



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRO-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

PRISCILA FELICIANO DE OLIVEIRA

**REPERCUSSÕES DO HIPOTIREOIDISMO GESTACIONAL E PERINATAL
EXPERIMENTAL NA FUNÇÃO AUDITIVA DA PROLE DE RATAS**

ARACAJU

2018

PRISCILA FELICIANO DE OLIVEIRA

**REPERCUSSÕES DO HIPOTIREOIDISMO GESTACIONAL E PERINATAL
EXPERIMENTAL NA FUNÇÃO AUDITIVA DA PROLE DE RATAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito final à obtenção do grau de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof Dr Daniel Badaue Passos Junior

ARACAJU

2018

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA BISAU
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

O48r Oliveira , Priscila Feliciano de
Repercussões do hipotireoidismo gestacional e perinatal experimental na função auditiva da prole de ratas / Priscila Feliciano de Oliveira ; orientador Daniel Badaue Passos Junior. – Aracaju, 2018.
103 f. : il.

Tese (doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, 2018.

1. Hipotireoidismo. 2. Hipotireoidismo congênito. 3. Cóclea. 4. Perda auditiva. 5. Ratos I. Passos Junior, Daniel Badaue, orient. II. Título.

CDU 616.441-008.64

PRISCILA FELICIANO DE OLIVEIRA

**REPERCUSSÕES DO HIPOTIREOIDISMO GESTACIONAL E PERINATAL
EXPERIMENTAL NA FUNÇÃO AUDITIVA DA PROLE DE RATAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito final à obtenção do grau de Doutora em Ciências da Saúde.

Aprovada em: 02/02/2018

Presidente -Orientador: Prof. Dr. Daniel Badauê dos Passos Junior

1º Examinador: Prof. Dr. Ronaldo Carvalho Santos Junior

2º Examinador: Prof^ª. Dr^ª. Aline Cabral Barreto de Oliveira

3º Examinador: Prof. Dr Carlos Kazuo Taguchi

4º Examinador: Prof. Dr Nelson Almeida D´avilla Melo

DEDICATÓRIA

La se vão quase quatro anos de desafio. Nunca imaginei que iria passar por tantas adversidades, até finalmente conseguir terminar. O primeiro desafio veio com relação ao tema: hipotireoidismo e a área: experimental. Confesso que não abracei de braços abertos, trilhei neste caminho com muitos medos e incertezas. Ao longo dos anos do doutorado senti que o desafio era grande: lidar com os ratos, fazer os exames rodarem nos animais... achei que não iria conseguir e inúmeras vezes pensei em desistir. Mas fui determinada e resolvi os problemas um a um e enfim o experimento se concretizou. Quando mal terminei a fase experimental, em 2016, a vida me deu uma rasteira para que eu novamente fraquejasse: meu pai sofria um terrível acidente de carro que me tirou de cena de corpo e alma e desta maneira não tive cabeça para escrever os resultados... precisei de um tempão para me recompor.

Em meio a tantas tribulações estou aqui com o material concluído, mas muitas vezes pensei que não chegaria ao fim. Trabalho árduo com noites de sono perdidas e o pior, me sentia mãe ausente quando escutava Lucas me dizendo: -Você nunca mais me pegou na escola, na nataçãõ, no inglês! Com tristeza no coração eu seguia e dizia a ele, tudo que faço é para você meu amor e juntos iremos passar por esta fase.

Com força e muito foco fui escrevendo a tese, mas em 2017 o desgaste mental e físico tomou conta de

mim. Olhava para a tese e pensava que muito ainda tinha por fazer. Me debrucei, estudei, entendi processos fisiológicos que eu nem imaginava que existiam e aqui está, o meu melhor e o melhor dos aprendizados que já tive em todos os aspectos.

Diante de tudo isso dedico minha tão sonhada tese a meu filho, Lucas, que pelo qual eu via no fundo dos olhos dele o brilho do meu e sabia o quanto esta etapa seria importante para nós dois. Você veio ao mundo para me dar mais brilho, amor e foco. Mamãe ama você, meu príncipe!

Dedico também aos meus pais. Primeiramente a minha mãe por segurar na minha mão para que eu não caísse e claro por ter feito o papel de mãe avó na vida do Lucas. Por ter me apoiado na minha escolha, por entender o quanto tudo isto iria fazer diferença na minha vida. Mae te amo demais, você é meu porto seguro e você faz parte deste momento! Saiba que sempre estarei ao seu lado, principalmente agora, no momento que você mais precisa de mim. Com certeza olharemos para trás e veremos que tudo passou, que somos vencedoras em todos os sentidos.

Ao meu pai, que quase o perdi, por entre meus dedos. Senti medo, senti a dor da perda, nos ausentamos em um momento tão difícil para mim, mas de repente você ressurgiu com sua força e garra e disse: “-Vai que você consegue: estou aqui ao seu lado”. Pai, te amo, obrigada pelas palavras de conforto... enfim serei a sua tão sonhada doutora!

Ainda preciso dedicar a uma pessoa muito especial na minha vida: minha irmã (in memoriam). Tudo que sou devo a você, com garra e vontade de viver por você, me tornei fonoaudióloga, professora, mestre e agora me torno doutora. Tenho certeza que você esteve ao meu lado em todos os momentos, me levantando enquanto eu caia, me motivando e emanando vibrações positivas. Te amo sempre!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Daniel Badauê Passos Júnior por acreditar em mim, por confiar que a pesquisa iria dar certo, por ter sido sensível em relação aos problemas de saúde da minha família, enfim obrigada por ter entendido minha ausência neste momento. Muito obrigada pela oportunidade e pelos ensinamentos. Enfim, por ter me aproximado da fisiologia e me fazer crescer enquanto profissional.

As minhas queridas alunas: Paloma, Bia e Stella por juntas trilharem este árduo caminho, cheio de descobertas, limpezas de caixas, anestésias, ciclo estral mas, o mais importante por estarem ao meu lado me confortando e por não terem deixado eu desistir. Dizer obrigada é pouco, ofereço a vocês meu amor, amizade e eterna gratidão.

As minhas queridas alunas do projeto de pesquisa da oncologia, por serem tão presentes na minha vida, pelos grupos de auto-ajuda, pelas muitas risadas, por entenderem minha ausência por algumas vezes no grupo. Agradeço por serem minhas amigas, por me acolherem, pelas palavras de carinho, pela festinha para me alegrar. Obrigada por me incentivarem e por me exaltarem sempre dizendo que sou a melhor orientadora. Sem vocês o caminho seria mais difícil. Obrigada de coração!

A minha amiga, ex-aluna, filha do coração, fonoaudióloga Tamara. O que dizer de alguém tão especial na minha vida? Que sacrificou sábados e domingos para me ajudar na coleta de dados, por me ajudar na minha ausência no grupo de pesquisa da oncologia. Tam você é muito especial e já tem lugar cativo no meu coração. Obrigada por tudo, pelas risadas, pelos abraços, puxões de orelha, pelas lágrimas em conjunto. Com você sou mais forte. Te amo!

A minha amiga e comadre Lilian por estar presente em todos os momentos inclusive neste momento, desde a confecção do projeto e discussão do tema enquanto almoçávamos no Tarantela. Obrigada pelo seu carinho e por acreditar que tudo daria certo, mesmo eu achando que não conseguiria. Ao longo dos anos e no doutorado nossa amizade só fortaleceu!

As minhas amigas: Gregorina por me emprestar o equipamento de emissões, por discutir os resultados em meio as nossas corridas e pela força de sempre; e a Luciana pelas idas ao laboratório para ajudar na coleta e a orientar as alunas de IC com a imitanciometria e emissões, enfim pelas palavras de carinho e conforto.

A minha amiga Ângela Marques que se fez tão presente em momentos distintos da minha vida. No meu concurso para professora efetiva da UFS e agora no meu doutorado. Tenha certeza que sua presença deixou a caminhada mais leve. Palavras de carinho e conforto foram a base deste processo que só ela sabe e viveu comigo as adversidades encontradas no caminho. Amiga obrigada por tudo, jamais esquecerei tanto amor por mim e pelo meu filho. Essa conquista é nossa, fruto da nossa amizade. Não posso deixar de mencionar que já estou com sintomas de saudade. Mas como diz Richard Bach: “ Longe é um lugar que não existe”. Amo você.

A Prof^a Dr^a Rosana Givigi por ajudar a concretizar esse sonho, me apresentando ao meu orientador. Muito obrigada!

Ao Dept^o de Fonoaudiologia da UFS por permitir o empréstimo dos equipamentos para que fosse possível a realização dos procedimentos experimentais.

A amiga Prof^a Dr^a Silvia Baldrighi pelos conselhos e carinho durante esta fase, acreditando no meu potencial. Obrigada pelo incentivo e amizade, principalmente nos momentos que mais precisei.

A Fga Milca Teles por me emprestar o equipamento do PEATE para realização da coleta de dados. Muito obrigada!

Ao grupo do LANBAC por me ensinar tudo que sei com relação aos cuidados e manuseio com os ratos, em especial ao Demétrius por me ajudar com a análise estatística. Obrigada pela ajuda de todos, sem vocês tudo seria mais difícil, quase que impossível.

Aos meus amigos de doutorado, Júlio Cesar, Francisco Klank e Cesar Faro pelos conselhos e pela força quando em alguns momentos pensei em desistir. Valeu, vocês foram pessoas que fizeram diferença nessa minha trajetória.

À UFS, CAPES e CNPQ por dar auxílio e realizar investimentos financeiros nas pesquisas experimentais, por ter tornado esta pesquisa viável.

AO PPGCS pela oportunidade e pelo engrandecimento profissional.

Enfim, agradeço aos meus alunos e ex-alunos do curso de fonoaudiologia, a todos que contribuíram direta ou indiretamente, meu muito obrigada!

Reconheço a importância dos animais nas pesquisas experimentais, e que mesmo fazendo uso de número reduzido de ratos, preciso agradecer-los uma vez que de certa maneira desconforto foi produzido. Sem os animais, as pesquisas clinicas experimentais não teria sucesso.

“Uma nuvem não sabe por que se move em tal direção e em tal velocidade. Sente apenas um impulso que a conduz para esta ou aquela direção. Mas o céu sabe os motivos e os desenhos por trás de todas as nuvens, e você, também saberá, quando se erguer o suficiente para ver além dos horizontes”
(Richard Bach)

REPERCUSSÕES DO HIPOTIREOIDISMO GESTACIONAL E PERINATAL EXPERIMENTAL NA FUNÇÃO AUDITIVA DA PROLE DE RATAS

Priscila Feliciano de Oliveira (2018)

Introdução: Os hormônios tireoidianos (HT) durante a gestação são críticos para o desenvolvimento do órgão da audição. A hipofunção da tireoide neste período provoca má formação do órgão de Corti, caracterizada por alteração no sulco interno, membrana tectorial, ducto colcear, além de dificuldade na diferenciação das células ciliadas. Estas alterações repercutem negativamente no sistema auditivo, que pode culminar em perda auditiva. Estudos experimentais são realizados com a indução do hipotireoidismo até o período pós-natal, porém não há pesquisas que induzam apenas no período gestacional. O impacto da hipofunção tireoidiana restrita ao período embrionário permanece desconhecida, o que torna este estudo inédito. **Objetivo:** Avaliar o efeito do hipotireoidismo gestacional experimental na função auditiva da prole adulta em ratos. **Material e Método:** A pesquisa foi realizada com ratos Wistar e foi aprovada pelo Comitê de ética em pesquisa com animais da UFS, sob o número 21/2015. Foi administrado às ratas Wistar prenhes o fármaco antitireoidiano metimazol (0,02% - 1-metilimidazol-2-tiol, em água potável, *ad libitum*.) do nono dia gestacional (DG) até o dia do parto (21-22DG), e formaram o grupo da prole de mães induzidas ao hipotireoidismo gestacional (PMHG). No grupo até a lactação [prole de mães induzidas ao hipotireoidismo perinatal (PMHPN)], o fármaco metimazol foi administrado do 9ºDG ao 15º dia pós natal (DPN). Parte dos grupos PMHG e PMHPN receberam reposição dos HT com Levotiroxina na concentração de 50 µg/100 mL na água de beber. Todos os animais foram submetidos aos seguintes procedimentos: exames de timpanometria, emissão otoacústica por produto de distorção (EOAPD) e potencial evocado auditivo de tronco encefálico (PEATE) nas idades de 30, 60, 90 e 120 DPN. **Resultados:** Os dados não demonstraram disfunção da orelha média; porém os grupos induzidos ao hipotireoidismo apresentaram menores valores de compliância que o grupo prole de mães eutiroidianas ($p < 0,05$). EOAPD foi menor no PMHG de 4 a 12 kilohertz (kHz), com ausência de respostas no PMHPN ($p < 0,001$). Por outro lado, o PEATE revelou integridade das vias auditivas neurais até o nível do tronco encefálico no sistema nervoso central, sem modificação de latência. Além disso, os grupos com hipofunção tireoidiana apresentaram maiores limiares eletrofisiológicos (isto é, perda auditiva), com pior repercussão no grupo PMHPN ($p < 0,001$). Não foi observada reversão da hipofunção tireoidiana nos grupos que receberam a reposição dos HT, uma vez que apresentaram o mesmo comportamento auditivo funcional que os grupos sem o tratamento com levotiroxina. **Conclusão:** O hipotireoidismo gestacional altera a função coclear da prole, com normalidade da integridade das vias auditivas até tronco encefálico e presença de perda auditiva sensorineural de grau moderado a profundo.

PALAVRAS CHAVE: Hipotireoidismo. Hipotireoidismo congênito. Cóclea. Perda auditiva. Ratos.

REPERCUSSIONS OF GESTATIONAL AND PERINATAL EXPERIMENTAL HYPOTIROIDISM IN HEARING FUNCTION OF OFFSPRING RAT

Priscila Feliciano de Oliveira (2018)

Introduction: Thyroid hormones (TH) during gestation are critical for fetal growth and development of hearing organ. The lack of maternal TH leads an inadequate development of Organ of Corti with malformation of internal sulcus, tectorial membrane, cochlear ductus and a hair cells differentiation. It can adversely affect the auditory system, which can cause a hearing loss. Experimental studies are performed with postnatal period hypothyroidism induction, but there are no investigations that induce at gestational period. The impact of thyroid hypofunction restricted to the embryonic period remains unknown, which makes this study unpublished. **Objective:** To evaluate the effect of gestational hypothyroidism on auditory function of adult offspring in rats. **Methods:** The research was composed by Wistar rats and it was approved by the Ethics Committee on Animal Research of Federal University of Sergipe (Protocol #21/15). Pregnant Wistar rats were given the antithyroid drug methimazole (0.02% - 1-methylimidazole-2-thiol – MMI, in drinking water, *ad libitum*) from gestational day (GD) 9 to delivery day (GD 21-22), and comprises a offspring from gestational MMI-treated dams group (OGMTD). To lactation hypothyroidism group [offspring from perinatal MMI-treated dams group (OPMTD)] the drug was given from 9^oGD to the 15th postnatal day (PND). Part of the OGMTD and OPMTD groups received replacement of HT with levothyroxine at the concentration of 50 µg / 100 mL in drinking water. All animals were evaluated by tympanometry, distortion product otoacoustic emission (DPOAE) and auditory evoked brainstem response (ABR) at 30, 60, 90 and 120 PND. **Results:** Our data demonstrated no middle ear dysfunction; regardless of hypothyroidism groups, compliance was lower than the control group ($p < 0,005$). DPOAE was lower in OGMTD from 4 up to 12 kilohertz (kHz) and absent in OPMTD ($p < 0,001$). On the other hand, ABR revealed normal integrity of neural auditory pathways up to brainstem level in the central nervous system, with no latency modification. Additionally, hypothyroidism groups presented a higher electrophysiological threshold (i.e., hearing loss), worse repercussion in OPMTD ($p < 0,001$). Groups treated with levothyroxine did not reveal difference on hearing behavior compared to hypothyroidism groups. Our data suggest that gestational hypothyroidism leads to a cochlear damage function in offspring, with normality of the auditory pathways to the brainsten with moderate to profound sensorineural hearing loss.

Key words: Hypothyroidism. Congenital Hypothyroidism. Cochlea. Hearing loss. Rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenvolvimento da cóclea e córtex auditivo no homem e no roedor.....	29
Figura 2. Diagrama do processo de desenvolvimento do órgão sensorial do sistema auditivo. A atuação dos HT na diferenciação sensorial das células ciliadas.....	30
Figura 3. Modelo de regulação da proteína prestina e KCNQ4 das CCE do nascimento ao 12DPN pela ativação dos receptores dos HT.....	31
Figura 4. Esquema do desenvolvimento da orelha interna desde o 13ºDG até o 21ºDG, indicando o início da expressão das proteínas e o processo de maturação funcional.....	32
Figura 5. Morfologia coclear dos ratos no 8ºDPN.....	33
Figura 6. Corte transversal do Órgão de Corti de um rato com 29DPN.....	35
Figura 7. Corte longitudinal da cóclea com as escalas vestibular, média e timpânica; Órgão de Corti apoiado na membrana basilar.....	37
Figura 8. Desenho esquemático das células ciliadas externas dos humanos.....	38
Figura 9. Processo de transdução mecanoelétrica das CCE.....	39
Figura 10. Esquema ilustrativo da formação dos grupos experimentais da pesquisa.....	52
Figura 11. Curva timpanométrica do tipo A com pico dentro da normalidade, pico A_D com pico acima da normalidade e A_s , abaixo da normalidade.....	54
Figura 12. Foto da sonda das EOAPD com oliva de recém-nascido utilizada na testagem com ratos.....	55
Figura 13. Foto de um rato adulto anestesiado alocado em uma caixa revestida com espuma com inserção da sonda das EOAPD na OD.....	56
Figura 14. Esquema de posicionamento dos eletrodos de eletroencefalografia de acordo com o Sistema Internacional de Posicionamento 10-20.....	57
Figura 15. Desenho experimental ao longo dos 120 dias de ensaios experimentais.....	58
Figura 16. Efeito experimental do hipotireoidismo gestacional e até a lactação na massa corpórea da prole com 30, 60, 90 e 120DPN.....	62
Figura 17. Efeito experimental da indução do hipotireoidismo gestacional e até a lactação na compliância da prole com 30, 60, 90 e 120DPN.....	63
Figura 18. Efeito experimental da indução do hipotireoidismo gestacional e até a lactação na pressão da compliância da prole.....	64
Figura 19. Estudo da pressão da compliância ao longo do procedimento experimental da prole com 30, 60, 90 e 120DPN, em função do fator tempo.....	64

Figura 20. Efeito experimental da indução do hipotireoidismo gestacional e até a lactação na amplitude das frequências das EOAPD da prole.....	65
Figura 21. Efeito experimental da indução do hipotireoidismo gestacional e até a lactação na amplitude das EOAPD na prole com 30, 60, 90 e 120 DPN.....	67
Figura 22. Efeito experimental da indução do hipotireoidismo gestacional e até a lactação na amplitude das frequências das EOAPD com 30DPN da prole.....	68
Figura 23. Efeito experimental da indução do hipotireoidismo gestacional e até a lactação na amplitude das frequências das EOAPD com 60DPN da prole.....	69
Figura 24. Efeito experimental da indução do hipotireoidismo gestacional e até a lactação na amplitude das frequências das EOAPD com 90DPN da prole.....	70
Figura 25. Efeito experimental da indução do hipotireoidismo gestacional e até a lactação na amplitude das frequências das EOAPD com 120DPN da prole.....	71
Figura 26. Exemplo de um traçado do PEATE de um roedor do grupo PMHG com 30DPN, na orelha direita, nas intensidades de 90dBNA com a marcação das ondas I a V e a 40dBNA, com presença de ondas II e IV.....	72
Figura 27. Efeito das orelhas no estudo experimental com a indução do hipotireoidismo gestacional e até a lactação nas latências absolutas I a V, na intensidade de 90dBNA.....	72
Figura 28. Efeito experimental da indução do hipotireoidismo gestacional e até a lactação na latência das ondas absolutas de I a V do PEATE, na intensidade de 90dBNA na prole.....	73
Figura 29. Efeito experimental da indução do hipotireoidismo em função do fator tempo na latência das ondas absolutas de I a V no PEATE, na intensidade de 90dBNA da prole com 30, 60, 90 e 120DPN.....	74
Figura 30. Efeito experimental da indução do hipotireoidismo na gestação e até a lactação na latência interpico I-III, III-V e I-V do PEATE, na intensidade de 90 dBNA da prole.....	75
Figura 31. Efeito experimental do hipotireoidismo na gestação e até a lactação nos níveis mínimos de resposta do PEATE na prole.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição do número (n) da prole dos grupos experimentais subdivididos ao longo do tempo (30 a 120DPN).....	61
Tabela 2. Efeito experimental do hipotireoidismo gestacional e até a lactação da massa corpórea da prole.....	62
Tabela 3. Efeito experimental da indução do hipotireoidismo gestacional e até a lactação na compliância da prole.....	63
Tabela 4. Efeito experimental do hipotireoidismo gestacional e até a lactação na amplitude das frequências das EOAPD.....	66
Tabela 5. Efeito experimental do hipotireoidismo gestacional e até a lactação na amplitude das frequências das EOAPD nos grupos induzidos ao hipotireoidismo em relação ao grupo HG.....	66
Tabela 6. Efeito experimental do hipotireoidismo gestacional e até a lactação na amplitude das frequências das EOAPD nos grupos induzidos ao hipotireoidismo + T4 em relação aos grupos sem uso de levotiroxina.....	67
Tabela 7. Efeito experimental da indução do hipotireoidismo gestacional e até a lactação na amplitude das frequências das EOAPD com 30DPN.....	68
Tabela 8. Efeito experimental da indução do hipotireoidismo gestacional e até a lactação na amplitude das frequências das EOAPD com 60DPN.....	69
Tabela 9. Efeito experimental do hipotireoidismo gestacional e perinatal na amplitude das frequências das EOAPD com 90DPN.....	70
Tabela 10. Efeito experimental da indução do hipotireoidismo gestacional e até a lactação na amplitude das frequências das EOAPD com 120DPN.....	71
Tabela 11. Efeito experimental da indução do hipotireoidismo gestacional e até a lactação na latência absoluta das ondas I a V.....	73
Tabela 12. Efeito experimental da indução do hipotireoidismo gestacional e até a lactação na latência das ondas absolutas de I a V no PEATE.....	74
Tabela 13. Efeito experimental do hipotireoidismo gestacional e até a lactação na latência interpico I-III, III-V e I-V do PEATE.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AASI	Aparelho de amplificação sonora individual
Na/K ATPase	Bomba de sódio e potássio
Cav1-3	Canal de cálcio dependente de voltagem, tipo L, subunidade alfa 1
SK2	Canal de potássio
BK	Canal de potássio ativado com cálcio
KCNQ4	Canal de potássio dependente de voltagem, subfamília Q membro4
KCNJ10	Canal de potássio dependente de voltagem, subfamília J membro10
CCE	Células ciliadas externas
CCI	Células ciliadas internas
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
dBNa	Decibel nível de audição
daPA	DecaPascal
dBNPS	Decibel nível de pressão sonora
D1	Desiodase tipo 1
D2	Desiodase tipo 2
D3	Desiodase tipo 3
DG	Dia gestacional
DPN	Dia pós-natal
DBCA	Diretrizes Brasileiras para o Cuidado e Utilização de Animais
EOAT	Emissões otoacústicas transientes
EOAPD	Emissões otoacústicas por produto de distorção
<i>Pit1</i> ^{dw}	Fator 1 da transcrição da pituitária
Fgf	Fator de crescimento do fibroblasto
Fgfr3	Fator de crescimento do fibroblasto receptor 3
f1	Frequencia 1
f2	Frequencia 2
CDKN	Genes inibidores da quinase
SLC5A5	Gene transportador de soluto da família 5 membro 5
SLC26A4	Gene transportador de soluto da família 26 membro 4
TBG	Globulina ligadora dos hormônios tireoidianos
HC	Hipotireoidismo congênito
PME	Prole de mães eutiroidianas

PMHG	Prole de mães hipotiroídianas induzidas no período gestacional
PMHG+T4	Prole de mães hipotiroídianas induzidas no período gestacional com administração de T4
PMHPN	Prole de mães hipotiroídianas induzidas até a lactação
PMHPN+T4	Prole de mães hipotiroídianas induzidas até a lactação com administração de T4
HG	Hipotireoidismo gestacional
TSH	Hormônio tiroestimulante ou tireotrofina
TSHr	Hormônio tiroestimulante ou tireotrofina mutante
HT	Hormônios tireoidianos
kDa	Kilodaltons
MAE	Meato acústico externo
MTZ	Metimazol
nm	Nanômetro
TRH	Tireotropina
TG	Tiroglobulina
T4	Tiroxina ou tetraiodotironina
TTR	Transtirretina
TE	Tronco encefálico
T3	Triiodotironina
SLC 26	Transportador de ânions, subfamília 26
PEATE	Potencial evocado auditivo de tronco encefálico
TPO	Peroxidase tireoidiana
PTU	Propiltiouracil
TR α	Receptores dos HT alfa
TR α 1	Receptores dos HT alfa1
TR α	Receptor do hormônio tireoidiano que codifica o TR α
TR β	Receptores dos HT beta
TR β	Receptor do hormônio tireoidiano que codifica o TR β
TRb ^{PV}	Mutação do gene TRb
SNC	Sistema nervoso central
OE	Orelha externa
OM	Orelha média
OI	Orelha interna

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. JUSTIFICATIVAS.....	23
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	24
3.1 <i>Hipotireoidismo.....</i>	24
3.2 <i>O sistema auditivo e a atuação do hormônio tireoidiano.....</i>	29
3.2.1 <i>Embriologia e funcionamento do órgão da audição em humanos e nos ratos.....</i>	29
3.2.2 <i>A repercussão do hipotireoidismo na função auditiva.....</i>	40
3.2.3 <i>Relação da avaliação do sistema auditiva em roedores frente ao hipotireidismo.....</i>	44
4. OBJETIVOS	49
4.1 <i>Objetivo geral.....</i>	49
4.2 <i>Objetivos específicos.....</i>	49
5. MATERIAL E MÉTODOS	50
5.1 <i>Aspectos éticos.....</i>	50
5.2 <i>Animais utilizados.....</i>	50
5.3 <i>Grupos experimentais.....</i>	50
5.4 <i>Drogas utilizadas.....</i>	52
5.6 <i>Estudo Piloto.....</i>	53
5.7 <i>Avaliação da função auditiva.....</i>	53
5.7.1 <i>Meatoscopia e Timpanometria.....</i>	54
5.7.2 <i>Emissões otoacústicas por produto de distorção.....</i>	55
5.7.3 <i>Potencial evocado de tronco encefálico (PEATE).....</i>	56
5.8 <i>Delineamento experimental.....</i>	58
5.9 <i>Planejamento estatístico.....</i>	58
6. RESULTADOS	60
6.1 <i>Estudo piloto.....</i>	60
6.2 <i>Caracterização da amostra.....</i>	61
6.3 <i>Timpanometria.....</i>	63
6.4 <i>Emissões otoacústicas por produto de distorção.....</i>	64

6.5	<i>Potencial evocado auditivo de tronco encefálico</i>	71
7.	DISCUSSÃO	77
7.1	<i>Timpanometria</i>	79
7.2	<i>Emissões otoacústicas por produto de distorção</i>	81
7.3	<i>Potencial evocado auditivo de tronco encefálico</i>	85
8.	CONCLUSÃO	90
9.	REFERÊNCIAS	91
10.	ANEXO	102

1. INTRODUÇÃO

Os hormônios tireoidianos (HT) atuam no desenvolvimento de diversos órgãos e sistemas, sobretudo no sistema nervoso central, principalmente durante a vida intrauterina. Nesta fase, o feto depende quase que exclusivamente dos HT produzidos pela mãe, uma vez que a tireoide fetal é inativa até o final do segundo trimestre da gestação em humanos e durante quase toda a vida intrauterina de outros mamíferos (LAZARUS, 2011).

A diminuição dos HT durante a gestação, desencadeia o hipotireoidismo gestacional (HG) e implica em redução do aporte destes hormônios para o feto. Estudos experimentais, com ratos, evidenciam prejuízos no desenvolvimento pós-natal como distúrbio do comportamento, dificuldade de aprendizagem (DARBRA et al., 2003), hipertensão (SANTOS et al., 2012), hipersensibilidade térmica (SANTOS et al., 2012) e alterações metabólicas (GAUJAC, 2013).

Outra desordem que pode estar relacionada a hipofunção da tireoide no período gestacional é a auditiva, porém esta, ainda é pouca conhecida. Pesquisas com humanos vem sendo desenvolvidas, entretanto não são capazes de elucidar se o hipotireoidismo, principalmente o clínico, é agente causal da perda auditiva, uma vez que o tratamento com tiroxina nestes pacientes é imprescindível e o uso desta terapêutica pode interferir no resultado dos estudos (HASHEMIPOUR et al., 2012).

Estudos experimentais são mais efetivos para explicar a repercussão do hipotireoidismo perinatal no processo de formação e desenvolvimento do órgão da audição, uma vez que não é preconizada a reposição hormonal para restabelecer o quadro de disfunção tireoidiana. Pesquisa com roedores relatam que a carência de HT no período gestacional e neonatal interfere negativamente na função auditiva e pode gerar alterações no Órgão de Corti. A alteração auditiva é caracterizada pelo acometimento das células ciliadas, sendo que quanto maior a dose da droga utilizada para indução do hipotireoidismo e o tempo de administração, maiores são os prejuízos ao sistema auditivo (DEOL, 1973; KNIPPER et al., 2000).

A maioria dos estudos experimentais induzem o hipotireoidismo até o período pós natal. Tem-se uma diminuição dos receptores dos HT ($TR\alpha$ e $TR\beta$) e, conseqüentemente, diminuição do aporte de glicogênio e da proteína prestina (atua no processo de eletromotilidade das células ciliadas). Além disto, observa-se a ruptura morfológica das células ciliadas externas (CCE) e a diminuição de microtúbulos dos pilares celulares (WEBER et al., 2002; WINTER et al., 2007; RICHTER et al., 2011; SZARAMA et al.,

2013). Também foram detectadas alterações morfológicas da orelha interna (OI), tais como malformação da membrana tectorial, diminuição do potencial endococlear e atraso na diferenciação do epitélio sensorial (RUSCH et al., 2001; WEBER et al., 2002; SENDIN et al., 2007; WINTER et al., 2007).

Evidências experimentais relatam que alterações morfológicas e histológicas do órgão de Corti comprometem o adequado funcionamento do sistema auditivo, com diminuição do reflexo de sobressalto (GOLDEY et al., 1995a) e perda auditiva neurossensorial coclear (DEOL, 1973; GOLDEY et al., 1995a; KNIPPER et al., 2000; WADA; YUMOTO; ISO, 2013).

Diante da repercussão negativa no órgão da audição dos filhos nascidos de mães com HG, torna-se imprescindível o diagnóstico precoce da deficiência auditiva, uma vez que esta possui íntima relação com atraso no desenvolvimento da linguagem, que conseqüentemente interfere nos aspectos social, emocional, educacional e familiar (GATTO; TOCHETTO, 2007).

Abordagens experimentais indutoras de hipotireoidismo gestacional permitem um olhar diferenciado para o estudo da função auditiva. Vários autores relatam que pouco se sabe sobre a relação dos HT na função auditiva, sendo assim estudos mais aprofundados devem ser desenvolvidos a fim de propiciar o entendimento dos impactos da disfunção tireoidiana materna na função auditiva da prole. Vale ressaltar que os estudos experimentais induzem a hipofunção tireoidiana até o período pós-natal, porém não há pesquisas que evidenciem a repercussão dos HT na função auditiva apenas no período gestacional (RUSCH et al., 2001; FORREST; REH; RÜSCH, 2002; MELSE-BOONSTRA; MACKENZIE, 2013).

Diante do exposto, a influência e importância dos HT na função auditiva no que diz respeito a repercussão dos acontecimentos da vida intrauterina na vida adulta, o presente estudo apresenta-se relevante e inédito.

2. JUSTIFICATIVAS

Este trabalho pode ser justificado pelas seguintes razões:

- i) Alta prevalência de hipotireoidismo durante o período gestacional em humanos;
- ii) Reconhecida influência dos HT maternos no desenvolvimento fetal;
- iii) Carência de dados correlacionando hipotireoidismo com a função auditiva

Atualmente não há ferramentas que substituam animais para fins de estudos da função auditiva, sobretudo da prole de mães com HG. Por outro lado, somente a experimentação realizada com animais tem a possibilidade para responder, de modo satisfatório as perguntas experimentais apresentadas neste projeto. Ressalta-se aqui o impedimento de se desenvolver este estudo em humanos, uma vez que a detecção de hipotireoidismo durante a gestação pressupõe a obrigação do tratamento das gestantes.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Hipotireoidismo

O hipotireoidismo é uma doença causada pelo funcionamento deficiente da glândula tireoide e resulta na produção de quantidade insuficiente ou ausência dos hormônios tetraiodotironina (T4) e triiodotironina (T3) (BRENT; DAVIES, 2011).

Sabe-se que a produção de T4 e T3 é regulada pela secreção hipofisária do hormônio tireosestimulante (TSH). Assim, alterações significativas nas concentrações séricas de TSH resultam em pequena alteração da concentração dos hormônios tireoidianos livres, que tornam o TSH o melhor indicador de discretas alterações da produção tireoidiana (CHIN et al., 1993).

A regulação da glândula tireóidea depende do suplemento de iodo regional, porém observa-se que há diferenças entre os países em relação a concentração de iodo (VÖLZKE et al., 2005).

O hipotireoidismo pode ser dividido em clínico (primários), e se apresenta de forma clássica. Resulta em um aumento da concentração de TSH e baixos níveis de T4 e T3. Essa disfunção tireoidiana ocorre em decorrência da diminuição da tireotropina (TRH) pela redução da estimulação a glândula tireóidea. A doença apresenta-se de forma severa e os sinais e sintomas são típicos do hipotireoidismo. Dentre os sintomas, tem-se a presença de bradicardia, pele grossa e seca, sensação de frio, cabelo seco e sem brilho, fraqueza e letargia (STAGNARO-GREEN, 2011; BRENTA et al., 2013).

