system interactions. **International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, v. 28, n. 6, p. 437–454, out. 2010.

AKAIKE, M. et al. Hyperactivity and spatial maze learning impairment of adult rats with temporary neonatal hypothyroidism. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 13, n. 3, p. 317–322, maio 1991.

ALVES, I. G. . et al. Experimental hypothyroidism during pregnancy affects nociception and locomotor performance of offspring in rats. **European Journal of Pain**, v. 17, n. 9, p. 1291–1298, 2013.

ALZOUBI, K. H. et al. Nicotine reverses adult-onset hypothyroidism-induced impairment of learning and memory: Behavioral and electrophysiological studies. **Journal of Neuroscience Research**, v. 84, n. 5, p. 944–953, 1 out. 2006.

ALZOUBI, K. H.; ALEISA, A. M.; ALKADHI, K. A. Adult-onset hypothyroidism facilitates and enhances LTD: reversal by chronic nicotine treatment. **Neurobiology of Disease**, v. 26, n. 1, p. 264–272, abr. 2007.

ANTUNES, F. D. et al. Automation of the free-exploratory paradigm. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 197, n. 2, p. 216–220, 30 abr. 2011.

ANTUNES, M.; BIALA, G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. **Cognitive Processing**, v. 13, n. 2, p. 93–110, maio 2012.

ARGUMEDO, G.; SANZ, C.; OLGUÍN, H. Experimental Models of Developmental Hypothyroidism. **Hormone and Metabolic Research**, v. 44, n. 02, p. 79–85, fev. 2012.

BARKER, D. The intrauterine origins of cardiovascular disease. **Acta Pædiatrica**, v. 82, p. 93–99, 1 dez. 1993.

BARKER, D. J. et al. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. **Lancet**, v. 2, n. 8663, p. 577–580, 9 set. 1989.

BARKER, D. J.; OSMOND, C.; LAW, C. M. The intrauterine and early postnatal origins of cardiovascular disease and chronic bronchitis. **Journal of Epidemiology and Community Health**, v. 43, n. 3, p. 237–240, set. 1989.

BARYKINA, N. N. et al. Effects of thyroid hormone deficiency on behavior in rat strains with different predisposition to catalepsy. **Physiology & Behavior**, v. 75, n. 5, p. 733–737, 15 abr. 2002.

BASSETT, J. H. D.; HARVEY, C. B.; WILLIAMS, G. R. Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 213, n. 1, p. 1–11, 31 dez. 2003.

BATES, J. M. et al. Effects of selenium deficiency on tissue selenium content, deiodinase activity, and thyroid hormone economy in the rat during development. **Endocrinology**, v. 141, n. 7, p. 2490–2500, jul. 2000.

BAXTER, J. D.; TYRRELL, J. B. Evaluation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: importance in steroid therapy, AIDS, and other stress syndromes. **Advances in internal medicine**, v. 39, p. 667–696, 1994.

BERENT, D. et al. Thyroid hormones association with depression severity and clinical outcome in patients with major depressive disorder. **Molecular Biology Reports**, v. 41, n. 4, p. 2419–2425, abr. 2014.

BERNAL, J. Thyroid Hormones and Brain Development. In: GERALD LITWACK (Ed.). **Vitamins & Hormones**. [s.l.] Academic Press, 2005. v. Volume 71p. 95–122.

BERNAL, J.; GUADAÑO-FERRAZ, A.; MORTE, B. Perspectives in the study of thyroid hormone action on brain development and function. **Thyroid: official journal of the American Thyroid Association**, v. 13, n. 11, p. 1005–1012, nov. 2003a.

BERNAL, J.; GUADAÑO-FERRAZ, A.; MORTE, B. Perspectives in the study of thyroid hormone action on brain development and function. **Thyroid: official journal of the American Thyroid Association**, v. 13, n. 11, p. 1005–1012, nov. 2003b.

BEVINS, R. A. et al. Novel-object place conditioning: behavioral and dopaminergic processes in expression of novelty reward. **Behavioural Brain Research**, v. 129, n. 1–2, p. 41–50, 1 fev. 2002.

BIANCO, A. C. et al. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. **Endocrine reviews**, v. 23, n. 1, p. 38–89, fev. 2002.

