



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
PROGRAMA DE DOUTORADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

KALINA KELMA OLIVEIRA DE SOUSA

**EFEITOS DO HIPOTIREOIDISMO NA NEUROPATIA PERIFÉRICA EXPERIMENTAL
POR CONSTRIÇÃO CRÔNICA DO NERVO ISQUIÁTICO DE RATOS**

FORTALEZA

2017

KALINA KELMA OLIVEIRA DE SOUSA

**EFEITOS DO HIPOTIREOIDISMO NA NEUROPATIA PERIFÉRICA EXPERIMENTAL
POR CONSTRIÇÃO CRÔNICA DO NERVO ISQUIÁTICO DE RATOS**

Defesa de Tese apresentada ao Curso de Doutorado Acadêmico em Ciências Médicas, do Departamento de Medicina, na Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá

Co-orientador: Profa. Dra. Mariana Lima Vale

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- D32e de Sousa, Kalina Kelma Oliveira.
EFEITOS DO HIPOTIREOIDISMO NA NEUROPATIA PERIFÉRICA EXPERIMENTAL POR
CONSTRICÇÃO CRÔNICA DO NERVO CIÁTICO DE RATOS / Kalina Kelma Oliveira de Sousa. – 2017.
127 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação
em Ciências Médicas, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá.
Coorientação: Prof. Dr. Mariana Lima Vale.
1. hipotireoidismo. 2. neuropatia periférica. 3. gânglio da raiz dorsal. 4. isquiático. I. Título.
CDD 610
-

KALINA KELMA OLIVEIRA DE SOUSA

**EFEITOS DO HIPOTIREOIDISMO NA NEUROPATIA PERIFÉRICA EXPERIMENTAL
POR CONSTRIÇÃO CRÔNICA DO NERVO ISQUIÁTICO DE RATOS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado Acadêmico em Ciências Médicas, do Departamento de Medicina, na Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Aprovada em: ___ / ___ / _____

Prof. Dr. Roberto César- UFC

Profa. Dra. Mariana Lima Vale- UFC

Prof. Dr. Carlos Campos Câmara – UFERSA

Profa. Dra. Danielle Macedo Gaspar- UFC

Prof. Dr. Ramon da Silva Raposo- UNIFOR

Suplente: Prof. Dr. Isaac Neto Goes da Silva- UECE

Suplente: Profa. Dra. Antoniella Souza Gomes Duarte- UFC

*A Deus,
Aos meus pais, irmãos tios e primos.
À minha amada mãe (in memoriam)*

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela minha vida, pelas constantes oportunidades, provações, desafios e conquistas alcançadas.

Ao meu pai **Aldivan Dias de Oliveira**, pelo incentivo e confiança; a minha mãe **Dalvanira Laura de Sousa**, pelo amor dado a mim em vida, sendo meu exemplo de força, fé e dignidade. A todos os **Familiares** e **Amigos** pela compreensão da minha ausência neste período de minha formação acadêmica, como também eterno amor e afeto.

Aos meus irmãos **Aldivan Dias de Oliveira Júnior, Kélen Rejane Oliveira de Sousa e Katiane Régia Oliveira de Sousa**, aos tios e primos pelo constante incentivo e apoio.

À minha tia-mãe, **Rita Laura de Sousa Leal**, pelo incentivo e pela eterna disponibilidade em ajudar.

Ao meu orientador **Reinaldo Barreto Oriá**, com todo respeito, agradeço por ter aceitado minha orientação, por todo empenho, sabedoria, compreensão, exigência e grande pesquisador que és, Deus o ilumine sempre. Muito obrigado!

A minha co-orientadora **Mariana Lima Vale**, que com sua doçura sempre me atende com gentileza e atenção, tornando ainda maior minha admiração como pessoa, brilhante profissional e grande pesquisadora, meu muito obrigado, pela força e pelo incentivo maior, ferramentas imprescindíveis a realização deste projeto.

Agradeço ao **Prof. Dr. Issac Neto** pela colaboração voluntária e de grande importância para o início deste trabalho.

Aos professores da Banca **Dra. Antoniella Souza Gomes Duarte, Dr. Carlos Campos Câmara, Dra. Danielle Macedo Gaspar, Dr. Ramon da Silva Raposo e ao Dr. Isaac Neto Goes da Silva**, obrigado pela atenção, disponibilidade, profissionalismo e comprometimento com a ciência. Meu muito obrigada.

Aos professores do **Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas** pela dedicação e profissionalismo.

A **Rosymeire Freire** e a central analítica da Universidade Federal do Ceará, por todo o profissionalismo e dedicação em prol da ciência.

A todos do **Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas**, em especial a **Ivone** e a **Rita**, por seus excelentes trabalhos e auxílios essenciais neste trajeto e por apoiar continuamente a evolução da qualidade formativa deste programa. Meus sinceros agradecimentos.

Aos colegas do **Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas** e, em especial, à **Allan Rodrigo Soares Maia e Howard Lopes Ribeiro Júnior**, pela sincera e estimada amizade conquistada ao longo de tantos momentos.

Aos meus amigos dos laboratórios: **LABICONTE, LAFICA e NEMPI**, Camila Queiroz, Tiê, Orleâncio, Raquel, Dulce, Cristiane, Luiz, Italo, Diego Bernarde, Fábio, Anamaria, Bruno, Camila Meireles, Camila Rodrigues, Luiza Clertiane, Mario Roberto, Luane, Carol, Ana Paula, Amanda, Vandinha, Denilde, Jaqueline, Josiane, Deysiane, Flávia, Júnior e a todos que colaboraram de forma direta e indireta para a realização deste trabalho.

À **Profa. Dra. Delane Viana Gondim**, a **Helson Freitas da Silveira**, e à todos os meus amigos da **UFC** pela amizade, apoio, compreensão e profissionalismo. Meus sinceros agradecimentos.

Ao professor **José Henrique Leal Cardoso** da Universidade Estadual do Ceará, por ser meu pai científico desde do mestrado acadêmico, a professora. **Andreлина Noronha** pela atenção a mim dispensada desde o mestrado, meus sinceros agradecimentos.

Ao Professor Otoni Cardoso do Vale “*in memoriam*”, pelo seu excelente trabalho , como médico, professor e pesquisador

Aos meus amigos **Silvia Fernanda Oliveira, Claudia Rubia, Michelle Costa, Eduardo Ribeiro, Keila Martins, Hermogenes David, Magnely Moura David, Daniel e Carol Mitchel, a Marcelo Queiroz**, obrigado a Deus por estarem em minha vida.

A **Desiere de Sousa Leal** por me presentear todos os dias com a presença de **Vitor e Miguel** , obrigada prima.

A **Vida**, por me ensinar que o ontem eu devo esquecer, que o hoje eu devo existir e que para o amanhã eu nunca devo deixar de sonhar.

*“Ave Maria, gratia plena, Dominus tecum; Benedicta tu in mulieribus, Et benedictus fructus ventris tui, Jesus.
Sancta Maria, Mater Dei, Ora pro nobis peccatoribus, Nunc et in hora mortis nostrae”*

*"Falam muito da beleza da certeza como se ignorassem a beleza sutil da dúvida. Crer é muito
monótono; a dúvida é apaixonante."
Oscar Wilde*

*“Totus Tuus”
(Santíssimo Papa João Paulo II)*

RESUMO

Os hormônios tireoidianos são ativos participantes no crescimento da diferenciação celular e no metabolismo do organismo, sendo essenciais para o desenvolvimento somático e neural. A ausência desses hormônios no sistema nervoso central e periférico, resulta em estados patológicos, como a redução do desenvolvimento da árvore dendrítica, do número de sinapses axônio-dendrito, além de provocar defeitos de mielinização. A dor neuropática é originada por lesão neural, característica da neuropatia periférica, comum na clínica neurológica. Entretanto, os eventos e modificações que podem ocorrer na neuropatia periférica durante um quadro de hipotireoidismo ainda são pouco estudados. No contexto de importância dos hormônios para o desenvolvimento do sistema nervoso o presente estudo foi desenhado com o intuito de se entender os efeitos do hipotireoidismo na neuropatia experimental induzida pela constrição crônica do nervo isquiático (ICC) em ratos, avaliando o comportamento nociceptivo e os aspectos morfológicos e neuroquímicos do dano neural. Metodologia: O hipotireoidismo foi induzido em ratos Wistar machos, pesando entre 200 e 250g, pelo consumo diário de propiltiuracil (PTU) na água de beber a 0,05%, e pesados semanalmente, durante 6 semanas. A neuropatia periférica foi induzida por injúria por constrição crônica (ICC) no nervo isquiático dos ratos, na 3ª semana de uso do PTU. O hipotireoidismo foi comprovado pela dosagem de tiroxina (T4) sanguínea no plexo orbitário. Para a avaliação da dor neuropática os animais foram submetidos ao teste de hiperalgesia mecânica plantar, utilizando Von Frey eletrônico, antes da indução de hipotireoidismo e após a ICC, durante três semanas (21 dias). Posteriormente realizou-se a eutanásia, foram retirados os tecidos da tireoide, do nervo isquiático e do gânglio da raiz dorsal. A análise histológica da glândula tireoide foi realizada pelo método de coloração de hematoxilina e eosina (HE), pesada e suas medidas foram realizadas através de um paquímetro. A análise morfométrica por imunofluorescência da proteína básica de mielina (PBM) no nervo isquiático, o fator de transcrição de ativação 3 (ATF-3) e o onco-gene de transcrição imediata (c-Fos) nos gânglios da raiz dorsal (GRD), foram utilizados para avaliar dano neuronal e alteração da atividade desses marcadores no hipotireoidismo e neuropatia periférica. A microscopia eletrônica foi realizada no nervo isquiático e medidas de área e diâmetro das fibras foram analisadas. As diferenças foram avaliadas através do teste t-Student e ANOVA com $p < 0,05$. Resultados: Os grupos com hipotireoidismo (HIPO) e hipotireoides e neuropáticos (HIPO+ICC) apresentaram redução da tiroxina até a terceira semana, não obtiveram ganho ponderal, durante as seis semanas, apresentaram aumento nas medidas da tireoide, alteração no formato folicular e células hiperplásicas, comparados ao controle; no GRD apresentaram aumento da imunexpressão de c-Fos comparados ao controle e diminuição da imunexpressão de ATF-3 comparados ao grupo neuropático (ICC), no nervo isquiático; os grupos ICC, HIPO e HIPO+ICC apresentaram aumento da imunexpressão da PBM com relação ao controle. O grupo HIPO apresentou aumento no limiar de retirada da pata enquanto que o ICC e HIPO+ICC diminuíam em relação ao controle, o grupo HIPO+ICC o limiar apresentou-se maior em relação ao ICC. As análises histológica e morfométrica do nervo, no grupo HIPO, apresentaram desmielinização vacuolar em HE e alterações na bainha de mielina, diminuição do diâmetro de fibras de pequeno e médio calibre e aumento da área dos axônios comparados ao controle. Conclusão: Nossos dados demonstraram que no hipotireoidismo há um aumento no limiar de dor e também associado a uma neuropatia periférica; os marcadores de dor e regeneração neural estão alterados no GRD e no nervo isquiático há alterações morfológicas sugestivas de uma degeneração Walleriana.

Palavras Chave: neuropatia periférica, gânglio da raiz dorsal, hipotireoidismo, nervo isquiático

ABSTRACT

Thyroid hormones are active participants in the growth of cell differentiation and in the metabolism of the organism, being essential for somatic and neural development. The absence of these hormones in the central and peripheral nervous system results in pathological conditions, such as the reduction of dendritic tree development, the number of axon-dendrite synapses, and cause myelination defects. Neuropathic pain is caused by neural damage, characteristic of peripheral neuropathy, common in the neurological clinic, and has been studied by several researchers. However, the events and modifications that may occur in peripheral neuropathy during hypothyroidism are still poorly studied. In the context of the importance of hormones for the development of the nervous system, the present study was designed to understand the effects of hypothyroidism on experimental neuropathy induced by chronic constriction of the sciatic nerve (CCI) in rats, evaluating nociceptive behavior and aspects Morphological and neurochemical effects of neural damage. **Method:** Hypothyroidism was induced in male Wistar rats, weighing between 200 and 250g, by daily consumption of propylthiouracil (PTU) in drinking water at 0.05%, and weighed weekly for 6 weeks, peripheral neuropathy was induced by injury By chronic constriction (CCI) in the sciatic nerve of rats, using the Bennet and Xie model, in the 3rd week of PTU use, hypothyroidism was confirmed by blood thyroxine (T4) in the orbital plexus. For the evaluation of neuropathic pain the animals were submitted to the mechanical plantar hyperalgesia test, using electronic Von Frey, before induction of hypothyroidism and after CCI, for three weeks (21 days). Later, the animals were euthanized and the thyroid, the sciatic nerve and the dorsal root ganglion were removed. The histological analysis of the thyroid gland was performed by the hematoxylin and eosin (HE) staining method, and its measurements were performed through a pachymer. The morphometric analysis by immunofluorescence of the myelin basic protein (PBM) in the sciatic nerve, the activation transcription factor 3 (ATF-3) and the onco-transcription gene (c-Fos) in the dorsal root ganglia (GRD) , to assess neuronal damage and alteration of the activity of these markers in hypothyroidism and peripheral neuropathy. Electron microscopy was performed on the sciatic nerve and measurements of area and diameter of the fibers were analyzed. Differences were assessed using Student's t-test and ANOVA with $p < 0.05$. **Results:** Hypothyroidism and hypothyroid and neuropathic groups (HYP + CCI) showed reduction of thyroxine up to the third week, did not gain weight during the six weeks, presented increase in thyroid measurements, alteration in follicular shape and hyperplastic cells , Compared to control; In the GRD presented increased c-Fos immunoexpression compared to the control and decrease of the ATF-3 immunoexpression compared to the neuropathic group (CCI) in the sciatic nerve; The CCI, HYP and HYP + CCI groups showed increased immunoexpression of PBM in relation to the control group. The HYP group presented an increase in the paw withdrawal threshold while the CCI and HYP + CCI decrease compared to the control, the HYP + CCI group the threshold was higher in relation to the CCI. The histological and morphometric analysis of the nerve in the HYP group presented vacuolar demyelination in HE and alterations in the myelin sheath, decrease in the diameter of small and medium caliber fibers and increase of the area of the axons compared to the control. **Conclusion:** Our data demonstrated that in hypothyroidism there is an increase in pain threshold and also associated with peripheral neuropathy; the markers of pain and neural regeneration are altered in the DRG and in the sciatic nerve there are morphological alterations in the suggestive of a Wallerian degeneration.

Keywords: peripheral neuropathy, dorsal root ganglion, hypothyroidism, sciatic nerve

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Morfologia do tecido tireoidiano.	19
Figura 2: Iodação e incorporação do iodo aos radicais tirosina dos hormônios tireoidianos.	22
Figura 3: Ação das deiodinases na conversão de T ₄ em T ₃ ativo.	24
Figura 4: Diagrama esquemático dos principais fatores que regulam a ação dos hormônios tireoidianos a nível celular.	26
Figura 5: Representação da via espinotalâmica, a principal via ascendente que conduz a informação nociceptiva.	34
Figura 6: Sumário dos principais mecanismos da gênese dor neuropática	37
Figura 7: Modelos de ferimentos mecânicos no nervo isquiático de roedores.	43
Figura 8: Diâmetros dos axônios e velocidades de condução no nervo periférico.	45
Figura 9: Gânglio da raiz dorsal (GRD) com os corpos celulares dos neurônios sensitivos na raiz dorsal.	46
Figura 10: Registro eletrofisiológico do potencial de ação composto.	53
Figura 11: Dados eletrofisiológico da excitabilidade neural do nervo isquiático de rato	54
Figura 12: Dados eletrofisiológicos na velocidade condução nervosa do nervo isquiático de rato	55
Figura 13: Protocolo experimental	59
Figura 14: Modelos experimentais de lesão mecânica no nervo isquiático de roedores	61
Figura 15.A: Grupo I: Controle, animais eutireoideos e sem neuropatia	62
Figura 15.B: Grupo II: ICC, animais eutireoideos com neuropatia	63
Figura 15.C: Grupo III: HIPO, animais hipotireoideos sem neuropatia	63
Figura 15.D: HIPO + ICC, animais hipotireoideos com neuropatia,	64
Figura 16: Teste de alodínia plantar (Von Frey Eletrônico).	65
Figura 17: Teste de alodínia plantar (Von Frey Eletrônico).	66
Figura 18: Criostato (Leica) utilizado para os cortes dos tecidos nervosos para Imunofluorescência	68
Figura 19: Fotomicrografia da análise histopatológica da glândula tireoide de ratos controle, hipotireoideos (HIPO), neuropáticos (ICC) e neuropáticos e hipotireoide(HIPO+ICC).	84
Figura 20: Fotomicrografia da imunoexpressão de ATF-3 no gânglio da raiz dorsal de ratos controle, hipotireoideos (HIPO), neuropáticos (ICC) e neuropáticos e hipotireoideos (HIPO+ICC).	86

- Figura 21:** Fotomicrografia da imunexpressão de c-Fos no gânglio da raiz dorsal de ratos controle, hipotireoideos (HIPO), neuropáticos (ICC) e neuropáticos e hipotireóideos (HIPO+ICC). 89
- Figura 22:** Fotomicrografia da imunexpressão de PBM no nervo isquiático de ratos controle, hipotireoideos (HIPO), neuropáticos (ICC) e neuropáticos e hipotireóideos (HIPO+ICC). 92
- Figura 23:** Fotomicrografia representativa dos nervos isquiáticos de ratos controle e hipotireoideos (HIPO) 96
- Figura 24:** Fotomicrografia da microscopia eletrônica (ME) do nervo isquiático de ratos controle e hipotireoidismo (HIPO). 98

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1:** Evolução do ganho ponderal em ratos tratados com PTU (HIPO e HIPO+ICC) e ratos não tratados com PTU (Controle e ICC) durante 42 dias. 47
- Gráfico 2:** Dosagem hormonal de T4 sérico em ratos tratados com PTU (PTU: HIPO e HIPO+ICC) e ratos não tratados com PTU (Controle: Controle e ICC) na 3ª. Semana após a ingestão de PTU. 73
- Gráfico 3:** Dosagem hormonal de cortisol sérico em ratos tratados com PTU (PTU: HIPO e HIPO+ICC) e ratos não tratados com PTU (Controle: Controle e ICC) na 3ª. Semana após a ingestão de PTU. 75
- Gráfico 4:** Evolução comparativa da hiperalgesia mecânica plantar em ratos submetidos a indução do hipotireoidismo e ICC. 77
- Gráfico 5. A:** Peso da glândula tireóide em ratos tratados com PTU (PTU: HIPO e HIPO+ICC) e ratos não tratados com PTU (Controle e ICC) após a ingestão de PTU. 79
- Gráfico 5.B:** Comprimento vertical da tireoide nos lobos direito e esquerdo em ratos tratados com PTU (PTU: HIPO e HIPO+ICC) e ratos não tratados com PTU (Controle e ICC) após a ingestão de PTU. 80
- Gráfico 5.C:** Comprimento vertical da tireoide nos lobos direito e esquerdo em ratos tratados com PTU (PTU: HIPO e HIPO+ICC) e ratos não tratados com PTU (Controle e ICC) após a ingestão de PTU. 81
- Gráfico 6:** Análise quantitativa para expressão de ATF-3 no GRD em ratos submetidos a indução do hipotireoidismo e ICC. 87
- Gráfico 7:** Análise quantitativa para expressão de c-Fos no GRD em ratos submetidos a indução do hipotireoidismo e ICC. 90
- Gráfico 8:** Análise quantitativa para expressão de PBM no nervo isquiático em ratos submetidos a indução do hipotireoidismo e ICC. 93
- Gráfico 9:** Análise dos diâmetros das fibras no nervo isquiático em ratos controle e hipotireoideos. 99
- Gráfico 10:** Análise quantitativa da área marcada no nervo isquiático em ratos controle e hipotireoideos. 100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das fibras nervosas de mamíferos. A classificação do grupo I a IV aplica-se somente a fibras sensoriais.	33
Tabela 2: Modelos animais de indução neuropatia periférica com os mecanismos envolvidos	80
Tabela 3: Efeito da indução do hipotireoidismo sobre o comprimento horizontal e vertical da tireoide medição em (mm).	92
Tabela 4: Efeito da indução do hipotireoidismo e injúria por constrição crônica sobre a imunofluorescência do ATF-3, c-Fos e PBM.	92

LISTA DE ABREVIATURAS

ATF-3	Fator de Transcrição de Ativação 3
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
CNTF	Fator Neurotrófico Ciliar
CPO	Células precursoras de oligodendrócitos
CSN	Células Estaminais Neurais
D1	Desiodases Tipo 1
D2	Desiodases Tipo 2
D3	Desiodases Tipo 3
DIT	Diiidotironina
FCE	Fator de Crescimento Epidérmico
FCF	Fator de Crescimento de Fibroblastos
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GDNF	Neurotrófico Derivado da Glial
GH	Hormônio de Crescimento
GNF	Fator de Crescimento Nervoso
GRD	Gânglios da Raiz Dorsal
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HT	Hormônios Tireoidianos
ICC	Injúria por Constricção Crônica
IGF-I	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina – I
LH	Hormônio Luteinizante
LIF	Fator Inibitório para Leucemia
MAPK	Mitose Ativada Proteína Quinase
MIT	Monoiodotironina
NF	Neurofilamentos
NGF	Fator de Crescimento Neural
NIS	Transportador Transmembrana Específico
NT-3	Factor Neurotrófico 3
NT-4	Factor Neurotrófico 4
PBM	Proteína Básica de Mielina
PLP	Proteína Proteolipídica
RT	Hormônio Tireoidiano

SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SVZ	Região Ventricular/ Subventricular
T ₃	Triiodotironina
T ₄	Tiroxina
TG	Tireoglobulina
TGF- β	Fator de Crescimento Tumoral- β
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TPO	Peroxidase Tireoidiana
TRH	Hormônio Liberador de Tireotrofina
TSH	Hormônio Estimulante da Tireóide

SUMARIO

1.INTRODUÇÃO	19
1.1. GLÂNDULA TIREÓIDE	19
1.2. MORFOLOGIA	19
1.2.1. Hormônios tireoidianos	21
1.2.2. Síntese dos hormônios tireoidianos	23
1.2.3. Mecanismo de Ação dos Hormônios Tireoidianos	25
1.2.4. Ações gerais dos Hormônios Tireoidianos	27
1.2.5. Ações específicas do hormônio tireoidiano no SNC e SNP	28
1.3. MECANISMO DE AÇÃO DOS TIOUREILENOS	31
1.4. DOR	32
1.4.1. Neuropatia periférica	36
1.4.2. Modelos de dor neuropática	40
1.4.3. Nervo Isquiático	44
1.4.4. Degeneração Walleriana	47
1.4.5. Regeneração neural	48
1.4.6. Remielinização	49
1.4.7. Proteína Básica da Mielina – PBM	52
1.4.8. Fator de transcrição de ativação 3 (ATF-3)	54
1.4.9. Hipotireoidismo e Neuropatia periférica	55
2. JUSTIFICATIVA	56
3. OBJETIVOS	57
3.1. Objetivo Geral	57
3.2. Objetivos Específicos	57
4. MATERIAIS E MÉTODOS	58
4.1. Animais	58
4.2. Pesagem dos Ratos	58
4.3. Indução do Hipotireoidismo	58
4.4. Coleta Sanguínea e Mensuração do hormônio tireoidiano	60

4.5. Modelo de Indução da mononeuropatia: Injúria por constrição crônica (ICC) do nervo isquiático.	60
4.6. Desenhos experimentais	62
4.7. Teste de alodínia mecânica (<i>Von Frey</i> eletrônico)	65
4.8. Coleta do nervo isquiático, gânglios da raiz dorsal e glândula tireóide	66
4.9. Análise histopatológica da tireoide	66
4.9.1. Imunofluorescência para ATF-3, c-Fos e PBM em nervo isquiático e gânglio da raiz dorsal.	67
4.9.2. Microscopia eletrônica nervo isquiático	68
4.9.3. Análise da microscopia eletrônica no nervo isquiático	69
4.9.4. Procedimentos de eutanásia	69
4.10. Estatística	70
5. RESULTADOS	71
5.1. Efeito da indução do hipotireoidismo sobre o ganho ponderal	71
5.2. Dosagens hormonais	72
5.2.1. Concentração sérica do hormônio tireoidiano, tiroxina (T4) após três semanas do uso do PTU	72
5.2.2. Concentração sérica de cortisol após três semanas do uso do PTU	74
5.3. Avaliação do limiar nociceptivos no teste de hiperalgesia mecânica plantar em ratos submetidos a indução do hipotireoidismo experimental e injúria por constrição crônica.	76
5.4. Efeito da indução do hipotireoidismo sobre o peso e as dimensões a glândula tireoide após seis semanas	78
5.5. Estudo histológico da glândula tireoide	83
5.6. Imunofluorescência para ATF-3 em gânglio da raiz dorsal em ratos submetidos a indução do hipotireoidismo e injúria por constrição crônica ICC.	85
5.7. Imunofluorescência para c-Fos em gânglio da raiz dorsal em ratos submetidos a indução do hipotireoidismo e injúria por constrição crônica ICC.	88
5.8. Imunofluorescência para PBM de nervo isquiático em ratos submetidos a indução do hipotireoidismo e injúria por constrição crônica ICC.	91
5.8.1. Estudo histológico do nervo isquiático	93
5.8.2. Microscopia eletrônica do nervo isquiático	97
6. DISCUSSÃO	101
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	112

8. CONCLUSÕES	114
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115
10. ANEXOS	128

1. INTRODUÇÃO

1.1. GLÂNDULA TIREÓIDE

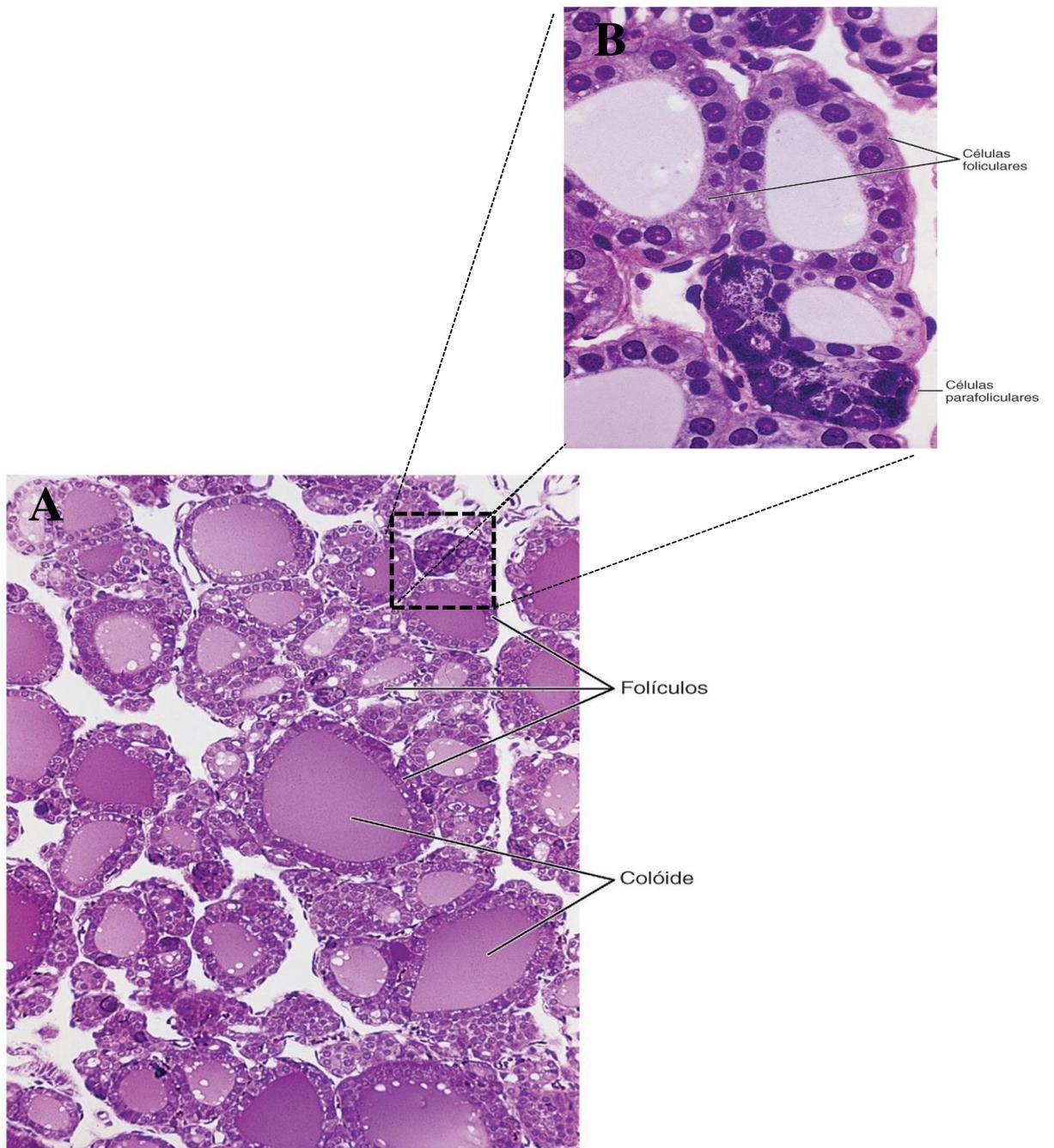
A glândula tireoide (do grego *thyreos* = escudo) é composta por um lobo direito e esquerdo e localizam-se ântero-lateralmente, unidos por um istmo de parênquima glandular localizado no plano médio-ventral, abaixo da cartilagem cricoide, e se apoia frouxamente sobre a traqueia anterior. Desenvolve-se como um divertículo da faringe primitiva, que se inicia na terceira semana de vida intra-uterina a partir do endoderma, sendo a primeira a aparecer no embrião humano, em seguida desce para porção inferior do pescoço, dividindo-se nos lobos, encontrados lateralmente á traqueia. Cada lobo mede cerca de 2,0 – 2,5 cm de comprimento e pesa em torno de 15-25 g no homem adulto. A inervação é simpática e irrigação é realizada pelas artérias tireoideas superiores e inferiores (KRATZSCH & PULZER, 2008; LOEVNER *et al* 2008; MIHAI, 2014).

A histogênese da tireoide envolve a diferenciação da massa celular sólida, que adquire o aspecto folicular por volta da 10.^a semana. Nesta época há a gênese da tireoglobulina (TG). Na 12.^a semana há aparecimento das funções específicas do órgão que está diretamente relacionado com a formação da estrutura glandular e a biossíntese dos hormônios tireoidianos (HT) (LOEVNER *et al* 2008).

1.1.2. MORFOLOGIA

O tecido tireoidiano é composto de folículos de estrutura esferoidal (**Figura 1, A**). Aproximadamente três milhões de foliculos medindo 50-500 µm em seu diâmetro e cada folículo está organizado em uma camada única de células cúbicas, circundado por uma pequena quantidade de tecido conjuntivo contendo muitos capilares que ocupam o espaço interfolicular. No polo basal das células foliculares, estão presentes os receptores para TSH (hormônio estimulante da tireóide) e outros fatores reguladores (LAURIE *et al* 2008; KRATZSCH & PULZER, 2008; SARKAR & SINGH, 2016).

Figura 1: Morfologia da glândula tireoide



(A) A tireoide formada por milhares de pequenas esferas chamadas de folículos tireoidianos, preenchidos por colóide. Pararrosanilina-toluidina, menor aumento; (B) Corte da tireoide mostrando os folículos formado pelas células foliculares e parafoliculares, produtoras de calcitonina. Pararrosanilina-toluidina maior aumento. **Fonte:** Junqueira e Carneiro, 2008.

O lúmen folicular, das células foliculares da tireoide, é preenchido com tireoglobulina, o retículo endoplasmático rugoso e o complexo de Golgi que são bastante desenvolvidos e ocupam posição intracelular, favorecendo a síntese e direcionamento de proteínas específicas da tireoide, a tireoglobulina (TG) e a peroxidase tireoidiana (TPO) para região apical da célula folicular (SOUSA 2001).

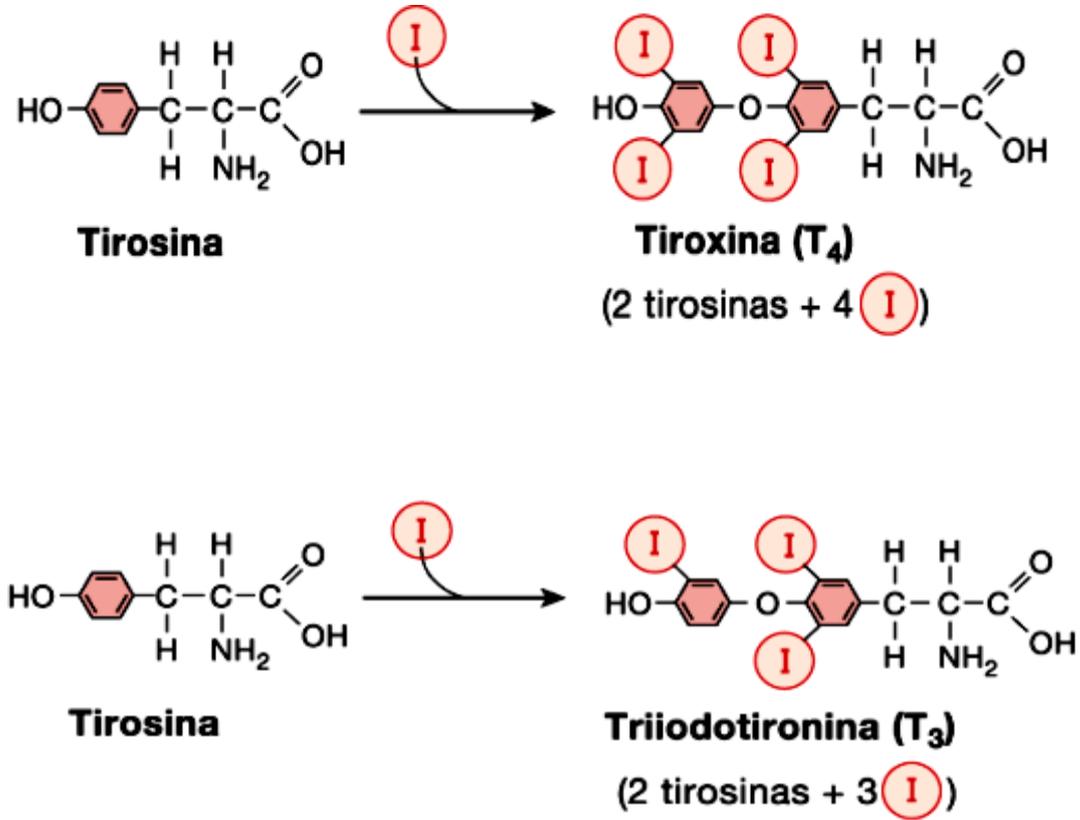
Os hormônios tireoidianos, ligados a tireoglobulina, permanecem armazenados no coloide e quando requisitados, são liberados como iodotironinas hormonalmente ativas. A atividade hormonal é controlada pelo eixo hipotálamo-hipófise-tireoide, através do modelo *feedback* negativo (SARKAR & SINGH, 2016).

A função primária da tireoide, é a síntese de hormônios triiodotironina (T_3) e tiroxina (T_4), que são formados pela incorporação do iodo as moléculas de tirosina, localizadas no coloide. As células parafoliculares, denominadas células C (**Figura 1, B**) que são fonte do hormônio polipeptídico calcitonina, que participa na homeostase do cálcio, sendo secretado em resposta ao aumento da calcemia (LOEVNER *et al* 2008).

1.2.1. Hormônios tireoidianos

Os hormônios tireoidianos são produzidos em um processo que envolve o transporte ativo do iodo para dentro do folículo através do transportador transmembrana específico (NIS), sua oxidação e incorporação em resíduos tirosina na molécula de tireoglobulina (**Figura 2**) (MIHAI, 2014). A iodação de tirosinas resulta em resíduos monoiodotironina (MIT) e diiodotironina (DIT) que são enzimaticamente ligados para formar tetra-iodotironina ou tiroxina (T_4) e triiodotironina (T_3) (WAJNER *et al.* 2008) conhecidos como hormônios-chave para o metabolismo corporal, sendo T_3 a forma funcionalmente mais ativa (BHUMIKA&DARRAS, 2014) (**Figura 2**).

Figura 2: Iodação e incorporação do iodo aos radicais tirosina dos hormônios tireoidianos.



Aminoácidos tirosina incorporando as moléculas de iodo aos seus radicais; Tiroxina (T₄) ligação com dois aminoácidos tirosina e incorporação de quatro iodios; Triiodotironina (T₃) ligação com dois aminoácidos tirosina e incorporação de três iodios. **Fonte:**Silverthorn, 2015.

1.2.2. Síntese dos hormônios tireoidianos

A síntese e secreção dos hormônios tireoidianos são reguladas pelo sistema de *feedback* negativo que envolve o hipotálamo, hipófise e glândula tireoide (eixo hipotálamo/hipófise/tireoide). O hormônio liberador de tireotrofina (TRH) é um tripeptídeo (piroglutamil-histidil-proliamida) sintetizado no núcleo paraventricular do hipotálamo. Este é transportado via axônios da eminência mediana, para a hipófise anterior pelo sistema porta-hipotálamo-hipofisário (LOEVNER *et al* 2008; SARKAR & SINGH, 2016).