A prevalência do hipotireoidismo clínico no período gestacional varia de 1,2 a 5% e é considerada alta, e está intimamente ligada a fatores ambientais e demográficos (SAHU et al., 2010; JISKRA et al., 2011; OHASHI et al., 2013; SAKI et al., 2014; ANDERSEN; OLSEN; LAURBERG, 2016).

É mais comum na população feminina e na idade reprodutiva (VADIVELLOO et al., 2013; ANDERSEN; OLSEN; LAURBERG, 2016). Além disto, a doença está associada a fatores de risco como: idade materna avançada, número de partos, concentração de iodo ingerida, bem como álcool e fumo (ANDERSEN; OLSEN; LAURBERG, 2016). Também há relatos na literatura da relação do hipotireoidismo com a hipertensão e diabetes mellitus (OHASHI et al., 2013).

A repercussão do hipotireoidismo clínico no período gestacional pode acarretar problemas para a gestante, feto e para o concepto na vida adulta. Dentre os prejuízos tem-se: prematuridade, hipertensão, baixo peso ao nascer, ruptura de placenta e óbito fetal. Dentre as

alterações no desenvolvimento observa-se: epilepsia, dificuldade de atenção, hiperatividade, desordem afetiva e até mesmo esquizofrenia. A literatura também reporta alteração na programação fetal, sendo que é possível o surgimento de doença neurológica e /ou psiquiátrica na infância (STAGNARO-GREEN, 2011; SAKI et al., 2014; ANDERSEN; OLSEN; LAURBERG, 2015).

Por outro lado, a doença subclínica é definida por uma alta concentração de TSH e níveis normais de T3 e T4 (LAZARUS et al., 2014). A desordem subclínica no período gestacional, não apresenta sintomas aparentes, pode diretamente afetar e alterar o perfil da expressão genética. Acarreta prejuízos para a mãe e para o feto como: aborto espontâneo, hipertensão gestacional, diabetes gestacional, baixo escore no índice de Apgar (teste que avalia a vitalidade do recém-nascido no nascimento) e diminuição do quociente de inteligência em decorrência de alteração no desenvolvimento intrauterino do sistema nervoso central (SNC) (STENZEL; HUTTNER, 2013; NEGRO; STAGNARO-GREEN, 2014; SAKI et al., 2014).

Na população em geral, a prevalência de hipotireoidismo subclínico é de 3 a 12%, com maior acometimento da população feminina (6 a 10%) durante o período gestacional (11,3%) (SAKI et al., 2014). Observa-se que 20% tendem a apresentar a doença com idade superior a 60 anos. A influência da idade avançada pode ser explicada pela presença da menopausa, uma vez que a reposição hormonal leva o aumento dos níveis de TSH (BOUCAI; HOLLOWELL; SURKS, 2011; KIM; PARK, 2014). Além disto, a prevalência é mais alta em países com baixas temperaturas na maior parte do ano (necessidade do corpo em manter a termogênese), na população branca e nos tabagistas (KIM; PARK, 2014).

Pesquisas realizadas no Brasil, apontam dados semelhantes ao da literatura internacional. A prevalência do hipotireoidismo subclínico varia de 6,5 a 19,1%, com maiores índices para a população feminina (SICHERI et al., 2007; CAMARGO et al., 2008; SGARBI et al., 2010; BENSEÑOR et al., 2011).

Diante do exposto, é notório que a prevalência do hipotireoidismo, seja clínico ou subclínico, varia de acordo com a região, população, idade, sexo e raça. Um dos fatores que também permitem a diferença de prevalência na população é o padrão de normalidade do TSH adotado. Os valores normais de TSH variam entre as regiões. Nos Estados Unidos e no Japão os valores normais estão entre 0,45 a 4,5 miliunidades internacionais por litro (mIU/L) (SURKS et al., 2004; OHASHI et al., 2013). Em contrapartida, na Alemanha o padrão preconizado como normal é de 0,3 a 3,7 mIU/L (VÖLZKE et al., 2005). No Brasil, de acordo com as recomendações do Departamento de Tireoide da Sociedade Brasileira de

Endocrinologia e Metabologia, são adotados valores de 0,4 a 4,5 mIU/L (SGARBI et al., 2013).

Por ser uma disfunção comum nas mulheres e pouco diagnosticada no período gestacional, é crescente a preocupação com o diagnóstico e tratamento precoce durante a gravidez. Estudo brasileiro enfatizou que a intervenção medicamentosa para reposição dos HT deve ocorrer, principalmente no período gestacional (VILLAGELIN et al., 2016). A Sociedade de Endocrinologia Americana enfatiza que se for diagnosticado antes do período gestacional, o tratamento se torna mais efetivo, caso a mulher venha engravidar (DE GROOT et al., 2012).

A última recomendação da Sociedade de Endocrinologia Americana para avaliação dos HT durante a gestação designa como níveis de normalidade para o TSH no primeiro trimestre valores de 0,1 a 2,5 mIU/L, no segundo de 0,2 a 3,0 mIU/L e no terceiro 0,3 a 3,0 mIU/L (VANDANA et al., 2014). O Departamento de Tireoide da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia do Brasil sugere para o primeiro trimestre valores até 2,5 mIU/L e no segundo e terceiro até 3,5 mIU/L (SGARBI et al., 2013). A mais recente diretriz de diagnóstico e manejo da doença da tireóide durante a gestação preconizada pela Associação Americana de Tireoide indica valores de 0,1 a 2,5 mIU/L (ALEXANDER et al., 2017).

Os valores séricos de T4 também podem definir o quadro de hipotireoidismo. Este é avaliado quando não há possibilidade de dosagem do TSH. A diretriz de prática clínica da Sociedade Endócrina Americana preconiza que na dosagem hormonal, os valores de T4 livre (5–12 µg/dL ou 50–150 nmol/L) no período gestacional, devem ser adaptados no segundo e terceiro trimestre (DE GROOT et al., 2012).

Mesmo sendo preconizado o diagnóstico precoce, os testes para dosagem dos HT são realizados apenas para o grupo de risco e não como uma triagem universal (DE GROOT et al., 2012; BRENTA et al., 2013; LAZARUS et al., 2014; ALEXANDER et al., 2017). O grupo de risco é caracterizado por mulheres gestantes que apresentam sinais clínicos de hipotireoidismo; idade acima de 30 anos; antecedentes familiares para hipotireoidismo ou doença tireóidea autoimune; com histórico de infertilidade dentre outros (DE GROOT et al., 2012; LAZARUS et al., 2014; ALEXANDER et al., 2017). Estudos elucidam que a estratégia de triagem apenas para o grupo de risco não é suficiente. O melhor custo benefício para a gestante, feto bem como para as políticas públicas seria a triagem universal (OHASHI et al., 2013; VILLAGELIN et al., 2016).

Diante do exposto, torna-se imprescindível o monitoramento da população feminina, sendo que há estudos que elucidam a importância da triagem englobar também as mulheres de meia idade, idade com alta prevalência (EASTMAN, 2012). A inserção do diagnóstico precoce possibilita terapia de reposição dos HT e evita diversos danos maternos e fetais, uma vez que esta é uma doença passível de prevenção e tratamento (KOOISTRA et al., 2006; MOLETI et al., 2009; EASTMAN, 2012).

É alarmante o número de mulheres não diagnosticadas no período gestacional (de 3 a 15%) e essa elevada prevalência evidencia que há necessidade de revisar o programa de triagem desta disfunção (NEGRO; STAGNARO-GREEN, 2014). Um estudo relatou a prevalência de 11,8% de hipotireoidismo diagnosticado a partir da 12ª semana gestacional, o que preconiza a intervenção precoce (MOLETI et al., 2009).

Diversos estudos elucidam prejuízos causados pelo hipotireoidismo durante a gravidez. Um estudo no Pará analisou a repercussão da disfunção tireoidiana nas crianças nascidas de mãe hipotireoidianas. Foram avaliados 131 prontuários de crianças com HC que participaram do Programa Nacional de Triagem Neonatal de Belém. Verificaram que, 57,3% das crianças iniciaram o tratamento com administração de tiroxina em até 90 dias, sendo as meninas mais acometido pelo HC. Observaram ainda, que 39,7% da amostra total apresentou atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e 34,4% hipoatividade. Os autores relataram a importância dos programas de triagem na população infantil para tratamento precoce das desordens relacionadas ao desenvolvimento, bem como o tratamento do hipotireoidismo materno durante o período gestacional (BENEVIDES et al., 2006).

Um estudo com 96 neonatos com HC nascidos de mães diagnosticadas com hipotireoidismo na 12ª semana gestacional evidenciou que os recém-nascidos apresentaram baixos índices neurológicos (KOOISTRA et al., 2006).

Além das alterações neurológicas, a literatura ainda reporta comprometimento do órgão da audição, porém as pesquisas com seres humanos muitas vezes não são capazes de inferir que o HC, exclusivo, pode gerar perda auditiva. É preconizado o tratamento com tiroxina nestes pacientes, e o uso da terapêutica pode interferir no resultado dos estudos (HASHEMIPOUR et al., 2012).

Exames de emissões otoacústicas transientes (EOAT) e potencial evocado de tronco encefálico (PEATE) foram realizados em 94 crianças com HC em tratamento com tiroxina nas idades de 4 meses a 3 anos. Foi diagnosticado 3,2% das crianças com perda auditiva neurossensorial, sendo que, tal dado reforça a importância da detecção precoce do HG, a fim

de prevenir diversas alterações incluindo desvios no desenvolvimento de linguagem e fala (HASHEMIPOUR et al., 2012).

Avaliação da função auditiva e neurológica foi realizada em 45 crianças em tratamento para HC. Observaram que 20% apresentaram perda auditiva neurossensorial, destes, 8,8% tinham indicação para uso de aparelho de amplificação sonora individual (AASI). Com relação aos aspectos neurológicos, 20% foram diagnosticados com QI rebaixado (VANDERSCHUEREN-LODEWEYCKX et al., 1983).

Observa-se que a repercussão do HC na audição pode se estender para a vida adulta. Investigadores reportaram presença de perda auditiva em 88,3% dos indivíduos, com média de idade de 23,5 anos, diagnosticados com HC tratados desde o período neonatal. A alteração foi caracterizada na maioria, de grau leve a moderado, com acometimento bilateral do tipo neurossensorial. O diagnóstico da perda auditiva ocorreu com uma média de idade de sete anos, sendo que 17% fizeram uso de AASI na vida adulta (LICHTENBERGER-GESLIN et al., 2013).

Vale ressaltar que a maioria das pesquisas em humanos estão voltadas para o hipotireoidismo clínico e a repercussão do subclínico ainda é pouco descrita. Estudos evidenciam que as gestantes com disfunção da tireoide na forma subclínica também podem apresentar complicações como ruptura da placenta e prematuridade, porém pouco se sabe sobre a repercussão da deficiência do hormônio da tireoide no desenvolvimento infantil (CASEY et al., 2005). Há relatos que a alteração dos HT na forma mais branda da doença, pode diretamente afetar e alterar o perfil da expressão genética, e leva a prejuízos no desenvolvimento do SNC e rebaixamento do QI (OHASHI et al., 2013; STENZEL; HUTTNER, 2013).

Estudos experimentais são capazes de inferir a presença de alteração no órgão da audição em decorrência do hipotireoidismo, sendo que há um consenso na literatura do diagnóstico de perda auditiva (UZIEL et al., 1983b; CROFTON et al., 2000; KNIPPER et al., 2001; SPRENKLE et al., 2001a; LASKY et al., 2002; ANJANA et al., 2006; GRAHAM; VETTER, 2011). Os estudos com animais evidenciaram que o hipotireoidismo gera alterações nos tecidos e órgãos como um todo e também atua negativamente no desenvolvimento do sistema auditivo e córtex cerebral (UZIEL et al., 1983b; WINTER et al., 2009; WADA; YUMOTO; ISO, 2013).

3.2 O sistema auditivo e a atuação do hormônio tireoidiano

3.2.1 Embriologia e funcionamento do órgão da audição em humanos e nos ratos

O processo embrionário do órgão da audição nos roedores é semelhante aos humanos, porém nos roedores o processo maturacional ocorre após o nascimento (Figura 1). O desenvolvimento da base morfológica ocorre antes do nascimento, porém a diferenciação das estruturas mais finas ocorre pós nascimento (DEOL, 1973).



Figura 1. Desenvolvimento da cóclea e córtex auditivo no homem e no roedor. Extraído e adaptado de (LENOIR; SHNERSON; PUJOL, 1980)

A OI, nos roedores, bem como nos humanos, é formada por tecido ectodérmico, sendo que o placóide óptico origina os neurônios do VIII nervo craniano e invagina para formar o otocisto. É formado por órgãos vestibulares: sáculo, utrículo e três canais semicirculares e o epitélio sensorial destes órgãos formam as células ciliadas (BRYANT; GOODYEAR; RICHARDSON, 2002).

No 12,5 dia gestacional (DG) (Figura 2), os receptores dos hormônios tireoidianos ($TR\beta$ e $TR\alpha$) agem no processo de diferenciação celular dos ratos após o nascimento e se estendem até os estágios mais tardios (BRADLEY; TOWLE; YOUNG, 1994). Estudos relatam que o $TR\beta$ é expresso no epitélio sensorial do gânglio espiral e na proteína prestina (WINTER et al., 2006, 2007; NG et al., 2009). Esta proteína pertencente à família de transportadores de anions, subfamília 26 (SLC26), é responsável pela eletromotilidade das CCE e pela amplificação coclear (KAVLIE et al., 2015). O $TR\alpha$ está presente nos canais de potássio das CCE e no potencial endococlear da estria vascular (WINTER et al., 2006, 2007; NG et al., 2009).

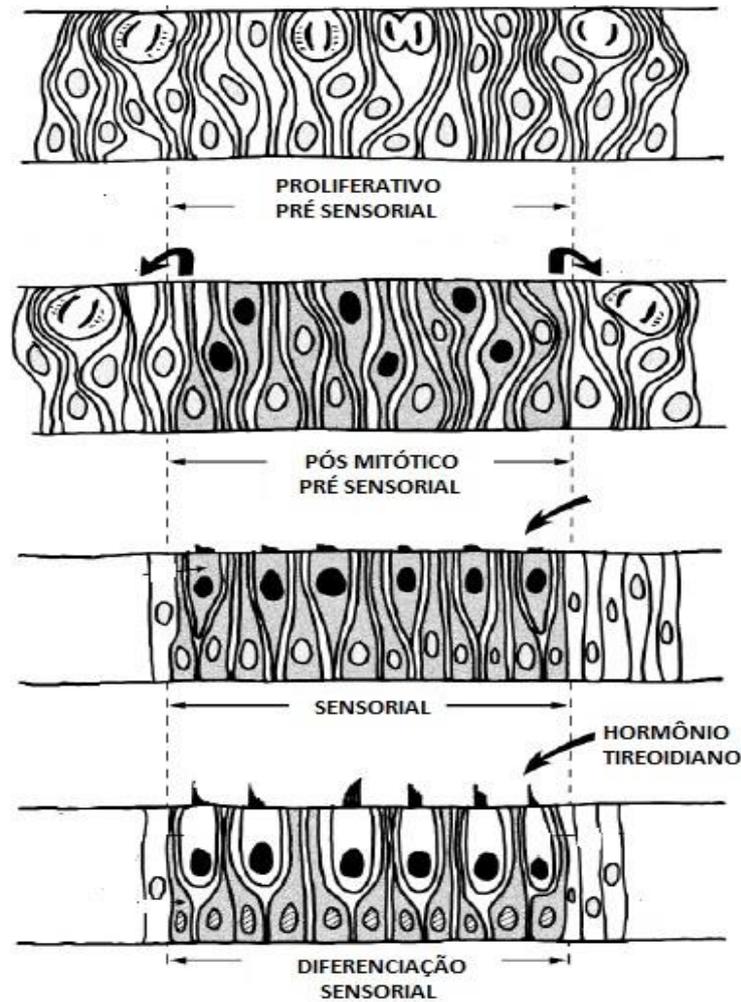


Figura 2. Diagrama do processo de desenvolvimento do órgão sensorial do sistema auditivo. A atuação dos HT na diferenciação sensorial das células ciliadas. Extraído, traduzido e adaptado de (BRYANT; GOODYEAR; RICHARDSON, 2002).

Destaca-se a importância dos hormônios tireoidianos durante a gestação, sendo que o período crítico para o desenvolvimento da OI dos roedores ocorre entre o 15° e 17° DG. A partir do 17°DG inicia a formação da glândula tireóidea, porém anterior a este período e até a glândula tireóidea do embrião iniciar o funcionamento, a prole é dependente dos HT maternos (DEOL, 1973).

É sabido a importância da atuação dos receptores no processo de proliferação, diferenciação e maturação das células ciliadas, sendo que a atuação inicia no período gestacional e se estende até o 21°DPN (BERMINGHAM, 1999). Estudos com receptores dos HT de ratos relatam a importância do TR α e TR β no processo maturacional e de eletromotilidade das CCE. Atuam na expressão da proteína prestina, no canal de potássio dependente de voltagem, subfamília Q4 (KCNQ4) e no canal de cálcio dependente de voltagem, tipo L, subunidade alfa 1 (Cav1-3) (WINTER et al., 2007), como pode ser observado na Figura 3.

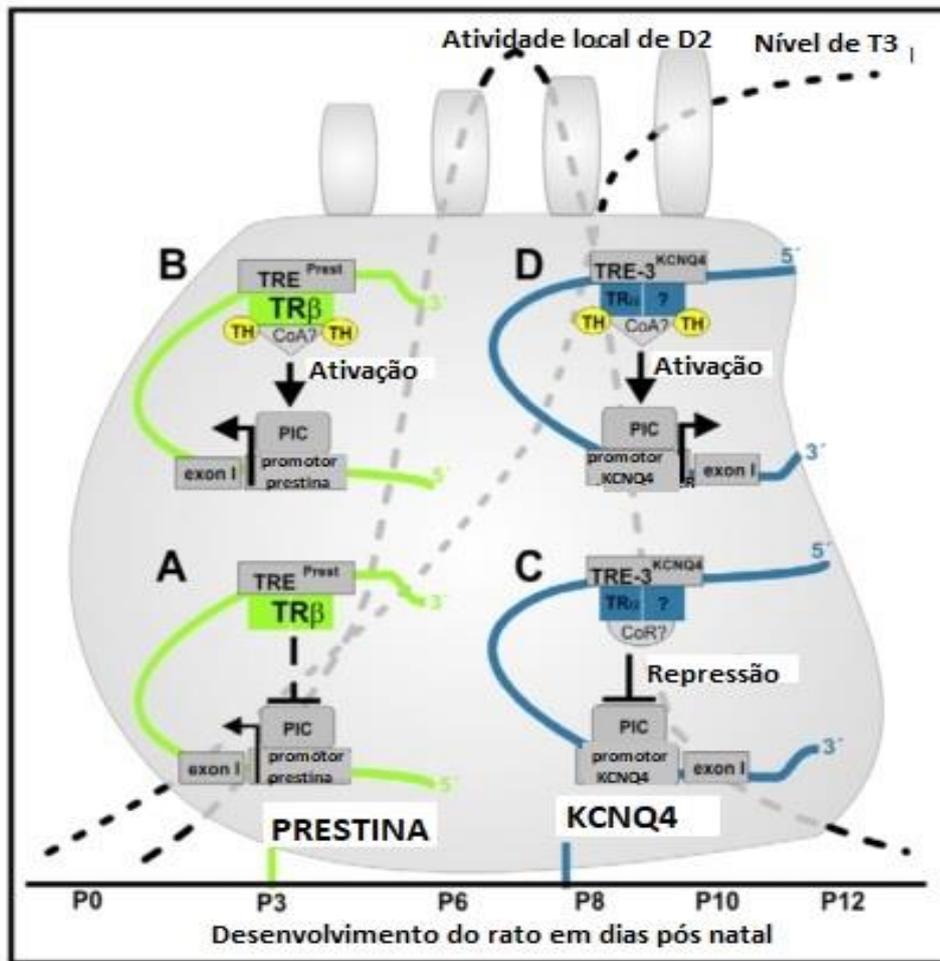


Figura 3. Modelo de regulação da proteína prestina e KCNQ4 das CCE do nascimento ao 12º DPN pela ativação dos receptores dos HT. Extraído de (BRYANT; GOODYEAR; RICHARDSON, 2002)

A Figura 4 ilustra na linha do tempo, do 13º DG até ao 21º DPN, a ação dos receptores dos HT no processo de desenvolvimento da OI até o término da maturação auditiva.

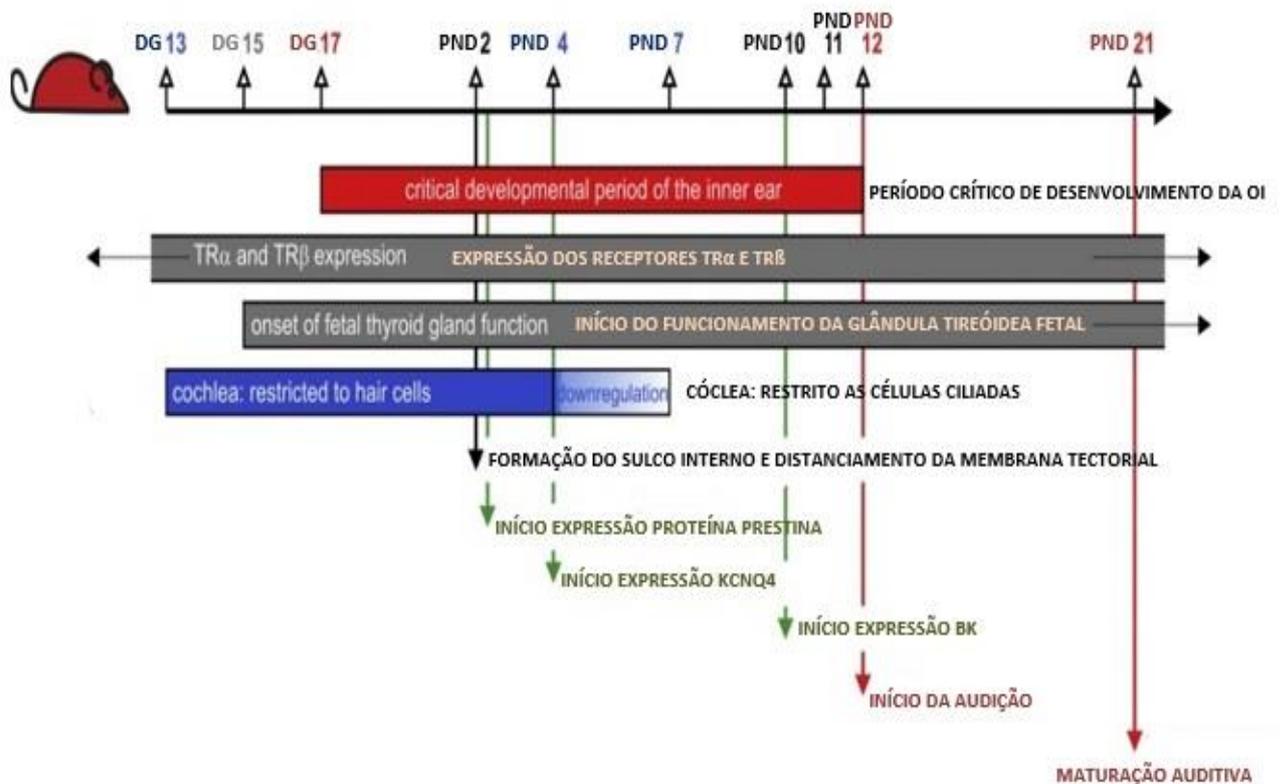


Figura 4. Esquema do desenvolvimento da orelha interna desde o 13º DG até o 21º DG, indicando o início da expressão das proteínas e o processo de maturação funcional. Extraído de (DETTLING et al., 2014) .

Diferentemente dos humanos, nos roedores, o processo maturacional e o desenvolvimento da OI ocorre após o nascimento. Os pilares (células de suporte) passam pelo processo de diferenciação no período neonatal, porém as células ciliadas apesar de imaturas podem ser reconhecidas no período embrionário. As células de suporte, sulco espiral e membrana tectorial são estruturas que, no nascimento ainda não estão totalmente formadas e apresentam um aspecto imaturo (DEOL, 1973).

Após o nascimento, no 1º e 2º DPN, o TR β é responsável por regular a excitabilidade neuronal das células sensoriais da cóclea, promovida pela proteína prestina (WINTER et al., 2007). Entre o 2º e 3º DPN, a prestina aparece na porção apical das células ciliadas (WEBER et al., 2002) e a aparência do Órgão de Corti ainda é a mesma do final do período gestacional. É ainda nesta época que se inicia o desenvolvimento da membrana tectorial. No 6º DPN, o sulco interno inicia sua formação e tem a aparência de um estreito espaço sobre a fina membrana tectorial e os pilares se tornam mais visíveis (DEOL, 1973).

Entre o 8º DPN e 13º DPN tem-se a distribuição subcelular da proteína prestina nas CCE, com início na porção basal, com posterior distribuição para a porção lateral. Quando os níveis de prestina tornam-se suficientes para o funcionamento das CCE, inicia-se o processo

de capacitancia da célula (MUSTAPHA et al., 2009). Observa-se que o processo maturacional da proteína prestina inicia no 7ºDPN e perdura até aproximadamente o 14ºDPN (ASHMORE, 2008).

Paralelo a distribuição da prestina, no 8ºDPN as células ciliadas passam pelo processo de organização, sendo formadas três fileiras de CCE e uma de CCI no epitélio sensorial, as quais passam a ser separadas pelo Túnel de Corti, e apresentam contato no polo ciliar com a membrana tectorial (NG et al., 2004) como pode ser observado na Figura 5. No túnel de Corti, estão situadas as células de suporte, que possuem um citoesqueleto peculiar formado por actina e microtúbulos, e sua diferenciação é controlada pelo fator de crescimento do fibroblastp (Fgf). A atuação deste fator na formação destas células ocorre desde o 16ºDG e, portanto, está intimamente ligada aos HT, os quais atuam como reguladores do tecido em crescimento e no desenvolvimento do citoesqueleto. O citoesqueleto das CCE é formado por uma base de actina, a qual atua nas propriedades mecânicas destas células, mediada pelos HT (SZARAMA et al., 2013). Observa-se que as CCE são envolvidas pelas células de sustentação, sendo que há um espaço entre elas (espaço de Nuel), o que permite a movimentação das CCE. Na porção basal há ligação das CCE com as células de suporte de Deiters, ancoradas na membrana basilar (OLIVEIRA, 1993).

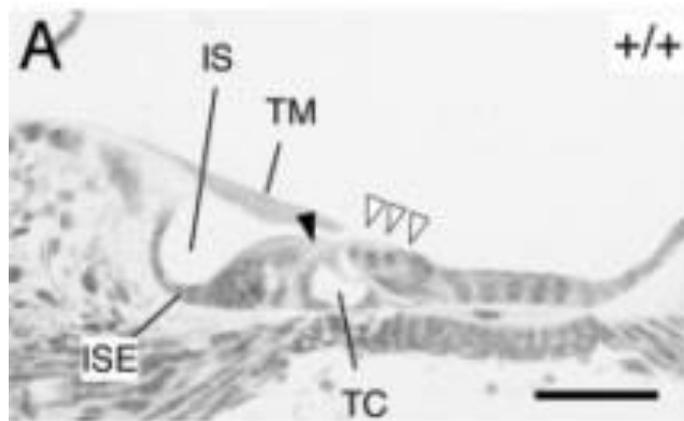


Figura 5. Morfologia coclear dos ratos no 8ºDPN. Extraído de: (NG et al., 2004). TM: membrana tectorial, IS: sulco interno, ISE: epitélio do sulco interno, TC: Túnel de Corti, ▽ ▽ ▽ células ciliadas externas, ▼ células Ciliadas internas

Estudos evidenciam que a proteína prestina é responsável pela motilidade das CCE, porém a condutância é predominantemente realizada pelo canal de potássio, KCNQ4, sendo este regulado pelo receptor TRα. Ainda nos primeiros dias de nascimento, entre o 5º e 6º DPN, tem-se a distribuição que se inicia pela superfície basolateral e entre 8º e 13º DPN a distribuição segue em direção da porção basal da CCE. O KNCNQ4 é responsável pela

ativação negativa do potássio, o que resulta na polarização do potencial da membrana em repouso (WINTER et al., 2006, 2007; MUSTAPHA et al., 2009).

A eletromotilidade das CCE permite a função mais importante destas células sensoriais. É importante ressaltar que o mecanismo de amplificação coclear não ocorre isoladamente com a ação da proteína prestina. As fibras aferentes necessitam de canais de potássio (KCNQ4) que são os mais importantes na formação das sinapses, porém também é necessário canais de Ca^{+2} . Um desses canais é o $\text{Ca}_v 1.3 \alpha 1D \text{Ca}^{+2}$ encontrado nos roedores entre o 1º e 8ºDPN. Atuam no processo de maturação das CCE e na exocitose das CCI, porém sua função não é totalmente conhecida (MICHNA et al., 2003; WINTER et al., 2007).

Observa-se ainda, uma grande voltagem de condutância gerada também pelo canal de potássio ativado com Ca^{+2} (BK). É um canal hetero octomero com 4 subunidades α e 4 subunidades β , encontrado no 4ºDPN nas fibras eferentes das CCE. Pouco se sabe sobre este canal, porém a literatura relata que possivelmente o BK faz a manutenção e a expressão do canal KCNQ4. Atua na formação do potencial endococlear das CCI e regula as CCE (UZIEL et al., 1983b; RÜTTIGER et al., 2004).

No 9ºDPN o Órgão de Corti torna-se mais maduro, porém as células de suporte ainda não estão totalmente diferenciadas (DEOL, 1973). Os primeiros potenciais endococleares surgem entre 9º e 10º DPN e nesta época são passíveis de registro. São potenciais gerados pelo canal de potássio dependente de voltagem, subfamília J membro10 (KCNJ10) na porção posterior da barreira basal celular da estria vascular, localizado célula intermediária (MARCUS et al., 2002; WANGEMANN et al., 2004). Só conseguem ser totalmente visíveis entre 20º e 21ºDPN (FREEMAN et al., 1993; SOHMER; FREEMAN, 1995). Observa-se que no 24ºDPN, o potencial endococlear esta em torno de 105 a 113mV (MUSTAPHA et al., 2009).

No 15º DPN a membrana tectorial passa a ter posicionamento de um órgão com configuração de adulto e entre o 12º e 25º DPN é possível observar a presença de estereocílios das CCI e CCE, com junção das células de suporte (DEOL, 1973; MUSTAPHA et al., 2009).

A Figura 6, do Órgão de Corti elucidada todas as estruturas formadas no 29ºDPN.

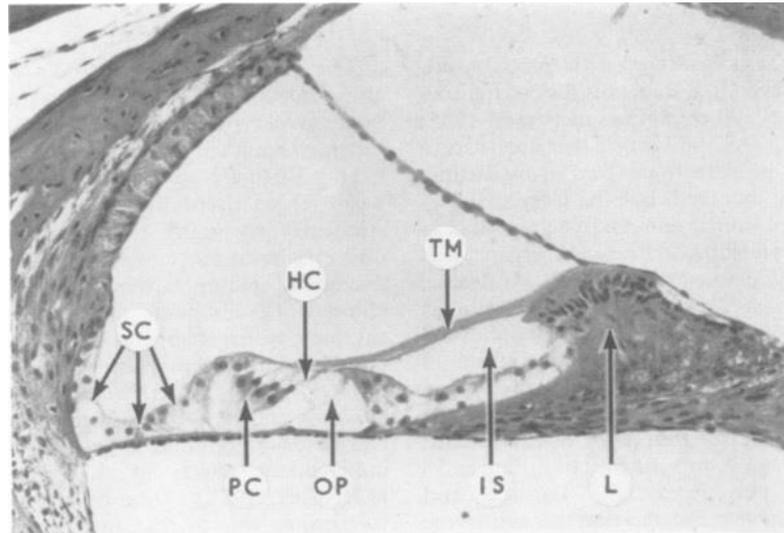


Figura 6. Corte transversal do Órgão de Corti de um rato com 29DPN. Extraído de (DEOL, 1973). SC: células de suporte, PC: células falangeas, HC: células ciliadas, OP:pilar externo, TM: membrana tectorial, IS: sulco espiral interno, L: limbus

A literatura reporta que o órgão da audição dos roedores encontra-se maduro entre 12° e 15° DPN (GEAL-DOR et al., 1993; FREEMAN et al., 1999; ECKRICH et al., 2012). Autores relatam que o 12°DPN dos roedores corresponde ao 29ª semana gestacional dos humanos (KNIPPER et al., 2000).

Há autores que ainda relatam que o processo de maturação ocorre entre o 16° ao 20° DPN (CROWLEY; HEPP-REYMOND, 1966). Esta variabilidade na literatura, em relação ao período de maturação do órgão da audição dos roedores pode estar relacionada a atividade elétrica da escala média. Entre o 6° e 8° DPN é reportada pequena atividade da bomba de sódio e potássio (Na- K-ATPase), sendo que esta sofre um aumento considerável entre 12° e 18°DPN e atinge a atividade de um adulto com 19 a 25 DPN, importante no processo de formação dos potenciais endococleares (KUIJPERS, 1974).

A cóclea nos humanos tem duas voltas e meia em torno do modíolo e nos roedores há apenas uma volta e meia; as células ciliadas de ambas as espécies são neuroepiteliais. Sabe-se que, as CCI e CCE por sua localização anatômica desempenham papéis diferentes. Na porção apical são consideradas mecanotransdutoras e no polo basal são neurotransmissoras.

As CCI, dispostas em uma fileira em menor número (3.500), são consideradas células sensoriais, sendo que 95% possuem fibras aferentes e são inervadas pelos dendritos do nervo auditivo (ASHMORE, 2008). As CCE existem em maior número (10 a 14 mil) e estão dispostas em três fileiras nos humanos e roedores. No polo ciliar são banhadas pela endolinfa e no lateral pela perilinfa. São envolvidas por células de sustentação, sendo que entre elas existem o espaço de Nuel, o que permite a movimentação entre elas (OLIVEIRA, 1993) Ao

contrário das CCI, apenas 5% são inervadas pelos dendritos no nervo auditivo e possuem uma extensa inervação eferente, uma vez que atuam no sistema do feixe olivo coclear (DEOL, 1973; ASHMORE, 2008).

