



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS

HELSON FREITAS DA SILVEIRA

**INFLUÊNCIA DO HIPOTIREOIDISMO SOBRE AS ALTERAÇÕES NOCICEPTIVAS E
MORFOLÓGICAS PERIFÉRICAS E CENTRAIS NA NEURALGIA TRIGEMINAL EM
RATOS.**

FORTALEZA

2017

HELSON FREITAS DA SILVEIRA

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Morfofuncionais, do Departamento de Morfologia, na Faculdade de Medicina, na Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Morfofuncionais.

Orientadora: Prof. Dr^a. Mariana Lima Vale

Coorientadora: Prof. Dr^a. Delane Viana Gondim

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)

S588i Silveira, Helson Freitas da.

Influência do Hipotireoidismo sobre as alterações nociceptivas e morfológicas periféricas e centrais na neuralgia trigeminal em ratos / Helson Freitas da Silveira. – 2017. 152 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de PósGraduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2017.

Orientação: Profa. Dra. Mariana Lima Vale.

Coorientação: Profa. Dra. Delane Viana Gondim.

1. Hipotireoidismo. 2. Neuralgia do trigêmeo. 3. Nocicepção. 4. Dor. I. Título.

CDD 611

HELSON FREITAS DA SILVEIRA

ANÁLISE NOCICEPTIVA E MORFOLÓGICA DAS ALTERAÇÕES PERIFÉRICAS E CENTRAIS NA NEURALGIA DO TRIGÊMEO EM RATOS COM HIPOTIREOIDISMO

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Morfofuncionais, do Departamento de Morfologia, na Faculdade de Medicina, na Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Morfofuncionais.

BANCA EXAMINADORA

Defesa em: 26/09/2017.

Prof. Dr^a. Mariana Lima Vale
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr^a. Ana Rosa Pinto Quidute
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr^a. Valéria Paula Sassoli Fazan
Universidade Federal do Ceará – UFC

A minha esposa.
Aos meus Filhos.
Aos meus pais e irmãos.
Aos professores.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela força para enfrentar os intemperes da vida, por guiar meus passos em todas minhas empreitadas e por me ensinar a cada dia a arte de viver com fé.

A minha amada esposa **Ana Christina de Sousa Silveira**, pela paciência, apoio, carinho e amor em todos os momentos destes nossos mais de 15 anos de companheirismo.

Aos meus amados filhos **Mariana de Sousa Silveira e Miguel Teófilo de Sousa Silveira**, pela paciência, carinho e amor em todos os momentos.

Aos meus pais **Manoel Teófilo da Silveira e Maria Leide Freitas da Silveira** e aos meus irmãos **Helsiana Freitas da Silveira e Herison Teófilo Freitas da Silveira**, a todos os **Familiares e Amigos** pela compreensão da minha ausência neste período de minha formação acadêmica, como também eterno amor e afeto.

A **Prof. Dra. Mariana Lima Vale**, minha orientadora que, com todo respeito, agradeço por ter aceitado minha orientação, por todo empenho, sabedoria, compreensão. Deus o abençoe sempre. Muito obrigado.

A **Prof. Dra. Delane Viana Gondim**, minha coorientadora que, com todo respeito, agradeço pelo incentivo, pela parceria em muitas empreitadas que vivenciamos, por ter aceitado minha coorientação, por todo empenho, sabedoria, compreensão. Deus o abençoe sempre. Muito obrigado.

À **Profa. Dra. Valéria Paula Sassoli Fazan**, por aceitar participar da banca de defesa desta dissertação, proporcionando discussões e sugestões que servirão para um maior crescimento, aprendizado e incentivo pessoal na minha carreira como pesquisador.

À **Profa. Dra. Ana Rosa Pinto Quidute**, por aceitar participar da banca de qualificação desta dissertação, proporcionando discussões e sugestões que servirão para um maior crescimento, aprendizado e incentivo pessoal na minha carreira como pesquisador.

À **Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão**, por aceitar participar da banca de qualificação desta dissertação, proporcionando discussões e sugestões que servirão para um maior crescimento, aprendizado e incentivo pessoal na minha carreira como pesquisador.

Ao amigo **Howard Lopes Ribeiro Júnior**, meus sinceros agradecimentos por sua amizade, pela cooperação e paciência no ambiente de trabalho e suporte para a difícil tarefa de conciliar minhas atividades de servidor da Universidade Federal do Ceará e aluno do Programa de pós-graduação e por seus inestimáveis ensinamentos estatísticos e metodológicos.

À **Profa. Dra. Eliane de Oliveira Ferreira**, ex-chefe e ex-professora do Departamento de morfologia, pelo apoio e incentivo, por propiciar ambiente favorável para a difícil tarefa de

conciliar minhas atividades de servidor da Universidade Federal do Ceará e aluno do Programa de pós-graduação em ciências morfofuncionais.

À **Prof. Dr. Emmanuel Prata de Sousa**, chefe do Departamento de morfologia, pelo apoio e incentivo, por propiciar ambiente favorável para a difícil tarefa de conciliar minhas atividades de servidor da Universidade Federal do Ceará e aluno do Programa de pós-graduação em ciências morfofuncionais.

Ao Amigo **Carlos Roberto de Oliveira Leite**, meus sinceros agradecimentos por sua amizade, pela cooperação e paciência no ambiente de trabalho.

À amiga **Kalina Kelma Sousa de Oliveira**, meus sinceros agradecimentos por sua amizade e por sua inestimável colaboração em nossas empreitadas científicas, também por prontamente aceitar participar da banca de qualificação desta dissertação proporcionando discussões e sugestões que servirão para um maior crescimento, aprendizado e incentivo pessoal na minha carreira como pesquisador.

A todos do **Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais**, por apoiar continuamente a evolução da qualidade formativa deste programa. Meus sinceros agradecimentos.

Destaco meus sinceros agradecimentos a cada um que compõe o **Laboratório Farmacologia e Inflamação do Câncer (LAFICA)** e o **Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagens (NEMPI)**.

A todos (as) estudantes de iniciação científica e de pós-graduação, que colaboram incansavelmente para execução e sucesso de nossos experimentos, em especial: **Luíza Clertiane Vieira Alves e Diego Bernardi Souza Dias** por suas inquestionáveis de dedicação e esforço.

Ao **CNPq** e a **CAPES**, pelo auxílio financeiro as pesquisas.

A **todos os professores e mestres** que já tive em minha história, cada um deles, desde a primeira professora primária (Prof.^a “Tia” Silvia), contribuíram para construção do meu ser, cada um deles deixou em pedacinho de seus conhecimentos para fundamentar cada passo seguinte de minha formação, meus muitíssimo obrigado.

Agradeço profundamente a todos os **animais**, que colaboraram com suas vidas para execução e sucesso dessa pesquisa, fundamentais neste novo passo na minha formação como pesquisador.

RESUMO

Os hormônios tireoidianos (HTs) são importantes mediadores do crescimento e desenvolvimento do organismo, principalmente do SNC. A falta dos HTs diminui o volume neuronal, e provoca defeitos na mielinização, deprimindo a excitabilidade e reduzindo a velocidade de condução. O hipotireoidismo provoca alterações no desenvolvimento da resposta neuronal, com aumento do limiar de excitabilidade da fibra nervosa periférica. Investigamos e avaliamos os efeitos nociceptivos e morfológicos periféricos e centrais do hipotireoidismo na presença da dor neuropática. Foram utilizados ratos Wistar machos, 180 a 220 g, mantidos a 24°C, ciclo dia/noite - 12/12 h, água *ad libitum*, livre acesso a ração balanceada, alojados em grupos de 4 por gaiola. Os animais foram divididos em 6 grupos de 6 animais: controle (C), neuralgia do trigêmeo (NT), NT Sham, hipotireoidismo (H), H+NT, H+ NT Sham. O hipotireoidismo foi induzido com propiltiuracil (PTU) 0,05% por 21 dias, e confirmado por dosagem de T4. Foi realizada indução da neuralgia trigeminal através da constrição do nervo infraorbital. O limiar nociceptivo foi aferido por teste de Von Frey eletrônico 2 vezes por semana após a cirurgia por 21 dias. Foram coletados o subnúcleo caudal do trigêmeo (SCT), gânglio trigeminal (GT), nervo infraorbital (NIO), tireoide e pele da vibrissa. O material marcado por imunofluorescência com os anticorpos, anti-NeuN, anti-c-Fos, anti-PBM, anti ATF-3 e anti-PGP 9.5 para evidenciar sinais de injúria celular, nocicepção e integridade das fibras nervosas e as tireoides coradas em HE para análise histopatológica. A análise estatística foi feita pela média \pm EPM das medidas registradas, normalização de dados por Shapiro-Wilk, análise de variância (ANOVA one way ou two way), com pós-teste de Turkey ou Games-Howell determinado pelo teste de homogeneidade de variância de Levene, onde valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos e teste de correlação de Spearman. Os resultados mostraram nos grupos com hipotireoidismo redução dos níveis de T4, perda ponderal, aumento nas dimensões e peso das glândulas tireoides, hiperplasia folicular e hipertrofia da tireoide, e houve correlação negativa entre os níveis de T4 e a morfometria da Tireoide. Houve redução do limiar nociceptivo no NT, contudo no grupo H mostraram aumento do limiar e o limiar do grupo H+NT mostrou a níveis do controle, sugerindo uma manifestação subclínica, além de correlação negativa com os níveis de T4. ATF3 mostrou-se elevado nos grupos neuropáticos no GT, mas não expressou no SCT. C-Fos elevou-se no grupo NT, reduzido no H+NT em GT, contudo no TE o c-Fos no grupo H+NT elevou-se acima do grupo NT, que também se apresentava aumentado. PBM e DAPI apresentaram-se aumentados nos grupos neuropáticos, houve sinais de morte axonal e delaminação da bainha de mielina. PGP 9.5 mostrou diminuição do número de terminações nervosas na pele das vibrissas nos grupos com NT. Concluímos que o modelo de indução do hipotireoidismo com PTU em ratos é eficaz, reproduz as alterações encontradas em humanos com hipotireoidismo, demonstrado através de estudos sorológicos, comportamentais, anatomopatológicos e histopatológicos. Há uma correlação negativa entre os níveis de T4 e a morfometria da tireoide. O hipotireoidismo leva a distúrbios na resposta nociceptiva em ratos, e levando os sinais de dor em estado neuropático a níveis subclínicos. Há uma correlação negativa entre os níveis de T4 e o limiar nociceptivo. A expressão de redução de c-Fos do gânglio trigeminal evidencia a predominância do efeito periférico na nocicepção do hipotireoidismo. A expressão de ATF3 mostra que o hipotireoidismo não influencia na capacidade do neurônio periférico de iniciar uma resposta. O hipotireoidismo diminui da capacidade de reparo axonal e remielinização das vias periféricas reduzindo a quantidade de fibras e terminações nervosas mostrados na expressão de PBM e PGP 9.5.

Palavras – chave: Hipotireoidismo, Neuralgia Trigeminal, Nocicepção, Dor.

ABSTRACT

Thyroid hormones (HTs) are important mediators of the growth and development of the organism, mainly of the CNS. The lack of HTs decreases neuronal volume, and causes defects in myelination. Hypothyroidism depresses neuronal excitability when associated with chronic peripheral lesion in rats, reduces conduction velocity, with absence of sensory potentials. Considering that hypothyroidism causes changes in the development of the neuronal response, with an increase in the excitability threshold of the peripheral nerve fiber. We investigated and evaluated peripheral and central nociceptive and morphological effects of hypothyroidism in the presence of neuropathic pain. Male Wistar rats, 180 to 220 g, maintained at 24 ° C, day / night cycle - 12/12 h, water ad libitum, free access to balanced feed, housed in groups of 4 per cage were used. The animals were divided into 6 groups of 6 animals: control (C), trigeminal neuralgia (NT), NT Sham, hypothyroidism (H), H + NT, H + NT Sham. Hypothyroidism was induced with 0.05% propylthiuracil (PTU) for 21 days, and confirmed by T4 dosing. Induction of trigeminal neuralgia was performed through infraorbital nerve constriction. The nociceptive threshold was measured by electronic Von Frey test 2 times a week after surgery for 21 days. The caudal trigeminal subnucleus (SCT), trigeminal ganglion (GT), infraorbital nerve (NIO), thyroid and vibrissa skin were collected. Immunofluorescence-labeled material with antibodies, anti-NeuN, anti-c-Fos, anti-PBM, anti-ATF-3 and anti-PGP 9.5 to evidence signs of cellular injury, pain and the integrity of nerve fibers. Thyroid stained in HE for histopathological analysis. Statistical analysis was done by mean \pm SEM of the measurements recorded, data normalization by Shapiro-Wilk, analysis of variance (ANOVA one way or two way), with post-test of Turkey or Games-Howell determined by the test of homogeneity of variance of Levene, where values of $p < 0.05$ were considered statistically significant and Spearman's correlation test. Our results showed a reduction in T4 levels, weight loss, increase in thyroid gland size and weight, follicular hyperplasia and thyroid hypertrophy, and negative correlation between T4 levels and thyroid morphometry. There was a reduction in the nociceptive threshold in the NT, but in the H group they showed an increase in the threshold and the threshold of the H + NT group showed at the control levels, suggesting a subclinical manifestation, in addition to a negative correlation with the T4 levels. ATF3 was shown to be elevated in neuropathic groups in GT, but did not express in SCT. C-Fos was elevated in the NT group, reduced in the H + NT in GT, but in the TE the c-Fos in the H + NT group rose above the NT group, which was also increased. PBM and DAPI were increased in the neuropathic groups, there were signs of axonal death and delamination of the myelin sheath. PGP 9.5 showed a decrease in the number of nerve endings in the skin of vibrissae in NT groups. We conclude that the induction model of hypothyroidism with PTU in rats is effective, reproduces the alterations found in humans with hypothyroidism, demonstrated through serological, behavioral, anatomopathological and histopathological studies. There is a negative correlation between T4 levels and thyroid morphometry. Hypothyroidism leads to disturbances in the nociceptive response in rats, and leading the pain signals in neuropathic state to subclinical levels. There is a negative correlation between T4 levels and the nociceptive threshold. The expression of c-Fos reduction in the trigeminal ganglion evidences the predominance of the peripheral effect in the nociception of hypothyroidism. Expression of ATF3 shows that hypothyroidism does not influence the ability of the peripheral neuron to initiate a response. Hypothyroidism decreases axonal repair ability and remyelination of peripheral pathways by reducing the amount of fibers and nerve endings shown in the expression of PBM and PGP 9.5.

Key-words: Hypothyroidism, Trigeminal Neuralgia, Nociception, Pain.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração da tireoide do rato e do homem	21
Figura 2 - Corte histológico da glândula tireoide do rato	23
Figura 3 - Representação da degeneração walleriana	31
Figura 4 - Representação da área de atuação do nervo trigêmeo e sua origem	33
Figura 5 - Representação do complexo nuclear trigeminal	35
Figura 6 - Ilustração do Encéfalo e tronco encefálico do rato e suas principais estruturas macroscópicas	36
Figura 7 - Ilustração da localização do subnúcleo caudal do nervo trigêmeo (Sp5C) no troco encefálico	37
Figura 8 - Representação da inervação da face, ramos do nervo trigêmeo	38
Figura 9 - Modelo de constrição do nervo infraorbital	40
Figura 10 - Representação esquemática dos grupos experimentais	51
Figura 11 - Representação esquemática da indução, manutenção e confirmação do Hipotireoidismo	53
Figura 12 - Representação esquemática do protocolo cirúrgico	55
Figura 13 - Cirurgia com ligadura do nervo infraorbital	56
Figura 14 - Cirurgia sem ligadura do nervo infraorbital (<i>Sham</i>)	57
Figura 15 - Ilustração da aferição do limiar nociceptivo na almofada vibrissal	59
Figura 16 - Representação esquemática do delineamento experimental referente ao limiar nociceptivo	60
Figura 17 - Localização do subnúcleo caudal do trato espinhal do nervo trigêmeo (Sp5C)	61
Figura 18 - Matriz para encéfalo de rato	62
Figura 19 - Material extraído para análises	63
Figura 20 - Medidas da Tireoide	64
Figura 21 - Tireoides de ratos com e sem hipotireoidismo	71
Figura 22 - Imagens histológicas das glândulas tireoides de todos os grupos experimentais	79
Figura 23 - Fotomicrografias de imunoexpressão de c-Fos em gânglio trigeminal	84
Figura 24 - Fotomicrografias de imunoexpressão de c-Fos em subnúcleo caudal do trato espinhal do nervo trigêmeo	86

Figura 25 - Fotomicrografia de imunexpressão de ATF3 em gânglio trigeminal	88
Figura 26 - Fotomicrografia de imunexpressão de ATF3 em subnúcleo caudal do trato espinhal do nervo trigêmeo	90
Figura 27 - Fotomicrografia de imunexpressão de PBM e DAPI em nervo infraorbital	93
Figura 28 - Fotomicrografia de imunexpressão de PBM em nervo infraorbital dos grupos experimentais C, NT, H e H+NT	95
Figura 29 - Fotomicrografia de imunexpressão de PGP 9.5 em pele da almofada vibrissal de ratos dos grupos experimentais	97

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Dosagem hormonal de tiroxina (T4)	68
Gráfico 2A - Curva do ganho ponderal em 42 dias experimentais	70
Gráfico 2B - Peso médio dos animais no dia 0 (zero)	70
Gráfico 2C - Peso médio dos animais no dia 21	70
Gráfico 2D - Peso médio dos animais no dia 42	70
Gráfico 3 - Comprimento craniocaudal dos lobos da glândula tireoide	72
Gráfico 4 - Largura médio-lateral dos lobos da Glândula Tireoide	73
Gráfico 5 - Peso médio da Glândula Tireoide	74
Gráfico 6 - Correlação entre as concentrações plasmáticas de T4 e o comprimento craniocaudal dos lobos da glândula tireoide após ingestão de PTU	75
Gráfico 7 - Correlação entre as concentrações plasmáticas de T4 e a largura (médio-lateral) dos lobos da glândula tireoide após ingestão de PTU	76
Gráfico 8 - Correlação entre as concentrações plasmáticas de T4 e o peso dos lobos da glândula tireoide após ingestão de PTU	77
Gráfico 9A - Evolução temporal do Limiar nociceptivo de todos os grupos experimentais entre os dias 0 e 42	81
Gráfico 9B - Limiar nociceptivo dos grupos no dia 0 do protocolo experimental	81
Gráfico 9C - Limiar nociceptivo dos grupos no dia 21 do protocolo experimental	81
Gráfico 9D - Limiar nociceptivo dos grupos no dia 42 do protocolo experimental	81
Gráfico 10 - Correlação entre as concentrações plasmáticas de T4 e o limiar nociceptivo	82
Gráfico 11 - Expressão de c-Fos em gânglio trigeminal	83
Gráfico 12 - Expressão de c-Fos em subnúcleo caudal do trato espinhal do nervo trigêmeo	85
Gráfico 13 - Expressão de ATF3 em gânglio trigeminal	87
Gráfico 14 - Expressão de ATF3 em subnúcleo caudal trato espinhal do nervo trigêmeo	89
Gráfico 15 - Expressão de PBM em nervo infraorbital	91

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
µm	Micrometro
µm ²	Micrometro quadrado
2D	Duas dimensões
3D	Três dimensões
ANOVA	Análise de Variância
AP-1	Proteína de ativação 1
ATF3	Fator de Ativação de Transcrição 3
C	Grupo controle “ <i>Naive</i> ”
CEPA	Comissão de Ética em Pesquisa Animal
CI	Intervalo de confiança
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX-2	Ciclooxigenase-2
D1	Desiodase tipo-1
DAPI	<i>4',6-Diamidine-2'-Phenylindole Dihydrochloride</i>
DIT	Diiidotironina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELFA	Ensaio fluorescente ligado a enzima
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
EPM	Erro padrão médio
g	Gramas
GABA	Ácido Gama Amino-Butírico
GH	Hormônio de crescimento
H	Grupo Hipotireoidismo
h	Hora
H.E.	Hematoxilina Eosina
H+NT	Grupo Hipotireoidismo + Neuralgia trigeminal
H+NT-S	Hipotireoidismo + Neuralgia trigeminal <i>Sham</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HTs	Hormônios Tireoidianos

IEGs	Genes de Resposta Imediata
IL-6	Interleucina 6
kg	Quilograma
l	Litro
M	Molar
mg	Miligrama
mg/kg	Miligrama/Kilograma
MIT	Monoiodotironina
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro
ms	Milissegundos
NaCl	Cloreto de sódio
NEMPI	Núcleos de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagens
NeuN	Antígeno nuclear neuronal
Nav1.3	Canais de Na ⁺ voltagem dependentes 1.3
Nav1.7	Canais de Na ⁺ voltagem dependentes
ng	Nanogramas
ng/ml	Nanograma/mililitro
NGF	Fator de crescimento neuronal
NIO	Nervo Infraorbital
NIS.	Transportador transmembrana de Na ⁺ e Iodo
NMDA	N-metil D-Aspartato
NT	Grupo Neuralgia Trigeminal
NT-S	Grupo Neuralgia trigeminal <i>Sham</i>
P.A.	Puro para análise
PAC	Potencial de ação composto
PBS	Solução tamponada de fosfato
PFA	Paraformaldeído
PGP 9.5	Produto de gene da proteína 9.5
pH	Potencial hidrogeniônico
PLP	Proteína proteolipídica
PTU	Propiltiuracil
r	Correlação

r^2	<i>r-square</i> - influência
rpm	Rotações por minuto
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
Sp5C	Zona extereotáxica do subnúcleo caudal do trato espinhal do nervo trigêmeo
T3	Triiodotironina
T3r	Triiodotironina reversa
T4	Tiroxina
TG	Tiroglobulina
TGF- β	Fator de crescimento tumoral
TIFF	<i>Tagged Image File Format</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
TPO	Peroxidase tireoidiana
TR α 1	Receptores de triiodotironina α 1
TR β 1	Receptores de triiodotironina β 1
TR β 2	Receptores de triiodotironina β 2
TSH	Hormônio estimulante da tireoide
TTXr	Tetrodotoxina r
TTXs	Tetrodotoxina s
UFC	Universidade Federal do Ceará

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	Tireoide	21
2.2	Hormônios Tireoidianos (HTs)	23
2.3	Modelo de Indução do Hipotireoidismo	25
2.4	Ação dos Hormônios Tireoidianos no Sistema Nervoso	26
2.5	Dor	27
2.5.1	Dor Neuropática	29
2.5.2	Neuralgia Trigeminal	31
2.6	Via Trigeminal	34
2.7	Modelo de Neuropatia no Nervo infraorbital	37
2.8	Marcadores de injúria a ativação da via nociceptiva	41
2.8.1	Fator de ativação de transcrição 3 (ATF3)	41
2.8.2	c-Fos	42
2.8.3	Proteína Básica de Mielina (PBM)	44
2.8.4	PGP 9.5	45
2.9	Hipotireoidismo e a Neuropatia	46
3	JUSTIFICATIVA	48
4	OBJETIVOS	49
4.1	Objetivo geral	49
4.2	Objetivos específicos	49
5	MATERIAIS E MÉTODOS	50
5.1	Animais	50
5.1.1	Grupos experimentais	50
5.2	Indução e confirmação do Hipotireoidismo	52