BLATT, A. National Status of Testing for Hypothyroidism during Pregnancy and Postpartum. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 97, n. 3, p. 777–784, 14 dez. 2011.

BUCKSHEE, K. et al. Hypothyroidism Complicating Pregnancy. **Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 32, n. 3, p. 240–242, 1 ago. 1992.

CARAGEORGIU, H. et al. Changes in Antioxidant Status, Protein Concentration, Acetylcholinesterase, (Na⁺,K⁺)-, and Mg²⁺-ATPase Activities in the Brain of Hyper-

and Hypothyroid Adult Rats. **Metabolic Brain Disease**, v. 20, n. 2, p. 129–139, 1 jun. 2005.

CARAYANNIOTIS, G. Recognition of thyroglobulin by T cells: the role of iodine. **Thyroid: official journal of the American Thyroid Association**, v. 17, n. 10, p. 963–973, out. 2007.

CASEY, B. M. et al. Subclinical hypothyroidism and pregnancy outcomes. **Obstetrics and gynecology**, v. 105, n. 2, p. 239–245, fev. 2005.

CASSIO, A. et al. Treatment for congenital hypothyroidism: thyroxine alone or thyroxine plus triiodothyronine? **Pediatrics**, v. 111, n. 5 Pt 1, p. 1055–1060, maio 2003.

CHAN, S.; ROVET, J. THYROID HORMONES IN FETAL CENTRAL NERVOUS SYSTEM DEVELOPMENT. **Fetal and Maternal Medicine Review**, v. 14, n. 03, p. 177–208, 2003.

CHEN, C. et al. Thyroid hormone promotes neuronal differentiation of embryonic neural stem cells by inhibiting STAT3 signaling through TR α 1. **Stem cells and development**, v. 21, n. 14, p. 2667–2681, 20 set. 2012.

CHOPRA, I. J.; TAING, P.; MIKUS, L. Direct determination of free triiodothyronine (T3) in undiluted serum by equilibrium dialysis/radioimmunoassay (RIA). **Thyroid: official journal of the American Thyroid Association**, v. 6, n. 4, p. 255–259, ago. 1996.

COLIN, I. M. et al. Recent Insights into the Cell Biology of Thyroid Angiofollicular Units. **Endocrine Reviews**, v. 34, n. 2, p. 209–238, abr. 2013.

COLOMBO, A. C. et al. Dopaminergic mechanisms underlying catalepsy, fear and anxiety: do they interact? **Behavioural Brain Research**, v. 257, p. 201–207, 15 nov. 2013.

COOKE, S. F.; BLISS, T. V. P. Plasticity in the human central nervous system. **Brain**, v. 129, n. 7, p. 1659–1673, 7 jan. 2006.

COOPER, D. S. Antithyroid drugs. **The New England journal of medicine**, v. 311, n. 21, p. 1353–1362, 22 nov. 1984.

CROTEAU, W. et al. Cloning and expression of a cDNA for a mammalian type III iodothyronine deiodinase. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 28, p. 16569–16575, 14 jul. 1995.

DARBRA, S. et al. Perinatal alterations of thyroid hormones and behaviour in adult rats. **Behavioural Brain Research**, v. 68, n. 2, p. 159–164, jun. 1995.

DARBRA, S. et al. Perinatal hypothyroidism effects on neuromotor competence, novelty-directed exploratory and anxiety-related behaviour and learning in rats. **Behavioural brain research**, v. 143, n. 2, p. 209–215, 14 ago. 2003.

DARBRA, S. et al. Perinatal hypothyroidism effects on step-through passive avoidance task in rats. **Physiology & Behavior**, v. 82, n. 2–3, p. 497–501, 15 set. 2004.

DAVID HOTELLING; SHUERWOOD, L. The Effects of Pregnancy on Circulating Triiodothyronine. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 33, n. 5, p. 783–786, 1 nov. 1971.

DE CARO, V. et al. Buccal Delivery of Methimazole as an Alternative Means for Improvement of Drug Bioavailability: Permeation Studies and Matrix System Design. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 34, p. 5405–5410, 1 nov. 2012.

DONALD L. GERMAIN; GALTON, V. A.; HERNANDEZ, A. Defining the Roles of the Iodothyronine Deiodinases: Current Concepts and Challenges. **Endocrinology**, v. 150, n. 3, p. 1097–1107, 1 mar. 2009.