O comprimento da cóclea dos ratos é menor (11mm) quando comparado aos humanos (34 mm) e a faixa de audição dos ratos é mais restrita (4 oitavas) do que nos humanos (8/9 oitavas), porém os ratos tem audição ultrassônica que se estende até a frequência de 64 quilohertz (kHz) (ASHMORE, 2008; BRUDZYNSKI, 2009).

Estudos com camundongos elucidam que a OM destes animais é menor e possui menor quantidade de massa com maior rigidez dos ossículos. Segundo a classificação anatômica dos ossículos, são chamados de orelha tipo micro (FLEISCHER, 1978), o que favorece a transmissão dos sons nas frequências mais altas (MASON, 2013). Vale ressaltar ainda que o meato acústico externo (MAE) dos ratos nasce ocluído e tem sua abertura, aproximadamente, no 10º DPN (GEAL-DOR et al., 1993).

Na fisiologia humana, após a formação das estruturas que compõem o ouvido: OE, OM e OI, o estímulo sonoro entra pela OE e é transmitido para a OM, pelo sistema tímpano ossicular. A entrada do estímulo sonoro provoca movimentação da membrana timpânica e dos ossículos na seguinte ordem: martelo, bigorna e estribo, sendo que a movimentação do estribo envia uma onda oscilatória para a perilinfa, da escala vestibular pela janela oval. A partir deste momento, a transmissão da vibração vai em direção a rampa timpânica e todo o processo vibratório atinge a membrana basilar, com propagação em direção ao helicotrema. Para elucidar a descrição anatômica da OI, a Figura 7 apresenta um corte longitudinal da cóclea. Sabe-se que a membrana basilar tem uma base mais estreita e se torna mais alargada no ápice, que de acordo com as características de elasticidade, massa e rigidez essa vibração passa a ter deflexão máxima na frequência sonora correspondente. Tem se início do processo de seletividade de frequência, uma vez que as graves são estimuladas próximo ao helicotrema e as agudas, que percorrem uma pequena distância da membrana basilar para alcançar a deflexão máxima, as quais ocorrem próximo ao estribo (OLIVEIRA, 1993).

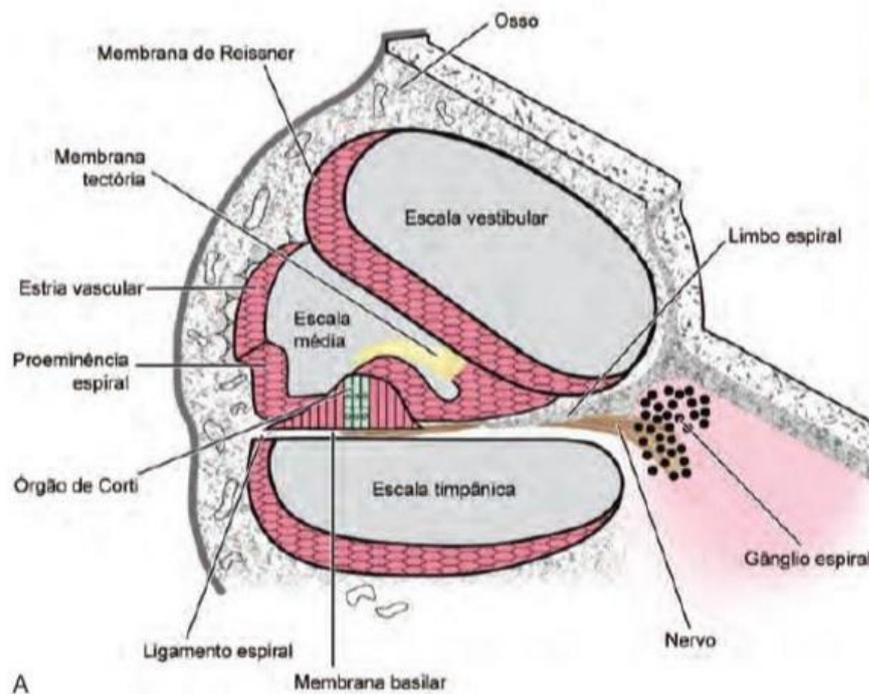


Figura 7. Corte longitudinal da cóclea dos humanos com as escalas vestibular, média e timpânica; Órgão de Corti apoiado na membrana basilar. Extraído de (CORREA, 2011)

A cóclea é responsável pela seletividade frequencial e é um verdadeiro amplificador acústico, sendo as células ciliadas responsáveis por este processo. As células ciliadas, são organizadas em microtúbulos, preenchidas por actina, que permite manter a célula de forma alongada. Possuem na sua extremidade esteriocílios, em forma de W nas CCE (KURK, 1999; ASHMORE, 2008) (Figura 8). No corpo das CCE existem proteínas que são distribuídas ao longo da membrana plasmática, dentre elas tem-se além de actina, miosina, tropomiosina e proteína prestina, sendo esta última a mais importante no processo de eletromotilidade (OLIVEIRA, 1993; KURK, 1999; ASHMORE, 2008). É descrito que as CCE que não possuem um citoesqueleto bem definido, em decorrência disto há uma pressão hidrostática positiva, a qual é mantida com elevados níveis de glicogênio (PRIETO; RUEDA; MERCHAN, 1990; OLIVEIRA, 1993).

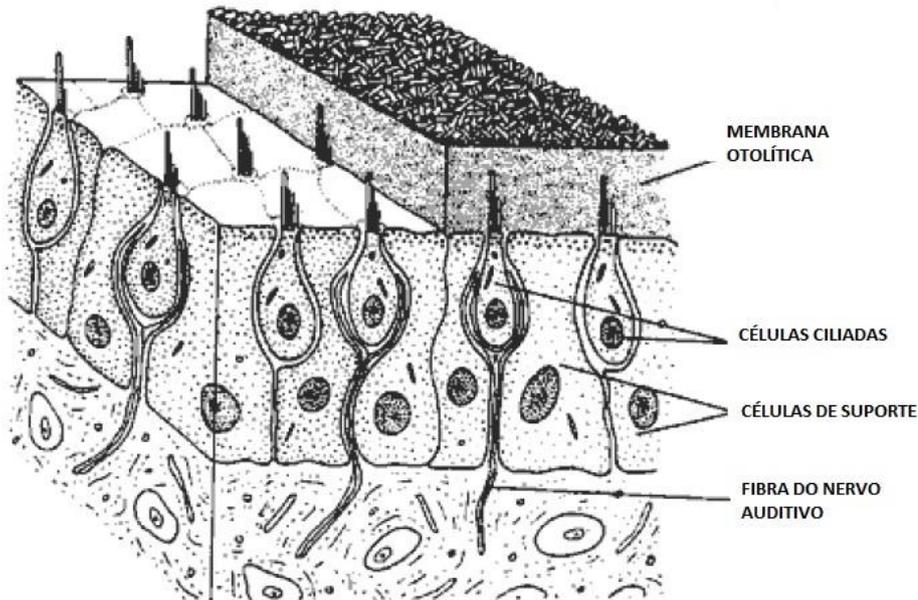


Figura 8. Desenho esquemático das células ciliadas externas dos humanos. Extraído de: ([HTtp://www.ebah.com.br/content/ABAAAAPsAE/audicao-equilibrio](http://www.ebah.com.br/content/ABAAAAPsAE/audicao-equilibrio)) em 09/08/2017

A função primordial das CCE é a amplificação coclear e a atuação inicia com a transdução mecanoelétrica (Figura 9), momento em que ocorre a formação do potencial elétrico. A onda mecânica que permite a vibração da membrana basilar, ao entrar na OI, faz a movimentação do líquido endolinfático permitindo a deflexão mecânica dos esteriocílios. A amplificação das CCE se dá pela contração, não dependente de Ca^{2+} nem de ATP (BREUEL; SANCHEZ; BENTO, 2001). Há canais iônicos que auxiliam neste processo de amplificação coclear. Como extensão da membrana, tem-se os esteriocílios, os quais são rígidos e são interligados por filamentos que fazem a união dos cílios de cada fileira entre si. São responsáveis pela transdução e permitem a deflexão, sendo que para que este processo ocorra, há a presença de um canal iônico de transdução, o *Tip Link*. Em atividade tem-se a abertura do canal do *Tip Link*, que proporciona o deslizamento de cada esteriocílio e o alonga o *Tip Link*, o que leva a alteração do comprimento das CCE. O estiramento das células abre o canal de transdução e proporciona a entrada de K^+ (KCNQ4), o que promove a inclinação dos cílios mediante a estimulação acústica. A mudança na configuração elétrica da membrana e faz uma queda de voltagem, induz a entrada Ca^{2+} , o que permite o fechamento dos canais, de modo que o *Tip Link* é reposicionado (KURK, 1999; ASHMORE, 2008).

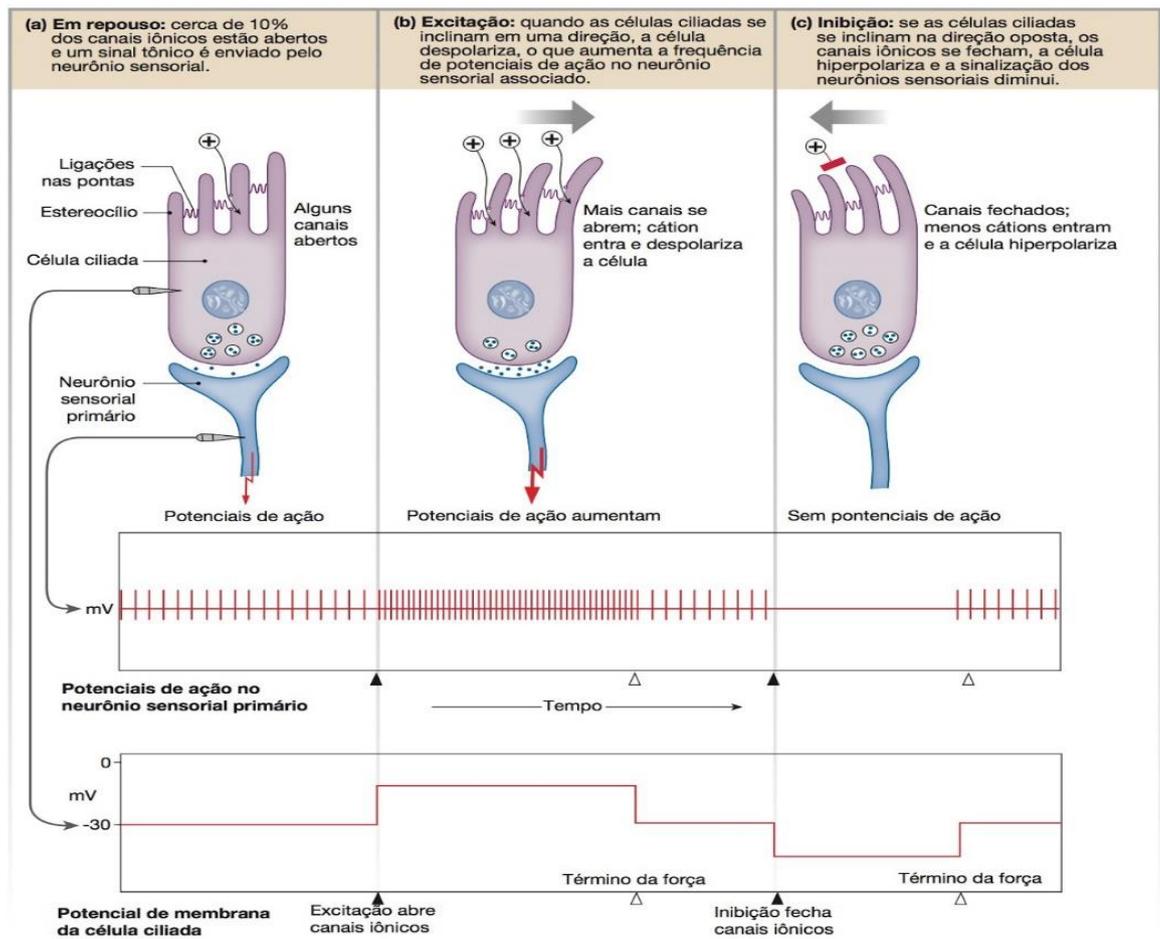


Figura 9. Processo de transdução mecanoelétrica das CCE em humanos. Extraído de: ([HTTp://arquivobioqui.blogspot.com.br/2015/11/transducao-de-sinal-das-celulas-ciliadas.HTmL](http://arquivobioqui.blogspot.com.br/2015/11/transducao-de-sinal-das-celulas-ciliadas.html)) em 09/08/2017

A segunda fase de atuação é conhecida por transdução eletromecânica das CCE. Ocorre a contração das CCE, em fase frequencial sonora, e este princípio é conhecido pela contração rápida. As CCE são acopladas a membrana tectorial, pelo aumento da vibração a partir da contração das CCE, processo chamado de cóclea ativa. Os potenciais receptores surgem com a inclinação dos cílios, o que gera uma corrente de potássio estável na estria vascular conhecida como BK. Nesta fase há conversão de energia elétrica em mecânica, gerada pela alteração mecânica das CCE, ou seja, alteração no comprimento (OLIVEIRA, 1993; ASHMORE, 2008)

Como dito anteriormente, 95% das CCE tem inervação eferente. É por meio destas fibras que as CCE disparam a contração lenta, ao invés da rápida como forma de um mecanismo de proteção celular. As fibras auditivas descendentes são originadas no córtex auditivo primário, e enviam informação para o complexo olivar superior pelo tálamo e

colículo inferior. Desta maneira, as fibras saem do tronco encefálico, vão para o trato olivo coclear medial que por meio de neurotransmissores acionam a contração lenta das CCE da cóclea, o que permite a proteção da OI a sons de forte intensidade. O sistema olivo coclear medial possui algumas funções: manter a membrana basilar da cóclea na posição estática a fim de facilitar a transdução da energia sonora, mediar a atenção seletiva e localização da fonte sonora e atuar como sistema de proteção contra ruídos intensos (BREUEL; SANCHEZ; BENTO, 2001; WERSINGER; FUCHS, 2011).

O principal neurotransmissor, deste sistema, é a acetilcolina, a qual hiperpolariza a célula, por meio do bloqueio do Ca^{2+} , e permite a entrada de K^+ , o que evita a contração rápida das CCE, fazendo com que a contração seja lenta. Estudos reportam que esta atividade é semelhante a ação da musculatura lisa. Observa-se que as CCI também possuem inervação eferente, sendo que em menor quantidade, apenas 5%. Está relacionada ao trato olivococlear lateral, e os neurotransmissores mais frequentes são os opióides e a dopamina. A literatura associa que as alterações no trato olivo coclear lateral podem ser detectadas na ausência de mielina, o que dificulta a descarga elétrica (FUCHS; MURROW, 1992; ELGOYHEN; KATZ; FUCHS, 2009).

A última fase é conhecida por transdução eletromecânica das CCI, que ocorre pela contração rápida das CCE faz com que os cílios longos das CCI toquem a membrana tectorial. Desta forma, ocorre a despolarização das CCI e tem-se a formação dos potenciais receptores com a entrada de potássio nos canais iônicos dos cílios. Posteriormente, são liberados neurotransmissores e a mensagem passa a ser codificada em impulso elétrico que é enviada pelo nervo acústico (OLIVEIRA, 1993).

3.2.2 A repercussão do hipotireoidismo na função auditiva

Para o estudo da hipofunção tireoidiana nas pesquisas experimentais com animais, o hipotireoidismo é induzido com o uso de substâncias químicas e administrado via oral às fêmeas prenhas. As substâncias químicas agem na atividade global da glândula da tireoide, no que diz respeito a ação dos receptores, função sódio iodeto e transportadores dos HT; enfim na regulação da glândula, síntese e transporte hormonal (BOAS; FELDT-RASMUSSEN; MAIN, 2012).

São descritos na literatura o uso de várias substâncias para indução da disfunção tireoidiana:

- *Polychlorinated biphenyls* e *dioxins* formam um grupo de produtos químicos lipofílicos. São derivados da produção industrial, e são encontrados nos pesticidas ou em processos de combustão (GOLDEY et al., 1995a; CROFTON, 2000; CROFTON et al., 2000; LASKY et al., 2002; BOAS; FELDT-RASMUSSEN; MAIN, 2012; GILBERT et al., 2013);
- *Methimazole* (MTZ) conhecido por *1-methylimidazole-2-thio* faz parte do grupo tioamida e é uma droga que inibe a síntese dos HT, principalmente a peroxidase tireoidiana (TPO). Sua fórmula molecular é $C_4H_6N_2$ (KNIPPER et al., 2000; AHMED et al., 2012; SZARAMA et al., 2013; WADA; YUMOTO; ISO, 2013);
- *Propylthiouracil* (PTU) chamado de *6-n-Propyl-2-thiouracil*, com fórmula molecular de $C_7H_{10}N$, é um fármaco derivado de tiouracilo e tem a capacidade de diminuir a quantidade de HT. É um inibidor da TPO e da 5' desiodase (DEOL, 1973; UZIEL; RABIE; MAROT, 1980; UZIEL et al., 1983a, 1983b; PRIETO; RUEDA; MERCHAN, 1990; GOLDEY et al., 1995b).

Observa-se que o Guia Prático da Sociedade Clínica de Endocrinologia recomenda o uso da substância química MTZ ou PTU para o tratamento do hipertireoidismo em humanos, uma vez que eles diminuem os níveis de HT, sendo que as duas substâncias químicas são eficazes na inibição da síntese dos HT (DE GROOT et al., 2012). Estudos experimentais que utilizam essas drogas relatam sua eficácia em induzir o hipotireoidismo na rata prenha (GOLDEY et al., 1995b; AHMED et al., 2012; WADA; YUMOTO; ISO, 2013).

Achados na literatura evidenciam prejuízos ao órgão da audição na presença da disfunção tireoidiana com a indução das substâncias químicas acima listadas. Os prejuízos se tornam mais evidentes quando o hipotireoidismo é induzido até a lactação. A relação da alteração auditiva com a disfunção tireoidiana vem sendo descrita, porém estudos ainda precisam ser fomentados para elucidar melhor essa relação.

Um estudo percussor desta linha data de 1973, com a administração da dose de 0,1% de PTU na água de beber as ratas gestantes do 10º DG ao 14º DPN. Deol (1973) descreveu as alterações no órgão de Corti, decorrente da disfunção dos HT, em um estudo histológico com indução do hipotireoidismo do 10ºDG ao 14ºDPN, período semelhante ao nosso estudo, porém foi utilizado o PTU como droga indutora. O autor constatou um padrão de anormalidade do ducto coclear, sendo que as alterações foram mais evidentes na membrana tectorial. A membrana tectorial tinha uma espessura maior, e não era capaz de manter contato com as células ciliadas. O órgão de Corti apresentou meia volta ou metade de meia volta em

torno do modíolo, em contraste observou-se que os animais do grupo controle apresentavam uma volta e meia. As células ciliadas, aparentemente normais, estavam reduzidas em número, sendo que cada célula apresentou tamanho menor e aspecto irregular. O autor ainda relatou dificuldade de diferenciação das células de suporte. A diferenciação celular ocorreu com 3°DPN, em ambos os grupos, porém no 12°DPN era evidente a distorção da membrana tectorial, a qual ainda estava aderida ao sulco interno espiral, caracterizado como imaturo. No 15°DPN, a distorção ao longo do ducto coclear era ainda mais visível, sendo que a membrana tectorial não apresentava contato com as células ciliadas e tinham uma aparência de divisão longitudinal, apoiada no sulco interno. O progresso de desenvolvimento do órgão de Corti foi mais lento e durante o curso deste, observou-se pouco progresso. O estudo detectou atraso significativo em toda a formação do órgão de Corti e diferenciação celular, que persistiu até o 29°DPN, sendo que no grupo controle, a diferenciação ocorreu em torno do 9°DPN.

Uziel; Rabie; Marot (1980) induziram o hipotireoidismo na fêmea prenha na dose de 50 mg de PTU por intubação gástrica do 18DG até 30/35DPN. Realizaram eletrococleografia e observaram inibição do desenvolvimento dos potenciais cocleares, com ausência do potencial de ação e de somação. Este estudo elucidou que o HC leva a alterações no desenvolvimento do Órgão de Corti, expresso no comportamento auditivo dos animais (UZIEL; RABIE; MAROT, 1980)

Uziel *et al.*(1983) utilizaram o mesmo método descrito acima para indução do hipotireoidismo. Na análise histológica da prole foi evidenciado normalidade das CCI, porém constataram alteração na inervação; sendo que o maior prejuízo ocorreu nas CCE, as quais apresentavam anormalidades com aspecto imaturo. Detectaram um atraso na formação dos terminais aferentes da espira coclear, a qual surgiu no 17°DPN, uma vez que em estado eutireoideo esta ação ocorre no 6°DPN. Desta forma, destacaram a presença de atraso do desenvolvimento da inervação das CCE, o que contribuiu para a ausência do potencial coclear.

Estudos ainda elucidam, que o hipotireoidismo também é capaz de alterar a densidade das partículas de glicogênio das CCE, as quais atuam diretamente nas propriedades contráteis destas células. Para isto, foi realizada análise histológica da cóclea da prole nascida de mãe hipotiroídiana pós indução com PTU do 17° DG até 30° DPN. Observou-se que a hipofunção tireoídiana propicia inadequado funcionamento das CCE, com a diminuição das partículas de glicogênio, que pode desenvolver perda auditiva (PRIETO; RUEDA; MERCHAN, 1990).

A maioria dos estudos relaciona a disfunção auditiva ao HC. Foi administrado as ratas prenhas, *Aroclor 1245* nas concentrações de 0,1, 4 e 8 mg/kg por via oral do 6° DG ao 20° DPN. Constataram que a prole apresentou diminuição da amplitude do reflexo de sobressalto

e perda auditiva neurossensorial de grau leve. Depreende-se que quanto maior a dose de substância química, maiores os prejuízos na função auditiva (GOLDEY et al., 1995a).

Foi induzida a hipofunção tireoidiana em ratos, com a administração de PTU em diferentes dosagens (0,1,5 e 25ppm) e foi diagnosticada perda auditiva entre 35 e 50dBNA nas frequências até 40kHz. Este dado evidencia que o hipotireoidismo gera perda auditiva, e torna imprescindível o controle dos HT no período gestacional (GOLDEY et al., 1995b).

Ao longo dos anos, estudos elucidam a importância dos HT no desenvolvimento intrauterino da cóclea e no processo maturacional da função auditiva, sendo que o receptor TR β é atuante neste processo (FORREST et al., 1996).

Com relação à capacidade eletromotora das CCE, a literatura relata que a proteína prestina atua como uma molécula motora destas células e são responsáveis pela eletromotilidade. Constatou-se que esta proteína age na maturação estrutural e funcional do Órgão de Corti a partir do 2ºDPN da prole. Os autores acreditam que os HT são os primeiros reguladores de transcrição da proteína prestina e atuam direta ou indiretamente como modulador na distribuição sub celular desta proteína (WEBER et al., 2002).

Além dos receptores dos HT, as desidases também desempenham um importante papel no processo de desenvolvimento do órgão da audição, uma vez que o suporte de HT atinge nível elevado dentro da cóclea com a atuação da desidase 2 (D2). Esta é responsável pelo aumento do nível de T3, o qual ativa a ação dos HT antes do início da atividade do órgão da audição. A deleção do D2 permitiu evidenciar, na prole, anormalidades histológicas no Órgão de Corti, bem como retardo na diferenciação do sulco interno coclear, do epitélio sensorial e deformidade na membrana tectória. Essas anormalidades favoreceram uma desorganização do epitélio sensorial como consequência degeneração e/ou interrupção do desenvolvimento dos tecidos cocleares (NG et al., 2004).

Outra vertente que faz o estudo da ação dos HT na função auditiva relatou que poucas são as informações sobre a regulação aferente das células ciliadas. A literatura infere que os HT agem na diferenciação das células ciliadas e são essenciais na morfologia e maturação funcional das sinapses destas células (SENDIN et al., 2007). Nesta mesma linha de raciocínio, Mustapha *et al.* (2007) relataram uma redução do potencial endococlear pelo prejuízo na expressão do canal de potássio dependente de voltagem, subfamília J membro 10 (KCNJ10) da estria vascular e pelo baixo nível de KCNQ4. Diminuição do KCNQ pode levar ao mau funcionamento das CCE e dificuldade em reciclar o potássio nas CCE, que pode culminar em degeneração das células sensoriais.

Autores ainda relataram que o receptor tipo β é o único responsável pela transcrição da proteína prestina e a sua ausência leva a diminuição da eletromotilidade das CCE o que propicia uma alteração na sensibilidade coclear. Observa-se ainda, a participação do receptor tipo $\alpha 1$ no processo de diferenciação das células ciliadas, que também atuam na transcrição da proteína prestina (WINTER et al., 2007).

Além da proteína prestina, existem canais de cálcio e potássio que também são importantes para o funcionamento das células ciliadas e são regulados pelo TR α e TR β , especialmente pelo TR $\alpha 1$. Como exemplo tem-se o canal KCNQ4, Ca_v 1.3 e BK das CCE, os quais atuam no processo de maturação e de polarização da célula, sendo que a disfunção tireoidiana gera prejuízos nestas proteínas e pode levar a uma perda auditiva (WINTER et al., 2006, 2007).

3.2.3 Relação da avaliação do sistema auditiva em roedores frente ao hipotireidismo

Para avaliação do comportamento auditivo em humanos, bem como em roedores, são utilizados os seguintes instrumentos: EOAPD e PEATE. Estudos descrevem alteração nas EOAPD com diminuição e até mesmo ausência de amplitude de resposta, e presença de perda auditiva diagnosticada pelo PEATE frente a hipofunção tireoidiana induzida até a lactação.

Knipper et al.(2000) administraram às ratas prenhas 0,02% de MTZ, do 3º DG ao 12º DPN. A prole foi submetida a análise morfológica e neuronal da OI, avaliação auditiva com as EOAPD e PEATE. No grupo controle, induzido com MTZ até o 3º DPN, não foram observadas alterações morfológicas na cóclea, porém foi detectada alteração dos limiares auditivos, com presença de EOAPD e latências de ondas do PEATE normais. Verificaram que quanto maior o tempo de indução do hipotireidismo, maior o prejuízo no órgão da audição. Nos animais induzidos até o 12ºDPN apresentaram alteração nas EOAPD caracterizada por ausência de respostas e no PEATE observaram aumento da latência das ondas II, III e IV com limiares eletrofisiológicos elevados.

Rusch *et al.* (2001) descreveu que a deficiência do receptor TR $\alpha 1$ leva a alterações morfológicas na cóclea, enquanto a diminuição do TR β leva ao retardo da distribuição da expressão de potássio nas CCI, o que altera o potencial endococlear e gera uma perda auditiva que pode ser constatada no PEATE.

Sprenkle *et al* (2001), realizaram mutação genética dos receptores dos HT para o estudo da relação do hipotireoidismo com a função auditiva. Nesta vertente, a prole com mutação da tireotrofina (TSHr) mutante foi avaliada com PEATE nas idades de 12, 15, 21 e 28DPN, e os achados demonstraram que a hipofunção tireoidiana interfere no processo de desenvolvimento e maturação dos potenciais auditivos. O comportamento auditivo no 12ºDPN estava dentro do padrão de normalidade, ainda estava em desenvolvimento. As mudanças significativas puderam ser detectadas a partir do 15º ao 21ºDPN, porém a partir do 28º DPN os prejuízos se intensificaram e foi diagnosticada perda auditiva nos roedores com mutação do TSH.

Ng *et al.* (2004) observaram aumento da latência das ondas no PEATE, sendo que o estudo relatou a importância do D2 no processo de desenvolvimento do órgão da audição.

Há um consenso entre os autores em relação a importância dos receptores TR α e TR β no processo de desenvolvimento e maturação do órgão da audição, por serem essenciais na formação dos potenciais endococleares, portanto a ausência gera uma perda auditiva, caracterizada por uma alteração coclear (FORREST *et al.*, 1996; FORREST; VENNSTRÖM, 2000; RUSCH *et al.*, 2001; GRIFFITH *et al.*, 2002; MUSTAPHA *et al.*, 2009; DETTLING *et al.*, 2014).

Estudos com mutação genética do TSH nas ratas prenhas permitiu identificar imaturidade do potencial endococlear no 24ºDPN diagnosticado no PEATE. Evidenciaram alterações nas estruturas cocleares do órgão da audição dentre elas, na membrana tectória, no Túnel de Corti e na estria vascular. Constataram anormalidade no processo de transdução eletromecânica das células ciliadas o que propiciou dificuldade na geração dos potenciais elétricos. Observou-se um aumento dos limiares e anormalidade no processo de seletividade de frequência, o qual persistiu até a idade adulta (SONG; MCGEE; WALSH, 2008).

É descrito a diminuição da amplitude das EOAPD nos grupos hipotireoidianos. O desenvolvimento das propriedades de transdução das células ciliadas caracteriza o processo de eletromotilidade das CCI, que se inicia no 17º DG e termina na primeira semana pós natal. Portanto, observa-se que a disfunção tireoidiana antes do 17ºDG pode levar a alteração de transdução das CCE, e este pode ser mais um fator que contribui para (LELLI *et al.*, 2009).

Estudo histológico e comportamental do órgão da audição com as EOAPD em um modelo de roedores com hipotireoidismo secundário, ou seja, fator 1 da transcrição da pituitária (*Pit1^{dw}*) foi possível detectar redução da condutância de KCNQ4, além de atraso no desenvolvimento da maturação morfológica da cóclea pela disruptura dos receptores HT bem como mudanças estruturais significativas na membrana tectorial. No 25º DPN, apresentaram

anormalidade no citoesqueleto dos pilares, a qual persistiu até o 42° DPN. Ademais, as CCE também apresentaram anormalidades na orientação dos cílios. Observaram que além da malformação das CCE, também houve degeneração celular devido a falta do potencial de repouso gerada pelo KCNQ4. Outro aspecto a ser levado em consideração é diminuição do potencial endococlear, uma vez que anormalidade na estria vascular gera alteração na expressão do KCNJ10 (MUSTAPHA et al., 2009).

A literatura reporta apenas um único estudo que faz relação dos HT com o desenvolvimento da OM. Estudiosos elucidam a atuação da função tireoidiana no desenvolvimento da OM, mais especificamente nos ossículos (martelo, bigorna e estribo), presente nos últimos estágios de desenvolvimento. É sabido que o mesênquima atua no processo de ossificação e tamanho da cartilagem dos ossículos. Observou-se que os receptores TR α 1 e TR β também atuam no processo de formação da OM, além de atuar na cóclea, mais especificamente nos ossículos. Portanto, acredita-se que a maturação da OM também seja dependente dos HT (CORDAS et al., 2012).

Há um consenso entre a relação da dose de substância química na indução do hipotireoidismo com o sistema auditivo. Quanto maior a dose administrada para indução da hipofunção dos HT, maior o prejuízo na função auditiva. Um estudo com diferentes dosagens de MTZ (0,002% a 0,02%), administrado a partir do 15°DG ao 28°DPN às ratas prenhas constatou que a aquisição do reflexo de sobressalto é atrasada em todos os grupos com aumento da amplitude da resposta relacionado ao aumento da dose (WADA; YUMOTO; ISO, 2013).

No que tange ao crescimento e desenvolvimento do citoesqueleto, os HT atuam nessa esfera, no epitélio sensorial do Órgão de Corti. São responsáveis por regular a expressão do fator de crescimento fibroblástico na cóclea. No hipotireoidismo é possível detectar um aumento da expressão do RNAm dos receptores do fator de crescimento fibroblástico (FgfR) que ocorre em torno do 16°DG. Este aumento pode gerar um atraso na distribuição da expressão do fator de crescimento do fibroblasto receptor 3 (FgfR3). Os estudiosos constataram que os HT atuam no desenvolvimento estrutural das células ciliadas. Ocorre um atraso no desenvolvimento da OI com conseqüente atraso na diferenciação das CCE e dos pilares de sustentação. As células de suporte apresentam menor número de microtúbulos e maior número de filamentos de actina o que leva ao enrijecimento das CCE, dificultando o processo de eletromotilidade destas células (SZARAMA et al., 2013). Achados semelhantes também relacionaram a influência do HT na citoarquitetura cortical e processo de maturação do Órgão de Corti (UZIEL et al., 1983a; BERBEL et al., 2010).

Detting *et al.* (2014) relatam que a diminuição da amplitude ainda pode ser explicada pela diminuição da expressão da proteína prestina. Os HT participam do processo de transcrição desta proteína, sendo que os receptores dos HT fazem a regulação. Estudos com camundongos evidenciaram a diminuição dos receptores tireoidianos em decorrência do hipotireoidismo, o qual pode levar a um atraso na formação desta proteína e uma distribuição imatura que ocorre entre o 2ºDPN e se estende até o 13ºDPN. Além disto, a ativação dos receptores TR α e TR β mediam a regulação dos canais iônicos, os quais são importantes no processo de diferenciação das células ciliadas. Dentre os canais de potássio, o SK2 e BK e o canal de cálcio Cav1.3 são regulados no período pós-natal. A atuação do Cav1.3 nas CCI se dá por meio da exocitose e a condutância do canal de potássio é realizada pelo canal BK, o qual é responsável pela formação do potencial endococlear. Autores ainda relatam que a hiperpolarização celular também ocorre por meio do aumento do canal BK, que por sua vez inibe a eletromotilidade de resposta das CCE.

Pesquisadores avaliaram a influência da TPO, responsável pela catalise da chave de reação da síntese do HT, no órgão da audição. A mutação deste gene é descrita na literatura e causa HC. Constataram alterações no sistema auditivo em decorrência da hipofunção tireoidiana, com presença de perda auditiva profunda, bem como anormalidades na membrana tectória e atraso na maturação das estruturas cocleares. Ressaltaram que a perda auditiva é ocasionada por alterações no sistema de amplificação coclear das CCE (JOHNSON *et al.*, 2014).