5.2.1	Avaliação ponderal dos animais	52
5.2.2	Dosagem de Tiroxina (T4)	53
5.3	Indução da neuralgia trigeminal (NT)	54
5.3.1	Procedimentos Pré-operatórios	54
5.3.2	Procedimento operatório de indução da Neuralgia Trigeminal	55
5.3.3	Procedimento operatório da cirurgia <i>Sham</i>	56
5.3.4	Procedimentos pós-operatórios	57
5.4	Avaliações do limiar nociceptivo - Estimulação mecânica	58
5.5	Extração do subnúcleo caudal do trato espinhal do nervo trigêmeo, gânglio trigeminal, nervo infraorbital, pele da vibrissa e tireoide	60
5.6	Imunofluorescência	64
5.7	Histopatologia das tireoides	65
5.8	Análise da Imagens	65
5.9	Análise Estatística	67
6	RESULTADOS	68
6.1	Implantação e validação do modelo experimental de indução do hipotireoidismo em ratos sob administração de PTU	68
6.1.1	Concentração Sérica de Tiroxina (T4) no 21º dia de experimentação	68
6.1.2	Análise da evolução ponderal	69
6.1.3	Efeito da Indução do Hipotireoidismo sobre a morfometria da Glândula Tireoide	70
6.1.4	Correlação entre as concentrações plasmáticas de T4 e a morfometria e peso da Tireoide	75
6.1.5	Análise histopatológica da glândula tireoide	78
6.2	Avaliação do Limiar nociceptivo no teste de hiperalgisia mecânica na almofada vibrissal esquerda	80
6.3	Correlação entre as concentrações plasmáticas de T4 e o limiar nociceptivo	82
6.4	Imunofluorescência para c-Fos de gânglio trigeminal de ratos submetidos à indução de hipotireoidismo e indução de neuralgia trigeminal	83

6.5	Imunofluorescência para c-Fos do subnúcleo caudal do trato espinhal do nervo trigêmeo de ratos submetidos a indução de hipotireoidismo e indução de neuralgia trigeminal	85
6.6	Imunofluorescência para ATF3 de gânglio trigeminal de ratos submetidos a indução de hipotireoidismo e indução de neuralgia trigeminal	87
6.7	Imunofluorescência para ATF3 do subnúcleo caudal do trato espinhal do nervo trigêmeo de ratos submetidos a indução de hipotireoidismo e indução de neuralgia trigeminal	89
6.8	Imunofluorescência para PBM de nervo infraorbital de ratos submetidos a indução de hipotireoidismo e indução de neuralgia trigeminal	91
6.9	Imunofluorescência para DAPI de nervo infraorbital de ratos submetidos a indução de hipotireoidismo e indução de neuralgia trigeminal	92
6.10	Análise Morfológica da Expressão de PBM no Nervo Infraorbital	94
6.11	Imunofluorescência para PGP 9.5 de pele da almofada vibrissal de ratos submetidos a indução de hipotireoidismo e indução de neuralgia trigeminal	96
7	DISCUSSÃO	98
8	CONCLUSÕES	109
9	REFERÊNCIAS	110
	APÊNDICE A - Teste de normalidade, homogeneidade de variâncias e ANOVA com teste <i>pos-hoc</i> de Games-Howell para Dosagem de T4	130
	APÊNDICE B – Teste de normalidade, homogeneidade de variâncias e ANOVA com teste <i>pos-hoc</i> de Games-Howell para peso dos ratos no dia 0 (zero)	131
	APÊNDICE C – Teste de normalidade, homogeneidade de variâncias e ANOVA com teste <i>pos-hoc</i> de Tukey para peso dos ratos no dia 21	132
	APÊNDICE D – Teste de normalidade, homogeneidade de variâncias e ANOVA com teste <i>pos-hoc</i> de Tukey para peso dos ratos no dia 42	133
	APÊNDICE E – Teste de normalidade, homogeneidade de variâncias e ANOVA com teste <i>pos-hoc</i> de Tukey para comprimento das tireoides	134
	APÊNDICE F – Teste de normalidade, homogeneidade de variâncias e ANOVA com teste <i>pos-hoc</i> de Games-Howell para largura das tireoides	135

APENDICE G – Teste de normalidade, homogeneidade de variâncias e ANOVA com teste <i>pos-hoc</i> de Tukey para o peso das tireoides	136
APENDICE H – Teste de normalidade e correlação de Spearman entre as dosagens de T4 e os comprimentos, larguras e os pesos das tireoides	137
APENDICE I – Teste de normalidade, homogeneidade de variâncias e ANOVA com teste <i>pos-hoc</i> de Games-Howell para o limiar nociceptivo no dia 0	138
APENDICE J – Teste de normalidade, homogeneidade de variâncias e ANOVA com teste <i>pos-hoc</i> de Tukey para o limiar nociceptivo no dia 21	139
APENDICE K – Teste de normalidade, homogeneidade de variâncias e ANOVA com teste <i>pos-hoc</i> de Tukey para o limiar nociceptivo no dia 42	140
APENDICE L – Teste de normalidade e correlação de Spearman entre as dosagens de T4 e o limiar nociceptivo	141
APÊNDICE M - Teste de normalidade, homogeneidade de variâncias e ANOVA com teste <i>pos-hoc</i> de Games-Howell para a expressão de c-Fos em gânglio trigeminal	142
APÊNDICE N - Teste de normalidade, homogeneidade de variâncias e ANOVA com teste <i>pos-hoc</i> de Games-Howell para a expressão de c-Fos em subnúcleo caudal do trato espinhal do trigêmeo	143
APÊNDICE O - Teste de normalidade, homogeneidade de variâncias e ANOVA com teste <i>pos-hoc</i> de Games-Howell para a expressão de ATF3 em gânglio trigeminal	144
APÊNDICE P - Teste de normalidade, homogeneidade de variâncias e ANOVA com teste <i>pos-hoc</i> de Games-Howell para a expressão de ATF3 em subnúcleo caudal do trato espinhal do trigêmeo	145
APÊNDICE Q - Teste de normalidade, homogeneidade de variâncias e ANOVA com teste <i>pos-hoc</i> de Games-Howell para a expressão de PBM em nervo infraorbital	146
APÊNDICE R - Teste de normalidade, homogeneidade de variâncias e ANOVA com teste <i>pos-hoc</i> de Games-Howell para a expressão de DAPI em nervo infraorbital	147
Anexo A - Certificado de aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará (UFC)	148

Anexo B - Artigo publicado em “The FASEB Journal” (JCR - 5.498, Web- Qualis 2016 para Ciências Biológicas II - A1) como uma “Short Communications”, com resultados parciais apresentados no “Experimental Biology 2017”	149
Anexo C – Premiação (2º lugar) na exposição “Arte sob o Microscópio”	150

1 INTRODUÇÃO

Os hormônios tireoidianos estão envolvidos em diversas atividades no organismo. Promovem crescimento, sinalização, migração, proliferação e diferenciação celular, envolvendo o estabelecimento dos fenótipos celulares (GAMBORINO *et al.*, 2001). Estimulam o metabolismo energético de carboidratos, proteínas e lipídios, nos quais estes hormônios participando de uma série de eventos em órgãos e sistemas diferentes, o que os torna importantes fatores mediadores do crescimento e desenvolvimento do organismo (SMITH *et al.*, 2002).

Estudos demonstram que a falta ou diminuição das concentrações plasmáticas dos hormônios tireoidianos leva a diminuição no desenvolvimento da árvore dendrítica, redução do número de sinapses axodendríticas, diminuição do volume neuronal e redução no número de células da glia, além de provocar defeitos na mielinização (CLOS; LEGRAND, 1970; XIAO; NIKODEM, 1998; PATEL *et al.*, 2011).

Mwangi (1998) relatou que o desenvolvimento do sistema nervoso central está diretamente relacionado com concentrações normais de hormônios tireoidianos. Sousa (2006) demonstrou que o hipotireoidismo deprime a excitabilidade neuronal quando associado a lesão crônica periférica por ligadura do nervo isquiático em ratos. Naraynan *et al.* (1986) demonstraram que os hormônios tireoidianos exercem papel crucial no desenvolvimento do trato espinhal do nervo trigêmeo.

A neuralgia trigeminal (NT) é considerada a mais séria e mais comum dentre as neuralgias de cabeça e pescoço. É uma doença crônica debilitante, caracterizada pela presença de uma dor paroxística e lancinante, semelhante a um choque elétrico, limitada a um ou mais ramos do nervo trigêmeo, em que a duração da dor pode chegar aos dois minutos, embora o ataque total possa consistir em numerosos espasmos de curta duração (MACIANSKYTE *et al.* 2011, FPA, 2016).

A NT tem maior incidência sobre o gênero feminino e acima da sexta década de vida. Na maioria dos casos, a crise de dor é abrupta e geralmente desencadeada por estímulos não dolorosos em regiões da face (alodinia), na manipulação ou toque em regiões como ângulo da boca, a bochecha, a asa do nariz e região lateral da fronte (MACIANSKYTE *et al.* 2011). A dor na NT prejudica hábitos diários, interrompendo-os, levando a uma diminuição na qualidade de vida, o que pode levar a apresentação de níveis de ansiedade e depressão (MACIANSKYTE *et al.*, 2011).

Estudos relatam que injúria periférica em um nervo leva a alodinia ou hiperalgesia em humanos e animais (GAUTRON *et al*, 1990, GUILBAUD *et al*, 1990, GARRISON *et al*, 1991, BENNETT, 1993, BENNETT, 1994, WOOLF; MAX, 2001). A injúria que segue a lesão de um nervo é muitas vezes intratável e o conhecimento dos mecanismos de desenvolvimento da doença ainda é pouco compreendido (SOUNVORAVONG *et al.*, 2004; PATEL *et al.*, 2011). O tratamento farmacológico tem limitada eficácia e produz frequentemente efeitos adversos (WALLACE, 2007).

Animais com polineuropatia associada ao hipotireoidismo demonstraram moderada redução da velocidade de condução motora em estudos eletrofisiológicos (SOUSA, 2006) e ainda, estudos morfológicos revelaram uma diminuição das fibras de mielina de todos os diâmetros, mais particularmente aquelas de largo diâmetro, indicando uma degeneração axonal (POLLARD *et al*, 1982). Quattrini *et al* (1993) observaram que a amplitude do potencial de ação motor do nervo caudal de ratos está reduzido em animais submetidos ao hipotireoidismo experimental, efeito este revertido quando utilizada a terapia de reposição dos hormônios tireoidianos.

Modelos desenvolvidos em animais, tais como o modelo de ligadura parcial do nervo isquiático (SELTZER *et al*, 1990) e de lesão por constrição crônica do nervo infraorbital ou de transecção completa dos nervos infraorbitais, alveolar inferior ou lingual (XU *et al*, 2008) vem sendo utilizados para a compreensão dos mecanismos ativos na dor neuropática. Nosso grupo vem desenvolvendo pesquisa em ratos com hipotireoidismo, os quais apresentam maior limiar nociceptivo quando estimulados na região infraorbital através do teste de Von Frey eletrônico, área essa inervada pelo ramo maxilar do nervo trigêmeo. Tal fato nos estimulou a investigar as alterações nociceptivas e morfológicas que possam estar relacionadas a essa resposta, bem como avaliar o hipotireoidismo no desenvolvimento da neuralgia trigeminal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tireoide

A glândula tireoide é um órgão ímpar, localizado na região cervical anterior no homem e na região cervical ventral nos quadrupedes (KÖNIG; LIEBICH, 2016), sobre a parede anterior e lateral da traqueia e da cartilagem tireóidea. É uma das maiores glândulas endócrinas do corpo e possui dois lobos laterais unidos por um istmo medialmente, que no rato (Figura 1A) é bem menos volumoso que no homem (Figura 1B) (KÖNIG; LIEBICH, 2016). A tireoide possui inervação simpática vasomotora, e não secretomotora, e é irrigada pelas artérias tireóideas inferior e superior (KRATZSCH; PULZER, 2008; NETTER, 2011; MIHAI, 2014).

Figura 1 - Ilustração da tireoide do rato e do homem

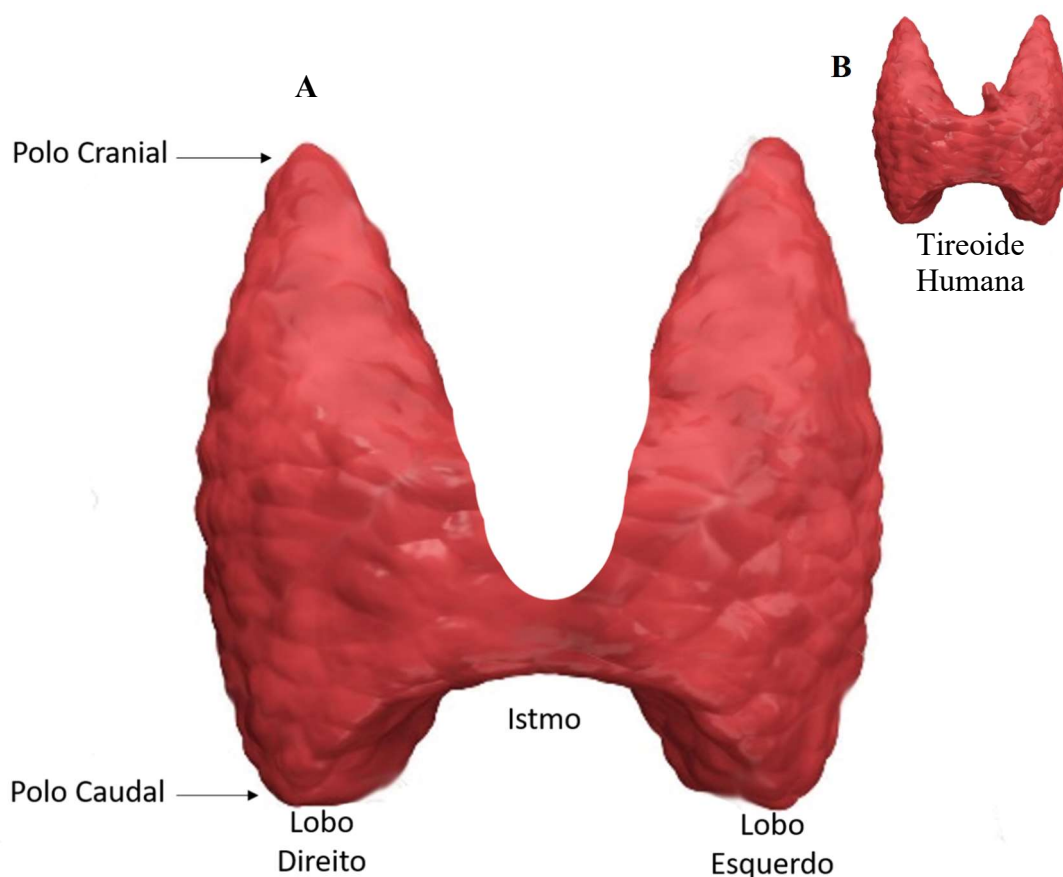


Figura A, ilustra a anatomia topográfica da glândula tireoide do rato, que possui um istmo bastante delgado quando comparado proporcionalmente a mesma glândula no homem ilustrado na figura B.

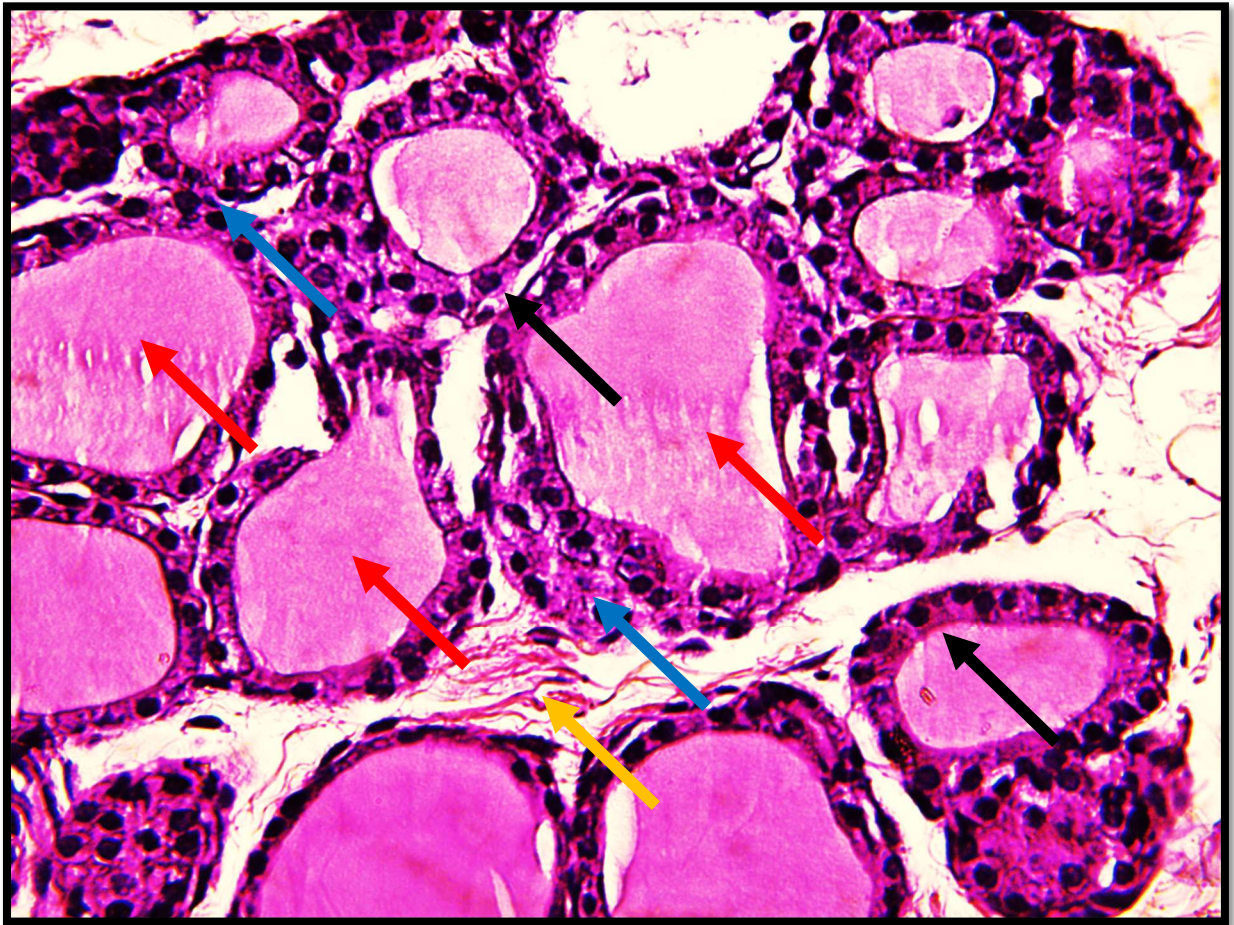
Fonte: elaborada pelo autor.

A função primária da tireoide é a síntese dos hormônios triiodotironina (T3) e tiroxina (T4), que são formados pela incorporação do iodo às moléculas do aminoácido tirosina, e são armazenados no coloide intrafolicular. O T4 é a forma mais abundante tanto no coloide como na forma livre na circulação (cerca de 93%), entretanto a forma mais ativa é o T3, que é convertido a partir da desiodação do T4 dentro das células alvo, no fígado e nos rins (LOEVNER *et al*, 2008, GUYTON, 2011).

O parênquima da glândula tireoide é composto de folículos de morfologia globular, também chamados de ácinos. Cada folículo é composto por camada única de células epiteliais do tipo cuboide, que envolvem um lúmen ocupado por uma substância coloide produzida por suas células foliculares, composto basicamente por tireoglobulina (Figura 2) (SILVERTHORN, 2017). O espaço interfolicular reserva uma pequena quantidade de tecido conjuntivo, onde se encontram capilares e células parafoliculares ou células C, produtoras de calcitonina (Figura 2).

As células foliculares da tireoide possuem retículo endoplasmático rugoso e o complexo de Golgi, o que favorece bastante a síntese de proteínas específicas da tireoide, como a tiroglobulina (TG) e a peroxidase tireoidiana (TPO). A TG é secretada para o lúmen dos folículos tireoidianos formando o coloide que os preenchem (SILVERTHORN, 2017). No polo basal das células foliculares, estão presentes os receptores para o hormônio estimulante da tireoide (TSH) e outros fatores reguladores (KRATZSCH; PULZER, 2008; SARKAR; SINGH, 2016).

Figura 2 - Corte histológico da glândula tireoide de rato



Fotomicrografia mostrando corte histológico corado em H.E. em magnitude 400x de glândula tireoide de rato saudável, onde podemos visualizar folículos tireoidianos contendo colóide de tiroglobulina (setas vermelhas), células foliculares cubóides (setas pretas), tecido conjuntivo (seta amarela) e célula parafolicular (setas azuis).

Fonte: Arquivo pessoal.

2.2 Hormônios Tireoidianos (HTs)

Os hormônios tireoidianos (HTs) são produzidos pelas células foliculares e permanecem ligados à tiroglobulina, armazenados no colóide, e liberados como iodotironinas hormonalmente ativas, sendo elas: a tiroxina ou tetra-iodotironina (T4) e a triiodotironina (T3). Tais substâncias são liberadas mediante controle do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide, através do modelo *feedback* negativo com o TSH (SARKAR; SINGH, 2016).

Tais hormônios possuem efeitos a longo prazo no metabolismo, além de serem essenciais para o crescimento e desenvolvimentos nos mamíferos. Sua carência pode levar a atrasos no crescimento e sua ausência também pode acarretar uma redução do metabolismo

basal em 40% a 50% do normal e o excesso pode aumentar o metabolismo em 60% a 100% (GUYTON, 2011; SILVERTHORN, 2017).

O efeito geral dos HTs consiste em ativar a transcrição de um grande número de genes. Portanto, há influência dos mesmos em praticamente todas as células do organismo, na síntese de enzimas e proteínas estruturais, resultando no aumento da atividade funcional metabólica (GUYTON, 2011; SILVERTHORN, 2017). Os HTs têm diversos papéis fisiológicos, pois modulam as vias metabólicas através da regulação do consumo de oxigênio e intervenção no metabolismo de proteínas, lipídios, carboidratos e vitaminas (SMITH *et al*, 2002).

Adicionalmente, acredita-se que os HTs promovam o crescimento através da estimulação do hormônio de crescimento (GH) a nível gênico e sinergicamente estimulando a síntese do receptor tecidual de GH a nível de placa de epifisária (VALSESIA *et al*, 2015; BHUMIKA; DARRAS, 2014; SILVERTHORN, 2017). A deficiência de T3 e T4 é a causa principal de alterações no desenvolvimento ântero-posterior do crânio e da face (GAMBORINO *et al*, 2001).