DUDCHENKO, P. A. An overview of the tasks used to test working memory in rodents. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 7, p. 699–709, nov. 2004.

DUPRÉ, S. M. et al. Both thyroid hormone receptor (TR)beta 1 and TR beta 2 isoforms contribute to the regulation of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone. **Endocrinology**, v. 145, n. 5, p. 2337–2345, maio 2004.

ENDLER, N. S.; KOCOVSKI, N. L. State and trait anxiety revisited. **Journal of Anxiety Disorders**, v. 15, n. 3, p. 231–245, maio 2001.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behavioural Brain Research**, v. 31, n. 1, p. 47–59, 1 nov. 1988.

ENTRINGER, S. et al. Stress exposure in intrauterine life is associated with shorter telomere length in young adulthood. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 33, p. E513–E518, 16 ago. 2011.

F, G. et al. Role of thyroid peroxidase antibodies in the outcome of pregnancy. **Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan : JCPSP**, v. 16, n. 7, p. 468–471, jul. 2006.

FENZI, G. F. et al. Neuropsychological assessment in schoolchildren from an area of moderate iodine deficiency. **Journal of endocrinological investigation**, v. 13, n. 5, p. 427–431, maio 1990.

FILE, S. E.; LISTER, R. G.; NUTT, D. J. The anxiogenic action of benzodiazepine antagonists. **Neuropharmacology**, v. 21, n. 10, p. 1033–1037, out. 1982.

FILE, S. E.; WARDILL, A. G. Validity of head-dipping as a measure of exploration in a modified hole-board. **Psychopharmacologia**, v. 44, n. 1, p. 53–59, 1 jan. 1975.

FLAMANT, F.; SAMARUT, J. Thyroid hormone receptors: lessons from knockout and knock-in mutant mice. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 14, n. 2, p. 85–90, mar. 2003.

FOWDEN, A. L.; FORHEAD, A. J. Endocrine mechanisms of intrauterine programming. **Reproduction**, v. 127, n. 5, p. 515–526, 5 jan. 2004a.

FOWDEN, A. L.; FORHEAD, A. J. Endocrine mechanisms of intrauterine programming. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 127, n. 5, p. 515–526, maio 2004b.

FOWDEN, A. L.; SILVER, M. The effects of thyroid hormones on oxygen and glucose metabolism in the sheep fetus during late gestation. **The Journal of Physiology**, v. 482 (Pt 1), p. 203–213, 1 jan. 1995.

FUGGLE, P. W. et al. Intelligence, motor skills and behaviour at 5 years in early-treated congenital hypothyroidism. **European journal of pediatrics**, v. 150, n. 8, p. 570–574, jun. 1991.

GENARO, G.; SCHMIDEK, W. R. The influence of handling and isolation postweaning on open field, exploratory and maternal behavior of female rats. **Physiology & Behavior**, v. 75, n. 5, p. 681–688, 15 abr. 2002.

GEREBEN, B. et al. Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. **Endocrine Reviews**, v. 29, n. 7, p. 898–938, dez. 2008.

GICQUEL, C.; EL-OSTA, A.; LE BOUC, Y. Epigenetic regulation and fetal programming. **Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 22, n. 1, p. 1–16, fev. 2008.

GILBERT, M. E.; PACZKOWSKI, C. Propylthiouracil (PTU)-induced hypothyroidism in the developing rat impairs synaptic transmission and plasticity in the dentate gyrus of the adult hippocampus. **Brain Research. Developmental Brain Research**, v. 145, n. 1, p. 19–29, 10 out. 2003.

GLINOER, D. The regulation of thyroid function in pregnancy: pathways of endocrine adaptation from physiology to pathology. **Endocrine reviews**, v. 18, n. 3, p. 404–433, jun. 1997.

GLINOER, D. Thyroid autoimmunity and spontaneous abortion. **Fertility and sterility**, v. 72, n. 2, p. 373–374, ago. 1999.

GLINOER, D. Clinical and biological consequences of iodine deficiency during pregnancy. **Endocrine development**, v. 10, p. 62–85, 2007.