Estudos aprofundados na área da fisiologia experimental relatam que a disfunção tireoidiana no período gestacional e pós-natal causam alterações morfológicas, histológicas e comportamentais no Órgão de Corti, e pode ocasionar perda auditiva. Apesar da literatura demonstrar diferenças entre o processo maturacional do órgão da audição nos humanos e roedores, é sabido que os HT têm participação ativa no desenvolvimento sensorial e neural da função auditiva no período embrionário de ambas as espécies. Estudos com humanos e roedores são capazes de evidenciar essa relação com a audição, porém os fatores que controlam este processo ainda não estão muito claros (VANDERSCHUEREN-LODEWEYCKX *et al.*, 1983; RUSCH *et al.*, 2001; BENEVIDES *et al.*, 2006; MELSE-BOONSTRA; MACKENZIE, 2013), principalmente quando a indução do hipotireoidismo ocorre somente no período gestacional, uma vez que não há estudos apenas no período embrionário.

Há um consenso na literatura que confirma que a hipofunção tireoidiana materna repercute negativamente no órgão da audição que pode se estender a vida adulta da prole (ANDERSEN; OLSEN; LAURBERG, 2015).

A literatura reporta que o hipotireoidismo gera alteração estritamente coclear o que leva a alterações no exame de EOAPD. Essas alterações podem ser detectadas na EOAPD como uma diminuição da amplitude e até mesmo ausência de resposta na indução até o período pós-natal (KNIPPER et al., 2000; LASKY et al., 2002; DETTLING et al., 2014).

É sabido que os receptores dos HT atuam na formação e desenvolvimento da cóclea, e a ausência destes, leva a alterações morfológicas na cóclea (RUSCH et al., 2001). Dentre os receptores, o TR β , no período gestacional, atua na expressão da proteína prestina (WINTER et al., 2006), na formação da membrana tectorial e do sulco interno (DETTLING et al., 2014). Observa-se ainda que este receptor é essencial na morfologia e no funcionamento normal da cóclea, portanto a diminuição dos HT no período gestacional podem desencadear alterações morfológicas do Órgão de Corti (RICHTER et al., 2011).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Investigar as repercussões do hipotireoidismo gestacional e perinatal experimental na função auditiva da prole adulta de ratas.

4.2 Objetivos específicos

- Analisar a interferência do hipotireoidismo gestacional e perinatal nos valores de compliância e pressão da orelha média;
- Observar a variação da amplitude de resposta das emissões otoacústicas por produto de distorção na prole de mães com hipotireoidismo gestacional e perinatal;
- Pesquisar as latências absolutas das ondas I a V do nervo auditivo até tronco encefálico na prole de mães com hipotireoidismo gestacional e perinatal;
- Determinar o nível mínimo de resposta eletrofisiológica do potencial auditivo evocado de tronco encefálico na prole de mães com hipotireoidismo gestacional e perinatal.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Aspectos éticos

Todos os procedimentos experimentais aos quais os animais utilizados neste estudo estão de acordo com as normas e princípios éticos preconizados pela Diretrizes Brasileiras para o Cuidado e Utilização de Animais (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. Além disso, a presente proposta de estudo foi submetida à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPA) da Universidade Federal de Sergipe (UFS) e aprovada sob o nº. 21/2015 (ANEXO1). Todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais a serem utilizados bem como a geração de desconforto e sofrimento.

5.2 Animais utilizados

A pesquisa trata de um estudo experimental longitudinal. Foram utilizados um total de 93 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, sendo 46 (12 machos e 34 fêmeas provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia da UFS e 57 proles das ratas (machos) adquiridas com o acasalamento dos ratos provenientes do Biotério Setorial.

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Neuroendocrinologia Básica e Comportamental (LANBAC) na UFS. Durante todo o período, os animais tiveram livre acesso à água filtrada e ração específica para roedores. As salas de manutenção dos animais e experimentação, eram dotadas de sistema de exaustão e luminosidade controlada com ciclo claro-escuro de 12/12 horas (luz das 6 às 18 horas) e temperatura de 23 ± 2 °C.

Com 120DPN, ao final da testagem, os animais foram eutanasiados sob anestesia profunda com tiopental sódico (40mg/kg, *i.p.*). A morte foi confirmada com a parada cardíaca. As carcaças foram congeladas e o descarte ocorreu com a identificação dos sacos.

5.3 Grupos experimentais

Os animais foram organizados em 3 categorias, como descrito na Figura 10:

CATEGORIA I: 12 ratos machos adultos (250 a 300 g) para acasalamento com as fêmeas adultas da categoria II. Este número de machos foi necessário para manter a variabilidade genética necessária para a composição dos grupos.

CATEGORIA II: 34 fêmeas adultas com peso entre 150 a 200g que foram acompanhadas para acasalamento programado.

As fêmeas (categoria II) foram mantidas em caixas de policarbonato coletiva com dois animais por caixa. Diariamente, por no mínimo uma semana antes do acasalamento, as ratas foram submetidas à análise colpo citológica para confirmação da regularidade do ciclo reprodutivo (ciclo estral). Quando estivessem na fase de acasalamento (proesto), as fêmeas eram colocadas na presença dos machos (categoria I), na proporção de duas fêmeas para cada macho e, ali mantidas durante a noite, período em que deveria ocorrer o estro.

Após este período as ratas foram novamente submetidas à análise colpocitológica para a verificação da presença de espermatozoides e, desta forma, confirmação da ocorrência de cópula. Em caso positivo, este momento era determinado como 0DG. Com o nascimento da prole o dia zero pós-natal foi considerado 0DPN.

Após confirmação da gestação, os grupos experimentais eram estabelecidos. As gestantes foram induzidas ao hipotireoidismo no período gestacional (PMHG) que compreendeu do 9º dia gestacional (DG) até o parto; e até a lactação (PMHPN) do 9ºDG até o 15º dia pós-natal (DPN), com e sem administração de T4 concomitante ao PMHG. De acordo com o índice de prenhez de 65% dos animais provenientes do Biotério Central da UFS, obtivemos 19 ratas prenhes. Após o nascimento, as proles das ratas prenhas formaram a categoria III.

CATEGORIA III: 57 ratos machos da prole das mães da categoria II, provenientes do acasalamento destas com os machos da categoria I. Os animais da categoria III foram dispostos de acordo com os respectivos tratamentos recebidos pelas suas genitoras, conforme descrito abaixo:

1. Grupo PME- Prole de ratas mães eutiroidianas (PME) (n=28): As genitoras (n=10) receberam água *ad libitum*, ou seja, livre acesso, durante todo o período gestacional e até a lactação e foram consideradas eutiroidianas. Foram utilizados 10 PME para o estudo piloto, ou seja, para padronização dos métodos. Compuseram a pesquisa experimental 18 PME para comparação com os grupos hipotireoidianos.

2. Grupo PMHG - Prole de ratas de mães hipotireoidianas induzidas no período gestacional (n=10): As mães (n=3) foram submetidas ao protocolo de indução de HG

experimental (HG). Para tanto, PMHG foi oferecido com livre acesso na água de beber, a partir do nono dia de gestação (9º DG) até o dia do parto 20º/21ºDG.

3. Grupo PMHG+T4 - Prole de ratas de mães hipotiroídianas induzidas no período gestacional com administração de T4 (n=10): As ratas genitoras (n=3) foram submetidas ao HG com reposição de T4. Assim, o PMHG e o T4 foram oferecidos com livre acesso na água de beber, a partir do 9º DG até o dia do parto às mães gestantes.

4. Grupo PMHPN - Prole de ratas de mães hipotiroídianas induzidas até a lactação (n=6): As mães dessa prole (n=2) receberam PMHG a partir 9º DG ao 15º DPN, na água de beber com livre acesso.

5. Grupo PMHPN+T4 - Prole de ratas de mães hipotiroídianas induzidas até a lactação com administração de T4 (n=3): A genitora (n=1) foi induzida com PMHG com administração de T4 oferecidos a partir do 9º DG ao 15º DPN, na água de beber com livre acesso.

Para todos os grupos hipotireoidianos, foram selecionados 10 machos para acompanhamento, porém no decorrer da pesquisa observou-se maior índice de morte nos grupos perinatais (PMHPN e PMHPN + T4). Tal dado justifica o menor número nestes grupos experimentais.

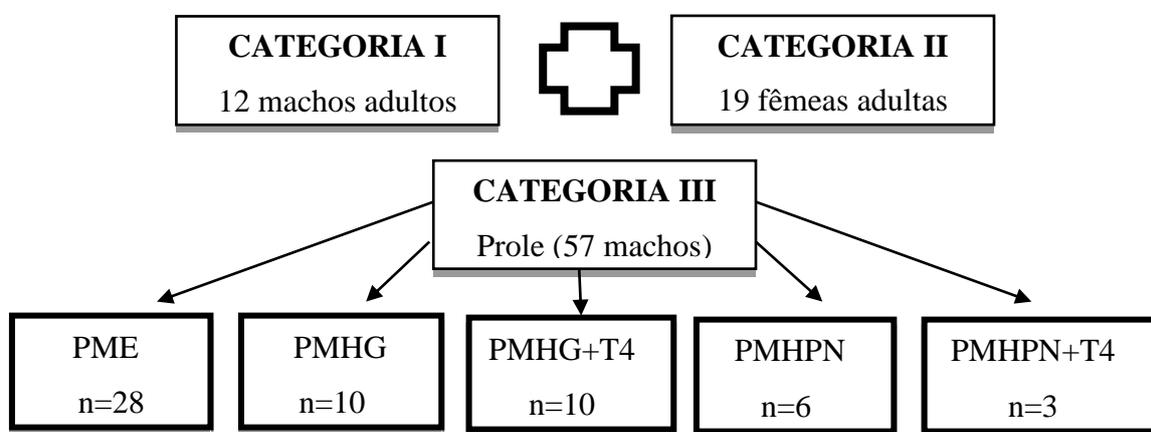


Figura 10. Esquema ilustrativo da formação dos grupos experimentais da pesquisa. PME: Prole de ratas de mães eutiroidianas, PMHG: Prole de ratas de mães hipotiroídianas induzidas no período gestacional, PMHG+T4: Prole de ratas de mães hipotiroídianas induzidas no período gestacional com administração de T4, PMHPN: Prole de ratas de mães hipotiroídianas induzidas até a lactação, PMHPN+T4: Prole de ratas de mães hipotiroídianas induzidas até a lactação com administração de T4.

5.4. Drogas utilizadas

Foi utilizado o inibidor da iodoperoxidase, Metimazol (*Mercapto 1 methylimidazol*, Sigma, St Louis, USA) (MTZ) como droga para indução do hipotireoidismo.

Para compor o método foi usado o protocolo de indução do HG padronizado pelo nosso grupo, que faz a administração da droga na água de beber, a livre acesso, a uma concentração de 0,02%, a partir do 9ºDG até 20/21ºDG (dia do parto). Esse protocolo foi previamente estabelecido em nosso laboratório quando se verificou que este é capaz de induzir o hipotireoidismo nas ratas prenhas com redução das concentrações séricas de T3 e T4, quando comparados com as mães eutiroidianas (ALVES et al., 2013; GAUJAC, 2013).

Para indução do grupo perinatal foi utilizado o método adaptado de Knipper et al. (2000) com indução materna do 9ºDG até 15ºDPN de MTZ na concentração de 0,02% na água de beber.

Para reposição dos hormônios tireoidianos foi utilizada a Levotiroxina sódica (Sanofi, Brasil) na concentração de 50 µg/100mL, na água de beber. Nos humanos considera-se essa concentração com uma biodisponibilidade média de 70% da droga (WENZEL; KIRSCHSIEPER, 1977).

Os anestésicos utilizados para realização dos procedimentos foi a Ketamina (Syntec, Brasil) e Xilazina (Syntec, Brasil) administrados em combinação por via intraperitoneal na dose de 90 mg/kg de Ketamina e 10mg/kg de Xilazina.

5.6 Estudo Piloto

Foi realizado um estudo piloto com 10 ratos machos adultos para padronizar todos os procedimentos de avaliação da função auditiva utilizados neste estudo. Devido à escassez de referencial teórico para estas metodologias adaptadas aos ratos, este procedimento foi necessário.

5.7 Avaliação da função auditiva

Para a avaliação da função auditiva foram realizados os seguintes procedimentos: anestesia (Ketamina 90mg/kg/Xilazina 10mg/kg), meatoscopia, medida de imitância acústica, EOAPD e PEATE.

Para a realização de todos os procedimentos, os animais foram alocados em uma sala silenciosa no LANBAC. Para garantir baixo nível de ruído, principalmente para a realização das EOAPD, foi realizada a avaliação pontual do ruído ambiental com o medidor de pressão sonora (*Instrutherm*, DEC 460, São Paulo, BR), sendo que o ruído deveria ser \leq a 50dBNPS. A temperatura ambiental foi de 23(\pm 2)°C, sendo que a oliva utilizada para as testagens foi a de recém-nascido, a qual permitiu adequadas condições de testagem.

5.7.1 Meatoscopia e Timpanometria

Após sedação foi realizada meatoscopia com otoscópio (*Welch Allyn, Pocket Junior*, 22840, SP, Brasil) para descartar uma possível obstrução do MAE. Caso não existisse nenhum impedimento era realizado o exame de medidas de imitância acústica com a pesquisa da curva timpanométrica.

O equipamento utilizado foi o analisador de OM portátil (*Kamplex/Interacoustics*, MT 10, Dinamarca, USA). O tom de sonda deste equipamento é o de 226Hz, sendo que estava devidamente calibrado como proposto pela resolução nº 365 de 30 de março de 2009 do Conselho Federal de Fonoaudiologia.

A testagem teve início com a introdução da sonda de recém-nascido no CAE. Na testagem, um gerador de estímulo sonoro é responsável por transmitir a energia acústica do CAE a OM, enquanto isto o equipamento exerce uma pressão positiva, 200 decaPascal (daPa), que é reduzido progressivamente até atingir a pressão máxima negativa, -400daPa. A captação é realizada pelo microfone, que gera uma curva timpanométrica como resposta. Observa-se que a timpanometria fornece informações quanto a integridade do sistema tímpano ossicular no que diz respeito a avaliação quantitativa do volume e mobilidade do sistema da OM (ONUSKO, 2004).

Sendo assim, as curvas timpanométricas são consideradas como normais nos humanos quando a compliância está acima de 0,30mL (curva tipo A) (ONUSKO, 2004). Não há relatos de valores de normalidade para os ratos, porém estudos experimentais com os mesmos animais também utilizaram a classificação de Onusko (2014) (GEAL-DOR et al., 1993; ZHENG et al., 2007). A figura 11 exemplifica os tipos de curvas existentes.

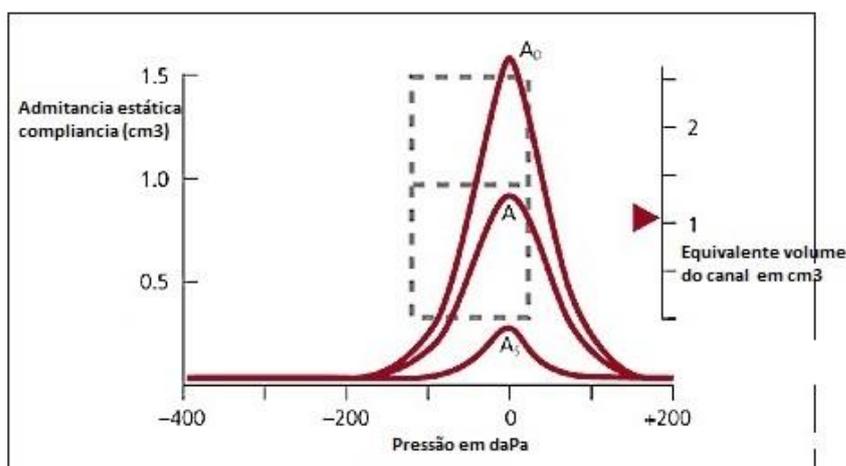


Figura 11. Curva timpanométrica do tipo A com pico dentro da normalidade, pico A_D com pico acima da normalidade e A_s , abaixo da normalidade. Extraído de ONUSKO, 2004.

5.7.2 Emissões otoacústicas por produto de distorção

As EOAPD são consideradas como uma medida eletroacústica da audição e permite a avaliação do sistema auditivo periférico. Estas emissões são sons gerados pela cóclea normal e transmitidos através dos ossículos e membrana timpânica, medidos no conduto auditivo externo, na presença de um estímulo acústico. Possui características pré-neurais, não-audíveis e são evocadas por dois sinais sonoros simultâneos de fraca intensidade (f_1 e f_2), que resultam na formação de uma terceira frequência devido a inabilidade da cóclea em responder aos dois sinais simultâneos (SOUZA et al., 2008).

Para a testagem, foi utilizado o equipamento Otoread DP+TE (Interacoustics, Dinamarca, EU), devidamente calibrado. A análise das EOAPD foi realizada por meio da frequência 1 (f_1) e frequência 2 (f_2), onde $2f_1 - f_2$ com relação $f_1: f_2 = 1,22$ na resolução de dois pontos por oitava. Como a audição dos roedores é ultrassônica, a testagem foi realizada em altas frequências, iniciando em 2 kHz, seguido por 3,4,6,8,10 e 12kHz. A frequência f_1 apresentou a intensidade de 65dBNPS e f_2 de 55dBNPS, mensuradas a uma taxa de aceitação de ruído de no máximo 10dBNPS. As EOAPD são normalmente traçadas em função das frequências tonais primárias. Dados demonstram que $2f_1 - f_2$ é gerada na região da cóclea que responde a tons primários (SOUZA et al., 2008).

A oliva utilizada para a testagem foi a de recém-nascido (Figura 12) e o animal foi alocado em uma caixa revestida com espuma (Figura 13), como proposto pelo estudo piloto.



Figura 12. Foto da sonda das EOAPD com oliva de recém-nascido utilizada na testagem com ratos



Figura 13. Foto de um rato adulto anestesiado alocado em uma caixa revestida com espuma com inserção da sonda das EOAPD na OD

A análise dos parâmetros das EOAPD foi realizada pela amplitude, sendo que é traçado um gráfico em função da frequência dos tons primários denominado DPGRAM. Desta forma, o resultado, evidencia uma configuração detalhada das frequências sob teste, que especifica o funcionamento das CCE. As respostas foram consideradas como presentes quando a amplitude era maior igual a 3dB em relação ao nível de ruído como descrito por Bayandir, et al. (2013).

5.7.3 Potencial evocado de tronco encefálico (PEATE)

As ondas de interesse clínico são as ondas I, III e V, uma vez que apresentam melhores traçados e são mais fáceis de ser identificadas. Desta forma avalia-se nos humanos, as latências absolutas e as interpicas dessas ondas (SOUZA et al., 2008)

Para realização do PEATE (Interacoustics, EP 15, Dinamarca, EU) foram utilizados eletrodos subcutâneos, dispostos da seguinte maneira: um eletrodo positivo no vértex craniano, dois eletrodos negativos na mastoide (direita e esquerda) e um eletrodo referência (terra) na perna direita ou esquerda (Figura 15).

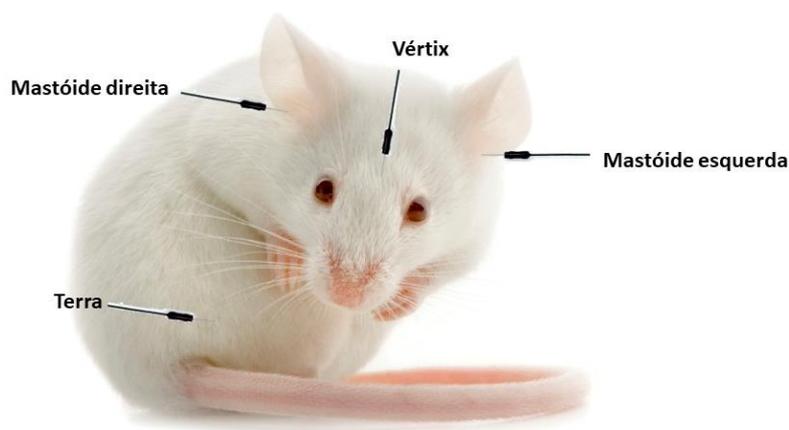


Figura 14. Esquema de posicionamento dos eletrodos do PEATE nos ratos.

Após a colocação dos eletrodos, os animais foram posicionados em decúbito ventral em uma caixa e foi feita a pesquisa da impedância dos eletrodos. A impedância utilizada foi a 1 a 5 ohms, com o critério de aceitação de artefatos em até 20%. O estímulo foi do tipo clique com polaridade alternada, com pulso monofásico de 100 microssegundos (μs) de duração a uma taxa de velocidade do estímulo de 27,7 seg. A quantidade de estímulos promediados foi de 1.024, em um tempo de 25,0 μs , com uma estimativa da relação sinal/ruído de 4,00 – 9,00ms e um ganho de 100,0K por meio de fones de inserção ER-3A. Os filtros de linha ativados foram os de passa baixa centrado em 3000Hz e passa alta em 150Hz. A testagem foi realizada com uma janela de curta latência, 10ms, e o resultado do exame foi analisado a partir das ondas de potencial elétrico frente ao estímulo sonoro.

Para a pesquisa da integridade das vias auditivas, a intensidade de análise foi 90dBNA. Após captura do traçado, as ondas I, II, III, IV e V foram assinaladas e caracterizadas as latências absolutas e interpicos. Para a identificação do nível mínimo de resposta, a testagem foi realizada com estímulo decrescente nas seguintes intensidades: 70, 40 e 20dBNA. Caso não fossem encontradas ondas nessas intensidades, a testagem prosseguia com intensidades superiores ou inferiores (80,60,30dBNA) às apresentadas. O nível mínimo de resposta permite obtenção do limiar eletrofisiológico, o qual é caracterizado pela mínima intensidade, a qual permitia o completo desaparecimento das ondas. Foi utilizada a onda II para caracterização do nível mínimo de resposta, uma vez que esta é a mais proeminente (ALVARADO et al., 2012).

O critério de normalidade adotado, mesmo que nos humanos, considerou que os limiares auditivos estavam normais quando os valores eram menores iguais a 20dBNA. Para a classificação da perda auditiva, a alteração leve foi considerada quando os limiares estavam

entre 30 e 40dBNA; moderada entre 50 e 70dBNA; severa de 80 a 90dBNA e profunda com limiares maiores que 100dBNA (SILMAN; SILVERMAN, 1997)

5.8 Delineamento experimental

Abaixo segue desenho experimental utilizado para formação das categorias de estudo e a testagem aplicada no decorrer dos 120 dias (Figura 15).

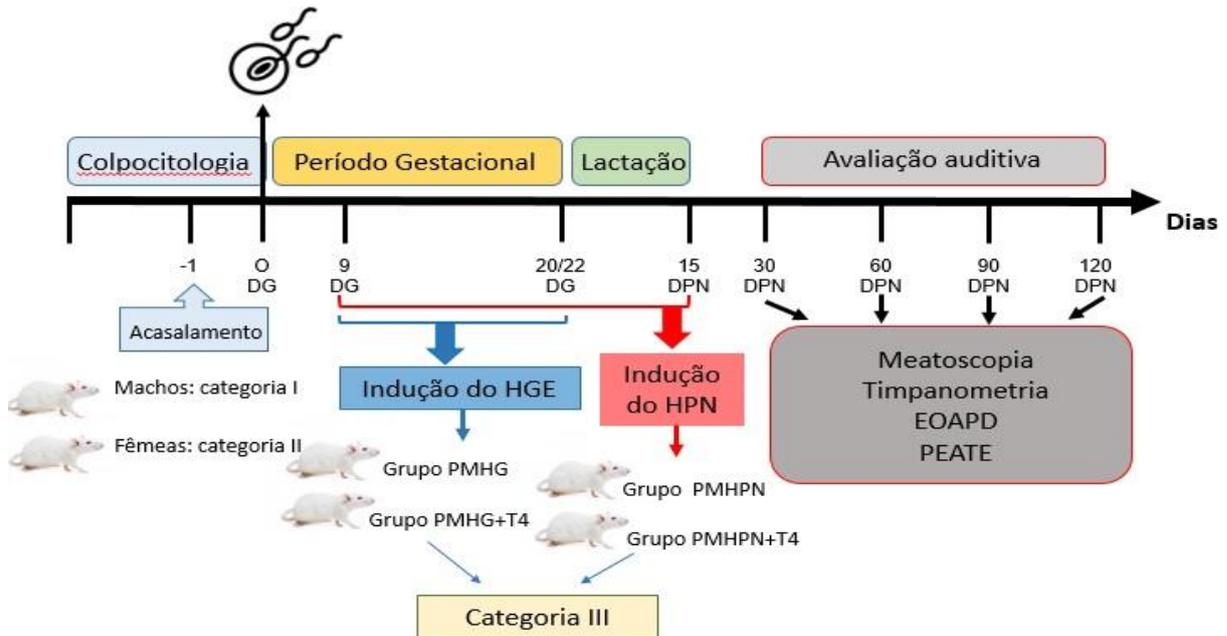


Figura 15. Desenho experimental ao longo dos 120 dias de ensaios experimentais. PME: Prole de ratas de mães eutiroídicas, PMHG: Prole de ratas de mães hipotiroídicas induzidas no período gestacional, PMHG+T4: Prole de ratas de mães hipotiroídicas induzidas no período gestacional com administração de T4, PMHPN: Prole de ratas de mães hipotiroídicas induzidas até a lactação, PMHPN+T4: Prole de ratas de mães hipotiroídicas induzidas até a lactação com administração de T4.

5.9 Planejamento estatístico

Após a obtenção dos dados, os resultados obtidos foram expressos em valores de média marginal e erro padrão da média. Os dados foram analisados com o teste de análise de variância mista (*Mixed Anova*), com pós teste de Tukey HSD.

Nas análises da pesquisa foram considerados como fatores aleatórios a ninhada, o animal individual e os fatores fixos foram o tratamento durante a gestação, tempo e orelhas (OD e OE).

Para o estudo do peso, a massa corporal foi considerada como variável dependente e os fatores de variação foram grupos experimentais e tempo. Na timpanometria a variável dependente foi a compliância e os fatores de variância foram: grupo experimental e tempo. Na EOAPD a amplitude de resposta, foi considerada fator fixo, e os fatores de variância foram:

grupos experimentais, tempo e frequência. No PEATE, a latência das ondas absolutas foi caracterizada como variável dependente e como independente os fatores grupo experimental e tempo.

Todos os testes estatísticos foram processados pelo *Statistical Package for Social Sciences* versão 20 (SPSS, Chicago, USA). O nível crítico fixado foi de 5% ($P < 0,05$) para se admitir uma diferença de médias como estatisticamente significativa. Os gráficos foram confeccionados por meio do software *GraphPad Prism* versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

6. RESULTADOS

6.1 Estudo piloto

Para o estudo piloto, cinco fêmeas adultas da categoria II foram acasaladas com três machos adultos da categoria I. Após confirmada a gestação, as mães foram acompanhadas até o parto. Durante o período gestacional e até a lactação, receberam água *ad libitum*, ou seja, livre acesso, e foram consideradas eutireoidianas. Para compor o estudo piloto, foram utilizados 10 ratos machos (prole), sendo que todos os procedimentos foram realizados com 30DPN.

Na timpanometria, verificou-se que a sonda mais adequada foi a de recém-nascido, sendo esta, a única que propiciou o vedamento da orelha e possibilitou a realização dos testes. No estudo piloto, não foram evidenciados valores de compliância menores que 0,30mL e o exame foi realizado de forma rápida e sem intercorrências.

Na testagem com as emissões otoacústicas, observou-se que a sonda mais adequada para fazer o exame também foi a de recém-nascido. Inicialmente, os animais foram alocados em uma sala silenciosa no LANBAC para realização da testagem. Uma caixa de papelão foi revestida com espuma para absorver o ruído e evitar a interferência do mesmo durante os testes. Além disto, antes do procedimento era realizada a avaliação pontual do ruído ambiental com o medidor de pressão sonora (*Instrutherm*, DEC 460, São Paulo, BR), sendo que o ruído deveria ser \leq a 50dBNPS.

Foi avaliada a possibilidade de utilização das emissões otoacústicas em duas plataformas, a saber, EOAT e EOAPD. Porém o EOAT não apresentou respostas, sendo que este teste, desta forma, não se mostrou eficiente para a avaliação com ratos. Por outro lado, a EOAPD mostrou-se como uma técnica aplicável, uma vez que os animais sob teste apresentaram respostas em todas as frequências. Nesta testagem, todos os animais apresentaram amplitude \geq a 3dBNPS, o que é considerado o mínimo aceitável para validar o método, nas frequências \geq a 4kHz.

Na pesquisa com o PEATE, verificou-se muita interferência na leitura do traçado, a qual foi resolvida com o aterramento da rede elétrica da sala. Inicialmente, o tipo de eletrodo utilizado foi o de superfície, que mesmo após a tricotomia da região da mastoide e vértex craniano, não possibilitou o registro dos potenciais. Para solucionar o problema, foi utilizado eletrodo subcutâneo nos animais. Os testes foram realizados com os três tipos de polaridade (alternada, rarefeita e condensada), porém obteve-se melhor padrão de resposta com a

alternada. Com relação a promediação dos estímulos, verificou-se que a configuração da onda apresentou bom padrão com 500 estímulos, porém para garantir melhor traçado, o estudo piloto foi realizado com 1.024. Os estímulos foram centrados em 3000Hz (passa baixo) e 150Hz (passa alto).

Para a pesquisa da integridade das vias auditivas, foram realizados testes nas intensidades de 100, 90 e 80dBNA. Verificou-se que o melhor padrão de resposta foi com o uso de 90dBNA. Foi observada presença de cinco ondas, o que permitiu caracterização da latência das ondas absolutas e interpicos. Para a pesquisa do limiar eletrofisiológico, foi investigada a menor intensidade de resposta, por meio de um estímulo sonoro decrescente, nas seguintes intensidades: 70, 40 e 20dBNA. Verificou-se que a onda II e a IV foram as únicas identificadas em intensidades mais fracas, porém a II apresentou maior ocorrência, sendo esta considerada a onda característica para determinação do limiar eletrofisiológico, dado este igual ao de Alvarado *et al.* (2012).

6.2 Caracterização da amostra

A pesquisa foi baseada no monitoramento dos animais ao longo do tempo: 30, 60, 90 e 120DPN. Na testagem com 30DPN o experimento foi realizado em 57 animais, sendo 10 utilizados para o estudo piloto. Ao longo do estudo, até os 120DPN, foram monitorados 39 animais. Na Tabela 1 tem-se o número de animais, divididos por grupo experimental e por idade.

Os grupos PMHPN e PMHPN+T4 foram compostos por uma menor quantidade de animais. Este fato decorreu da dificuldade na sobrevivência das mães e da prole quando submetidas ao protocolo de indução do hipotireoidismo até a lactação. Inicialmente, o protocolo iria ser realizado até o 21DPN, porém as mães e a prole morriam antes de completar esta idade. Desta forma, observou-se que houve um aumento da sobrevivência na indução da hipofunção tireoidiana materna até o 15ºDPN.

Tabela 1. Distribuição do número (n) da prole dos grupos experimentais subdivididos ao longo do tempo (30 a 120 DPN)

Tempo (DPN)	PME	PMHG	PMHG+T4	PMHPN	PMHPN+T4	TOTAL
30	18	10	10	6	3	47
60	18	10	10	6	3	47
90	16	9	7	6	3	41
120	15	9	7	5	3	39

No que tange a massa corporal da prole, observou-se que os grupos induzidos ao hipotireoidismo apresentaram menor peso. A análise estatística *Mixed* ANOVA revelou efeito

do fator principal grupo experimental [F (4;5,869) =6,253, p=0,026], porém o pós-teste de Tukey HSD revelou significância estatística de menor massa corporal para o grupo PMHPN com p=0,022, quando comparado ao PME.

A Figura 16 (Tabela 2) apresentam os dados da massa corporal com fator de variância tempo (30 a 120DPN). Os resultados evidenciaram que ao longo do tempo, os animais apresentaram aumento de peso, semelhante a todos os grupos estudados. Desta forma, observou-se na análise estatística presença do efeito principal fator tempo [F (3;17,638) =500,845, p=0,000] e ausência de interação entre os fatores tempo e grupos experimentais [F (12; 17,292) = 1,366, p=0,270].

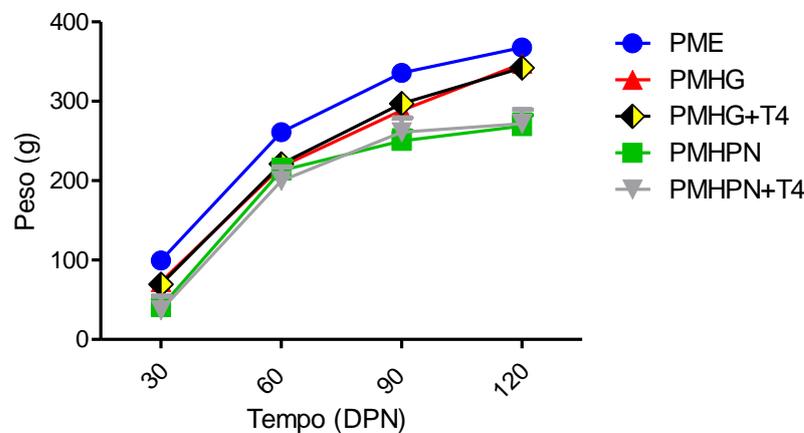


Figura 16. Efeito experimental do hipotireoidismo gestacional e até a lactação na massa corpórea da prole com 30, 60, 90 e 120 DPN (n =18/18/16/15 PME), (n =10/10/9/9 PMHG), (n =10/10/7/7 PMHG+T4), (n= 6/6/6/5 PMHPN) e (n=3/3/3/3 PMHPN+T4) respectivamente, em função do fator tempo. Análise estatística: *Mixed ANOVA*. Valores expressos com média marginal (\pm SEM). PME: Prole de ratas de mães eutiroidianas, PMHG: Prole de ratas de mães hipotiroidianas induzidas no período gestacional, PMHG+T4: Prole de ratas de mães hipotiroidianas induzidas no período gestacional com administração de T4, PMHPN: Prole de ratas de mães hipotiroidianas induzidas até a lactação, PMHPN+T4: Prole de ratas de mães hipotiroidianas induzidas até a lactação com administração de T4, DPN: dias pós-natal.