A produção dos HTs está envolvida com o transporte ativo de íons de iodo para o interior dos folículos tireoidianos por meio de um transportador transmembrana específico (NIS) (MIHAI, 2014). A iodação da tirosina produz como resultado a monoiodotironina (MIT) e a diiodotironina (DIT) que são posteriormente ligadas para formar T4 e T3, que são as formas biologicamente ativas dos hormônios tireoidianos no metabolismo (WAJNER *et al*, 2008; BHUMIKA; DARRAS, 2014).

O TSH é regulador primário da liberação e secreção dos hormônios tireoidianos, e tem um importante papel no crescimento e desenvolvimento da glândula tireoide (BHUMIKA; DARRAS, 2014). O TSH estimula a captação de iodo, a síntese de peroxidase tireoidiana (TPO) e tireoglobulina, a produção intracelular de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e parece influenciar também na reabsorção do coloide (QUATRINNI *et al*, 1993; YEN, 2001).

A transformação metabólica dos HTs nos tecidos periféricos envolve uma série de reações enzimáticas, dentre as quais a desiodação é o mecanismo para a ativação ou desativação hormonal, no caso, a conversão do T4 em T3 e o inverso (WEINBERGER *et al*, 1986; WAJNER *et al*, 2008).

Ao atingir a célula alvo, os HTs são transportados para o interior da célula por transportadores transmembrana (VISSER *et al*, 2011; MUZZIO *et al*, 2014). A forma de ação dos HTs nas células alvo ocorre a nível gênico, por meio da ativação de receptores ligados à

molécula de DNA, que resulta na expressão de genes específicos, modificando a expressão das proteínas nas células alvo (OPPENHEIMER *et al*, 1987).

É de fundamental importância a manutenção de concentrações adequadas de HTs para a resposta inflamatória, pois estão intrinsecamente ligados a relação entre os sistemas imune e endócrino (HODKINSON, 2009). Os HTs estão envolvidos na função imune, assim como na imunossupressão. Tais atividades dos HTs são moduladas através de receptores nucleares (TRs) os quais se ligam para ativar a transcrição de genes-alvo (YEN, 2001; HIROI, 2006). Assim, o sistema imune tanto regula, como é regulado, pelos HTs. Alterações nos níveis de HTs livres reduzem a capacidade do organismo na reação ao estresse, uma vez que participam das mais variadas funções metabólicas (KLEIN, 2006).

Na fase inicial da resposta inflamatória, as concentrações plasmáticas de T3 estão diminuídos e de T3 inativos (T3r) estão aumentados. As concentrações plasmáticas séricas de T4 diminuem entre 24 a 48 horas, enquanto as concentrações plasmáticas de TSH permanecem inalteradas (PEETERS *et al*, 2003). A produção local de citocinas exerce um importante *feedback* negativo na regulação da liberação do TSH na hipófise. Citocinas pró-inflamatórias produzidas periféricamente agem diretamente na tirotrófina hipofisária para diminuir a liberação do TSH, em especial a IL-6, que apresenta potente supressão do TSH no plasma (PEETERS *et al*, 2003).

2.3 Modelo de Indução do Hipotireoidismo

A literatura cita diferentes modelos experimentais de indução do hipotireoidismo, tais como a tireoidectomia (GROSSIE, 1965), a administração de carbimazol e methimazol (SIMSEK, 1997) e o propiltiuracil (PTU) a 0,05% em água de beber, proposto por Blake e Henning em 1985, consistindo no modelo mais difundido e usado (RIAL, 1987; YU, 2014; SARKAR, 2016).

Os tiolurelenos, como o carbimazol, methilmazol e propiltiouracil, são utilizados no tratamento do hipertireoidismo, inibindo a síntese dos HTs, através do bloqueio do transportador de Na⁺ e Iodo (NIS), que leva íons de Iodo para o acoplamento com o radical tirosina nas células foliculares da tireoide, através de oxidação, catalisadas pela tireoperoxidase. O PTU age, paralelamente, inibindo a desiodação do T4 em T3 nos tecidos periféricos, o que torna o PTU uma ótima opção no tratamento do hipertireoidismo grave (MAIA *et al*, 2013).

A desiodase tipo-1 (D1) é inibida pelo PTU, mas não pelo methilmazol ou pelo carbimazol, o que potencializa seu efeito, pois a deiodação do T4 nos tecidos periféricos é

responsável por cerca de 80% de todo T3 circulante e mantém os níveis constantes de T3 intracelular no sistema nervoso central (GARNER; SHOBACK, 2011; BIANCO; KIM, 2006; MAIA *et al*, 2013).

De fato, cerca de 40% do T4 produzido diariamente são transformados em T3. Outros 40% são transformados em rT3, metabólito do T4 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 T4 circulante (KRONENBURG *et al*, 2010; MAIA *et al*, 2013)

2.4 Ação dos Hormônios Tireoidianos no Sistema Nervoso

As concentrações plasmáticas normais de HTs estão intrinsecamente relacionadas com o desenvolvimento e função do sistema nervoso central (SNC) (MWANGI, 1998; BERNAL, 2002), as quais afetam dramaticamente a maturação de populações específicas de neurônios, que desempenham um papel primordial no desenvolvimento, na formação embrionária, expressão gênica, e têm resultados no desenvolvimento do aprendizado, memória e habilidades motoras (CHAN, 2000; SCHWARTZ *et al*, 1997).

Os HTs são responsáveis por estimular a proliferação e a diferenciação celular em fases iniciais do desenvolvimento cerebral nos mamíferos. A ausência ou deficiência nas concentrações dos HTs no período inicial do desenvolvimento neural, que é uma fase crítica, até seis meses de idade em humanos, leva a danos ao sistema nervoso de caráter irreversível (DUSSAULT; RUEL, 1987; OPPENHEIMER; SCHWARTZ, 1997, ANDERSON, 2001). Estudos demonstram falhas na mielinização dos axônios, redução do número de sinapses, deficiência na migração neuronal e redução da síntese de neurotransmissores, que podem comprometer a morfologia cerebral (DUSSAULT; RUEL, 1987; CHAPA *et al*, 1995, OPPENHEIMER; SCHWARTZ, 1997, ANDERSON, 2001).

No sistema nervoso central e periférico, os HTs influenciam, sobretudo, na neurotransmissão, aumentando a síntese e sensibilidade a catecolaminas (ENGSTRÖM *et al*, 1974). Distúrbios cognitivos, em indivíduos hipotireoideos, são associados a redução da excitabilidade neuronal no SNC e SNP de indivíduos não tratados (POLLARD *et al*, 1982).

O T3 estimula a formação, reorganização, o transporte, a estabilidade e a plasticidade axonal, sendo também responsáveis pela regulação da síntese de proteínas estruturais relacionadas com o crescimento, transporte axonal e regeneração de nervos

periféricos, como a tubulina e a vimentina (HOFFMAN; CLEVELAND, 1988; SCHENKER *et al*, 2002).

Os HTs também são responsáveis pela modulação da produção dos neurofilamentos, principais estruturas do citoesqueleto neuronal, onde o diâmetro dos axônios está diretamente relacionado com tal produção. Durante o crescimento do axônio, os neurofilamentos são dinamicamente incorporados ao cone de crescimento, estabilizando seu avanço (CHAN *et al*, 2000).

No hipotireoidismo neonatal em ratos, há redução do número de fibras mielinizadas e diminuição do diâmetro do axônio no nervo isquiático, afetando o crescimento das fibras mielinizadas, além da redução do número de células de Schwann, fundamentais para a maturação do sistema nervoso central e desenvolvimento de nervos periféricos (CLOS; LEGRAND, 1970; SCHENKER *et al*, 2002). Alguns estudos têm mostrado uma diminuição na liberação de glutamato e na expressão dos receptores NMDA nos neurônios de ratos hipotireoideos induzidos (SHUAIB *et al.*, 1994; LEE *et al.*, 2003).

Os mecanismos moleculares, os quais os HTs levam a defeitos no desenvolvimento do cérebro ainda são pouco elucidados, e acredita-se que em sua grande maioria sejam através da ativação de receptores nucleares, modulando a expressão de genes específicos que transcrevem proteínas essenciais ao desenvolvimento do sistema nervoso (ANDERSON, 2001; BERNAL *et al*, 2002).

2.5 Dor

A dor é conceituada pela *International Society for Study of Pain* (IASP) como uma a uma experiência emocional e sensorial subjetiva e desagradável, associada a um dano real ou potencial dano tecidual (IASP, 2012). É um mecanismo de sinalização fisiológica, que leva a atenção consciente ou inconsciente do indivíduo para a o local da lesão através de uma resposta sensorial e motora de proteção, o que pode ser considerada uma grande vantagem evolutiva (AGUGGIA, 2003, CORTELLI; PIERANGELI, 2003).

Assim, a dor funciona como uma advertência ao sistema nervoso de algum comprometimento biológico, e normalmente é acompanhada da nocicepção, que se refere a sinais que estimulam o sistema nervoso central através da ativação de receptores sensoriais periféricos, os nociceptores (FEIN, 2012). A incapacidade para sentir dor ou analgesia pode leva a danos muito graves a saúde (AXELROD; HILZ 2003).

A dor pode ser classificada em dor nociceptiva (ativação de nociceptores periféricos e está relacionada a estímulos potencialmente prejudiciais ao indivíduo), neuropática (iniciada ou causada por lesões primárias, ou por disfunções no sistema nervoso central ou no sistema nervoso periférico) e dor psicogênica (relacionada a fatores psicológicos, com ausência de um dano físico associado) (MACFARLANE *et al*, 1997, CALIXTO *et al*, 2000, IASP, 2012).

A dor geralmente é desencadeada por excesso de estímulos das vias nociceptivas ou por deficiência na funcionalidade do sistema supressor de dor, tal como ocorre em casos de dor por desaferentação (dor neuropática). Em condições fisiológicas, a informação sensorial é captada pelas estruturas do Sistema Nervoso Periférico (SNP) e transmitida para as unidades do Sistema Nervoso Central (SNC), onde é decodificada e interpretada, e mecanismos modulatórios sensibilizam ou suprimem a nocicepção em todas as estações em que ela é processada (TEIXEIRA, 2001).

A via clássica aferente nociceptiva consiste em uma cadeia de três neurônios que transmitem informações da periferia para o corno dorsal da medula ou núcleo do tronco encefálico, e deste para o tálamo antes de terminar no córtex somatossensorial, onde é processado. Entretanto, a experiência da dor é multidimensional. O aspecto sensorial-discriminativo da dor envolve a intensidade, qualidade e localização da dor, enquanto que os fatores cognitivos e afetivos/emocionais, constituem variáveis psicológicas mais subjetivas, como atenção, ansiedade, medo, expectativa e antecipação (AHMAD; AZIZ, 2014).

As fibras nervosas que transmitem a mensagem nociceptiva ao SNC são fibras mielinizadas de pequeno calibre (fibras A δ) e fibras não-mielinizadas (fibras C), capazes de transmitir o estímulo nociceptivo em diferentes velocidades (FEIN, 2012, BRADY *et al*, 2011).

Os receptores envolvidos na detecção da dor são chamados de nociceptores. Esses receptores são terminações nervosas livres de alto limiar, capazes de traduzir estímulos agressivos de natureza química, térmica ou mecânica em estímulos elétricos. Tais receptores podem ser sensibilizados por substância algogênicas, tais como bradicinina, acetilcolina, prostaglandinas, histamina, serotonina, leucotrieno, tromboxano, fator de ativação plaquetário, radicais ácidos e íons potássio, liberadas nos tecidos por células de defesa, vasos sanguíneos e células lesadas (TEIXEIRA, 2001).

O potencial de ação gerado por estímulos nociceptivos levam a despolarização da membrana neuronal por tempo prolongado, havendo abertura de canais de sódio e cálcio, e redução do influxo de potássio e cloro para o citoplasma. Os canais de sódio são classificados em dois grupos: sensíveis à tetrodotoxina (TTXs), presentes nas fibras A δ , no SNC e gânglios da raiz dorsal e trigeminal; e os resistentes à tetrodotoxina (TTXr), presentes nas fibras C dos

mesmos gânglios (LAI; GOLD; KIM, 2002). Além, de influência sobre os canais iônicos, o potencial de ação também ativa uma cascata de receptores e segundos mensageiros que levam a sensibilização sináptica (potencialização de sinal, redução de limiar nociceptivo) e expressão de genes de formação imediata c-Fos, c-Jun e COX-2 e genes de expressão tardia na medula espinhal, relacionados a resposta a possível agressão (HUNT, 1987).

A nociceção também é modulada por uma via descendente, que na grande maioria das vezes sinaliza analgesia, sendo ativada no estresse, situações de medo e exercício intenso (FIELDS, 2000).

Existem condições não fisiológicas, em que a dor, mesmo na ausência de agressão tecidual ou estímulos nociceptivos, pode se instalar como uma condição patológica, das quais as dores neuropáticas, as neurogênicas e psicogênicas podem ser enquadradas. A dor neuropática manifesta-se como dores crônicas graves e persistentes, levando seus portadores ao sofrimento e redução da qualidade de vida (FRIED *et al*, 2001).

2.5.1 Dor Neuropática

A dor neuropática normalmente está relacionada a uma lesão de nervos periféricos ou doença no sistema somestésico. A etiologia é variada, e os mecanismos biológicos ainda não estão esclarecidos. Teorias infamatórias e imunes podem estar envolvidas na patogênese, o que dificulta a abordagem ao paciente e a escolha de um tratamento apropriado, tornando-se um desafio para médicos e pesquisadores (GUIMARÃES; SILVEIRA, 2008, KRAYCHETE *et al*, 2008). Tem como característica a presença de dor espontânea e é comumente relatada por pacientes com uma dor em “choque elétrico”, “queimação”, “fina” ou “formigamento” (TREEDE *et al*, 2008).

A manifestação de hiperalgesia secundária em quadros neuropáticos é comum, e é originada do comprometimento de tecidos nervosos e tecidos adjacentes a lesão, e pode estar associada a sensibilização central (KRAYCHETE *et al*, 2008). A sensibilização central por sua vez, aumenta a transmissão na fenda sináptica por excessiva liberação de neurotransmissores excitatórios (KRAYCHETE *et al*, 2008). A dor de origem central pode surgir decorrente de dano no trato espino-talâmico-cortical, que pode levar a perda da inibição descendente da dor, contribuindo para a instalação da dor neuropática de características centrais através de mecanismo ainda não compreendidos (SKHESTATSKY, 2008).

A etiologia da dor neuropática também pode estar envolvida com fatores constitucionais e genéticos. As propriedades morfofuncionais dos nociceptores e das estruturas

centrais necessitam ser mantidas íntegras para que a transmissão nociceptiva seja conduzida adequadamente. Modificações morfofuncionais das terminações nervosas, ganglionares, ou em qualquer ponto das vias de condução ou de interpretação central da informação podem levar a manifestação de dor espontânea ou alodinia (TEIXEIRA, 2001).

A sensibilização dos receptores, focos ectópicos de potencial de ação nos nociceptores e vias centrais e as alterações funcionais das estruturas de processamento central da aferência sensitiva são mecanismos importantes responsáveis pela instalação da dor por desaferentação, a dor neuropática (TEIXEIRA, 2001).

No mecanismo de lesão no SNP acontecem eventos fisiológicos que levam ao processo de regeneração, através de modificações estruturais e funcionais, alterando a condutibilidade nervosa, levando a sensibilização central e periférica. Durante tais eventos, ocorre a ativação de macrófagos pelas células de Schwann que sintetizam mediadores inflamatórios, levando a disparos anormais de potenciais de ação (DICKENSON et al 2002; SCHWARTZMAN *et al*, 2001; NICHOLSON, 2004).

A desmielinização de nervos periféricos, do tipo walleriana (degeneração axonal pós-solução de continuidade) (Figura 3) são fatores que podem levar a dor neuropática, bem como esclerose do SNP e SNC. Processos de remielinização, divisão das células de Schwann, podem ocorrer de forma errônea levando a geração de alodinia, excitação cruzada e disparos espontâneos (MURRAY, 2005; KRAYCHETE *et al*, 2008).

Uma das dores neuropáticas mais comumente observadas na região de cabeça e pescoço é a neuralgia do trigêmeo, uma doença altamente debilitante, com elevada incidência e prevalência e cujos mecanismos ainda não estão completamente esclarecidos (ESKANDAR, BARKER e RABINOV, 2006).

Figura 3 - Representação da degeneração walleriana

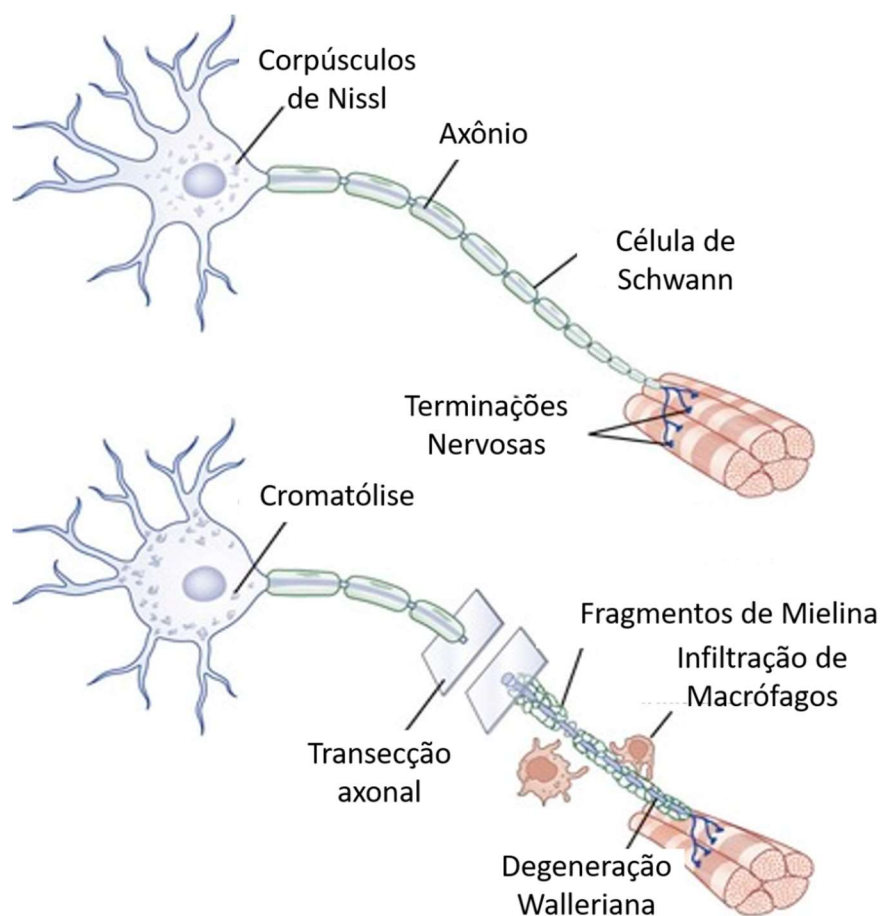


Ilustração demonstrando a degeneração axonal do tipo walleriana por solução de continuidade.
Fonte: MURRAY, 2005

2.5.2 Neuralgia Trigeminal (NT)

A NT é descrita como uma síndrome dolorosa facial neuropática, sendo a forma mais comum de dor na face em pessoas na terceira idade, acometendo mais mulheres do que homens em uma proporção de 5:1 (PRASAD; GALETTA, 2009). Diversos estudos epidemiológicos têm demonstrado que a incidência anual é de cerca de 4 a 5 casos a cada 100.000 indivíduos (KATUSIC *et al*, 1990, PRASAD; GALETTA, 2009).

O primeiro caso comprovado de NT descrito na literatura, foi o do bispo Inglês chamado Button, falecido em 1274. Há relatos que o bispo se queixava de dor dentária, e mesmo após inúmeras avaliações, faleceu sem cura. Chama-se atenção neste caso, o fato de poder ser encontrado em sua lápide, uma figura de um homem com a face expressando extrema agonia

apontando um dente. Um exame realizado posteriormente revelou ausência de anormalidades dentárias (TEIXEIRA, 1984).

Muitos pacientes têm suas atividades diárias comprometidas, impossibilitados de exercerem cuidados básicos de higiene ou de convívio social, o que compromete intensamente sua qualidade de vida e os torna deprimidos e isolados, o que mostra que a neuralgia trigeminal apresenta características incapacitantes, refletindo na capacidade produtiva do indivíduo como trabalhador (KOOPMAN *et al*, 2009; SIQUEIRA *et al*, 2010).

A NT é uma condição de dor crônica caracterizada por disparos bruscos (paroxismos) de dor facial nas áreas de atuação do V par craniano (Figura 4), o nervo trigêmeo. Tais episódios de dor podem ser desencadeados por um leve toque em torno da boca ou rosto ou mesmo por falar ou comer e são acompanhados de hiperalgesia e alodinia (SCHESTATSKY, 2008). Os ramos do nervo trigêmeo mais afetados na neuralgia trigeminal são os ramos maxilar e mandibular (OKESON, 2005).

Figura 4 – Representação da área de atuação do nervo trigêmeo e sua origem

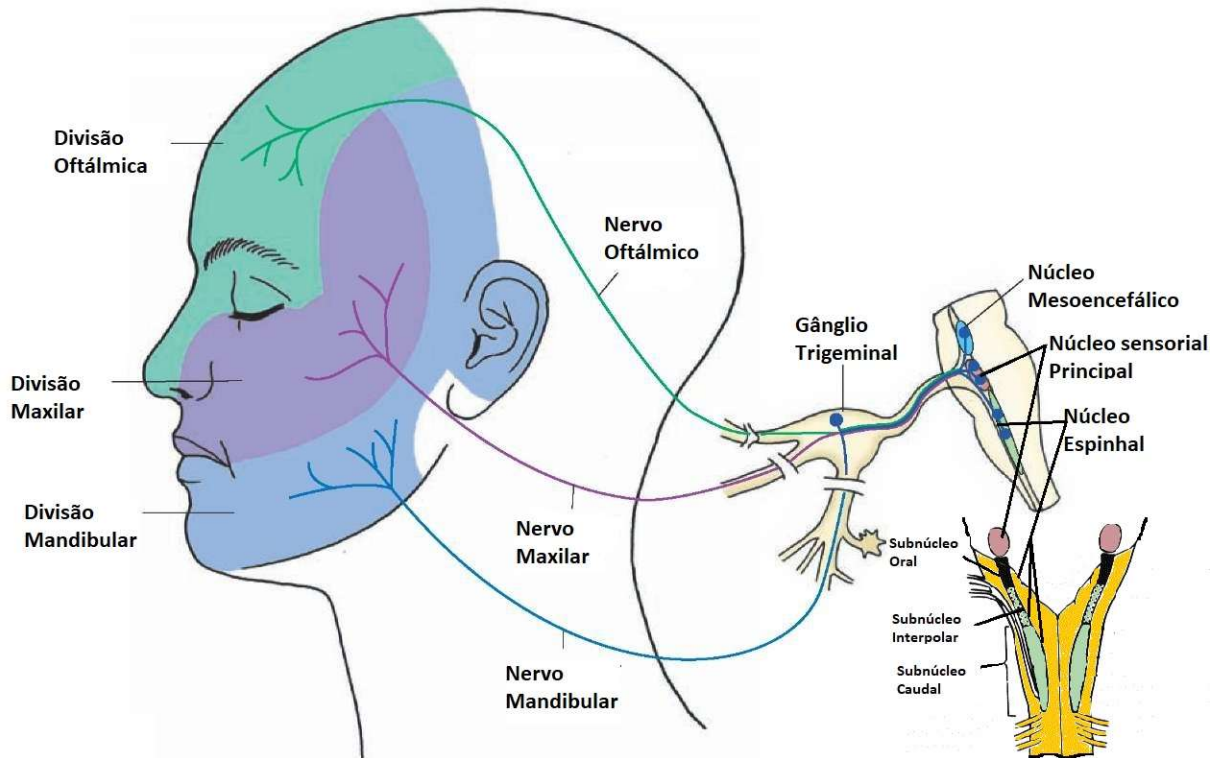


Ilustração da área de atuação do nervo trigêmeo de acordo com seus ramos. Na mesma figura sua origem no troco encefálico.