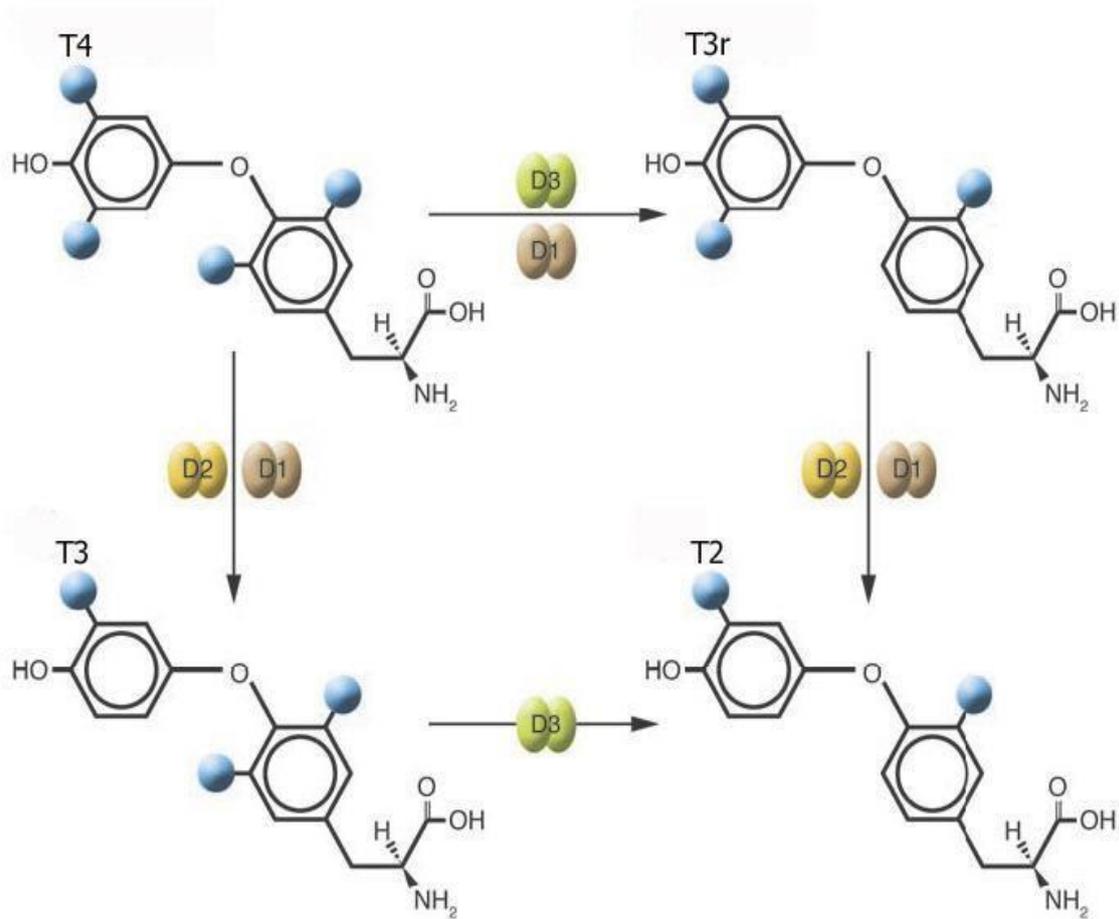
O TRH liga-se aos receptores na hipófise, e uma subpopulação de células hipofisárias sensíveis (células tireotróficas) levam a liberação do hormônio estimulante da tireoide (TSH) ou hormônio tireotrófico. (BHUMIKA&DARRAS, 2014), estimulando a secreção de TSH. O TSH é uma glicoproteína com 28 kDa, composta por duas subunidades α e β . A subunidade α é comum em outros hormônios como o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH). A subunidade β confere a atividade biológica específica (YEN, 2001; WAJNER *et al.* 2008).

A secreção do TRH e do TSH é regulada negativamente pelos hormônios tireoidianos. Um importante mecanismo para regulação negativa do TSH é a conversão na hipófise de T_4 em T_3 ou na circulação pela desidase tipo 2 ($5'$ -D2). Além disso a dopamina e a somatostatina do hipotálamo regulam negativamente a secreção de TSH. O TSH é regulador primário da liberação e secreção dos hormônios tireoidianos, também tem um importante papel no crescimento e desenvolvimento da tireoide (BHUMIKA&DARRAS, 2014). O TSH estimula a captação de iodo, a síntese de tireoperoxidase (TPO) e tireoglobulina (TG), a geração intracelular de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e parece influenciar na reabsorção do coloide (QUATRINNI, *et al* 1993; YEN, 2001).

A transformação metabólica do hormônio tireoidiano nos tecidos periféricos envolve uma série de reações enzimáticas complexas, dentre as quais a desidase é o mecanismo para a ativação ou desativação hormonal. As desidases tipo 1 (D1) e tipo 2 (D2) catalisam esta reação. A desidase tipo 1 (D1) catalisa a desidase tanto do anel fenólico quanto do anel tirosínico convertendo T_4 a T_3 , T_4 a T_{3r} (triiodotironina reverso) e T_3 e T_{3r} a T_2 (diiodotironina), enquanto a desidase tipo 2 (D2) atua exclusivamente

no anel fenólico das iodotironinas, convertendo T_4 a T_3 e T_{3r} a T_2 ; a desiodase tipo 3 (D3) T_4 a T_{3r} e T_3 a T_2 (WEINBERGER *et al.*, 1996; WAJNER *et al.* 2008) (**Figura 3**).

Figura 3: Ação das desiodases na conversão de T_4 em T_3 ativo.



Esquema representativo das enzimas desiodases. D3 e D1 catalisam a desiodação do anel interno, convertendo T_4 em T_{3r} e T_3 em T_2 . D2 e D1 catalisam a desiodação do anel externo, convertendo T_4 em T_3 e T_{3r} em T_2 . T_4 : tiroxina T_3 : triiodotironina; T_2 : diiodotironina; T_{3r} : triiodotironina reverso. As bolas azuis representam a molécula de iodo. **Fonte:** Adaptado de Bianco e Kim (2006).

1.2.3. Mecanismo de Ação dos Hormônios Tireoidianos

A ação dos hormônios nas células alvo é a nível gênico através da associação de proteínas específicas com os receptores nucleares, que estão firmemente ligados à molécula de DNA. Dessa interação resultam modificações da expressão de genes específicos, modificando o conjunto de proteínas que são expressas nas células alvo. No interior celular, o T_4 é convertido em T_3 ou T_{3r} (OPPENHEIMER *et al.*, 1987). O transporte dos hormônios tireoidianos dentro das células-alvo parece ser através de difusão passiva ou via mecanismo de transporte, e promove a junção de proteínas para que ocorra o transporte intracelular uma vez dentro da célula (LAZAR, 1993), fixam-se aos receptores nucleares de hormônio tireoidiano (RT) (**Figura 4**), que são da superfamília dos receptores nucleares da vitamina D e que incluem estrógeno, glicocorticoides e ácido retinóico (SAP *et al.*, 1986, WEINBERGER *et al.*; 1986).

Os hormônios tireoidianos são secretados pela glândula tireóide na corrente sanguínea a maioria dos hormônios tireoidianos plasmáticos consiste na forma menos ativa tiroxina (T_4), enquanto a mais ativa, 3,5,3-triiodotironina (T_3), é menos abundante (HULBERT, 2009). Ao atingir a célula alvo, os hormônios tireoidianos são transferidos para o citoplasma das células por transportadores transmembranas (FRIESEMA *et al.*, 2003; ARJONA *et al.*, 2011 VISSER *et al.*, 2011; EBLING, 2014; MUZZIO *et al.*, 2014) (**Figura 4**).

Figura 4: Diagrama esquemático dos principais fatores que regulam a ação dos hormônios tireoidianos a nível celular.

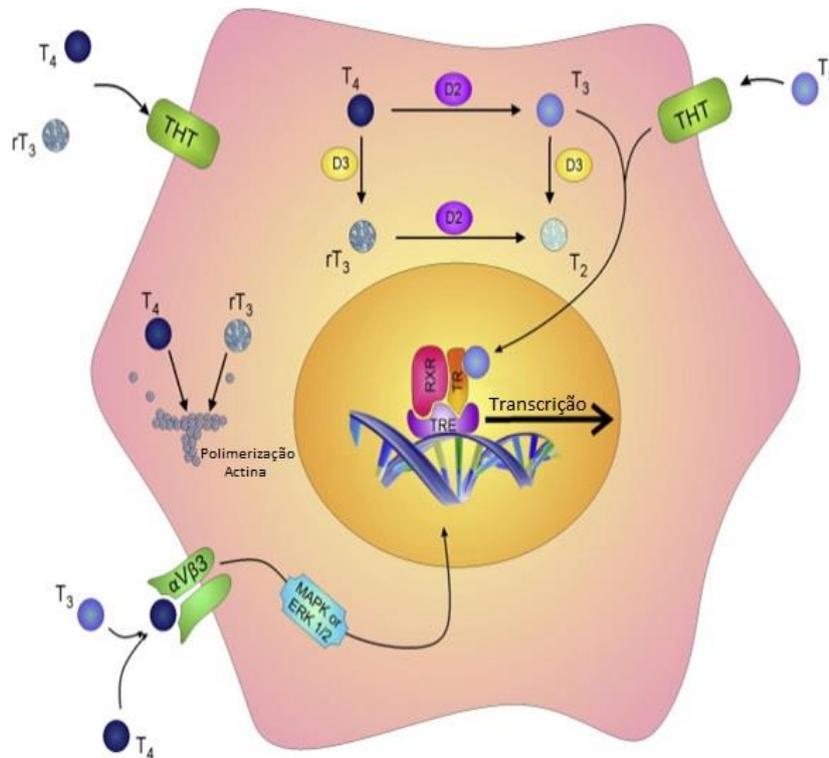


Diagrama esquemático dos principais fatores que regulam a ação dos hormônios tireoidianos a nível celular. Os transportadores dos hormônios tireoidianos (HT) medeiam o influxo de hormônios através da membrana plasmática, as deiodinases ativam e inativam HTs intracelularmente. Os receptores tireoidianos (RT) nucleares medeiam a atividade de HT ao nível da transcrição de genes. As ações não-genômicas dos HT ocorrem no citoplasma, incluindo controle de polimerização da actina e o controle indireto da transcrição genética através da via MAPK/ERK. O transportador de hormônios tireoidianos (THT), D1 a D3 enzima deiodinase tipo 1 (D1), tipo 2 (D2) ou tipo 3 (D3); receptor integrina (αVβ3); receptor de hormônio tireoidiano (TR), receptor nuclear de hormônio tireoidiano (TR), receptor retinóico RXR, proteína quinase ativada por mitose (MAPK), quinase ativada por sinalização extracelular (ERK) tiroxina (T₄); triiodotironina (T₃); triiodotironina reverso (rT₃) e diiodotironina (T₂).

Fonte: Bhumika & Darras, 2014.

As desiodases presentes no núcleo celular controlam a proporção de diferentes formas de hormônios tireoidianos. No sistema nervoso, T_4 é convertido em T_3 principalmente pela enzima desiodinase tipo 2 (D2) enquanto T_4 e T_3 são convertidos por a enzima desiodinase tipo 3 (D3) para rT_3 e T_2 , respectivamente (**Figura 3**). A desiodase de Tipo 1 (D1) pode ativar ou desativar os hormônios tireoidianos, mas é apenas expressa em níveis baixos no sistema nervoso (BIANCO & KIM, 2006; EBLING, 2014).

A expressão de desiodase pode mudar de acordo com a disponibilidade dos hormônios tireoidianos no sistema de *feedback*. D2 é o sistema de “*up-regulation*” no hipotireoidismo em uma tentativa de restabelecer níveis normais de T_3 dentro das células, enquanto a expressão de D3 é aumentada durante a tirotoxicose (BIANCO & KIM, 2006).

Os sinais dos hormônios tireoidianos são enviados principalmente através dos receptores nucleares (RTs). Os vertebrados têm dois subtipos de receptores, $RT\alpha$ e $RT\beta$, codificados por dois genes, $Thra$ e $Thrb$ e suas isoformas variam nos diferentes tipos de vertebrados (DARRAS *et al.*, 2011, FLAMANT & GAUTHIER, 2013). Na ampla variedade de receptores tireoidianos, em mamíferos apenas $TR\alpha1$, $TR\beta1$ e $TR\beta2$ são ativos (CHENG *et al.*, 2010).

1.2.4. Ações gerais dos Hormônios Tireoidianos

Os hormônios tireoidianos exercem muitas ações fisiológicas, modulam os caminhos metabólicos através das alterações no consumo de oxigênio e mudanças no metabolismo de proteínas, lipídios, carboidratos e vitaminas (SMITH, *et al.* 2002). Promovem crescimento, sinalização, migração, proliferação e diferenciação celular, envolvendo o estabelecimento dos fenótipos celulares (GAMBORINO *et al.*, 2001). O metabolismo energético de carboidratos, proteínas e lipídios, são hormônio-dependentes como também uma série de ações em órgãos e sistemas diferentes, o que os torna importantes fatores mediadores do crescimento e desenvolvimento do organismo (SMITH *et al.*, 2002).

No sistema cardiovascular aumentam a transcrição da Ca^{2+} ATPase no retículo sarcoplasmático, e dos receptores β -adrenérgicos e altera as isoformas da Na^+/K^+ ATPase, provocando cronotropismo e ionotropismo positivos no coração. Nos pulmões juntamente com os glicocorticóides participam do desenvolvimento e

maturação pulmonar, estimulando a secreção e síntese do surfactante alveolar pelos pneumócitos tipo II e afetam o metabolismo do acetato e de outras enzimas respiratórias mitocondriais (YEN, 2001).

No intestino estimulam a motilidade peristáltica. No fígado regulam a lipólise e a lipogênese, estimulando as enzimas, como por exemplo, a enzima málica e a glicose-6-fostato desidrogenase. (GREENSPAN & STREWLER, 1997; YEN, 2001).

Os efeitos da transcrição do T_3 levam horas ou dias para se concluírem. Essas alterações genômicas resultam em numerosos efeitos nos tecidos em crescimento, como maturação do cérebro, aumento da produção de calor pelo aumento da atividade da Na^+/K^+ -ATPase, do consumo de oxigênio, e a expressão de receptores β -adrenérgicos. Na hipófise reduzem a atividade da enzima desidase tipo 2 (D2) e aumentam o transporte de glicose e aminoácidos (EBLING, 2014).

Acredita-se que o hormônio tireoidiano promova o crescimento por estimular a produção de hormônio de crescimento (GH) no plano gênico e interage sinergicamente com este nos tecidos, estimulando a síntese do receptor tecidual de (GH) para que este interaja com as somatomedinas a nível de placa de epifisária (AIRES, 2015). A deficiência de T_3 e T_4 é a causa principal de alterações no desenvolvimento ântero-posterior do crânio e da face (GAMBORINO *et al.*, 2001). A homeostasia plasmática de eletrólitos como cálcio, zinco e magnésio fica prejudicada na ausência ou diminuição das concentrações sanguíneas de hormônio T_4 (SIMSEK *et al.*, 1997).

1.2.5. Ações específicas do hormônio tireoidiano no sistema nervoso central e sistema nervoso periférico

O desenvolvimento do sistema nervoso central está relacionado diretamente com níveis normais de hormônios tireoidianos (MWANGI, 1998) os quais afetam dramaticamente a maturação de populações específicas de neurônios (LEGRAND, 1986; GARZA *et al.*, 1990; LAZARUS, 1999; CHAN *et al.*, 2001). Os astrócitos são os principais transportadores de T_4 do sangue e, sendo responsáveis pela sua conversão a T_3 , fornecem aos tecidos nervosos o hormônio em sua forma ativa. A falta deste hormônio durante o primeiro trimestre de vida pós-natal em humanos resulta em cretinismo, síndrome caracterizada por retardo mental severo e, em modelo de rato, promove anormalidades morfológicas irreversíveis no cérebro (CHAPA *et al.*, 1995; ZUCCO, 2009).

A formação, reorganização, o transporte, a estabilidade e a plasticidade axonal são estimulados pelo hormônio T₃ circulante. Portanto proteínas estruturais que envolvem o crescimento e transporte axonal, como a tubulina molécula responsável pela estabilidade citoesqueleto e transporte de substâncias dentro dos axônios, e a vimentina nos processos de desenvolvimento regeneração de nervos periféricos são dependente dos hormônios tireoidianos, como também a produção de neurotransmissores, proteínas estruturais, e fatores de crescimento está sendo investigada (HOFFMAN & CLEVELAND, 1988; SCHENKER *et al.*, 2002).

Os hormônios tireoidianos também modulam os neurofilamentos, componentes principais do citoesqueleto neuronal que fornece suporte e aumenta o diâmetro dos axônios. Durante o crescimento do axônio, os neurofilamentos são dinamicamente incorporados ao cone de crescimento, estabilizando seu avanço (CHAN *et al.*, 2003). No hipotireoidismo neonatal em ratos a redução do número de fibras mielinizadas e diminuição do diâmetro do axônio no nervo isquiático afeta o crescimento das fibras não-mielinizadas em associação às células de Schwann, portanto importantes para a maturação do sistema nervoso central e desenvolvimento de nervos periféricos. (CLOS & LEGRAND, 1970; SCHENKER *et al.*, 2002).

Vários fenômenos estão envolvidos com o desenvolvimento, formação e maturação do sistema nervoso central. Como por exemplo, a sinaptogênese, a proliferação, a migração celular, a diferenciação e a apoptose, contribuem para um estabelecimento preciso de estruturas morfológica e funcionalmente eficazes em um sistema tão complexo e dinâmico. A ausência ou diminuição dos níveis circulantes de T₃ e T₄ causam diminuição do desenvolvimento da árvore dendrítica, redução do número de sinapses axônio-dentrito, do volume neuronal, do número de células da glia além de provocar defeitos de mielinização (PATEL *et al.*, 1980; XIAO & NIKODEM. 1998; NUCCI *et al.*, 2003; SCHROEDER & PRIVALSKY, 2014).

Os hormônios tireoidianos são essenciais para o desenvolvimento do sistema nervoso fetal e pós-natal, desempenham um papel importante na manutenção da função cerebral. A expressão dos receptores tireoidianos RT α e RT β no sistema nervoso varia entre regiões/tipos de células e com o estado de desenvolvimento (FLAMANT & GAUTHIER, 2013). Há uma distribuição heterogênea dos transportadores tireoidianos e das desidases no sistema nervoso, garantindo que as concentrações dos hormônios tireoidianos, na sua forma ativa T₃, variam de acordo com o tipo de célula, região e necessidade (DENTICE & SALVATORE, 2011).

Os hormônios tireoidianos acoplam-se ao receptor transmembrana, aVb3 a receptores citoplasmáticos, exercendo efeitos não-genômicos, como genômico ao se ligar com receptor tireoidiano (**Figura 4**) (CHENG *et al.*, 2010 BHUMIKA & DARRAS, 2014). Para compreender o efeito dos hormônios tireoidianos sobre a regeneração, é importante observar a expressão dos transportadores, das deiodinases e receptores tireoidianos em células específicos, durante este processo.

Os astrócitos expressam receptores tireoidianos, predominantemente receptor tireoidianos alfa-1 (RT α 1) (MOHACSIK *et al.*, 2011). Os hormônios tireoidianos atuam via RT α 1 nos astrócitos e células de Purkinje para estimularem a secreção de fatores que controlam a proliferação de células precursoras de oligodendrócitos (KEILHAUER *et al.*, 1985, KONDO & RAFF, 2000, ZHU *et al.*, 2008; PICOU *et al.*, 2012).

As células precursoras de oligodendrócitos são células progenitoras multipotentes presentes, no sistema nervoso central, que pode diferenciar-se em oligodendrócitos, astrócitos e neurônios (KEILHAUER *et al.*, 1985, KONDO & RAFF, 2000, ZHU *et al.*, 2008) Geralmente, células precursoras de oligodendrócitos tendem a diferenciar-se em astrócitos, no entanto a adição de T₄ alterou esta tendência favor da diferenciação e maturação dos oligodendrócitos (TATSUMI *et al.*, 2005).

Uma lesão grave de um axônio, no sistema nervoso central, é seguida por atrofia local e acompanhado pela morte do corpo neuronal, enquanto o corpo celular de neurônios com axônios lesados no sistema nervoso periférico (SNP) regenera-se. Essas reações diferentes interferem na expressão de receptores tireoidianos (KASELIS & SATKAUSKAS, 2013). Na lesão axonal do sistema nervoso central há a perda de oligodendrócitos. No sistema nervoso periférico, as células de Schwann possuem capacidade regenerativa espontânea e sofrem diferenciação e proliferação para formar uma nova população de células de Schwann (ARTHUR-FARRAJ *et al.*, 2012; SHULGA & RIVERA, 2013).

A administração de T₄ aumentou o número de axônio mais que a administração de T₃. Em neurônios cerebelares de ratos neonatais onde T₄ e rT₃, promovem o crescimento e polimerização de actina nas neurites (FARWELL *et al.*, 2005; BOUZAFFOUR *et al.*, 2010). No entanto, outro estudo revelou que a administração de T₃ estimulou a expressão no gânglio cervical superior 10 (GCS10), um regulador da dinâmica de microtúbulos e de cones de crescimento, sugerindo que T₃ também pode facilitar a extensão do axônio (JUNG *et al.*, 2012; VORIA *et al.*, 2006).

A administração de hormônios tireoidianos, após lesão pode regenerar as células no sistema nervoso central e sistema nervoso periférico, é comprovado pela regeneração de neurônios sensoriais dos gânglios da raiz dorsal (GRD) após lesão do nervo isquiático, hipocampo e da substância branca (SCHENKER *et al.*, 2003; SHULGA *et al.*, 2009 HUNG *et al.*, 2013). Assim as ações do hormônio tireoideos são importantes tanto no sistema nervoso central como sistema nervoso periférico, onde atuam regulando a regeneração neuronal, produção de mielina, regulação das células gliais, indução e produção de neurotrofinas, importantes na sobrevivência e regeneração. Os efeitos parecem ser diferentes no sistema nervoso periférico, pois através desses hormônios os neurônios periféricos são estimulados a regenerar, no entanto no sistema nervoso central são essenciais principalmente no neurodesenvolvimento e na manutenção da função autonômica simpática.

1.3. MECANISMO DE AÇÃO DOS TIUREILENOS

Os tiourelenos, fármacos utilizados no tratamento do hipertireoidismo, carbimazol (CB), metimazol (MMI) e propiltiouracil (PTU) inibem a síntese dos hormônios tireoidianos pelo bloqueio do transportador de Na^+ e I (NIS), nas reações de acoplamento e oxidação catalisadas pela tireoperoxidase TPO, inibindo competitivamente a interação com o radical tirosina com o iodo, nas células foliculares da tireoide. O propiltiuracil tem o efeito adicional de reduzir a desiodação do T_4 , em T_3 nos tecidos periféricos, conferindo a ele a melhor indicação para hipertireoidismo grave (MAIA *et al.*, 2013).

A desidase tipo-1 (D1) (**Figura 3**) está presente com maior afinidade específica no fígado, rins e musculatura esquelética. Esta enzima é inibida pelo propiltiuracil (PTU), mas não pelo metimazol. Cálculos aproximados indicam que este sistema extratireoidiano de conversão de T_4 em T_3 representado pela D1, é responsável por cerca de 80% de todo T_3 circulante. De fato cerca de 40% do T_4 produzido diariamente são transformados em T_3 . Outros 40% são transformados em rT_3 , metabólito do T_4 sem atividade biológica conhecida. A enzima que catalisa esta reação é a D3, presente primeiramente no sistema nervoso central e placenta. A enzima D2 é encontrada largamente no cérebro e na hipófise, sendo resistente ao propiltiuracil, porém muito sensível ao T_4 circulante. Seu maior efeito é a manutenção dos níveis constantes de T_3

intracelular no sistema nervoso central (GREENSPAN e STREWLER, 1997; BIANCO & KIM 2006; MAIA *et al.*, 2013).

1.4. DOR

A palavra “dor”, na língua portuguesa*, vem do latim: *dolore*, que significa sofrimento; e “*pain*” na língua inglesa, do grego: *poiné*, pena (FEIN 2011)

A dor é definida como uma desagradável sensação e uma experiência emocional relacionada a uma lesão tecidual presente ou potencial descrita em semelhantes termos (IASP). Constitui um dos componentes essenciais do sistema de defesa do organismo, sua transmissão é um mecanismo que envolve muitas interações complexas nas estruturas do sistema nervoso central e periférico, avisa o sistema nervoso para iniciar uma resposta motora e minimizar o prejuízo físico (FEIN, 2011)

As vias aferentes envolvidas na transmissão da informação nociceptiva de uma área inflamada para centros superiores, passam pela raiz dorsal, sistema do “portão”, tratos ascendentes e tálamo sendo o componente sensorial da nocicepção projetado para o córtex somatosensorial, onde é processado (WALTON *et al.*, 1994). Entretanto, a subjetividade da sensação dolorosa está vinculada com o aspecto comportamental. Isso ocorre porque a informação nociceptiva atinge não apenas regiões do sistema somatossensorial, mas também o sistema límbico (MILLAN, 1999; BYERS & BONICA, 2001).

Os receptores envolvidos na detecção do estímulo doloroso são chamados de nociceptores. Esses receptores são terminações nervosas livres de alto limiar, sendo ativados por estímulos químicos, térmicos ou mecânicos intensos. As fibras nervosas que transmitem a mensagem nociceptiva ao sistema nervoso central (SNC) são fibras mielinizadas de pequeno calibre (fibras A delta) e fibras não-mielinizadas (fibras C) (**Tabela 1**). Com base em critério funcional, os nociceptores podem ser classificados em:

- Nociceptores: mecanoceptores e mecanotérmicos, conectados a fibras A δ , com velocidade de condução de 5 - 10 m/s, ativados por estímulos tácteis e sonoros,

- Nociceptivos polimodais fibras C, com velocidade de condução de 0,5 – 2 m/s, ativados por estímulos mecânicos, químicos, térmicos e substâncias liberadas durante a inflamação (WALTON *et al.*,1994; NOBACK *et al.*,1996).

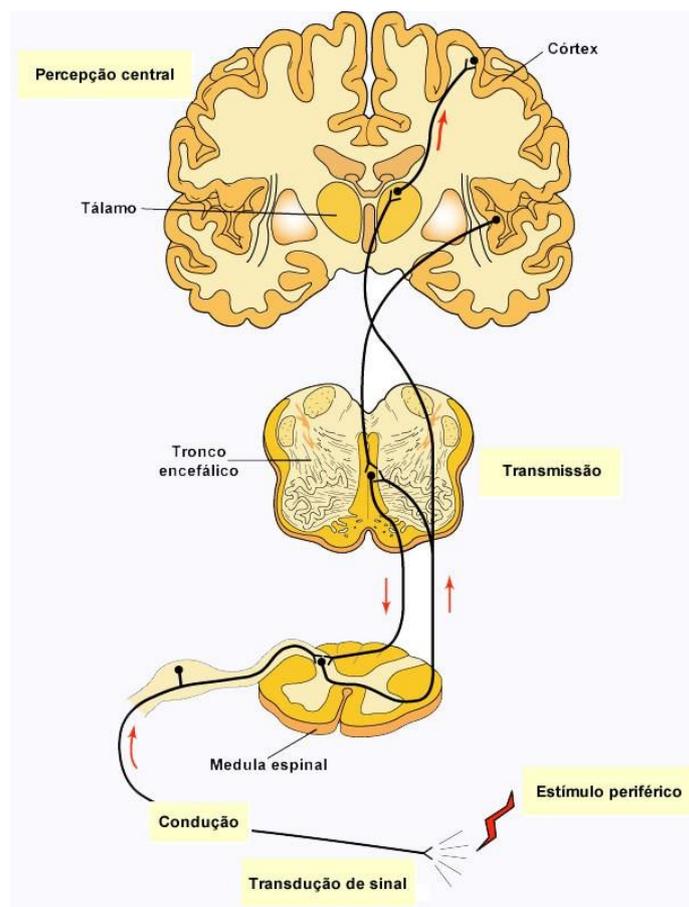
Tabela 1: Classificação das fibras nervosas de mamíferos. A classificação do grupo I a IV aplica-se somente a fibras sensoriais.

Tipo	Grupo	Diâmetro (μm)	Velocidade (m/s)	Função
Aα		15-20	50-120	Fibras motoras para músculo esquelético
Aα	Ia	15-20	70-120	Terminações primárias no fuso muscular
Aα	Ib	12-20	70-120	Aferentes no órgão tendinoso de Golgi
Aβ	II	5-10	30-70	Terminações secundárias nos fusos musculares, tato, pressão
Aγ		3-6	15-30	Inervação motora dos fusos musculares
Aδ	III	2-5	5-25	Receptores de pressão e dor
B		3	3-15	Pré-ganglionares autonômicas
C		0.5-1	0.5-2	Pós-ganglionares autonômicas não mielinizadas)
C	IV	0.5-1	0.5-2	Dor (não-mielinizadas)

Fonte: Menezes, 2004, Adaptada pelo autor

Os corpos celulares desses neurônios localizam-se nos gânglios das raízes dorsais, que são conjuntos de neurônios sensoriais situados póstero-lateralmente à medula espinal. Essa organização anatômica refere-se à informação nociceptiva proveniente da pele e dos músculos do tronco e dos membros. As fibras desses neurônios projetam-se a partir da periferia do corpo em direção ao corno dorsal da medula espinal. Portanto, a medula espinal representa o centro de processamento primário da informação nociceptiva. A percepção dolorosa ocorre quando esta alcança o córtex somatossensorial. Porém, antes de atingir as áreas corticais, a informação sensorial nociceptiva é projetada para o tálamo. Essa via, proveniente da medula espinal, que ascende pelo sistema nervoso até o tálamo, é chamada de via espinotalâmica (**Figura 5**), e representa a principal via relacionada à condução e transmissão da informação dolorosa (MILLAN, 1999; COSTIGAN *et al.*, 2006).

Figura 5: Representação da via espinotalâmica, a principal via ascendente que conduz a informação nociceptiva.



Fonte: Costigan *et al.*, 2006.

A manifestação clínica da dor pode ser interpretada como expressão da capacidade de modificações na sensibilidade de transdução dos sinais; na excitabilidade das membranas e no fenótipo de neurônios sensoriais, primários; na eficácia sináptica e/ou na circuitaria de neurônios espinhais; ou seja, modificações na capacidade de resposta plástica do sistema nervoso (SN). Tais modificações poderiam ser induzidas pela inflamação e pela lesão de nervos, resultando na redução do limiar e amplificação da resposta algésica (DE LA CALLE *et al.*, 2002, FEIN, 2011).

A dor funciona como alerta ao sistema nervoso de algum comprometimento biológico, desencadeando reações de defesa e preservação, a falta da capacidade de experimentar a dor, como na rara condição de insensibilidade congênita à dor, pode causar vários problemas para a saúde, tais como: automutilações, auto amputações e perda da visão (FEIN, 2011).

A estimulação nociva ao tecido intacto causa uma dor considerada fisiológica devido ao seu caráter protetor, a qual ativa o reflexo de retirada e impede lesão adicional. A dor patológica é gerada quando o tecido é inflamado ou sofre uma lesão. Nesse caso, ocorrem os mecanismos de sensibilização periférica e central. Esses mecanismos envolvem a liberação de mediadores químicos no local da lesão e nas regiões do SNC relacionadas, que intensifica a transmissão nociceptiva. A partir da sensibilização podem surgir alterações sensoriais características da dor patológica que são observadas através da existência de hiperalgesia e alodínia (DESCORTERD *et al.*, 2002).

Em determinadas circunstâncias, para um estímulo que é normalmente doloroso, existe uma resposta aumentada. O estado de sensibilização desenvolvido nessas circunstâncias é conhecido como hiperalgesia, que é caracterizada principalmente por uma redução no limiar nociceptivo e maior sensibilidade a estímulo supralimiar (NOBACK *et al.*, 1996). Já a alodinia representa uma resposta dolorosa a estímulos considerados inócuos (MILLAN, 1999).

As dores são classificadas em “nociceptiva”, “neurogênica”, “neuropática” e “psicogênica”, que são respectivamente associadas com a estimulação de nociceptores, destruição de tecido neural, disfunção do nervo ou fatores psicológicos (CALIXTO *et al.*, 2000).

A dor neuropática periférica é uma síndrome complexa resultando de diversas lesões no sistema nervoso periférico incluindo trauma, doenças metabólicas, compressões, neurotoxinas, infecções, doenças imunes, deficiências de vitaminas e invasão de células cancerígenas (WOOLF & MANNION, 1999), são caracterizadas por uma dor espontânea e por indução de estímulos como alodinia e hiperalgesia (DESCORTERD *et al.*, 2002).

1.4.1. Neuropatia periférica

Neuropatia periférica é um termo genérico que se aplica na existência de lesão dos nervos periféricos. A disfunção do nervo periférico é uma situação frequente, com expressão clínica limitada, mas com causas etiológicas variadas, mais difícil que o reconhecimento de uma neuropatia é o seu diagnóstico etiológico (GOETZ & PAPPERT, 1999; GUIMARÃES & SILVEIRA, 2008). É um problema neurológico comum principalmente em pessoas acima de 55 anos. Suas manifestações clínicas variam amplamente, apresentando características que englobam combinações de alteração de sensibilidade, dor, fraqueza muscular ou atrofia e sintomas autonômicos. Essa apresentação variável ocorre, provavelmente, em virtude das suas causas serem diferentes (ENGLAND & ASBURY, 2004).

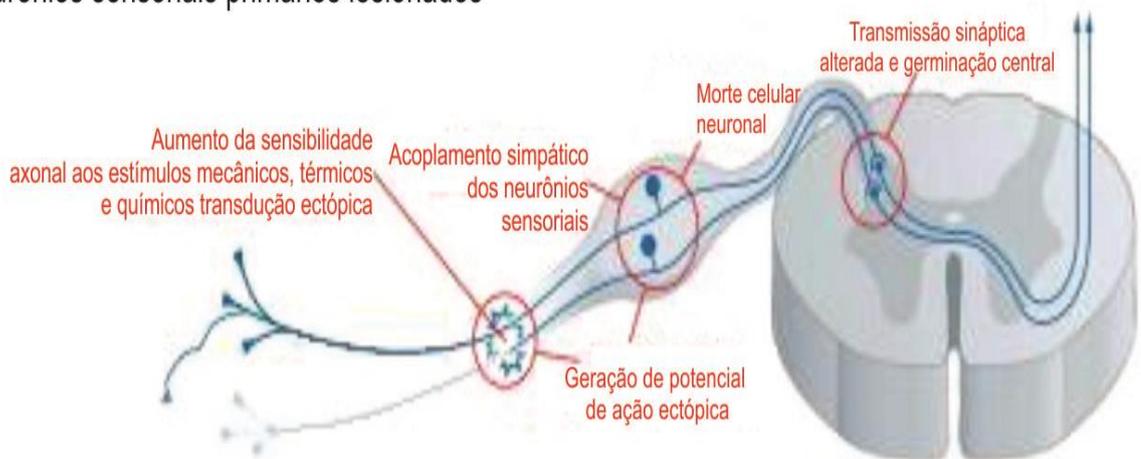
A dor neuropática tem sintomatologia e etiologias diversas, incluindo câncer, artrite, doenças vasculares, traumatismos (KUPERS *et al.*, 1992), neuropatias diabéticas e alcoólicas, neuromas, dor do membro fantasma, síndrome talâmica, etc, pode também surgir como complicação acidentes traumáticos e cirurgias (ENGLAND & ASBURY, 2004).

A dor originada por lesão neural, característica da neuropatia periférica, é um problema comum na clínica neurológica, tem sido estudada por vários pesquisadores clínicos e de ciência básica, e mais recentemente tem sido proposto que a dor neuropática é consequência direta de lesões ou doenças que afetam sistema somatosensitivo periférico e central (WOLFE *et al.*, 1990; DEVOR; SELTZER, 1999 ENGLAND e ASBURY, 2004; COSTA-CASTRO, 2009). Existem situações com lesão neural definida, sem exibição de dor, como na síndrome de pernas inquietas e condições com dor sem lesão neural comprovada, como nas neuralgias (GRIFFIN; MCARTHUR; POLYDEFKIS, 2001).

Os mecanismos envolvidos na gênese (**Figura 6**) da dor neuropática baseiam-se em alterações eletrofisiológicas e de expressão gênica em neurônios. As alterações eletrofisiológicas são expressas por atividade elétrica contínua anormal, já descrita por Wall e Gutnick (1974). Essa atividade elétrica anormal origina-se após lesão neural em neurônios aferentes axotomizados (DEVOR; SELTZER, 1999) e pode induzir sensibilização central (CODERRE *et al.*, 1993).

Figura 6: Sumário dos principais mecanismos da gênese dor neuropática

Neurônios sensoriais primários lesionados



Amplificação periférica e central mediada por:

Alterações na síntese e na sinalização do transmissor
Aumento da excitabilidade da membrana
Crescimento do axônio central e periférico

Desencadeado por:

Perda de fatores neurotróficos periféricos
Atividade espontânea e mediada pelo receptor
Sinalização retrógrada
Sinais de células imunes e células de Schwann desnervadas

Ilustração mostra o resumo dos principais mecanismos subjacentes á dor neuropática periférica, sua localização e os gatilhos responsáveis pela sua ativação. **Fonte:** Costigan 2009.