Tabela 2. Efeito experimental do hipotireoidismo gestacional e até a lactação na massa corpórea da prole. Valores expressos com média marginal (\pm SEM)

	PME	PMHG	PMHG+T4	PMHPN	PMHPN+T4
TEMPO (DPN)	Média (mL) (\pm SEM)				
30	0,882 (\pm 0,050)	0,630 (\pm 0,067)	0,529 (\pm 0,067)	0,476 (\pm 0,086)	0,380 (\pm 0,122)
60	0,786 (\pm 0,050)	0,499 (\pm 0,067)	0,585 (\pm 0,067)	0,551 (\pm 0,086)	0,515 (\pm 0,122)
90	0,610 (\pm 0,053)	0,687 (\pm 0,071)	0,654 (\pm 0,080)	0,379 (\pm 0,080)	0,472 (\pm 0,122)
120	0,445 (\pm 0,054)	0,377 (\pm 0,071)	0,392 (\pm 0,080)	0,434 (\pm 0,080)	0,373 (\pm 0,122)

Para análise dos procedimentos audiológicos (timpanometria, EOAPD e PEATE) as orelhas foram analisadas agrupadamente, uma vez que foi constatado ausência de diferença significativa entre OD e OE no teste *Mixed ANOVA* (p>0,05).

6.3 Timpanometria

Na Figura 17 (Tabela 3) está expressa a compliância em função do tempo nos diferentes grupos experimentais, sendo que os valores de compliância foram menores para os grupos induzidos ao hipotireoidismo quando comparados ao grupo PME. A análise estatística, revelou haver presença do efeito principal do fator tempo [$F(3;16,185) = 12,606$; $p=0,000$] e grupos experimentais [$F(4;5,173) = 9,132$; $p= 0,015$], na comparação com o grupo PME.

No tocante a interação do fator tempo e grupos experimentais, a análise apresentou dados significativos [$F(12;15,387) = 3,864$ $p= 0,007$].

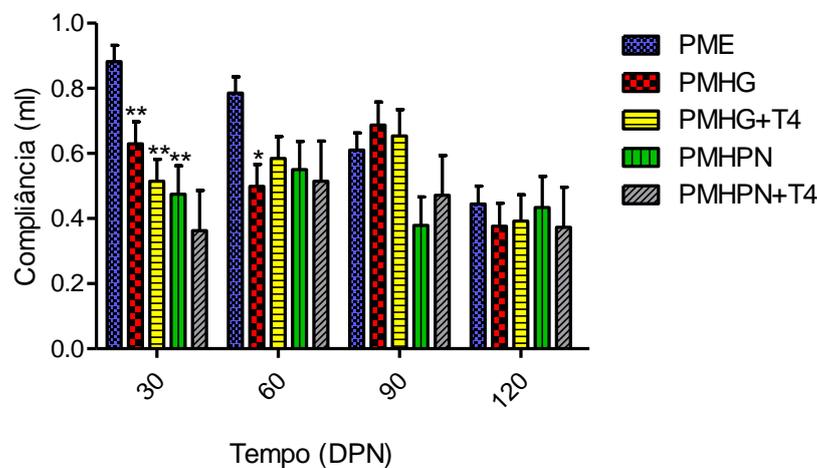


Figura 17. Efeito experimental da indução do hipotireoidismo gestacional e até a lactação na compliância da prole com 30, 60, 90 e 120DPN (n=18/18/16/15PME), (n=10/10/9/9PMHG), (n=10/10/7/7PMHG+T4), (n=6/6/6/5PMHPN) e (n=3/3/3/3PMHPN+T4) respectivamente, na interação dos fatores tempo e grupos experimentais. Análise estatística: *Mixed ANOVA* seguida por *Tukey HSD post hoc*. Valores expressos com média marginal (\pm SEM) (*) $p<0,05$ e (**) $p<0,01$ quando comparados ao grupo PME para cada idade da testagem.. PME: Prole de ratas de mães eutiroidianas, PMHG: Prole de ratas de mães hipotiroídianas induzidas no período gestacional, PMHG+T4: Prole de ratas de mães hipotiroídianas induzidas no período gestacional com administração de T4, PMHPN: Prole de ratas de mães hipotiroídianas induzidas até a lactação, PMHPN+T4: Prole de ratas de mães hipotiroídianas induzidas até a lactação com administração de T4, DPN: dias pós-natal.

Tabela 3. Efeito experimental da indução do hipotireoidismo na gestação e até a lactação na compliância da prole. Valores expressos com média marginal (\pm SEM)

	PME	PMHG	PMHG+T4	PMHPN	PMHPN+T4
TEMPO (DPN)	Média (mL) (\pm SEM)				
30	0,882 (\pm 0,050)	0,630 (\pm 0,067)	0,529 (\pm 0,067)	0,476 (\pm 0,086)	0,380 (\pm 0,122)
60	0,786 (\pm 0,050)	0,499 (\pm 0,067)	0,585 (\pm 0,067)	0,551 (\pm 0,086)	0,515 (\pm 0,122)
90	0,610 (\pm 0,053)	0,687 (\pm 0,071)	0,654 (\pm 0,080)	0,379 (\pm 0,080)	0,472 (\pm 0,122)
120	0,445 (\pm 0,054)	0,377 (\pm 0,071)	0,392 (\pm 0,080)	0,434 (\pm 0,080)	0,373 (\pm 0,122)

A pressão da compliância da OM apresentou pico negativo, para todos os grupos experimentais. Na análise dos dados com *Mixed ANOVA* não houve efeito principal dos

grupos experimentais [$F(4; 4,553) = 0,921, p=0,523$] (Figura 18) e do fator tempo [$F(3; 14,900) = 2,200, p=0,131$] (Figura 19). Não foi detectada interação positiva (*Mixed ANOVA*) da pressão em função dos fatores tempo e grupos experimentais [$F(12;13,576) = 1,974 p=0,115$].

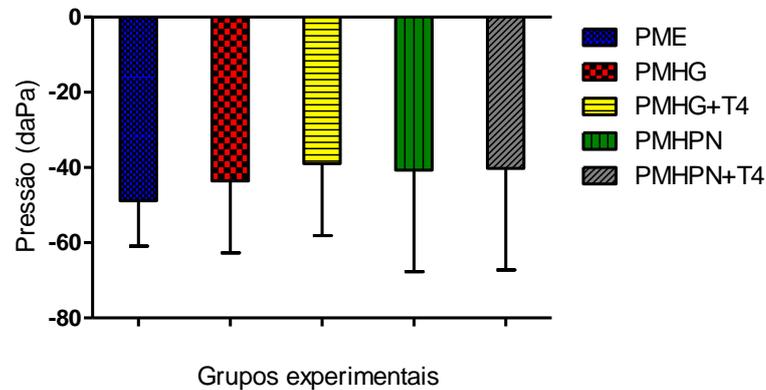


Figura 18. Efeito experimental da indução do hipotireoidismo gestacional e até a lactação na pressão da compliância da prole (n=18 PME), (n=10 PMHG), (n=10 PMHG+T4), (n=6 PMHPN) e (n=3 PMHPN+T4) em função do fator grupos experimentais. Análise estatística: *Mixed ANOVA*. Valores expressos com média marginal (\pm SEM). PME: Prole de ratas de mães eutiroidianas, PMHG: Prole de ratas de mães hipotiroidianas induzidas no período gestacional, PMHG+T4: Prole de ratas de mães hipotiroidianas induzidas no período gestacional com administração de T4, PMHPN: Prole de ratas de mães hipotiroidianas induzidas até a lactação, PMHPN+T4: Prole de ratas de mães hipotiroidianas induzidas até a lactação com administração de T4, daPa: decaPascals

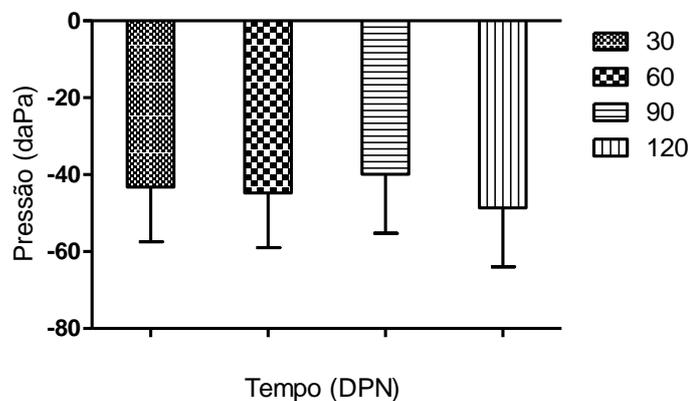


Figura 19. Estudo da pressão da compliância ao longo do procedimento experimental da prole com 30, 60, 90 e 120DPN, em função do fator tempo. Análise estatística: *Mixed ANOVA*. Valores expressos com média marginal (\pm SEM). daPa: decaPascals, DPN: dia pós natal.

6.4 Emissões otoacústicas por produto de distorção

Na análise da amplitude da EOAPD verificou-se dados significativos para o efeito principal grupos experimentais [$F(4;5,458) = 15,445, p= 0,004$] e para o fator tempo [$F(3; 15,783) = 5,487, p= 0,009$]. Desta maneira, observa-se que a amplitude das frequências se

comportou de forma diferente entre os grupos induzidos ao hipotireoidismo (menores valores) quando comparados ao grupo PME, sendo que também diferiram em relação ao fator tempo quando comparado a idade de 30DPN.

Na Figura 20 (Tabela 4) estão expressas as amplitudes em função das frequências sob teste e grupos experimentais. Após a análise, os dados obtidos foram significativos para o efeito principal das frequências [$F(5;31,282) = 115,710$ $p = 0,000$], uma vez que as frequências apresentaram valores diferentes entre si.

No estudo dos fatores amplitude das frequências e grupos experimentais, houve interação positiva nos resultados do *Mixed ANOVA* [$F(20;29,071) = 13,041$ $p = 0,000$], porém Tukey HSD *post hoc* evidenciou dados significativos para as frequências de 6 a 12kHz ($p < 0,00$), quando comparados ao grupo PME. Observou-se presença de diferença entre as frequências partir da frequência de 6kHz para os grupos com indução do hipotireoidismo em relação ao grupo PME.

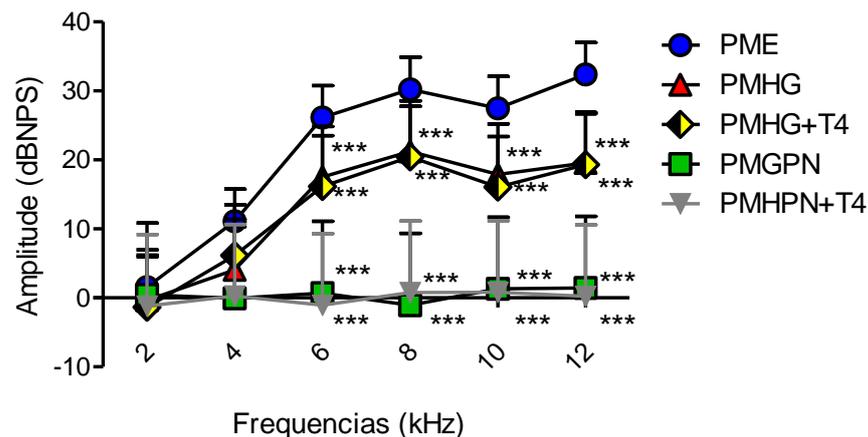


Figura 20. Efeito experimental da indução do hipotireoidismo gestacional e até a lactação na amplitude das frequências das EOAPD da prole ($n = 18$ PME), ($n = 10$ PMHG), ($n = 10$ PMHG+T4), ($n = 6$ PMHPN) e ($n = 3$ PMHPN+T4) na interação dos fatores tempo e grupos experimentais. Análise estatística: *Mixed ANOVA* seguida por Tukey HSD *post hoc*. Valores expressos com média marginal (\pm SEM) (***) $p < 0,001$ quando comparado ao grupo PME. PME: Prole de ratas de mães eutiroidianas, PMHG: Prole de ratas de mães hipotiroidianas induzidas no período gestacional, PMHG+T4: Prole de ratas de mães hipotiroidianas induzidas no período gestacional com administração de T4, PMHPN: Prole de ratas de mães hipotiroidianas induzidas até a lactação, PMHPN+T4: Prole de ratas de mães hipotiroidianas induzidas até a lactação com administração de T4, dBNS: decibel nível e pressão sonora

Tabela 4. Efeito experimental do hipotireoidismo gestacional e até a lactação na amplitude das frequências das EOAPD. Valores expressos com média marginal (\pm SEM)

	PME	PMHG	PMHG+T4	PMHPN	PMHPN+T4
FREQ. (kHz)	Média dBNPS (\pm SEM)				
2	1,55 (\pm 3,96)	-0,36 (\pm 6,26)	-1,35 (\pm 6,26))	0,45 (\pm 8,86)	-1,20 (\pm 8,86)
4	11,12 (\pm 3,96)	4,04(\pm 6,26)	6,16 (\pm 6,26)	-0,07 (\pm 8,86)	0,25 (\pm 8,86)
6	26,26 (\pm 3,96)	17,52 (\pm 6,26)	16,15 (\pm 6,26)	0,69(\pm 8,86)	-1,08 (\pm 8,86)
8	30,24 (\pm 3,96)	21,23 (\pm 6,26)	20,43(\pm 6,26))	-1,04 (\pm 8,86)	0,75 (\pm 8,86)
10	27,47 (\pm 3,96)	17,89 (\pm 6,26)	16,04 (\pm 6,26)	1,31(\pm 8,86)	0,79 (\pm 8,86)
12	32,39 (\pm 3,96)	19,54 (\pm 6,26)	19,32 (\pm 6,26)	1,44(\pm 8,86)	0,22 (\pm 8,86)

Na Tabela 5 tem-se a distribuição da média marginal (\pm SEM) dos grupos experimentais PMHG e PMHPN. Os dados obtidos revelaram redução significativa da amplitude no grupo PMHPN a partir da frequência de 6 kHz ($p=0,00$), quando comparados ao grupo PMHG.

Tabela 5. Efeito experimental do hipotireoidismo gestacional e até a lactação na amplitude das frequências das EOAPD nos grupos induzidos ao hipotireoidismo em relação ao grupo HG. Análise estatística: *Mixed ANOVA* seguida por Tukey HSD *post hoc*. Valores expressos com média marginal (\pm SEM) (***) $p < 0,001$ quando comparado ao grupo HG.

	PMHG	PMHPN	Pós Teste Tukey HSD	PMHG+T4	PMHPN+T4	Pós Teste Tukey HSD
FREQ. (kHz)	Média dBNPS (\pm SEM)	Média dBNPS (\pm SEM)	P valor	Média dBNPS (\pm SEM)	Média dBNPS (\pm SEM)	P valor
2	-0,36 (\pm 6,26)	0,44 (\pm 8,86)	1,00	-1,35 (\pm 6,26)	-1,20 (\pm 8,86)	1,00
4	4,04 (\pm 6,26)	-0,77 (\pm 8,86)	0,97	6,16 (\pm 6,26)	0,25 (\pm 8,86)	0,92
6	17,52 (\pm 6,26)	0,69 (\pm 8,86)	***	16,15 (\pm 6,26)	-1,08 (\pm 8,86)	***
8	21,23 (\pm 6,26)	-1,04 (\pm 8,86)	***	20,43 (\pm 6,26)	0,75 (\pm 8,86)	***
10	17,89 (\pm 6,26)	1,31 (\pm 8,86)	***	16,04 (\pm 6,26)	0,79 (\pm 8,86)	***
12	19,54 (\pm 6,26)	1,30 (\pm 8,86)	***	19,32 (\pm 6,26)	0,22 (\pm 8,86)	***

Os dados do presente estudo evidenciaram que não houve interação positiva dos fatores grupos experimentais e uso de T4, quando comparados aos grupos sem administração de T4. O Tukey HSD *post hoc* não revelou diferença significativa entre os dados ($p= 1,00$), descrito na Tabela 6.

Tabela 6. Efeito experimental do hipotireoidismo gestacional e até a lactação na amplitude das frequências das EOAPD nos grupos induzidos ao hipotireoidismo + T4 em relação aos grupos sem uso de levotiroxina. Análise estatística: *Mixed ANOVA* seguida por *Tukey HSD post hoc*. Valores expressos com média marginal (\pm SEM), $p=1,00$ quando comparado aos grupos sem reposição de T4 (PMHG e PMHPN).

FREQ. (kHz)	PMHG	PMHG+T4	Pós Teste Tukey HSD	PMHPN	PMHPN+T4	Pós Teste Tukey HSD
	Média dBNPS (\pm SEM)	Média dBNPS (\pm SEM)	P valor	Média dBNPS (\pm SEM)	Média dBNPS (\pm SEM)	P valor
2	-0,36 (\pm 6,26)	-1,35 (\pm 6,26)	1,00	0,44 (\pm 8,86)	-1,20 (\pm 8,86)	1,00
4	4,04 (\pm 6,26)	6,16 (\pm 6,26)	1,00	-0,77 (\pm 8,86)	0,25 (\pm 8,86)	1,00
6	17,52 (\pm 6,26)	16,15 (\pm 6,26)	1,00	0,69 (\pm 8,86)	-1,08 (\pm 8,86)	1,00
8	21,23 (\pm 6,26)	20,43 (\pm 6,26)	1,00	-1,04 (\pm 8,86)	0,75 (\pm 8,86)	1,00
10	17,89 (\pm 6,26)	16,04 (\pm 6,26)	1,00	1,31 (\pm 8,86)	0,79 (\pm 8,86)	1,00
12	19,54 (\pm 6,26)	19,32 (\pm 6,26)	1,00	1,30 (\pm 8,86)	0,22 (\pm 8,86)	1,00

No estudo das EOAPD verificou-se que não houve interação da variável amplitude nos fatores tempo e grupos experimentais [$F(12; 15,0) = 0,853$, $p = 0,604$] como pode ser observado na Figura 21.

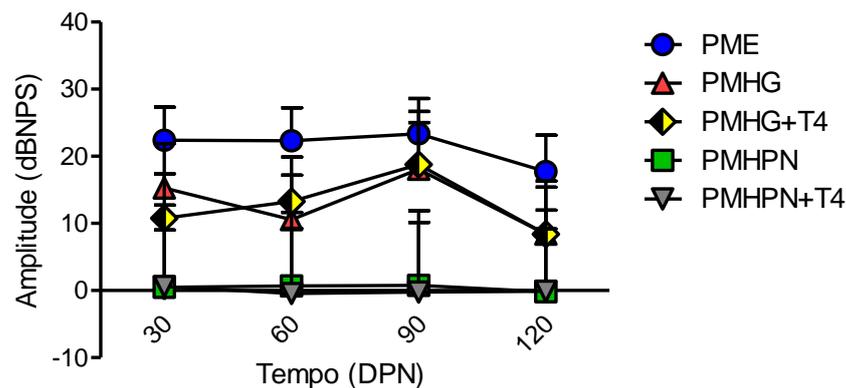


Figura 21. Efeito experimental da indução do hipotireoidismo gestacional e até a lactação na amplitude das EOAPD na prole com 30, 60, 90 e 120DPN ($n = 18/18/16/15$ PME), ($n = 10/10/9/9$ PMHG), ($n = 10/10/7/7$ PMHG+T4), ($n = 6/6/6/5$ PMHPN) e ($n = 3/3/3/3$ PMHPN+T4) respectivamente, na interação dos fatores tempo e grupos experimentais. Análise estatística: *Mixed ANOVA*. PME: Prole de ratas de mães eutiroidianas, PMHG: Prole de ratas de mães hipotiroidianas induzidas no período gestacional, PMHG+T4: Prole de ratas de mães hipotiroidianas induzidas no período gestacional com administração de T4, PMHPN: Prole de ratas de mães hipotiroidianas induzidas até a lactação, PMHPN+T4: Prole de ratas de mães hipotiroidianas induzidas até a lactação com administração de T4, DPN: dias pós-natal, dBNPS: decibel nível de pressão sonora.

Os achados foram analisados em relação ao fator idade, sendo que com 30 dias, a frequência de 2kHz apresentou ausência de respostas, uma vez que os valores de amplitude foram mais elevados para as frequências de 4 a 12kHz, com exceção para os grupos PMHPN e PMHPN+T4 que apresenta amplitudes rebaixadas quando comparada com os demais grupos (Figura 22/tabela7).

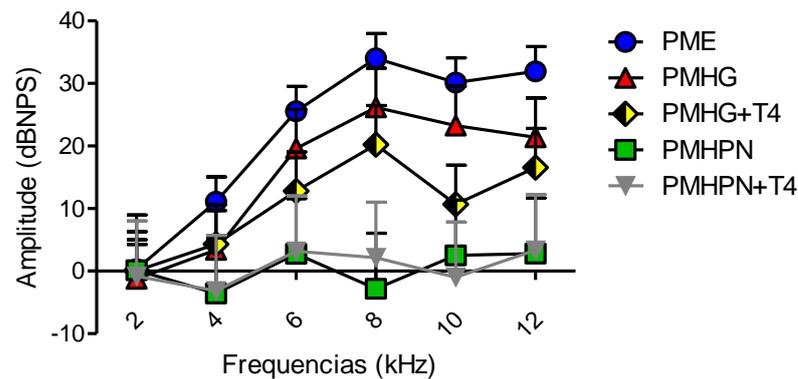


Figura 22. Efeito experimental da indução do hipotireoidismo gestacional e até a lactação na amplitude das frequências das EOAPD com 30DPN da prole (n =18 PME), (n =10 PMHG), (n =10 PMHG+T4), (n =6 PMHPN) e (n =3 PMHPN+T4) em relação aos grupos experimentais. Análise estatística: *Mixed ANOVA* seguida pelo teste de Tukey HSD post hoc. Valores expressos com média marginal (\pm SEM) PME: Prole de ratas de mães eutiroidianas, PMHG: Prole de ratas de mães hipotiroidianas induzidas no período gestacional, PMHG+T4: Prole de ratas de mães hipotiroidianas induzidas no período gestacional com administração de T4, PMHPN: Prole de ratas de mães hipotiroidianas induzidas até a lactação, PMHPN+T4: Prole de ratas de mães hipotiroidianas induzidas até a lactação com administração de T4, dBNSP: decibel nível e pressão sonora.

Tabela 7. Efeito experimental da indução do hipotireoidismo gestacional e até a lactação na amplitude das frequências das EOAPD com 30DPN

	PME	PMHG	PMHG+T4	PMHPN	PMHPN+T4
FREQ. (kHz)	Média dBNSP (\pm SEM)	Média dBNSP (\pm SEM)	Média dBNSP (\pm SEM))	Média dBNSP (\pm SEM)	Média dBNSP (\pm SEM)
2	0,29 (\pm 3,96)	-1,43 (\pm 6,26)	0,05 (\pm 6,26))	0,13 (\pm 8,86)	-0,83 (\pm 8,86)
4	11,11 (\pm 3,96)	3,41 (\pm 6,26)	4,33 (\pm 6,26)	-3,54 (\pm 8,86)	-3,14 (\pm 8,86)
6	25,56 (\pm 3,96)	19,59 (\pm 6,26)	12,79 (\pm 6,26)	2,75 (\pm 8,86)	3,17 (\pm 8,86)
8	34,03 (\pm 3,96)	26,17 (\pm 6,26)	20,21 (\pm 6,26))	-2,81 (\pm 8,86)	2,14 (\pm 8,86)
10	30,14 (\pm 3,96)	23,27 (\pm 6,26)	10,68 (\pm 6,26)	2,50 (\pm 8,86)	-1,00 (\pm 8,86)
12	31,92 (\pm 3,96)	21,40 (\pm 6,26)	16,55 (\pm 6,26)	2,83 (\pm 8,86)	3,35 (\pm 8,86)

Na idade de 60DPN, o grupo PME e os demais apresentaram achados semelhantes a idade de 30DPN, amplitude rebaixada para 2kHz com valores maiores que 3kHz para as demais frequências, porém os grupos PMHPN e PMHPN+T4 possuem ausência de respostas em quase todas as frequências (figura 23/ tabela 8)

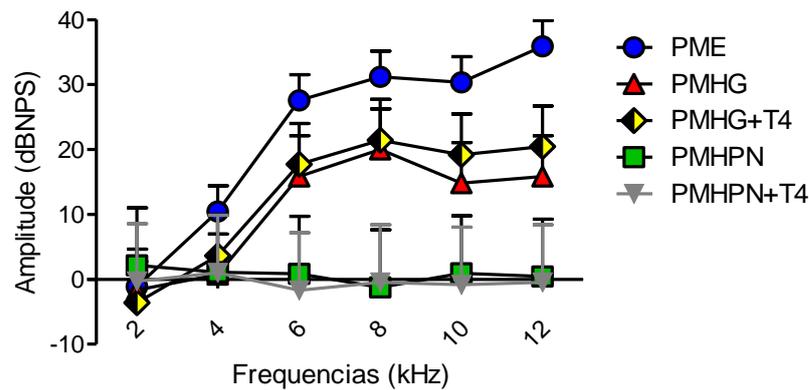


Figura 23. Efeito experimental da indução do hipotireoidismo gestacional e até a lactação na amplitude das frequências das EOAPD com 60DPN da prole (n=18 PME), (n=10 PMHG), (n=10 PMHG+T4), (n=6 PMHPN) e (n=3 PMHPN+T4) em relação aos grupos experimentais. Análise estatística: *Mixed ANOVA* seguida pelo teste de Tukey HSD post hoc. Valores expressos com média marginal (\pm SEM) PME: Prole de ratas de mães eutiroidianas, PMHG: Prole de ratas de mães hipotiroídianas induzidas no período gestacional, PMHG+T4: Prole de ratas de mães hipotiroídianas induzidas no período gestacional com administração de T4, PMHPN: Prole de ratas de mães hipotiroídianas induzidas até a lactação, PMHPN+T4: Prole de ratas de mães hipotiroídianas induzidas até a lactação com administração de T4, dBNPS: decibel nível e pressão sonora.

Tabela 8. Efeito experimental da indução do hipotireoidismo gestacional e até a lactação na amplitude das frequências das EOAPD com 60DPN

	PME	PMHG	PMHG+T4	PMHPN	PMHPN+T4
FREQ. (kHz)	Média dBNPS (\pm SEM)				
2	-1,12 (\pm 3,96)	-1,63 (\pm 6,26)	-3,61 (\pm 6,26)	2,17 (\pm 8,86)	0,31 (\pm 8,86)
4	10,40 (\pm 3,96)	0,70 (\pm 6,26)	3,62 (\pm 6,26)	1,08 (\pm 8,86)	1,02 (\pm 8,86)
6	27,56 (\pm 3,96)	15,85 (\pm 6,26)	17,72 (\pm 6,26)	0,83 (\pm 8,86)	-1,69 (\pm 8,86)
8	31,19 (\pm 3,96)	20,00 (\pm 6,26)	21,45 (\pm 6,26)	-1,25 (\pm 8,86)	-0,45 (\pm 8,86)
10	30,34 (\pm 3,96)	14,81 (\pm 6,26)	19,19 (\pm 6,26)	0,92 (\pm 8,86)	-0,81 (\pm 8,86)
12	35,90 (\pm 3,96)	15,84 (\pm 6,26)	20,45 (\pm 6,26)	0,42 (\pm 8,86)	0,48 (\pm 8,86)

Na testagem com 90DPN verificou-se que os valores de amplitude do grupo PME diminuíram, porém, a relação estatística ainda é significativa entre os grupos de estudo. Observa-se ainda que os grupos PMHPN e PMHPN +T4 apresentam ausência de resposta em todas as frequências, dado este que se mantém desde o 30°DPN (figura 24/ tabela 9)

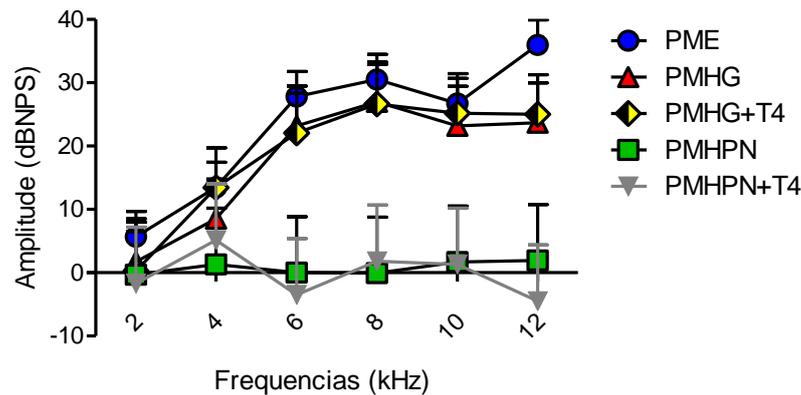


Figura 24. Efeito experimental da indução do hipotireoidismo gestacional e até a lactação na amplitude das frequências das EOAPD com 90DPN da prole (n=16 PME), (n=9 PMHG), (n=7 PMHG+T4), (n=6 PMHPN) e (n=3 PMHPN+T4) em relação aos grupos experimentais. Análise estatística: *Mixed ANOVA* seguida pelo teste de Tukey HSD post hoc. Valores expressos com média marginal (\pm SEM) PME: Prole de ratas de mães eutiroidianas, PMHG: Prole de ratas de mães hipotiroidianas induzidas no período gestacional, PMHG+T4: Prole de ratas de mães hipotiroidianas induzidas no período gestacional com administração de T4, PMHPN: Prole de ratas de mães hipotiroidianas induzidas até a lactação, PMHPN+T4: Prole de ratas de mães hipotiroidianas induzidas até a lactação com administração de T4, dBNPS: decibel nível e pressão sonora.

Tabela 9. Efeito experimental do hipotireoidismo gestacional e até a lactação na amplitude das frequências das EOAPD com 90DPN

	PME	PMHG	PMHG+T4	PMHPN	PMHPN+T4
FREQ. (kHz)	Média dBNPS (\pm SEM)				
2	5,70 (\pm 3,96)	1,72 (\pm 6,26)	0,25 (\pm 6,26)	-0,33 (\pm 8,86)	-1,67 (\pm 6,26)
4	13,48 (\pm 3,96)	8,50 (\pm 6,26)	13,44 (\pm 6,26)	1,33 (\pm 6,26)	5,14 (\pm 6,26)
6	27,80 (\pm 3,96)	23,20 (\pm 6,26)	22,06 (\pm 6,26)	0,00 (\pm 6,26)	-3,49 (\pm 6,26)
8	30,53 (\pm 3,96)	26,98 (\pm 6,26)	26,63 (\pm 6,26)	-0,08 (\pm 6,26)	1,83 (\pm 6,26)
10	26,72 (\pm 3,96)	23,18 (\pm 6,26)	25,19 (\pm 6,26)	1,67 (\pm 6,26)	1,33 (\pm 6,26)
12	35,96 (\pm 3,96)	23,70 (\pm 6,26)	25,00 (\pm 6,26)	1,92 (\pm 6,26)	-4,48 (\pm 6,26)

Aos 120DPN, última idade da testagem observa-se que as frequências dos grupos hipotiroidianos apresentam padrão rebaixado quando comparados com o grupo PME com interação positiva nas frequências de 4 a 12kHz (figura 25/tabela 10).

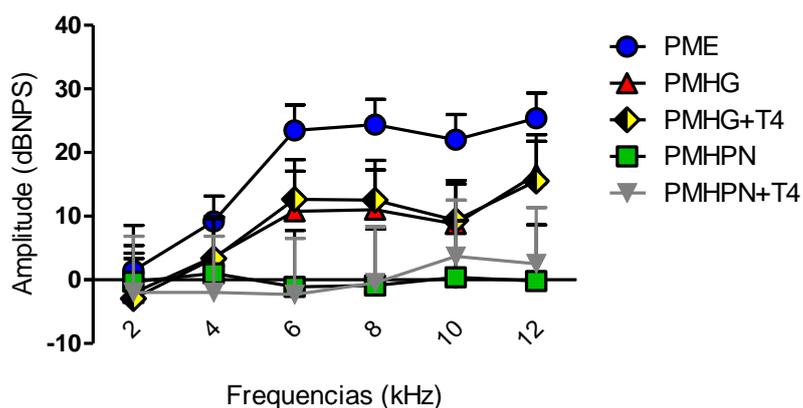


Figura 25. Efeito experimental da indução do hipotireoidismo gestacional e até a lactação na amplitude das frequências das EOAPD com 120DPN da prole (n =15 PME), (n =9 PMHG), (n =7 PMHG+T4), (n =5 PMHPN) e (n =3 PMHPN+T4) em relação aos grupos experimentais. Análise estatística: *Mixed ANOVA* seguida pelo teste de Tukey HSD post hoc. Valores expressos com média marginal (\pm SEM) PME: Prole de ratas de mães eutiroidianas, PMHG: Prole de ratas de mães hipotiroidianas induzidas no período gestacional, PMHG+T4: Prole de ratas de mães hipotiroidianas induzidas no período gestacional com administração de T4, PMHPN: Prole de ratas de mães hipotiroidianas induzidas até a lactação, PMHPN+T4: Prole de ratas de mães hipotiroidianas induzidas até a lactação com administração de T4, dBNS: decibel nível e pressão sonora

Tabela 10. Efeito experimental da indução do hipotireoidismo gestacional e até a lactação na amplitude das frequências das EOAPD com 120DPN

FREQ. (kHz)	PME	PMHG	PMHG+T4	PMHPN	PMHPN+T4
	Média dBNPS (\pm SEM)	Média dBNPS (\pm SEM)	Média dBNPS (\pm SEM))	Média dBNPS (\pm SEM)	Média dBNPS (\pm SEM)
2	1,42 (\pm 3,96)	-2,08 (\pm 6,26)	-2,93 (\pm 6,26)	-0,30 (\pm 8,86)	-2,00 (\pm 8,86)
4	9,18 (\pm 3,96)	3,61 (\pm 6,26)	3,36 (\pm 6,26)	1,00 (\pm 8,86)	-2,00 (\pm 8,86))
6	23,49 (\pm 3,96)	10,78 (\pm 6,26)	12,64 (\pm 6,26)	-1,10 (\pm 8,86)	-2,33 (\pm 8,86)
8	24,49 (\pm 3,96)	11,00 (\pm 6,26)	12,50 (\pm 6,26)	-0,90 (\pm 8,86)	-0,50 (\pm 8,86)
10	22,00 (\pm 3,96)	8,78 (\pm 6,26)	9,36 (\pm 6,26)	0,40 (\pm 8,86)	3,67 (\pm 8,86)
12	25,39 (\pm 3,96)	16,56 (\pm 6,26))	15,50 (\pm 6,26)	-0,20 (\pm 8,86)	2,50 (\pm 8,86)

6.5 Potencial evocado auditivo de tronco encefálico

A pesquisa da integridade das vias auditivas foi realizada com a intensidade de 90dBNA e verificou-se a presença de cinco ondas em todos os grupos de estudo.