Fonte: Adaptada de Silverthorn (2017).

As dores se apresentam de forma severa, repentina e geralmente são unilaterais. Podem ser causadas por uma simples irritação em algum ramo trigeminal ou estimulação do nervo trigêmeo por compressão de estruturas circunvizinhas ou por vasos sanguíneos próximos a raiz trigeminal (66% dos casos). Em alguns casos é associado a esclerose múltipla ou tumor (SCHESTATSKY, 2008, FEIN, 2012). Eventualmente, a dor irradia-se para fora da área de distribuição do nervo trigêmeo (FRONN *et al*, 1990), e desencadeia fenômenos neurovegetativos como salivação, lacrimejamento, ruborização da face e rinorréia (FRONN *et al*, 1990; DEVOR *et al.*, 2002).

Acredita-se também que a etiologia da NT pode estar relacionada a lesões em ramos do nervo trigêmeo por desmielinização de suas fibras nervosas que levam a despolarizações anormais e geração de impulsos ectópicos. A injúria direta do nervo e seus ramos, angiomas e até acidentes vasculares cerebrais também podem ser considerados causas etiológicas da NT (DE LEEUW, 2008, VAN KLEEF *et al*, 2009).

Apesar das controvérsias, nas neuropatias trigeminais, os testes sensitivos demonstraram envolvimento de fibras amielínicas, com diminuição do limiar aos estímulos térmicos e sensibilização de nociceptores periféricos do tipo C (LANG *et al*, 2005; RENTON

et al., 2003). Há evidências de um possível envolvimento de canais de Na⁺ voltagem-dependentes na fisiopatologia da neuropatia trigeminal (bem como em outros processos de dor neuropática), principalmente os subtipos Nav1.3 e Nav1.7, sugerindo que a neuropatia trigeminal possa ser uma canalopatia (SIQUEIRA *et al.*, 2009).

2.6 Via trigeminal

O nervo trigêmeo (V par craniano) é um nervo misto com fibras aferentes (sensitivas) e eferentes (motoras), o mais calibroso entre os 12 pares cranianos (Figuras 6 e 8). Este nervo é responsável pela sensibilidade geral (tato, pressão, dor e temperatura) da cabeça, innervando a pele e as túnicas mucosas, onde seu componente sensitivo é consideravelmente maior. Possui três ramos principais: o oftálmico (V₁), o maxilar (V₂) (do qual o nervo infraorbital é ramo) e o mandibular (V₃) (Figura 4), onde os ramos oftálmico e maxilar são sensitivos e o mandibular possui um componente motor que atua na mastigação (FRIED *et al.*, 2001, MACHADO, 2013).

Semelhantemente aos sistemas somatosensoriais espinhais, os corpos celulares das fibras sensoriais (pseudounipolares) do nervo trigêmeo, são encontrados em um gânglio próprio sensorial periférico, o gânglio trigeminal. Os corpos celulares das fibras motoras presentes no nervo trigêmeo, se localizam no núcleo motor e mesencefálico no troco encefálico (Figura 4) (MACHADO, 2013; MARTIN, 2013).

Posterior ao gânglio trigeminal, junto à ponte, localizam-se duas raízes trigeminais: uma motora e outra sensitiva, que penetram separadamente no tronco encefálico, onde a raiz sensitiva possui em torno de 144.000 fibras, dificilmente paralelas pois formam numerosas anastomoses entre as duas raízes. Tais anastomoses constituem o plexo triangular. A raiz principal do nervo trigêmeo penetra na ponte, e suas fibras alcançam os núcleos trigeminais do trato espinhal no troco encefálico (Figura 5) (JANNETA, 1963; MACHADO, 2013; MARTIN, 2013).

Figura 5 – Representação do complexo nuclear trigeminal

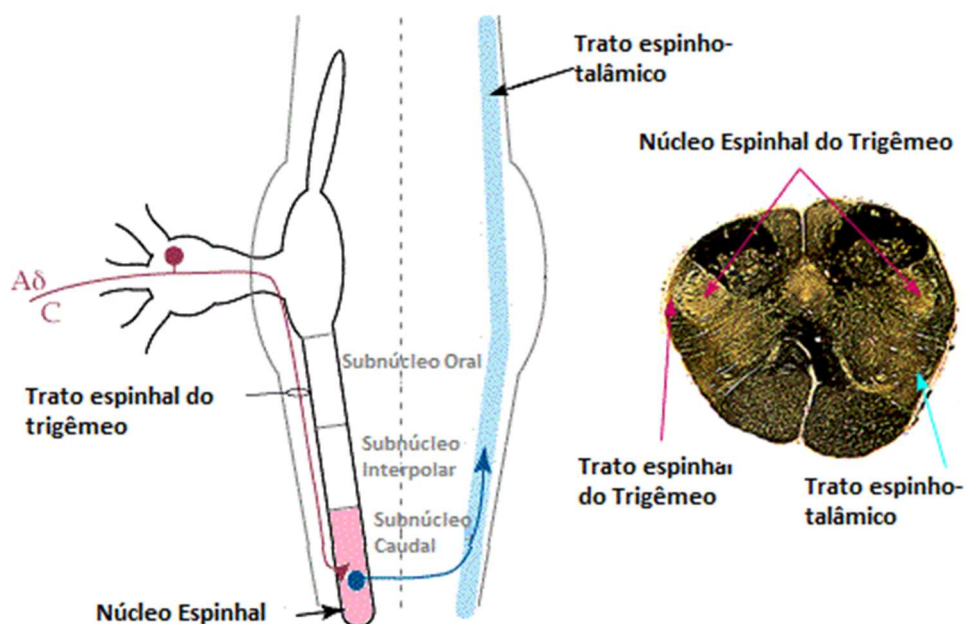


Ilustração dos componentes que formam o complexo nuclear trigeminal no troco encefálico.
Fonte: Adaptada pelo autor a partir de Martin (2013).

O complexo nuclear trigeminal espinhal (Figura 5) envolvido no processamento da informação exteroceptiva da face e da cavidade oral é subdividido, em núcleo mesencefálico e principal, situados rostralmente, e núcleo do trato espinhal do nervo trigêmeo, situado caudalmente (Figura 5 e 7). Esse último foi subdividido com base na sua posição celular, em subnúcleos caudal, interpolar e oral (Figura 5) (ALVES-NETO, *et al*, 2009). Admite-se que todo o complexo nuclear trigeminal espinhal e o núcleo trigeminal principal estejam envolvidos na nocicepção facial, havendo unidades nociceptivas no subnúcleo caudal e nas regiões superficiais e profundas do subnúcleo interpolar e nos núcleos oral e principal (MERSKEY, 1979; ALVES-NETO, *et al*, 2009).

A sensibilidade nociceptiva da face é principalmente processada no subnúcleo caudal (área Sp5C) do complexo trigeminal, as fibras projetam no complexo ventrobasal contralateral do tálamo e nos núcleos intralaminares, e as fibras do núcleo sensitivo principal no complexo ventrobasal homo e contralateral do tálamo. Os neurônios do subnúcleo caudal têm importância fundamental no processamento da dor facial (TEIXEIRA, 2001, ALVES-NETO, *et al*, 2009).

Figura 6 - Ilustração do Encéfalo e tronco encefálico do rato e suas principais estruturas macroscópicas

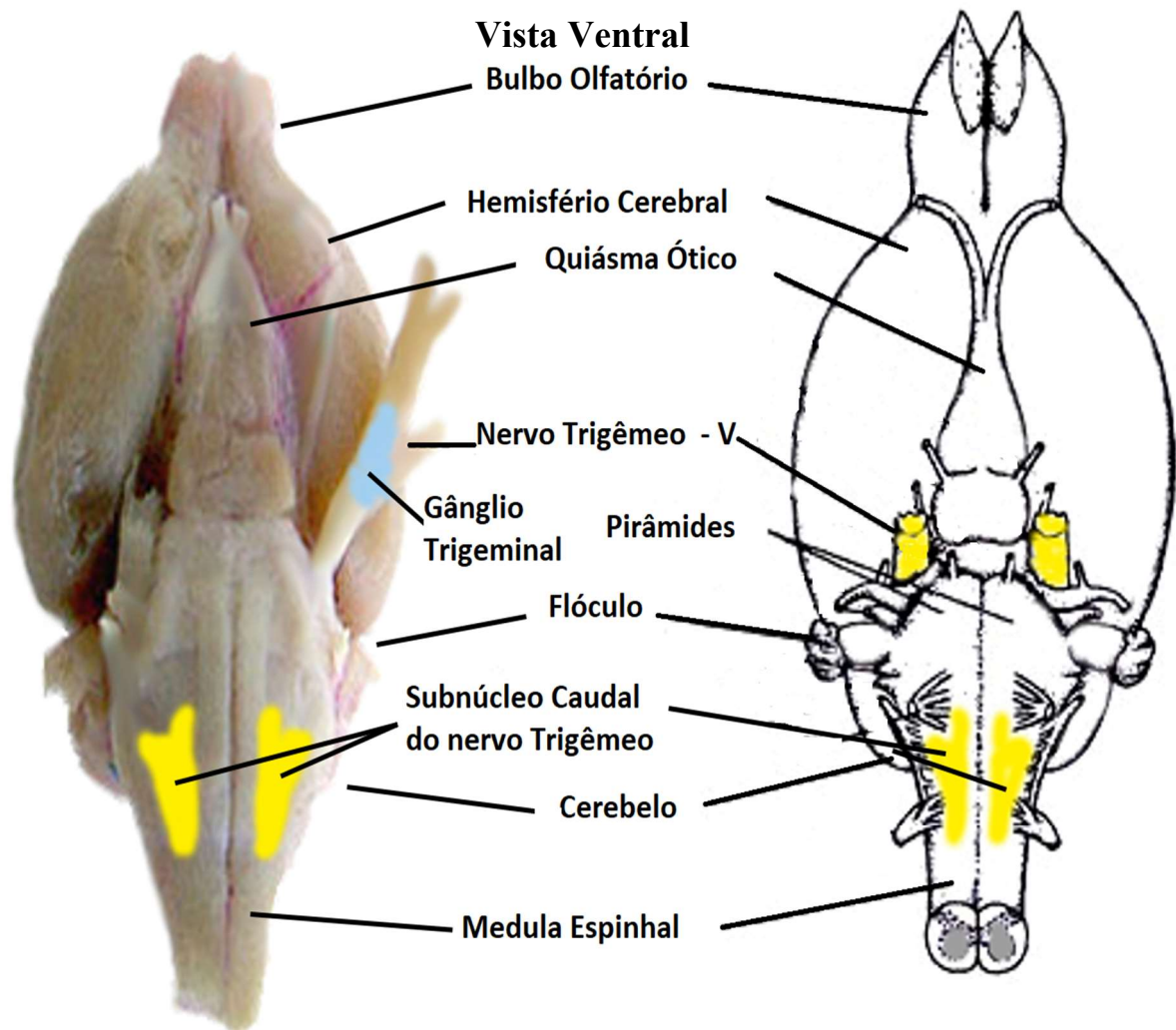
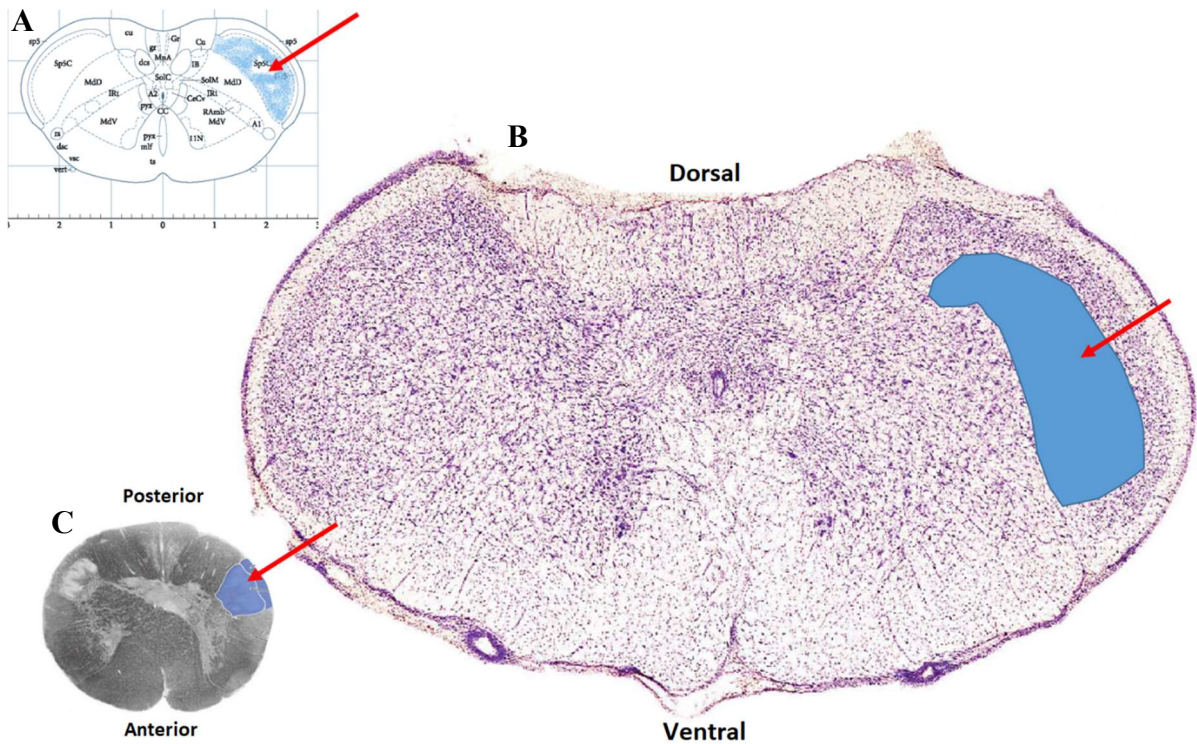


Ilustração representa a anatomia do encéfalo do rato, demonstrado os principais nervos cranianos, e em destaque amarelo, a via trigeminal: nervo trigêmeo e subnúcleo caudal do trato espinhal do nervo trigêmeo, e o gânglio trigeminal em azul.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Figura 7 - Ilustração da localização do subnúcleo caudal do trato espinhal do nervo trigêmeo (Sp5C) no tronco encefálico



A Figura mostra cortes histológicos de tronco encefálico de rato (B) e humano (C) e a representação gráfica da mesma estrutura do rato (A) em bregma -15,72, onde a seta vermelha indica na região hachurada de azul as delimitações do subnúcleo caudal do trato espinhal do nervo trigêmeo (Sp5C) correspondente em cada espécie.

Fonte: Adaptada pelo autor a partir de MARTIN, 2013 (C) e PAXINOS; WATSON, 2007 (A e B).

2.7 Modelo de Neuropatia no Nervo infraorbital

O nervo infraorbital (NIO) é um nervo exclusivamente sensitivo, ramo de uma das raízes do nervo trigêmeo, o nervo maxilar. Após sua origem no nervo maxilar (que emerge pelo forame oval), adentra a órbita, pela fissura orbital inferior e perfura a maxila (canal infraorbitário), saindo no forame infraorbital para inervar a pele do lábio superior, asa do nariz e a parte anterior da bochecha, a túnica mucosa do seio maxilar, os dentes incisivos, canino e pré-molar (nervo alveolar antero-superior) e a parte superior da gengiva e mucosa do lábio e parte anterior da mucosa jugal (Figura 8A) (NETTER, 2011; MARTIN, 2013; MACHADO, 2013). Nos ratos, além de inervar as mesmas estruturas análogas, os ramos no nervo infra orbital também inervam na mesma região, os folículos pilosos das vibrissas, que possuem função sensorial para a espécie (Figura 8B) (MALMMIERCA, MERCHÁN, 2002; PAXINOS, WATSON, 2007).

Figura 8 - Representação da inervação da face, ramos do nervo trigêmeo

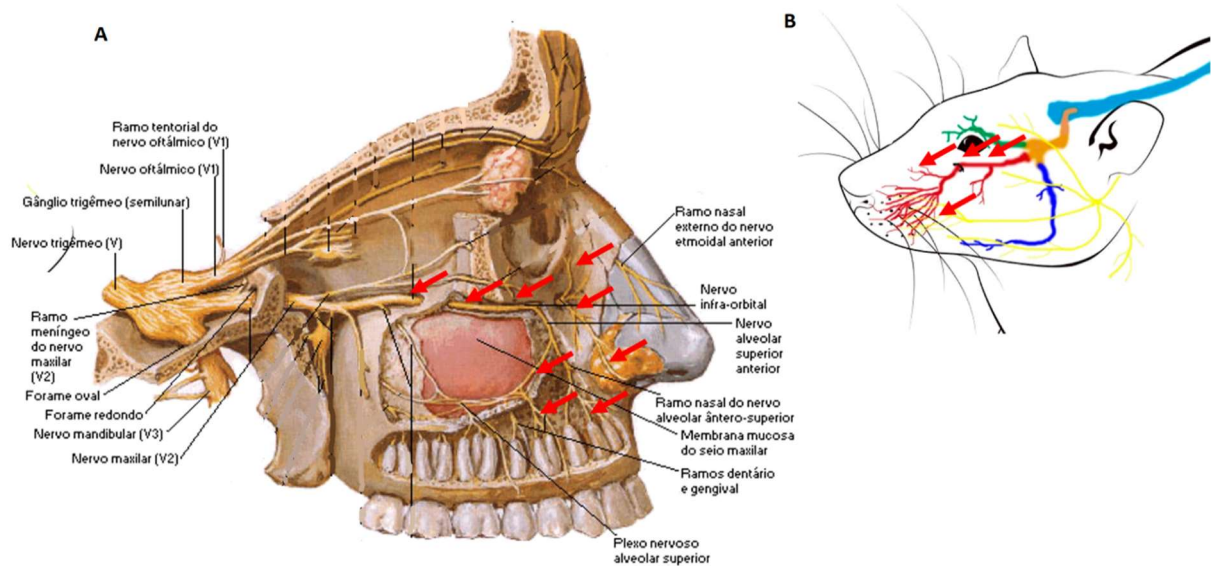


Ilustração compartiva mostrando os principais ramos trigeminais no homem (A) e no rato (B), em destaque nas setas vermelhas, trajeto, ramos e inervação do nervo infra-orbital.

Fonte: A – Adaptada pelo autor a partir de Netter, 2011, B – Elaborada pelo autor.

Modelos experimentais são relevantes para o estudo de distúrbios periféricos em humanos (neuropatias, plexopatias e radiculopatias), e são utilizados para representar doenças que possam, de alguma forma, levar a alterações neuropáticas ou que levem a nocicepção (WOOLF; MANNION, 1999). Dentre tais intervenções, a lesão neuronal periférica ou processos inflamatórios locais são bastante comuns como modelos de situações nociceptivas (ZIMMERMENN, 2011).

Grande parte dos modelos de dor neuropática consiste em lesões periféricas por trauma, que devem reproduzir déficits sensitivos, como alodinia, hiperalgesia e dor espontânea em animais, que manifestam a dor como resposta a estímulos térmicos (frio ou calor), mecânicos (pressão) ou químicos (WOOLF; MANNION, 1999).

Existem vários modelos experimentais de lesões nervosas periféricas em nervos espinhais, que simulam distúrbios sensoriais e dor neuropática no homem. A secção e a ligadura de nervo periférico levam à formação de neuroma, que é acompanhada de alterações comportamentais que confirmam os sinais de nocicepção (ato de lambem, coçar e morder a área desnervada) como indício de sensação anormal e/ou desagradável, na forma aguda (DEVOR; SELTZER, 1999). Nos neuromas experimentais do nervo isquiático, os axônios mielinizados e não mielinizados desenvolvem atividade espontânea e sensibilidade mecânica, que se assemelham a diferentes tipos de lesões possíveis em nervos periféricos. As mesmas lesões

experimentais no sistema trigeminal levam a atividade espontânea ectópica e sensibilidade mecânica das fibras aferentes mielinizadas (DEVOR; SELTZER, 1999).

Através de estudos eletrofisiológicos em ratos, ao se comparar atividade ectópica anormal dos neuromas do ramo infraorbital do nervo trigeminal com a atividade dos neuromas do nervo isquiático, verificou-se que a atividade anormal no nervo infraorbital era menor ou decrescia mais rapidamente ao longo do tempo, devido ao menor trajeto do nervo, o que facilitaria o reparo (TAL; DEVOR, 1992).

Um modelo de lesão por constrição crônica do nervo infraorbital foi desenvolvido por Gregg et al (1973) e modificado por Bennett e Xie (1988), em que ligaduras frouxas de fio Catgut cromado são colocadas em torno do nervo para produzir a lesão de constrição. Estudos comportamentais, após lesão de constrição crônica de ramos de nervos espinhais, mostraram sinais prolongados de hiperalgesia e alodinia após estimulação mecânica, térmica ou química, como sinais da presença de parestesia e disestesia (BENNETT; XIE, 1988).

O modelo original de Gregg (1973), consiste em uma constrição do nervo infraorbital, por ligadura frouxa, com acesso pela fossa orbital, dissecando os ossos frontal, lacrimal e zigomático, rebatendo a musculatura (temporal e masseter) onde a parte caudal ao forame infraorbital é acessada (CHRISTENSEN, 1999), entretanto, a dificuldade do acesso cirúrgico e um pós-operatório com complicações levou a Bennett e Xie (1988) a fazer modificações na metodologia, realizando o acesso da porção rostral ao forame infraorbital do nervo no espaço subcutâneo maxilo-nasal (Figura 9) (BENNETT; XIE, 1988, CHUDLER; ANDERSON, 2002, CHRISTENSEN et al, 1999, FRIEND *et al*, 2001, XU *et al*, 2008, VOS *et al*, 1994).