Observou-se o aparecimento de hipersensibilidade e mecanoalodinia, hiperalgesia térmica, inflamação neurogênica e desregulação autonômica (BARON, 2001; DICKENSON *et al* 2002; NICHOLSON, 2004), tendo em comum a presença de hiperalgesia e/ou alodinia, dor espontânea e parestesia (BENNETT, 1994), sugerindo que existem mecanismos fundamentais que são comuns nas diferentes síndromes dolorosas (WOOLF; MANION, 1999).

A abordagem de uma neuropatia conjuga duas formas principais de investigação: o estudo clínico e eletrofisiológico. A semiologia e o exame objetivo fornecem dados que de imediato podem orientar a caracterização da neuropatia em relação ao tipo de fibras envolvidas, ao padrão espacial e ao padrão temporal de envolvimento (ROSENBERG *et al.*, 2001). A avaliação eletrofisiológica complementar permite uma localização mais específica da lesão, caracteriza a natureza da lesão (axonal versus desmielinizante), avalia a gravidade e a evolução temporal da neuropatia (ROSENBERG *et al.*, 2005).

Podemos também avaliar a intensidade da dor pela imunoexpressão da Fos um produto protéico do gene imediato c-Fos, encontrado em núcleos neuronais. A expressão de c-fos foi usada, em estudos, para examinar a circuitos neurais subjacentes à nocicepção e produziram uma imagem que é geralmente consistente com as vias nociceptivas mapeadas por métodos de traçado eletrofisiológicos (LUDWIG *et. al*, 2004).

Após a aplicação de estímulos dolorosos, c-Fos se expressa em várias estruturas do SNC envolvidas no processo nociceptivo, incluindo medula espinhal, substância periquedutal mesencefálica, os núcleos parabraquiais e o tálamo. A expressão de c-Fos está relacionada à atividade neuronal e à intensidade da dor (AHMAND, 2002; TEIXEIRA, 2009).

O mecanismo de lesão no sistema nervoso periférico se dá pelo acontecimento de alguns eventos, levando ao processo de regeneração, causando modificações estruturais e funcionais que vão alterar a condução nervosa induzindo a sensibilização central e periférica (SCHWARTZMAN *et al.* 2001; NICHOLSON, 2004) (**Figura 6**).

Esses eventos acontecem primeiramente pela ativação de macrófagos pelas células de Schwann que sintetizam mediadores inflamatórios como citocinas,

interleucinas, fator de necrose tumoral (TNF), fator de crescimento tumoral- β (TGF- β) e fatores de crescimento para a regeneração nervosa. O fator de crescimento nervoso (NGF) aumenta a síntese, transporte e conteúdo neuronal de neuropéptidos algio gênicos, nas terminações centrais e periféricas, sensibilizando os receptores nociceptivos das fibras C, e estes respondem a estímulos mecânicos e térmicos, normalmente inócuos, ou a atividade espontânea. A ativação espontânea das fibras mielinizadas grossas provoca o aparecimento de parestesias independente da intensidade de estímulos (BARON, 2001; DICKENSON *et al* 2002; NICHOLSON, 2004).

A regeneração também provoca modificação na permeabilidade das membranas neuronais e do número, distribuição e cinética dos canais de Na^+ e Ca^{++} , há um aumento na densidade de canais de Na^+ nos troncos em regeneração nos gânglios sensitivos, com isso ocorre excitabilidade exagerada e geração de maior número de potenciais ectópicos e descargas espontâneas nas fibras lesadas (GUERTIN, 2005).

As células de Schwann, que controlam a expressão e distribuição dos canais de Na^+ ao longo do axônio, sofrem diferenciação, na regeneração, com mudanças na produção de mielina e fatores de crescimento, o que provoca efeitos nos neurônios lesados e também nos neurônios da vizinhança, as correntes efáticas contribuem para a gênese do fenômeno de alodínia (BARON, 2001, SCHWARTZMAN *et al.*, 2001 DICKENSON *et al* 2002, TEXEIRA, 2003). Doenças neurológicas como esclerose múltipla e neuropatias causam alterações na formação da mielina e o funcionamento do sistema nervoso (McMAHON & BENNETT, 1999; PEREIRA, LEBRUN-JULIEN & SUTER, 2011).

Os gânglios sensitivos respondem as alterações nos nervos periféricos com alterações anatômicas e fisiológicas, onde há um aumento da síntese de proteínas, que constituem os canais iônicos e receptores, aumentando assim a fonte de potenciais anormais (WOOLF, 2000; DICKENSON *et al.*, 2002; TEXEIRA, 2003 e NICHOLSON, 2004). A dor neuropática ainda é um obstáculo para os pesquisadores clínicos e experimentais. Entender a neurobiologia da dor neuropática é um passo para melhoria no tratamento dessa síndrome (CASTRO-COSTA, 2009).

1.4.2. Modelos de dor neuropática

Existem diversas abordagens experimentais para o estudo da nocicepção, dentre elas, podemos citar a lesão nervosa periférica e a indução de trauma tecidual ou processos inflamatórios locais (SOMMER & MYERS, 1995; ZIMMERMANN, 2001). A dor neuropática é caracterizada por anormalidades sensitivas tais como sensação desagradável, aumento da intensidade da resposta a estímulos dolorosos (hiperalgesia) e dor em resposta a estímulos que normalmente não provocam dor (alodinia), iniciada ou causada por uma lesão primária ou disfunção do sistema nervoso (MERSKEY & BOGDUK, 1994).

Os modelos desenvolvidos para o estudo da neuropatia se dividem em nociceptivos e neuropáticos (MORTON & GRIFFITHS, 1985).

Os modelos animais de estudo da dor podem ser espontâneos ou induzidos. A maioria dos modelos experimentais de dor neuropática foi desenvolvida a partir de lesões periféricas traumáticas, metabólicas ou tóxicas, e devem reproduzir déficits sensitivos, como alodinia, hiperalgesia e dor espontânea por curtos períodos de tempo, ocorrem em sistemas onde os animais manifestam a dor como resposta a algum estímulo como por exemplo, o estímulo térmico (frio ou calor), mecânico (pressão), químico. Esses modelos são relevantes para o estudo de distúrbios periféricos em humanos (neuropatias, plexopatias e radiculopatias), representam porcentagem considerável de doenças capazes de induzir neuropatia, diabetes e alcoolismo, por exemplo, promovem distúrbios sensitivos que podem induzir dor, por neuropatia periférica dolorosa (WOOLF & MANNION, 1999).

Assim, os modelos nos quais os animais são submetidos a situações que comprovadamente resultam em dor neuropática são utilizados para o estudo dos mecanismos e da fisiopatologia da nocicepção (ZIMMERMANN, 2001).

Pacientes com câncer, podem apresentar neuropatia além do crescimento tumoral e compressão de estruturas nervosas que causam lesão tecidual, pode causar dor neuropática induzida por quimioterapia, os fármacos mais eficazes para tratamento de

tumores sólidos induzem neuropatia periférica como efeito secundário (SOUSA *et al.*, 2016).

A axotomia de uma proporção variável de fibras nervosas tornou-se técnica primordial para gerar comportamentos de dor em animais, sendo realizada em modelos de rizotomia, ligadura parcial do nervo isquiático (LPN), ligadura do nervo espinhal L5 (LNS) e lesão poupadora de nervo (LPN). Em todos estes modelos, os animais lesados desenvolvem comportamentos de autoproteção e apresentam reações exageradas a estímulos mecânicos (alodinia) e térmicos (SMITH & SAIKI, 2015).

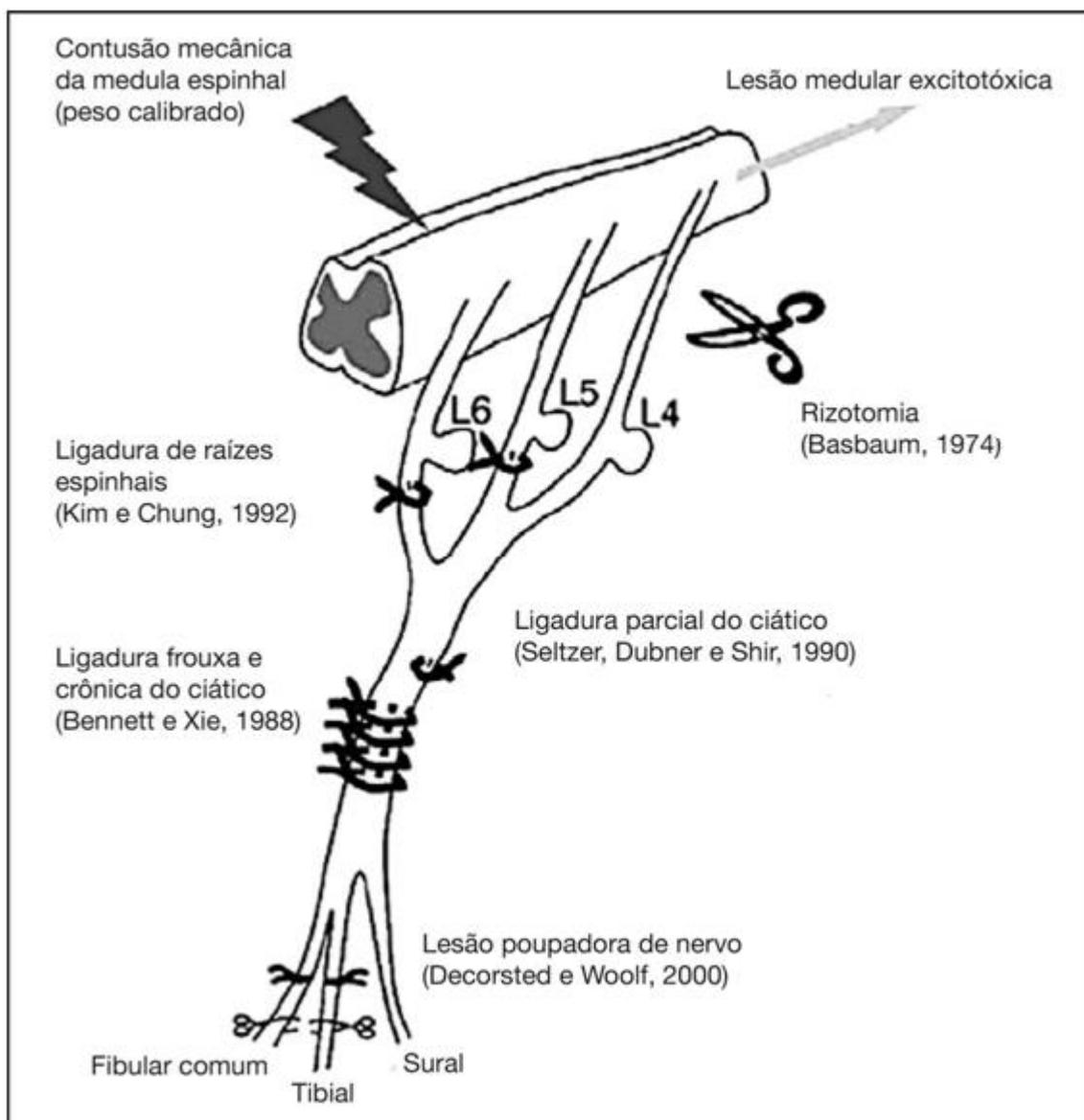
Os modelos animais empregados para induzir a neuropatia periférica são a transecção nervosa completa ou parcial e ainda a lesão por constrição crônica, tais como (ZIMMERMANN, 2001), mostrados na **tabela 2**.

Tabela 2: Modelos animais de indução neuropatia periférica com os mecanismos envolvidos

Modelos	Definição	Mecanismos envolvidos	Vantagens	Desvantagens	Observações
<i>Secção do nervo isquiático</i>	Secção total do nervo isquiático	-Interrupção irreversível das transmissões aferente e Extremidade distal acometida por eferente. DW	-Estudar mecanismos em doenças em que a axotomia é parte da causa.	-Impossibilidade de avaliação da alodínia e hiperalgesia no membro desnervado.	-Simula neuropatia do membro fantasma, traumatismo de nervo ou lesão iatrogénica. -Maior grau de alodínia mecânica, autotomia do membro denervado (sinal de dor espontânea ou de desnervação)
<i>Lesão de constrição crónica</i>	Quatro anéis de suturas em torno do nervo isquiático sem o estrangular	-Reação inflamatória local e edema, com aumento da compressão. -Mistura de neurónios aferentes intactos e lesados no GRD associado. -Fibras intactas expostas a moléculas produzidas por DW das lesadas	-Adequado para estudo da contribuição da DW na indução da DN periférica.	-Inadequado para distinção entre componentes de lesão inflamatórios e axonais de DN periférica. -Estimulação de um número variado de axónios lesados.	-Simula compressão crónica de nervo (Síndrome do túnel cárpico, hérnia discal lombar, intoxicação por metais pesados, anóxia e doenças metabólicas). -Alodínia mecânica, hiperalgesias mecânica bilateral, térmica e química, que persistem por vários meses. -Podem apresentar crescimento exagerado das unhas, autotomia, ventroflexão, eversão e atrofia muscular.
<i>Ligação parcial do nervo isquiático</i>	Nó com estrangulação em torno de metade do nervo isquiático	-Conservação das fibras grandes mielinizadas na parte intacta do nervo. -Mistura aleatória de nervos lesionados em L4-L5, bem como aferentes mistura de nervos lesionados e intactos. -Fibras intactas expostas a moléculas produzidas por DW das lesadas.	-Menor componente inflamatório que o modelo de constrição.	-Variabilidade no número axónios lesados. -Difícil especificar o GRD e segmento da medula espinhal relacionados com a lesão.	-Simula contusão nervosa e Síndrome de dor regional complexa. -Hiperalgesia térmica, mecânica e alodínia ao frio mais vigorosos, que surgem em poucas horas de pós-operatório e persistem por vários meses.
<i>Modelo de lesão com nervo intacto</i>	Seccionamento dos nervos tibial e peroneal comum, deixando o sural intacto	- Evita o contato entre fibras lesionadas e intactas do nervo periférico, embora todos os neurónios sejam afetados no GRD, por aí haver mistura.	-Modelo tecnicamente mais simples de desnervação parcial. -Variabilidade mínima no grau de lesão. -Investigação do contributo dos aferentes primários lesados e dos intactos na fisiopatologia da dor.		-Simula várias neuropatias periféricas. -Modificações: seccionamento dos nervos tibial e sural mostrou uma resposta mais vigorosa de alodínia mecânica, ao frio e dor espontânea; modelo com preservação do nervo tibial obteve alterações mais marcadas e reprodutíveis -Preserva função motora. Hiperalgesias mecânica e térmica ipsilateral, que surgem em poucas horas de pós-operatório e persistem por pelo menos 6 meses. Sem alteração do limiar ao calor.
<i>Ligação segmentar do nervo em L5/L6</i>	Estrangulamento das raízes de L5 e L6, distalmente ao GRD, com L4 e nervo safeno(L3) intactos	-Num GRD em particular teoricamente todos os aferentes são ou axotomizados ou intactos. -Os neurónios intactos de L4 nos segmentos nervosos distais estão incorporados num meio de DW.	-Diferenciar papel dos neurónios axotomizados e intactos do GRD. -Preciso e reprodutível.	-Cirurgia longa, difícil execução e altamente invasiva (lesão de tecidos que podem afectar o GRD intacto próximo).	-Simula lesão do plexo nervoso ou da raiz dorsal. -Retêm a função motora dos músculos proximais do membro inferior, innervados por L4. -Hiperalgesia mecânica, que surge em poucas horas de pós- operatório e persiste por pelo menos 4 meses e alodínia ao calor na pata ipsilateral.

Fonte: Moraes, Pinho e Teixeira, 2010. Adaptado pelo Autor

Figura 7: Modelos experimentais de ferimentos mecânicos no nervo isquiático de roedores.



Modelo experimental de dor neuropática. Ligadura de raiz espinhais (LRS), ligadura parcial do nervo (LPN), constrição crônica do nervo (CCN), rizotomia, contusão mecânica da medula espinhal, lesão nervosa poupada **Fonte:** Sousa, 2016

1.4.3. Nervos Isquiático

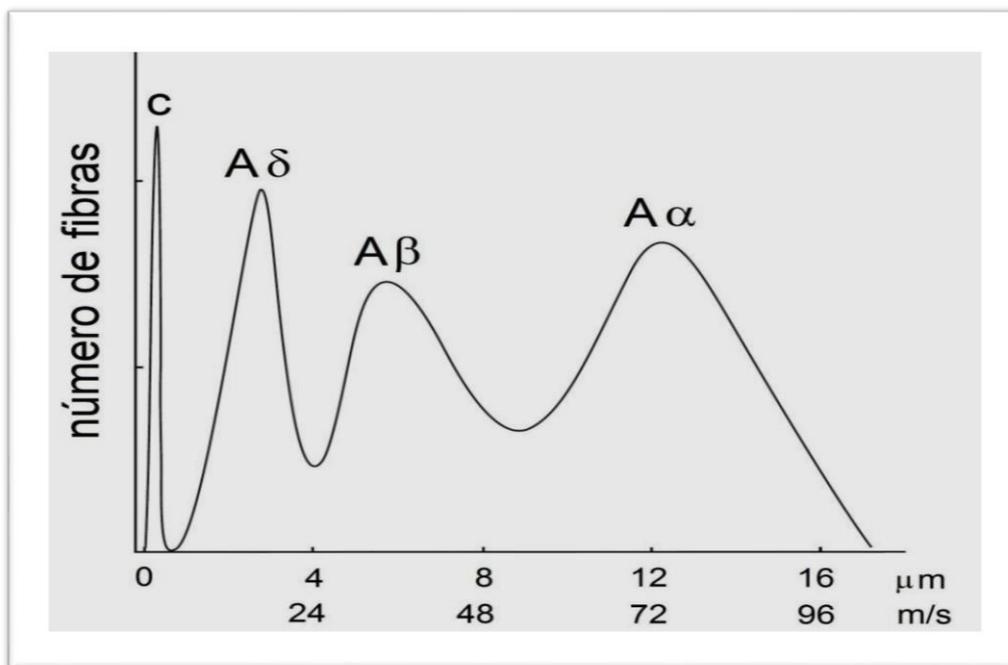
O nervo isquiático é um nervo de extensão grande que se origina na medula espinhal distal e estende-se ao longo de todo o comprimento do membro inferior em sua face posterior; isolado é uma preparação clássica para o estudo do potencial de ação composto. Como em muitos nervos longos do sistema nervoso dos animais vertebrados, o nervo isquiático é funcionalmente misto, ou seja, o tronco nervoso é constituído de fibras sensoriais e motoras.

O nervo isquiático é constituído por axônios de centenas de neurônios. Esses axônios podem variar amplamente em diâmetro em uma escala de valores inferiores a 1 μm até 20 μm . Devido a proporcionalidade entre diâmetro da fibra nervosa e velocidade de condução, assim como, presença ou não de mielina, as velocidades de condução dessas fibras variam largamente em uma escala que compreende valores de 0.2 a 150 m/s (**Figura 8**) (HURSH, 1939).

Os neurônios são comumente classificados com base em aspectos morfológicos e/ou funcionais, os critérios que categorizam esses grupos de fibras são a largura do seu diâmetro e grau de mielinização, como podemos observar na Tabela 1. É constituído em sua maior parte por fibras do tipo A, segundo a classificação de Erlanger & Gasser (1937). Este nervo apresenta como subtipos os seguintes grupos:

- **Subtipo A α :** Constituem uma via eferente para fibras musculares esqueléticas; possuem um diâmetro médio de 15 μm e velocidade de condução de 85 a 100 m/s.
- **Subtipo A β :** Função principal de aferências na propriocepção, tato e pressão nos músculos e articulações; diâmetro médio de 8 μm e velocidade de condução média de 50 m/s.
- **Subtipo A γ :** Responsável pela manutenção do tônus muscular, possui fibras motoras eferentes para o fuso muscular, diâmetro de 3 a 6 μm velocidade de condução de 15 a 35 m/s
- **Subtipo A δ :** Fibras sensitivas para temperatura e dor, diâmetro de 1 a 4 μm e velocidade de condução de 5 a 25 m/s (NOKES *et al.*, 1991) (Figura 8; Tabela1).

Figura 8: Diâmetros dos axônios e velocidades de condução no nervo periférico.

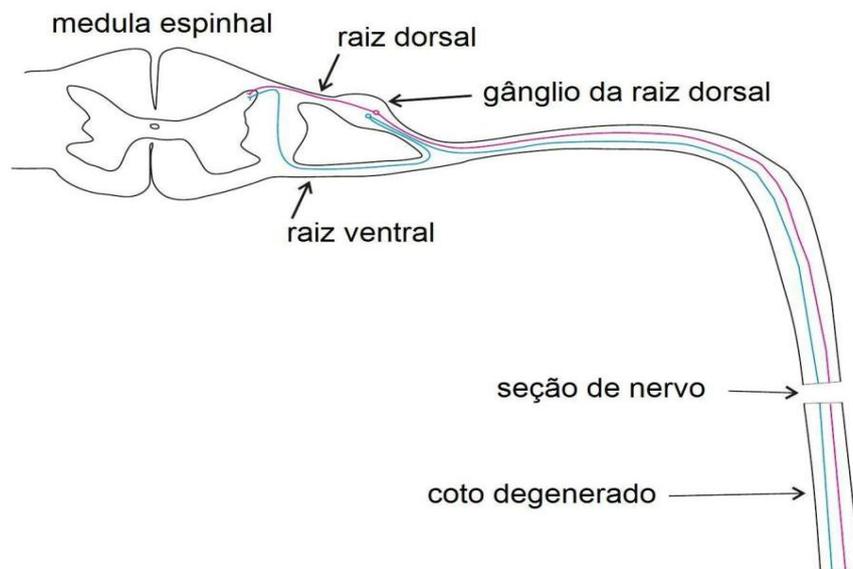


Os diâmetros dos axônios são apresentados em micrômetros (μm) e as velocidades de condução são indicadas em metros por segundo (m/s). As fibras designadas por C são amielinizadas e as fibras A têm uma camada de mielina. **Fonte:** Fein, 2011

As preparações que fazem uso do nervo isquiático, para a análise dos fenômenos de excitabilidade e condutibilidade são clássicas, frequentemente utilizadas na literatura há muitos anos. Além de ser um nervo periférico de fácil acesso e dissecação é muito utilizado em estudos envolvendo nocicepção. Ele é empregado no modelo de dor neuropática, envolvendo a realização da técnica de Injúria por Constricção Crônica (ICC), como descrito por Bennett & Xie (1988).

A secção do nervo isquiático (Figura 9) resulta em alterações neuroquímicas e neuroanatômicas importantes nos neurônios sensoriais primários, bem como em seus territórios de projeção central (ZIMMERMANN, 2001; CAMPBELL & MEYER, 2006).

Figura 9: Gânglio da raiz dorsal (GRD) com os corpos celulares dos neurônios sensitivos na raiz dorsal.



Na cor rosa, o axônio entra na medula espinhal através da raiz dorsal; e na cor verde, o axônio entra através da raiz ventral. O nervo formado pelas duas raízes foi seccionado distalmente. **Fonte:** Fein, 2011

Os mecanismos periféricos de dor neuropática envolvem o disparo de descargas ectópicas pelas fibras nervosas lesadas. Essa atividade elétrica alterada ocorre não apenas nas fibras que conduzem a informação nociceptiva, as fibras C e A delta, mas também nas fibras do tipo A β , que em situações fisiológicas conduzem informações referentes à sensibilidade mecânica inócua. As hipóteses que justificam essas descargas ectópicas após lesão nervosa incluem: a alteração na expressão de canais iônicos nas fibras nervosas danificadas, e também nos corpos celulares no gânglio da raiz dorsal; e ainda, a liberação de mediadores inflamatórios no local da lesão, tais como bradicinina e a serotonina, os quais ativam e/ou sensibilizam os neurônios aferentes primários (ZIMMERMANN, 2001; SCHAIBLE & RICHTER, 2004).

O gânglio da raiz dorsal é composto por vários corpos celulares de neurônios sensoriais e está localizado lateralmente à medula espinhal da coluna vertebral. Estes

neurônios sensoriais têm axônios que se projetam aos tecidos periféricos, como a pele, vísceras e são responsáveis pelas sensações em nosso corpo (FEIN, 2011).

1.4.4. Degeneração Walleriana

O termo degeneração de Walleriana, foi adotado para descrever eventos que acompanham traumatismos do sistema nervoso central. No entanto, a degeneração Walleriana no sistema nervoso periférico e sistema nervoso central envolvem células diferentes, células de Schwann e macrófagos no sistema nervoso periférico versus oligodendrócitos e microglia no sistema nervoso central, também usado para definir eventos que se desenvolvem durante as neuropatias do sistema nervoso periférico sem trauma (por exemplo, doenças desmielinizantes hereditárias) (MURINSON *et al.*, 2005).

O processo de degeneração no nervo periférico consiste cronologicamente em morte neuronal (degeneração axonal aguda), degradação da bainha mielina, fagocitose dos fragmentos (*debris*) de mielina e dos fragmentos de axônios (remoção dos resíduos não necessários ao nervo) proporcionando um ambiente favorável para posterior alongamento dos axônios e remielinização (HIRAGA *et al.*, 2006), viabilizando a recuperação da propagação normal do potencial de ação e das funções sensitivas ou motoras. (CAMARA, 2009).

O processo de degeneração do nervo periférico inicia quando o axônio se encontra submetido a qualquer tipo de trauma. Um fator produzido a partir do axônio presente no axolema chamado de neuregulina (GUERTIN *et al.*, 2005) sinaliza para a ativação das células de Schwann (RIECHMACHER *et al.*, 1997), através de receptores tipo tirosina kinase (ErbB2) presentes na membrana destas células (CARROLL *et al.*, 1997). As células de Schwann em contato com axônios íntegros não são ativadas (MURINSON *et al.*, 2005). A ativação das células de Schwann é um evento importante no início da DW. Possuem um papel chave tanto na quebra da bainha de mielina como também promovem uma rápida remoção dos *debris* de mielina e do axônio na ausência dos macrófagos (STOLL *et al.*, 1999; PERRY *et al.*, 1995, FERNANDEZ-VALLE *et al.*, 1995).

Células de *Schwann* e macrófagos produzem altos níveis de metaloproteases (WEE YOUNG *et al.*, 2001; LA FLEUR *et al.*, 1996) que degradam a mielina e desta forma promovem especificamente a fagocitose das proteínas da mielina (MATYSZAK;

PERRY, 1996; CHANDLER *et al.*, 1997; PROOST *et al.*, 1993; SHUBAYEV; MYERS, 2000; MYERS *et al.*, 2001).

Em seguida, a fagocitose a partir das células de Schwann e macrófagos são importantes para a remoção dos fragmentos de axônios e de mielina (BRÜCK, 1997).

1.4.5. Regeneração neural

No início da degeneração Walleriana, como já mencionado, o axônio injuriado sinaliza para as células de Schwann induzindo sua ativação. Numa fase posterior, agora na direção inversa, as células de Schwann liberam sinais químicos que promovem crescimento axonal e remielinização (ESPER; LOEB, 2004). Estes sinais incluem o fator de crescimento neural (NGF) e o fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF), o qual é retrogradamente transportado para o corpo celular de neurônios sensitivos primários, onde atuam como um potente regulador da expressão gênica. O fator de crescimento neural e o fator neurotrófico derivado de células gliais também ativam e sensibilizam diretamente os nociceptores (MALIN *et al.*, 2006) contribuindo para a iniciação da dor em resposta à injúria neural. Entre o 3º e 14º dia após lesão ocorre um aumento de cinco a sete vezes na expressão de RNAm para fator de crescimento neural no nervo isquiático (HEUMANN *et al.*, 1987). Macrófagos, células de Schwann, e fibroblastos no segmento distal do nervo expressam uma grande variedade de moléculas neurotróficas incluindo NGF (fator de crescimento neural), BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro), CNTF (fator neurotrófico ciliar), LIF (fator inibitório para leucemia), IGF-I (Fator de crescimento semelhante à insulina – I), FGF (fator de crescimento de fibroblastos) e osteonectina (glicoprotéina ligante a cálcio), desta forma gerando um ambiente de suporte para a regeneração do axônio (HEUMANN *et al.*, 1987, SAHENK *et al.*, 1994, NAVEILHAN *et al.*, 1997, HOKE *et al.* 2000, ZHANG *et al.*, 2000, BAMPTON *et al.*, 2005; CAMARA, 2009).

As células Schwann também promovem regeneração gerando orientação estrutural e substratos promotores de crescimento para os axônios em crescimento. Durante a degeneração Walleriana, após lesão no nervo periférico, as células de Schwann devem proliferar formando uma linha de células chamadas de *bands of Büngner*, as quais suportam o crescimento axonal (KOEPPEN, 2004). Laminina, um componente da matriz extracelular da lamina basal das fibras produzido pelas células de Schwann, é

uma molécula de adesão que promove crescimento dos axônios (SANES, 1982; CORNBROOKS *et al.*, 1983; BARON-VAN EVERCOOREN *et al.*, 1982).

O tempo para atingir a regeneração completa depende do tipo de trauma no nervo. O alongamento dos axônios pode iniciar a partir da primeira semana após a injúria. Após transecção do nervo isquiático de rato, as funções motoras começaram a surgir na terceira semana após a secção e melhoraram em torno de 50% na sexta semana (TEMPORIN *et al.*, 2008b).

Na fase inicial depois da lesão neural, os axônios necessitam se estenderem sob ambiente não favorável, onde permanecem os resíduos de mielina. O recrutamento de macrófagos conduz a um *clearance* rápido dos *debris* de Mielina. Estes *debris* contêm inibidores dos fatores de crescimento dos axônios, uma glicoproteína associada à mielina (MAG). A fagocitose dos *debris* de mielina por células de Schwann e macrófagos remove também os inibidores (MAG) criando condições favoráveis para o alongamento dos axônios (TEMPORIN *et al.*, 2008a; QIU *et al.*, 2000; STOLL; JANDER, 1999; STOLL; MULLER, 1999; HIRATA *et al.*, 1999). A proteína RhoA (família de proteínas A, envolvidas na regulação e coordenação temporal da divisão celular), a qual inibe o alongamento dos neuritos, é ativada por este inibidor (MAG) e está ativado em motoneurônios 24 horas após a injúria do nervo isquiático (HIRAGA *et al.*, 2006).

De modo que a rápida proliferação das células de Schwann (3 a 4 dias após a lesão) é um evento decisivo para promover a regeneração do axônio (HALL, 1978). Foi demonstrado *in vitro* que as células de Schwann degradam mielina e proliferam na ausência de macrófagos (FERNANDEZ-VALLE *et al.*, 1995), processos considerados como pré-requisitos para a remielinização que ocorre a seguir (BAICHWAL; DE VRIES, 1989).

1.4.6. Remielinização

As células de Schwann diminuem sua síntese de mielina dentro de 12 horas após injúria neural (WHITE *et al.*, 1989) e interrompe a síntese de proteínas da mielina dentro de 48 horas” (TRAPP *et al.*, 1988 *apud* VARGAS; BARRES 2007, p. 160).

Como comentado acima, logo após a injúria neural, as células de Schwann são ativadas, entram em estado de diferenciação, ou seja, entram em ciclo celular (PELLEGRINO *et al.*, 1986; LIU *et al.*, 1995, MURINSON *et al.*, 2005), interrompem

sua síntese de mielina, proliferam e realizam a remoção da mielina. (VARGAS; BARRES 2007). No entanto, o processo de remielinização a partir destas mesmas células ocorre depois, quando entram em estado não diferenciado (ou rediferenciado), o qual é direcionado pela via de sinalização intracelular Ras/Raí/ERK (HARRISINGH *et al.*, 2004). O processo de rediferenciação das células de *Schwann* e remielinização ocorre no sentido proximal para o distal em relação ao local de injúria. Haja vista que estas células necessitam de sinais a partir dos axônios em crescimento para entrar neste estágio (GUPTA *et al.*, 1993; CAMARA, 2009).

1.4.7. Proteína Básica da Mielina – PBM

Como visto acima, as células de *Schwann* do SNP são responsáveis pela síntese da camada de mielina que envolve os axônios (FERNANDEZ-VALLE *et al.*, 1995). As principais proteínas que modelam a estrutura da bainha de mielina são: Proteína Básica de Mielina (PBM) presente no sistema nervoso central e periférico e proteína proteolipídica (PLP) presente no sistema nervoso central. Estas duas proteínas compõem no mínimo 85% da proteína total na bainha de mielina que envolve o axônio (ASPIDU; BLAIR, 1994).

A própria presença da proteína básica de mielina (PBM) e seus peptídeos (fragmentos) são desencadeantes para a ativação vigorosa das células de *Schwann* (TZENG *et al.*, 1995; TZENG *et al.*, 1999).

A família **P1** de proteínas básicas de mielina é composta por polipeptídeos de 21.5-kDa, 18.5- kDa, 17- kDa e 14- kDa produzidos por trocas alternativas de genes individuais, os quais variam em relativas quantidades com altas sequências homólogas de espécies cruzadas. A proteína básica de mielina são proteínas hidrofílicas localizadas no lado citoplasmático de membranas mielínicas que contribuem para a estabilização da mielina por complexos formados com lipídios carregados negativamente (GARBAY *et al.*, 2000).

Outra família de PBM, a **P2**, está presente em valores bem mais baixos do que as isoformas de 18.5-kDa e 21.5-kDa da família P1. Esta proteína complementa a PBM/P1 é responsável por interagir com lipídios ácidos durante a principal consolidação da linha densa e é expressa somente em uma seleta população de fibras mielínicas (GARBAY *et al.*, 2000).

Após a injúria neural predominam os processos de remoção da mielina. Os macrófagos e células de *Schwann* produzem altos níveis de metaloproteases (WEE YOUNG *et al.*, 2001; LA FLEUR *et al.*, 1996) que degradam a mielina e desta forma promovem especificamente a fagocitose da PBM (MATYSZAK; PERRY, 1996; CHANDLER *et al.*, 1997; PROOST *et al.*, 1993). O processo de gênese de mielina nas células de *Schwann* ocorre mais tardiamente requerendo sinais oriundos do início do alongamento dos axônios (GUPTA *et al.*, 1993). Ou seja, a expressão da PBM pode ser um parâmetro do grau da velocidade da degeneração ou da regeneração do nervo dependendo do tempo pós-injúria em que é avaliada (CAMARA, 2009).

1.4.8. Fator de transcrição de ativação 3 (ATF-3)

O fator de transcrição de ativação 3 (ATF-3) é um membro da família ATF/CREB (fatores de transcrição de ativação/proteína de ligação a elemento responsivo ao cAMP) de fatores de transcrição. O ATF-3 é induzido por sinais de estresse em uma variedade de tecidos, como por exemplo no fígado, em condições de intoxicação e hepatectomia. No coração, em condições de isquemia e isquemia-reperusão; no rim, em isquemia-reperusão e cérebro, sob convulsão após tratamento com pentilenotetrazole (TSUJINO *et al.*, 2000; HAI e HARTMAN, 2001).

A indução de ATF-3 pode ser uma resposta celular a sinais de estresse. O ATF-3 não é expresso de forma constitutiva em gânglios da raiz dorsal e medula espinhal, sendo induzido em neurônios submetidos à axotomia. Além do mais, o ATF-3 é induzido em neurônios sensoriais e motores da medula espinhal após lesão do nervo, sendo considerado um marcador de injúria neuronal (TSUJINO *et al.*, 2000).

O gene ATF-3 é induzido por uma variedade de tipos de células por muitos sinais de estresse, sugerindo que o ATF-3 é chave nas respostas de estresse celular, apesar da expressão não ser nem do local estímulo, nem no tecido específico, mas são esses sinais que induzem ao dano celular (HAI e HARTMAN, 2001).

Fatores de transcrição controlam as alterações gênicas em nervos axotomizados, o ATF3 é induzido na regeneração axonal porque pode formar heterodímeros com c-Jun. Na degeneração Walleriana tem-se um “*upregulated*” pelas células de Schwann em degeneração dos nervos e “*downregulated*” após regeneração axonal (HUNT *et al.*, 2004).

1.4.9. Hipotireoidismo e Neuropatia periférica

Na clínica, pacientes com hipotireoidismo apresentam sintomas de disfunção neuromuscular, foi presumido então que o hipotireoidismo pode estar associado a uma polineuropatia sensorio-motora e outras neuropatias periféricas apresentando prevalências variando, entre 42 e 72% dos casos (DUYFF *et al.*, 2000).

Em estudos anteriores pacientes hipotireoideos apresentaram dores em queimaduras nas extremidades em forma de luvas, parestesias, ataxia e uma diminuição do reflexos profundos, a polineuropatia sensorio-motora foi confirmada por achados, em biópsia do nervo surral, de alterações degenerativas em axônios pela presença de aglomerados de pequenas fibras mielinizadas de desmielinização em formato de “cebola” e regeneração neuroaxonal incompleta (DYCK & LAMBERT, 1970; KRISTIN *et al*, 2006; ØRSTAVIK, NORHEIM E JØRUM, 2006).