O exame abaixo (Figura 26) demonstra o traçado do PEATE nos roedores, com a presença de 5 ondas absolutas na intensidade de 90dBNA e a pesquisa de limiar elucidou presença da onda II até a intensidade de 40dBNA, com ausência na intensidade de 30dBNA.

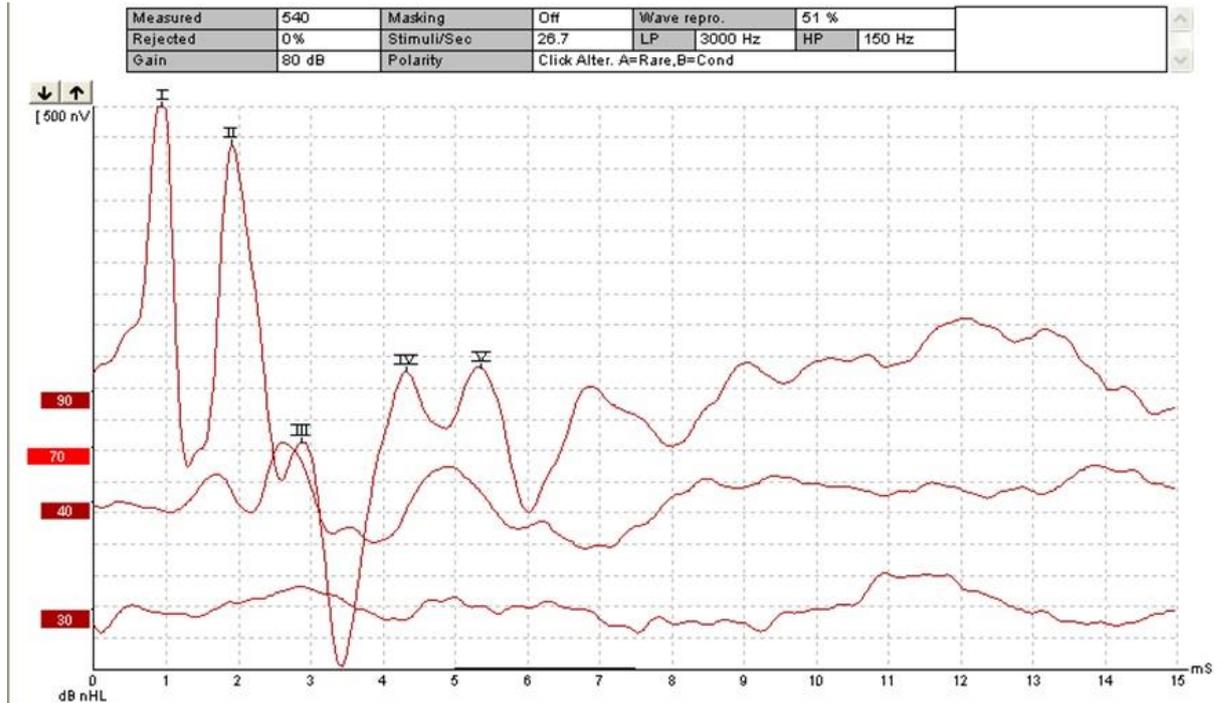


Figura 26. Exemplo de um traçado do PEATE de um roedor do grupo PMHG com 30 DPN, na orelha direita, na intensidade de 90 dBNA com a marcação das ondas I a V e; a 40 dBNA, com presença de ondas II e IV.

A análise estatística demonstrou que os valores da latência da OD e OE foram semelhantes entre si, e o teste *Mixed ANOVA* elucidou que não há interação entre as orelhas. Portanto os valores das latências absolutas e interpicos não diferem entre os lados com $p > 0,05$ (Figura 27).

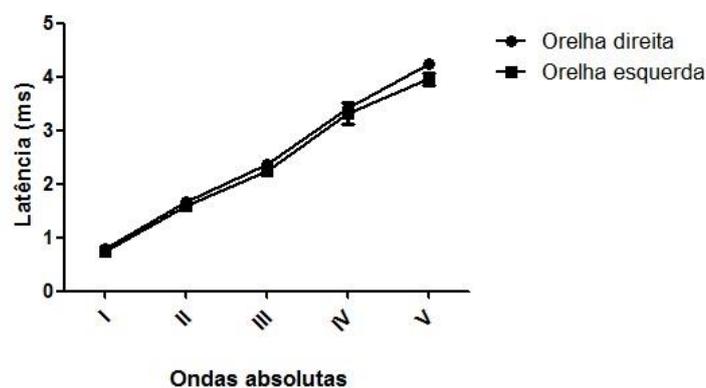


Figura 27. Efeito das orelhas no estudo experimental com a indução do hipotireoidismo gestacional e até a lactação nas latências absolutas I a V, na intensidade de 90dBNA ao longo da testagem. Análise estatística: *Mixed ANOVA*. Valores expressos com média marginal (\pm SEM). dBNA: decibel nível de audição, ms: milissegundos.

Na análise dos resultados, na Figura 28 (Tabela 11) tem-se a variação da latência das ondas I a V nos grupos experimentais. Os dados revelaram não haver efeito principal dos grupos experimentais [$F(4;5,697) = 0,337$, $p = 0,844$], portanto na comparação das latências dos grupos induzidos ao hipotireoidismo com o grupo PME não foi possível observar diferença entre as latências absolutas.

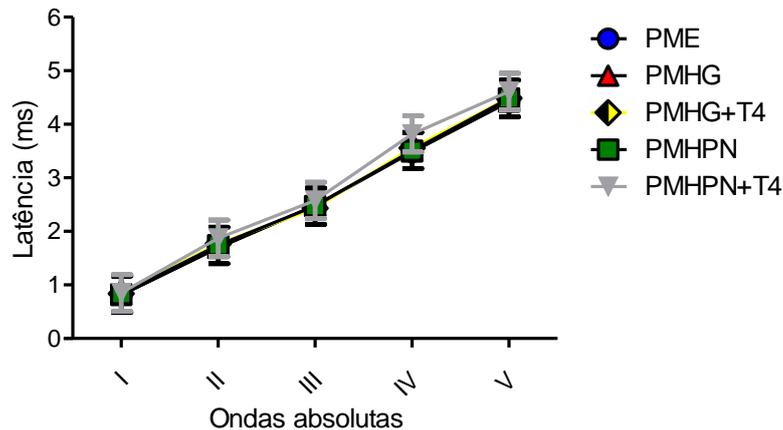


Figura 28. Efeito experimental da indução do hipotireoidismo gestacional e até a lactação na latência das ondas absolutas de I a V do PEATE, na intensidade de 90 dBNA na prole ao longo da testagem (n=18 PME), (n=10 PMHG), (n=10 PMHG+T4), (n=6 PMHPN) e (n=3 PMHPN+T4). Análise estatística: *Mixed ANOVA*. Valores expressos com média marginal (\pm SEM). PME: Prole de ratas de mães eutiroidianas, PMHG: Prole de ratas de mães hipotiroídianas induzidas no período gestacional, PMHG+T4: Prole de ratas de mães hipotiroídianas induzidas no período gestacional com administração de T4, PMHPN: Prole de ratas de mães hipotiroídianas induzidas até a lactação, PMHPN+T4: Prole de ratas de mães hipotiroídianas induzidas até a lactação com administração de T4, PEATE: Potencial evocado auditivo de tronco encefálico, dBNA: decibel nível de audição, ms: milissegundos.

Tabela 11. Efeito experimental da indução do hipotireoidismo gestacional e até a lactação na latência absoluta das ondas I a V. Valores expressos com média marginal (\pm SEM).

	PME	PMHG	PMHG+T4	PMHPN	PMHPN+T4
Ondas absolutas	Média (ms) (\pm SEM)				
I	0,81 (\pm 0,15)	0,81 (\pm 0,24)	0,84 (\pm 0,24)	0,83 (\pm 0,34)	0,85 (\pm 0,34)
II	1,70 (\pm 0,15)	1,69 (\pm 0,24)	1,77 (\pm 0,24)	1,74 (\pm 0,34)	1,87 (\pm 0,34)
III	2,47 (\pm 0,15)	2,47 (\pm 0,24)	2,43 (\pm 0,24)	2,47 (\pm 0,34)	2,58 (\pm 0,34)
IV	3,48 (\pm 0,15)	3,48 (\pm 0,24)	3,56 (\pm 0,24)	3,51 (\pm 0,34)	3,82 (\pm 0,34)
V	4,41 (\pm 0,15)	4,41 (\pm 0,24)	4,49 (\pm 0,24)	4,48 (\pm 0,34)	3,61 (\pm 0,34)

Na Figura 29 (Tabela 12) tem-se a latência das ondas absolutas em função do fator tempo. O resultado do *Mixed ANOVA* revelou haver efeito principal do fator tempo [$F(3;15,932) = 72,050$, $P = 0,000$]. O *Tukey HSD post hoc* revelou diferença significativa de 60 a 120DPN quando comparados a 30PN com $p = 0,000$. Observa-se que ao longo do tempo, há um aumento da latência das ondas absolutas, quando comparadas a idade de 30DPN.

Na interação dos fatores tempo e grupos experimentais, o teste revelou dados não significativos [F (12; 14,361) =0,933, P=0,543].

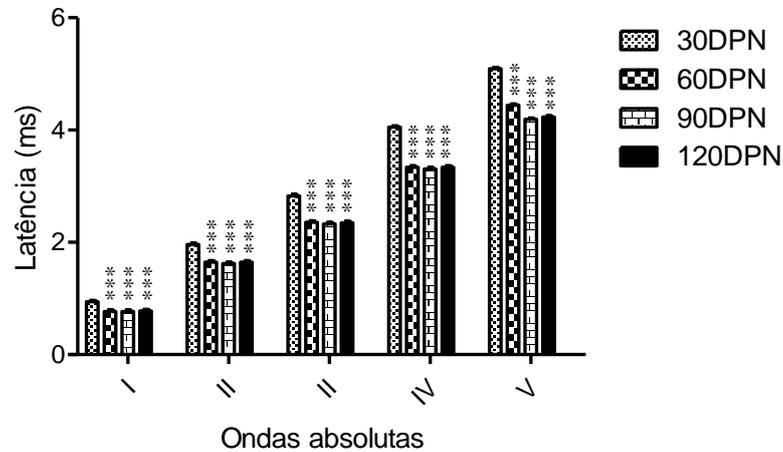


Figura 29. Efeito experimental da indução do hipotireoidismo em função do fator tempo na latência das ondas absolutas de I a V no PEATE, na intensidade de 90dBNA da prole com 30, 60, 90 e 120DPN (n=18/18/16/15 PME), (n=10/10/9/9PMHG), (n=10/10/7/7PMHG+T4), (n=6/6/6/5PMHPN) e (n=3/3/3/3PMHPN+T4) respectivamente, do fator tempo. Análise estatística: Mixed ANOVA seguida por Tukey HSD post hoc. Valores expressos com média marginal (\pm SEM) (***) $p < 0,001$ quando comparados a 30DPN.PME: Prole de ratas de mães eutiroidianas, PMHG: Prole de ratas de mães hipotiroidianas induzidas no período gestacional, PMHG+T4: Prole de ratas de mães hipotiroidianas induzidas no período gestacional com administração de T4, PMHPN: Prole de ratas de mães hipotiroidianas induzidas até a lactação, PMHPN+T4: Prole de ratas de mães hipotiroidianas induzidas até a lactação com administração de T4, DPN: dias pós-natal, PEATE: Potencial evocado auditivo de tronco encefálico, dBNA: decibel nível de audição, ms: milissegundos.

Tabela 12. Efeito experimental da indução do hipotireoidismo gestacional e até a lactação na latência das ondas absolutas de I a V no PEATE. Valores expressos com média marginal (\pm SEM)

Ondas absolutas	30DPN Média (ms) (\pm SEM)	60DPN Média (ms) (\pm SEM)	90DPN Média (ms) (\pm SEM)	120DPN Média (ms) (\pm SEM)
I	0,94 (\pm 0,07)	0,77 (\pm 0,07)	0,77 (\pm 0,07)	0,78 (\pm 0,07)
II	1,96 (\pm 0,07)	1,65 (\pm 0,07)	1,62 (\pm 0,07)	1,65 (\pm 0,07)
III	2,83 (\pm 0,07)	2,36 (\pm 0,07)	2,33 (\pm 0,07)	2,35 (\pm 0,07)
IV	4,05 (\pm 0,07)	3,34 (\pm 0,07)	3,31 (\pm 0,07)	3,34 (\pm 0,07)
V	5,09 (\pm 0,07)	4,44 (\pm 0,07)	4,19 (\pm 0,07)	4,23 (\pm 0,07)

Na Figura 30 (Tabela 13) tem-se a latência interpico (I-III, III-V e I-V) na intensidade de 90dBNA dos grupos experimentais ao longo da testagem. Os resultados demonstraram ausência de dados significativos no teste *Mixed ANOVA* [F (16;24,9) = 0,355, $p=0,982$], uma vez que as latências interpicos se comportam de forma semelhante entre os grupos quando comparados ao grupo PME

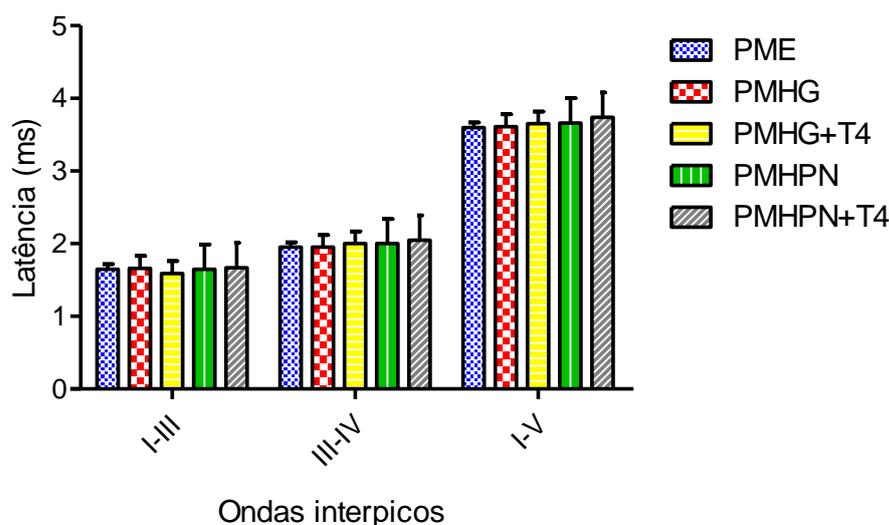


Figura 30. Efeito experimental da indução do hipotireoidismo gestacional e até a lactação na latência interpico I-III, III-V e I-V do PEATE, na intensidade de 90dBNA da prole (n=18 PME), (n=10 PMHG), (n=10 PMHG+T4), (n =6 PMHPN) e (n =3 PMHPN+T4). Análise estatística: Mixed ANOVA. Valores expressos com média marginal (\pm SEM). PME: Prole de ratas de mães eutiroidianas, PMHG: Prole de ratas de mães hipotiroídianas induzidas no período gestacional, PMHG+T4: Prole de ratas de mães hipotiroídianas induzidas no período gestacional com administração de T4, PMHPN: Prole de ratas de mães hipotiroídianas induzidas até a lactação, PMHPN+T4: Prole de ratas de mães hipotiroídianas induzidas até a lactação com administração de T4, PEATE: Potencial evocado auditivo de tronco encefálico, dBNA: decibel nível de audição, ms: milissegundos.

Tabela 13. Efeito experimental do hipotireoidismo gestacional e até a lactação na latência interpico I-III, III-V e I-V do PEATE ao longo da testagem. Valores expressos com média marginal (\pm SEM)

	PME	PMHG	PMHG+T4	PMHPN	PMHPN+T4
Ondas Interpicos	Média (ms) (\pm SEM)				
I-III	1,65 (\pm 0,15)	1,66 (\pm 0,24)	1,59 (\pm 0,24)	1,65 (\pm 0,34)	1,67 (\pm 0,34)
III-V	1,95 (\pm 0,15)	1,95 (\pm 0,24)	2,00 (\pm 0,24)	2,00 (\pm 0,34)	2,05 (\pm 0,34)
I-V	3,60 (\pm 0,15)	3,61 (\pm 0,24)	3,65 (\pm 0,24)	3,66 (\pm 0,34)	3,74 (\pm 0,34)

Na pesquisa do nível mínimo de resposta observou-se com o *Mixed ANOVA* presença de efeito principal do fator grupo experimental [$F(1;2.383) = 18.564$, $p=0.036$] e o Tukey HSD *post hoc* revelou diferença significativa dos grupos HG e lactação quando comparados com o grupo PME ($p=0,000$).

A mínima intensidade pesquisada foi de 20dBNA e foi constatado presença de onda II em 90,2% dos ratos do grupo PME. Os grupos experimentais gestacionais (PMHG e PMHG+T4) apresentaram perda auditiva sendo caracterizada por alteração de grau leve (24,4% versus 22,1%), porém não foi possível constatar que a reposição hormonal com T4 propiciou melhoria nos limiares eletrofisiológicos destes animais. Os grupos lactação (PMHPN e PMHPN+T4) apresentaram quase que na sua totalidade perda auditiva moderada

(41,3% versus 33,3%) e perda auditiva de grau severo (28,9% versus 41,6%), sendo que o T4 também não reverteu o quadro de hipotireoidismo. Os dados estão ilustrados na Figura 31.

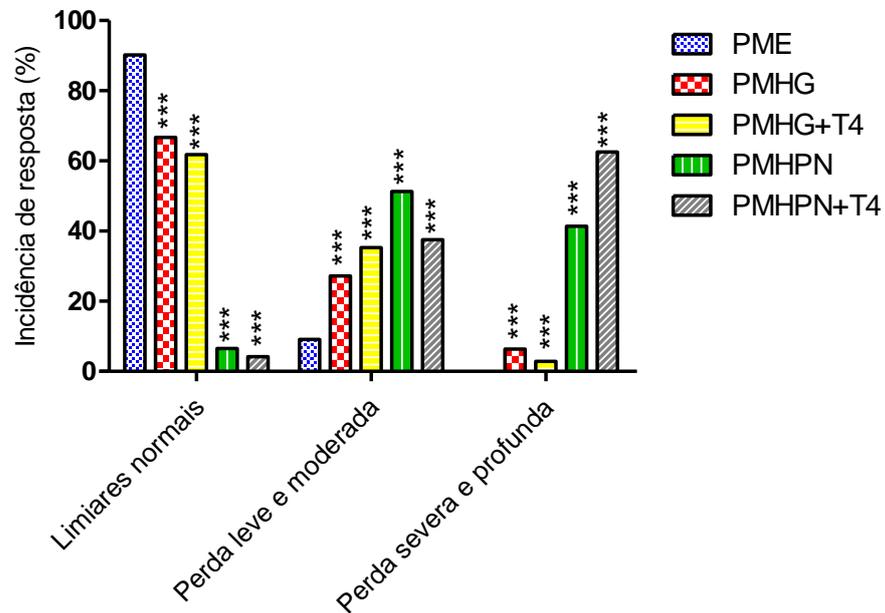


Figura 31. Efeito experimental do hipotireoidismo gestacional e até a lactação no nível mínimo de resposta do PEATE da prole (n =18 PME), (n =10 PMHG), (n =10 PMHG+T4), (n =6 PMHPN) e (n =3 PMHPN+T4) ao longo da testagem. Análise estatística: Mixed ANOVA seguida por Tukey HSD post hoc. Valores expressos em porcentagem (***) p< 0,001 quando comparados ao grupo PME. PMHG: Prole de ratas de mães hipotiroídianas induzidas no período gestacional, PMHG+T4: Prole de ratas de mães hipotiroídianas induzidas no período gestacional com administração de T4, PMHPN: Prole de ratas de mães hipotiroídianas induzidas até a lactação, PMHPN+T4: Prole de ratas de mães hipotiroídianas induzidas até a lactação com administração de T4, PEATE: Potencial evocado auditivo de tronco encefálico.

7. DISCUSSÃO

Os hormônios tireoidianos no período gestacional atuam na formação e desenvolvimento do órgão da audição, visto que a presente pesquisa após a indução do hipotireoidismo com a administração de MTZ às fêmeas prenhes, foi caracterizada por alterações nas respostas fisiológicas do sistema auditivo da prole.

A literatura reporta o uso de algumas drogas indutoras da disfunção tireoidiana como o PTU (DEOL, 1973; UZIEL; RABIE; MAROT, 1980; UZIEL et al., 1983a, 1983b; PRIETO; RUEDA; MERCHAN, 1990; GOLDEY et al., 1995b) e o Aroclor 1254 (GOLDEY et al., 1995a; LASKY et al., 2002). Neste estudo, entretanto, utilizou-se o MTZ, por ter sido previamente utilizada para o estudo da função auditiva relacionado ao hipotireoidismo (KNIPPER et al., 1999, 2001; WINTER et al., 2007; AHMED et al., 2012; ALBORNOZ et al., 2013; ALVES et al., 2013; GAUJAC, 2013; SZARAMA et al., 2013; WADA; YUMOTO; ISO, 2013).

A concentração utilizada do MTZ foi de 0,02% na água de beber. Achados na literatura evidenciam que o MTZ é capaz de reduzir as concentrações plasmáticas dos HT pela inibição da TPO e bloqueio da formação de iodotironinas (AHMED et al., 2012; SZARAMA et al., 2013; WADA; YUMOTO; ISO, 2013).

Nosso laboratório tem estudado a disfunção tireoidiana e sua relação com os diferentes órgãos e tecidos dos ratos, de modo que, o protocolo adotado havia sido utilizado e publicado, com indução do 9ºDG até o parto, aproximadamente até o 20ºDG (ALVES et al., 2013). Estudos posteriores, na mesma linha de pesquisa, também mostraram que a indução propiciou redução das concentrações séricas de T3 e T4 das ratas gestantes (ALVES et al., 2013; GAUJAC, 2013), o que corrobora a condição de hipotireoidismo durante o período gestacional utilizada neste estudo. Outros estudos também confirmam o hipotireoidismo materno após a administração de MTZ por um período mínimo de 7 a 10 dias consecutivos, levando a redução da concentração dos HT no plasma materno de ratas (CALVO et al., 1990; HASEBE et al., 2008; AHMED et al., 2012).

Outro fator que evidencia que o protocolo de indução do hipotireoidismo foi realizado com o sucesso são os valores da massa corporal da prole. Dados estatísticos evidenciaram diminuição do peso dos animais, principalmente para o grupo PMHPN, quando comparados ao grupo PME. Estudiosos fazem a relação da diminuição da massa corpórea ao hipotireoidismo, sendo este um sinal clássico da disfunção tireoidiana (GOLDEY et al., 1995a, 1995b; KOBAYASHI et al., 2014; SEDAGHAT et al., 2015)

A indução do hipotireoidismo até a lactação, diminuem em 10% da massa corporal da prole desde o 1ºDPN, sendo que este déficit de massa perdura até a vida adulta (GOLDEY et al., 1995a). Os autores também relatam alteração do peso corporal dos animais induzidos com PTU do nascimento até a idade de 60DPN (SEDAGHAT et al., 2015). GOLDEY et al. (1995b) ainda elucidam que, quanto maior a dose e o tempo de administração da droga, menor é a massa corporal dos animais.

Em contraposição, um estudo com o uso de PTU até a lactação, revelou alteração da massa corporal nos primeiros dias de vida, que se estendeu até o 21ºDPN, entretanto, foi restabelecida na 26ª semana pós-natal (KOBAYASHI et al., 2014).

Com relação ao grupo PMHPN+T4, os testes estatísticos (Tukey HSD post hoc) não caracterizaram redução significativa da massa corporal da prole quando comparado ao grupo PME. Podemos inferir que, talvez, a administração de T4 tenha revertido o quadro hipotireoidiano no que diz respeito a massa corporal dos animais.

O presente estudo, em relação ao estudo do modelo do HG buscou elucidar a repercussão dos HT no sistema auditivo na formação do órgão frente a disfunção tireoidiana materna. Sabe-se da importância da atuação dos HT no período de formação do sistema auditivo, que ocorre ainda no útero, uma vez que, neste período, o feto é dependente dos HT maternos (MELSE-BOONSTRA; MACKENZIE, 2013).

Há uma grande variabilidade quanto ao período de indução do hipotireoidismo. A maioria dos autores estudam o processo de formação e desenvolvimento do órgão da audição pós nascimento. Geralmente a indução ocorre a partir do 17ºDG até o 40ºDPN (UZIEL et al., 1983a, 1983b, KNIPPER et al., 2000, 2001; WEBER et al., 2002). Existem ainda estudos que fazem a indução a partir do 15ºDG (WADA; YUMOTO; ISO, 2013), 16ºDG (SZARAMA et al., 2013) e 18ºDG (UZIEL; RABIE; MAROT, 1980; GOLDEY et al., 1995b). A presente pesquisa fez a indução a partir do 9ºDG, sendo que apenas três pesquisas foram as que mais se aproximaram a data da presente pesquisa: 6ºDG (GOLDEY et al., 1995a), 8ºDG (KNIPPER et al., 2000) e 10ºDG (DEOL, 1973), porém todos os estudos estendem a indução até o período pós natal, como foi realizado no nosso grupo PMHPN.

É sabido que na espécie humana, todo o processo de formação e desenvolvimento do órgão da audição ocorre no período intrauterino, uma vez que as células ciliadas e de suporte dos mamíferos se proliferam no epitélio sensorial principalmente entre o 13º e 15º semana gestacional e cessam ao nascimento. O órgão da audição está praticamente pronto na 29ª semana de gestação (RUBEN, 1967). Nos ratos, o processo de formação do sistema auditivo se inicia no período gestacional, porém o desenvolvimento do órgão, como por exemplo a

diferenciação das células ciliadas ocorre após o nascimento (GEAL-DOR et al., 1993; FREEMAN et al., 1999; BRYANT; GOODYEAR; RICHARDSON, 2002)

Para formação do grupo PMHPN, o MTZ foi administrado no período compreendido entre o 9ºDG ao 15ºDPN. A literatura reporta que a indução da disfunção tireoidiana, estendida a lactação, reduz significativamente os níveis dos HT da prole pós indução, o que mimetiza o HC (KNIPPER et al., 2000; WADA; YUMOTO; ISO, 2013). Estudo com administração de PMHG a partir do 17ºDG até o 28ºDPN, constatou uma diminuição da quantidade de T4 sérico na prole em dois ou três dias e do T3 em três a quatro dias, o que interferiu negativamente na maturação da cóclea (KNIPPER et al., 1999).

No presente estudo, o máximo de tempo de indução do hipotireoidismo, com maior sobrevivência materna foi de 15DPN. Inicialmente, a indução foi realizada até 21DPN, porém os animais (mães e filhotes) não sobreviveram, sendo que com 15DPN foi a idade em que obtivemos maior número de animais vivos. Há relatos na literatura que a indução ocorre até 40ºDPN (KNIPPER et al., 2000).

Na presente pesquisa, além dos grupos hipotireoidianos, também foram formados dois grupos com administração concomitante de MTZ e T4 (PMHG+T4 e PMHPN+T4). A dose diária de levotiroxina foi estimada em 50 µg/100 mL na água de beber, porém observou-se que não houve melhoria dos achados audiológicos. Estudos com dosagem maior associada ao uso de PTU foi capaz de reverter o quadro de alterações no sistema auditivo (DEOL, 1973).

7.1 Timpanometria

Os grupos induzidos ao hipotireoidismo apresentaram redução significativa dos valores de compliância, porém estes valores estavam dentro dos padrões de normalidade, ou seja, acima de 0,3mL. Tal dado evidencia preservação da funcionalidade da OM nas idades estudadas (30 a 120DPN), o que nos permite inferir ausência de disfunção de OM.

Desta maneira, os valores de compliância variaram de 0,41 a 0,66mL em todos os grupos, inclusive PME, sendo que estes dados estão em consonância com a literatura pesquisada, que relata normalidade da função da OM (GEAL-DOR; KHVOLES; SOHMER, 1997; ZHENG et al., 2007). Estudos com ratos reportam valores de 0,38 a 0,45mL (GEAL-DOR; KHVOLES; SOHMER, 1997) e valores médios de 0,40mL em camundongos (ZHENG et al., 2007). Estes estudos não indicaram rigidez do sistema tímpano ossicular com valores de compliância acima de 0,3mL, porém vale ressaltar a escassez de dados na literatura referente a esta temática.

Na análise da compliância em relação ao fator idade, foi possível caracterizar uma redução significativa entre as idades, sendo que os valores com a idade de 120DPN foram significativamente menores que os de 30DPN. Os achados nos permitem inferir que os ratos da presente pesquisa podem ter alteração precoce de OM, uma vez que o estudo foi realizado até 120DPN. Talvez em idades mais avançadas, a interação com o tempo evidencie curvas timpanométricas com maior rigidez do sistema ossicular, o que pode representar menor funcionalidade da OM. Zheng et al. (2007) elucidaram que a diminuição da compliância em relação a idade é esperada, uma vez que ao longo do tempo há uma tendência de a membrana timpânica ficar mais rígida. Em discordância com nossos achados, outro estudo não encontrou diminuição significativa da compliância nas idades de 16 e 24 meses de ratos albinos quando comparada ao de 3 meses (BIELEFELD et al., 2008).

Na relação da compliância com os grupos experimentais verificou-se que o grupo PME apresentou maior compliância que aos demais grupos. Nos grupos com disfunção tireoidiana, o PMHPN apresentou menor compliância quando comparado ao PMHG e PME. Os animais do grupo PMHPN apresentaram valores inferiores aos demais grupos, porém foram maiores iguais a 0,36 mL, o que elucida ausência de rigidez do sistema timpano ossicular (GEAL-DOR; KHVOLES; SOHMER, 1997; ZHENG et al., 2007).

Em contrapartida, existem achados na literatura que apontam que os receptores dos HT, especificamente $TR\alpha 1$ e $TR\beta$, podem influenciar na formação e desenvolvimento da OM. A ação desses hormônios depende de seus receptores para que induzam o crescimento dos ossículos e da cavidade da OM. Alteração na expressão destes receptores levam a hipofunção tireoidiana com consequente imaturidade e alteração no tamanho dos ossículos, o que propicia, disfunção na OM, como exemplo presença de otite média (CORDAS et al., 2012). Ressalta-se que este achado não foi evidenciado na presente pesquisa, uma vez que a funcionalidade da OM estava dentro dos limites aceitáveis como normais (GEAL-DOR; KHVOLES; SOHMER, 1997; ZHENG et al., 2007).

A literatura ainda reporta que, até o 24ºDPN, pode ser observada alteração de OM nos animais sob influência do hipotireoidismo no período gestacional, sendo que é comum apresentarem presença de um líquido gelatinoso, que tende a desaparecer entre o 21º e 24ºDPN. É importante ressaltar que no presente estudo não foi encontrado este tipo de influência nas idades sob teste (30, 60 90 e 120DPN), confirmando que a partir do 30ºDPN há ausência de líquido gelatinoso nos ratos (UZIEL; RABIE; MAROT, 1980).

Na análise da pressão da compliância, a presente pesquisa caracterizou-se por valores negativos para todos os grupos experimentais, estatisticamente, sem efeito positivo dos

fatores de variância, e corrobora com os estudos (GEAL-DOR; KHVOLES; SOHMER, 1997; ZHENG et al., 2007; BIELEFELD et al., 2008).

Observa-se que há uma escassez de estudos na literatura que relacionam o hipotireoidismo a OM (UZIEL; RABIE; MAROT, 1980; CORDAS et al., 2012). Talvez este fator seja decorrente da íntima relação da hipofunção tireoidiana com alterações no Órgão de Corti, especificamente as células ciliadas (JOHNSON et al., 2014).

7.2 Emissões otoacústicas por produto de distorção

Estudos que envolvem animais para avaliação da função auditiva baseiam-se no uso do exame de EOAPD (KNIPPER et al., 2000; LASKY et al., 2002; FREITAS et al., 2009; MUSTAPHA et al., 2009; NG et al., 2009; BAYINDIR et al., 2013; KARLI; GUL, 2013; DETTLING et al., 2014). Todos os estudos que envolvem otoemissões acústicas, com ratos/camundongos, são realizadas com as EOAPD de altas frequências, e a presente pesquisa foi realizada nas frequências de 2 a 12kHz. Na literatura, observou-se que as altas frequências estudadas são as de 9,5 kHz (BAYINDIR et al., 2013), 20 kHz (KNIPPER et al., 2000; LASKY et al., 2002; DETTLING et al., 2014), 30kHz (MUSTAPHA et al., 2009) e 32kHz (BAYINDIR et al., 2013). A literatura relata que o estudo das altas frequências permite compreender melhor o funcionamento do sistema auditivo dos ratos, posto que a audição deles é ultrassônica (PORTFORS, 2007; BRUDZYNSKI, 2009).

A faixa de frequência de audição dos humanos é de 20 a 20kHz e nos ratos esta faixa se estende até 50kHz porque a comunicação é efetivada por meio da vocalização ultrassônica. A literatura reporta que existem dois tipos de vocalizações, a de 22kHz, relacionada a comunicação frente a situações aversivas; e a de 50kHz, ligada ao prazer (PORTFORS, 2007; BRUDZYNSKI, 2009). Paralelo a esta informação, observou-se na presente pesquisa a ausência de repostas na frequência de 2kHz, a qual é considerada uma frequência com pouca ou quase nenhuma importância aos roedores (HEFFNER; KOAY; HEFFNER, 2001).