Vos *et al* (1994) realizaram um excelente estudo comportamental usando um modelo de lesão de constrição crônica de Gregg et al (1973) modificada por Bennett; Xie (1988) (Figura 8) no nervo infraorbital em ratos, que mostrou o desenvolvimento de comportamento de dor espontânea e alodinia mecânica na região inervada pelo nervo, onde diferentes sinais comportamentais de fase aguda começaram imediatamente após a lesão, seguido do desenvolvimento tardio de alodinia mecânica (IMAMURA *et al*, 1997; CHRISTENSEN *et al*, 1999).

Figura 9 - Modelo de constrição do nervo infraorbital

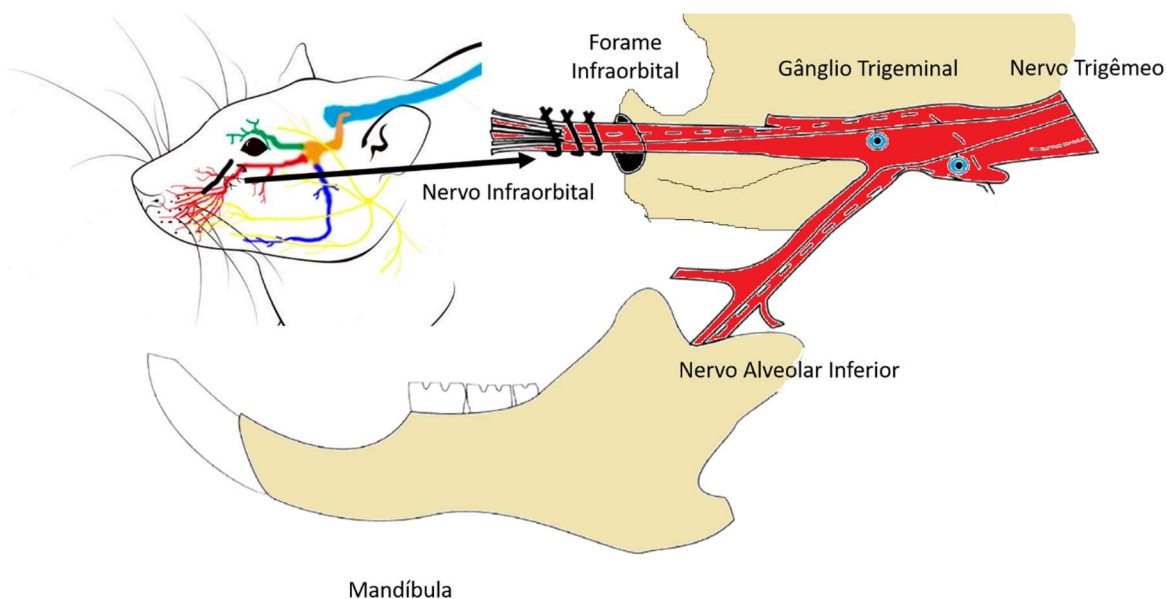


Ilustração da indução de neuralgia trigeminal por constrição de ramos do nervo trigêmeo, com destaque para a constrição do ramo infraorbital do nervo maxilar proposto por Gregg (1973) e modificado Bennett; Xie (1988).
Fonte: Elaborada pelo autor.

Além da constrição do nervo infraorbital há estudos que induzem as mesmas condições através da inoculação de veneno de cobra diretamente no nervo infraorbital, acessado cirurgicamente (ZHAO *et al*, 2015), indução de neuralgia trigeminal através de constrição do ramo mandibular trigeminal, levando a desordens sensitivas e motoras (FRIEND *et al*, 2001), além de outras metodologias que incluem o uso de agente químicos inflamatórios, congelamento, agentes biológicos e indução de doenças que levam a neuropatia (SOUSA *et al*, 2016). Entretanto, o modelo de uma lesão de constrição crônica no nervo infraorbitário é o mais utilizado por diversos pesquisadores para reproduzir as condições neuropáticas e nociceptivas como na neuralgia trigeminal, principalmente quando se objetiva avaliar condições estritamente sensitivas, sem interferência em funções motoras (VOS *et al*, 1994, CHRISTENSEN *et al*, 1999, FRIEND *et al*, 2001, CHUDLER; ANDERSON, 2002, XU *et al*, 2008,).

2.8 Marcadores de injúria a ativação da via nociceptiva

No processo de sinalização celular, sabemos que substâncias sinalizadoras que interagem com receptores de membrana celular podem alterar segundos mensageiros e estes, posteriormente, podem indiretamente induzir a expressão de genes específicos e podem afetar a função celular através da regulação da expressão gênica ativadas por diversas cascatas de sinalização. Além disto, as moléculas que passam facilmente pelas membranas podem modificar diretamente a expressão gênica ao interagir com os receptores nucleares (HERRERA; ROBERTSON, 1996).

Dentre os genes que são ativados rapidamente após a estimulação celular e cuja expressão não pode ser prevenida por inibidores da síntese proteica destacam-se os genes de expressão imediata (IEGs), tais como o ATF3 e o c-Fos, que são ativados logo após agressões a estruturas nervosas ou estímulos nociceptivos. Considera-se que esses IEGs codificam, na maioria dos casos, fatores de transcrição que, por sua vez, modificarão a expressão de outros genes conhecidos como genes alvo, e a expressão do gene alvo irá modificar o fenótipo da célula em questão. Assim, os sinais externos podem alterar a expressão fenotípica das células (HERRERA; ROBERTSON, 1996).

2.8.1 Fator de ativação de transcrição 3 (ATF3)

O Fator de Ativação de Transcrição 3 (ATF3) é um IEG, é expressado em diversos tecidos em resposta ao estresse. Como todo fator de transcrição, essa pequena sequência genética, está sempre ativa, pronta para responder a sinalização de agressão celular, regulando a transcrição, ligando-se a sítios de DNA maiores, com proteínas Jun, como homodímero, que reprime a transcrição, ou como um heterodímero, que ativa a transcrição, ou seja, inicia e finaliza a transcrição do DNA. O ATF3 reage como inicializador imediato da transcrição, isto é, ele codifica fatores de transcrição que controlam genes-alvo específicos responsáveis pela regulação das principais funções na medição de resposta direta a uma lesão, e especificamente no neurônio, ativa a maquinaria metabólica responsável pela sua sobrevivência e regeneração (LINDA *et al*, 2011).

O ATF3 é induzido por sinais de estresse em diversos tecidos, como no fígado, no coração, no rim, e no cérebro. O ATF3 também é induzido após a axotomia em neurônios espinhais motores e nos neurônios sensitivos do gânglio da raiz dorsal (TSUJINO *et al*, 2000; HAI; HARTMAN, 2001).

Embora o ATF3 seja amplamente utilizado como marcador para lesões axonais, as interações complexas de ATF3 com outros fatores de transcrição tornam difícil a avaliação do seu papel no sistema nervoso lesionado, haja vista, o ATF3 mostrar-se como um gene de resposta adaptativa que permite que mecanismos celulares em células não neuronais seja modulado para produzir uma resposta apropriada aos estímulos de estresse ou lesão (HUNT *et al*, 2012).

A expressão do ATF3 em muitos tecidos também está associada à disfunção tecidual e à progressão da doença, entretanto nos neurônios sua expressão geralmente está correlacionada com as respostas às lesões que levam à regeneração axonal e à neuroproteção (SEIJFFERS *et al*, 2006). Também associado a condições de dor por períodos prolongados como é o caso das dores neuropáticas, incluindo a neuralgia trigeminal (OBATA *et al*, 2003).

Após a lesão do nervo periférico, pode ocorrer regeneração de nervos lesionados e restauração da função. Os neurônios afetados e suas células da glia circundantes reagem ao insulto com mudanças morfológicas, metabólicas e bioquímicas, contudo, atualmente, o mecanismo que leva a ativação do ATF3 ainda é desconhecido, mas estudos já demonstraram que os fatores de crescimento neural e fator neurotrófico derivado de células da glia influenciam diretamente na expressão de ATF3 (AVERILL *et al*, 2004, LINDA *et al*, 2011).

Como o ATF3 não é expresso de forma constitutiva em gânglios da raiz dorsal e medula espinhal, sua indução pode ser uma resposta celular à sinais de estresse, pois pode ser induzido em neurônios submetidos à axotomia. Assim, como o ATF3 é induzido em neurônios sensoriais e motores da medula espinhal após lesão do nervo, ele é considerado um marcador de injúria neuronal (TSUJINO *et al*, 2000).

Apesar de sua expressão no corno dorsal da medula espinhal, de modo geral o ATF3 não é expresso após injúria em vias centrais, o que corrobora com a pouca capacidade regenerativa dos neurônios do SNC (SEIJFFERS *et al*, 2006; TSUJINO *et al*, 2000). Situação que se reproduz no trato espinhal do nervo trigêmeo, onde o ATF3 não é expresso após injúria periférica como resposta central da via (LATRÉMOLIÈRE *et al*, 2008). Assim, o ATF3 é considerado um importante marcador da presença de lesão, e da capacidade regenerativa neuronal periférica (PETERS *et al*, 2007; LINDA *et al*, 2011).

2.8.2 c-Fos

Na presença de lesões teciduais, estímulos externos levam as células lesadas à liberação de substâncias (mediadores), que induzem a sinalização e resposta em outras células,

podendo induzir uma série de modificações intracelulares. Essas mudanças podem incluir: alterações na concentração intracelular de segundos mensageiros que podem modular as taxas de fosforilação de diferentes proteínas, alterações no influxo de íons e modificações nos canais iônicos, que por sua vez iniciam processos de expressão gênica em resposta a essas agressões (HERRERA; ROBERTSON, 1996). E dentre essas expressões, a ativação dos genes de resposta imediata são na maioria das vezes o pontapé de uma resposta a uma agressão, como por exemplo a sensibilização da via nociceptiva (KRAYCHETE *et al*, 2008) e um desse genes é o c-Fos (TEIXEIRA, 2009).

O c-Fos faz parte da família Fos de fatores de transcrição que inclui também b-Fos, Fra-1 e Fra-2, e forma heterodímero com c-Jun (parte da família Jun de fatores de transcrição), resultando na formação do complexo proteína de ativação-1 (AP-1) que se liga ao DNA em locais específicos de genes alvo, convertendo sinais extracelulares em expressão gênica (CHIU *et al*, 1988; MILDE-LANGOSCH, 2005). O c-Fos desempenha um papel importante em muitas funções celulares e, em uma variedade de cânceres, pode estar subexpressado (HALAZONETIS *et al*, 1988).

A ativação de c-Fos no cérebro pode se induzida por um grupo diversificado de estímulos. O mRNA e o c-Fos são uns dos primeiros a serem expressados, assim o gene c-Fos é referido como um gene de resposta imediata ou inicial imediato (IEGs) (NESTLER, 2012).

O c-Fos tem sido utilizado como ferramenta para estudar a ativação neuronal em diferentes estruturas do sistema nervoso, podendo ser considerado como um dos vários IEGs que respondem a sinais celulares externos com alterações fenotípicas nas células nervosas. Diferentes conjuntos de IEGs podem ser ativados por diferentes estímulos e, por sua vez, esses IEGs podem induzir ou inibir a transcrição de genes tardios ou alvos que podem, por sua vez, produzir mudanças de longo prazo, como por exemplo alterações neuroplásticas que levam maior expressão de receptores e neurotransmissores da via nociceptiva, bem como inibição da via inibitória descendente (SUPRONSINCHAI; STORER, 2015; MILDE-LANGOSCH, 2005; NESTLER, 2012).

Hunt, em 1987, foi o primeiro a associar o aumento de c-Fos em determinadas regiões como o corno dorsal da medula espinhal com a nocicepção. Assim, a expressão de c-Fos vem sendo utilizada para a identificação anatômica de múltiplos neurônios em núcleos cerebrais que respondem especificamente à estímulos nociceptivos e mapeamento das vias nociceptivas ascendentes e descendentes envolvidas, inclusive como um marcador de dor craniofacial e orofacial (SUPRONSINCHAI; STORER, 2015).

O c-Fos é expresso em interneurônios e neurônios que se projetam a partir da medula espinhal em resposta à estimulação somática, articular e visceral nociva (TAVARES, *et al*, 1993). Neurônios do corno dorsal superficial da medula espinhal podem expressar c-Fos após estímulo nociceptivo cutâneo. Muitos tipos de estímulos nociceptivos induzem a expressão de c-Fos, incluindo elétrica, química e estímulos térmicos, quando aplicados à polpa dentária. A localização anatômica (área imuno-marcada) da expressão de c-Fos pode ser usada como uma estratégia não invasiva para medir o processamento nociceptivo onde, os resultados podem ser correlacionados com estudos comportamentais (SUGIMOTO *et al*, 1998; CHATTIPAKORN *et al*, 2002; CHATTIPAKORN *et al*, 2005).

Após a aplicação de estímulos dolorosos, c-Fos se expressa em várias estruturas do SNC envolvidas no processo nociceptivo, incluindo medula espinhal, substância periarquedutal mesocefálica, os núcleos parabraquiais e o tálamo. A expressão de c-Fos está relacionada à atividade neuronal e à intensidade da dor. Os neurônios na via nociceptiva da medula espinhal e do núcleo trigeminal da coluna vertebral conduzem a informação nociceptiva ao córtex somatossensorial através das estruturas do tálamo e do tronco encefálico, incluindo a substância cinzenta periaquedutal (AHMAND; ISMAIL, 2002; TEIXEIRA, 2009).

A marcação imunohistoquímica de Fos, juntamente com a marcação de outras proteína e/ou marcadores neurais, torna possível a caracterização dos neurônios que expressam c-Fos, em resposta a estimulação nociceptiva. Assim, o c-Fos pode ser usado como um marcador de atividade nociceptiva neuronal, permitindo investigação destes neurônios através da marcação de estruturas centrais e periféricas ativadas por estímulo periférico, bem como para o estudo de alterações funcionais destes neurônios após tais estímulos (PRADO; DEL BEL, 2009).

2.8.3 Proteína Básica de Mielina (PBM)

As células de Schwann do SNP e os oligodendrócitos no SNC são as responsáveis pela síntese da proteína de mielina, presente nas lamelas celulares que formam a bainha de mielina que envolve os axônios (FERNANDEZ-VALLE *et al*, 1995). Podemos destacar a existência de diversas proteínas que modelam a forma lamelar da bainha de mielina, onde duas dessas proteínas compõem pelo menos 85% da proteína total na bainha de mielina que envolve o axônio, a Proteína Básica de Mielina (PBM) presente no SNC e SNP e proteína proteolipídica (PLP) presente no SNC (ASIPU; BLAIR, 1994).

As proteínas básicas 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, sub dividida em duas família de proteínas PBM, a P1 e a P2, onde P2 é encontrada em concentrações mais baixas e complementa a PBM/P1, sendo 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 uma injúria neuronal, as células de Schwann diminuem sua síntese de mielina dentro de 12 horas e interrompem totalmente a síntese dentro de 48 horas (VARGAS; BARRES 2007). Assim, após sua ativação, entram em estado de diferenciação, ou seja, entram em ciclo celular, proliferam e realizam a remoção da mielina (PELLEGRINO *et al*, 1986; LIU *et al*, 1999; MURINSON *et al*, 2005; VARGAS; BARRES 2007).

No entanto, o processo de remielinização a partir destas mesmas células, só vem ocorrer posteriormente, após uma diferenciação, multiplicação e rediferenciação celular, a qual é direcionada pela via de sinalização intracelular RAS/RAI/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; CÂMARA, 2015).

Tendo em vista que, após a injúria neural predominam os processos de remoção da mielina pelos macrófagos e as próprias células de Schwann, seguido mais tardiamente uma nova gênese da mielina estimulada pelo alongamento e reparo do axônio, a avaliação e quantificação da PBM consiste em uma importante ferramenta na avaliação de injúria axonal. Além disto, está associado com a capacidade de reparo e ainda possibilita avaliar, juntamente com outros parâmetros (principalmente comportamentais), a influência da injúria na funcionalidade neuronal. Assim, a expressão da PBM pode ser usada como uma ferramenta associada a outros parâmetros para avaliar o grau da velocidade da degeneração ou da regeneração do nervo dependendo do tempo pós-injúria (GUPTA *et al*, 1993; CÂMARA, 2015).

2.8.4 PGP 9.5

O PGP 9,5 também é conhecido como ubiquitina carboxil-terminal hidrolase-1 (UCH-L1), proteína originalmente isolada de extratos cerebrais. Embora a expressão de PGP9.5

em tecidos normais tenha sido originalmente observada em neurônios e células neuroendócrinas, foi posteriormente verificada em epitélio tubular renal distal, em espermatogonias, células de Leyding, oócitos, melanócitos, epitélio secretor da próstata, células do ducto ejaculatório, epidídimos, células epiteliais mamárias, células de Merkel e fibroblastos dérmicos (JACKSON; THOMPSON, 1981; THOMPSON et al, 1983; MARTIN et al, 2000).

O produto gênico anti-proteico (PGP 9,5), um marcador pan-axonal, tem sido usado, para a visualização das fibras nervosas intraepidérmicas, por sua grande sensibilidade em estudos desses terminais nervosos, tanto em padrões normais de distribuição da inervação, como em outros componentes neurais da pele, e em situações patológicas do sistema nervoso periférico, em especial nos processos que comprometem as fibras mielínicas de pequeno calibre e as amielínicas (MOURA et al, 2004).

2.9 Hipotireoidismo e a Neuropatia

É comum a associação do hipotireoidismo com a presença de polineuropatias. Em torno de 71% dos casos de hipotireoidismo é possível identificar, eletrofisiologicamente, a prevalência de polineuropatias, que, em alguns casos se manifestam com problemas motores, e em outros com distúrbios sensitivos (hiperalgesia ou parestesia) ou ambas e na maioria das vezes de forma subclínica ou não diagnosticada corretamente através de estudos eletrofisiológicos (BEGHI et al, 1989).

A presença de neuropatias periféricas também foi relatada em animais, e foi demonstrado que o tratamento com suplementação de T4 revertia tanto o hipotireoidismo como quanto as polineuropatias (FARIA et al, 2012). Em testes eletrofisiológicos, foi demonstrado que o hipotireoidismo parece influenciar na percepção da dor, ou na sensibilidade mecânica e térmica (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 sensibilização central (ØRSTAVIK, NORHEIM E JØRUM, 2006). Também foi relatado casos de neuropatias dolorosas em pacientes com hipotireoidismo subclínico, responsável ao tratamento com reposição hormonal (PENZA et al, 2009).

Foi demonstrado que hipotireoidismo experimental na gestação leva a prole a distúrbios nociceptivos e motores, onde o limiar nociceptivo térmico pode estar reduzido, e o limiar mecânico aumentado (ALVES et al, 2013). Também que os HTs podem regular a

percepção da dor modulando a função do sistema Acido-Gama-Amino-Butírico (GABA), apontado os HTs como importantes biomarcadores de dor crônica em sua instalação e manutenção, o que pode favorecer intervenção terapêuticas no futuro (CHEN et al, 2016).

Sousa (2016), em um estudo “*in vivo*”, avaliou, experimentalmente, em modelos animais, o efeito do hipotireoidismo e da injúria por constrição crônica em nervo isquiático de rato. Foram encontradas alterações nos parâmetros eletrofisiológicos associados a um aumento da cronaxia (duração mínima de estímulo necessária para obter uma resposta ou gerar um potencial de ação), elevação da reobase (valor da intensidade do menor estímulo capaz de gerar uma resposta) e diminuição da velocidade de condução nervosa e amplitude do potencial de ação composto (PAC) (SOUSA, 2006).

3 JUSTIFICATIVA

Sabe-se que o hipotireoidismo pode levar a quadros neuropáticos e nociceptivos, inclusive crânio faciais e provoca alterações no desenvolvimento da resposta neuronal à injúrias, entretanto há uma lacuna nas informações sobre a caracterização das alterações sensitivas e morfofuncionais na via nociceptiva.

Em estudos prévios do nosso grupo em modelo de dor do nervo isquiático em animais hipotireoideos, foi observado aumento do limiar de sensibilidade mecânica e aumento de expressão de marcadores de injúria neuronal e sinalizadores de resposta nociceptiva. Entendendo que a inervação ciática é mista (motora e sensitiva), torna-se essencial a investigação de uma via exclusivamente sensitiva.

A injúria neural leva a alterações neuroplásticas, com conseqüente sensibilização periférica e central, podendo sofrer interferência dos HTs. Além disso, é desconhecido o comportamento de um quadro neuropático na presença do hipotireoidismo, tal como a neuralgia trigeminal, a qual acomete um nervo que apresenta ramos puramente sensitivos.

A via Trigeminal possui diferenças morfofuncionais das demais vias espinhais, onde podemos destacar componentes exclusivamente sensitivos e diferenciados de componentes motores. Dessa forma, há necessidade de estudos adicionais para melhor caracterização dos efeitos do hipotireoidismo sobre os nervos periféricos na via trigeminal na presença da dor neuropática.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

- Avaliar as alterações nociceptivas e morfológicas periféricas e centrais em ratos com hipotireoidismo no modelo de neuralgia trigeminal por constrição do nervo infraorbitário.

4.2 Objetivos Específicos

- Induzir o Hipotireoidismo por ingestão de PTU.
- Confirmar o modelo experimental de hipotireoidismo com PTU através da dosagem do hormônio tireoidiano tiroxina (T4), alterações macroscópicas e histológicas da glândula tireoide e evolução ponderal.
- Verificar a correlação entre as concentrações plasmáticas de T4 e a morfometria da glândula tireoide.
- Verificar a correlação entre as concentrações plasmáticas de T4 e o peso das glândulas tireoides.
- Verificar e avaliar a variação do limiar nociceptivo em condições normais, na neuralgia trigeminal, no hipotireoidismo e na neuralgia com hipotireoidismo.
- Verificar a correlação das concentrações plasmáticas de T4 com o limiar nociceptivo.
- Verificar as alterações estruturais periféricas no gânglio trigeminal e centrais no subnúcleo caudal do trato espinhal do trigêmeo através de marcação de injúria neuronal ATF3 e de ativação da via nociceptiva trigeminal c-Fos.
- Verificar as alterações estruturais periféricas no nervo infraorbital e suas terminações em pele da almofada vibrissal através do marcador de bainha de mielina PBM, e de fibras nervosas PGP 9.5 respectivamente.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizados 72 ratos Wistar machos (*Ratus norvegicus*) pesando entre 180 e 220 g e idade aproximada de 2 meses, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC) e mantidos no Biotério do Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagens (NEMPI) da UFC. Todos os animais foram submetidos a temperatura média de 24°C, obedecendo o ciclo dia/noite de 12/12 h, com disponibilidade de água *ad libitum* e livre acesso à ração balanceada, alojados em grupos de quatro animais por gaiola, distribuídos aleatoriamente para formar os grupos experimentais.