Pacientes diagnosticados com hipotireoidismo apresentaram dor nas extremidades, sintomas e achados neurofisiológicos compatíveis com neuropatia de fibras de grande e pequeno calibre, bem como sinais de hiperexcitabilidade no sistema nervoso central (ØRSTAVIK, NORHEIM E JØRUM, 2006).

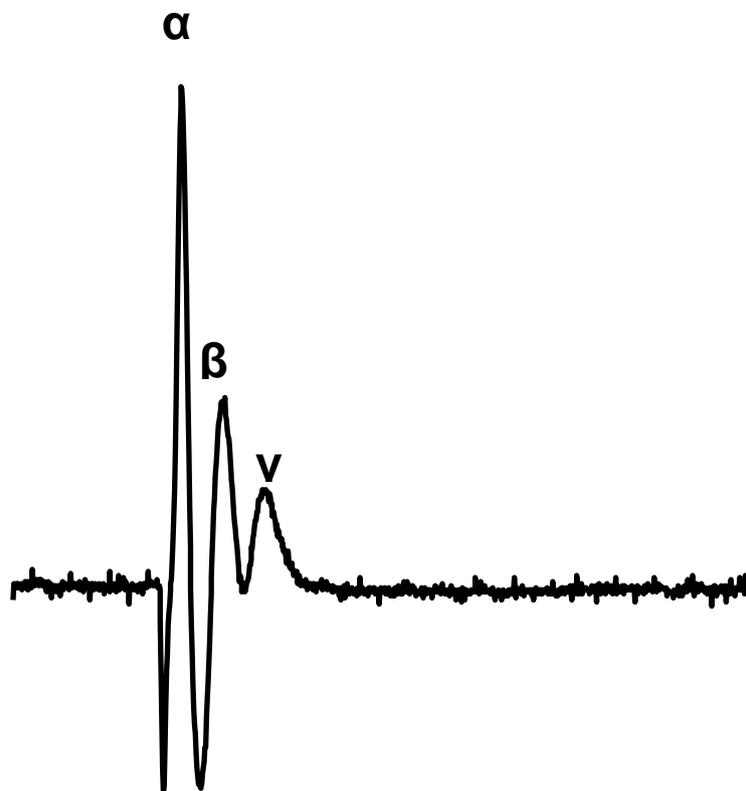
Estudos “*in vitro*” realizados na Universidade Estadual do Ceará, no Laboratório de eletrofisiologia, avaliamos experimentalmente em modelos animais o efeito do hipotireoidismo e da injúria por constrição crônica em nervo isquiático de rato através da medição de parâmetros eletrofisiológicos como: cronaxia (duração mínima de estímulo necessária para obter uma resposta ou gerar um potencial de ação), reobase (valor da intensidade do menor estímulo capaz de gerar uma resposta), velocidade de condução nervosa e amplitude do potencial de ação composto (PAC) (SOUSA, 2006) (**Figura 10**).

Com esses dados concluímos que os parâmetros de excitabilidade neural (cronaxia e reobase) no nervo isquiático estavam aumentados, portanto a excitabilidade neural diminuída, devido ao maior tempo que o neurônio responde ao estímulo e sua intensidade para se gerar um potencial de ação(**Figura 11**). A velocidade condução do primeiro componente diminuiu (**Figura 12**) e quando em associação com a neuropatia periférica atingiu os três componentes do potencial de ação composto (SOUSA, 2006).

Podendo-se sugerir que há uma alteração na população de canais de Na^+ voltagem dependentes nos axônios de animais hipotireoideos e neuropáticos

O hipotireoidismo amplificou a amplitude pico-a-pico e a amplitude positiva dos três componentes do PAC; quando associado á injúria constrictiva, houve abolição desse efeito amplificador e redução dessas amplitudes. O nervo isquiático é composto tanto por fibras sensitivas quanto motoras, onde as fibras motoras possuem maior velocidade de condução,

Figura 10: Registro eletrofisiológico do potencial de ação composto.



Registro original de um potencial de ação composto com presença do 1º componente (α), 2º componente (β) e 3º componente (γ). **Fonte:** Sousa, 2006

Figura 11. Dados eletrofisiológico da excitabilidade neural do nervo isquiático de rato

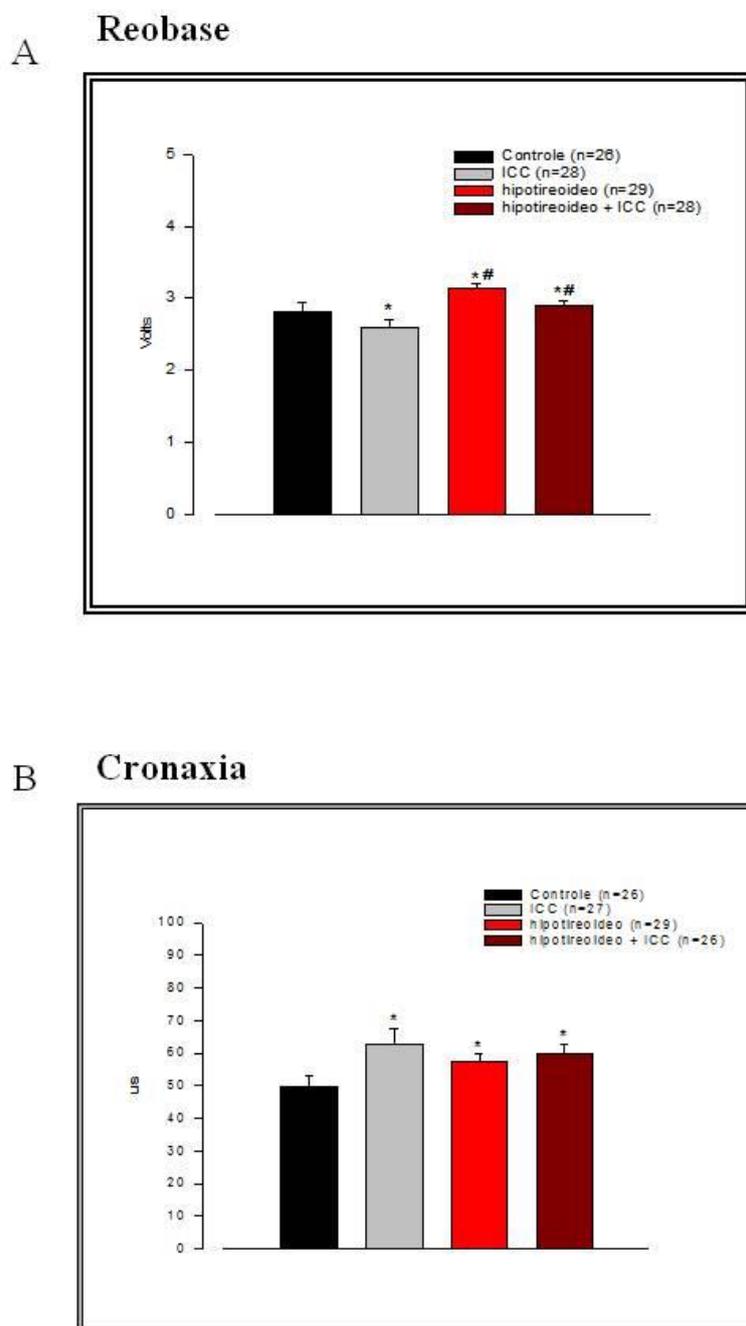


Ilustração dos dados eletrofisiológicos do potencial de ação composto sobre a excitabilidade neural: A) Reobase; onde os dados foram representados como média \pm erro padrão da média. *, $P \leq 0,05$ comparado ao controle (ANOVA teste de Dunn's), B) Cronaxia. Ratos submetidos ao hipotireoidismo e ICC, grupos controle, ICC, hipotireoideo e hipotireoideo +ICC. Dados estão representados como média \pm erro padrão da média. *, $P \leq 0,05$ comparado ao controle (teste t-Student). **Fonte:** Sousa, 2006

Figura 12. Dados eletrofisiológicos na velocidade condução nervosa do nervo isquiático de rato

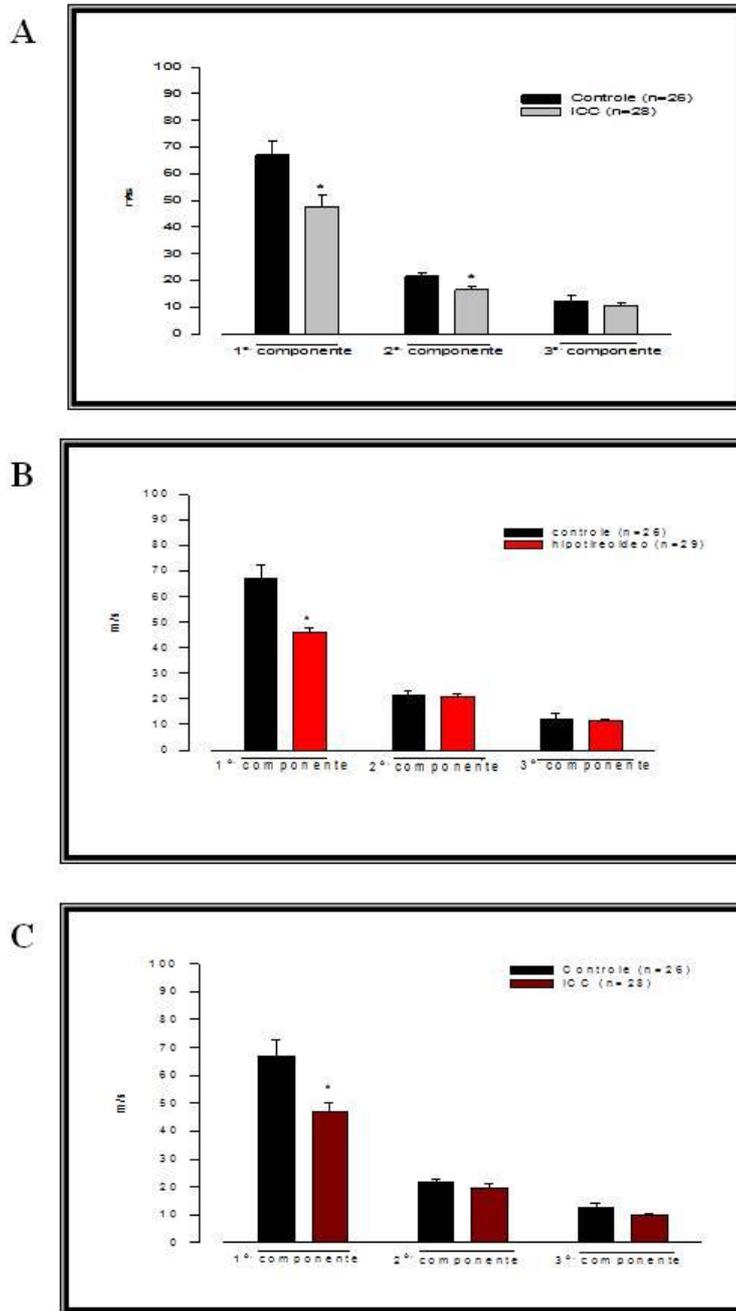


Ilustração dos dados eletrofisiológicos do potencial de ação composto sobre a velocidade de condução: A) Grupo controle *versus* ICC; B) Grupo controle *versus* hipotireoideo; C) Grupo controle *versus* hipotireoideo+ICC. Os dados estão representados como média \pm erro padrão da média. *, $P \leq 0,05$ comparado ao controle (teste t-Student), **Fonte:** Sousa, 2006.

2. JUSTIFICATIVA

As disfunções da tireoide, principalmente as que cursam com diminuição da produção de T_3 e T_4 , estão relacionadas a uma maior incidência de distúrbios de condução neural como a síndrome do túnel do carpo e outros tipos de neuropatia. Essas alterações sugerem uma relação direta entre hormônios tireoidianos e função neural. Muito já está descrito sobre o papel dos hormônios tireoidianos no neurodesenvolvimento com a descrição da importância desses hormônios para o crescimento e desenvolvimento dos córtices cerebral e cerebelar, sinaptogênese, crescimento axonal e produção da bainha de mielina no sistema nervoso central. Pouco se sabe da importância desses hormônios sobre o sistema nervoso periférico, principalmente quando se refere ao fenômeno das neuropatias periféricas.

Esse trabalho então se propõe a investigar o efeito do hipotireoidismo sobre a sensibilidade nociceptiva em um quadro de neuropatia induzida por constrição crônica do nervo isquiático. A neuropatia periférica é uma condição comum na clínica em estados de hipotireoidismo subclínico. Dessa forma, além de analisar a neuropatia periférica diante de um quadro de hipotireoidismo, poderemos observar a importância dos hormônios tireoidianos na resposta a injúria como a mielinização, alterações morfológicas no nervo e marcadores de injúria/regeneração e de ativação neuronal no gânglio periférico. Até a presente data, não existem trabalhos avaliando essas diferenças induzidas pelo hipotireoidismo em animais neuropáticos e nem os mecanismos envolvidos nessas alterações.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Estudar o efeito do hipotireoidismo sobre a neuropatia experimental induzida pela constrição crônica do nervo isquiático em ratos, avaliando o comportamento nociceptivo e parâmetros de neurodegeneração.

3.2. Objetivos Específicos

- Reproduzir o modelo de hipotireoidismo em ratos induzido por PTU e de mononeuropatia por constrição crônica do nervo isquiático avaliando os seguintes parâmetros:
 - ganho ponderal dos ratos durante a indução do hipotireoidismo e neuropatia periférica;
 - dosagem hormonal sérica da tetraiotironina (T₄)
 - dosagem hormonal de cortisol
 - dimensões da glândula tireoide (peso, comprimento vertical e horizontal) e as alterações morfológicas após a indução do hipotireoidismo e constrição crônica
- Avaliar o efeito do hipotireoidismo sobre a hiperalgesia mecânica na neuropatia induzida por constrição crônica do nervo isquiático;
- Investigar os efeitos do hipotireoidismo na expressão de ATF-3, como indicativo de dano neuronal/regeneração em gânglios da raiz dorsal na neuropatia induzida por constrição crônica do nervo isquiático;
- Investigar os efeitos do hipotireoidismo na atividade neuronal no nervo isquiático neuropático através da expressão de c-Fos em gânglios da raiz dorsal.
- Investigar os efeitos do hipotireoidismo na expressão da proteína básica de mielina (PBM), como indicativo de desmielinização ou re-mielinização neural na neuropatia induzida por constrição crônica do nervo isquiático;
- Avaliar os efeitos do hipotireoidismo nas alterações morfológicas do nervo isquiático após indução da neuropatia através da morfometria do nervo, investigando a área e o diâmetro das fibras.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Neste estudo seguiu-se as normas estabelecidas em 1983 pela *International Association for the study of Pain* (IASP) que estabelece uso do menor número possível de animais, que o modelo desenvolvido, não leve a incapacitação definitiva, que não interfira nas suas atividades rotineiras e que se deem condições a esses animais para que possam aliviar a dor (IASP, 1983) e foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal do Ceará UFC número 05/2015.

Foram utilizados Ratos *Wistar* machos pesando entre 200 e 250g provenientes do biotério central da UFC (26 a 28°C, ciclo claro/escuro - 12/12 h, água *ad libitum*). Os animais tiveram livre acesso a ração e foram condicionados em número de 6 por cada gaiola.

4.2. Pesagem dos Ratos

Os ratos para a constituição dos grupos experimentais nas três primeiras semanas foram separados em dois grupos de Controle (consumiram de água potável) e hipotireoideo (consumiram água com 0,05% de propiltiuracil (PTU)), após três semanas foram novamente separados randomicamente em quatro grupos: 1) grupo controle, 2) com injúria com constrição crônica no nervo isquiático (ICC), 3) grupo com hipotireoidismo HIPO, e 4) HIPO + ICC (hipotireoideo e com injúria com constrição crônica no nervo isquiático), foram pesados semanalmente, durante 42 dias, no mesmo dia e horário, para avaliação do ganho ponderal. (**Figura 13**).

4.3. Indução do Hipotireoidismo

Para promover diminuição das concentrações plasmáticas dos hormônios tireoidianos foi administrado propiltiuracil (PTU) *biolab* 0,05%, aos animais (QUATRINI *et al.*, 1993; MWANGI, 1998), juntamente na água de beber, durante 6 semanas. O controle deste grupo constitui-se de animais que ingeriram água não tratada com o PTU (**Figura 13**).

Figura 13: Protocolo experimental

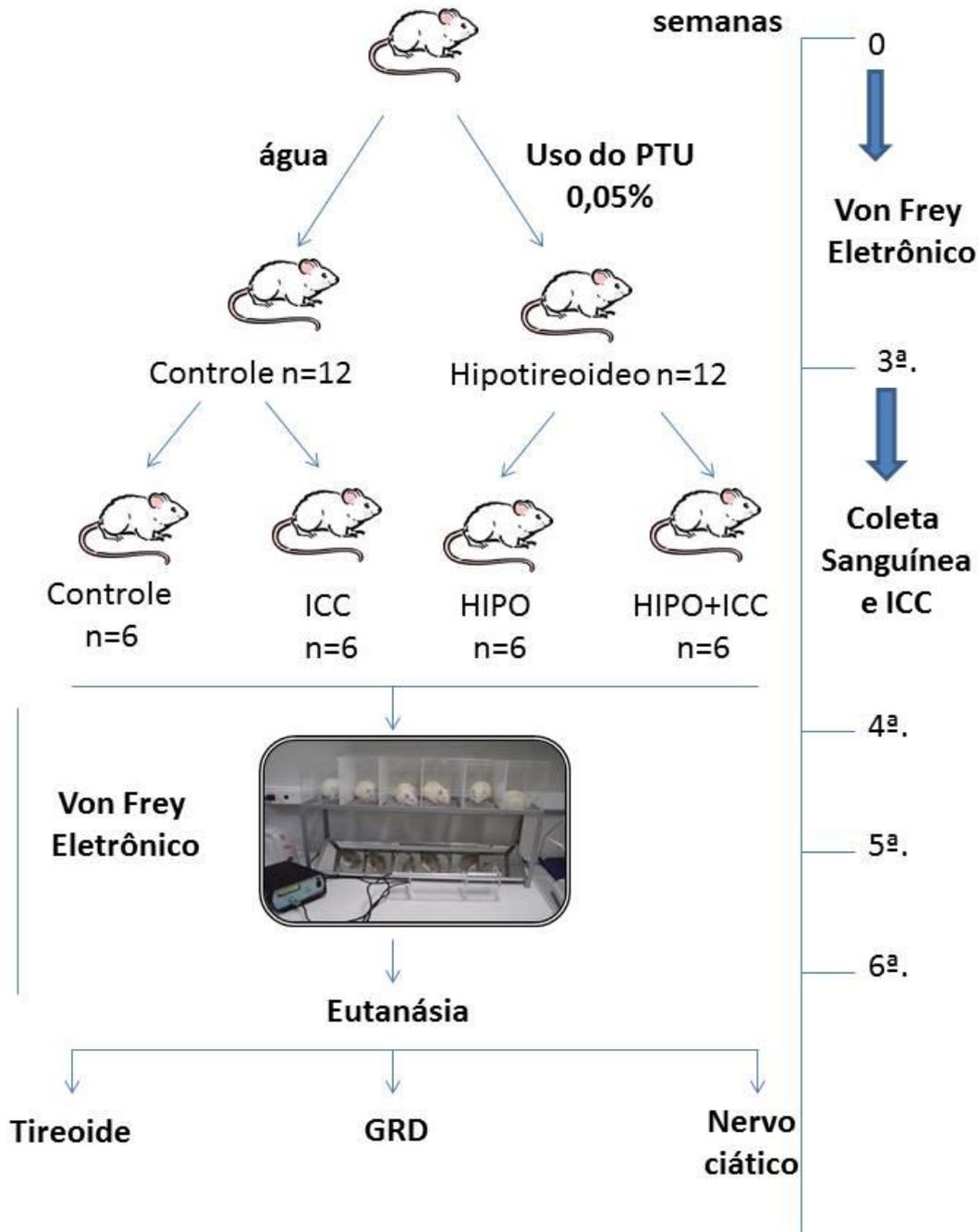


Ilustração do protocolo experimental, demonstrando as etapas e constituição dos grupos experimentais e os procedimentos realizados no período (em semanas) de toda a experimentação como pesagem dos animais; coleta sanguínea e indução da constrição crônica na terceira semana; Von Frey durante o início e posteriormente a partir da quarta semana e eutanásia na sexta semana onde se coletou os tecidos nervosos: GRD (gânglio da raiz dorsal), nervo isquiático; e coleta da glândula tireoide.

4.4. Coleta Sanguínea e Mensuração do hormônio tireoidiano

As amostras de sangue foram obtidas nos animais após as 3 semanas de uso do PTU, para comprovar o estado de hipotireoidismo, sangue total foi obtido por punção de plexo orbital antecedida de sedação com acepromazina (4mg/Kg) via intraperitoneal. O sangue colhido foi centrifugado a 6500rpm e o soro separado adequadamente em frascos criopreservantes. As amostras de soro foram devidamente identificadas e acondicionadas em freezer -20°C até o momento das análises de cortisol e tiroxina total (T₄). As determinações hormonais foram realizadas no laboratório VETTINGS serviços laboratoriais especializados, em parceria com o Laboratório de patologia clínica Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará. Foi utilizado o aparelho miniVidas (Biomerieux) que processa as amostras de modo automatizado e independente por ensaio fluorescente ligado a enzima (ELFA), combinando o método ELISA com uma leitura final em fluorescência. O tempo de reação avaliado e o volume necessário (100 a 200 microlitros de soro) variam de acordo com o hormônio utilizado sendo 100 microlitros para T₄ e 200 microlitros para Cortisol

4.5. Modelo de Indução da mononeuropatia: Injúria por constrição crônica (ICC) do nervo isquiático.

Após as 3 semanas de tratamento com o PTU, foi induzida neuropatia utilizando o modelo de dor neuropática em ratos, através da técnica de Injúria por Constrição Crônica (ICC) no nervo isquiático de rato como descrito por Bennet & Xie (1988). Cada animal recebeu, 12 hs antes da cirurgia, 25.000 unidades de benzilpenicilina potássica por via intramuscular. Os ratos foram previamente anestesiados com ketamina (100 mg/kg) e xilasina (10 mg/kg) via intraperitoneal. Foi feita uma incisão longitudinal de 15 mm na altura da coxa, região dorso-lateral, ao nível do trocanter (fêmur), no membro posterior direito. O nervo isquiático da pata direita foi acessado e exposto e realizado ligadura frouxa com fio de sutura 4.0, distanciando-se de cerca de 1mm entre as ligaduras e proximal à trifurcação ciática. Na região suturada foi realizada a assepsia com álcool iodado, para evitar contaminação. Os animais submetidos à cirurgia foram colocados em caixas individuais (**Figura 14**).

Figura 14: Modelos experimentais de lesão mecânica no nervo isquiático de roedores.

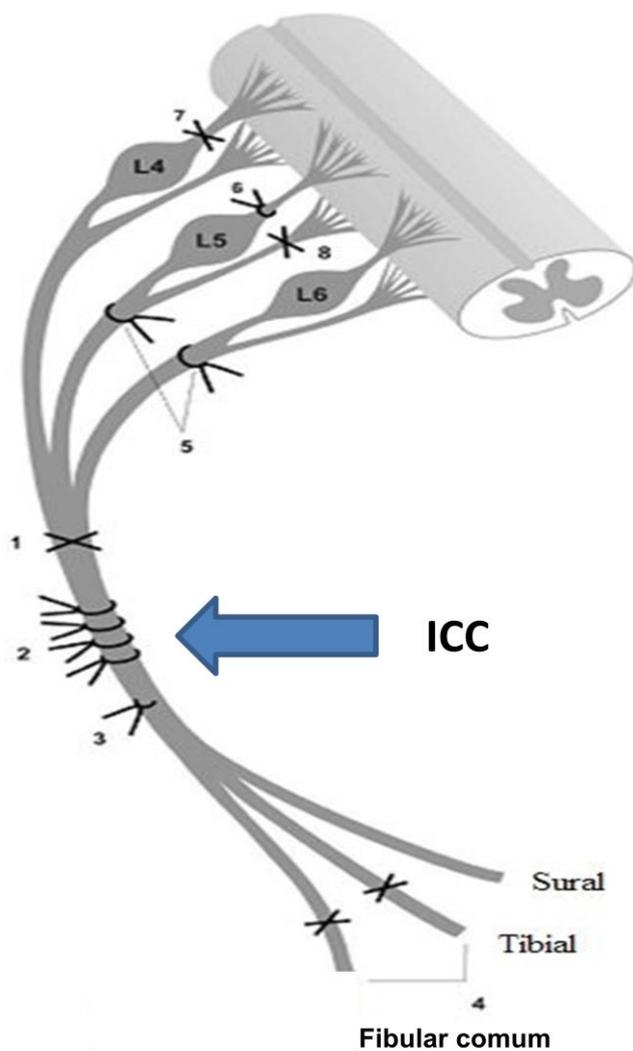


Ilustração esquemática do modelo experimental de dor neuropática baseado em lesão de estruturas nervosas periféricas.: 1. Seccionamento do nervo isquiático; 2. Lesão de constrição crônica (ICC); 3. Ligação parcial do nervo isquiático; 4. Modelo de lesão do nervo isquiático com preservação do ramo sural; 5. Ligação segmentar do nervo em L5/L6; 6. Constrição da raiz dorsal; 7. Rizotomia dorsal; 8. Rizotomia ventral **Fonte:** Moraes, 2010. Adaptada pelo autor.

4.6. Desenhos experimentais

Os ratos foram separados em 4 grupos experimentais após três semanas de tratamento com PTU:

Grupo I: Controle, animais eutireoideos e sem neuropatia, n=6. (**Figura 15. A**).

Grupo II: ICC, animais eutireoideos com neuropatia, n=6 (**Figura 15.B**).

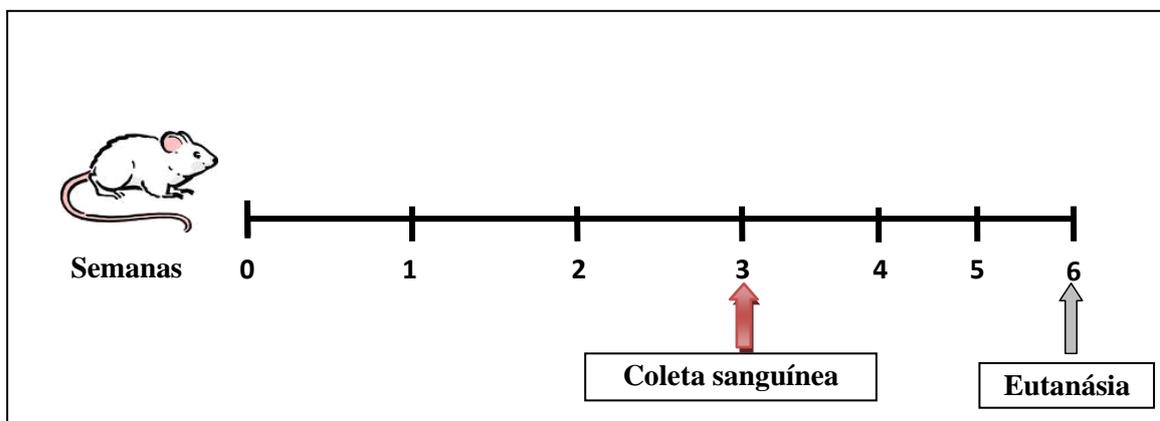
Grupo III: HIPO, animais hipotireoidos sem neuropatia, n=6 (**Figura 15.C**).

Grupo IV: HIPO + ICC, animais hipotireoidos com neuropatia, n=6 (**Figura 15.D**).

Durante o período experimental foi realizado controle do peso corporal semanalmente e a observação de dor espontânea, após a indução da mononeuropatia periférica, Von Frey eletrônico concomitantemente da quarta a sexta semana.

Figura 15. A : Grupo I Controle: animais eutireoideos e sem neuropatia.

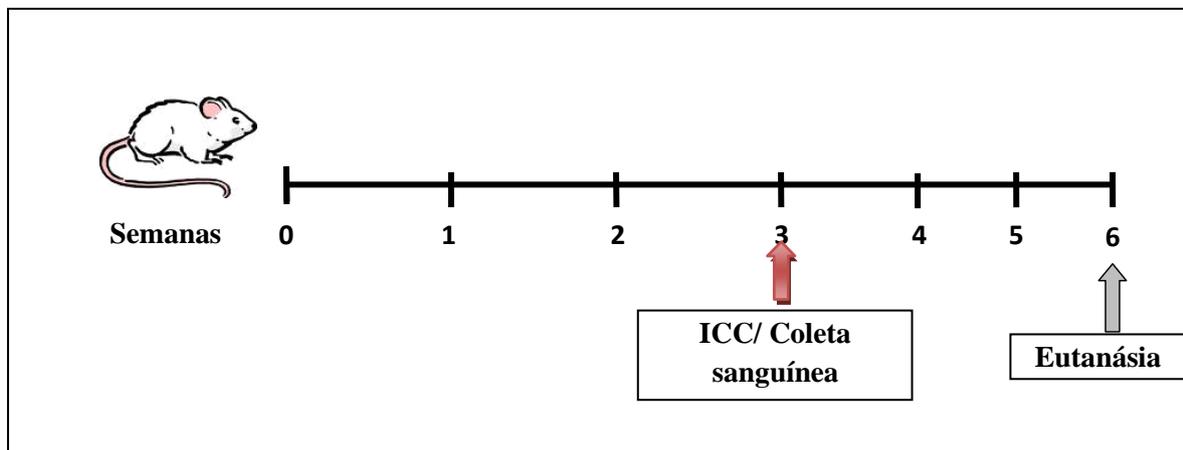
A.



Ratos com dois meses de idade receberam água potável durante todo o período experimental (6 semanas). Ao completar três semanas de tratamento com o PTU, foi coletado o sangue para medição do hormônio tireoidiano e cortisol, e na sexta semana foram submetidos a eutanásia.

Figura 15. B.: Grupo II: ICC, animais eutireoideos com neuropatia

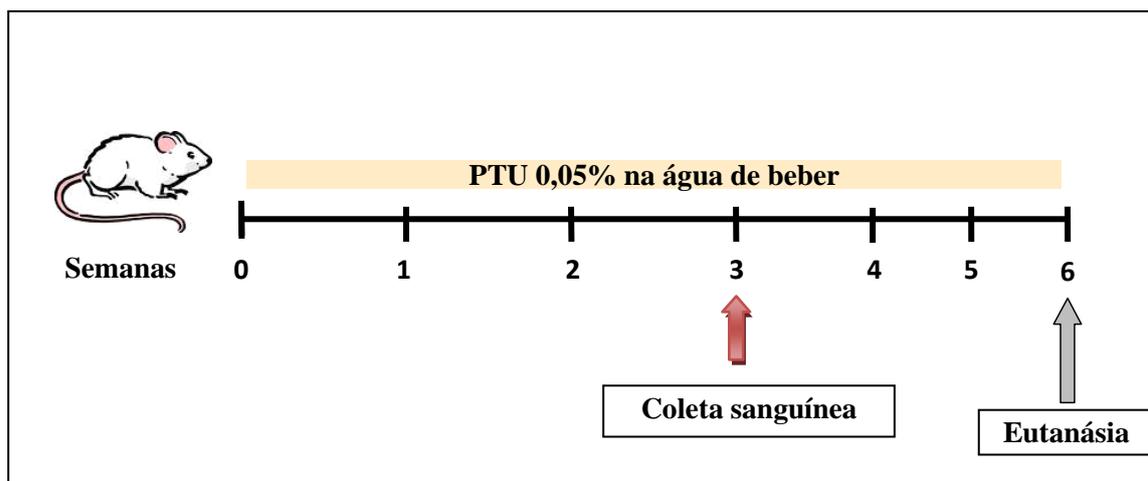
B.



Ratos com dois meses de idade receberam água durante todo o período experimental (6 semanas). Ao completar três semanas de tratamento, os animais foram submetidos a injúria por constrição crônica (ICC) e a coleta de sangue para medição do hormônio tireoidiano e cortisol na sexta semana foram submetidos a eutanásia.

Figura 15. C: Grupo III: HIPO, animais hipotireoides sem neuropatia.

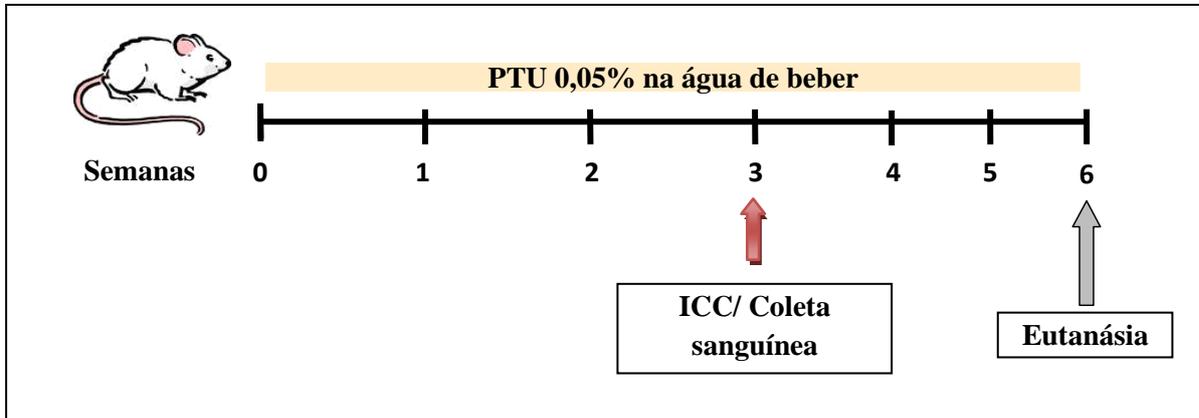
C.



Ratos com dois meses de idade receberam água contendo 0,05% de propiltiuracil (PTU) (grupo HIPO) durante todo o período experimental (6 semanas). Ao completar três semanas de tratamento, foi realizada a coleta de sangue para medição do hormônio tireoidiano e cortisol, na sexta semana foram submetidos a eutanásia.

Figura 15. D: Grupo IV: HIPO + ICC, animais hipotireoideos com neuropatia.

D.



Ratos com dois meses de idade receberam água contendo a 0,05% de propiltiuracil (PTU) (grupo HIPO) durante todo o período experimental (6 semanas). Ao completar três semanas de tratamento, os animais foram submetidos a injúria por constrição crônica (ICC) e a coleta sanguínea para medição do hormônio tireoideo e cortisol, na sexta semana foram submetidos a eutanásia.

4.7. Teste de alodínia mecânica (Von Frey eletrônico)

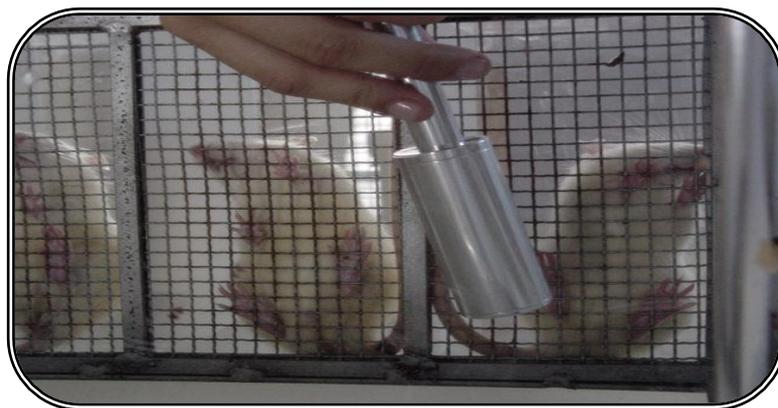
A intensidade de hiperalgesia em animais neuropáticos e hipotireoideos foi avaliada pelo limiar de sensibilidade de cada animal a um estímulo mecânico produzido pela pressão gradual exercida por um filamento rígido acoplado a um aparelho que registra a pressão em gramas exercida na ponta desse filamento, em local silencioso e pouco iluminado, na sala de estudo da dor (LAFICA- UFC). Dez minutos antes de começar o teste, os ratos foram colocados em gaiolas de acrílico com dimensões 12x10x17cm sob uma grade de arame (**Figura 16**). Um espelho inclinado é colocado a baixo da grade de arame para a visualização da região das patas traseiras do animal, na qual é exercida a estimulação mecânica. O aparelho de Von Frey eletrônico (Insight®) registra a pressão em gramas suficiente para provocar reação descrita como flexão da pata seguida por um “flinch” após a retirada da pata em contato com ao aparelho (**Figura 17**). As medidas do Limiar de Retirada da Pata (LRP) em gramas foram obtidas antes da cirurgia de ICC e depois na 4^a, 5^a e 6^a semanas após a ICC. A primeira medida, feita antes da indução do hipotireoidismo induzido pelo tratamento com PTU, e após a 3 semana da indução do hipotireodismo, semanalmente na 4^a. , 5^a. e 6^a. semana de ICC. (ARGUIS *et al.*,2008; TRIERWEILER *et al.* , 2012).

Figura 16: Teste de alodínia plantar (Von Frey Eletrônico).



Fotografia do condicionamento dos ratos na plataforma de alumínio e nas gaiolas de acrílico

Figura 17: Teste de alodínia plantar (Von Frey Eletrônico).