Outra vertente, a mais importante, a qual explicita ausência de resposta na frequência de 2kHz pode estar ligada aos aspectos biofísicos do órgão da audição dos ratos. A movimentação das CCE nas frequências abaixo de 3kHz gera como resposta, bandas quase que verticais, o que propicia o surgimento de propriedades de reflexão. Conseqüentemente não são capazes de originar o componente de distorção, evidenciando ausência de EOAPD na frequência de 2kHz (MARTIN et al., 2011).

Além disto, a dimensão do CAE dos mamíferos de pequeno porte como os ratos, tem tamanho reduzido (HEMILÄ; NUMMELA; REUTER, 1995), o que pode favorecer o surgimento de bandas verticais nas baixas frequências. Ademais, as respostas que são geradas coincidem com o ruído captado pelo equipamento, que em associação à reflexão, não são capazes de originar o produto de distorção nas frequências graves (HYPPOLITO et al., 2005).

Diante do exposto, os achados na presente pesquisa corroboram os da literatura vigente, uma vez que estudos que envolvem as EOAPD em roedores relatam presença de respostas nas frequências \geq a 3kHz (LASKY et al., 2002; BAYINDIR et al., 2013; KARLI; GUL, 2013).

Na análise geral das frequências estudadas, observou-se que as frequências de 8 e 12kHz apresentaram maiores valores de amplitude, quando comparadas com as demais frequências sob teste (2 a 6 kHz). O grupo PME apresentou valores mais altos para 12 kHz e o grupo gestacional experimental foi caracterizado por uma amplitude maior para a frequência de 8 kHz, em contrapartida, o grupo lactação apresentou ausência de respostas em todas as frequências. Achados na literatura evidenciaram que, em geral, a frequência de 8kHz é considerada a frequência com maior amplitude (HEFFNER; KOAY; HEFFNER, 2001; KARLI; GUL, 2013), porém há estudos que evidenciam que a melhor resposta pode ser detectada na frequência de 9kHz (BAYINDIR et al., 2013). Diante do exposto, observa-se um consenso na literatura que a amplitude é mais elevada nas frequências mais altas, a partir de 8kHz, sendo este dado presente na atual pesquisa.

Na análise da amplitude, os dados revelaram ser estatisticamente significativos para as frequências \geq 6 kHz para os grupos hipotireoidianos, quando comparados ao grupo PME. Os estudos mimetizam o HC ao invés do HG, e todos relataram amplitude reduzida, e até mesmo ausência de resposta na EOAPD (KNIPPER et al., 2000; LASKY et al., 2002; WINTER et al., 2009; FANG et al., 2012; DETTLING et al., 2014). É consenso na literatura que quanto maior a falta de HT durante o período perinatal, maior a redução da amplitude das EOAPD (KNIPPER et al., 2000).

No que tange aos grupos tratados com levotiroxina (PMH+T4 e PMHPN+T4) a análise estatística revelou que não houve efeito da administração da droga na amplitude de resposta das EOAPD. O estudo de DEOL (1973) com camundongos induziu a hipofunção tireoidiana com 0,01 % de PTU, sendo que o T4 foi administrado concomitantemente ao PTU na dose de 90 μ g/100 mL, na água de beber. Os achados evidenciaram poucas anormalidades histológicas no Órgão de Corti e estruturas correlatas quando administrado no período pós-

natal. Em contrapartida, no período gestacional, os animais apresentaram desenvolvimento histológico auditivo normal.

Existem vários fatores que podem interferir na diminuição da amplitude da resposta, porém é importante levar em consideração que a literatura inicia a indução da hipofunção tireoidiana, na sua maioria, a partir do 17ºDG (UZIEL et al., 1983a, 1983b, KNIPPER et al., 2000, 2001; WEBER et al., 2002). Entretanto, estudo de Knipper et al. (2000), realizaram a indução do 3º ao 17ºDG e não observaram alteração na amplitude de resposta. Porém, com a indução do 17ºDG ao 10ºDPN, observaram diminuição da amplitude das EOAPD. Sabe-se que a glândula tireoideia fetal não é funcional durante o período gestacional quase que na sua totalidade, sendo que inicia a produção de HT entre o 18º ao 21ºDG (FELDMAN; VAZQUEZ; KURTZ, 1961). A interrupção da indução do hipotireoidismo no dia do parto (PMHG), na presente pesquisa, revelou diminuição da amplitude das freqüências da DPOAE observada em descendentes adultos. Este fator pode, muito provavelmente ser devido à falta de HT maternos até o final da gestação, quando órgão de Corti e CCE estão em período crítico de desenvolvimento, principalmente em torno do 12,5º DG (BRYANT; GOODYEAR; RICHARDSON, 2002). Além disto, o estudo de Knipper et al (2000) ainda nos leva a crer que a janela do 17ºDG ao dia do parto, é extremamente importante para o desenvolvimento do órgão da audição, uma vez que foi detectada alteração na amplitude na presente pesquisa.

Dentre os fatores que podem levar a diminuição da amplitude estão: alteração morfológica da cóclea, diminuição da expressão da proteína prestina, do KCNQ4, do fgfr3, da diminuição D2, bem como baixo nível de glicogênio (DEOL, 1973; PRIETO; RUEDA; MERCHAN, 1990; WEBER et al., 2002; WINTER et al., 2007; MUSTAPHA et al., 2009; SZARAMA et al., 2013; DETTLING et al., 2014).

Além disto a diminuição do canal de potássio KCNQ4 também pode ter levado a redução da amplitude de resposta das CCE (WINTER et al., 2006, 2007; MUSTAPHA et al., 2009).

Uma das vertentes que explica ausência de resposta nos grupos PMHPN relata que há aumento do canal BK, que por sua vez inibe a eletromotilidade de resposta das CCE (DETLING et al., 2014). A ação destes canais nas CCE ainda é pouco conhecida, porém a deleção dos canais iônicos pode levar a degeneração das CCE, com atraso na distribuição do Cav1.3 (WINTER et al., 2007).

A maior repercussão se dá no grupo perinatal devido a diminuição do glicogênio, o qual atua na movimentação contrátil das CCE e sua diminuição altera a atividade dos neurônios eferentes destas células (PRIETO; RUEDA; MERCHAN, 1990). Esta é mais uma

das vertentes que pode explicar a alteração na amplitude nas EOAPD no grupo PMHPN do presente estudo. Porém, nenhum estudo faz a relação da diminuição do glicogênio com indução do hipotireoidismo apenas no período gestacional.

Na análise do grupo PMHPN, induzido até o 15º DPN, observou-se que os roedores apresentaram ausência de respostas das CCE, caracterizado por amplitude menor que 3dBNPS na EOAPD. Estudos evidenciam que quanto maior a dose e o tempo de administração da substância química para a indução do hipotireoidismo, maiores são as repercussões no sistema auditivo (DEOL, 1973; GOLDEY et al., 1995b; WEBER et al., 2002).

A ausência de resposta nas EOAPD no grupo PMHPN pode ser decorrente das inúmeras alterações morfológicas causadas pelo hipotireoidismo, no que diz respeito ao processo de formação e desenvolvimento do órgão da audição, como descrito anteriormente. Autores relatam malformação da membrana tectorial, diminuição do potencial endococlear e atraso na diferenciação do epitélio sensorial (RUSCH et al., 2001; WEBER et al., 2002; SENDIN et al., 2007; WINTER et al., 2007).

Além das alterações histológicas, os autores descreveram a ocorrência de distribuição imatura da proteína prestina (WEBER et al., 2002). Ausência da condutância do KCNQ4 e do potencial endococlear, expresso pelo BK (RUSCH et al., 2001; WINTER et al., 2007). Estes fatores contribuem para a ausência de respostas nas EOAPD no grupo perinatal

Estudos na literatura também observaram ausência de resposta das EOAPD, como ocorreu na presente pesquisa no grupo PMHPN. Knipper et al (2000) induziram o hipotireoidismo do 17ºDG ao 10ºDPN e constataram que as CCE não foram capazes de realizar a transdução eletromecânica e mecanoelétrica bem como a formação do potencial endococlear.

A literatura reporta que o hipotireoidismo gera alteração estritamente coclear o que leva a alterações no exame de EOAPD, dados que corroboram com a presente pesquisa (LASKY et al., 2002; DETTLING et al., 2014).

Considerando os resultados das EOAPD, ao longo das idades, observou-se que a amplitude de todos os grupos de estudo é menor aos 120 DPN. Tal fato pode ser explicado pelo processo de envelhecimento do órgão de Corti, mais especificamente das células ciliadas, as quais tem um declínio do potencial regenerativo com a idade e sofrem influência de alguns fatores como: regulação epigenética, micro RNA, redundância de genes inibidores da quinase (CDKN) e comprimento dos telômeros, bem como da atividade da telomerase (WALTERS;

ZUO, 2013). Além disto, a literatura também cita degeneração citoestrutural do órgão de Corti, que pode ser decorrente do stress oxidativo (WONG; RYAN, 2015).

7.3 Potencial evocado auditivo de tronco encefálico

A presente pesquisa está em consonância com os achados da literatura, sendo que foi possível a captação de respostas com presença das ondas I a V, com o uso do clique produzido com pulso monofásico de 100 μ s de duração (LASKY et al., 2002; LEGATT, 2015). Há estudos que fazem uso do tom puro para evocar a resposta e as frequências avaliadas são mais altas: 8 a 32 kHz (RUSCH et al., 2001; SPRENKLE et al., 2001b; NG et al., 2004, 2009; ALVARADO et al., 2012; JOHNSON et al., 2014)

Na presente pesquisa, foi possível identificar a presença das cinco ondas (I a V), portanto os parâmetros para análise foram as latências absolutas. A literatura também reporta presença das cinco ondas (FREITAS et al., 2009; MURASHIMA, 2013), embora alguns estudos relatem a presença apenas de quatro ondas (OLIVEIRA; DEL VECCHI; MARSEILLAN, 1983; SPRENKLE et al., 2001a; FARAHANI et al., 2015).

Na análise da integridade das vias auditiva da presente pesquisa, todos os grupos apresentaram integridade das vias auditivas, uma vez que as latências das ondas absolutas foram semelhantes entre si e dentro da normalidade como preconizado por Alvarado et al. (2012).

Na pesquisa das ondas I a V verificou-se que a média dos valores absolutos de todos os grupos, para estas ondas foi: 0,87 ms (onda I), 1,85 ms (onda II), 2,53 ms (onda III), 3,64 ms (onda IV) e 4,46 ms (onda V), porém são poucos estudos que reportam os valores das latências absolutas das ondas. No que tange a onda I, a literatura elucida que ela pode ser captada em torno de 1,0 ms corroborando nosso estudo (UZIEL et al., 1983a; LASKY et al., 2002), em contrapartida há estudos que relatam valores entre 1,43 a 2,11ms para a onda I (OLIVEIRA; DEL VECCHI; MARSEILLAN, 1983; FARAHANI et al., 2015). A onda II, segundo a literatura vigente, pode ser captada entre 2,40 a 2,54ms (OLIVEIRA; DEL VECCHI; MARSEILLAN, 1983; LASKY et al., 2002), valores que diferem da nossa pesquisa. As ondas III e IV foram semelhantes ao estudo de Oliveira; Del Vecchi; Marseillan (1983) e diferem da pesquisa de Farahani et al., (2015).

Observa-se, um aumento das ondas absolutas do PEATE em humanos quando comparadas aos ratos. Nos humanos, os valores para as ondas I, III e V são 1,69 ms, 3,82 ms e 5,59ms respectivamente (ESTEVES et al., 2009). A diferença da latência entre os roedores e

humanos é de aproximadamente 1ms, este fato pode ser decorrente da visível diferença anatômica do tamanho da cabeça e do órgão da audição dos ratos, uma vez que a distância que o estímulo sonoro percorre da OE até o TE é menor (ALBUQUERQUE et al., 2009).

Não foram observadas alterações na latência das ondas absolutas e interpicas de todos os grupos sob teste, sendo que foram semelhantes entre si. A latência do grupo PME foi igual aos grupos PMHG e PMHPN em todas as idades, portanto não há alteração na integridade das vias auditivas (SOUZA et al., 2008; LEGATT, 2015; DAVIES, 2016). Tal dado corrobora com a literatura, as quais mencionam alteração coclear e não retrococlear (nervo auditivo) em decorrência da hipofunção tireoidiana (UZIEL et al., 1983a; GOLDEY et al., 1995a; RICHTER et al., 2011; SZARAMA et al., 2013; DETTLING et al., 2014; JOHNSON et al., 2014). Sprenkle et al (2001a), no experimento com a mutação do gene TRH em ratos, relataram presença de recrutamento, alteração esta considerada coclear.

Estudos com hipotireoidismo corroboram com a presente pesquisa, uma vez que as latências na pesquisa da integridade das vias auditivas encontram-se dentro dos padrões normais, quando induzidos do 17°DG ao 8°DPN (KNIPPER et al., 2000) e do do 6°DG até o desmame (21DPN)(LASKY et al., 2002)

Nos grupos PMHPN, os resultados da integridade das vias auditivas foram semelhantes aos grupos PMHG, os quais encontram-se dentro da normalidade. Em contraposição aos nossos achados, autores relataram aumento da latência das ondas, principalmente da onda I, no grupo induzido ao hipotireoidismo com administração de MTZ do 17°DG ao 10°DPN (ALBEE et al., 1989) e 14°DPN (KNIPPER et al., 2000). Os mesmos resultados foram observados com a indução de PTU do 17°DG até 30°DPN (UZIEL et al., 1983a).

Na análise da latência das ondas absolutas ao longo da testagem, observou-se diminuição significativa da latência em relação ao fator idade com 60 a 120DPN, quando comparada aos 30DPN. Tal fato é decorrente do processo de maturação das vias auditivas, o qual interfere nas respostas do PEATE, que propicia diminuição da latência ao longo do tempo. Vale ressaltar que as vias auditivas dos roedores encontram-se maturadas ao final do 3° mês de vida (KNIPPER et al., 2000). Nos humanos, a onda I no recém-nascido de um mês de idade possui latência semelhante a de um adulto, porém as ondas III e V, ao longo do primeiro ano de idade, apresentam diminuição significativa, o que evidencia de maturação dos axônios e mecanismos sinápticos do TE (AMORIM; AGOSTINHO-PESSE; ALVARENGA, 2009; CASALI; SANTOS, 2010).

Para a pesquisa do nível mínimo de resposta eletrofisiológico, verificou-se presença de onda II na intensidade mínima de 20 dBNA. Estudos também relataram a presença da onda II na mesma intensidade que a da presença pesquisa, como nível mínimo de resposta (LASKY et al., 2002; FREITAS et al., 2009; RICHTER et al., 2011; ALVARADO et al., 2012; MURASHIMA, 2013). Observa-se ainda, que há relatos na literatura que referenciam a onda I como parâmetro da análise do nível mínimo (GRAHAM; VETTER, 2011) e onda IV (NG et al., 2004).

Verificou-se que 90,2 % do grupo PME apresentaram níveis mínimos de resposta na intensidade de 20dBNA, o que significa ausência de alteração auditiva (SOUZA et al., 2008; LEGATT, 2015). O grupo HG apresentou, na maior parte, limiares eletrofisiológicos normais, sendo que 24,4 % do grupo PMHG foi diagnosticado com perda auditiva leve. As pesquisas na literatura mimetizam o HC, portanto não há achados que descrevem apenas o HG. Porém, é sabido que o grau de perda auditiva é proporcional às alterações morfológicas do órgão de Corti (KNIPPER et al., 2000; WADA; YUMOTO; ISO, 2013).

A maior repercussão foi para o grupo PMHPN que apresentou perda moderada a profunda e estes achados se assemelham a literatura pesquisada. Há relatos de perda auditiva moderada (NG et al., 2009), de grau severo (UZIEL et al., 1983a; RUSCH et al., 2001; NG et al., 2009) e grau profundo (JOHNSON et al., 2014). Há um consenso na literatura vigente, que relata presença de perda auditiva frente a indução da disfunção tireoidiana no HC (UZIEL et al., 1983a; KNIPPER et al., 2000; RUSCH et al., 2001; NG et al., 2004, 2009; BERBEL et al., 2010; JOHNSON et al., 2014).

Verificou-se que grupos tratados com levotiroxina (PMHG+T4 e PMHPN+T4) apresentaram resultados do PEATE semelhante aos grupos não tratados (PMHG e PMHPN). O diagnóstico de perda auditiva foi semelhante entre os grupos. Em contrapartida, estudos descrevem melhora significativa dos achados no PEATE com administração de levotiroxina (UZIEL; RABIE; MAROT, 1980; NG et al., 2004).

Nas disfunções cocleares, o grau da perda auditiva pode ser avaliado pela audiometria convencional ou pelo PEATE, por meio da pesquisa dos limiares eletrofisiológicos (DAVIES, 2016). É sabido que nas alterações cocleares não há comprometimento da integridade das vias auditivas. Porém, quando se tem diminuição da intensidade, a cóclea, frente a uma disfunção auditiva não é capaz de realizar as etapas de transdução, e desta forma é possível observar dificuldades para formação do potencial endococlear, o que caracteriza a perda auditiva (ASHMORE, 2008; SOUZA et al., 2008).

Ademais, sabe-se que a indução do hipotireoidismo pode gerar perda auditiva em decorrência da deficiência do receptor TR β , o qual leva a um atraso na expressão do canal de potássio (BK), que por sua vez, afeta o potencial endococlear. A alteração gera anormalidades nos dendritos aferentes e ausência de inervação eferente das CCI (RICHTER et al., 2011).

Os autores também relatam que alterações nas CCE desencadeiam malformação do potencial endococlear influenciando negativamente na ação das CCI. É descrito que os receptores β e α , promovem o controle fisiológico das propriedades mecânicas e elétricas das CCE, e quando este controle ocorre de forma inadequada compromete o funcionamento das CCI (RUSCH et al., 2001).

No que tange ao tempo de administração, observa-se que na presente pesquisa o prejuízo maior foi para o grupo PMHPN, corroborando aos achados da literatura, uma vez que os animais foram diagnosticados com uma alteração auditiva de maior severidade. Estudos com indução até o 21ºDPN relataram presença de perda auditiva profunda, sendo que esta está associada a uma alteração coclear em decorrência de anormalidades da membrana basilar, a qual possui aspecto imaturo com presença de um grande epitélio colunar celular (JOHNSON et al., 2014).

Autores ainda relatam a presença de perda auditiva em decorrência da mutação do TPO. Sabe-se que a TPO é capaz de catalisar as reações da síntese dos HT e a mutação deste gene pode propiciar atraso na maturação das estruturas cocleares. Há um inadequado desenvolvimento da membrana tectorial, a qual tem espessura mais grossa. Neste estudo, que mimetiza o HC, os ratos com TPO mutantes apresentaram perda auditiva profunda (JOHNSON et al., 2014).

Na mesma vertente, foi realizado estudo para investigar a relação do DUOX2 com o órgão da audição. Este é um gene responsável pela oxidase dupla do peróxido de hidrogênio, o qual é requerido pelo TPO para atuar na organificação do iodeto; processo importante na síntese do HT. Autores detectaram que a mutação do DUOX2 levou a anormalidades na cóclea caracterizada por perda auditiva com má formação do sulco interno e do Túnel de Corti (JOHNSON et al., 2007)

Observa-se que a grande parte dos estudos, induzem o hipotireoidismo até a lactação, o que torna o sistema auditivo mais vulnerável aos desvios no processo de formação e desenvolvimento do Órgão de Corti (RUSCH et al., 2001; WEBER et al., 2002; WINTER et al., 2009; WADA; YUMOTO; ISO, 2013; DETTLING et al., 2014).

A presente pesquisa evidenciou alterações importantes no sistema auditivo não só no grupo PMHPN mas também no PMHG, com prejuízo comportamental no Órgão de Corti,

caracterizado por uma perda auditiva leve e moderada, e menor amplitude de resposta nas EOAPD. Estas alterações podem ser decorrentes da influência da diminuição dos HT no período intrauterino, que leva a alterações na função do sistema auditivo, sem muito prejuízo morfológico (DEOL, 1973).

Os dados obtidos com esse estudo poderão gerar conhecimento para fomentar estudos clínicos, fonoterápicos, farmacológicos e não-farmacológicos de prevenção e intervenção dos sistemas afetados. Ademais, a partir desse estudo, novos elementos poderão ser incorporados, de modo a fortalecer a ideia da necessidade de se instituir como compulsório, no sistema único de saúde brasileiro, a triagem universal da função tireoidiana em todas as gestantes, uma vez que esta deficiência endócrina tem grande potencial de gerar consequências graves a audição.

8. CONCLUSÃO

A presente pesquisa revelou, pela primeira vez, disfunção sensorineural coclear, com amplitude de resposta das EOAPD reduzida e limiares eletrofisiológicos aumentados no grupo PMHG.

No grupo PMHPN observou-se ausência de respostas na EOAPD com presença de perda auditiva de grau moderado a profundo.

Não foi observada alteração funcional significativa na compliância e pressão da OM. Além disto a integridade das vias auditivas até tronco encefálico encontra-se dentro dos padrões de normalidade nos grupos hipotireoidianos.

9. REFERÊNCIAS

AHMED, O. M.; AHMED, R. G.; EL-GAREIB, a W.; EL-BAKRY, a M.; ABD EL-TAWAB, S. M. Effects of Experimentally Induced Maternal Hypothyroidism and Hyperthyroidism on the Development of Rat Offspring: II-the Developmental Pattern of Neurons in Relation to Oxidative Stress and Antioxidant Defense System. **Int J Dev Neurosci.**, v. 30, n. 6, p. 517–37, 2012.

ALBEE, R. R.; MATTSSON, J. L.; JOHNSON, K. A.; KIRK, H. D.; BRESLIN, W. J. Neurological Consequences of Congenital Hypothyroidism in Fischer 344 Rats. **Neurotoxicol Teratol.**, v. 11, n. 2, p. 171–83, 1989.

ALBORNOZ, E. A.; CARREÑO, L. J.; CORTES, C. M.; GONZALEZ, P. A.; CISTERNAS, P. A.; CAUTIVO, K. M.; CATALÁN, T. P.; OPAZO, M. C.; EUGENIN, E. A.; BERMAN, J. W.; BUENO, S. M.; KALERGIS, A. M.; RIEDEL, C. A. Gestational Hypothyroidism Increases the Severity of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Adult Offspring. **Thyroid**, v. 23, n. 12, p. 1627–37, 2013.

ALBUQUERQUE, A. A. S.; ROSSATO, M.; OLIVEIRA, J. A. A. de; HYPPOLITO, M. A. Conhecimento Da Anatomia Da Orelha de Cobaias E Ratos E Sua Aplicação Na Pesquisa Otológica Básica. **Braz J Otorhinolaryngol.**, v. 75, n. 1, p. 43–9, 2009.

ALEXANDER, E. K.; PEARCE, E. N.; BRENT, G. A.; BROWN, R. S.; CHEN, H.; DOSIOU, C.; GROBMAN, W. A.; LAURBERG, P.; LAZARUS, J. H.; MANDEL, S. J.; PEETERS, R. P.; SULLIVAN, S. 2017 Guidelines of the American Thyroid Association for the Diagnosis and Management of Thyroid Disease During Pregnancy and the Postpartum. **Thyroid**, v. 27, n. 3, p. 315–89, 2017.

ALVARADO, J. C.; FUENTES-SANTAMARÍA, V.; JAREÑO-FLORES, T.; BLANCO, J. L.; JUIZ, J. M. Normal Variations in the Morphology of Auditory Brainstem Response (ABR) Waveforms: A Study in Wistar Rats. **Neuroscience research**, v. 73, n. 4, p. 302–11, 2012.

ALVES, I. G. N.; DA CRUZ, K. M. L.; MOTA, C. M. D.; DE SANTANA, D. S.; GAUJAC, D. P.; DE CARVALHO, V. C. B.; REIS, L. C.; SLUKA, K. A.; QUINTANS-JUNIOR, L. J.; ANTONIOLLI, A. R.; DESANTANA, J. M.; BADAUÊ-PASSOS, D.; DE SANTANA-FILHO, V. J. Experimental Hypothyroidism during Pregnancy Affects Nociception and Locomotor Performance of Offspring in Rats. **Eur J Pain.**, v. 17, n. 9, p. 1291–8, 2013.

AMORIM, R. B.; AGOSTINHO-PESSE, R. S.; ALVARENGA, K. de F. The Maturation Process of the Auditory System in the First Year of Life Characterized by Brainstem Auditory Evoked Potentials. **J. Appl. Oral Sci.**, v. 17, n. sp. issue, p. 57–62, 2009.

ANDERSEN, S. L.; OLSEN, J.; LAURBERG, P. Foetal Programming by Maternal Thyroid Disease. **Clin. Endocrinol. (Oxf)**, v. 83, n. 6, p. 751–8, 2015.

ANDERSEN, S. L.; OLSEN, J.; LAURBERG, P. Maternal Thyroid Disease in the Danish National Birth Cohort: Prevalence and Risk Factors. **Eur J Endocrinol.**, v. 174, n. 2, p. 203–12, 2016.

ANJANA, Y.; VANEY, N.; TANDON, O. P.; MADHU, S. V. Functional Status of Auditory Pathways in Hypothyroidism: Evoked Potential Study. **Indian J Physiol Pharmacol.**, v. 50, n. 4, p. 341–9, 2006.

ASHMORE, J. Cochlear Outer Hair Cell Motility. **Physiol. Rev.**, v. 88, n. 1, p. 173–

210, 2008.

BAYINDIR, T.; FILIZ, A.; IRAZ, M.; KAYA, S.; TAN, M.; KALCIOGLU, M. T. Evaluation of the Protective Effect of Beta Glucan on Amikacin Ototoxicity Using Distortion Product Otoacoustic Emission Measurements in Rats. **Clin Exp Otorhinolaryngol.**, v. 6, n. 1, p. 1–6, 2013.

BENEVIDES, A.; LIMA, C.; ROCHA, C.; CORREA, A.; HUNSY, A.; FERNANDES-CALDATO, M. Perfil Epidemiológico de Portadores de Hipotireoidismo Congênito. **Revista Paraense de Medicina**, v. 20, n. 3, p. 23–6, 2006.

BENSEÑOR, I. M.; GOULART, A. C.; LOTUFO, P. A.; MENEZES, P. R.; SCAZUFCA, M. Prevalence of Thyroid Disorders among Older People: Results from the São Paulo Ageing & Health Study. **Cad Saude Publica**, v. 27, n. 1, p. 155–61, 2011.

BERBEL, P.; NAVARRO, D.; AUSÓ, E.; VAREA, E.; RODRÍGUEZ, A. E.; BALLESTA, J. J.; SALINAS, M.; FLORES, E.; FAURA, C. C.; DE ESCOBAR, G. M. Role of Late Maternal Thyroid Hormones in Cerebral Cortex Development: An Experimental Model for Human Prematurity. **Cereb Cortex**, v. 20, n. 6, p. 1462–75, 2010.

BERMINGHAM, N. A. Math1: An Essential Gene for the Generation of Inner Ear Hair Cells. **Science**, v. 284, n. 5421, p. 1837–41, 1999.

BIELEFELD, E. C.; COLING, D.; CHEN, G.-D.; LI, M.; TANAKA, C.; HU, B.-H.; HENDERSON, D. Age-Related Hearing Loss in the Fischer 344/NHsd Rat Substrain. **Hear Res.**, v. 241, n. 1–2, p. 26–33, 2008.

BOAS, M.; FELDT-RASMUSSEN, U.; MAIN, K. M. Thyroid Effects of Endocrine Disrupting Chemicals. **Mol Cell Endocrinol.**, v. 355, n. 2, p. 240–8, 2012.

BOUCAI, L.; HOLLOWELL, J. G.; SURKS, M. I. An Approach for Development of Age-, Gender-, and Ethnicity-Specific Thyrotropin Reference Limits. **Thyroid**, v. 21, n. 1, p. 5–11, 2011.

BRADLEY, D. J.; TOWLE, H. C.; YOUNG, W. S. Alpha and Beta Thyroid Hormone Receptor (TR) Gene Expression during Auditory Neurogenesis: Evidence for TR Isoform-Specific Transcriptional Regulation in Vivo. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 91, n. 2, p. 439–43, 1994.

BRENT, G. A.; DAVIES, T. F. Hypothyroidism and thyroiditis. In: MELMED, S.; POLONSKY, K. S.; LARSEN, P. R.; KRONENBERG, H. M. (Ed.). **Williams Textbook of Endocrinology**. 12 th ed. Philadelphia: Elsevier, 2011. p. 406–39.

BRENTA, G.; VAISMAN, M.; SGARBI, J. A.; BERGOGLIO, L. M.; ANDRADA, N. C. de; BRAVO, P. P.; ORLANDI, A. M.; GRAF, H.; TASK FORCE ON HYPOTHYROIDISM OF THE LATIN AMERICAN THYROID SOCIETY (LATS). Clinical Practice Guidelines for the Management of Hypothyroidism. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 57, n. 4, p. 265–91, 2013.

BREUEL, M. L. F.; SANCHEZ, T. G.; BENTO, R. F. Efferent Auditory Pathways and Their Role in the Auditory System. **Int. Arch. Otorhinolaryngol.**, v. 5, n. 2, p. 62–7, 2001.

BRUDZYNSKI, S. M. Communication of Adult Rats by Ultrasonic Vocalization: Biological, Sociobiological, and Neuroscience Approaches. **ILAR J**, v. 50, n. 1, p. 43–50, 2009.

BRYANT, J.; GOODYEAR, R. J.; RICHARDSON, G. P. Sensory Organ Development in the Inner Ear: Molecular and Cellular Mechanisms. **Br Med Bull**, v. 63, p.

39–57, 2002.

CALVO, R.; OBREGÓN, M. J.; RUIZ DE OÑA, C.; ESCOBAR DEL REY, F.; MORREALE DE ESCOBAR, G. Congenital Hypothyroidism, as Studied in Rats. Crucial Role of Maternal Thyroxine but Not of 3,5,3'-triiodothyronine in the Protection of the Fetal Brain. **J Clin Invest.**, v. 86, n. 3, p. 889–99, 1990.

CAMARGO, R. Y. A.; TOMIMORI, E. K.; NEVES, S. C.; G S RUBIO, I.; GALRAO, A. L.; KNOBEL, M.; MEDEIROS-NETO, G. Thyroid and the Environment: Exposure to Excessive Nutritional Iodine Increases the Prevalence of Thyroid Disorders in Sao Paulo, Brazil. **Eur J Endocrinol.**, v. 159, n. 3, p. 293–9, 2008.

CASALI, R.; SANTOS, M. Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico: Padrão de Respostas de Lactentes Termos E Prematuros. **Brazilian Journal of**, 2010.

CASEY, B. M.; DASHE, J. S.; WELLS, C. E.; MCINTIRE, D. D.; BYRD, W.; LEVENO, K. J.; CUNNINGHAM, F. G. Subclinical Hypothyroidism and Pregnancy Outcomes. **Obstet Gynecol.**, v. 105, n. 2, p. 239–45, 2005.

CHIN, W. W.; CARR, F. E.; BURNSIDE, J.; DARLING, D. S. Thyroid Hormone Regulation of Thyrotropin Gene Expression. **Recent Prog Horm Res.**, v. 48, p. 393–414, 1993.

CORDAS, E. A.; NG, L.; HERNANDEZ, A.; KANESHIGE, M.; CHENG, S.-Y.; FORREST, D. Thyroid Hormone Receptors Control Developmental Maturation of the Middle Ear and the Size of the Ossicular Bones. **Endocrinology**, v. 153, n. 3, p. 1548–60, 2012.

CORREA, E. M. Aspectos gerais dos sistemas auditivo e vestibular. In: **Embriologia e histologia em fonoaudiologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 212.

CROFTON, K. M. PCBs, Thyroid Hormones, and Ototoxicity in Rats: Cross-Fostering Experiments Demonstrate the Impact of Postnatal Lactation Exposure. **Toxicol.Sci.**, v. 57, n. 1, p. 131–40, 2000.

CROFTON, K. M.; DING, D.; PADICH, R.; TAYLOR, M.; HENDERSON, D. Hearing Loss Following Exposure during Development to Polychlorinated Biphenyls: A Cochlear Site of Action. **Hear Res.**, v. 144, n. 1–2, p. 196–204, 2000.

CROWLEY, D. E.; HEPP-REYMOND, M. C. Development of Cochlear Function in the Ear of the Infant Rat. **J Comp Physiol Psychol.**, v. 62, n. 3, p. 427–32, 1966.

DARBRA, S.; GARAU, A.; BALADA, F.; SALA, J.; MARTÍ-CARBONELL, M. A. Perinatal Hypothyroidism Effects on Neuromotor Competence, Novelty-Directed Exploratory and Anxiety-Related Behaviour and Learning in Rats. **Behav Brain Res.**, v. 143, n. 2, p. 209–15, 2003.

DAVIES, R. A. Audiometry and other hearing tests. In: FURMAN, J.; LEMPET, T. (Ed.). **Handb Clin Neurol**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 157–76.

DE GROOT, L.; ABALOVICH, M.; ALEXANDER, E. K.; AMINO, N.; BARBOUR, L.; COBIN, R. H.; EASTMAN, C. J.; LAZARUS, J. H.; LUTON, D.; MANDEL, S. J.; MESTMAN, J.; ROVET, J.; SULLIVAN, S. Management of Thyroid Dysfunction during Pregnancy and Postpartum: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 97, n. 8, p. 2543–65, 2012.

DEOL, M. S. An Experimental Approach to the Understanding and Treatment of Hereditary Syndromes with Congenital Deafness and Hypothyroidism. **J. Med. Genet.**, v. 10, n. 3, p. 235–42, 1973.

DETTLING, J.; FRANZ, C.; ZIMMERMANN, U.; LEE, S. C.; BRESS, A.;

BRANDT, N.; FEIL, R.; PFISTER, M.; ENGEL, J.; FLAMANT, F.; RÜTTIGER, L.; KNIPPER, M. Autonomous Functions of Murine Thyroid Hormone Receptor TR α and TR β in Cochlear Hair Cells. **Mol Cell Endocrinol.**, v. 382, n. 1, p. 26–37, 2014.