Os protocolos experimentais usados no estudo foram submetidos à análise pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA da UFC, tendo sido aprovado sob o protocolo 45/2015 (Anexo 1). Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais, bem como o número de animais utilizados, estando de acordo com as diretrizes da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) / Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

5.1.1 Grupos experimentais

Seis grupos experimentais foram formados por seis animais em cada, separados randomicamente, sendo assim descritos: **Grupo “C”** – Grupo controle; **Grupo “NT”** – Grupo Neuralgia Trigeminal, composto por animais os quais foi induzida a neuralgia do trigeminal por ligadura “frouxa” (constricção) do Nervo Infraorbital (NIO); **Grupo “NT-S”** – Grupo Neuralgia trigeminal *Sham*, composto por animais os quais foram submetidos ao ato cirúrgico sem constricção do nervo infraorbital; **Grupo “H”** – Grupo Hipotireoidismo, composto por animais os quais foram induzidos apenas o hipotireoidismo, não submetidos a protocolo cirúrgico; **Grupo “H+NT”** – Grupo Hipotireoidismo + Neuralgia trigeminal, composto por animais com hipotireoidismo induzido, os quais foram submetidos a ligadura frouxa do nervo infraorbital e o **Grupo “H+NT-S”** – Hipotireoidismo + Neuralgia trigeminal *Sham*, composto por animais com hipotireoidismo induzido, os quais foram submetidos ao ato cirúrgico sem constricção do nervo infraorbital (Figura 10).

Os protocolos experimentais foram repetidos duas vezes cada para coleta de material (nervo infraorbital, trato espinhal do trigêmeo, gânglio trigeminal, pele da vibrissa e tireoide) a

serem usados em diferentes estudos morfológicos (imunofluorescência e morfometria). Assim, foram utilizados um total de 72 ratos divididos em 6 grupos de 6 animais em 2 experimentos. Os animais de cada grupo eram identificados pela referência das gaiolas e pela marcação individual na cauda.

Figura 10 - Representação esquemática dos grupos experimentais

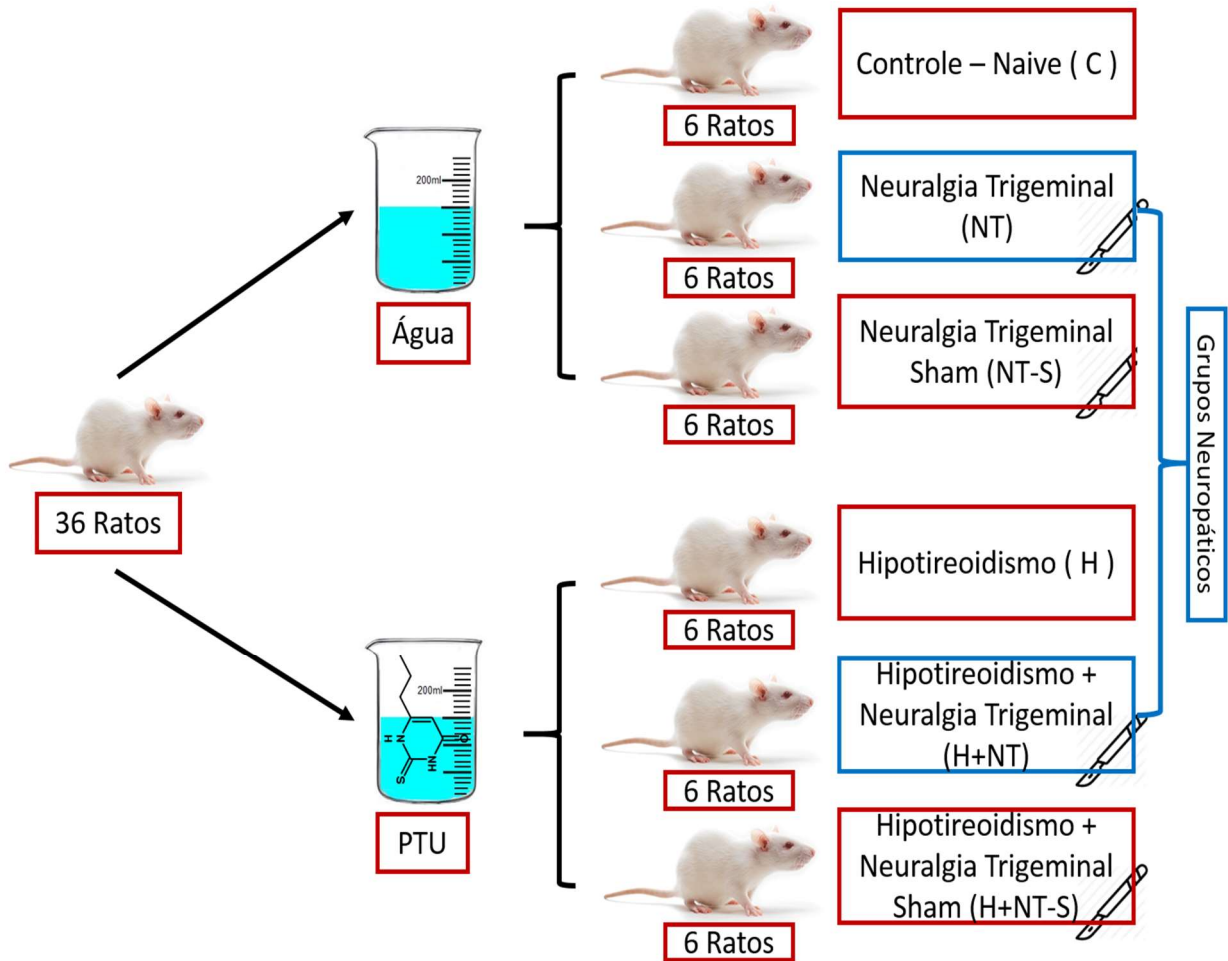


Ilustração esquemática dos grupos experimentais, demonstrando a divisão dos animais entre os grupos de acordo com o protocolo experimental os quais foram submetidos. Em cada experimento (2) 36 animais foram divididos em 6 grupos de 6 ratos, onde 3 grupos (C, NT e NT-S) receberam água em suas dietas e 3 grupos (H, H+NT e H+NT-S) receberam solução 0,05% de PTU. 4 destes grupos foram submetidos a protocolo cirúrgico (NT, NT-S, H+NT e H+NT-S).

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2 Indução e Confirmação do Hipotireoidismo

Para promover diminuição das concentrações plasmáticas dos hormônios tireoidianos, foi administrado o Propiltiuracil (PTU) *Biolab*[®] a 0,05% em água de beber (YU et al, 2014, CHAALAL et al, 2014), aos animais dos grupos H, H+NT e H+NT-S + H, durante os 42 dias experimentais, onde o período mínimo de indução foi de 21 dias.

As soluções de PTU a 0,05% foram preparadas a partir de comprimidos de 100mg da droga (5 comprimidos por litro), macerados com cadinho e pistilo e dissolvidos em água tratada usada na hidratação usual dos animais, homogeneizada em agitador magnético (SOLAB[®] SL-91), e oferecido aos animais em bebedouros. Os bebedouros eram lavados e tinham suas soluções de PTU 0,05% trocadas diariamente. As garrafas dos bebedouros eram revestidas de papel alumínio para evitar a exposição do fármaco à luz.

A solução foi ofertada aos animais durante todo o período experimental, onde os primeiros 21 dias foram a fase indutora do hipotireoidismo e o restante do período experimental a fase de manutenção em concentrações baixas dos hormônios tireoidianos. Após o período de indução, foi realizada a coleta de material sanguíneo para dosagem hormonal e confirmação do hipotireoidismo (YU et al, 2014, CHAALAL et al, 2014) (Figura 11). O controle destes grupos constitui-se de animais que ingeriram água não tratada com o PTU.

5.2.1 Avaliação ponderal dos animais

Todos os ratos foram pesados semanalmente em balança digital (Filizola[®] MF 4006082) antes e durante o período experimental (dias 0, 7, 14, 21, 28, 35 e 42) para avaliação da evolução ponderal (Figura 11). Os ratos foram pesados de forma aleatória no período da manhã, sempre no mesmo horário, em dias não coincidentes com trocas de caixa e cama (maravalha), onde seus pesos eram registrados em planilha de acordo com grupo e número do animal.

Figura 11 - Representação esquemática da indução, manutenção e confirmação do Hipotireoidismo

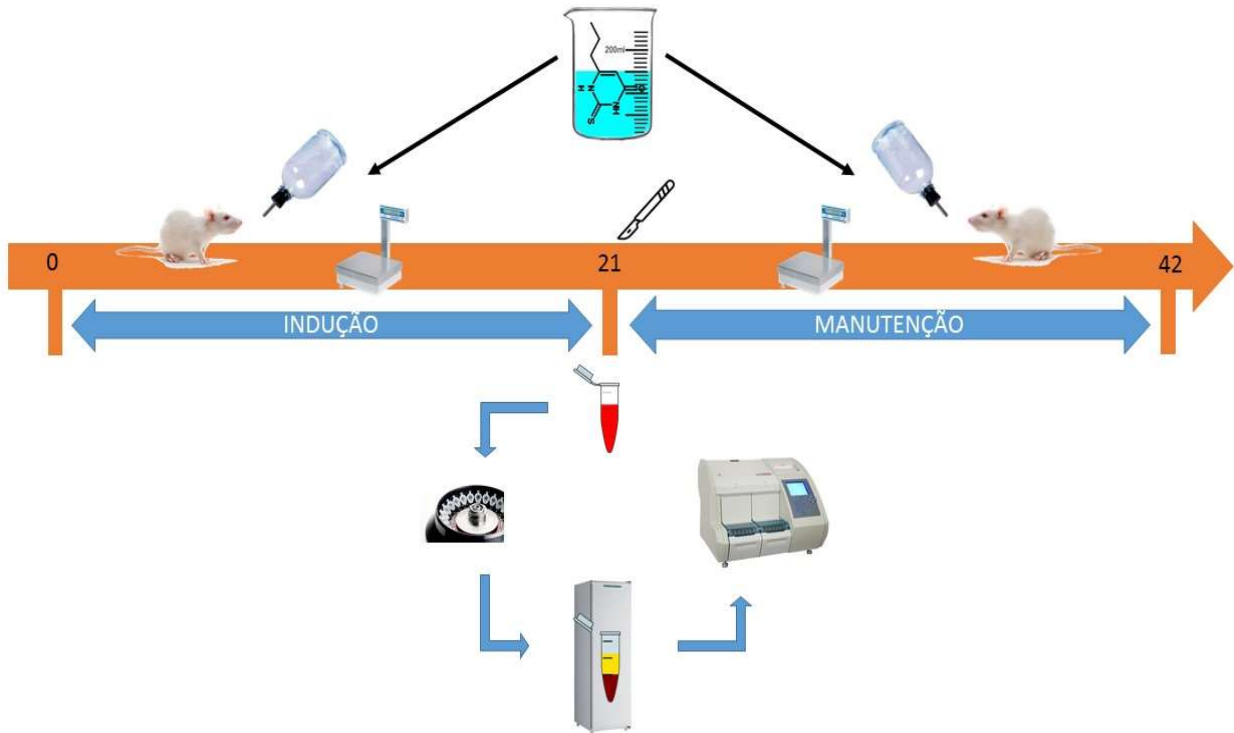


Ilustração esquemática do protocolo de indução e manutenção do Hipotireoidismo e sua confirmação laboratorial, demonstrando a administração de PTU 0,05% em água de beber durante todo o período experimental, o qual é dividido em fase indutora e fase de manutenção, e a coleta de sangue ao 21º dia para análise laboratorial, bem como a pesagem semanal para o acompanhamento ponderal.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2.2 Dosagem de Tiroxina (T4)

Amostras de sangue total foram obtidas dos animais após 21 dias de consumo do PTU, para mensuração das concentrações séricas do hormônio T4 e comprovação do estado de hipotireoidismo (Figura 11). Os animais foram previamente anestesiados com quetamina (10%) e xilazina (2%) nas doses de 100 mg/kg e 10 mg/kg respectivamente por via intraperitoneal.

Foi coletado 1ml de sangue do plexo orbitário por um tubo capilar inserido medialmente ao globo ocular em tubos tipos eppendorf de 2 ml, devidamente identificados com o grupo e número do animal, e resfriados a 4°C. O sangue coletado foi centrifugado a 6500 rpm por 10 minutos para obtenção do soro em centrífuga refrigerada 4°C. As amostras de soro foram conservadas em freezer a uma temperatura de - 20°C até realização das análises de tiroxina total (T4), no mesmo dia.

As análises 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 (UECE). Foi utilizado o aparelho MiniVidas (Biomérieux®) 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 volume necessário foi de 100 µm para a dosagem do hormônio T4 (Figura 11).

5.3 Indução da neuralgia trigeminal (NT)

A indução da NT foi realizada nos grupos neuropáticos (NT e H+NT) após 21º dia de protocolo experimental (fase indutora do hipotireoidismo), imediatamente após a confirmação do hipotireoidismo via análise sorológica de T4 e após a aferição do limiar nociceptivo e pesagem dos ratos. A indução da NT foi feita utilizando o modelo de ligadura falsa do nervo infraorbital esquerdo descrita por Gregg (1973), modificada por Vos *et al* (1994) e adaptada por nosso grupo de pesquisa (Figura 12 e Figura 13). Também foi realizada cirurgia *Sham* (sem constrição do nervo) nos grupos *Sham* (NT-S e H+NT-S) (FIGURA 14).

5.3.1 Procedimentos Pré-operatórios

Os animais foram anestesiados com quetamina (10%) e xilazina (2%) nas doses de 100mg/kg e 10 mg/kg respectivamente por via intraperitoneal. Posteriormente, os animais eram devidamente tricotomizados na região rostral lateral esquerda da face do rato, obedecendo o cuidado em não depilar nenhuma vibrissa. Também foi realizada a antisepsia local com clorexidina 0,5% em álcool metílico. Os campos e materiais cirúrgicos eram esterilizados por calor úmido (autoclave) (Figura 12).

Figura 12 - Representação esquemática do protocolo cirúrgico

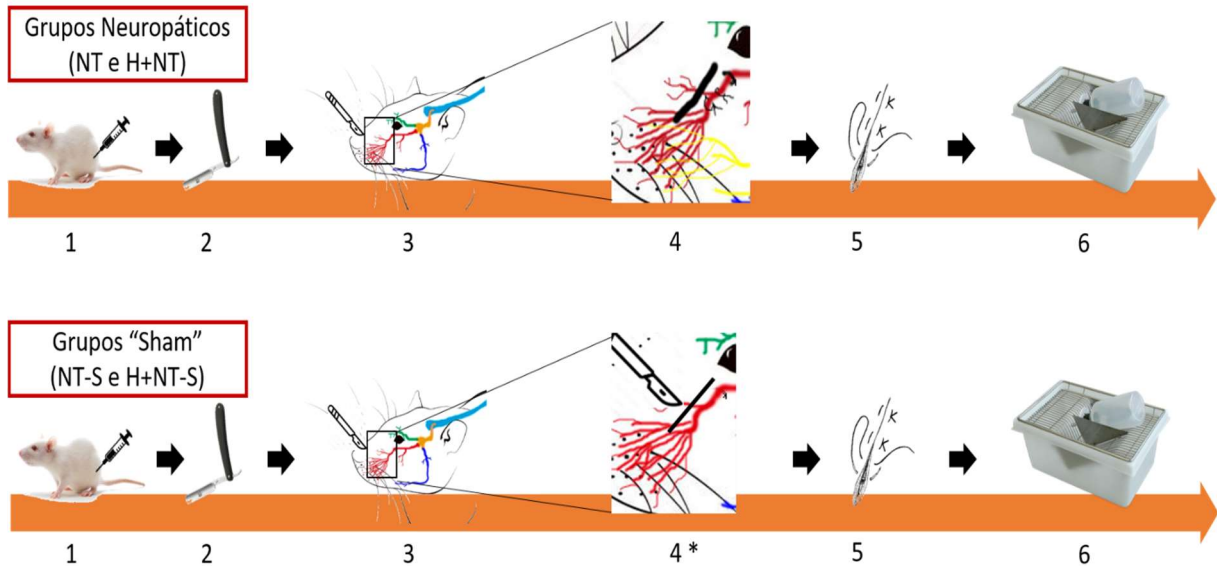


Ilustração demonstrando o protocolo cirúrgico dos grupos neuropáticos e grupos *Sham*. O protocolo foi composto das etapas 1 – Anestesia, 2 – procedimentos pré-operatórios: tricotomia, assepsia e preparação do campo cirúrgico, 3 – Incisão infraorbital e acesso ao nervo, 4 – Dupla ligadura do nervo infraorbital nos grupos neuropáticos, 4* – não ligadura do nervo, 5 – sutura e 6 – Procedimentos pós-operatórios.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.3.2 Procedimento operatório de indução da Neuralgia Trigeminal

O acesso ao nervo infraorbital foi realizado através de incisão infraorbital usando lâmina de bisturi nº 15. A incisão iniciou-se 2 mm lateralmente e abaixo do ângulo medial do olho esquerdo, paralela ao trajeto do nervo, na altura do forame infraorbital, em direção a região vibrissal rostralmente. Para acessar o nervo infraorbital, foram utilizados espaçadores, chumaços de algodão e um afastador cirúrgico. Foi feito o debridamento dos tecidos adjacentes com tesoura até que se pudesse identificar o nervo infraorbital e o ramo zigomático do nervo facial, afim de que não fosse feita a constrição do nervo facial juntamente com o nervo infraorbital (Figura 13).

Uma porção de cerca de 5 mm do nervo infraorbital, estendendo-se mais rostralmente a órbita e ao forame infraorbital, foi exposta (Figura 13). Duas amarras frouxas com fio inócuo de polipropileno nº 6-0, separadas uma da outra por aproximadamente 2 mm, foram feitas ao redor do nervo infraorbital, o mais próximo possível da região caudal do nervo e do forame infraorbital. Um espaçador de nylon com diâmetro de 0,5 mm foi colocado paralelamente ao nervo e retirado por deslizamento após a realização das amarras, assegurando

uma folga constante e suficiente para diminuir o diâmetro do nervo e retardar, mas sem ocluir, a passagem do impulso nervoso e da vasculatura superficial, conforme descrito por Bennett e Xie (1988). A incisão foi então fechada com três pontos de fio de nylon 4-0 (Figura 13).

A cirurgia foi realizada seguindo padrões de limpeza e assepsia.

Figura 13 - Cirurgia com ligadura do nervo infraorbital

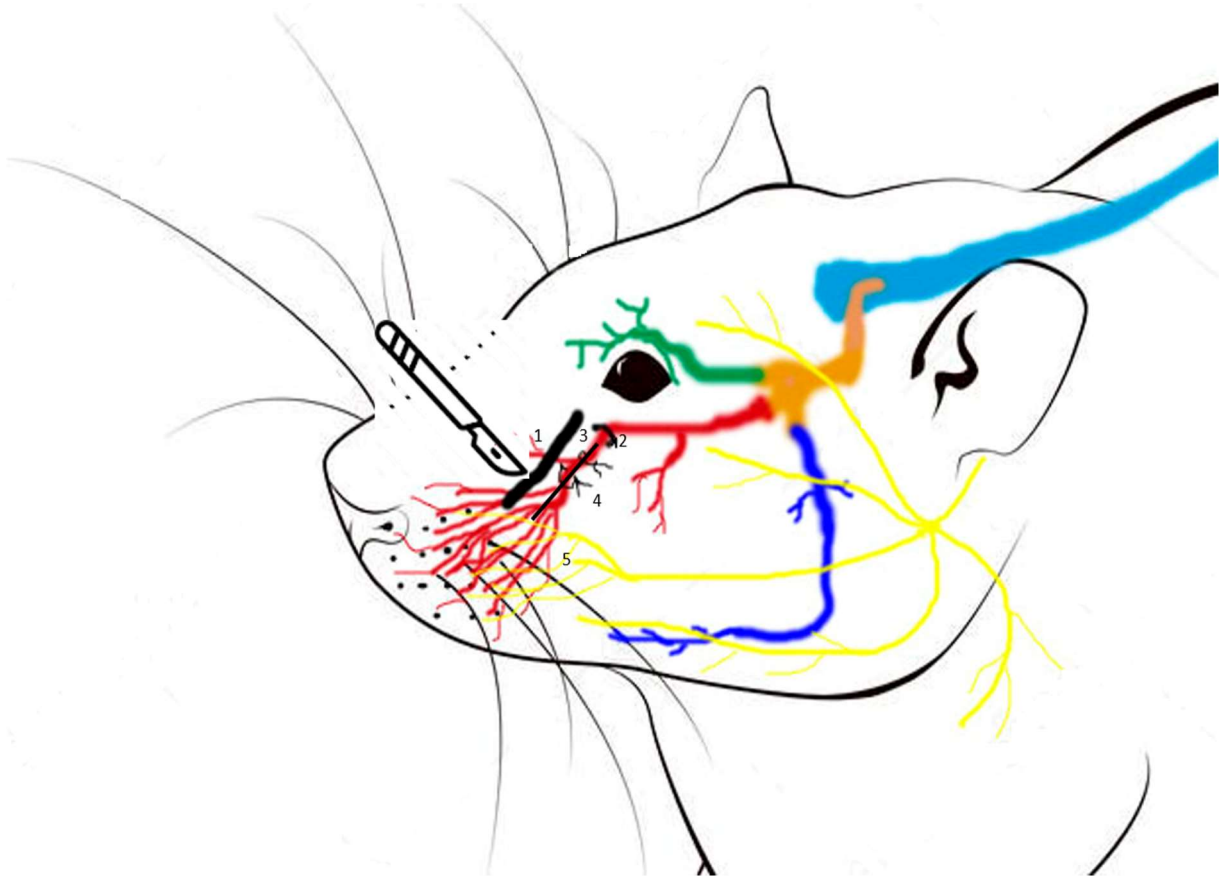


Ilustração demonstrando a indução da neuropatia trigeminal através da ligadura frouxa do nervo Infraorbital. 1 – Incisão infraorbital em linha caudo-rostral, 2 – Forame infraorbital, 3 – Nervo infraorbital, 4 – Dupla amarradura do nervo infraorbital com espaçamento de 2mm sobre espaçador de nylon e 5 – Ramos zigomático do Nervo Facial.

Fonte: Elaborada pelo autor

5.3.3 Procedimento operatório da cirurgia *Sham*

Na cirurgia falsa ou *Sham*, o nervo infraorbital esquerdo foi dissecado e identificado da mesma forma que na cirurgia com constrição, usando a mesma incisão e sendo liberado dos tecidos conjuntivos (Figura 14). Entretanto, os animais destes grupos (NT-S e H+NT-S) não receberam a amarradura do nervo infraorbital (Figura 14). Os demais procedimentos seguiram os mesmos passos cirúrgicos descritos anteriormente (Figura 14). A cirurgia foi realizada seguindo padrões de limpeza e assepsia.