Fotografia da aplicação da pressão com filamento rígido na pata traseira do animal rato na plataforma de alumínio e nas gaiolas de acrílico

4.8. Coleta do nervo isquiático, gânglios da raiz dorsal e glândula tireoide.

Na 6ª semana após a indução do hipotireoidismo, logo após as observações dos comportamentos, os animais foram anestesiados, via intraperitoneal com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Foi realizada a perfusão intracardíaca com 60 mL de solução salina e 60 mL de solução de paraformaldeído (PFA) a 4%. O gânglios da raiz dorsal L₅ e o nervo isquiático foram removidos, acondicionados por 1 hora em PFA a 4% e, em seguida, foi feita a crioproteção em sacarose 30% por 2 dias. Depois, os tecidos foram acondicionados com tissue-tek®, em freezer, a temperatura de - 80°C.

No mesmo procedimento, após perfusão, a glândula tireoide foi removida, pesada em balança analítica e através de um paquímetro foram realizadas medições laterais (altura) e horizontais (comprimento), depois foi conservada em formol a 10 %, depois em álcool 70%, incluída em parafina, cortada e corado com hemotoxilina e eosina, para realização de análise histopatológica por microscopia óptica.

4.9. Análise histopatológica da tireoide

A análise histopatológica da glândula tireoide foi feita com as amostras retiradas, como descrito anteriormente. Os tecidos foram parafinizados e cortados em micrótomo em cortes de 4um de espessura para realização de coloração por hematoxilina e eosina. As lamina foram analisadas e fotografadas em microscópio óptico. Os seguintes parâmetros foram avaliados: aspecto morfológico dos folículos tireoidianos e das células foliculares.

4.9.1. Imunofluorescência para ATF-3, c-Fos e PBM em nervo isquiático e gânglio da raiz dorsal.

Com os tecidos extraídos, foram feitos cortes de 14 μm (para nervo isquiático), 10 μm (para gânglio), no criostato (Leica CM1850) (**Figura 17**), à temperatura de -24°C . Os cortes foram fixados por 2 minutos em metanol e ficaram imersos em PBS até o momento de começar a imunofluorescência. Em seguida, foi feita a recuperação antigênica com tampão citrato 0,1M (pH 6,0), sob aquecimento em forno micro-ondas, por 15 minutos, à temperatura de 95°C . Após o resfriamento, obtido em temperatura ambiente, por 20 minutos, foi feita a permeabilização da membrana nuclear (para ATF-3 e C-Fos) com triton X-100 (0,1%) e foi feito o bloqueio com albumina sérica bovina (BSA) 5 % acrescida de glicina 0,3M por 30 minutos. Os cortes foram lavados com PBS e incubados, durante a noite, à temperatura de 4°C , com o anticorpo primário feito em coelho anti-ATF-3 (Abcam®) ou anti c-Fos (Santacruz Biotechnonology®) ou anti-PBM (Santa Cruz Biotechnonology®) na diluição 1:200 em BSA 5%. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas, durante 1 hora e 30 minutos, com o anticorpo anti-igG de coelho Alexa flúor 568 (Invitrogen®) ou anti-igG de coelho Alexa flúor 488 nm (invitrogen) ou na diluição de 1:400 em BSA 5%. Em cortes de gânglio foi feito ainda a incubação com o anticorpo anti-NeuN conjugado com alexa flúor 488, para marcação de corpo celular de neurônios. Em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS, montadas com “Prolong gold” e fotografadas no microscópio confocal (LM 710, Zeis).

A quantificação da área marcada nas fotos foi feita diferenciando as áreas marcadas (pixels) pela maior saturação de cor associada à marcação (vermelha ou verde). Para isso, foi utilizado o programa Finji Image J. O procedimento foi baseado na saturação da cor associada à marcação positiva para um determinado marcador. Os limites necessários para definição de pixels marcados e não marcados foram definidos previamente. Para a quantificação de área marcada foram utilizadas no mínimo 4 fotos por grupo de animais diferentes. Os resultados dessa quantificação foram apresentados em porcentagem, a qual foi calculada a marcação positiva de um determinado marcador em relação a área total da foto, que foi considerada de 100%. Os marcadores quantificados foram ATF-3, c-Fos e PBM. O NeuN foi utilizado para marcar os corpos neuronais, de modo que a co-marcação (“merge”) foi utilizada para mostrar se os neurônios estariam expressando ATF-3 e C-Fos.

Figura 18: Criostato (Leica) utilizado para os cortes dos tecidos nervosos para imunofluorescência



4.9.2. Microscopia eletrônica nervo isquiático

A microscopia eletrônica foi realizada na Universidade Federal de Brasília UnB. Após perfusão, o nervo isquiático foi dissecado e retirado, aproximadamente 1cm de tecido da porção distal, sendo imediatamente imersa na solução Karnovsky modificada, composta por 2% de PFA, 2,5% de Glutaraldeido em tampão Cacodilato de Sódio (Caco) 0,1M pH 7,4, durante 3h em temperatura ambiente. Posteriormente o material foi lavado, três vezes, em Caco durante 5 minutos cada lavagem. Na Pós-fixação o tecido foi imerso em Tetróxido de Ósmio 1% junto com Ferricianeto de K^+ Cl_2Ca 5mM, durante uma hora em ambiente escuro. Após essa etapa o material foi lavado com dois banhos de Caco 0,1M e dois banhos de água, cinco minutos cada.

A contração foi feita “in block” (antes do corte) com Acetato de Uranila no mínimo duas horas em ambiente escuro. Após a contração do material, o mesmo foi lavado três vezes em água destilada e foi desidratado em banhos de acetona 30%, 50%, 70%, 90%, trinta minutos em cada e 100% três banhos de dez minutos cada. Após a desidratação o tecido foi imerso em uma solução contendo acetona e resina Spurr-s inicialmente em uma proporção de 2 medidas de acetona para 1 de resina, durante seis horas no mínimo, depois, 1:1, 1:2 e finalmente resina pura com a tampa do endorf aberta para eliminar qualquer vestígio de acetona, permanecendo somente resina.

Durante o processo para emblocar teve-se o cuidado de posicionar o material para a obtenção de cortes transversais do nervo, assim o material emblocado permaneceu 72h na estufa a 65°C para a polimerização da resina. Os blocos de resina polimerizados foram trimados com lamina de aço para formar uma pirâmide. O bloco estando piramidado foi encaminhado para o corte ultra-fino de espessura de 70nm, o qual é colocado em *grids* metálicos de cobre pré tratadas em ácido clorídrico (HCl) 1M, H₂O e Etanol. Após a colocação dos cortes nas telinhas, o material foi analisado no Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL JEM 1011 para a obtenção de imagens com aumento de até 20.000 vezes (ALVES *et al.*, 2013).

4.9.3. Análise da microscopia eletrônica do nervo isquiático

Em uma primeira fase realizou-se uma análise subjetiva através da comparação das imagens organizadas em pranchetas. Para essa comparação buscou-se organizar as imagens que apresentassem o mesmo aumento e/ou a mesma barra de calibração. Posteriormente foi feita uma análise objetiva, escolhendo aleatoriamente 100 axônios mielínicos do grupo controle e 200 axônios mielínicos do grupo hipotireóideo, onde foi medido o diâmetro e área. Para essa análise foi utilizado o software Finji Image J (ALVES *et al.*, 2013).

4.9.4. Procedimentos de eutanásia

Para coleta de tecidos foi realizada eutanásia dos animais após os testes nociceptivos, imunofluorescência, microscopia óptica e eletrônica, os ratos foram anestesiados por injeção de ketamina (100 mg/kg) e xilasina (10 mg/kg) via intraperitoneal. Uma incisão na altura do apêndice xifoide foi realizada e estendida até a altura do coração. Os animais foram então transcárdialmente perfundidos com 60 ml de solução salina e 60 ml de paraformaldeído a 4% tamponado. O gânglio da raiz dorsal das raízes L₄, L₅ e L₆ o nervo isquiático e a tireoide foram excisados.

4.10. Estatística

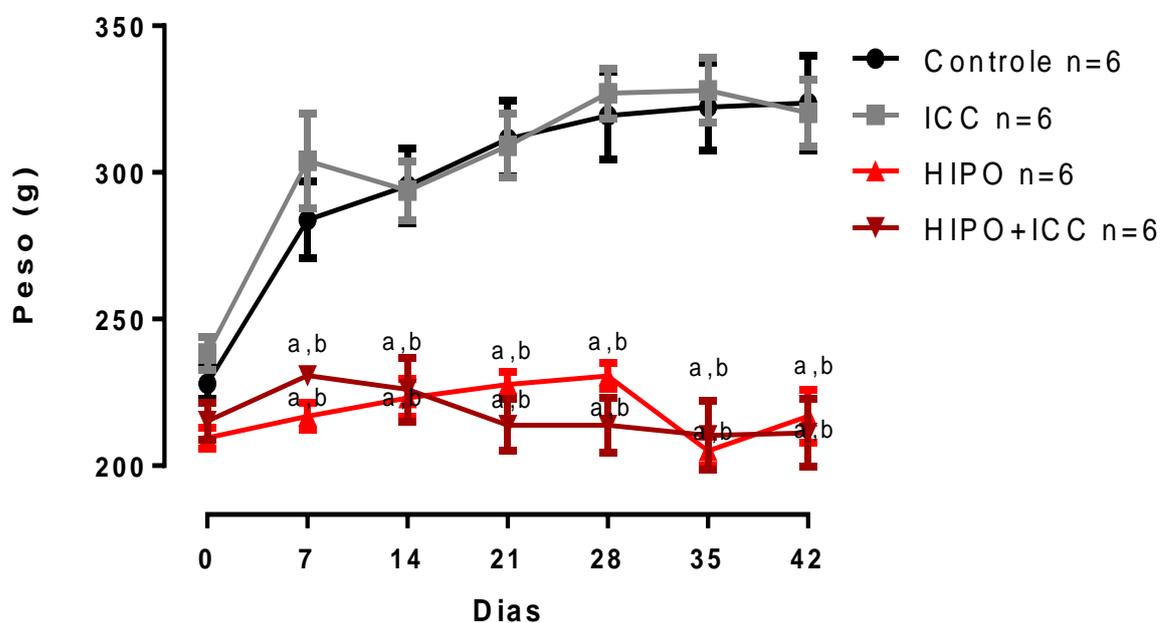
Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Para verificação das diferenças estatísticas entre os grupos experimentais, foi utilizado o ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls ou Bonferroni, o teste t- Student também foi utilizado para comparação em dois grupos. Foram utilizados seis animais por grupo experimental os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. As análises foram feitas utilizando-se o software GraphPad Prism 5.0.

5. RESULTADOS

5.1. Efeito da indução do hipotireoidismo sobre o ganho ponderal

Antes do início do tratamento com PTU os animais apresentaram peso médio de 225 ± 8 g. O **gráfico 1**, mostra o ganho ponderal dos ratos tratados e não tratados com PTU, durante 42 dias (6 semanas). Conforme pode ser observado, ratos que receberam PTU (grupos HIPO e HIPO+ICC) na água de beber mantiveram o peso médio inicial durante todo o tempo de experimentação enquanto os animais dos grupos controle e ICC mostraram um ganho ponderal, estatisticamente significativo, desde a primeira semana de 225 ± 8 g a 317 ± 21 g ao final da 6 semana (42 dias). (ANOVA; $p < 0,001$) (Gráfico 1).

Gráfico 1: Evolução do ganho ponderal em ratos tratados com PTU (HIPO e HIPO+ICC) e ratos não tratados com PTU (Controle e ICC) durante 42 dias.



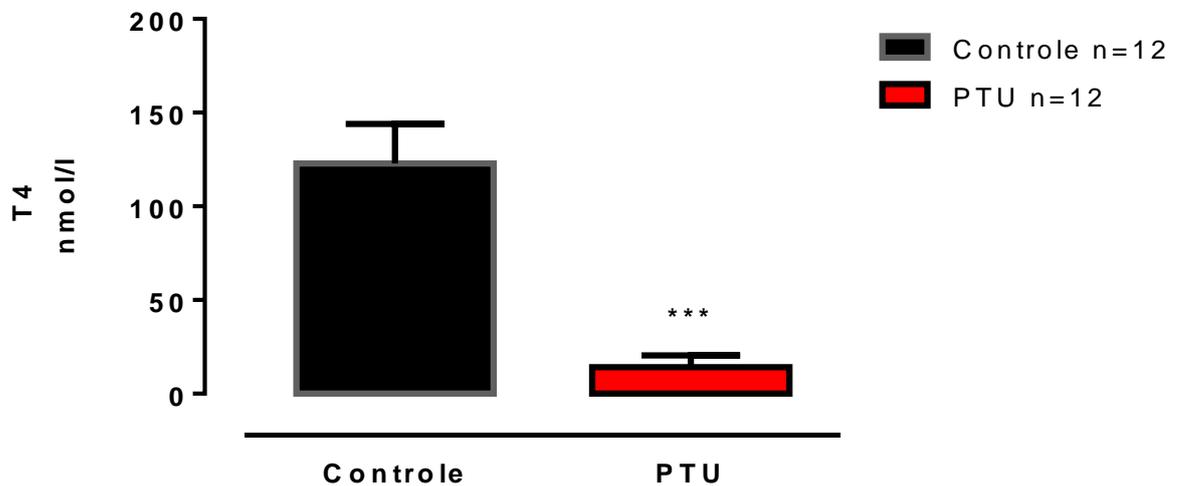
O gráfico representa o ganho ponderal dos ratos tratados e não tratados com PTU, por 42 dias (6 semanas). Os grupos HIPO e HIPO+ICC, não aumentaram o peso quando comparados aos grupos Controle e ICC. **a,b** $P < 0,001$ comparado ao controle e ao grupo ICC respectivamente (ANOVA, teste de Bonferroni).

5.2. Dosagens hormonais

5.2.1.1 Concentração sérica do hormônio tireoidiano, tiroxina (T₄) após três semanas do uso do PTU

A determinação da concentração sérica do hormônio tireoidiano foi realizada para a comprovação do estado de hipotireoidismo. O **gráfico 2**, apresenta resultados da dosagem do hormônios tireoidiano (T₄) nos grupos sem indução de hipotireoidismo (Controle: Controle e ICC) e com indução de hipotireoidismo (PTU: HIPO e HIPO+ICC). Pode-se observar que nos animais com indução de hipotireoidismo (PTU), as concentrações de T₄ foram menores ($14,13 \pm 2.08$ nmol/l) em comparação ao sem indução de hipotireoidismo (Controle; $122,09 \pm 6.69$ nmol/l) (teste t-Student; $p < 0,001$). Vale salientar que a dosagem foi feita em sangue coletado após 3 semanas da indução com PTU, antes de induzir a neuropatia (**Gráfico 2**).

Gráfico 2: Dosagem hormonal de T4 sérico em ratos tratados com PTU (HIPO) e ratos não tratados com PTU (Controle) na 3ª. Semana após a ingestão de PTU.

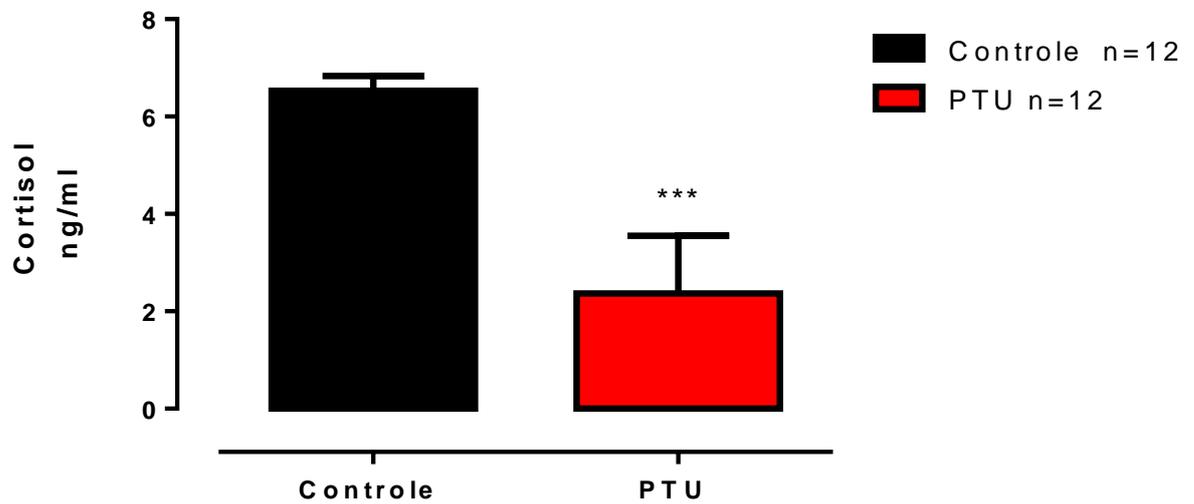


O gráfico representa a concentração sérica de tiroxina (T4) em ng/ml, medida após 3 semanas de uso do propiltiuracil (PTU). Os grupos com indução de hipotireoidismo (PTU) apresentaram diminuição da concentração de tiroxina (T4) comparado ao grupo sem indução de hipotireoidismo (controle). ***, diferença estatisticamente significativa quando comparado ao controle ($P < 0,001$, t - Student).

5.2.1.2 Concentração sérica de cortisol após três semanas do uso do PTU

A determinação da concentração sérica do hormônio tireoidiano foi realizada para a comprovação do estado de hipotireoidismo. O **gráfico 3**, apresenta resultados da dosagem do hormônios cortisol nos grupos sem indução de hipotireoidismo (Controle: Controle e ICC) e com indução de hipotireoidismo (PTU: HIPO e HIPO+ICC). Pode-se observar que nos animais com indução de hipotireoidismo (PTU), as concentrações de cortisol foram menores ($2,36 \pm 0.12$ ng/ml) em comparação ao sem indução de hipotireoidismo (Controle; 6.56 ± 0.12 ng/ml) (teste t-Student; $p < 0,001$) (**Gráfico 3**).

Gráfico 3: Dosagem hormonal de cortisol sérico em ratos tratados com PTU (HIPO) e ratos não tratados com PTU (Controle) na 3ª. Semana após a ingestão de PTU.

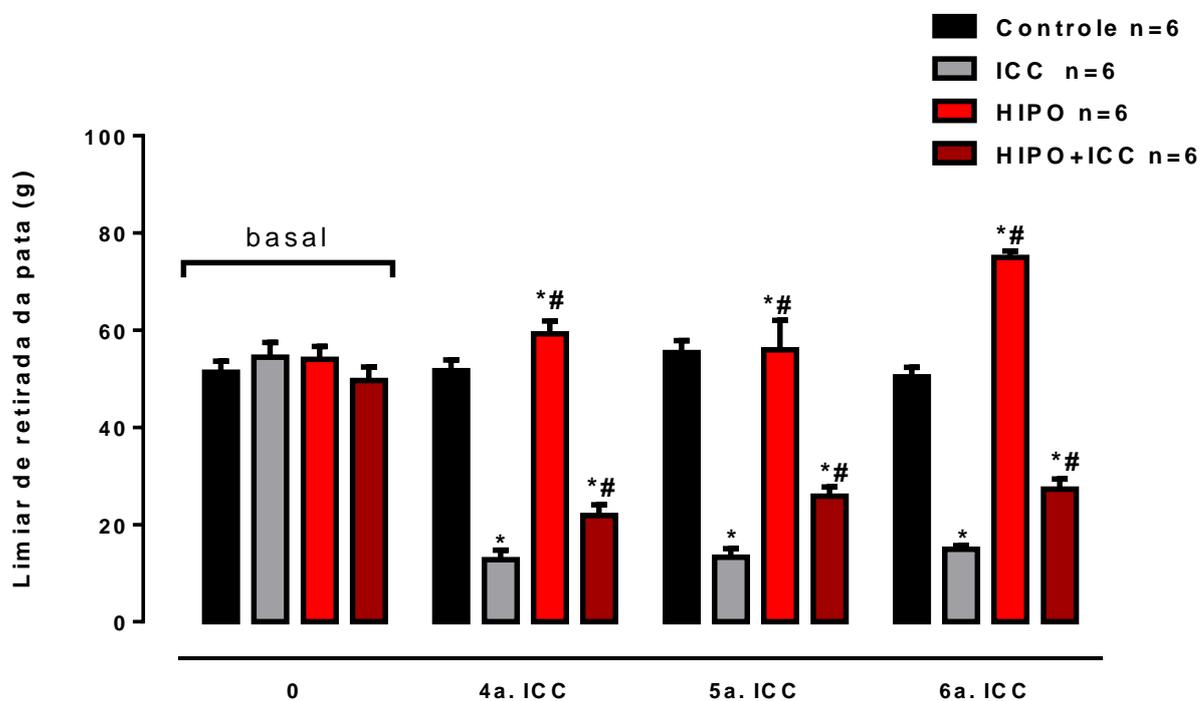


O gráfico representa a concentração sérica de cortisol em ng/ml, medida após 3 semanas de uso do propiltiuracil (PTU). Os grupos com indução de hipotireoidismo (PTU) apresentaram diminuição da concentração de tiroxina (T4) comparado ao grupo controle. ***, diferença estatisticamente significativa quando comparado ao controle ($P < 0,001$, t - Student).

5.3. Avaliação do limiar nociceptivos no teste de hiperalgesia mecânica plantar em ratos submetidos a indução do hipotireoidismo experimental e injúria por constrição crônica.

Após 21 dias do início do tratamento com PTU, os animais estavam hipotireoideos e foram separados em grupos: Controle, Neuropático (ICC), hipotireoideo (HIPO) e Hipotireoideo com neuropatia (HIPO+ICC). A hiperalgesia plantar a foi avaliada, através do teste de Von Frey eletrônico, na pata direita traseiras dos ratos, antes da indução de neuropatia e depois semanalmente até a 3^a. semana de indução da injúria por constrição crônica. O gráfico 4 mostra a evolução comparativa do limiar nociceptivo durante três semanas. Conforme pode ser observado, o limiar de retirada de pata foi reduzido significativamente, nos grupos ICC e HIPO+ICC, com relação ao grupo controle. No grupo HIPO o limiar de retirada de pata aumentou significativamente na 1^a. e 3^a. semana comparado ao grupo controle. O grupo HIPO + ICC demonstrou um limiar mais alto quando comparado ao grupo ICC (ANOVA;# p< 0,05) (**Gráfico 4**).

Gráfico 4: Evolução comparativa da hiperalgesia mecânica plantar em ratos submetidos a indução do hipotireoidismo e ICC.



O gráfico representa a evolução comparativa do limiar de retirada de pata, pelo modelo de hiperalgesia mecânica (Von Frey Eletrônico) nos grupos controle, grupo neuropático (ICC), grupo neuropático e com uso de PTU (HIPO+ICC). Basal. 4ª. ICC (1ª. semana de injúria por constrição) 5ª. ICC (2ª. semana de injúria por constrição), 6ª. ICC (3ª. semana de injúria por constrição) (*, diferença estatisticamente significante quando comparado ao controle #, $p < 0,05$ comparados ao grupo neuropático (ICC). ($p < 0,05$ ANOVA, teste de Newman-Keuls).

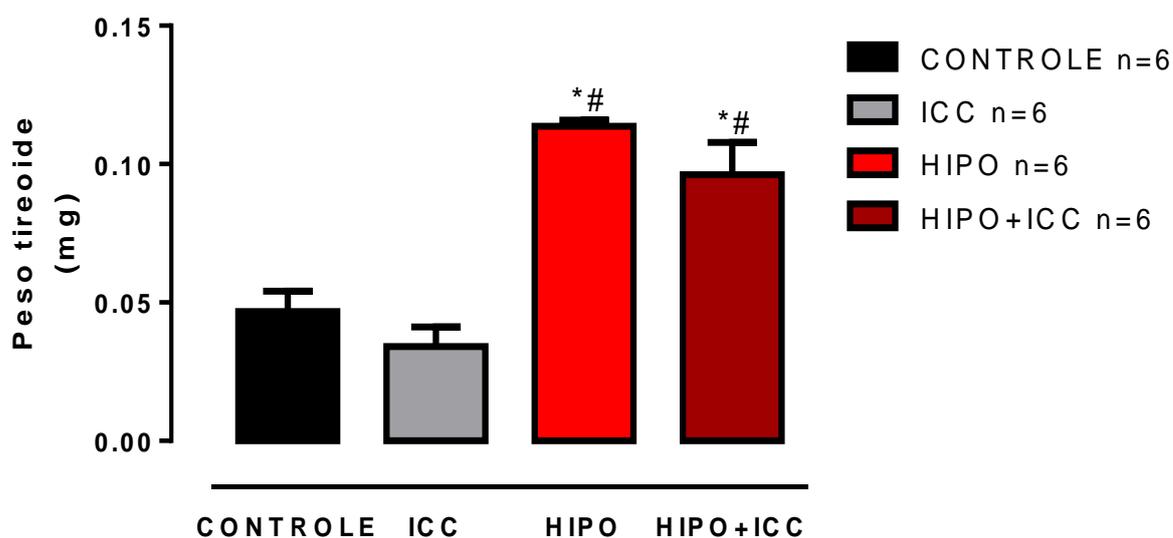
5.4. Efeito da indução do hipotireoidismo sobre o peso e as dimensões a glândula tireoide após seis semanas

A determinação do peso da glândula tireoide foi realizada 6 semanas após o consumo do PTU na água de beber em todos os grupos experimentais (Controle, ICC, HIPO e HIPO+ICC), a fim se verificar possíveis alterações da glândula tireoide. Os **gráficos 5 A, 5B e 5C** e a **tabela 2** apresentam resultados da medição do peso da glândula tireoide, das alterações do comprimento vertical (altura) e do comprimento horizontal (largura) da mesma, respectivamente. A indução de hipotireoidismo através da administração de PTU aumentou o peso da tireoide nos grupos (0.09 ± 0.01 mg e 0.11 ± 0.076 mg; HIPO e HIPO+ICC, respectivamente em comparação com o controle e ICC 0.05 ± 0.003 mg e 0.03 ± 0.02 mg) Apresentando diferença estatística significativa (ANOVA, Bonferoni; $p<0,001$). (**Gráfico 5 A**).

O **gráfico 5.B** e a **tabela 2** apresentam resultados da medição da alteração na medida do comprimento vertical (altura) da glândula tireoide, foi medida nos dois lobos direito (LD) e esquerdo (LE). A indução de hipotireoidismo através da administração de PTU aumentou comprimento vertical, tanto no lobo direito ($4,0\pm 0.4$ mm e $4,2\pm 0.6$ mm; HIPO e HIPO+ICC, respectivamente em comparação com o controle $5,5\pm 0.26$ mm e ICC $2,3 \pm 0.23$ mm) quanto no lobo esquerdo ($4,1\pm 0.4$ mm e $4,0\pm 0.6$ mm; HIPO e HIPO+ICC, respectivamente em comparação com o controle $5,1\pm 0.2$ mm e ICC $2,65 \pm 0.15$ mm), sendo estatisticamente significativo (ANOVA, Bonferoni; $p<0,001$).

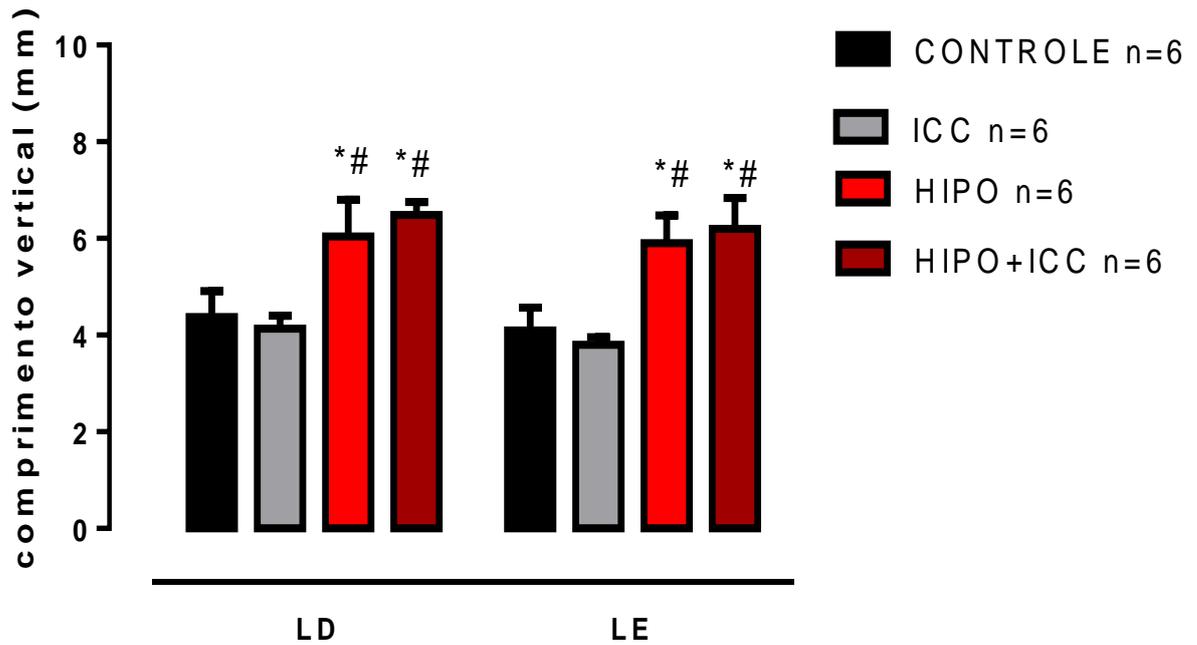
O **gráfico 5. C** e a **tabela 3**, apresentam resultados da medição da alteração na medida do comprimento horizontal (largura) da glândula tireoide, foi medida nos dois lobos direito (LD) e esquerdo (LE). A indução de hipotireoidismo através da administração de PTU aumentou comprimento horizontal tanto no lobo direito (6.5 ± 0.6 mm e 6.55 ± 0.1 mm; HIPO e HIPO+ICC, respectivamente em comparação com o controle 3.7 ± 0.21 mm e ICC $4,1 \pm 0.2$ mm) quanto no lobo esquerdo ($5,9\pm 0.4$ mm e 6.2 ± 0.9 mm; HIPO e HIPO+ICC, respectivamente em comparação com o controle $3,5\pm 0.23$ mm e ICC $3,8 \pm 0.1$ mm), sendo estatisticamente significativo (ANOVA, Bonferoni; $p<0,001$) (**Figura 20**).

Gráfico 5. A: Peso da glândula tireóide em ratos tratados com PTU (PTU: HIPO e HIPO+ICC) e ratos não tratados com PTU (Controle e ICC) após a ingestão de PTU.



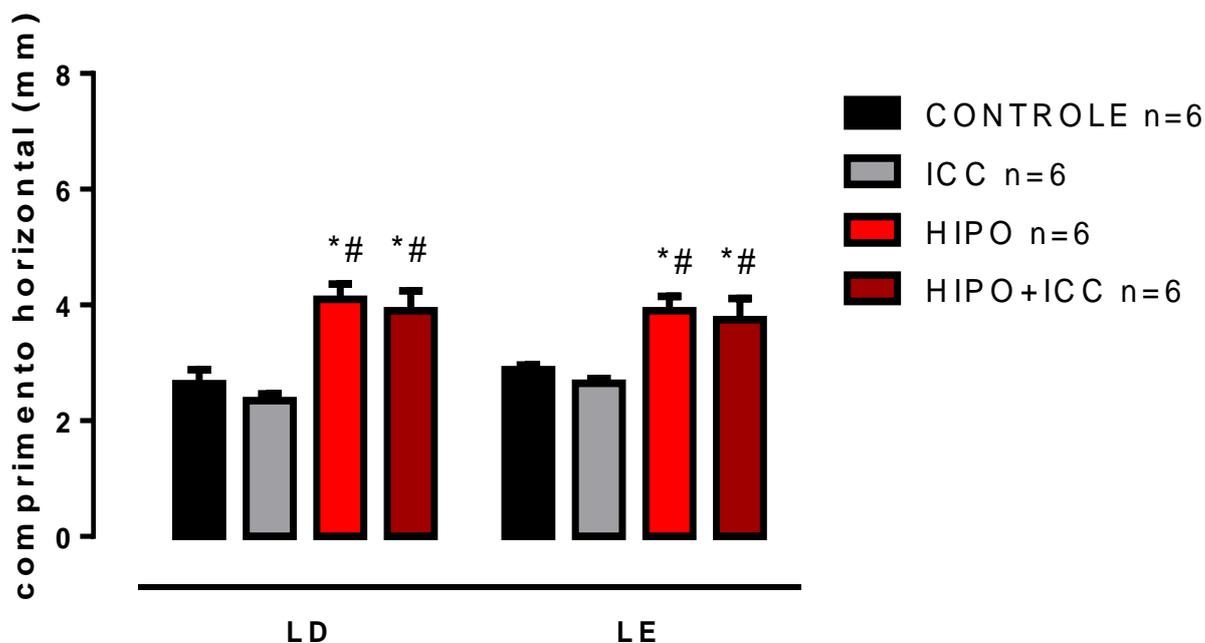
O gráfico representa o peso da tireoide foi medido após 6 semanas de uso do propiltiuracil (PTU). Nos grupos que fizeram uso do PTU (HIPO, HIPO+ICC) houve o aumento do peso da tireoide com relação ao grupo controle e ICC. *, diferença estatisticamente significativa quando comparado ao controle. # diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo ICC, (*#, $p < 0,001$, ANOVA, Bonferroni).

Gráfico 5.B: Comprimento vertical da tireoide nos lobos direito e esquerdo em ratos tratados com PTU (PTU: HIPO e HIPO+ICC) e ratos não tratados com PTU (Controle e ICC) após a ingestão de PTU.



O gráfico representa a medida de comprimento vertical da tireoide (altura), foi medida nos dois lobos, direito (D) e esquerdo (E); foi medido após 6 semanas de uso do propiltiuracil (PTU). Nos grupos que fizeram uso do PTU (HIPO, HIPO+ICC) houve o aumento da altura da tireóide com relação ao grupo controle e ICC. *, diferença estatisticamente significativa quando comparado ao controle. # diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo ICC. (*#, $p < 0,001$, ANOVA, Bonferroni)

Gráfico 5.C: Comprimento horizontal da tireoide nos lobos direito e esquerdo em ratos tratados com PTU (PTU: HIPO e HIPO+ICC) e ratos não tratados com PTU (Controle e ICC) após a ingestão de PTU.



O gráfico representa a medida de comprimento horizontal da tireoide, foi medida nos dois lobos, direito (LD) e esquerdo (LE); foi medido após 6 semanas de uso do propiltiuracil (PTU). Nos grupos que fizeram uso do PTU (HIPO, HIPO+ICC) houve o aumento da largura da tireóide com relação ao grupo controle e ICC *, diferença estatisticamente significativa quando comparado ao controle. # diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo ICC. (*#, $p < 0,001$, ANOVA, Bonferroni).

Tabela 3: Efeito da indução do hipotireoidismo sobre o comprimento horizontal e vertical da tireoide medição em (mm).

	Comprimento horizontal LD	Comprimento horizontal LE	Comprimento vertical LD	Comprimento vertical LE
CONTROLE	3,7 ± 0,21mm (N=6)	3,5 ± 0,23mm (N=6)	5,5 ± 0.26 mm (N=6)	5,1 ± 0,20 mm (N=6)
ICC	4,1 ± 0.2 mm (N=6)	3,8 ± 0.1mm (N=6)	2,3 ± 0.23 mm (N=6)	2,65 ± 0.15mm (N=6)
HIPO	6,5 ± 0.6 mm (N=6) *#	5,9 ± 0.4 mm (N=6) *#	4,0 ± 0.4 mm (N=6) *#	4,1 ± 0.4 mm (N=6) *#
HIPO+ICC	6.55 ± 0.1mm (N=6) *#	6.2 ± 0.9mm (N=6) *#	4,2 ± 0.6 mm (N=6)*#	4,0 ± 0.6mm (N=6)*#

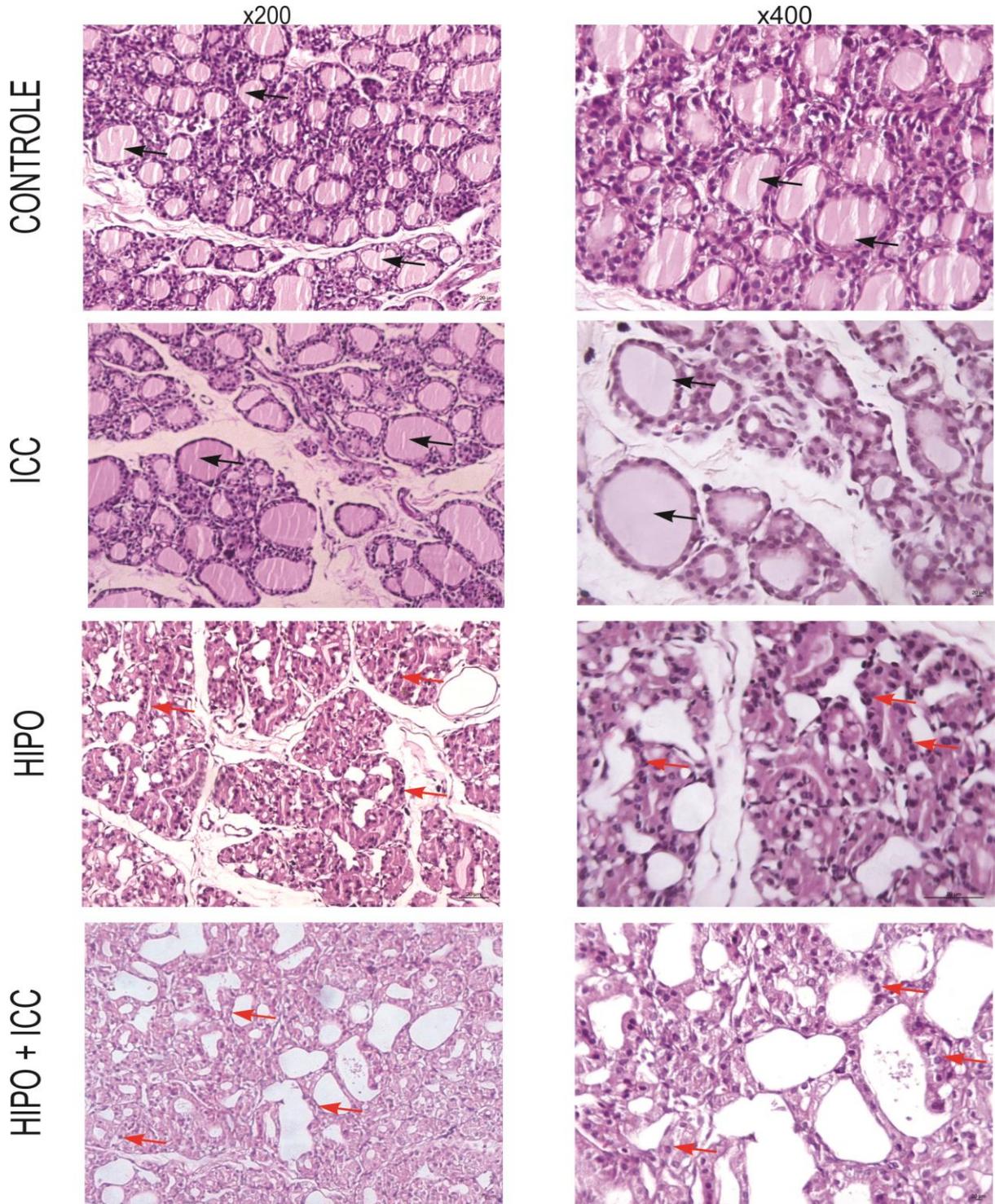
*, # p< 0,001, ANOVA . Diferença estatisticamente significativa comparado ao controle e ao grupo neuropático (ICC).