EASTMAN, C. J. Screening for Thyroid Disease and Iodine Deficiency. **Pathology**, v. 44, n. 2, p. 153–9, 2012.

ECKRICH, T.; VARAKINA, K.; JOHNSON, S. L.; FRANZ, C.; SINGER, W.; KUHN, S.; KNIPPER, M.; HOLLEY, M. C.; MARCOTTI, W. Development and Function of the Voltage-Gated Sodium Current in Immature Mammalian Cochlear Inner Hair Cells. **PLoS one**, v. 7, n. 9, p. e45732, 2012.

ELGOYHEN, A. B.; KATZ, E.; FUCHS, P. a. The Nicotinic Receptor of Cochlear Hair Cells: A Possible Pharmacotherapeutic Target? **Biochem Pharmacol.**, v. 78, n. 7, p. 712–9, 2009.

ESTEVEZ, M. C. B. N.; DELL'ARINGA, A. H. B.; ARRUDA, G. V.; DELL'ARINGA, A. R.; NARDI, J. C. Brainstem Evoked Response Audiometry in Normal Hearing Subjects. **Braz J Otorhinolaryngol.**, v. 75, n. 3, p. 420–5, 2009.

FANG, Q.; GIORDIMAINA, A. M.; DOLAN, D. F.; CAMPER, S. a; MUSTAPHA, M. Genetic Background of Prop1(df) Mutants Provides Remarkable Protection against Hypothyroidism-Induced Hearing Impairment. **J. Assoc. Res. Otolaryngol.**, v. 13, n. 2, p. 173–84, 2012.

FARAHANI, S.; ZARANDY, M. M.; HASSANZADEH, G.; SHIDFAR, F.; JALAIE, S.; RAHIMI, V. The Effect of Low Omega-3/Omega-6 Ratio on Auditory Nerve Conduction in Rat Pups. **Acta Med Iran.**, v. 53, n. 6, p. 346–350, 2015.

FELDMAN, J. D.; VAZQUEZ, J. J.; KURTZ, S. M. Maturation of the Rat Fetal Thyroid. **J Biophys Biochem Cytol**, v. 11, n. 2, p. 365–83, 1961.

FLEISCHER, G. Evolutionary Principles of the Mammalian Middle Ear. **Adv Anat Embryol Cell .**, v. 55, n. 5, p. 3–70, 1978.

FORREST, D.; ERWAY, L. C.; NG, L.; ALTSCHULER, R.; CURRAN, T. Thyroid Hormone Receptor Beta Is Essential for Development of Auditory Function. **Nat. Genet.**, v. 13, n. 3, p. 354–7, 1996.

FORREST, D.; REH, T. A.; RÜSCH, A. Neurodevelopmental Control by Thyroid Hormone Receptors. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 12, n. 1, p. 49–56, 2002.

FORREST, D.; VENNSTRÖM, B. Functions of Thyroid Hormone Receptors in Mice. **Thyroid**, v. 10, n. 1, p. 41–52, 2000.

FREEMAN, S.; GEAL-DOR, M.; SHIMONI, Y.; SOHMER, H. Thyroid Hormone Induces Earlier Onset of Auditory Function in Neonatal Rats. **Hear Res.**, v. 69, n. 1–2, p. 229–35, 1993.

FREEMAN, S.; PLOTNIK, M.; ELIDAN, J.; SOHMER, H. Development of Short Latency Vestibular Evoked Potentials in the Neonatal Rat. **Hear Res.**, v. 137, n. 1–2, p. 51–8, Nov. 1999.

FREITAS, M. R. de; SILVA, V. C. da; BRITO, G. A. de C.; CARVALHO JUNIOR, J. V. de; GOMES JUNIOR, R. M.; RIBEIRO, R. de A. Distortion-Product Otoacoustic Emissions and Auditory Brainstem Responses Sensitivity Assessment in Cisplatin-Induced Ototoxicity in Rats. **Braz J Otorhinolaryngol.**, v. 75, n. 4, p. 476–84, 2009.

FUCHS, P. A.; MURROW, B. W. A Novel Cholinergic Receptor Mediates Inhibition of Chick Cochlear Hair Cells. **Proc. Biol. Sci.**, v. 248, n. 1321, p. 35–40, 1992.

GATTO, C.; TOCHETTO, T. Deficiência Auditiva Infantil: Implicações E Soluções. *Rev CEFAC*, v. 9, n. 1, p. 11–5, 2007.

GAUJAC, D. P. **Influência do HGE no comportamento ingestivo e perfil metabólico da prole de ratas**. 2013. Universidade Federal de Sergipe, 2013.

GEAL-DOR, M.; FREEMAN, S.; LI, G.; SOHMER, H. Development of Hearing in Neonatal Rats: Air and Bone Conducted ABR Thresholds. *Hear Res.*, v. 69, n. 1–2, p. 236–42, 1993.

GEAL-DOR, M.; KHVOLES, R.; SOHMER, H. Cooling Induces a Decrease in Middle Ear Compliance. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.*, v. 8, n. 3, p. 127–32, 1997.

GILBERT, M. E.; HEDGE, J. M.; VALENTÍN-BLASINI, L.; BLOUNT, B. C.; KANNAN, K.; TIETGE, J.; ZOELLER, R. T.; CROFTON, K. M.; JARRETT, J. M.; FISHER, J. W. An Animal Model of Marginal Iodine Deficiency during Development: The Thyroid Axis and Neurodevelopmental Outcome. *Toxicol.Sci.*, v. 132, n. 1, p. 177–95, 2013.

GOLDEY, E. S.; KEHN, L. S.; LAU, C.; REHNBERG, G. L.; CROFTON, K. M. Developmental Exposure to Polychlorinated Biphenyls (Aroclor 1254) Reduces Circulating Thyroid Hormone Concentrations and Causes Hearing Deficits in Rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v. 135, n. 1, p. 77–88, 1995a.

GOLDEY, E. S.; KEHN, L. S.; REHNBERG, G. L.; CROFTON, K. M. Effects of Developmental Hypothyroidism on Auditory and Motor Function in the Rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v. 135, n. 1, p. 67–76, 1995b.

GRAHAM, C. E.; VETTER, D. E. The Mouse Cochlea Expresses a Local Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Equivalent Signaling System and Requires Corticotropin-Releasing Factor Receptor 1 to Establish Normal Hair Cell Innervation and Cochlear Sensitivity. *J Neurosci.*, v. 31, n. 4, p. 1267–78, 2011.

GRIFFITH, A. J.; SZYMKO, Y. M.; KANESHIGE, M.; QUIÑÓNEZ, R. E.; KANESHIGE, K.; HEINTZ, K. a; MASTROIANNI, M. A.; KELLEY, M. W.; CHENG, S. Knock-in Mouse Model for Resistance to Thyroid Hormone (RTH): An RTH Mutation in the Thyroid Hormone Receptor Beta Gene Disrupts Cochlear Morphogenesis. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.*, v. 3, n. 3, p. 279–88, 2002.

HASEBE, M.; MATSUMOTO, I.; IMAGAWA, T.; UEHARA, M. Effects of an Anti-Thyroid Drug, Methimazole, Administration to Rat Dams on the Cerebellar Cortex Development in Their Pups. *Int J Dev Neurosci.*, v. 26, n. 5, p. 409–414, 2008.

HASHEMIPOUR, M.; HOVSEPIAN, S.; HASHEMI, M.; AMINI, M.; KELISHADI, R.; SADEGHI, S. Hearing Impairment in Congenitally Hypothyroid Patients. *Iran J Pediatr.*, v. 22, n. 1, p. 92–6, 2012.

HEFFNER, R.; KOAY, G.; HEFFNER, H. Audiograms of Five Species of Rodents: Implications for the Evolution of Hearing and the Perception of Pitch. *Hear Res.*, v. Jul;157, n. 1–2, p. 138–52., 2001.

HEMILÄ, S.; NUMMELA, S.; REUTER, T. What Middle Ear Parameters Tell about Impedance Matching and High Frequency Hearing. *Hear Res.*, v. 85, n. 1–2, p. 31–44, 1995.

HYPPOLITO, M. A.; OLIVEIRA, A. A. de; LESSA, R. M.; ROSSATO, M. Otoproteção Da Amifostina Aos Efeitos Ototóxicos Da Cisplatina: Estudo Em Cobaias Albinas Por Emissões Otoacústicas Produtos de Distorção E Microscopia Eletrônica de Varredura. *Braz J Otorhinolaryngol.*, v. 71, n. 3, p. 268–73, 2005.

JISKRA, J.; BARTÁKOVÁ, J.; HOLINKA, Š.; LÍMANOVÁ, Z.; SPRINGER, D.;

ANTOŠOVÁ, M.; TELIČKA, Z.; POTLUKOVÁ, E. Low Prevalence of Clinically High-Risk Women and Pathological Thyroid Ultrasound among Pregnant Women Positive in Universal Screening for Thyroid Disorders. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v. 119, n. 9, p. 530–5, 2011.

JOHNSON, K. R.; GAGNON, L. H.; LONGO-GUESS, C. M.; HARRIS, B. S.; CHANG, B. Hearing Impairment in Hypothyroid Dwarf Mice Caused by Mutations of the Thyroid Peroxidase Gene. **J. Assoc. Res. Otolaryngol.**, v. 15, n. 1, p. 45–55, 2014.

JOHNSON, K. R.; MARDEN, C. C.; WARD-BAILEY, P.; GAGNON, L. H.; BRONSON, R. T.; DONAHUE, L. R. Congenital Hypothyroidism, Dwarfism, and Hearing Impairment Caused by a Missense Mutation in the Mouse Dual Oxidase 2 Gene, *Duox2*. **Mol. Endocrinol.**, v. 21, n. 7, p. 1593–1602, 2007.

KARLI, R.; GUL, A. Evaluation of the Effect of Gemcitabine on Cochlea by Otoacoustic Emission in Experimental Animal Model. **Eur Rev Med Pharmacol Sci.**, v. 17, n. 4, p. 541–7, 2013.

KAVLIE, R. G.; FRITZ, J. L.; NIES, F.; GÖPFERT, M. C.; OLIVER, D.; ALBERT, J. T.; EBERL, D. F. Prestin Is an Anion Transporter Dispensable for Mechanical Feedback Amplification in *Drosophila* Hearing. **J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol.**, v. 201, n. 1, p. 51–60, 2015.

KIM, Y. A.; PARK, Y. J. Prevalence and Risk Factors of Subclinical Thyroid Disease. **Endocrinol Metab (Seoul)**, v. 29, n. 1, p. 20, Mar. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24741450>>. Acesso em: 3 feb. 2017.

KNIPPER, M.; GESTWA, L.; TEN CATE, W. J.; LAUTERMANN, J.; BRUGGER, H.; MAIER, H.; ZIMMERMANN, U.; ROHBOCK, K.; KÖPSCHALL, I.; WIECHERS, B.; ZENNER, H. P. Distinct Thyroid Hormone-Dependent Expression of TrkB and p75NGFR in Nonneuronal Cells during the Critical TH-Dependent Period of the Cochlea. **J. Neurobiol.**, v. 38, n. 3, p. 338–56, 1999.

KNIPPER, M.; RICHARDSON, G.; MACK, A.; MÜLLER, M.; GOODYEAR, R.; LIMBERGER, A.; ROHBOCK, K.; KÖPSCHALL, I.; ZENNER, H. P.; ZIMMERMANN, U. Thyroid Hormone-Deficient Period prior to the Onset of Hearing Is Associated with Reduced Levels of β -Tectorin Protein in the Tectorial Membrane: Implication for Hearing Loss. **J Biol Pharm Chem Res.**, v. 276, n. 42, p. 39046–39052, 2001.

KNIPPER, M.; ZINN, C.; MAIER, H.; PRAETORIUS, M.; ROHBOCK, K.; KÖPSCHALL, I.; ZIMMERMANN, U. Thyroid Hormone Deficiency before the Onset of Hearing Causes Irreversible Damage to Peripheral and Central Auditory Systems. **J. Neurophysiol.**, v. 83, n. 5, p. 3101–12, 2000.

KOBAYASHI, K.; KUBOTA, H.; HOJO, R.; MIYAGAWA, M. Dose-Dependent Effects of Perinatal Hypothyroidism on Postnatal Testicular Development in Rat Offspring. **Toxicol.Sci.**, v. 39, n. 6, p. 867–74, 2014.

KOOISTRA, L.; KEMPERS, M. J. E.; VAN DER SLUIJS VEER, L.; NIJHUIS-VAN DER SANDEN, M. W. G.; WIEDIJK, B. M.; FABER, I.; LAST, B. F.; DE VIJLDER, J. J. M.; GROOTENHUIS, M. a; VULSMA, T. Intellectual and Motor Development of Young Adults with Congenital Hypothyroidism Diagnosed by Neonatal Screening. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 91, n. 2, p. 418–24, 2006.

KUIJPERS, W. Na-K-ATPase Activity in the Cochlea of the Rat During Development. **Acta Otolaryngol.**, v. 78, n. 1–6, p. 341–4, 1974.

KURK, M. O Amplificador Colcear. **Int. Arch. Otorhinolaryngol.**, v. 3, n. 2, p. 48–

56, 1999.

LASKY, R. E.; WIDHOLM, J. J.; CROFTON, K. M.; SCHANTZ, S. L. Perinatal Exposure to Aroclor 1254 Impairs Distortion Product Otoacoustic Emissions (DPOAEs) in Rats. **Toxicol.Sci.**, v. 68, n. 2, p. 458–64, 2002.

LAZARUS, J. Thyroid Function in Pregnancy. **Br Med Bull.**, v. 97, n. 1, p. 137–48, 2011.

LAZARUS, J.; BROWN, R. S.; DAUMERIE, C.; HUBALEWSKA-DYDEJCZYK, A.; NEGRO, R.; VAIDYA, B. 2014 European Thyroid Association Guidelines for the Management of Subclinical Hypothyroidism in Pregnancy and in Children. **Eur Thyroid J.**, v. 3, n. 2, p. 76–94, 2014.

LEGATT, A. D. Electrophysiologic auditory tests. In: CELESIA, G.; HICKK, G. (Ed.). **Handb Clin Neurol.** 3. ed. New York: Elsevier, 2015. p. 289–311.

LELLI, A.; ASAI, Y.; FORGE, A.; HOLT, J. R.; GÉLÉOC, G. S. G. **Tonotopic gradient in the developmental acquisition of sensory transduction in outer hair cells of the mouse cochlea.** **J. Neurophysiol.**, Jun. 2009. .

LENOIR, M.; SHNERSON, A.; PUJOL, R. Cochlear Receptor Development in the Rat with Emphasis on Synaptogenesis. **Anat. Embryol.**, v. 160, n. 3, p. 253–62, 1980.

LICHTENBERGER-GESLIN, L.; DOS SANTOS, S.; HASSANI, Y.; ECOSSE, E.; VAN DEN ABEELE, T.; LÉGER, J. Factors Associated with Hearing Impairment in Patients with Congenital Hypothyroidism Treated since the Neonatal Period: A National Population-Based Study. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 98, n. February, p. 3644–52, 2013.

MARCUS, D. C.; WU, T.; WANGEMANN, P.; KOFUJI, P. KCNJ10 (Kir4.1) Potassium Channel Knockout Abolishes Endocochlear Potential. **Am J Physiol Cell Physiol.**, v. 282, n. 2, p. C403-7, 2002.

MARTIN, G. K.; STAGNER, B. B.; CHUNG, Y. S.; LONSBURY-MARTIN, B. L. Characterizing Distortion-Product Otoacoustic Emission Components across Four Species. **J Acoust Soc Am.**, v. 129, n. 5, p. 3090–103, 2011.

MASON, M. J. Of Mice, Moles and Guinea Pigs: Functional Morphology of the Middle Ear in Living Mammals. **Hear Res.**, v. 301, p. 4–18, Jul. 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378595512002456>>. Acesso em: 3 feb. 2017.

MELSE-BOONSTRA, A.; MACKENZIE, I. Iodine Deficiency, Thyroid Function and Hearing Deficit: A Review. **Nutr Res Rev.**, v. 26, n. 2, p. 110–7, 2013.

MICHNA, M.; KNIRSCH, M.; HODA, J.-C.; MUENKNER, S.; LANGER, P.; PLATZER, J.; STRIESSNIG, J.; ENGEL, J. Cav1.3 (alpha1D) Ca²⁺ Currents in Neonatal Outer Hair Cells of Mice. **J. Physiol.**, v. 553, n. Pt 3, p. 747–58, 2003.

MOLETI, M.; LO PRESTI, V. P.; MATTINA, F.; MANCUSO, A.; DE VIVO, A.; GIORGIANNI, G.; DI BELLA, B.; TRIMARCHI, F.; VERMIGLIO, F. Gestational Thyroid Function Abnormalities in Conditions of Mild Iodine Deficiency: Early Screening versus Continuous Monitoring of Maternal Thyroid Status. **Eur J Endocrinol.**, v. 160, n. 4, p. 611–7, 2009.

MURASHIMA, A. **Caracterização funcional, eletrofisiológica e microanatômica coclear de animais com sensibilidade audiológica da cepa Wistar Audiogenic Rats (WAR).** 2013. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2013.

MUSTAPHA, M.; FANG, Q.; GONG, T.-W.; DOLAN, D. F.; RAPHAEL, Y.; CAMPER, S. a; DUNCAN, R. K. Deafness and Permanently Reduced Potassium Channel

Gene Expression and Function in Hypothyroid Pit1dw Mutants. **J Neurosci.**, v. 29, n. 4, p. 1212–23, 2009.

NEGRO, R.; STAGNARO-GREEN, A. Diagnosis and Management of Subclinical Hypothyroidism in Pregnancy. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 349, p. g4929, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25288580>>.

NG, L.; GOODYEAR, R. J.; WOODS, C. a; SCHNEIDER, M. J.; DIAMOND, E.; RICHARDSON, G. P.; KELLEY, M. W.; GERMAIN, D. L. S.; GALTON, V. A.; FORREST, D. Hearing Loss and Retarded Cochlear Development in Mice Lacking Type 2 Iodothyronine Deiodinase. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 101, n. 10, p. 3474–9, 2004.

NG, L.; HERNANDEZ, A.; HE, W.; REN, T.; SRINIVAS, M.; MA, M.; GALTON, V. A.; ST GERMAIN, D. L.; FORREST, D. A Protective Role for Type 3 Deiodinase, a Thyroid Hormone-Inactivating Enzyme, in Cochlear Development and Auditory Function. **Endocrinology**, v. 150, n. 4, p. 1952–60, 2009.

OHASHI, M.; FURUKAWA, S.; MICHIKATA, K.; KAI, K.; SAMESHIMA, H.; IKENOUE, T. Risk-Based Screening for Thyroid Dysfunction during Pregnancy. **J Pregnancy.**, v. 2013, p. 1–5, 2013.

OLIVEIRA, J. O Mecanismo Eletrobiomecânico Ativo Da Cóclea. **Braz J Otorhinolaryngol**, v. 59, n. 4, p. 236–48, 1993.

OLIVEIRA, J. A. A.; DEL VECCHI, F.; MARSEILLAN, R. F. Respostas Elétricas Evocadas Das Vias Auditivas de Cobaias Por Estimulação Com Cliques. **Braz J Otorhinolaryngol.**, v. 49, n. 2, p. 7–15, 1983.

ONUSKO, E. Tympanometry. **Am. Fam. Phys.**, v. 70, n. 9, p. 1713–20, 2004.

PORTFORS, C. V. Types and Functions of Ultrasonic Vocalizations in Laboratory Rats and Mice. **J Am Assoc Lab Anim Sci .**, v. 46, n. 1, p. 28–34, 2007.

PRIETO, J. J.; RUEDA, J.; MERCHAN, J. A. The Effect of Hypothyroidism on the Development of the Glycogen Content of Organ of Corti S Hair Cells. **Brain Res.**, v. 1, n. 51, p. 138–141, 1990.

RICHTER, C.-P.; MÜNSCHER, A.; SANTANA MACHADO, D.; WONDISFORD, F. E.; ORTIGA-CARVALHO, T. M. Complete Activation of Thyroid Hormone Receptor β by T3 Is Essential for Normal Cochlear Function and Morphology in Mice. **Cell. Physiol. Biochem.**, v. 28, n. 5, p. 997–1008, 2011.

RUBEN, R. J. Development of the Inner Ear of the Mouse: A Radioautographic Study of Terminal Mitoses. **Acta oto-laryngologica**, p. Suppl 220:1-44, 1967.

RUSCH, a; NG, L.; GOODYEAR, R.; OLIVER, D.; LISOUKOV, I.; VENNSTROM, B.; RICHARDSON, G.; KELLEY, M. W.; FORREST, D. Retardation of Cochlear Maturation and Impaired Hair Cell Function Caused by Deletion of All Known Thyroid Hormone Receptors. **J Neurosci.**, v. 21, n. 24, p. 9792–800, 2001.

RÜTTIGER, L.; SAUSBIER, M.; ZIMMERMANN, U.; WINTER, H.; BRAIG, C.; ENGEL, J.; KNIRSCH, M.; ARNTZ, C.; LANGER, P.; HIRT, B.; MÜLLER, M.; KÖPSCHALL, I.; PFISTER, M.; MÜNKNER, S.; ROHBOCK, K.; PFAFF, I.; RÜSCH, A.; RUTH, P.; KNIPPER, M. Deletion of the Ca²⁺-Activated Potassium (BK) Alpha-Subunit but Not the BKbeta1-Subunit Leads to Progressive Hearing Loss. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 101, n. 35, p. 12922–7, 2004.

SAHU, M. T.; DAS, V.; MITTAL, S.; AGARWAL, A.; SAHU, M. Overt and Subclinical Thyroid Dysfunction among Indian Pregnant Women and Its Effect on Maternal

and Fetal Outcome. **Arch Gynecol Obstet.**, v. 281, n. 2, p. 215–220, 2010.

SAKI, F.; DABBAGHMANESH, M. H.; GHAEMI, S. Z.; FOROUHARI, S.; RANJBAR OMRANI, G.; BAKHSHAYESHKARAM, M. Thyroid Function in Pregnancy and Its Influences on Maternal and Fetal Outcomes. **Int J Endocrinol Metab**, v. 12, n. 4, p. e19378, 2014.

SANTOS, S. O.; LOUREIRO, S. M. A.; ALVES, I. G. N.; JESUS, C. S. de; SANTOS, P. R. dos; SANTOS, M. R. V. dos; DIAS, D. P. M.; SANTANA-FILHO, V. J.; BADAUÊ-PASSOS, D. Experimental Gestational Hypothyroidism Evokes Hypertension in Adult Offspring Rats. **Auton Neurosci.**, v. 170, n. 1–2, p. 36–41, 2012.

SEDAGHAT, K.; ZAHEDIASL, S.; GHASEMI, A.; ZAHEDIASL, S. K.; GHASEMI, S. Iranian Journal of Basic Medical Sciences Gestational Hypothyroidism-Induced Changes in L-Type Calcium Channels of Rat Aorta Smooth Muscle and Their Impact on the Responses to Vasoconstrictors. **Iran J Basic Med Sci**, v. 18, n. 2, p. 172–9, 2015.

SENDIN, G.; BULANKINA, A. V.; RIEDEL, D.; MOSER, T. Maturation of Ribbon Synapses in Hair Cells Is Driven by Thyroid Hormone. **J Neurosci.**, v. 27, n. 12, p. 3163–73, 2007.

SGARBI, J. A.; MATSUMURA, L. K.; KASAMATSU, T. S.; FERREIRA, S. R.; MACIEL, R. M. B. Subclinical Thyroid Dysfunctions Are Independent Risk Factors for Mortality in a 7.5-Year Follow-up: The Japanese-Brazilian Thyroid Study. **Eur J Endocrinol.**, v. 162, n. 3, p. 569–77, 2010.

SGARBI, J. A.; TEIXEIRA, P. F. S.; MACIEL, L. M. Z.; MAZETO, G. M. F. S.; VAISMAN, M.; MONTENEGRO JUNIOR, R. M.; WARD, L. S. Consenso Brasileiro Para a Abordagem Clínica E Tratamento Do Hipotireoidismo Subclínico Em Adultos: Recomendações Do Departamento de Tireoide Da Sociedade Brasileira de Endocrinologia E Metabologia. **Arq Bras Endocrinol Metabol.**, v. 57, n. 3, p. 166–83, 2013.

SICHERI, R.; BAIMA, J.; MARANTE, T.; DE VASCONCELLOS, M. T. L.; MOURA, A. S.; VAISMAN, M. Low Prevalence of Hypothyroidism among Black and Mulatto People in a Population-Based Study of Brazilian Women. **Clin. Endocrinol. (Oxf).**, v. 66, n. 6, p. 803–7, 2007.

SILMAN, S.; SILVERMAN, C. Basic Audiology Testing. In: **Auditory Diagnosis: Principles and Applications**. [s.l.] SingularPublishing Group, 1997. p. 10–65.

SOHMER, H.; FREEMAN, S. Functional Development of Auditory Sensitivity in the Fetus and Neonate. **J Basic Clin Physiol Pharmacol.**, v. 6, n. 2, p. 97–108, 1995.

SONG, L.; MCGEE, J.; WALSH, E. J. The Influence of Thyroid Hormone Deficiency on the Development of Cochlear Nonlinearities. **J. Assoc. Res. Otolaryngol.**, v. 9, n. 4, p. 464–476, 2008.

SOUZA, L.; PIZA, M.; ALVARENGA, K.; CÓSER, P. **Eletrofisiologia da audição e emissões otoacústicas: princípios e aplicações clínicas**. São Paulo: Tecmedd, 2008.

SPRENKLE, P. M.; MCGEE, J.; BERTONI, J. M.; WALSH, E. J. Development of Auditory Brainstem Responses (ABRs) in Tshr Mutant Mice Derived from Euthyroid and Hypothyroid Dams. **J. Assoc. Res. Otolaryngol.**, v. 2, n. 4, p. 330–347, 2001a.

SPRENKLE, P. M.; MCGEE, J.; BERTONI, J. M.; WALSH, E. J. Consequences of Hypothyroidism on Auditory System Function in Tshr Mutant (Hyt) Mice. **J. Assoc. Res. Otolaryngol.**, v. 2, n. 4, p. 312–329, 2001b.

STAGNARO-GREEN, A. Overt Hyperthyroidism and Hypothyroidism during

Pregnancy. **Clinical obstetrics and gynecology**, v. 54, n. 3, p. 478–87, 2011.

STENZEL, D.; HUTTNER, W. B. Role of Maternal Thyroid Hormones in the Developing Neocortex and during Human Evolution. **Front Neuroanat.**, v. 7, p. 19, 2013.

SURKS, M. I.; ORTIZ, E.; DANIELS, G. H.; SAWIN, C. T.; COL, N. F.; COBIN, R. H.; FRANKLYN, J. A.; HERSHMAN, J. M.; BURMAN, K. D.; DENKE, M. A.; GORMAN, C.; COOPER, R. S.; WEISSMAN, N. J. Subclinical Thyroid Disease: Scientific Review and Guidelines for Diagnosis and Management. **JAMA**, v. 291, n. 2, p. 228–38, 2004.

SZARAMA, K. B.; GAVARA, N.; PETRALIA, R. S.; CHADWICK, R. S.; KELLEY, M. W. Thyroid Hormone Increases Fibroblast Growth Factor Receptor Expression and Disrupts Cell Mechanics in the Developing Organ of Corti. **BMC Dev Biol.**, v. 13, n. 6, p. 1–18, 2013.

UZIEL, A.; LEGRAND, C.; OHRESSER, M.; MAROT, M. Maturation and Degenerative Processes in the Organ of Corti after Neonatal Hypothyroidism. **Hear Res.**, v. 11, n. 2, p. 203–18, 1983a.

UZIEL, A.; PUJOL, R.; LEGRAND, C.; LEGRAND, J. Cochlear Synaptogenesis in the Hypothyroid Rat. **Brain res**, v. 283, n. 2–3, p. 295–301, 1983b.

UZIEL, A.; RABIE, A.; MAROT, M. The Effect of Hypothyroidism on the Onset of Cochlear Potentials in Developing Rats. **Brain res**, v. 182, n. 1, p. 172–5, 1980.

VADIVELLOO, T.; DONNAN, P. T.; MURPHY, M. J.; LEESE, G. P. Age- and Gender-Specific TSH Reference Intervals in People with No Obvious Thyroid Disease in Tayside, Scotland: The Thyroid Epidemiology, Audit, and Research Study (TEARS). **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 98, n. 3, p. 1147–53, 2013.

VANDANA; KUMAR, A.; KHATUJA, R.; MEHTA, S. Thyroid Dysfunction during Pregnancy and in Postpartum Period: Treatment and Latest Recommendations. **Arch Gynecol Obstet.**, v. 289, n. 5, p. 1137–44, 2014.

VANDERSCHUEREN-LODEWEYCKX, M.; DEBRUYNE, F.; DOOMS, L.; EGGERMONT, E.; ECKELS, R. Sensorineural Hearing Loss in Sporadic Congenital Hypothyroidism. **Arch Dis Child.**, v. 58, n. 6, p. 419–22, 1983.

VILLAGELIN, D.; COMARELLA, A. P.; TIAGO, D. B.; WARD, L. S. Management of Gestational Hypothyroidism: Results of a Brazilian Survey. **Arch Endocrinol Metab**, v. 60, n. 1, p. 16–20, 2016.

VÖLZKE, H.; ALTE, D.; KOHLMANN, T.; LÜDEMANN, J.; NAUCK, M.; JOHN, U.; MENG, W. Reference Intervals of Serum Thyroid Function Tests in a Previously Iodine-Deficient Area. **Thyroid**, v. 15, n. 3, p. 279–285, 2005.

WADA, H.; YUMOTO, S.; ISO, H. Irreversible Damage to Auditory System Functions Caused by Perinatal Hypothyroidism in Rats. **Neurotoxicol Teratol.**, v. 37, p. 18–22, 2013.

WALTERS, B. J.; ZUO, J. Postnatal Development, Maturation and Aging in the Mouse Cochlea and Their Effects on Hair Cell Regeneration. **Hear Res.**, v. 297, p. 68–83, 2013.

WANGEMANN, P.; ITZA, E. M.; ALBRECHT, B.; WU, T.; JABBA, S. V.; MAGANTI, R. J.; LEE, J. H.; EVERETT, L. A.; WALL, S. M.; ROYAUX, I. E.; GREEN, E. D.; MARCUS, D. C. Loss of KCNJ10 Protein Expression Abolishes Endocochlear Potential and Causes Deafness in Pendred Syndrome Mouse Model. **BMC Med.**, v. 20, n. 2, p. 30, 2004.

WEBER, T.; ZIMMERMANN, U.; WINTER, H.; MACK, A.; KÖPSCHALL, I.; ROHBOCK, K.; ZENNER, H.-P.; KNIPPER, M. Thyroid Hormone Is a Critical Determinant for the Regulation of the Cochlear Motor Protein Prestin. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 99, n. 5, p. 2901–6, 2002.

WENZEL, K. W.; KIRSCHSIEPER, H. E. Aspects of the Absorption of Oral L-Thyroxine in Normal Man. **Metabolism**, v. 26, n. 1, p. 1–8, 1977.

WERSINGER, E.; FUCHS, P. A. Modulation of Hair Cell Efferents. **Hear Res.**, v. 279, n. 1–2, p. 1–12, 2011.

WINTER, H.; BRAIG, C.; ZIMMERMANN, U.; ENGEL, J.; ROHBOCK, K.; KNIPPER, M. Thyroid Hormone Receptor $\alpha 1$ Is a Critical Regulator for the Expression of Ion Channels during Final Differentiation of Outer Hair Cells. **Histochem. Cell Biol.**, v. 128, n. 1, p. 65–75, 2007.

WINTER, H.; BRAIG, C.; ZIMMERMANN, U.; GEISLER, H.-S.; FRÄNZER, J.-T.; WEBER, T.; LEY, M.; ENGEL, J.; KNIRSCH, M.; BAUER, K.; CHRIST, S.; WALSH, E. J.; MCGEE, J.; KÖPSCHALL, I.; ROHBOCK, K.; KNIPPER, M. Thyroid Hormone Receptors TR $\alpha 1$ and TR β Differentially Regulate Gene Expression of Kcnq4 and Prestin during Final Differentiation of Outer Hair Cells. **J. Cell Sci.**, v. 119, n. Pt 14, p. 2975–84, 2006.

WINTER, H.; RUTTIGER, L.; MULLER, M.; KUHN, S.; BRANDT, N.; ZIMMERMANN, U.; HIRT, B.; BRESS, A.; SAUSBIER, M.; CONSCIENCE, A.; FLAMANT, F.; TIAN, Y.; ZUO, J.; PFISTER, M.; RUTH, P.; LOWENHEIM, H.; SAMARUT, J.; ENGEL, J.; KNIPPER, M. Deafness in TR Mutants Is Caused by Malformation of the Tectorial Membrane. **J Neurosci.**, v. 29, n. 8, p. 2581–87, 2009.

WONG, A. C.; RYAN, A. F. Cellular Mechanisms of Acquired Sensorineural Hearing Loss. **Front Neurosci.**, v. 28, p. 7–21, 2015.

ZHENG, Q. Y.; TONG, Y.-C. I.; ALAGRAMAM, K. N.; YU, H. Tympanometry Assessment of 61 Inbred Strains of Mice. **Hear Res.**, v. 231, n. 1–2, p. 23–31, 2007.

10. ANEXO

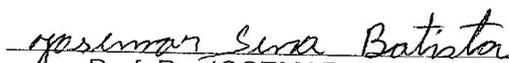


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa intitulado "REPERCUSSÕES DO HIPOTIREOIDISMO GESTACIONAL E PERINATAL EXPERIMENTAL NA FUNÇÃO AUDITIVA DA PROLE DE RATAS" Sob Coordenação do Prof. Dr. DANIEL BADAUÊ PASSOS JÚNIOR (protocolo CEPA 21/2015) foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Sergipe, em reunião realizada dia 12/06/2015.

São Cristóvão, 12 de junho de 2015.


Prof. Dr. JOSEMAR SENA BATISTA
Coordenador do CEPA/UFS

Cidade Universitária "Prof. Aloísio de Campos"
Jardim Rosa Elze - São Cristóvão - SE
49100-000
Fones: 3212 6661/6606