GOODMAN, J. H.; GILBERT, M. E. Modest Thyroid Hormone Insufficiency during Development Induces a Cellular Malformation in the Corpus Callosum: A Model of Cortical Dysplasia. **Endocrinology**, v. 148, n. 6, p. 2593–2597, jun. 2007.

GRIEBEL, G. et al. The free-exploratory paradigm: an effective method for measuring neophobic behaviour in mice and testing potential neophobia-reducing drugs. **Behavioural Pharmacology**, v. 4, n. 6, p. 637–644, dez. 1993.

HASEBE, M. et al. Effects of an anti-thyroid drug, methimazole, administration to rat dams on the cerebellar cortex development in their pups. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 26, n. 5, p. 409–414, ago. 2008.

IZQUIERDO, I. et al. Separate mechanisms for short- and long-term memory. **Behavioural Brain Research**, v. 103, n. 1, p. 1–11, ago. 1999.

IZQUIERDO, I. et al. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. **Trends in Neurosciences**, v. 29, n. 9, p. 496–505, set. 2006.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory Formation: The Sequence of Biochemical Events in the Hippocampus and Its Connection to Activity in Other Brain Structures. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 68, n. 3, p. 285–316, nov. 1997.

IZQUIERDO, L. A. et al. Molecular pharmacological dissection of short- and long-term memory. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 22, n. 3, p. 269–287, jun. 2002.

KANAKA-GANTENBEIN, C. Fetal origins of adult diabetes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1205, p. 99–105, set. 2010.

KANDEL, E. R.; SQUIRE, L. R. Neuroscience: Breaking Down Scientific Barriers to the Study of Brain and Mind. **Science**, v. 290, n. 5494, p. 1113–1120, 11 out. 2000.

KIRSTEN, D. The thyroid gland: physiology and pathophysiology. **Neonatal network: NN**, v. 19, n. 8, p. 11–26, dez. 2000.

KLEIN, R. Z. et al. Prevalence of thyroid deficiency in pregnant women. **Clinical Endocrinology**, v. 35, n. 1, p. 41–46, jul. 1991.

KLEMM, W. R. Drug effects on active immobility responses: what they tell us about neurotransmitter systems and motor functions. **Progress in Neurobiology**, v. 32, n. 5, p. 403–422, 1989.

KOIBUCHI, N.; CHIN, W. W. Thyroid Hormone Action and Brain Development. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 11, n. 4, p. 123–128, 1 maio 2000.

KOROMILAS, C. et al. Effects of experimentally-induced maternal hypothyroidism on crucial offspring rat brain enzyme activities. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 35, p. 1–6, jun. 2014.

KOTERMANSKI, S. E.; JOHNSON, J. W.; THIELS, E. Comparison of behavioral effects of the NMDA receptor channel blockers memantine and ketamine in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 109, p. 67–76, ago. 2013.

KRASSAS, G. E.; POPPE, K.; GLINOER, D. Thyroid function and human reproductive health. **Endocrine Reviews**, v. 31, n. 5, p. 702–755, out. 2010.

LAZARUS, J. H. Thyroid disease in pregnancy and childhood. **Minerva Endocrinologica**, v. 30, n. 2, p. 71–87, jun. 2005.

LEGROW, A. B.; FIELDING, D. C.; PRESSLEY, T. A. Stimulation of Na,K-ATPase by hypothyroidism in the thyroid gland. **Journal of Endocrinology**, v. 160, n. 3, p. 453–460, 3 jan. 1999.

LEMKINE, G. F. et al. Adult neural stem cell cycling in vivo requires thyroid hormone and its alpha receptor. **The FASEB Journal**, 23 fev. 2005.

LI, Y. et al. Abnormalities of maternal thyroid function during pregnancy affect neuropsychological development of their children at 25-30 months. **Clinical endocrinology**, v. 72, n. 6, p. 825–829, jun. 2010.

LISBOA, P. C. et al. Acute cold exposure, leptin, and somatostatin analog (octreotide) modulate thyroid 5'-deiodinase activity. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 284, n. 6, p. E1172–1176, jun. 2003.

MÄNNISTÖ, T. et al. Thyroid dysfunction and autoantibodies during pregnancy as predictive factors of pregnancy complications and maternal morbidity in later life. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 95, n. 3, p. 1084–1094, mar. 2010.