FONTE: Elaborada pelo autor.

5.5. Estudo histológico da glândula tireoide

A histologia da glândula tireoide foi realizada 6 semanas após o consumo do PTU na água de beber em todos os grupos experimentais (Controle, ICC, HIPO e HIPO+ICC), a fim de verificar as possíveis alterações morfológicas da glândula tireoide. Nos grupos que fizeram uso do PTU (grupo HIPO e HIPO+ICC) houve uma diminuição do material colóide, indicado pelas setas pretas (**Figura 19**). Foi observada também uma alteração morfológica dos folículos tireoidianos, com perda do formato arredondado e hiperplasia das células foliculares, indicadas pelas setas vermelhas. Essas alterações foram observadas nos aumentos de 200X e 400X, nos grupos HIPO e HIPO+ICC quando comparados aos grupos controle e ICC.

Figura 19: Fotomicrografia da análise histopatológica da glândula tireoide de ratos controle, hipotireoideos (HIPO), neuropáticos (ICC) e neuropáticos e hipotireoide(HIPO+ICC).



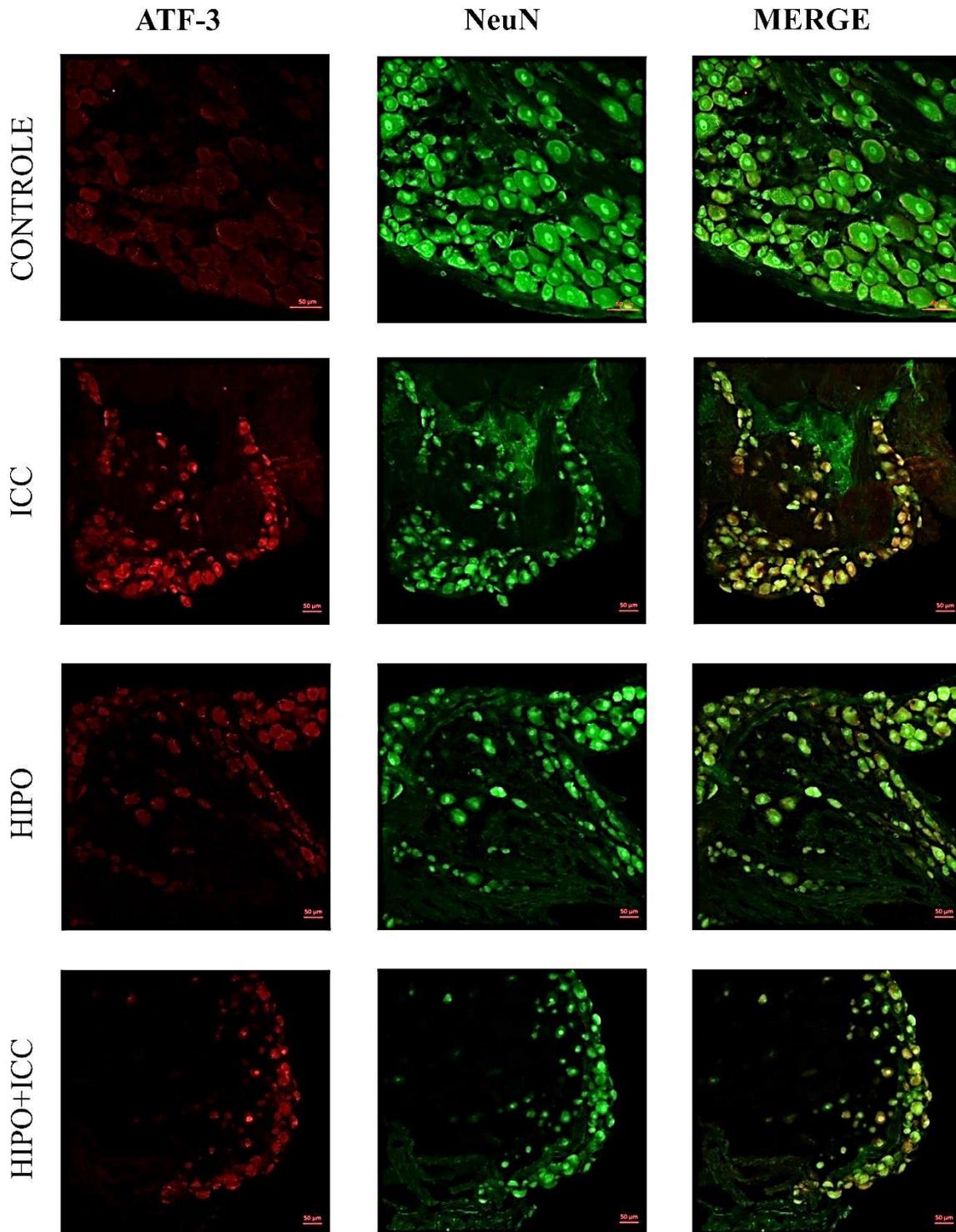
Histologia da glândula tireoide em HE, mostrando folículos tireoideanos dos grupos Controle, neuropático (ICC), hipotireoideo (HIPO) e neuropático com hipotireoidismo (HIPO+ICC). As setas pretas indicam a presença de material colóide no interior do folículo tireoideano e também o formato arredondado do folículo. As setas vermelhas indicam hiperplasia das células foliculares e a alteração do formato folicular. Magnificação de 200 e 400X.

5.6. Imunofluorescência para ATF-3 em gânglio da raiz dorsal em ratos submetidos a indução do hipotireoidismo e injúria por constrição crônica ICC.

Na imunofluorescência para ATF-3, após 6 semanas de indução do hipotireoidismo (PTU) e 21 dias da indução da injúria por constrição (ICC), foi observado um aumento significativo (*, $p < 0,001$) na imunoexpressão do fator de ativação de transcrição ATF-3 nos grupo com ICC e uma diminuição significativa nos grupos HIPO e HIPO+ICC ([#], $p < 0,001$), quando comparados ao grupo ICC. Houve também um aumento significativo do grupo HIPO+ICC em relação ao HIPO.

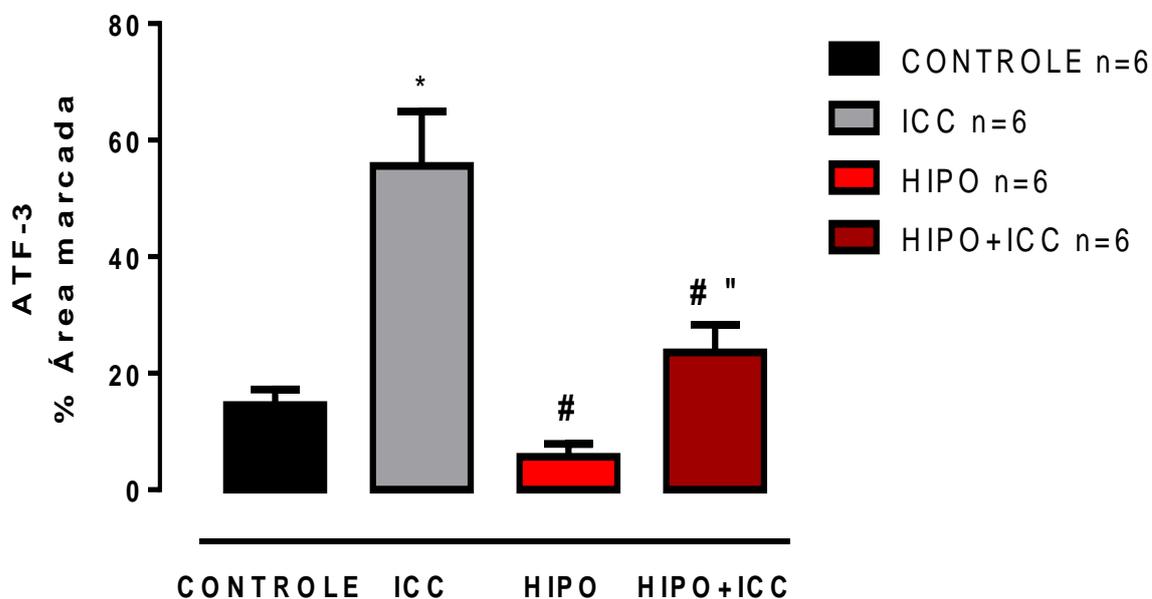
Na análise quantitativa da imunoexpressão do ATF-3, houve um aumento estatisticamente significativo no grupo ICC em relação ao grupo controle; uma diminuição da imunoexpressão em comparação do grupo ICC e grupos HIPO e HIPO+ICC, e um aumento comparado o grupo HIPO como o grupo HIPO+ICC. (**Figura 20; Gráfico 6; Tabela 3**)

Figura 20: Fotomicrografia da imunopressão de ATF-3 no gânglio da raiz dorsal de ratos controle, hipotireóides (HIPO), neuropáticos (ICC) e neuropáticos e hipotireóides (HIPO+ICC).



Vermelho: fator de ativação de transcrição ATF-3; verde: NeuN (marcado de neurônio); laranja: fusão; Controle, grupo neuropático ICC; grupo hipotireóideo (HIPO) e grupo neuropático e hipotireóideo (HIPO+ICC).

Gráfico 6: Análise quantitativa para expressão de ATF-3 no GRD em ratos submetidos a indução do hipotireoidismo e ICC

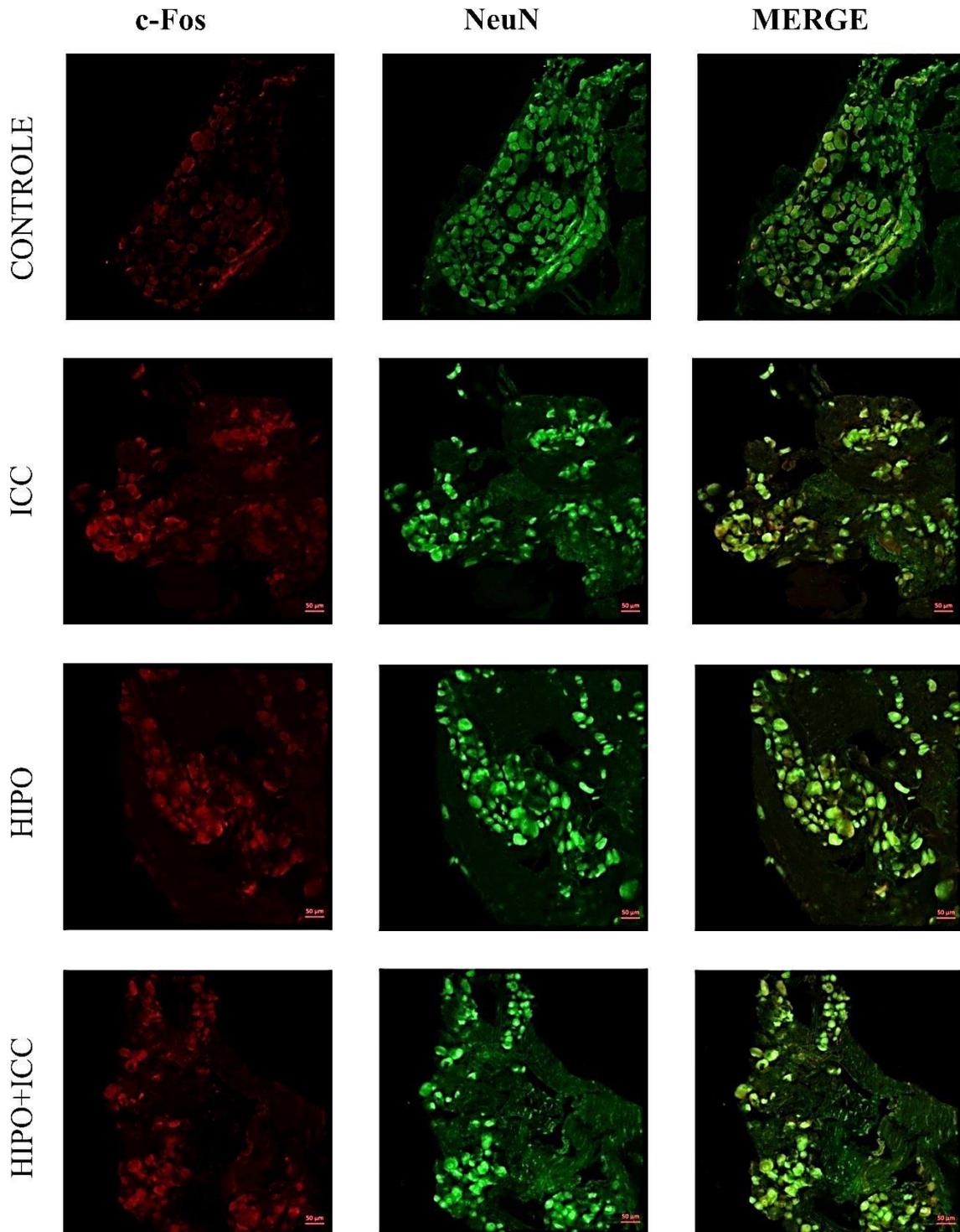


O gráfico representa a quantificação (%) da área marcada pela imunoposição do fator de ativação de transcrição ATF-3 em gânglios da raiz dorsal (GRD) de L4 em ratos controle (CONTROLE), hipotireóides (HIPO), neuropáticos (ICC) e neuropáticos e hipotireóides (HIPO+ICC). *, a imunoposição aumentou no grupo ICC comparado ao grupo controle. #, diminuiu a imunoposição comparando os grupos HIPO e HIPO+ICC com o grupo ICC e “, aumentou a imunoposição no grupo HIPO+ICC em relação ao HIPO (*; #, $P < 0,001$; “, $P < 0,005$ ANOVA, Bonferroni).

5.7. Imunofluorescência para c-Fos em gânglio da raiz dorsal em ratos submetidos a indução do hipotireoidismo e injúria por constrição crônica ICC.

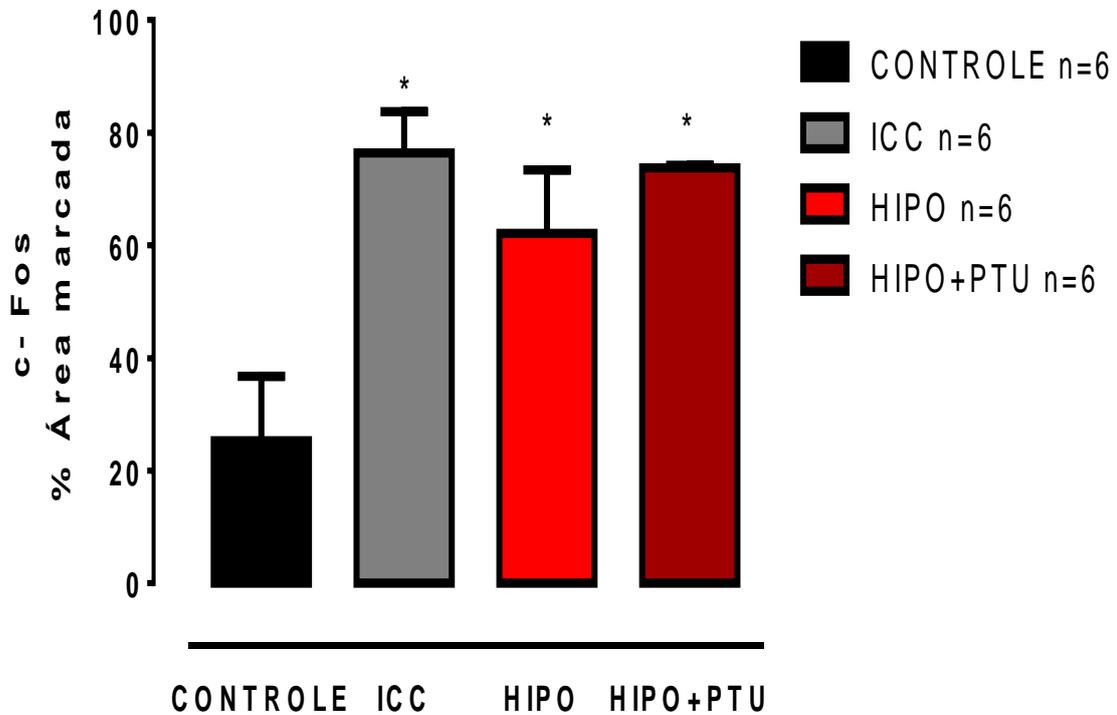
Na imunofluorescência para c-Fos, após 6 semanas de indução do hipotireoidismo (PTU) e 21 dias da indução da injúria por constrição (ICC), foi observado um aumento significativo do gene de ativação imediata c-Fos na imunoexpressão nos grupos com ICC, HIPO e HIPO+ICC com relação ao grupo controle (ANOVA, * $p < 0,05$). (**Figura 21; Gráfico 7; Tabela 3**).

Figura 21 Fotomicrografia da imunoexpressão de c-Fos no gânglio da raiz dorsal de ratos controle, hipotireóides (HIPO), neuropáticos (ICC) e neuropáticos e hipotireóides (HIPO+ICC).



Vermelho: do onco-gene de transcrição imediata (c-Fos); verde: NeuN (marcador de neuronal); laranja: fusão; Controle, grupo neuropático ICC; grupo hipotireóide (HIPO) e grupo neuropático e hipotireóide (HIPO+ICC).

Gráfico 7: Análise quantitativa para expressão de c-Fos no GRD em ratos submetidos a indução do hipotireoidismo e ICC.



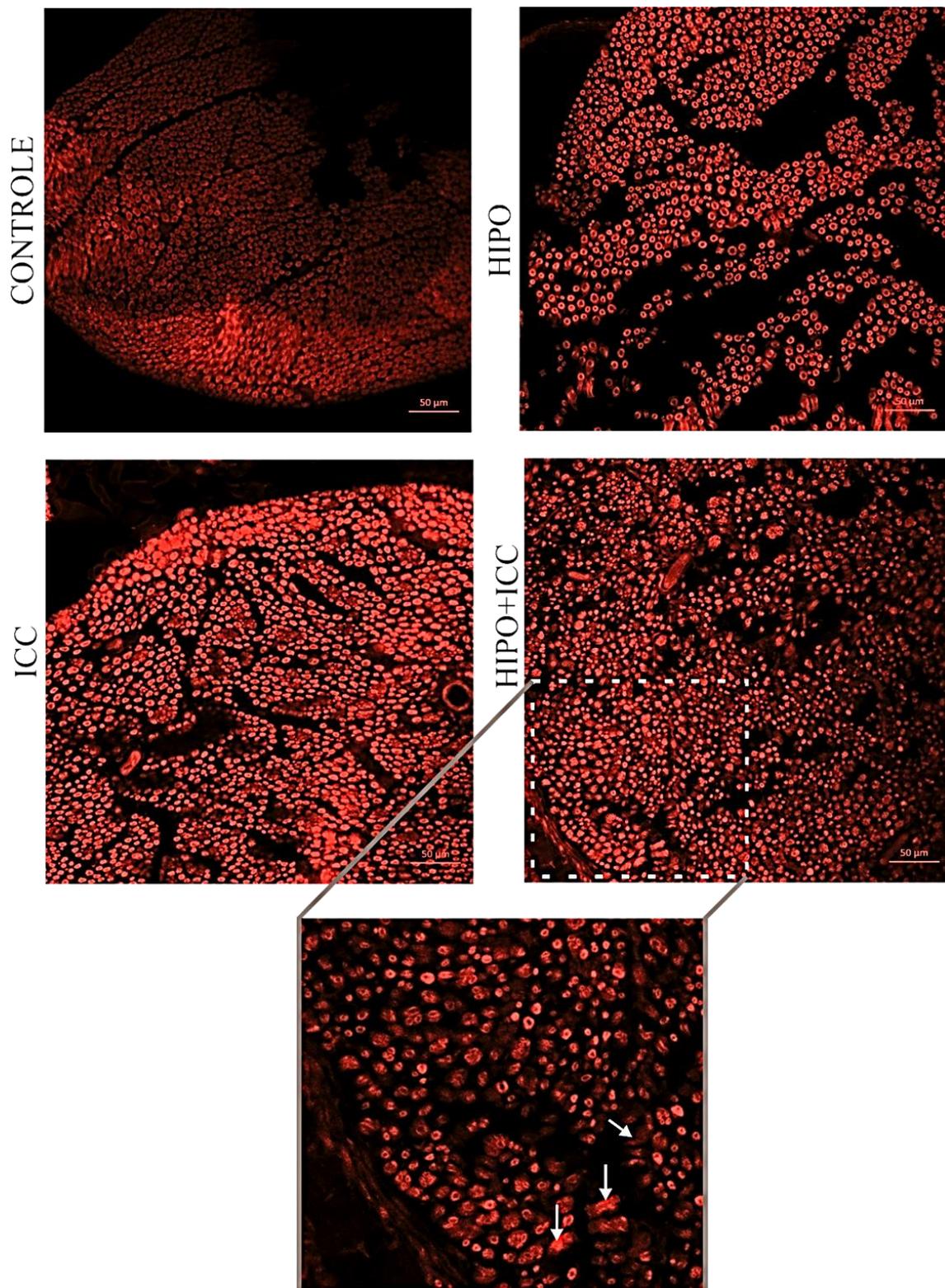
O gráfico representa a quantificação (%) da área marcada pela imunoposição pelo gene de ativação imediata c-Fos em gânglios da raiz dorsal (GRD) de L4 em ratos controle (CONTROLE), hipotireóides (HIPO), neuropáticos (ICC) e neuropáticos e hipotireóides (HIPO+ICC). *, a imunoposição aumentou no grupo ICC, HIPO E HIPO+ICC comparados ao grupo controle. (*, $P < 0,05$ ANOVA, Bonferroni).

5.8. Imunofluorescência para PBM de nervo isquiático em ratos submetidos a indução do hipotireoidismo e injúria por constrição crônica ICC.

Na imunofluorescência para PBM, após 6 semanas de indução do hipotireoidismo (PTU) e 21 dias da indução da injúria por constrição (ICC), foi observado um aumento significativo ($*p < 0,001$) na imunoexpressão da proteína básica de mileina (PBM) nos grupos com ICC, HIPO e HIPO+ICC ($^{\#}p < 0,001$), quando comparados ao grupo Controle.

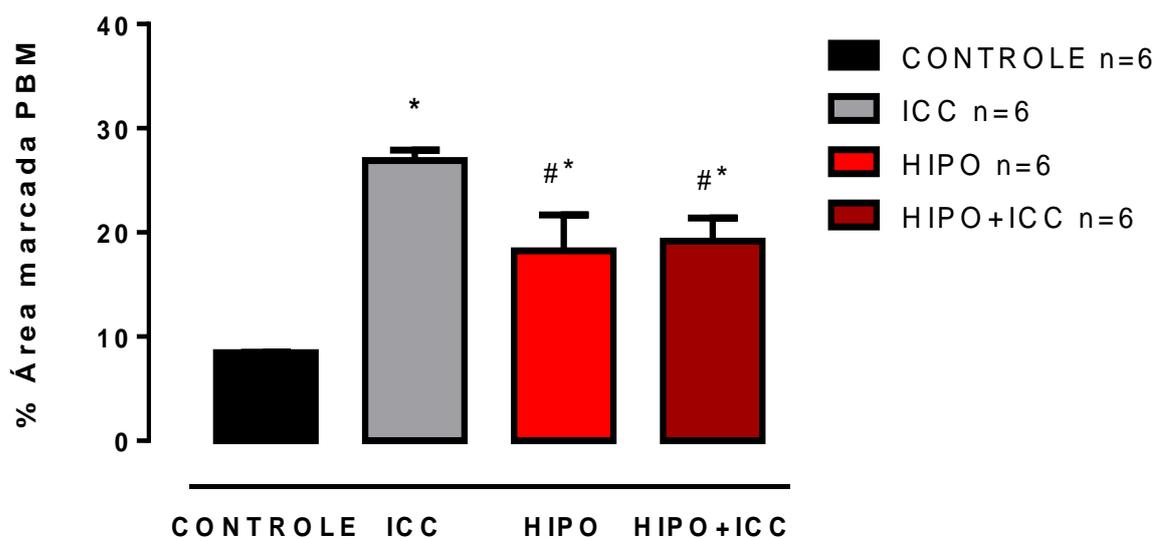
Na análise quantitativa da imunoexpressão da PBM, houve um aumento estatisticamente significativo no grupo ICC, HIPO e HIPO+ICC em relação ao grupo controle; uma diminuição da imunoexpressão dos grupos HIPO e HIPO+ ICC em comparação ao grupo ICC. (**Figura 22; Gráfico 8; Tabela 3**)

Figura 22. Fotomicrografia da imunexpressão de PBM no nervo isquiático de ratos controle, hipotireóides (HIPO), neuropáticos (ICC) e neuropáticos e hipotireóides (HIPO+ICC).



Proteína básica de mielina (Vermelho; PBM) marcando axônios de neurônio; Controle, grupo neuropático (ICC); grupo hipotireóide (HIPO) e grupo hipotireóide neuropático HIPO+ICC. As setas mostram, no detalhe do grupo HIPO + ICC, a desorganização dos feixes axonais em várias direções, observadas principalmente nesse grupo experimental. Magnificação 200X

Gráfico 8: Análise quantitativa para expressão de PBM no nervo isquiático em ratos submetidos a indução do hipotireoidismo e ICC.



O gráfico representa a quantificação (%) da área marcada pela imunoposição pela proteína básica de mielina de nervo isquiático, em controle, hipotireoideos (HIPO), neuropáticos (ICC) e neuropáticos e hipotireoideos (HIPO+ICC). *, a imunoposição aumentou no grupo ICC, HIPO e HIPO+ ICC comparado ao grupo controle. #, a imunoposição diminuiu nos grupos HIPO e HIPO+ICC comparados ao grupo ICC (*; #, $P < 0,05$ ANOVA, Bonferroni).

Tabela 3: Efeito da indução do hipotireoidismo e injúria por constrição crônica sobre a imunofluorescência do ATF-3, c-Fos e PBM.

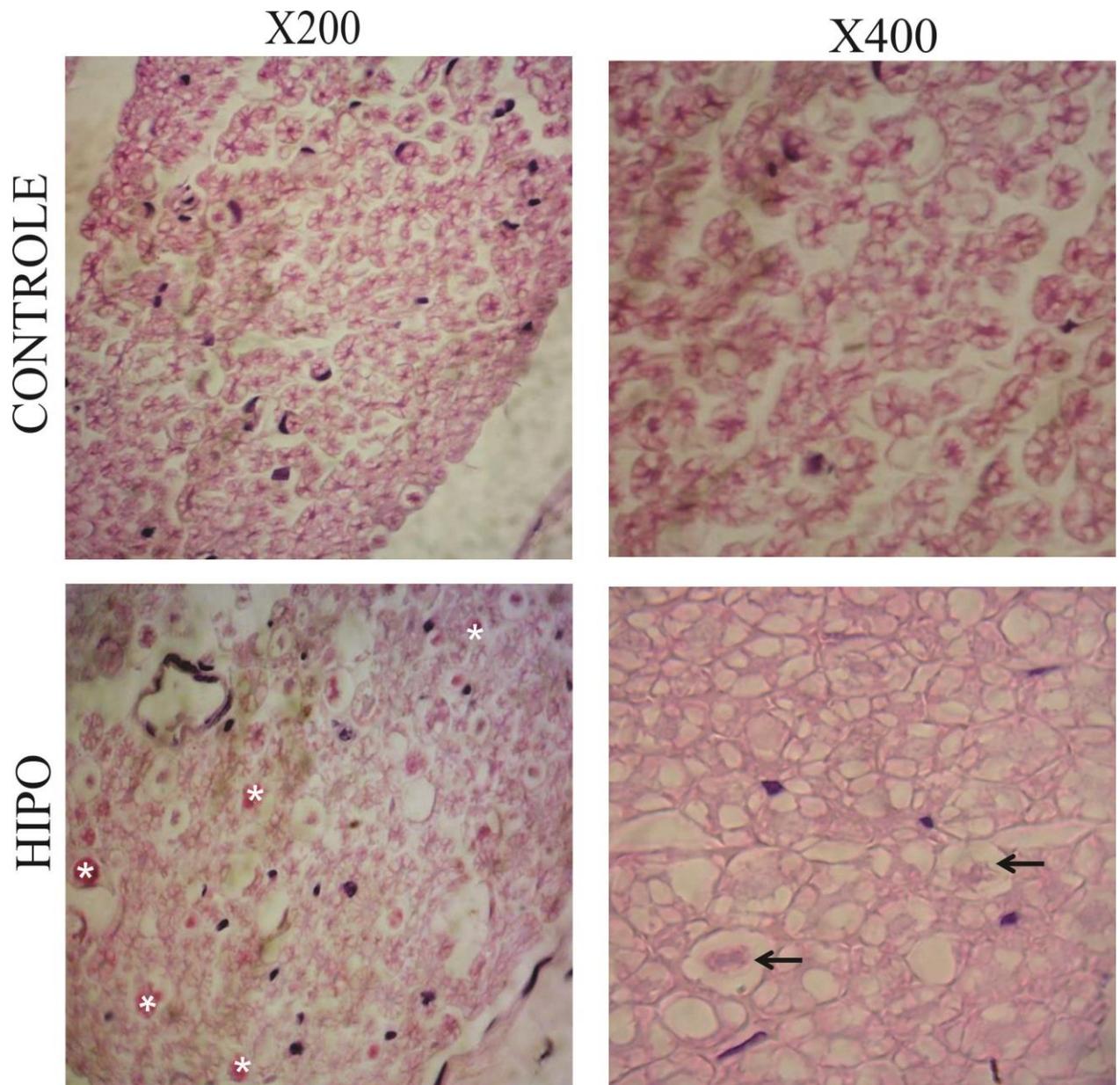
TECIDO	GRD	GRD	NERVO ISQUIÁTICO
GRUPOS	ATF-3	c-Fos	PBM
CONTROLE	-	-	-
ICC	++	+	++
HIPO	-	+	+
HIPO+ICC	+	+	+

Resumo dos resultados das imunofluorescência. Os símbolos representam o aumento da imunexpressão dos marcadores nos tecidos e grupos; onde - (não imunexpresso) e + (aumento da imunexpressão).

5.8.1. Estudo histológico do nervo isquiático

A histologia do nervo isquiático foi realizada 6 semanas após o consumo do PTU na água de beber, durante a eutanásia dos animais, a fim de se verificar as alterações no nervo isquiático do rato no hipotireoidismo. No grupo que fez uso do PTU (HIPO), houve uma presença de uma desmielinização vacuolar extensa e degeneração focal de feixes axônicos e com acentuação da eosinofilia sugerindo uma degeneração walleriana. Essas alterações foram observadas nos aumentos de 200X e 400X, no grupo HIPO quando comparado ao grupo controle.(Figura 24)

Figura 23. Fotomicrografia representativa dos nervos isquiáticos de ratos controle e hipotireóides (HIPO)



Histologia do nervo isquiático em hematoxilina eosina (HE), mostrando um corte transversal dos nervos isquiáticos; dos grupos controle (CONTROLE) e hipotireóideo (HIPO) , * eosinofilia; ↑ desmielinização vacuolar . Magnificação 200X e 400X.

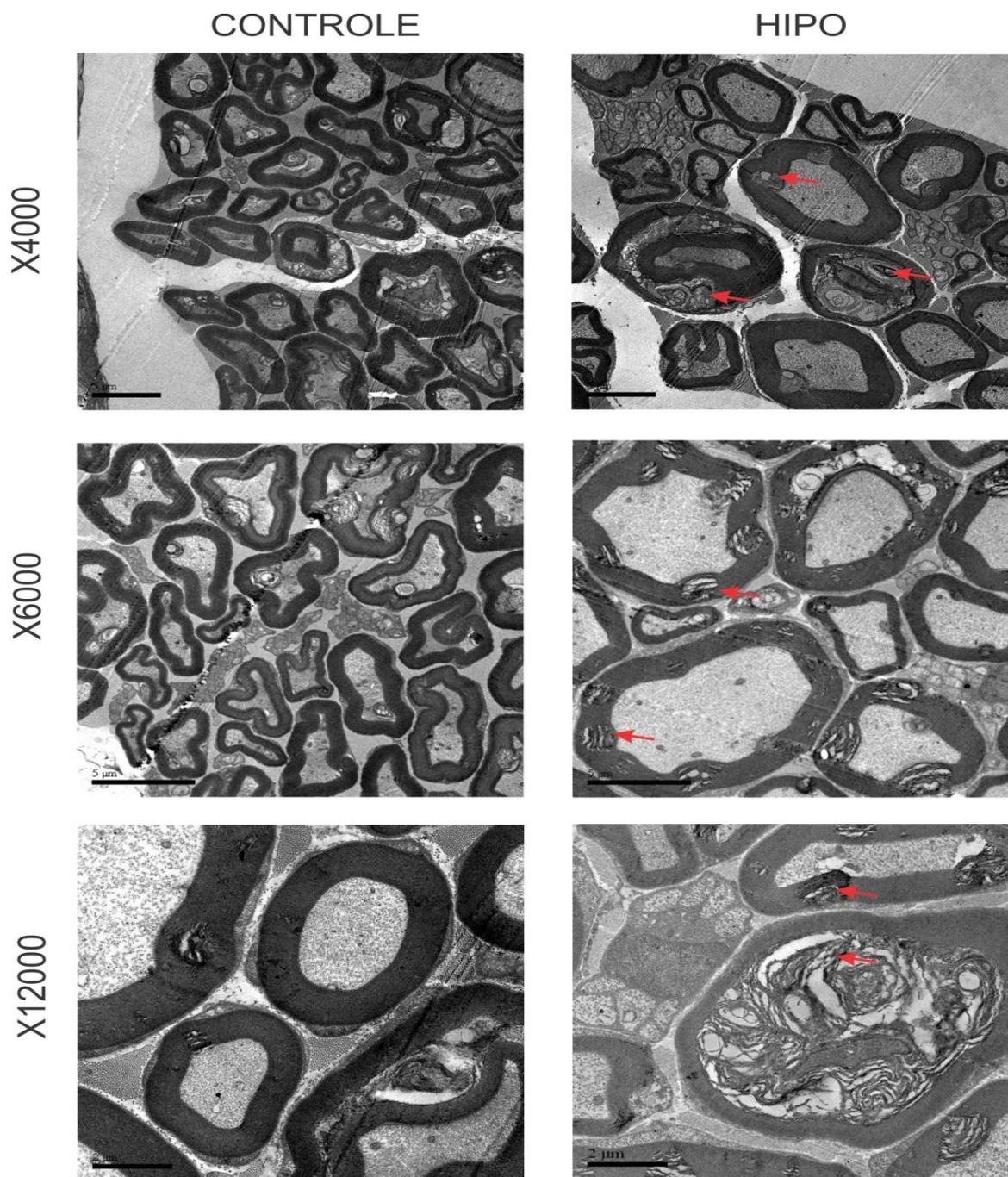
5.8.2. Microscopia eletrônica do nervo isquiático

A microscopia eletrônica do nervo isquiático foi realizada 6 semanas após o consumo do PTU na água de beber, durante a eutanásia dos animais, nos grupos controle (H₂O) e hipotireoideo (PTU; HIPO) a fim de se verificar as alterações morfológicas no nervo isquiático dos ratos com hipotireoidismo, as análises no microscópio eletrônico foram realizadas na Universidade de Brasília UnB.