MARTINEZ, R.; GOMES, F. C. A. Neuritogenesis Induced by Thyroid Hormone-treated Astrocytes Is Mediated by Epidermal Growth Factor/Mitogen-activated Protein Kinase-Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathways and Involves Modulation of Extracellular Matrix Proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 51, p. 49311–49318, 20 dez. 2002.

MATOS, A. C. C. et al. Trait anxiety affects the orofacial nociceptive response in rats. **Biological Research**, v. 44, n. 4, p. 357–361, jan. 2011.

MONTERO-PEDRAZUELA, A. et al. Modulation of adult hippocampal neurogenesis by thyroid hormones: implications in depressive-like behavior. **Molecular Psychiatry**, v. 11, n. 4, p. 361–371, 31 jan. 2006.

MORREALE DE ESCOBAR, G.; OBREGON, M. J.; ESCOBAR DEL REY, F. Role of thyroid hormone during early brain development. **European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies**, v. 151 Suppl 3, p. U25–37, nov. 2004.

MORREALE DE ESCOBAR, G.; OBREGÓN, M. J.; ESCOBAR DEL REY, F. Is neuropsychological development related to maternal hypothyroidism or to maternal hypothyroxinemia? **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 85, n. 11, p. 3975–3987, nov. 2000.

MORSE, A. C.; GENE ERWIN, V.; JONES, B. C. Strain and housing affect cocaine self-selection and open-field locomotor activity in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 45, n. 4, p. 905–912, ago. 1993.

MOZZACHIODI, R.; BYRNE, J. H. More than synaptic plasticity: role of nonsynaptic plasticity in learning and memory. **Trends in Neurosciences**, v. 33, n. 1, p. 17–26, jan. 2010.

MUMBY, D. G. et al. Hippocampal Damage and Exploratory Preferences in Rats: Memory for Objects, Places, and Contexts. **Learning & Memory**, v. 9, n. 2, p. 49–57, 3 jan. 2002.

NEGRO, R.; MESTMAN, J. H. Thyroid disease in pregnancy. **Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism**, v. 25, n. 6, p. 927–943, dez. 2011.

- OLIVARES, E. L. et al. Social stress-induced hypothyroidism is attenuated by antidepressant treatment in rats. **Neuropharmacology**, Anxiety and Depression. v. 62, n. 1, p. 446–456, jan. 2012.
- OLTON, D. S.; WERZ, M. A. Hippocampal function and behavior: spatial discrimination and response inhibition. **Physiology & Behavior**, v. 20, n. 5, p. 597–605, maio 1978.
- OWEN, G. R.; BRENNER, E. A. Mapping Molecular Memory: Navigating the Cellular Pathways of Learning. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 32, n. 6, p. 919–941, 1 ago. 2012.
- PASCUAL, A.; ARANDA, A. Thyroid hormone receptors, cell growth and differentiation. **Biochimica et biophysica acta**, 29 mar. 2012.
- PATEL, J. et al. Delivery of maternal thyroid hormones to the fetus. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 22, n. 5, p. 164–170, maio 2011.
- PEARCE, E. N. What do we know about iodine supplementation in pregnancy? **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 94, n. 9, p. 3188–3190, set. 2009a.
- PEARCE, E. N. What Do We Know about Iodine Supplementation in Pregnancy? **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 94, n. 9, p. 3188–3190, set. 2009b.
- POPOVA, N. K.; KULIKOV, A. V. On the role of brain serotonin in expression of genetic predisposition to catalepsy in animal models. **American Journal of Medical Genetics**, v. 60, n. 3, p. 214–220, 19 jun. 1995.
- RAO, K. R.; PADMAVATHI, I. J. N.; RAGHUNATH, M. Maternal micronutrient restriction programs the body adiposity, adipocyte function and lipid metabolism in offspring: a review. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders**, v. 13, n. 2, p. 103–108, jun. 2012.
- ROBERTS, C. G. P.; LADENSON, P. W. Hypothyroidism. **Lancet**, v. 363, n. 9411, p. 793–803, 6 mar. 2004.
- RUCHAT, S.-M.; HIVERT, M.-F.; BOUCHARD, L. Epigenetic programming of obesity and diabetes by in utero exposure to gestational diabetes mellitus. **Nutrition Reviews**, v. 71, p. S88–S94, 1 out. 2013.
- SALA-ROCA, J. et al. Effects of dysthyroidism in plus maze and social interaction tests. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 72, n. 3, p. 643–650, jun. 2002.
- SANBERG, P. R. et al. The catalepsy test: its ups and downs. **Behavioral Neuroscience**, v. 102, n. 5, p. 748–759, out. 1988.
- SANTOS, J. R. et al. Cognitive, motor and tyrosine hydroxylase temporal impairment in a model of parkinsonism induced by reserpine. **Behavioural Brain Research**, v. 253, p. 68–77, 15 set. 2013.

SARLIÈVE, L. L.; RODRÍGUEZ-PEÑA, A.; LANGLEY, K. Expression of thyroid hormone receptor isoforms in the oligodendrocyte lineage. **Neurochemical research**, v. 29, n. 5, p. 903–922, maio 2004.

SAWIN, S. et al. Development of Cholinergic Neurons in Rat Brain Regions: Dose-Dependent Effects of Propylthiouracil-Induced Hypothyroidism. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 20, n. 6, p. 627–635, nov. 1998.

SCHIØRRING, E. An open field study of stereotyped locomotor activity in amphetamine-treated rats. **Psychopharmacology**, v. 66, n. 3, p. 281–287, 1 dez. 1979.

SCHMITT, C. A.; MCDONOUGH, A. A. Thyroid hormone regulates alpha and alpha + isoforms of Na,K-ATPase during development in neonatal rat brain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 33, p. 17643–17649, 25 nov. 1988.

SHIBUTANI, M. et al. Assessment of developmental effects of hypothyroidism in rats from in utero and lactation exposure to anti-thyroid agents. **Reproductive Toxicology**, v. 28, n. 3, p. 297–307, nov. 2009.

SHIMOKAWA, N. et al. Altered Cerebellum Development and Dopamine Distribution in a Rat Genetic Model with Congenital Hypothyroidism. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 26, n. 3, p. 164–175, 1 mar. 2014.

SHUKLA, P. K. et al. Prenatal thyroxine treatment disparately affects peripheral and amygdala thyroid hormone levels. **Psychoneuroendocrinology**, v. 35, n. 6, p. 791–797, jul. 2010.

SILVA, J. E.; LARSEN, P. R. Adrenergic activation of triiodothyronine production in brown adipose tissue. **Nature**, v. 305, n. 5936, p. 712–713, 20 out. 1983.

SILVA, J. E.; LARSEN, P. R. Potential of brown adipose tissue type II thyroxine 5'-deiodinase as a local and systemic source of triiodothyronine in rats. **The Journal of clinical investigation**, v. 76, n. 6, p. 2296–2305, dez. 1985.

SINHA, R. A. et al. Enhanced neuronal loss under perinatal hypothyroidism involves impaired neurotrophic signaling and increased proteolysis of p75NTR. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 40, n. 3, p. 354–364, mar. 2009.

SMALLRIDGE, R. C. et al. Thyroid function inside and outside of pregnancy: what do we know and what don't we know? **Thyroid: official journal of the American Thyroid Association**, v. 15, n. 1, p. 54–59, jan. 2005.

SMITH, J. W. et al. Thyroid hormones, brain function and cognition: a brief review. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 26, n. 1, p. 45–60, jan. 2002.

SPIELBERGER, C. D. CHAPTER 14 - The Effects of Anxiety on Complex Learning and Academic Achievement. In: SPIELBERGER, C. D. (Ed.). **Anxiety and Behavior**. [s.l.] Academic Press, 1966. p. 361–398.

ST GERMAIN, D. L.; GALTON, V. A. The deiodinase family of selenoproteins. **Thyroid: official journal of the American Thyroid Association**, v. 7, n. 4, p. 655–668, ago. 1997.

STEIN, E. J. et al. Chronic mild stress induces widespread decreases in thyroid hormone $\alpha 1$ receptor mRNA levels in brain--reversal by imipramine. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n. 2, p. 281–286, fev. 2009.