A indução de hipotireoidismo através da administração de PTU (grupo HIPO), alterou o diâmetro das fibras, houve um aumento do diâmetro nas fibras de menor calibre (1-4.9µm) de $3.8 \pm 0.1 \mu\text{m}$ para $4.4 \pm 0.09 \mu\text{m}$ e de médio calibre (5-7.9µm) de $6.4 \pm 0.1 \mu\text{m}$ para $6.9 \pm 0.08 \mu\text{m}$ em comparação ao grupo controle, sendo estatisticamente significante teste t-Student; $p < 0,001$. Os dados foram escolhidos aleatoriamente da amostra total de ratos dos grupos estudados (**gráfico 9; Figura 24**).

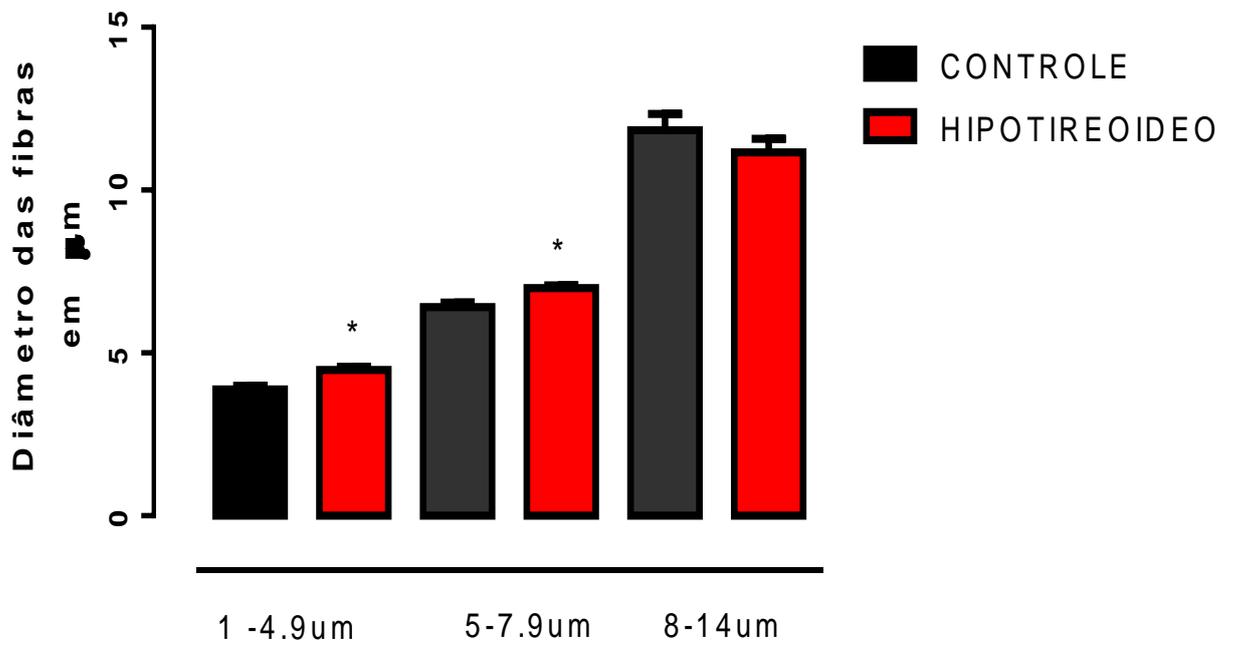
O **gráfico 10** apresenta resultados da medição a área média dos axônios das fibras mielinizadas. A indução de hipotireoidismo através da administração de PTU aumentou a área média do grupo hipotireoideo (HIPO) de $26.2 \pm 2,6 \mu\text{m}^2$ para $32.8 \pm 2.4 \mu\text{m}^2$, sendo estatisticamente significante teste t-Student; $p < 0,005$. Os dados foram escolhidos aleatoriamente da amostra total de ratos dos grupos estudados.

Figura 24. Fotomicrografia da microscopia eletrônica (ME) do nervo isquiático de ratos controle e hipotireoidismo (HIPO).



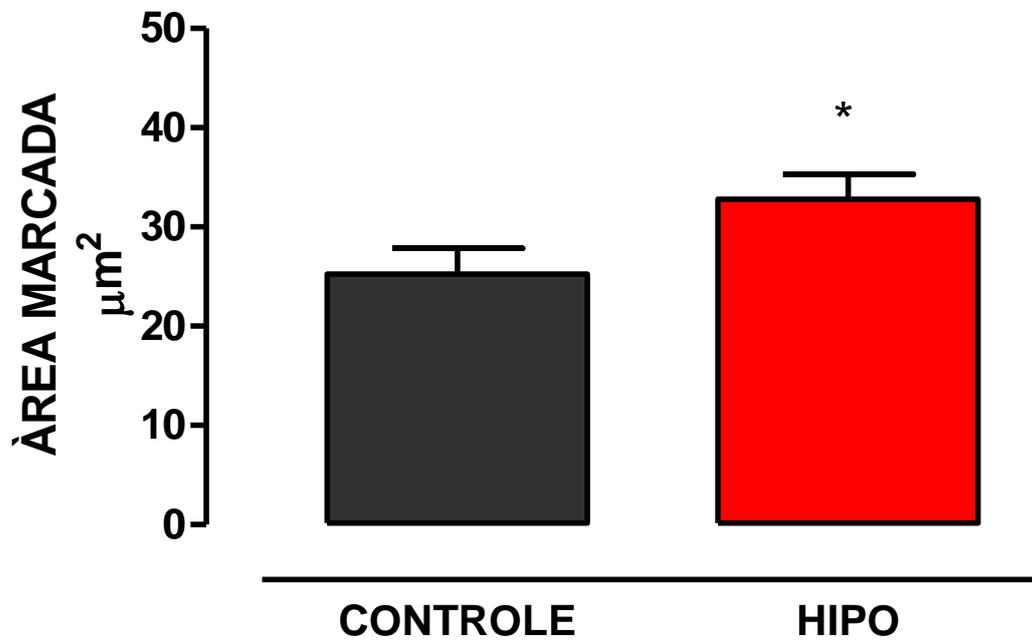
Microscopia eletrônica (ME) do nervo isquiático, mostrando um corte transversal dos nervos isquiáticos; nos grupos controle e com hipotireoidismo, com o aumento de 4000X, 6000X e 12000X. setas vermelhas indicam alterações na mielina

Gráfico 9: Análise dos diâmetros das fibras no nervo isquiático em ratos controle e hipotireoideos.



O gráfico mostra a distribuição das fibras do nervo isquiático do grupo controle e do grupo hipotireoideo em comparação com o controle (* $p < 0,001$, teste t-Student).

Gráfico 10: Análise quantitativa da área marcada no nervo isquiático em ratos controle e hipotireoideos.



O gráfico mostra a área média das fibras do nervo isquiático do grupo controle e do grupo hipotireoideo (* $p < 0,005$, teste t-Student).

6. DISCUSSÃO

Esse trabalho objetivou estudar de modo geral o efeito do hipotireoidismo no desenvolvimento da neuropatia periférica por constrição nervosa em ratos. Nossos resultados confirmaram o efeito do PTU em induzir hipotireoidismo através do estudo da glândula tireoide e da dosagem hormonal no sangue. A neuropatia foi avaliada através de testes comportamentais e também por análise morfológica do nervo. O hipotireoidismo alterou o comportamento nociceptivo, assim como também a morfologia do nervo. Adicionalmente, no gânglio da raiz dorsal, o hipotireoidismo alterou marcadores importantes da transmissão nociceptiva e de regeneração neural.

O hipotireoidismo é caracterizado pelo o estado clínico evoluído a partir das quantidades insuficientes de hormônios tireoidianos, sendo classificados como primário quando originária de distúrbios inerentes a própria tireoide, tendo maior prevalência em relação ao hipotireoidismo de natureza hipotalâmica ou hipofisária (SHEFF & GOLD, 2015). O propiltiuracil é um fármaco utilizado para tratamento de pacientes com hipertireoidismo e atua inibindo a tireoperoxidase, mecanismo realizado pelo grupo dos tiolureilenos, apresentado um efeito adicional de reduzir a desiodação do T₄ em T₃ nos tecidos periféricos, conferindo a ele a melhor indicação para tratamento hipertireoidismo grave (MAIA *et al.*, 2013). O PTU que foi utilizado como método de indução do hipotireoidismo experimental, realizada na presente investigação, mostrou-se eficaz, no 21º. dia de consumo do PTU na água de beber, confirmando o que já está descrito na literatura (QUATTRINI *et al.*,1993; LAI *et al.*,1997; MWANGI, 1998; LOPES, VALE, OGAWA, 2016).

Essa eficácia foi demonstrada pelas concentrações séricas de T₄ nos ratos controle e hipotireoideos, encontram-se diminuídas na terceira semana de uso do PTU, onde ocorreu a coleta sanguínea. As concentrações de T₄ foram medidas pelo método ELFA, os valores esses dentro dos limites previstos na literatura para eutireoidismo e hipotireoidismo (QUATTRINI *et al.*,1993; SIDENIUS *et al.*, 1997).

Os resultados comprovaram, que os ratos hipotireoideos apresentam níveis de cortisol reduzidos com relação ao controle, corroborando com estudos anteriores , que comprovaram que há diminuição dos pesos das adrenais e dos níveis de corticosterona (MCCARTHY *et al.*,1959; MURAKAMI, HAYAFUJI, TAKAHASHI,1984; TOHEI *et al.*, 1997). Em experimentos nos quais ratos com

hipotireoidismo e submetidos ao estresse de imobilização, níveis plasmáticos de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) encontravam-se aumentados, enquanto os níveis de corticoesterona estão reduzidos, indicando que os hormônios tireoidianos causam disfunção direta nas adrenais, é possível supor que a hipersecreção de ACTH nos ratos hipotireoideos é devida à hipersecreção do hormônio corticotrófico (CRH), pela redução da retroalimentação negativa do glicocorticóide do córtex adrenal (TOHEI *et al.*, 1997).

Segundo Tohei, 1997 a disfunção adrenal leva à hipersecreção de CRH no hipotálamo e resulta na estimulação da secreção de ACTH pela hipófise anterior, por conseguinte, tem-se a supressão da secreção de LH em ratas fêmeas com hipotireoidismo que pode ser mediada pelos efeitos inibitórios do aumento da secreção de CRH. O nosso estudo comprovou que há disfunção na liberação dos hormônios do córtex da adrenal pela diminuição do cortisol em ratos machos hipotireoideos. Namvar *et al.*, 2016 relatou que a restrição calórica em seus achados experimentais, não alterou a expressão de c-Fos no hipotálamo.

Em nossos estudos, ratos em que se utilizou o PTU, a tireoide apresentou alterações em suas dimensões, como também no seu peso nos grupos com hipotireoidismo e hipotireoidismo mais neuropatia. Os comprimentos verticais (altura) e horizontais (largura) dos lobos direito e esquerdo, comprovadamente aumentados com relação aos grupos controle e ICC, os quais não fizeram uso do PTU.

Em humanos, o hipotireoidismo primário está associado histologicamente a hipertrofia e hiperplasia da glândula das células tireotróficas, apresentam alterações no tamanho e nas células da tireoide (SCHEITHAUER *et al.*, 1985) nos modelos animais esta glândula encontra-se aumentada (LOPES, VALE, OGAWA, 2016), os resultados obtidos comprovam esse achado. Observamos as dimensões e histologicamente as células foliculares da glândula, onde pode-se perceber a presença de hiperplasia nas células foliculares e redução do colóide, onde há perda da estrutura folicular.

O aumento da glândula tireoide deve-se aos níveis de concentração de TSH, que no hipotireoidismo primário estão aumentados, pelo fato da glândula tireoidiana hipofuncionante não produzir T₃ e T₄. A retroalimentação negativa diminuída sobre a produção de TSH, aumenta os níveis desse hormônio, o qual produz alterações nas células foliculares como descrito na literatura (QUATTRINI *et al.*, 1993; SIDENIUS *et*

al., 1997). Esta hipótese é confirmada pelos resultados obtidos por Sousa 2006, onde animais submetidos as mesmas condições experimentais apresentaram níveis de concentração de TSH elevados.

Nos modelos animais de hipotireoidismo não houve ganho ponderal no decorrer da indução, observa-se uma perda de massa corporal uma vez que, no estado hipotireoideo há aumento no catabolismo proteico com consequente perda de massa muscular, redução nos fatores de crescimento e de vitaminas e diminuição na absorção no trato gastrointestinal de carboidratos (FERREIRA *et.al.*, 2007), corroborando assim com nossos achados.

Autores observaram uma relação inversa, ou seja, uma correlação negativa entre níveis séricos de hormônios tireoidianos e da leptina secretada por células adiposas, hormônio indutor da sensação de saciedade. No hipotireoidismo, portanto postula-se um nível sérico aumentado de leptina, diminuindo a ingestão alimentar e hídrica em conjunto com o catabolismo proteico aumentado há uma perda de massa corporal, os resultados foram confirmados conforme descritos nos resultados. Supõe-se como provável mecanismo, a redução do nível sérico de glicocorticóides e de hormônios tireoidianos nos animais tratados com PTU, o que pode estimular a produção de leptina pelas células adiposas e resultar na supressão da regulação na saciedade alimentar a nível hipotalâmico (TOHEI *et al.*, 1997; HASEBE *et al.*, 2008; EBLING, 2014)

A perda de peso significativa observada nos animais dos grupos (HIPO e HIPO+ ICC) pode estar associada à alteração de apetite, somado aos efeitos de alterações hormonais induzidas pelo desequilíbrio do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e suas repercussões por sobre os demais eixos hormonais. Há evidências de que ratos induzidos ao hipotireoidismo por PTU mostram disfunção da glândula adrenal na porção cortical com baixa produção de corticosterona e adrenais atrofiadas (TOHEI *et al.*, 1997; HASEBE *et al.*, 2008), devido a estes achados foi observado que o cortisol encontra-se com seus valores séricos diminuídos.

Estudos realizados em animais como hipotireoidismo sugerem alterações no processo sensitivo, notadamente a nocicepção, tanto em vida intra-uterina quanto na fase adulta e, o efeito antinociceptivo interpretado como sendo resultado de três principais possíveis fatores: envolvimento dos mecanismos de estruturação das sinapses, alteração do metabolismo de compostos específicos no cérebro e a liberação de

substâncias e/ou neurotransmissores capazes de modificar os potenciais de membranas das células (FERREIRA *et.al.*, 2007; FALEIROS *et.al.*, 2009; ALVES *et.al.*, 2013). Estudos realizados anteriormente no Laboratório de Eletrofisiologia da Universidade Estadual do Ceará, comprovaram redução da velocidade de condução nervosa e diminuição da excitabilidade neural em nervo isquiático em fibras nervosas de grande, médio e pequenos calibres (SOUSA, 2006).

Para avaliação da nocicepção no hipotireoidismo e na dor neuropática foi utilizado o teste de pressão plantar. A dor não pode ser monitorada diretamente em animais, mas só pode ser estimada através da análise das respostas aos estímulos nociceptivos. No entanto, tais respostas não significam necessariamente que há uma sensação concomitante. Os tipos de estímulos nociceptivos (elétrico, térmico, mecânico ou químico) têm sido utilizados em vários modelos de dor foram revisados com a conclusão que nenhum é ideal (LE BARS *et.al.*, 2001). As reações monitorizadas são quase sempre respostas motoras que vão desde reflexos espinhais e comportamentos complexos. A maioria tem a limitação que podem ser associados, ou são modulados por outras funções fisiológicas.

Para a avaliação da alodinia plantar mecânica foi utilizada um analgesímetro plantar da Insight, Von Frey eletrônico. Os locais preferidos para a aplicação dos estímulos nociceptivos mecânicos são as patas e a cauda. Os ensaios utilizam pressão constante, uma pressão progressiva maior é aplicada em um a área pontual na pata. O parâmetro medido é o limiar (peso em gramas) para o aparecimento de um comportamento (reflexo de retirada da pata) (LE BARS *et.al.*, 2001).

Efeitos antinoceptivos no hipotireoidismo foram observados no grupo HIPO com o aumento do limiar de retirada de pata. No grupo ICC com neuropatia periférica causada por injúria mecânica o limiar de retirada é bem menor, esse efeito torna-se mais prejudicial quando comparamos ao grupo HIPO+ICC em que mesmo após uma injúria mecânica o limiar diminui, mas não tanto quanto o grupo ICC, ou seja, sua resposta torna-se mais lenta ao estímulo doloroso ou hipoalgesica. A velocidade de condução nervosa *in vitro*, medida eletrofisiologicamente comprova este dado, pois apresenta-se diminuída tanto em grupo hipotireoideo quanto no hipotireoideo com neuropatia (SOUSA, 2006).

Ulrich –Lai et. al, 2006 em seus estudos observou a relação entre a injúria constrição crônica e o eixo hipotálamo-hipofise-adrenal e seus achados comprovaram que houve diminuição do limiar de retirada da pata, corroborando com os nossos dados. No entanto não houve alteração dos níveis de ACTH, corticosterona nem houve hipertrofia da adrenal observada quando há a liberação crônica de ACTH, induzida pelo estresse, nem aumenta a expressão de CRH no hipotálamo, como ocorre no estresse crônico.

Estudos realizados sobre o efeito do PTU em ratos, comprovaram o efeito antinociceptivos quando medidas as sensibilidade térmica, com o teste da placa quente. A perda sensorial nociceptiva pode ser explicada, uma vez que a excitabilidade das vias sensoriais é uma das funções prejudicadas em decorrência de baixos teores de hormônio tireoidiano no organismo, sobretudo no tecido nervoso, os quais podem culminar em um estado de hipoalgesia. A perda de sensibilidade pode ocorrer através da hiperpolarização dos neurônios, ocasionada possivelmente pela ativação de canais de potássio-ATP dependente pós-sináptica. Em consequência disso, um decréscimo na liberação de substância P e de aminoácidos excitatórios, como o neurotransmissor excitatório glutamato, na medula espinhal são os possíveis mecanismos que poderiam explicar a hipoalgesia observada nos animais tratados com PTU (LOPES, VALE, OGAWA, 2016)

Para um estudo da expressão de dor foi utilizado um marcador de ativação neural, o Fos que é o produto protéico do gene imediato c-Fos, encontrado em núcleos neuronais. A expressão de c-Fos foi usada, em estudos para examinar a circuitos neurais subjacentes à nocicepção produzindo uma imagem que é geralmente consistente com as vias nociceptivas mapeadas por métodos de traçado eletrofisiológicos (LUDWIG *et. al*, 2004). Após a aplicação de estímulos dolorosos, c-Fos se expressa em várias estruturas do SNP, como o gânglio da raiz dorsal, e do SNC envolvidas no processo nociceptivo, incluindo medula espinhal, substância periquedutal mesencefálica, os núcleos parabraquiais e o tálamo (AHMAND, 2002; TEIXEIRA, 2009).

O mecanismo de lesão no sistema nervoso periférico se dá pelo acontecimento de alguns eventos que levam ao processo de regeneração, causando modificações estruturais e funcionais que vão alterar a condução nervosa induzindo a sensibilização

central e periférica (SCHWARTZMAN *et al.* 2001; NICHOLSON, 2004). Desse modo, Fos é um marcador útil para rastrear os efeitos de estímulos farmacológicos, elétricos e fisiológicos no sistema nervoso e tem sido utilizado para indicar dor e neuroplasticidade (AZEVEDO *et al.*, 2013).

No nosso estudo a imunexpressão de c-Fos foi aumentada no gânglio da raiz dorsal tanto no grupo eutireoideo com ICC (o que era esperado), quanto nos grupos hipotireoideos. Após seis semanas de indução do hipotireoidismo e três semanas da neuropatia periférica houve aumento significativo da imunexpressão de c-Fos no GRD, nos grupos ICC, HIPO e HIPO+ICC. A avaliação da expressão de c-Fos, na literatura relaciona o aumento desse marcador com a atividade neuronal e a intensidade da dor (TEIXEIRA, 2009). Nossos resultados mostram que ratos hipotireoideos com neuropatia, apesar de demonstrarem um aumento do limiar nociceptivo, sugerindo analgesia, paradoxalmente apresentaram também uma expressão aumentada de c-Fos no GRD. Essa expressão aumentada não era esperada nesse grupo devido ao seu comportamento nociceptivo no teste de Von Frey. Olhando a literatura que aborda o efeito de hormônios tireoidianos sobre a produção de c-Fos neuronal, encontramos trabalhos mostrando que o hormônio T₃ é um importante regulador da expressão desse fator.

Estudos *in vitro* e em *in vivo* evidenciam que a expressão de c-Fos é regulada pelos hormônios tireoidianos, onde o receptor nuclear tireoidiano reprime a ativação do fator de transcrição funcional ou proteína-ativadora -1 (AP-1) (SCHMIDT, CRAMER and OFFRINGA, 1993), portanto suprimindo a expressão de c-Fos. O hormônio tireoidiano atua como silenciadores transcripcionais de proteínas que se acoplam ao local de ligação da AP-1. Na ausência do T₃ circulante há uma maior expressão de c-Fos (YUAN & YANG, 2005), corroborando assim com os dados eletrofisiológicos anteriores em que as velocidades de condução nervosa estão alteradas, como também pela microscopia eletrônica, sugestivos de uma degeneração neural.

O fator de transcrição de ativação 3 (ATF-3), membro da família ATF-3/CREB (fatores de transcrição de ativação/proteína de ligação a elemento responsivo ao cAMP) de fatores de transcrição, que regula a transcrição por ligação a locais do DNA formando um homodímero ou heterodímero com proteínas Jun. O ATF-3 não é expresso no tecido intacto, mas sim no tecido exposto ao sinal de estresse. Além

disso, o ATF-3 não é expresso de forma constitutiva em gânglios da raiz dorsal e medula espinhal, sendo induzido de forma considerável em neurônios submetidos à axotomia. Desse modo, o ATF-3 pode desempenhar papéis importantes na resposta ao estresse em geral, sendo induzido em neurônios sensoriais e motores da medula espinhal após a lesão do nervo e considerado um marcador de injúria neuronal (TSUJINO *et al.*, 2000).

O gene ATF-3 é induzido por uma variedade de tipos de células por muitos sinais de estresse, sugerindo que o ATF-3 é chave nas respostas de estresse celular, apesar da expressão não possuir local de estímulo e nem tecido específico, mas esses sinais induzem ao dano celular, como também estimulam a proliferação celular (HAI e HARTMAN, 2001; NAKAGOMI *et al.*, 2003).

No nosso estudo, foi observada uma diminuição da imunoexpressão de ATF-3, no GRD no grupo com hipotireoidismo quanto no hipotireoidismo com neuropatia em relação ao controle, apesar do grupo HIPO+ICC ter os seus neurônios lesionados pela constrição crônica não houve aumento significativo da expressão de ATF-3, indicando uma resposta reduzida para a regeneração neural.

No grupo HIPO esta expressão está muito reduzida em relação ao grupo ICC como também ao grupo HIPO+ICC, sugerindo que o efeito na expressão de ATF-3 seja dependente da presença de hormônio tireoidiano, pois a porcentagem da imunoexpressão foi maior no grupo ICC que a do grupo HIPO+ICC. Segundo Schmidt *et al.*, 1993 o receptor nuclear tireoidiano reprime a ativação do fator de transcrição funcional ou proteína-ativadora -1 (AP-1), atuando como silenciador transcripcional de proteínas que se acoplam ao sítio de ligação da AP-1 como o ATF-3, podemos sugerir que hormônio tireoidiano causa alteração na expressão do ATF-3.

Em neurônios do sistema nervoso central e periférico o ATF-3 foi designado como marcador de injúria neuronal onde sua expressão seria uma resposta específica a lesão do nervo, embora as consequências funcionais não tenham sido esclarecidas (TSUJINO *et al.*, 2000; TAKEDA *et al.*, 2000). Em seus estudos Nakagomi *et al.* 2003 demonstrou que o ATF-3 liga-se à família AP-1, e a sua transcrição pode executar funções opostas de repressão ou ativação de genes, diferenciando-se de acordo com sua via de ativação, sob ativação da c-Jun quinase N-terminal (JNK) mostrou que medeia atividades de regeneração em neurônios do gânglio cervical superior (GCS). Sinais

inflamatórios , alterações nos níveis de radiação, inibidores de sínteses de proteínas e uma variedade de estímulos de estresse podem ativar a JNK (IP & DAVIS , 1998).

Como citado anteriormente o ATF-3 liga-se a família AP-1, e pode exercer atividade de repressão ou ativação genética dependendo da via de ativação. Nakagomi *et al* 2003 observou que a expressão de ATF-3, sob ativação de JNK, medeia atividades de regeneração em neurônios do GCS (Nakagomi *et al* 2003). A JNK1 está envolvida em ativação apoptose celular, neurodegeneração, a diferenciação e proliferação celular, condições inflamatórias e produção de citocinas mediada por AP-1 (proteína de ativação 1), tais como RANTES (regulada por ativação, expressa e secretada de células T normais , IL-8 (interleucina-8) e GM-CSF (fator de ativação de colônias de macrófagos e granulócitos) (OLTMANN *et al.*, 2003).

Um estudo de microarranjo de DNA realizado por Nakagomi *et al* 2003 mostrou que uma chaperona Hsp27, inibidora de apoptose em células neuronais, é alvo transcripcional de ATF-3 /c- Jun. Estudos anteriores também demonstraram a co-expressão de Hsp27 e c-Jun ou co-expressão de Hsp27 e ATF3 no gânglio da raiz dorsal (GRD) e neurônios motores após a lesão em neurônios do GCS (LEWIS *et al.*, 1999 ; BENN *et al.*, 2002).

Fatores de transcrição controlam as alterações gênicas em nervos axotomizados, o ATF-3 é induzido na regeneração axonal porque pode formar heterodímeros com c-Jun e sua regulação em neurônios axotomizados imita o c-Jun. Na degeneração Walleriana é “*upregulated*” pelas células de Schwann em degeneração dos nervos periféricos e “*downregulated*” após regeneração axonal (HUNT *et al*, 2004).

Di Cesare Mannelli *et al.* (2015), mostrou que há um aumento da expressão de ATF-3, por imunohistoquímica, no nervo isquiático e gânglios da raiz dorsal em um modelo de neuropatia em ratos, corroborando com os resultados encontrados em nossa pesquisa, onde foi demonstrado há um aumento da imunoexpressão de ATF-3 nos gânglios da raiz dorsal do grupo com neuropatia por injúria por constrição crônica (grupo ICC).

No presente estudo, o aumento da expressão de ATF-3 nos GRD de ratos neuropáticos e a sua diminuição na presença de hipotireoidismo sugere que, muito provavelmente a regeneração neural está diminuída nos animais hipotireoideos. A

alteração do processo normal de tentativa de regeneração nervosa perante injúria, provavelmente poderá estar envolvida com as alterações de condução nervosa observadas anteriormente nos trabalhos prévios a este. Nosso estudo é pioneiro em demonstrar essa relação entre o hipotireoidismo, neuropatia periférica e expressão de ATF3 em GRD.

Outro marcador importante de lesão e regeneração nervosa é a PBM que é produzida por neurônios do SNC e SNP. De acordo com os nossos resultados, pode-se verificar através da imunofluorescência em nervo isquiático que houve um aumento significativo na expressão de PBM após seis semanas de indução do hipotireoidismo como também após três semanas de ICC no terço distal à ligadura dos nervos dos grupos hipotireoideos em comparação ao grupo controle.

Em trabalhos anteriores, outros autores realizaram o estudo temporal (3, 7 e 14 dias) da expressão da proteína básica de mielina (PBM) em nervo isquiático de ratos após a sua constrição. Utilizando métodos de imunohistoquímica e eletroforese, pode-se observar que o pico de expressão máxima de PBM ocorre com 14 dia, no segmento proximal, motivo pelo qual, escolhemos este segmento para coleta do nervo e o 21º dia após a lesão, já que a intensificação do sinal da PBM não é totalmente conhecido no 14º dia, embora presume-se que deva ser devido a uma degradação parcial da proteína permitindo assim uma alta adesão dos anticorpos (anti- PBM). Os segmentos distais do nervo isquiático foram coletados para estudos histológicos, pois nestes a degradação ocorre de maneira mais intensa (SETTON-AVRUJ, 2002; CAMARA *et al*, 2015).

Na lesão do nervo periférico as células de Schwann, com a perda axonal, tornam-se indiferenciadas, diminuem a síntese de proteínas mielínicas em dois dias, proliferam, sequestram pequenos pacotes de debris de mielina transformando-as em formações “ovoides” (CAMARA 2009) formam uma linha de células chamada de “*Bands Bungner*” que apoiam e guiam as fibras de regeneração. Há o influxo de macrófagos periféricos para ao endoneuro, a partir do sexto dia, quando começa a remoção da mielina (fagocitose) pelo macrófagos (CAMARA *et al*, 2015). Verifica-se que provavelmente não ocorra síntese de mielina significativa até o 14º dia da degeneração Walleriana.

Segundo Gupta, (1993) a síntese de mielina na degeneração Walleriana, só ocorrerá após 40º dia, pois requer sinais dos axônios em crescimento.

No nosso estudo verificamos que há aumento significativo na imunexpressão da PBM em todos grupos experimentais quando comparamos ao controle. No grupo com ICC houve aumento da expressão de PBM e as fibras nervosas mantiveram-se organizadas. No grupo com hipotireoidismo a expressão da PBM foi maior com relação ao controle e menor ao grupo ICC, as fibras nervosas apresentam-se desorganizadas, sugerido que a ausência de hormônio tireoidiano pode influenciar no processo de regeneração neural e na formação das “*Bands of Bugner*”, que direciona a regeneração. No grupo com hipotireoidismo e neuropatia os achados foram semelhantes aos do hipotireoidismo, no entanto intensificados, apresentando rupturas nas fibras nervosas.

O hipotireoidismo durante o primeiro trimestre de vida pós-natal em humanos resulta em cretinismo, síndrome caracterizada por retardo mental severo e, em modelo animais, promove anormalidades morfológicas irreversíveis no cérebro, como a diminuição do número de astrócitos cerebelares em ratos Wistar neonatos (ZUCCO, 2009). Em pacientes hipotireoideos constatou-se que apresentavam dores nas extremidades, parestesias, ataxia e uma diminuição do reflexos profundos, a polineuropatia sensório-motora foi confirmada por achados, em biópsia do nervo sural, de alterações degenerativas em axônios pela presença de aglomerados de pequenas fibras mielinizadas em desmielinização apresentando uma forma de “ovóides” e regeneração neuroaxonal incompleta (DYCK & LAMBERT, 1970; KRISTIN *et al*, 2006; ØRSTAVIK, NORHEIM E JØRUM, 2006).

Nossos resultados apresentaram, na região distal do nervo isquiático, alterações histológicas e morfológicas no nervo e na disposição da mielina em torno dos axônios. Houve presença de eosinofilia, de desmielinização vacuolar extensa e degeneração focal de feixes axônicos. As fibras nervosas foram contadas e posteriormente medidas a sua área e diâmetro, onde encontramos a área aumentada nos hipotireoideos e o diâmetro aumentados nas fibras de calibre de pequeno e médio calibre. Nossos estudos através dos achados histológicos e morfológicos de microscopia eletrônica comprovaram os achados da clínica, sendo sugestivos a uma degeneração Walleriana.

A degeneração Walleriana ocorre em nervos periféricos e ocorre em etapas: 1) degeneração axonal, diminuição a síntese de proteínas mielínicas; 2) transformação da mielina em formações “ovóides”, fagocitose da mielina; 3) mitose e proliferação no coto distal do nervo; 4) a formação das “*Bands Bungner*” próximo ao local da lesão; 5)

formação de uma nova bainha de mielina em torno do axônio regenerado (FU E GORDON, 1997). Estas alterações na bainha de mielina corroboram com os nossos achados morfométricos e reforçam os estudos eletrofisiológicos, realizados anteriormente, pois alteram a velocidade de condução e a excitabilidade neural em ratos com hipotireoidismo experimental, sugestivos de uma provável degeneração Walleriana no hipotireoidismo.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O hipotireoidismo é deficiência na produção de T_3 e T_4 e seus níveis estão diretamente relacionados ao desenvolvimento do sistema nervoso central e com a maturação específicas de neurônios e na clínica o quadro clínico que se observa pela falta desses hormônios circulantes é o cretinismo em recém nascidos (MWANGI, 1998 GARZA *et al.*, 1990). Em adultos é observado um aumento da glândula tireoide, letargia e em alguns casos dores nas extremidades, parestesias, disfunção neuromuscular, presumindo que o hipotireoidismo pode está associado a uma polineuropatia sensório-motora e outras neuropatias periféricas apresentando prevalências variando entre 42 e 72% dos casos (DUYFF *et al.*, 2000).

Como observado nos resultados de teste do Von Frey há um aumento do limiar nociceptivo nos animais com hipotireoidismo, o que podemos sugerir uma alteração no comportamento nociceptivo, indicativo de uma degeneração Walleriana. Como foi mencionado foram feitos estudos “*in vitro*” e “*in vivo*”. Nos achados anteriores, onde houve a avaliação de dados eletrofisiológicos, constatou-se alterações nas velocidades de condução e na excitabilidade neural no nervo isquiático, que possui fibras de diferentes diâmetros e velocidades.

No hipotireoidismo essas velocidades estavam diminuídas em fibras de maior calibre e a reobase e cronaxia (parâmetros de excitabilidade neural) estavam aumentadas, corroborando com os dados “*in vivo*” onde se observou um aumento do limiar de retirada da pata, tanto no grupo hipotireoideo quanto no grupo hipotireoideo e neuropático. Supõe-se que seja devido as alterações na população de canais de Na^+ voltagem dependentes, responsáveis geração do potencial de membrana, contudo averiguações mais detalhadas devem ser realizadas para canais iônicos específicos na membrana.

A c-Fos marcador usado para examinar a circuitos neurais subjacentes à nocicepção produziram uma imagem consistente com as vias nociceptivas mapeadas por métodos de traçado eletrofisiológicos (LUDWIG *et. al*, 2004). Está aumentada nestes grupos podendo sugerir que a dor é processada pelo sistema nervoso periférico mas não

manifestada. No grupo hipotireoideo e neuropatico este efeito antinociceptivo manifesta-se com maior dano, pois apesar de estar com uma mononeuropatia mecânica, o limiar de retirada da pata está maior do que o grupo neuropático que apresentavam diminuição da resposta nociceptiva e maior sensibilidade a dor. A c-Fos está expressa com maior intensidade que o controle. A dor é um mecanismo essencial à sobrevivência por possibilitar a adaptação a condições adversas. As patologias com dor crônica têm diferentes etiologias devido à complexidade do sistema nociceptivo.

O hipotireoidismo diminui o ATF-3, marcador de regeneração neural, no GRD indicando uma alteração na regeneração nervosa mediante uma resposta á constrição. Concomitantemente no nervo isquiático, há uma aumento da PBM sugerindo que houve ativação das células de Schwann semelhante de uma degeneração Walleriana. Além disso o hipotireoidismo provoca alteração na formação na bainha de mielina o que pode gerar uma alteração na população de canais iônicos e na capacitância da membrana dos neurônios, confirmando os dados anteriores onde há diminuição da velocidade de condução e da excitabilidade neural.

Contribuir para ao entendimento da importância dos hormônios tireoidianos no funcionamento do sistema nervoso periférico e central na manutenção da integridade e homeostase, como também se faz necessário, nos mecanismos complexos de dor.

8. CONCLUSÕES

- O hipotireoidismo alterou o comportamento nociceptivo dos ratos submetidos a neuropatia por constrição crônica do nervo isquiático, assim como os parâmetros de neurodegeneração;
- O modelo de hipotireoidismo induzido por PTU e neuropatia por constrição crônica do nervo isquiático foi reproduzido de forma eficaz demonstrando: diminuição do ganho ponderal, diminuição dos níveis séricos de T4 livre, diminuição dos níveis séricos de cortisol, aumentou do peso e das dimensões da glândula tireoide, bem como alterações no formato das células foliculares e dos folículos tireoidianos;
- O hipotireoidismo aumentou o limiar nociceptivo de animais neuropáticos no teste de hiperalgesia mecânica plantar;
- O hipotireoidismo diminuiu a expressão de ATF-3 e aumentou a expressão de c-Fos no GRD de animais neuropáticos, indicando alterações nos mecanismos de regeneração nervosa e atividade neuronal;
- O hipotireoidismo induziu o aumento da expressão de PBM no nervo isquiático de animais neuropáticos, indicando uma possível alteração do processo de regeneração do nervo.
- O hipotireoidismo alterou o diâmetro das fibras de pequeno e médio calibre e causou degeneração axonal e desorganização da deposição de mielina nos axônios do nervo isquiático.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES J. S. M, LEAL-CARDOSO J. H., SANTOS-JÚNIOR. F.F.U., CARLOS P.S., SILVA R.C., LUCCI C.M., BÁO S.N., CECCATTO V.M., BARBOSA. R., LIMB Immobilization alters functional Electrophysiological parameters of sciatic nerve. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 46: 715-721, 2013

ALVES, I.G.N. Experimental hypothyroidism during pregnancy affects nociception and locomotor performance of offspring in rats. **European Journal of Pain**, 17: 1291-1298, 2013.

AHMAD A. H, AZIZ C. B. A. The Brain in Pain. **Malays J Med Sci**. Special Issue: 46-5, 2014.

ALMAD, A., SAHINKAYA, F.R., MCTIGUE, D.M. Oligodendrocyte fate after spinal cord injury. **NeuroTherapeutics** v.8, p. 262–273, 2011. and repair. **Bioessays** v.14, p. 401-406, 1992.

ARJONA F.J.; VRIEZE E.; VISSER T.J.; FLIK G.; KLAREN H.M.P. Identification and Functional Characterization of Zebrafish Solute Carrier Slc16a2 (Mct8) as a Thyroid Hormone Membrane Transporter. **Endocrinology**, v.152, n.12, p. 5065-5073, 2011.

ARTHUR-FARRAJ, P.J., LATOUCHE, M., WILTON, D.K., QUINTES, S., CHABROL, E., BANERJEE, A. C-Jun reprograms Schwann cells of injured nerves to generate a repair cell essential for regeneration. **Neuron** v. 75, p. 633–647, 2012.

BARON R., Neuropathic pain the long path from mechanisms to mechanisms-basic treatment. **Int J Pain Med Palliat Care** 1 (1); 2-14, 2001.

BENNETT, G. J. Neuropathic pain. In: WALL, P. D.; MELZACK, R. (Ed.). **Textbook of pain**. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone, p. 494-510, 1994.

BHUMIKA S.; DARRAS M.V.; Role of thyroid hormones in different aspects of nervous system regeneration in vertebrates **General and Comparative Endocrinology**. 2016.

BIANCO, A.C., KIM, B.W. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. **J. Clin. Investig.** V. 116, p.2571–2579, 2006.

BJØRO T, HOLMEN J, KRUGER Ø. Prevalence of thyroid disease, thyroid dysfunction and thyroid peroxidase antibodies in a large, unselected population. The Health Study of Nord-Trøndelag (HUNT). **Eur J Endocrinol** v.143, p.639–647. 2000

BOUZAFFOUR, M., RAMPON, C., RAMAUGE, M., COURTIN, F., VRIZ, S. Implication of type 3 deiodinase induction in zebrafish fin regeneration. **Gen. Comp. Endocrinol.** v.168, p.88–94, 2010.

BYERS M.R.; BONICA J.J. Peripheral pain mechanisms and nociceptor plasticity. In: Loeser, J.D.; Butler, S.H.; Chapman, R.; Turk, D.C. (eds). *Bonica's management of pain*, Lippincott Williams & Wilkins, p. 26-72, 2001.

- CALIXTO, J.B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J.; SANTOS, A.S.; FILHO, C.V.; YUNES R.A. Naturally Occurring Antinoceptive substances from plants. **Phytotherapy Research** v.14, p. 401-118, 2000.
- CAMPBELL, J. N. Nerve lesions and the generation of pain. **Muscle Nerve**, v. 24, p. 1261-1273, 2001.
- CARROLL,S.L.,MILLER,M.L.,FROHNERT,P.W.,KIM,S.S.&CORBETT,J.A.Expression of Neuregulin and their putative receptors, ErbB2 and ErbB3, is induced during Wallerian degeneration. **J.Neurosci.** v. 17, p.1642–1659 1997
- CASTRO-COSTA C.M. Dor neuropática : Novos conceitos, expressão clínica e desafios terapêuticos.Prática Hospitalar Ano XI, n. .60, 2009.
- CHAN, S.; KILBY, M.D. Thyroid hormone and central nervous system development. **Journal Endocrinology.** v.165, p.1- 8, 2000.
- CHAPA, F.; KUNNECHE, B.; CALVO, R.; ESCOBAR, D. R.; MORREALE, E.G.; CERDAN, S. Adult onset hypothyroidism and the cerebral metabolism of (1,2-¹³C₂) acetate as detected by C nuclear magnetic resonance. **Endocrinology.** v.136, p.296-305, 1995.
- CHENG, S.Y., LEONARD, J.L., DAVIS, P.J. Molecular aspects of thyroid hormone actions. **Endocrinology. Rev.** v. 31, p.139–170, 2010.
- CLOS, J.; LEGRAND, J. Influences de la déficience et de la sous-alimentation sur la croissance et la myélinisation des fibres nerveuses du nerf sciatique chez le jeune rat blanc. Etude en microscopie électronique. **Brain.** v.22, p. 285-297,1970.
- CODERRE, T.J.; KATZ, J.; VACCARINO, A.L.; MELZACK, R. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. **Pain**, v. 52, p. 259-285, 1993.
- COSTIGAN M., SCHOLZ J., SAMAD, T.; WOOLF, C.J. Pain. In: SIEGEL G.J.; ALBERS R.W.; BRADY S.T.; PRICE, D.L. (eds). **Basic neurochemistry**, Academic Press, 7^a ed., 928-937, 2006.
- DARRAS, V.M., VAN HERCK, S.L., HEIJLEN, M., DE GROEF, B. Thyroid hormone receptors in two model species for vertebrate embryonic development: chicken and zebrafish. **J. Thyroid Res.** 2011.
- DE CASTRO-COSTA, M.; De SUTTER, P.; GYBELS, J.; VAN HEES, J. Adjuvant induced arthritis in rats: a possible animal model of chronic pain. **Pain**, v. 13, n. 2, p. 205-206, June 1981.
- DE LA CALLE, J.L.; MENA, M.A.; GONZÁLEZ-ESCALADA, J.R.; PAÍNO, C.L. Intrathecal transplantation of neuroblastoma cells decreases heat hyperalgesia and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. **Brain Research Bulletin.** p 205-211, 2002.
- DECOSTERD, I.; ALLCHORNE, A.; WOOLF, C.J. Progressive tactile hypersensitivity after a peripheral nerve crush: non – noxious mechanical stimulus-induced. **Pain.** v. 100, p. 155-162, 2002.
- DENTICE, M., SALVATORE, D. Deiodinases: the balance of thyroid hormone: local impact of thyroid hormone inactivation. **J. Endocrinology.** 209, 273–282, 2011.

DESOUZA, L.A., LADIWALA, U., DANIEL, S.M., AGASHE, S., VAIDYA, R.A., VAIDYA, V.A. Thyroid hormone regulates hippocampal neurogenesis in the adult rat brain. **Mol. Cell. Neurosci.** v.29,p. 414–426, 2005.

DEVOR, M.; SELTZER, Z. Pathophysiology of damaged nerves in relation to chronic pain. In: WALL, P. D.; MELZACK, R. (Ed.). **Textbook of pain.** 4th ed. London: Churchill Livingstone, p. 129-164, 1999.

DICKENSON A.H.,MATTHEUS E. A, SUZUKI R. Neurobiology of neuropathic pain: mode of action of convulsivants **Eur J Pain** 6 suppl A: 51-56, 2002.

DUYFF RF, VAN DEN BOSCH J, LAMAN DM, POTTER VAN LOON BJ, LINSSEN W. Neuromuscular findings in thyroid dysfunction: a prospective clinical and electrodiagnostic study. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** v. 68: p.750–755, 2000.

DYCK PJ, LAMBERT EH. Polyneuropathy associated with hypothyroidism. **J Neuropathol Exp Neurol** v.10: p. 631– 658, 1970

EBLING F. J. F. On the value of seasonal mammals for identifying mechanisms underlying the control of food intake and body weight. **Hormones and Behavior**, 2014.

ENGLAND,J.D.;ASBURY,A.K. **Periferal Neuropathy.** Lancet; 363: 2151–61, 2004.

ERLANGER, J.; GASSER, H. S. Eletrical Signs of Nervous Activity. Philadelphia. Univ. Pennsylvania Press apud : BEST,C.; TAYLOR, N (1990) **Physiological basis of medical practice.** 12. ed. Baltimore. Willians & Wilkins. 1937.

ESPER,R.M.; LOEB,J.A. Rapid axo-glial signaling mediated by neuregulin and Neurotrophic factors. **J.Neurosci.** v.24, p. 6218–6227, 2004.

EL-BACKRY AM, EL-GAREIB AW, AHMED, RG. Comparative study of the effects of experimentally induced hypothyroidism and hyperthyroidism in some brain regions in albino rats. **International Journal of Developmental Neuroscience** , 28: 371-389, 2010.

FALEIROS A.T.S, RESENDE L.A.L, ZANINI M.A., CASTRO H.A.L., GABARRA R.C. C5 and C6 humana dermatomes: A clinical, electromyographical, imaging and surgical findings **Arq Neuropsiquiatr.** 67: 262-264, 2009;

FARWELL, A.P., DUBORD-TOMASETTI, S.A., PIETRZYKOWSKI, A.Z., STACHELEK, S.J., LEONARD, J.L Regulation of cerebellar neuronal migration and neurite outgrowth by thyroxine and 3,30,50-triiodothyronine. **Brain Res. Dev. Brain Res.** v. 154, p. 121–135, 2005.

FERNANDEZ, M., PIRONDI, S., MANSERVIGI, M., GIARDINO, L., CALZA, L., Thyroid hormone participates in the regulation of neural stem cells and oligodendrocyte precursor cells in the central nervous system of adult rat. **Eur. J. Neurosci.** 20, 2059–2070, 2004

FERNANDEZ-VALLE C, BUNGE R.P., BUNGE M.B. Schwann cells degrade myelin and proliferate in the absence of macrophages: evidence from in vitro studies of Wallerian degeneration. **Journal of Neurocytology** v. 24, p.667-679, 1995

FERREIRA E, SILVA AE, SERAKIDES R, GOMES AES, CASSALI GD. Model of induction of thyroid dysfunctions in adult female mice. **Arquivos Brasileiros de Veterinária e Zootecnia**, 59: 1245-1249,2007.

FLAMANT, F., GAUTHIER, K. Thyroid hormone receptors: the challenge of elucidating isotype-specific functions and cell-specific response. **Biochim. Biophys. Acta Gen** v. 1830, p. 3900–3907, 2013.

FRIESEMA, E.C.H.; GANGULY S.; ABDALLA A; FOX J.E.M.; HALESTRAP A.P.; VISSER T.J. Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. **The journal of biological chemistry**, v. 278, n. 41, p. 40128 – 40135, 2003

GAMBORINO, M.J.; SEVILLA-ROMERO, E.; MUÑOZ, A.; HERNÁNDEZ-YAGO, J.; RENAÚ-PIQUERAS, J.; PINAZO-DURAN, M.D. Role of thyroid hormone in craniofacial and eye development using a rat model. **Ophthalmic** v.33, n. 5, p. 283-91, 2001.

GARZA, R.; PUYMIRAT, J.; DUSSAULT, J.H.; Influence of soluble environmental factors on the development of foetal the brain acetylcholinesterase-positive neurons culture in a chemically defined medium: compar with the effects of L-tri-iodothyronine (L-T3). **Braint Res** v. 56, p.160-8, 1990.

GEORGE, A., BUEHL, A., SOMMER, C., 2004A. Wallerian degeneration after crush injury of rat sciatic nerve increases endo- and epineurial tumor necrosis factor-alpha protein. **Neurosci. Lett.** 372, 215-219

GOMES, F.C., MAIA, C.G., DE MENEZES, J.R., NETO, V.M.,. Cerebellar astrocytes treated by thyroid hormone modulate neuronal proliferation. **Glia** v.25, p.247–255, 1999.

GONZALEZ, S.L., LABOMBARDA, F., DENISELLE, M.C., Mougél, A., Guennoun, R., Schumacher, M. Progesterone neuroprotection in spinal cord trauma involves up-regulation of brain-derived neurotrophic factor in motoneurons. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** v.94, p. 143–149, 2005

GÖTZ, E., FEUERSTEIN, T.J. MEYER, D.K.. Effects of gabapentin on release of γ -aminobutyric acid from slices of rat neostriatum. **Drug Res.** v. 43, p. 636-638, 1993.

GREENSPAN, F.S; STREWLER, G.J. **Basic & Clinical Endocrinology**. 5.ed. London: International, 1997.

GRIFFIN, J. W.; MCARTHUR, J. C.; POLYDEFKIS, M. Assessment of cutaneous innervation by skin biopsies. **Curr. Opin. Neurol.**, v. 14, p. 655-659, 2001.

GUERTIN, A.D., ZHANG, D.P., MAK, K.S., ALBERTA, J.A. & KIM, H.A. Microanatomy of axon/glia signaling during Wallerian degeneration. **J. Neurosci.** v. 25, p. 3478–3487, 2005

GUIMARÃES J., SILVEIRA F. Abordagem diagnóstica das neuropatias periféricas **Acta Med Port**; 21: 83-88, 2008.

GUPTA, S. K.; PRINGLE, J.; PODUSLO, J. F.; MEZEI, C. Induction of myelin genes during peripheral nerve remyelination requires a continuous signal from the ingrowing axon. **J. Neurosci. Res.**, v. 34, n. 1, p. 14-23, Jan. 1993.

HAI T, HARTMAN M. G. The molecular biology and nomenclature of the activating transcription Factor/camp responsive element binding family of transcription

factors: Activating transcription factor proteins and homeostasis. **Gene** v. 273, p.1-11, 2001.

HELDMANN, U.; THORED, P.; CLAASEN, J. H.; ARVIDSSON, A.; KOKAIA, Z.; LINDVALL, O. TNF-alpha antibody infusion impairs survival of stroke-generated neuroblasts in adult rat brain. **Exp. Neurol.**, v. 196, n. 1, p. 204-208, Nov. 2005.

HIRATA, K., KAWABUCHI, M. Myelin phagocytosis by macrophages and nonmacrophages during Wallerian degeneration. **Microsc. Res. Tech.** v.57, p. 541-547, 2002

HOFFMAN, P.N., CLEVELAND, D.W. Neurofilament and tubulin expression. recapitulates the developmental program during axonal regeneration: induction of a specific beta-tubulin isotype. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v.85, p.4530-4533, 1998.

HUEBNER, E.A., STRITTMATTER, S.M.. Axon regeneration in the peripheral and central nervous systems. **Results Probl. Cell Differ.** N.48, p.339-351, 2009.

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. **International Journal of Developmental Neuroscience**, 26: 409-414, 2008.

HUNG, P.L., HUANG, C.C., HUANG, H.M., TU, D.G., CHANG, Y.C. Thyroxin treatment protects against white matter injury in the immature brain via brain-derived neurotrophic factor. **Stroke** v. 44, p. 2275-2283, 2013.

HUNT D., HOSSAIN-IBRAHI K., MASON M.R. J, COFFIN R. S ARLIEBERMAN C. R. S. , WINTERBOTTOM J., ANDERSON P. N. ATF3 upregulation in glia during Wallerian degeneration: differential expression in peripheral nerves and CNS White matter **BMC Neuroscience** n.5, p. 1-12, 2004

HUNTER, J.C.; GOGAS; K.R.; HEDLEY, L.R.; JACOBSON, L.O.; KASSOTAKIS, L.; THOMPSON, J.; FONTANA, D.J. . The effect of novel anti-epileptic drugs in rat experimental models of acute and chronic pain. **Eur. J. Pharmacol.** 324, 153-160, 1997.

IASP Committee for Research and Ethical Issues. Ethical standards for Investigation of Experimental Pain in Animals. **Pain.** v. 16, p. 109-110, 1983.

IP Y. T, DAVIS R.J. "Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)-from inflammation to development". **Curr. Opin. Cell Biol.** 10 (2): 205-19, 1998.

JAGGI AS, JAIN V, SINGH N. Animal models of neuropathic pain. **Fundam Clin Pharmacol.** v. 1 , n. 25, p. 1-28, 2011.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular.** 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S/A, 2000.

KASELIS, A., ŠATKAUSKAS, S. Key molecules in axon regeneration. **Biologija** v. 59, p. 1-14, 2013.

KEILHAUER, G., MEIER, D.H., KUHLMANN-KRIEG, S., NIEKE, J., SCHACHNER, M. Astrocytes support incomplete differentiation of an oligodendrocyte precursor cell. **EMBO J.** v.4, p.2499-2504, 1985.

- KIM S.H; CHUNG J.M. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. **Pain**. v.50, n. 3 p. 355-63, 1992
- KONDO, T., RAFF, M. Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. **Science** v. 289, p. 1754–1757, 2000.
- KRATZSCH J; PULZER F. Thyroid gland development and defects, **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**. v.22, n. 1, p. 57–75,2008.
- KUPERS, R. C.; NUYTEN, D.; DE CASTRO-COSTA, M.; GYBELS, J. M. A time course analysis of the changes in spontaneous and evoked behaviour in a rat model of neuropathic pain. **Pain**, v. 50, p. 101-111, 1992.
- LAZAR, M.A. Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. **Endocrinology**. v.14, p.184-93, 1993.
- LAZARUS, J. H, Thyroid hormones and neurodevelopment, **Clin. Endocrinol. (Oxf.)** v. 50, p. 147-148, 1999.
- LEGRAND, J. Thyroid hormone effects on growth and development, in; G. Henneman (Ed.), **Thyroid hormone Metabolism**, Marcel Dekker, New York, p. 503-534, 1986.
- LEMKINE, G.F., RAJ, A., ALFAMA, G., TURQUE, N., HASSANI, Z., ALEGRIA-PREVOT, O. Adult neural stem cell cycling in vivo requires thyroid hormone and its alpha receptor. **Faseb j**. n.19, p.863–865, 2005.
- LIU L, LIUDYNO M, TAO R, ERIKSSON P, SVENSSON M, ALDSKOGIUS H: Hereditary absence of complement C5 in adult mice influences wallerian degeneration, but not retrograde responses, following injury to peripheral nerve. **Journal of the Peripheral Nervous System**. v.4, p.123-133, 1999.
- LIU, L.Y., ZHENG, H., XIAO, H.L., SHE, Z.J., ZHAO, S.M., CHEN, Z.L., ZHOU, G.M. Comparison of blood-nerve barrier disruption and matrix metalloprotease-9 expression in injured central and peripheral nerves in mice. **Neurosci. Lett**. v.434, p. 155-159, 2008
- LOEVNER A.L.;KAPLAN L.S.;CUNNANE M.E.; MOONIS G. Cross-sectional Imaging of the thyroid gland, **Neuroimaging Clin.** v.18, Issue3, p.445-461, 2008.
- LOPEZ-JUAREZ, A., REMAUD, S., HASSANI, Z., JOLIVET, P., SIMONS, J.P., SONTAG, T. Thyroid hormone signaling acts as a neurogenic switch by repressing Sox2 in the adult neural stem cell niche. **Cell Stem Cell** v.10, p. 531–543, 2012.
- MAHI R. Physiology of the pituitary, thyroid, parathyroid and adrenal glands, **Basic Science**. v.32, n. 10, p. 504-512.
- MAIA A. L., SCHEFFEL R. S, MEYERE. L. S., MAZETO G. M. F. S. , CARVALHO G. A. , GRAF H.,VAISMAN M., LEA M. Z. MACIEL L. M. Z., RAMOS H. E., TINCANI A. J. ANDRADA N. C. WARD L. S. The Brazilian consensus for the diagnosis and treatment of hyperthyroidism: recommendations by the Thyroid Department of the Brazilian Society of Endocrinology and Metabolism. **Arq Bras Endocrinol Metab**. v.57/3, p. 205-231, 2013.
- MALIN,S.A. *et al*. Glial cell line-derived neurotrophic factor family members sensitize Nociceptors in vitro and produce thermal hyperalgesia in vivo. **J.Neurosci**. v. 26, p. 8588–8599, 2006.

- MARTINEZ, R., GOMES, F.C. Neuritogenesis induced by thyroid hormone-treated astrocytes is mediated by epidermal growth factor/mitogen-activated protein kinase-phosphatidylinositol 3-kinase pathways and involves modulation of extracellular matrix proteins. **J. Biol. Chem.** V. 277, p. 49311–49318, 2002.
- McMAHON, S. B.; BENNETT, D. L. H. Trophic factors and pain. *In*: WALL, P. D.; MELZACK, R. (Ed.). **Textbook of pain**. 4th ed. London: Churchill Livingstone. p. 105–128 1999.
- MCCARTHY, J. L., CORLEY, R. C. AND ZARROW, M. X. Effect of goitrogens on adrenal glands of rats. **Am. J. Physiol.** 197: 693–698.1959
- MELZACK R, WALL P.D. Pain mechanisms: A new theory. **Science**. v. 150, p. 971–979, 1965
- MENEZES, A.P.B. Efeito do timol sobre o potencial de ação composto em nervo isquiático de rato.. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências da Saúde. Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza, 2004.
- MERSKEY, H.; BOGDUK, N. Classification of Chronic Pain - Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms, Seattle, **IASP Press**. 2^a ed., 1994.
- MILLAN, J.M. The induction of pain: an integrative review. **Prog. Neurobiol.**, p.571-164, 1999.
- MOHACSIK, P., ZEOLD, A., BIANCO, A.C., GEREBEN, B. Thyroid hormone and the neuroglia: both source and target. **J. Thyroid Res.**, 21571, 2011
- MURINSON BB, ARCHER DR, LI Y, GRIFFIN JW: Degeneration of myelinated efferent fibers prompts mitosis in Remak Schwann cells of uninjured Cfiber afferents. **J Neurosci** v.25, p.1179-1187, 2005
- MUZZIO D.; ZYGMUNT M.; JENSEN F.The role of pregnancy-associated hormones in the development and function of regulatory B cells. **Frontiers in Endocrinology Cellular Endocrinology** v. 5, n. 39, p.1-6, 2014.
- MURAKAMI, N., HAYAFUJI, C. AND TAKAHASHI, K. Thyroid hormone maintains normal circadian rhythm of blood corti- costerone levels in the rat by restoring the release and synthesis of ACTH after thyroidectomy. **Acta Endocrinol.** 107: 519– 524 1984.
- MWANGI, D.K. Effect of propylthiouracil induced hypothyroidism in developing rat cerebellum: comparison o cerebellar parameters in five day old normal and treated rat pups. **East. Afr. Med. Journal.** v.75, n.10, p. 602-608, 1998.
- nerve-fiber degeneration. **J. Neurocytol.** v.15, p.17-28, 1986
- NAKAGOMI S.,SUZUKI Y., NAMIKAWA K., KIRY-SEO S., HIROSHI KIYAMA Expression of the Activating Transcription Factor 3 Prevents c-Jun N-Terminal Kinase-Induced Neuronal Death by Promoting Heat Shock Protein 27 Expression and Akt Activation; **Journal of Neuroscience** , 23 (12) 5187-5196, 2003
- NICHOLSON B. D, Evolution and tratament of central pain syndromes.**Neurology** v. 62 n. 5 suppl2: p.30-36, 2004.

NOBACK, C.R.; STROMINGER, N.L.; DEMAREST, R.J. Pain and temperature the human nervous system structure and function. New York: Willians & Wilkins, 5.ed., 1996.

NOKES, L. D.M.; DANIEL. D.; FLINT, T.; BARASI, S. Investigations into the Analysis of the rate of decay of the compound actions potentials recorded from, the rat sciatic nerve after death: Significance for the prediction of the postmortem period. **Forensic science International**. v. 50 , n.1, p. 75-85, 1991.

OLTMANNNS U, ISSA R, SUKKAR M.B, JOHN M, CHUNG K.F. "Role of c-jun N terminal kinase in the induced release of GM-CSF, RANTES and IL-8 from human airway smooth muscle cells". **Br. J. Pharmacol.** 139 (6): 1228–34 2003.

OPPENHEIMER, J.H.; SCHWARTZ, H.L.; MARIASH, C.N.; KINLAW, W.B.; WONG, N.C.W.; FREAKE, H.C. Advances in our understanding of thyroid hormone action at the cellular level. **Endocrinology Rev.** v. 8, p. 288-308, 1987.

ØRSTAVIK K, NORHEIM I, JØRUM E. Pain and small-fiber neuropathy in patients with hypothyroidism. **Neurology** v. 67: p.786–791, 2006

ORTEGA, E., RODRIGUEZ, E., RUIZ, E. AND OSORIO, C. Activity of the hypothalamo-pituitary ovarian axis in hypothyroid rats with or without triiodothyronine replacement. *Life Sci.* 46: 391–395,1990.

PATEL, A. J.; BALAZS, R.; SMITH, R.M.; KINGSBURY, A.E.; HUNT, A. Thyroid hormone and development, in: C.Di BENEDETTA, R. BALAZS, G. GOMBOS, G.PORCELLATI (Eds.), Multidisciplinary Approach to **Brain Development**, Elsevier, *Amsterdam*,p. 261-277, 1980.

PELLEGRINO, R.G., POLITIS, M.J., RITCHIE, J.M., SPENCER, P.S.. Events in degenerating cat peripheral-nerve - induction of schwann-cell s-phase and its relation to

PEREIRA J. A., JULIEN L. F., SUTER U. Molecular mechanisms regulating myelination in the peripheral nervous system **Cell PRESS**, TINS-871; No. of Pages 12, 2011.

PERRY, V.H., BROWN, M.C. Role of macrophages in peripheral-nerve degeneration

PICOU, F., FAUQUIER, T., CHATONNET, F., FLAMANT, F. A bimodal influence of thyroid hormone on cerebellum oligodendrocyte differentiation. **Mol. Endocrinol.** V.26, p.608–618, 2012.

QIN, Y.; CHENG, C.; WANG, H.; SHAO, X.; GAO, Y.; SHEN, A. TNF-alpha as an autocrine mediator and its role in the activation of Schwann cells. **Neurochem. Res.**, v. 33, n. 6, p. 1077-1084, June 2008.

QUATTRINI, A.; NEMNI, R.; MARCHETTINI, P.; FAZIO, R.; IANNACCONE, S.; CORBO, M.; CANAL, N. Effect of hypothyroidism on rat peripheral nervous system. **Neuro Report**. v. 4, p. 499-502, 1993.

ROSENBERG N.R, SLOTEMA C.W, HOOGENDIJK J.E, VERMEULEN M.: Follow up of patients with signs and symptoms of polyneuropathy not confirmed by electrophysiological studies. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**;76(6):879-881, 2005.

SAP, J.; MUNOZ, A.; DAMM, K.; GOLBERG, Y.; GHYSDAEL, J.; LEUTZA, B.H.; VENNSTROM, B. The c-erb-a protein is a high affinity receptor for thyroid hormone. **Nature**. v. 324, p. 635-40, 1986.

SARKAR D.; SINGH K.S. Effect of neonatal hypothyroidism on prepubertal mouse testisin relation to thyroid hormone receptor alpha 1 (THR α 1) **General and Comparative Endocrinology**. 2016

SCHENKER, M.; RIEDERER, B.M.; KUNTZER, T.; BARAKAT-WALTER, I. Thyroid hormones stimulate expression and modification of cytoskeletal protein during rat sciatic nerve regeneration. **Brain Res** v.113; 957, n.2, p. 259-70, 2002.

SCHROEDER A. C.. PRIVALSKY M.L. Thyroid hormones,T3 andT4, in the brain. **Frontiers in Endocrinology**. v.5, n. 40, p. 1-6, 2014.

SCHWARTZMAN R.J.,GROTHUSEN J.,KIEFER T.R., RORH P., Neuropathic central pain: epidemiology,etiology,and treatment options **Arch Neurol** 58 : 1547-50. 2001

SELTZER Z. R, DUBNER R, SHIR Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain**. v. 2 n.43, p.:205-18, 1990.

SCHMIDT E.D, CRAMER S.J, OFFRINGA R. The thyroid hormone receptor interferes with transcriptional activation via the AP-1 complex. **Biochem Biophys Res Commun** 192: 151–160, 1993.

SCHEFF N.N, GOLD M.S. Trafficking of Na⁺/Ca²⁺ Exchanger to the Site of Persistent Inflammation in Nociceptive Afferents. *The Journal of Neuroscience*,35(22): 8423-8432 2015.

SHULGA, A., BLAESSE, A., KYSENIUS, K., HUTTUNEN, H.J., TANHUANPAA, K., SAARMA, M. Thyroxin regulates BDNF expression to promote survival of injured neurons. **Mol. Cell. Neurosci**. v.42, p.408–418, 2009.

SIMSEK, G.; ANDICAN, G.; KARAKOC, Y.; YIGIT, G.; HATEMI, H.; CANDAN, G. Calcium, magnesium,and zinc status in experimental hypothyroidism. **Biol Trace Elem Res** v. 60,n.3, p. 205-13. 1997.

SMITH T. J, SAIKI C. B. Cancer pain management. **Mayo Clin Proc**. v.10:, p.1428-39, 201

SMITH, J. W.; EVANS, A.; COSTALL, B.; SMYTHE, J.W. Thyroid hormones, brain function and cognition; a brief review. **Neuroscience and biobehavioral reviews** v.26, p. 45-60, 2002.

SOUSA A. M, LAGES G. V., PEREIRA C.L., SLULLITEL A. Experimental models for the study of neuropathic pain **Rev Dor**. São Paulo, n.17, p. 27-30 , 2016

SOUSA A. M.; LAGES G, V.; PEREIRA C. L., SLULLITEL A. SCHEITHAUER B.W, KOVACS K, RANDALL RV, RYAN N. Pituitary gland in hypothyroidism. Histologic and immunocytologic study. **Arch Pathol Lab Med**.;109(6):499-504, 1985.

SOUSA, C. T. Efeitos da tireoidectomia na resposta broncoconstrictora e sensibilização antigênica em pulmões isolados de ratos. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) Departamento de fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, 2001.

STOLL, G.; JANDER, S.; MYERS, R. R. Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation. **J. Peripher. Nerv. Syst.**, v. 7, n. 1, p. 13-27, Mar. 2002.

STOLL, G.; MÜLLER, H. W. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. **Brain Pathol.**, v. 9,n. 2, p. 313-325, Apr. 1999.

TATSUMI, K., HAGA, S., MATSUYOSHI, H., INOUE, M., MANABE, T., Makinodan, M. Characterization of cells with proliferative activity after a brain injury. **Neurochem. Int.** v.46,p. 381–389, 2005.

TEIXEIRA, M. J. **Dor: Princípios e Prática.** São Paulo-SP: Artmed Editora, p.165 2009.

TEMPORIN, K.; TANAKA, H.; KURODA, Y.; OKADA, K.; YACHI, K.; MORITOMO, H.; MURASE, T.; YOSHIKAWA, H. IL-1beta promotes neurite outgrowth by deactivation RhoA via p38 MAPK pathway. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 365, p. 375-380, 2008a

TEMPORIN, K.; TANAKA, H.; KURODA, Y.; OKADA, K.; YACHI, K.; MORITOMO, H.; MURASE, T.; YOSHIKAWA, H. Interleukin-1 beta promotes sensory nerve regeneration after sciatic nerve injury. **Neurosci. Lett.**, v. 440, n. 2, p. 130-133, Aug. 2008b.

TOHEI, A., AKAI, M., TOMABECHI, T., MAMADA, M., TAYA, K. Adrenal and gonadal function in hypothyroid adult male rats. **J. Endocrinol.** 152: 147–154, 1997.

TOHEI, A., IMAI, A., WATANABE, G., TAYA, K., Influence of Thiouracil-induced hypothyroidism on adrenal and gonadal functions in adult female rats. **J. Vet. Med. Sci.** 60(4): 439–446, 1998

TRENTIN, A.G., GOMES, F.C., LIMA, F.R., NETO, V.M., 1998. Thyroid hormone acting on astrocytes in culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* v.34, p.280–282, 1998.

TSUJINO, H. *et al.* Activating transcription factor 3 (ATF3) induction by axotomy in sensory and motoneurons: A novel neuronal marker of nerve injury. **Molecular and cellular neurosciences**, v. 15, n. 2, p. 170–182, 2000.

VARGAS, M. E.; BARRES, B. A. Why is wallerian degeneration in tehe CNS so slow? **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 30, p. 153-179, 2007.

VISSER, W.E., FRIESEMA, E.C., VISSER, T.J. Minireview: thyroid hormone transporters: the knowns and the unknowns. **Mol. Endocrinol.** V.25, p. 1–14, 2011.

VORIA, I., HAUSER, J., AXIS, A., SCHENKER, M., BICHET, S., KUNTZER, T. Improved sciatic nerve regeneration by local thyroid hormone treatment in adult rat is accompanied by increased expression of SCG10. **Exp. Neurol.** v.197, p. 258–267, 2006.

WAJNER S. M.; WAGNER M.S.; FERNENDES N.S.; MAIA A.L. Thyroid hormones and testicular function. **HCPA** v.8,n.1, p.41-48, 2008.

WALTON, J.G.; THOMPSON, J.W.; SYMUOR, R.A. (Eds) The pharmacology of pain. Textbook of dental Pharmacology and Therapeutics, Oxford: Oxford medical Publications, p.49-65, 1994.

WEINBERGER, C.; THOMPSON, C.C.; ONG, E.S.; LEBO, R.; GRUL, D.J.; EVANS, R.M. The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor. **Nature** v.324, p.641-6, 1986.

WOLFE, F.; SMYTHE, H. A.; YUNUS, M. B.; BENNETT, R. M.; BOMBARDIER, C.; GOLDENBERG, D. L.; TUGWELL, P.; CAMPBELL, S. M.; ABELES, M.; CLARK, P. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee. **Athristis Rheum.**, v. 33, n. 2, p. 160-172, Feb. 1990.

WOOLF, C.J.; MANNION, R.J. Neuropathic pain: a etiology, symptoms, mechanism and management. *Lacet* v.353 , p.1959 -1964, 1999.

XIAO, Q.; V. M. NIKODEM, Apoptosis in the developing cerebellum of the thyroid hormone deficient rat , **Front. Biosci.**3 (1998) A52-A57.

YUAN P. Q., YANG H., Hypothyroidism increases Fos immunoreactivity in cholinergic neurons of brain medullary dorsal vagal complex in rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 289: E892–E899, 2005.

YEN, PAUL M., Physiological and Molecular Basis of Thyroid Hormone Action. **Physiology Reviews** v.81, n.3, 2001.

ZHU, X., BERGLES, D.E., NISHIYAMA, A., 2008. NG2 cells generate both oligodendrocytes and gray matter astrocytes. **Development** v.135, p. 145–157, 2008.

ZIMMERMANN, M. Pathobiology of neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**. v. 429, p.23-37, 2001.

Artigos Publicados e Submetidos

1-Dear Mrs. KALINA Kelma SOUSA,

You have received this email to confirm that a consolidated user account has been created for you in the Elsevier Editorial System (EES) - the online submission and peer review tracking system for Neurochemistry International. This is a 'parent' account which contains your contact and log-in information for all your EES journals.

At the same time, this EES consolidated account has been linked to your [Elsevier profile](#). Your Elsevier profile may also be used to access other Elsevier products.

When you register for another Elsevier journal, you can link the new journal to this Elsevier profile. Doing this will automatically copy the contact and log-in information to your new account.

Please note: Your username is the email address to which this message was sent.

Changes made to your personal information will be reflected in all EES journals - and any other Elsevier product accounts - that are linked to your Elsevier profile. If you forget your password, you can reset it by clicking the 'Forgotten Username/Password' link.

When you log into EES, you may click the 'My EES Hub' link on the menu banner at the top of the page to go to a landing page that offers several benefits:

- A helpful overview lists any activities pending in your account
- Any unlinked journal accounts registered to an email address matching that of your consolidated account are listed, so that you can easily add these to your consolidated account
- Once you link additional journals to your consolidated account, you can switch between them without logging out
- A search option helps you find other EES journals

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Neurochemistry International

Dear Ms de Sousa:

A manuscript titled Neurotoxic effect of oxaliplatin: comparison with its oxalate-free and stable analogue (LLC-1402) in mice (2017-BJP-0056-RP) has been submitted by Professor Mariana Vale to the British Journal of Pharmacology.

You are listed as a co-author for this manuscript. The online peer-review system, Manuscript Central, automatically creates a user account for you. Your British Journal of Pharmacology - Manuscript Central account information is as follows:

Site URL: <https://mc.manuscriptcentral.com/bjp>

USER ID: kalinakelma@hotmail.com

PASSWORD: Click (or copy and paste) this link to set a

password: https://mc.manuscriptcentral.com/bjp?URL_MASK=0d31d059312d48f2bc8391b59852a703

You can use the above USER ID and PASSWORD to log in to the site and check the status of papers you have authored/co-authored. Please log in to <https://mc.manuscriptcentral.com/bjp> and click on your name in the top right area of the site to update your account information (inclusive of a minimum of four keywords).

Thank you for your participation.

Best wishes,

Alice Kallaway
Senior Editorial Assistant
British Journal of Pharmacology

14-Jan-2017

Dear Professor Vale:

Your manuscript entitled "Neurotoxic effect of oxaliplatin: comparison with its oxalate-free and stable analogue (LLC-1402) in mice" by Pereira, Anamaria; de Oliveira, Francisco Fábio ; Alves, Bruno Wesley; de Menezes, Karoline Luanne; de Mesquita, Aline Kelly; Lisboa, Mario Roberto; de Sousa, Kalina Kelma; Vale, Mariana, has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the British Journal of Pharmacology.

Co-authors: Please contact the Editorial Office as soon as possible if you disagree with being listed as a co-author for this manuscript.

Your manuscript ID is 2017-BJP-0056-RP.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc.manuscriptcentral.com/bjp> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Centre after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/bjp>.

Effective with the 2013 volume, this journal will be published in an online-only format. Issues of this title will be published online only and will not be printed but authors will still be able to order offprints of their own articles.

Thank you for submitting your manuscript to the British Journal of Pharmacology.

Best wishes,

Alice Kallaway
Senior Editorial Assistant
British Journal of Pharmacology