SUTER, M. A.; ANDERS, A. M.; AAGAARD, K. M. Maternal smoking as a model for environmental epigenetic changes affecting birthweight and fetal programming. **Molecular Human Reproduction**, v. 19, n. 1, p. 1–6, jan. 2013.

TEIXEIRA-SILVA, F. et al. The free-exploratory paradigm as a model of trait anxiety in rats: test-retest reliability. **Physiology & Behavior**, v. 96, n. 4-5, p. 729–734, 23 mar. 2009.

THOMPSON, C. C.; POTTER, G. B. Thyroid Hormone Action in Neural Development. **Cerebral Cortex**, v. 10, n. 10, p. 939–945, 10 jan. 2000.

TONG, H. et al. Age-related learning and memory impairments in adult-onset hypothyroidism in Kunming mice. **Physiology & Behavior**, v. 91, n. 2-3, p. 290–298, 8 jun. 2007.

VACCARI, A.; TIMIRAS, P. S. Alterations in brain dopaminergic receptors in developing hypo- and hyperthyroid rats. **Neurochemistry International**, v. 3, n. 2, p. 149–153, 1981.

VAIDYA, B. et al. Detection of thyroid dysfunction in early pregnancy: Universal screening or targeted high-risk case finding? **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 92, n. 1, p. 203–207, jan. 2007.

VAN PRAAG, H. Serotonin-related, anxiety/aggression-driven, stressor-precipitated depression. A psycho-biological hypothesis. **European Psychiatry**, v. 11, n. 2, p. 57–67, 1996.

VARA, H. et al. Thyroid hormone regulates neurotransmitter release in neonatal rat hippocampus. **Neuroscience**, v. 110, n. 1, p. 19–28, 1 mar. 2002.

VENERO, C. et al. Anxiety, memory impairment, and locomotor dysfunction caused by a mutant thyroid hormone receptor $\alpha 1$ can be ameliorated by T3 treatment. **Genes & development**, v. 19, n. 18, p. 2152–2163, 15 set. 2005.

VERMIGLIO, F. et al. Defective neuromotor and cognitive ability in iodine-deficient schoolchildren of an endemic goiter region in Sicily. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 70, n. 2, p. 379–384, fev. 1990.

VOLPATO, C. B.; NUNES, M. T. Functional evidence for the presence of type II 5'-deiodinase in somatotropes and its adaptive role in hypothyroidism. **Neuroendocrinology**, v. 74, n. 4, p. 220–226, out. 2001.

WARNER, M. J.; OZANNE, S. E. Mechanisms involved in the developmental programming of adulthood disease. **Biochemical Journal**, v. 427, n. 3, p. 333–347, 1 maio 2010.

WASSERSTRUM, N.; ANANLA, C. A. Perinatal consequences of maternal hypothyroidism in early pregnancy and inadequate replacement. **Clinical Endocrinology**, v. 42, n. 4, p. 353–358, 1 abr. 1995.

WEINSTOCK, M. Sex-dependent changes induced by prenatal stress in cortical and hippocampal morphology and behaviour in rats: an update. **Stress (Amsterdam, Netherlands)**, v. 14, n. 6, p. 604–613, nov. 2011.

WILLOUGHBY, K. A.; MCANDREWS, M. P.; ROVET, J. F. Effects of maternal hypothyroidism on offspring hippocampus and memory. **Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association**, v. 24, n. 3, p. 576–584, mar. 2014.

WU, S.-Y. et al. Alternate pathways of thyroid hormone metabolism. **Thyroid: official journal of the American Thyroid Association**, v. 15, n. 8, p. 943–958, ago. 2005.

**ANEXO A – DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA
JUNTO AO CEPA/UFS**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa intitulado
“INFLUÊNCIA DO HIPOTIREOIDISMO GESTACIONAL
EXPERIMENTAL NA MEMÓRIA, ANSIEDADE E FUNÇÃO
MOTORA DE RATAS E SUA PROLE.” Sob coordenação do
Prof.Dr. Daniel Badauê Passos Júnior (protocolo CEPA 39/2013)
foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da
Universidade Federal de Sergipe, em reunião realizada dia
28/02/2014.

São Cristóvão, 06 de março de 2014.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Flávia', written over a horizontal line.

Prof. Dr. FLÁVIA TEIXEIRA SILVA
Coordenadora do CEPA/UFS