Figura 14 - Cirurgia sem ligadura do nervo infraorbital (*Sham*)

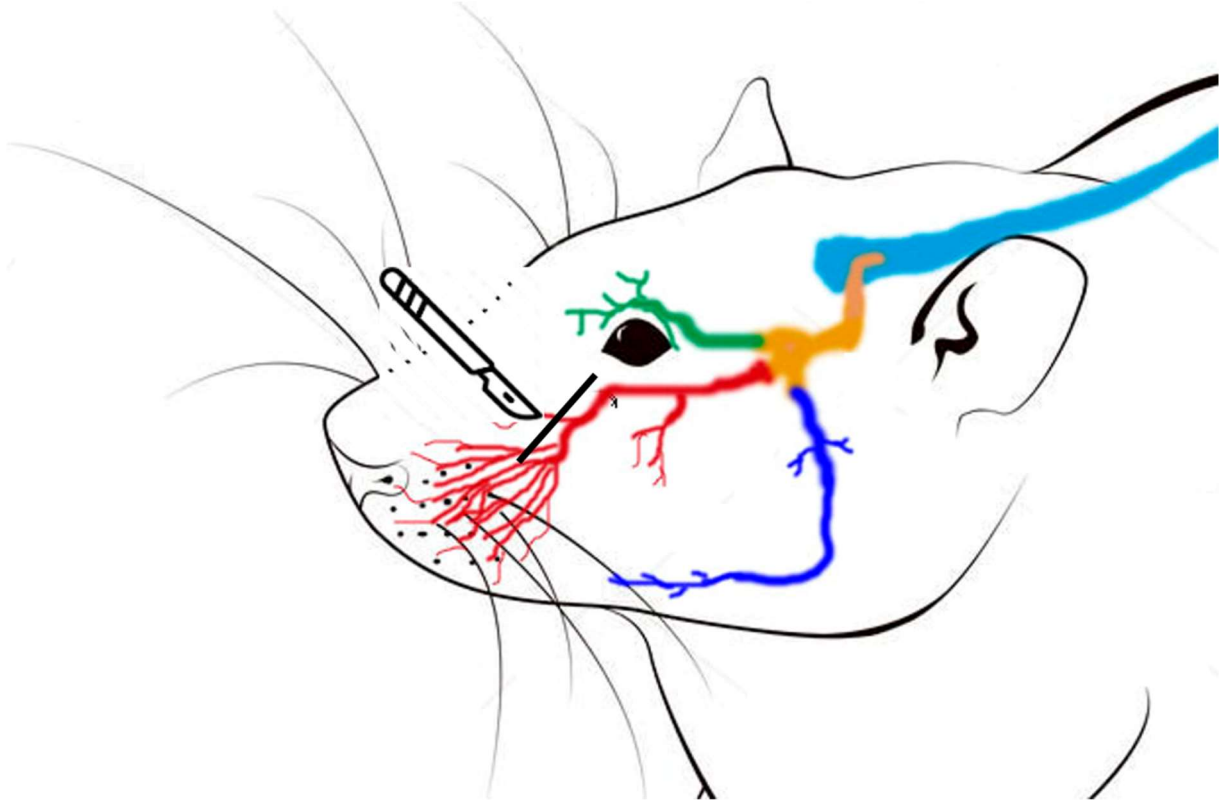


Ilustração demonstrando a cirurgia *Sham*, onde é feito apenas a incisão e o acesso do Nervo Infraorbital sem ligadura.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.3.4 Procedimentos pós-operatórios

Após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram acondicionados em local silencioso, com pouca luminosidade e manipulação mínima em gaiolas individuais, mantidos à temperatura entre 27 e 30 °C, usando lâmpada aquecedora. No período pós-operatório, todos os animais foram observados por 2 horas ou tempo retorno anestésico, onde foi controlada a ingestão de líquidos e alimentos.

Após esse período, os animais retornaram às condições de temperatura, umidade, alimentação e ingestão hídrica descritas anteriormente. Após 24 horas, os animais voltaram para as gaiolas comunitárias de origem. Os animais continuaram sendo observados diariamente durante todo o período experimental, onde era verificado o estado da ferida cirúrgica, possíveis infecções, remoção das suturas e possíveis alterações comportamentais ou clínicas que

demonstrassem sinais de sofrimento animal (piloereção, agressividade, autolimpeza, apatia e isolamento) (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002).

Como o estudo objetivava avaliar os parâmetros da dor neuropática e de neuroproteção, não foi administrado nenhum tipo de droga que pudesse alterar padrões comportamentais, bioquímicos e nociceptivos dos animais.

5.4 Avaliações do limiar nociceptivo - Estimulação mecânica

Para o teste de nocicepção, por estimulação mecânica, submetemos os animais a sessões de condicionamento durante os 5 dias que antecederam a realização da indução do hipotireoidismo e início do experimento. Os ratos foram condicionados ao manuseio, a caixa onde era realizado o teste e ao braço transdutor do analgesímetro digital (Von Frey eletrônico INSIGHT®).

O limiar de nocicepção do animal foi aferido através do registro da intensidade de força aplicada na região da almofada vibrissal esquerda (Figura 15) com a resposta reflexa, movimento de retirada da cabeça ou vocalização. Para isso, o analgesímetro acoplado a uma ponteira rígida (extremidade de diâmetro 0,5 mm), foi aplicado perpendicularmente na região a ser avaliada (Figura 15). O analgesímetro digital é um transdutor de força que afere a pressão exercida em gramas (g) (capacidade de transdução de 0,1 g, limite de 1000g e tempo de reação de 1 ms). A quantidade de gramas de pressão suficiente para provocar a reação de retirada da cabeça com “flinch” (sacudida da cabeça) ou então vocalização, é registrada por esse aparelho e significa o limiar de retirada da cabeça ou limiar nociceptivo.

Figura 15 - Ilustração da aferição do limiar nociceptivo na almofada vibrissal

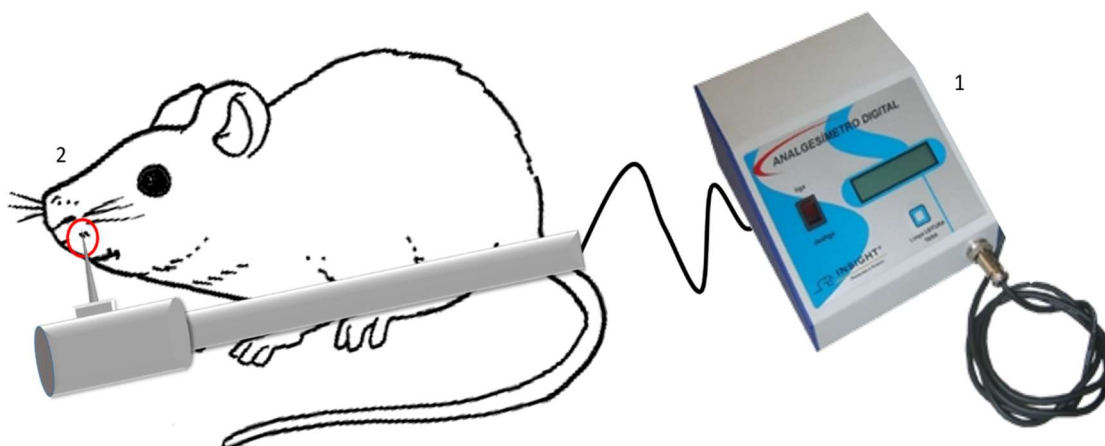


Ilustração da aferição do Limiar nociceptivo na almofada vibrissal (2) com transdutor de força de analgesímetro digital (Von Frey eletrônico INSIGHT®) (1).

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Os testes de nociceção mecânica foram realizados em ambiente silencioso e na penumbra, aleatoriamente, por grupo e número do animal, nos dias 0, 7, 14 e 21, que corresponde ao período de indução do hipotireoidismo, em todos os grupos experimentais, onde o dia 0 consistiu ao dia anterior ao primeiro dia de exposição ao PTU e o dia 21 foi o dia final da fase indutora do hipotireoidismo (Figura 16).

Após confirmação do hipotireoidismo e realização das cirurgias de indução da neuralgia trigeminal e cirurgias “Sham”, novos testes de nociceção foram realizados nos dias 21 (imediatamente antes da indução da neuralgia trigeminal), 24, 28, 31, 35, 38 e 42, em todos os grupos experimentais. Após o termino da fase neuropática, todos os animais foram eutanasiados para coleta de amostras para as análises morfológicas (Figura 16).

Figura 16 - Representação esquemática do delineamento experimental referente a aferição do limiar nociceptivo

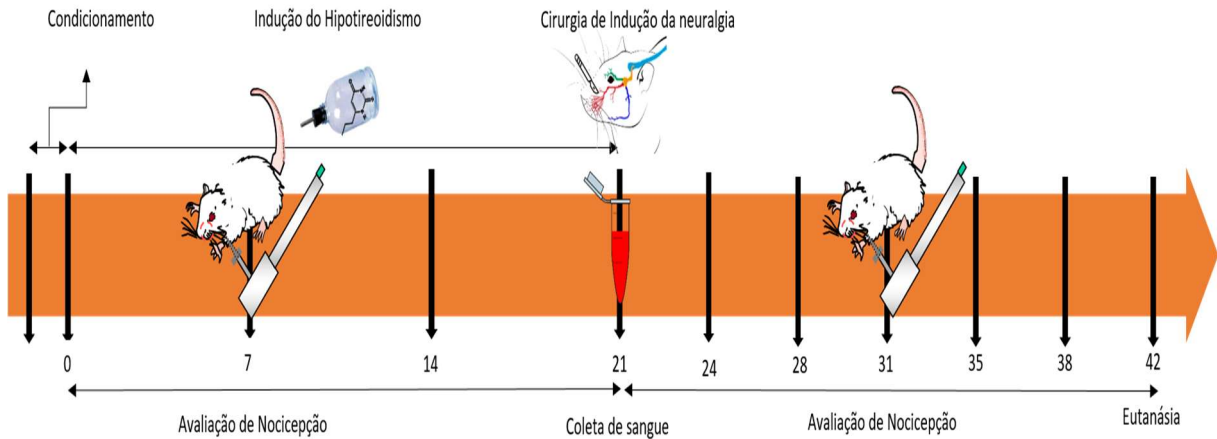


Ilustração demonstrando o delineamento experimental do protocolo de aferição do limiar nociceptivo nos dias 0, 7, 14, 21, 24, 28, 31, 35, 38 e 42, onde o dia 21 é o dia da coleta de sangue para confirmação do hipotireoidismo e dia da cirurgia de indução. Na fase de indução do hipotireoidismo o limiar nociceptivo é aferido semanalmente e na fase neuropática o limiar nociceptivo é aferido 2 vezes por semana.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.5 Extração do subnúcleo caudal do trato espinal do nervo trigêmeo, gânglio trigeminal, nervo infraorbital, pele da vibrissa e tireoide

Após o protocolo experimental, os animais foram eutanasiados por injeção de dose anestésica de quetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) seguida de perfusão transcardíaca de solução salina (NaCl) 0,9% e de solução de paraformaldeído (PFA) a 4% tamponado. O conjugado anestésico foi administrado via peritoneal usando agulha hipodérmica.

Para realização da perfusão, foi verificada o grau de anestesia com ausência de reflexo nociceptivo, e então foi rebatida a pele da região torácica ventral, seguida de uma incisão na altura do apêndice xifoide estendida paraesternalmente nas cartilagens costais até a altura dos vasos da base do coração. Uma agulha de ponta romba foi introduzida 5mm no ventrículo esquerdo caudo-cranialmente partindo do ápice do coração paralela ao septo interventricular. Uma abertura no átrio direito foi feita para drenagem de sangue, salina e paraformaldeído excedentes, oriundos da circulação forçada.

Em seguida, as carcaças dos animais foram rapidamente resfriadas e imediatamente iniciadas a coleta do material a ser estudado (subnúcleo caudal do trato espinal do nervo trigêmeo, gânglio trigeminal, nervo infraorbital, pele da vibrissa e tireoide) (Figura 19).

Inicialmente, o subnúcleo caudal do trato espinal do trigêmeo foi coletado através da extração do bloco encefálico, contendo: cérebro, cerebelo e tronco encefálico, pela abertura dorsal da caixa craniana e das vertebrae cervicais. Posteriormente, seguiu-se da localização da região do tronco encefálico contendo o subnúcleo caudal do trato espinal do trigêmeo por meio de estereotaxia em uma matriz própria para encéfalo de rato (INSIGHT[®]) (Figura 18), utilizando como guia o bregma -14,04 até -15,72 mm (Figura 17) (PAXINOS & WATSON, 2007).

Figura 17 - Localização do subnúcleo caudal do trato espinal do nervo trigêmeo (Sp5C)

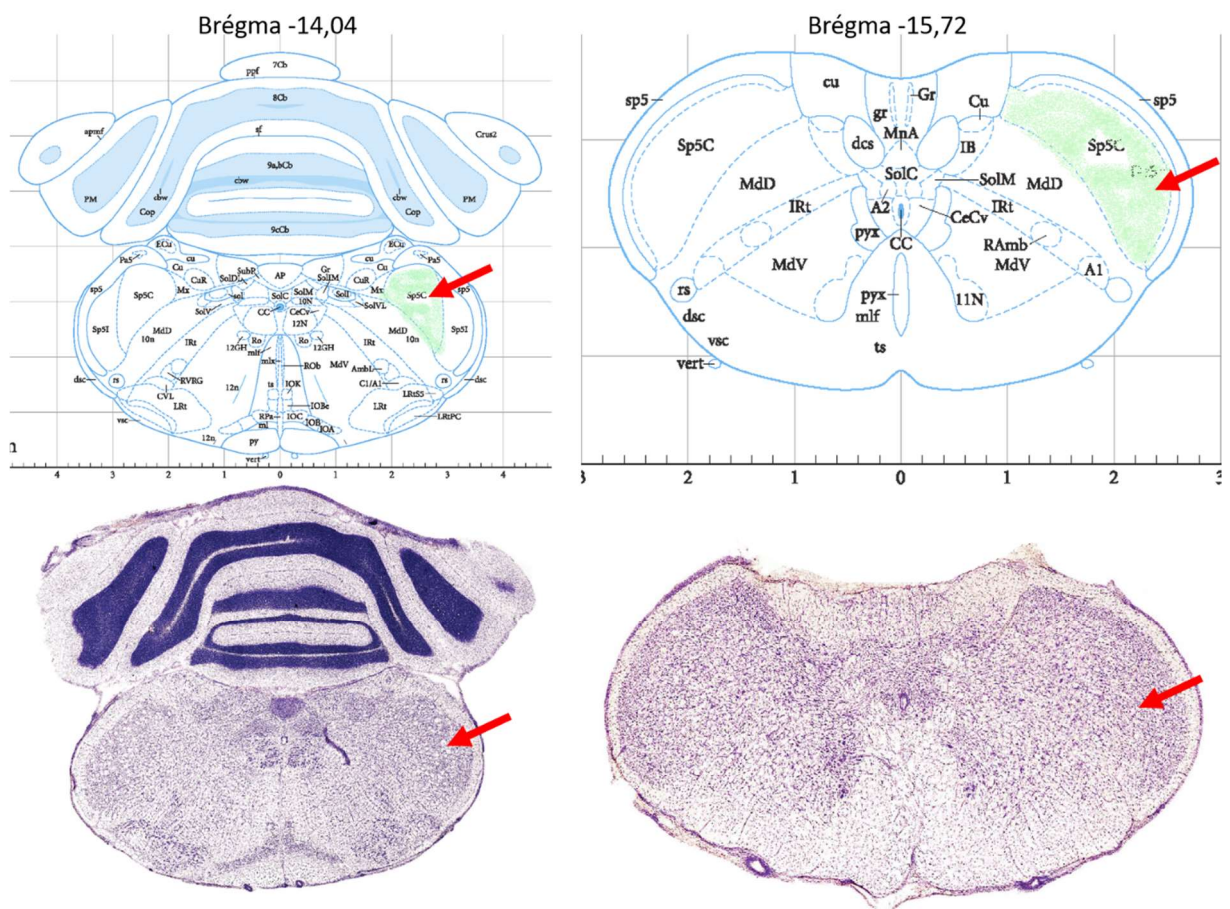


Ilustração da localização do subnúcleo caudal do trato espinal do trigêmeo (Sp5C) entre Bregmas -14,04 e -15,72 (seta vermelha).

Fonte: PAXINOS & WATSON, 2007.

Figura 18 - Matriz para encéfalo de rato

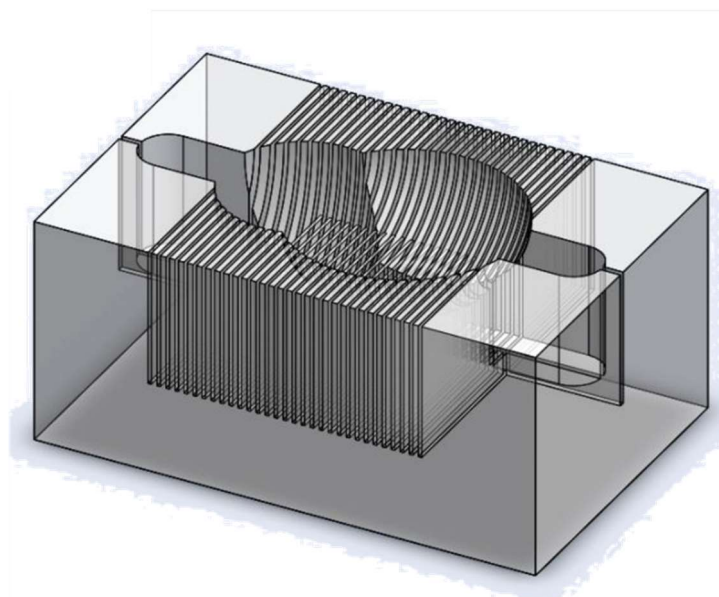


Ilustração de uma matriz para corte estereotáxicos em cérebro de rato. (INSIGHT®).

Fonte: INSIGHT®.

O gânglio trigeminal esquerdo foi removido por abertura das meninges e fraturamento dos ossos da base do crânio (temporal e esfenóide). Já o nervo infraorbital foi coletado seguindo os mesmos passos da abordagem cirúrgica de ligadura, seccionando desde sua saída, no forame infraorbital, até o início de sua ramificação para a região vibrissal, mantendo o cuidado de isolá-lo dos feixes do ramo zigomático do nervo facial que inerva a mesma região. Por fim, um retalho retangular (5 x 3 mm) da pele da almofada vibrissal foi coletado, onde o excesso de pelos (vibrissas) foi removido.

Tais materiais foram pós-fixados por 2 horas em PFA 4% tamponado e em seguida crioprotetidos em uma solução de sacarose 30% a 0,1M, a 4° C por 72 h (onde esta solução era renovada com 1h, 24h e 48h). Em seguida, os tecidos foram embebidos e emblocados em OCT-Tissue-Tek®, e armazenados em freezer -80°C até o corte e montagem das lâminas para os ensaios de imunofluorescência. A região do subnúcleo caudal do trato espinhal do trigêmeo foi cuidadosamente posicionada durante o emblocamento com a face caudal da amostra para a superfície, a fim de facilitar a identificação do lado esquerdo e direito do corte.

A tireoide foi removida extraindo-se o bloco laringe-traqueia, seguida de dissecação da glândula da parede externa da cartilagem tireóideia e da traqueia. Imediatamente após a coleta, as tireoides foram pesadas em balança digital analítica e aferida as suas medidas: comprimento do polo cranial ao caudal (medida craniocaudal) e largura (medida médio-lateral) de cada lobo (Figura 20), com um paquímetro digital (Disma®). As medidas do istmo da tireoide

foram desprezadas devido a seu volume ser insignificante em relação ao volume total da glândula no rato (KÖNIG; LIEBICH, 2016). A tireoide foi em seguida fixada em formaldeído 10% tamponado por 12 h em cassetes identificados com o grupo e número do animal. Após às 12h, as tireoides foram transferidas para solução de álcool etílico 70%, onde ficaram submersas em temperatura ambiente até a confecção das lâminas histológicas. As medidas do istmo foram ignoradas por serem muito delgadas no rato e de difícil remoção.

Após as coletas, as carcaças dos animais eutanasiados foram armazenados em freezer para posterior descarte em lixo (resíduos sólidos biológicos) destinado a incineração.

Figura 19 - Material extraído para análises

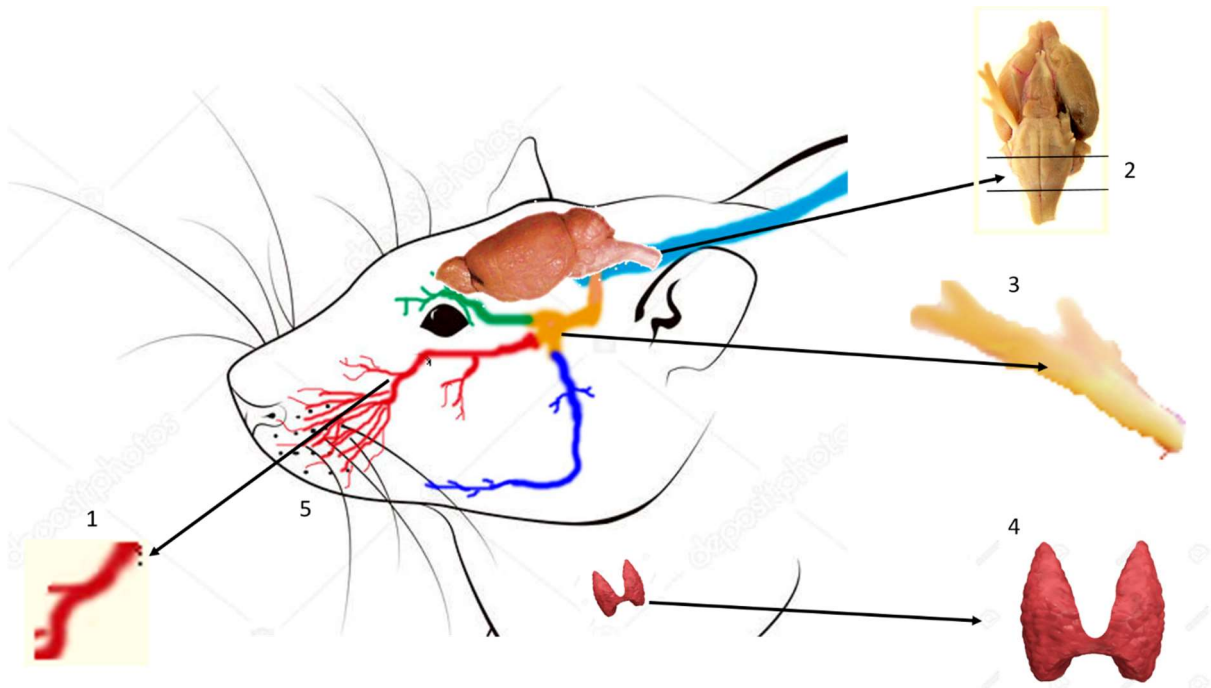


Ilustração mostrando o material coletado após eutanásia para as análises histopatológicas e imunofluorescência. 1 – Nervo Infraorbital, 2 – Subnúcleo caudal do trato espinhal do nervo trigêmeo, 3 – Gânglio Trigeminal, 4 – Glândula Tireoide e 5 – Pele da almofada vibrissal.

Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 20 - Medidas da Tireoide

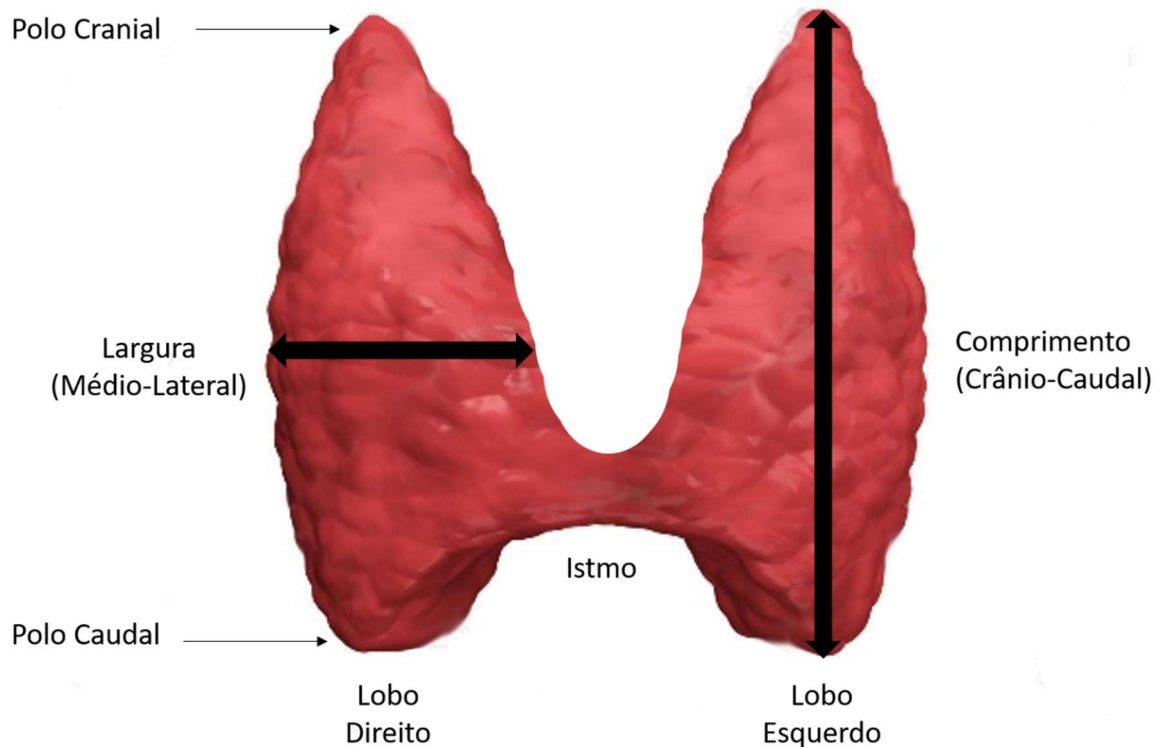


Ilustração demonstrando a medição das grandezas da Glândula Tireoide.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor

5.6 Imunofluorescência

O material coletado e preservado a -80°C , foi posteriormente cortado em criostato Leica[®] CM1100 à temperatura de -25°C na espessura de $8\ \mu\text{m}$ e montado em lâminas silanizadas ImmunoSlide para imunohistoquímica (Easy Path[®]) para realização do protocolo de imunofluorescência.

Para evidenciar as fibras nervosas da pele foi feita imunofluorescência utilizando-se anticorpo anti-PGP 9.5 (Abcam[®]) e DAPI (Invitrogen[®]) para evidenciar núcleos celulares das células de Schwann e demais células adjacentes. O gânglio trigeminal e o subnúcleo caudal do trato espinhal do trigêmeo foram incubados com os anticorpos anti-ATF3 (Abcam[®]), anti-c-Fos (Santa Cruz Biotechnology[®]) para marcar a expressão das proteínas correspondentes e com o anticorpo NeuN (conjugado com Alexa fluor 488 - Millipore[®]) para evidenciar os corpos celulares de neurônios. Os cortes de nervos infraorbitais foram incubados com anti-PBM (Santa

Cruz Biotechnology[®]) para evidenciar a bainha de mielina nas fibras nervosas e DAPI para marcar os núcleos das células de Schwann.

Para isso, os cortes histológicos foram secados em temperatura ambiente, fixados por 2 min em álcool metílico (Metanol) P.A. (Sigma[®]), lavados em solução tamponada de fosfato (PBS), e imersos em tampão citrato 0,1M (pH 6,0), sob aquecimento a 95°C em forno de micro-ondas, por 15 minutos para a recuperação antigênica. Após o resfriamento, obtido em temperatura ambiente durante 20 minutos, foram feitas lavagens com solução de PBS e bloqueio das ligações inespecíficas com glicina (0,3M) em Albumina Sérica Bovina 5% (BSA) durante 30 min. Os cortes foram incubados “*overnight*” (4°C) com os anticorpos primários policlonais anti-PGP 9.5, anti-ATF3, anti-c-Fos e anti-PBM.

Depois de incubados overnight os cortes foram lavados e depois incubados por 90 minutos em soluções contendo espécies anticorpos específicos secundário Anti IgG para coelho conjugados a Alexa flúor 568, 594 ou 488 (Invitrogen[®]). O DAPI foi acrescentado ao final para evidenciar os núcleos celulares. Estudos de controle de imunomarcação foram realizados por omissão dos anticorpos primários (controle negativos). Para diferenciação de neurônios foi utilizado o anticorpo fluorescente NeuN (conjugado a Alexa flúor 488) por imunofluorescência direta. Após lavagens, todas as seções foram montadas em meio próprio e armazenadas em câmara escura a 4 °C até a leitura em microscópio confocal (Zeis[®] LSM-710).

5.7 Histopatologia das tireoides

As glândulas tireoides preservadas em álcool etílico 70% (Dinâmica[®]), foram desidratadas em banhos de álcool etílico 70%, 80%, 90% e 100%, e desengorduradas em Xilol P.A. (Dinâmica[®]), depois emblocadas em parafina. Em seguida, os blocos contendo as tireoides foram cortados em micrótomo (Leica[®]) e montadas em lâminas histológicas, coradas com Hematoxilina e Eosina (HE), e cobertas com lamínula fixada em Entellan (Merk[®]).

5.8 Análise da Imagens

As imagens foram coletadas sequencialmente usando um microscópio laser de varredura confocal (Zeis[®] LSM-710), observando-se a padronização do ganho mestre (“master gain”), contraste (“offset”) e o ganho digital (“digital gain”) para todas as amostras fotografadas. As imagens obtidas foram editadas (inclusão da escala) e convertidas para o formato de imagem TIFF (*Tagged Image File Format*) usando o software ZEN[®] Blue.

A localização do subnúcleo caudal do trato espinhal do nervo trigêmeo nos cortes, foi feita encontrando na lâmina a região “Sp5C” esquerda (Paxinos & Watson, 2007).

A quantificação da área marcada com ATF3 e c-Fos nas fotomicrografias foram feitas demarcando-se a área de interesse (onde se encontravam os corpos celulares) nos gânglios trigeminais e no subnúcleo caudal do trato espinhal do trigêmeo, excluindo-se a área restante. Afim de definir o nível de expressão desses marcadores, depois de isolada a área de interesse, foi realizada a mensuração das áreas marcadas (μm^2) pela maior saturação de cor associada (vermelha) em razão da área total demarcada também pela maior saturação da cor associada à marcação do NeuN (Verde), expressada em percentagem (%).

A quantificação da marcação de PBM nas fotomicrografias foi feita pela obtenção da densidade de marcação no histograma (pixels) em razão da área total das fibras nervosas demarcadas pela maior saturação da cor associada (vermelha) expressados em $\text{pixels}/\mu\text{m}^2$. A quantificação da marcação de DAPI nas fotomicrografias foi feita pela mensuração das áreas marcadas (μm^2) pela maior saturação de cor associada (azul) em razão da área total do nervo infraorbital demarcada por seleção. Para isso, foi utilizado um software de livre acesso Fiji[®] ImageJ[®] (versão 1.51k).

As marcações em PGP 9.5 das fibras nervosas na pele, foram obtidas em microscópio laser de varredura confocal (Zeis[®] LSM-710) em três dimensões (3D) pela varredura em camadas sequenciadas, e depois sobrepostas, para formar uma imagem de duas dimensões (2D). Devido as características nas imagens 3D, tais como as disposições das terminações nervosas e a quantidade de imagem obtidas, não foi possível quantificar as estruturas marcadas. Assim, os resultados da imuno-marcação de PGP 9.5 foi expresso descritivamente.

As lâminas de tireoide foram observadas qualitativamente e fotografadas em microscópio ótico (Leica[®]) no aumento de 400x. As imagens foram submetidas a análise histopatológica, para verificação do formato e preenchimentos dos folículos tireoidianos (coloide), da morfologia das células foliculares e alterações na quantidade de células foliculares.

5.9 Análise estatística

Os resultados referentes às análises da evolução temporal dos pesos dos animais, das dosagens sorológicas do hormônio tireoidiano T4, dos pesos e medidas das tireoides coletadas, da aferição do limiar nociceptivo na almofada vibrissal, da quantificação da área marcada nos ensaios de imunofluorescência de ATF3 e c-FosS dos gânglio trigeminal e subnúcleo caudal do trato espinhal do nervo trigêmeo e da densidade de marcação do ensaio de imunofluorescência de PBM e área marcada com DAPI no nervo Infraorbital foram expressos pela média \pm EPM das medidas registradas com intervalo de confiança (CI) (máximo e mínimo), a fim de determinar a possível associação entre os parâmetros, dosagens e aferições realizadas a partir de 6 animais por grupo.

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar se os dados de cada variável analisada apresentavam distribuição normal (dados paramétricos, com grupos com menos de 30 indivíduos). Os valores de “*outliers*” foram retirados (quando ocorreram e indicados pelo teste), por não representarem os resultados que o estudo tinha o objetivo de generalizar (p-valor >0.05 para o teste de Shapiro-Wilk) (FIELD, 2013).

Os dados paramétricos foram analisados através do teste de ANOVA *one-way*, para a comparação das médias entre variáveis dos grupos. O pós-teste (*pos-hoc*) para a ANOVA *one-way* foi definido a partir da análise da homogeneidade de variâncias através do teste de Levene. Caso houvesse homogeneidade de variâncias ($p \geq 0,05$), foi definido como pós-teste para a ANOVA o teste de Tukey. Caso não houvesse homogeneidade de variâncias entre os dados ($p < 0,05$), foi definido como pós-teste para a ANOVA o teste de Games-Howell (FIELD, 2013).

O teste de correlação de *Spearman* foi utilizado para a obtenção dos valores de r e *r-square* (r^2) que demonstram a influência das concentrações plasmáticas dos hormônios tireoidianos sobre o comprimento, largura e peso da glândula tireoide, e sobre o limiar nociceptivo dos grupos não neuropáticos (C, NT-S, H e H+NT-S). A análise da correlação foi assim considerada: desprezível, para $0 \leq r \leq 0,3$ e $-0,3 \geq r \geq 0$; fraca para $0,3 < r \leq 0,5$ e $-0,5 \geq r > -0,3$; moderada para $0,5 < r \leq 0,7$ e $-0,7 \geq r > -0,5$; forte para $0,7 < r \leq 0,9$ e $-0,9 \geq r > -0,7$; e muito forte para $r > 0,9$ e $r < -0,9$ (MUKAKA, 2012).

O nível de significância estatística utilizado foi de $p < 0,05$ e todas as análises foram efetuadas com recurso do software IBM® SPSS® statistics 20 e gráfico elaborados usando os recursos do software GraphPad Prism® 6.0.

6 RESULTADOS

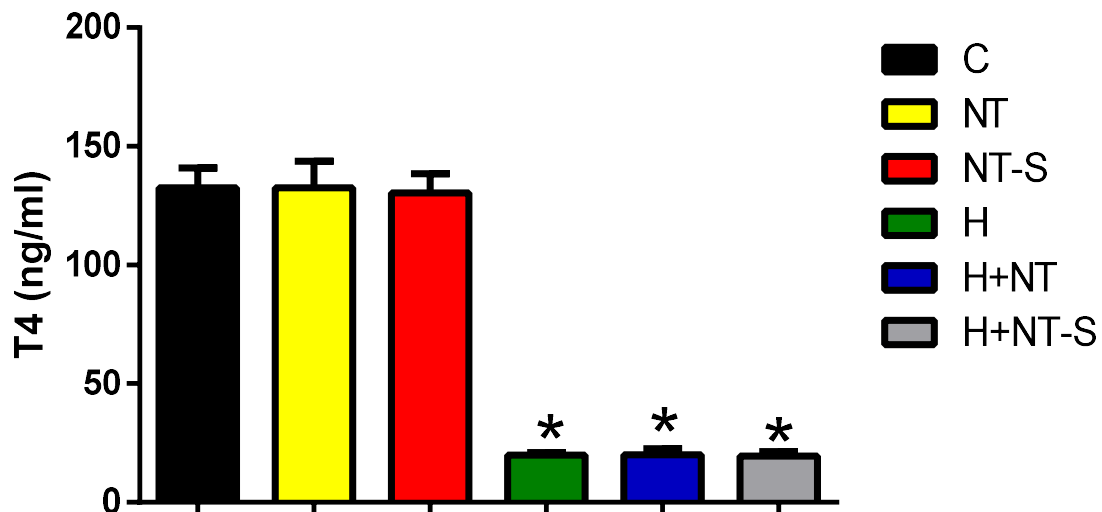
6.1 Implantação e validação do modelo experimental de indução do hipotireoidismo em ratos sob administração de PTU

6.1.1 Concentração Sérica de Tiroxina (T4) no 21º dia de experimentação

A determinação das concentrações séricas do hormônio T4 foi realizada para comprovação da indução e instalação do hipotireoidismo no modelo de indução da doença por ingestão do PTU. Inicialmente, demonstramos os resultados das dosagens de T4 (ng/ml) na associação entre os grupos de animais que não foram induzidos o hipotireoidismo (C, NT e NT-S) e os grupos os quais foram induzidos o hipotireoidismo (H, H+NT e H+NT-S) (Gráfico 1).

Nesta análise, pode-se observar que as concentrações plasmáticas de T4 encontravam-se significativamente reduzidas nos grupos com hipotireoidismo induzido (H: $19,86 \pm 1,25$ ng/ml, H+NT: $20,14 \pm 2,45$ ng/ml, H+NT-S: $19,64 \pm 1,69$ ng/ml) em relação aos grupos hipotireoidismo não induzidos (C: $132,55 \pm 8,42$ ng/ml, NT: $132,50 \pm 11,29$ ng/ml, NT-S: $130,42 \pm 7,96$ ng/ml), ($p < 0,0001$, Gráfico 1, ver Apêndice A).

Gráfico 1 - Dosagem hormonal de tiroxina (T4)



O gráfico representa a concentração sérica de tiroxina (T4) em ng/ml, medida após 21 dias de uso do propiltiuracil (PTU). Os grupos com indução de hipotireoidismo (H, H+NT e H+NT-S) apresentaram diminuição da concentração de tiroxina (T4) comparado aos grupos sem indução de hipotireoidismo (C, NT e NT-S). *, diferença estatisticamente significativa quando comparado os com e sem indução do Hipotireoidismo ($P < 0,0001$, ANOVA one way, pos-hoc de Games-Howell).

6.1.2 Análise da evolução ponderal

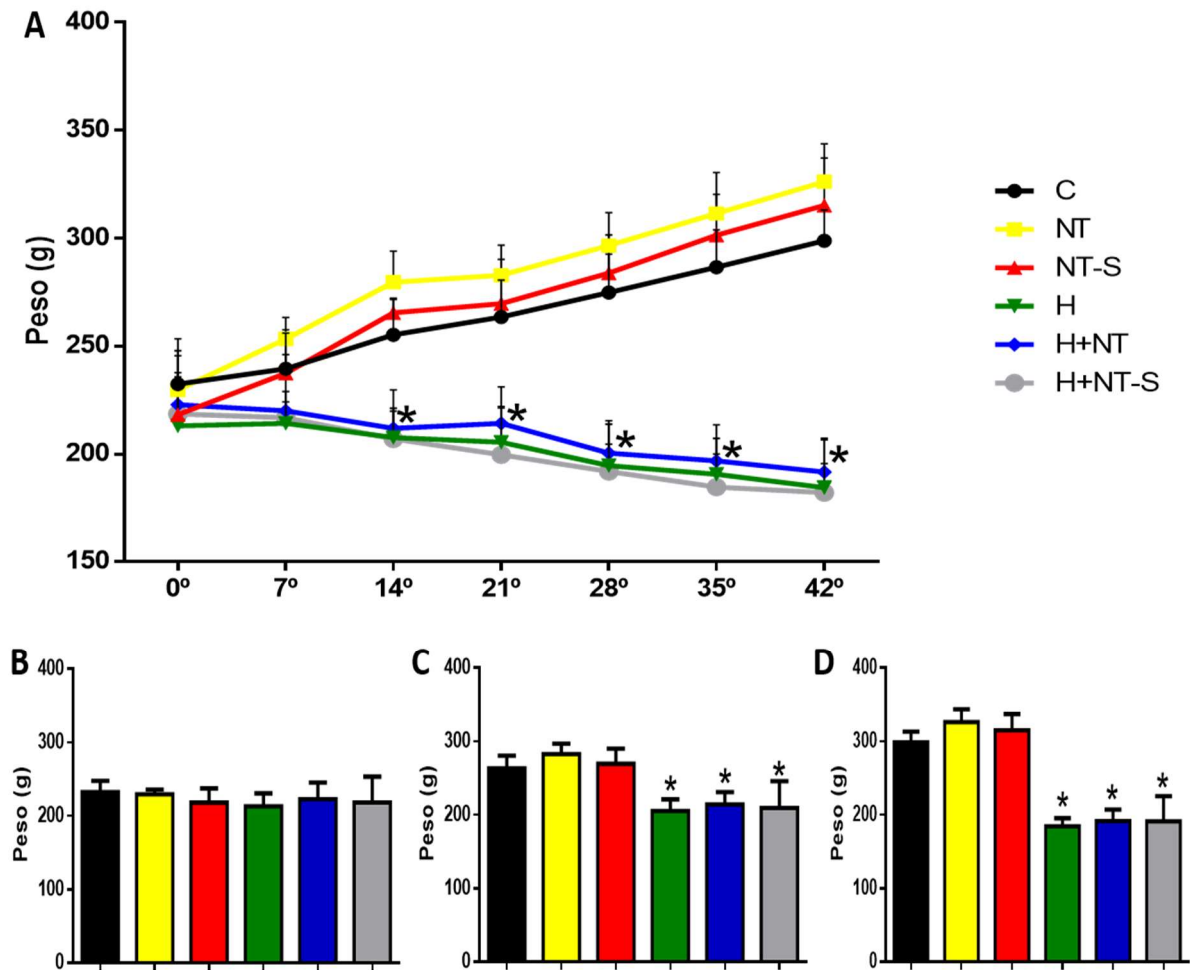
O acompanhamento do ganho ponderal foi realizado para avaliar os efeitos da indução do hipotireoidismo sobre o ganho de peso dos animais, bem como corroborar com a comprovação da indução e instalação do hipotireoidismo na confirmação do modelo de indução da doença por ingestão do PTU. Além disso também confirma que o ato cirúrgico não causa dano incapacitante nos animais.

No gráfico 2A, podemos observar a curva de ganho ponderal durante todo o período experimental de 42 dias. Primeiramente, somente a partir do 14º dia em diante (21º, 28º, 35º e 42º), de execução do protocolo de indução, foi possível identificar uma significativa diferença dos pesos (g) dos animais dos grupos hipotireoidismo induzidos (H, H+NT e H+NT-S) quando comparados aos pesos dos animais dos grupos hipotireoidismo não induzido (C, NT e NT-S) ($p < 0,001$, Gráfico 2A).

Mais detalhadamente, podemos ver, por exemplo, no gráfico 2B que, ao início do protocolo experimental, não havia diferença estatística entre os pesos dos animais e os grupos experimentais analisados ($p > 0,05$, Apêndice B). Entretanto, ao analisarmos as aferições dos pesos dos animais nos 21º (fim do período de indução) e 42º (fim do período experimental) dias, pudemos observar uma diferença significativa entre os pesos dos grupos hipotireoidismo induzidos (H, H+NT e H+NT-S), tratados com PTU e hipotireoidismo não induzido (C, NT e NT-S), não tratados com PTU, demonstrando o efeito da instalação do hipotireoidismo sobre o ganho ponderal dos animais tratados com PTU (Gráficos 2C e 2D; ver Apêndices C e D).

Além dos achados analisados do ganho ponderal, também foi verificadas alterações comportamentais nos grupos experimentais hipotireoidismo induzidos (H, H+NT e H+NT-S) durante o período experimental, tais como apatia, letargia e anorexia.

Gráficos 2A, 2B, 2C e 2D - Curva de evolução ponderal em 42 dias experimentais



O gráfico A representa o ganho ponderal dos ratos de todos os grupos experimentais, tratados e não tratados com PTU, por 42 dias, onde os grupos H, H+NT e H+NT-S (tratados com PTU) apresentaram decréscimo do peso ao longo dos 42 dias, enquanto os grupos C, NT e NT-S (não tratados com PTU) apresentam ganho ponderal positivo. *, $p < 0,0001$ diferença entre os grupos não tratados com PTU comparado aos grupos que receberam PTU (H, H+NT e H+NT-S). O gráfico B, mostra a ausência de diferença ($p > 0,05$) entre os pesos dos grupos experimentais ao início do experimento, nos gráficos C e D, após o período de indução do hipotireoidismo com PTU e ao final da experimentação (42 dias) respectivamente, houve diferença entre os grupos tratados com PTU e não tratado (ANOVA two way, teste pos-hoc de Tukey).

6.1.3 Efeito da Indução do Hipotireoidismo sobre a morfometria da Glândula Tireoide

As mediações das dimensões, bem como a pesagem da glândula tireoide, foram feitas para verificar o efeito do hipotireoidismo sobre o desenvolvimento da glândula em todos os grupos experimentais após 42 dias de protocolo (Figura 21). Além de mostrar dados morfológicos que corroborem com a comprovação da instalação do hipotireoidismo e confirmação do modelo de indução da doença por ingestão do PTU.

Figura 21 - Tireoides de ratos com e sem hipotireoidismo

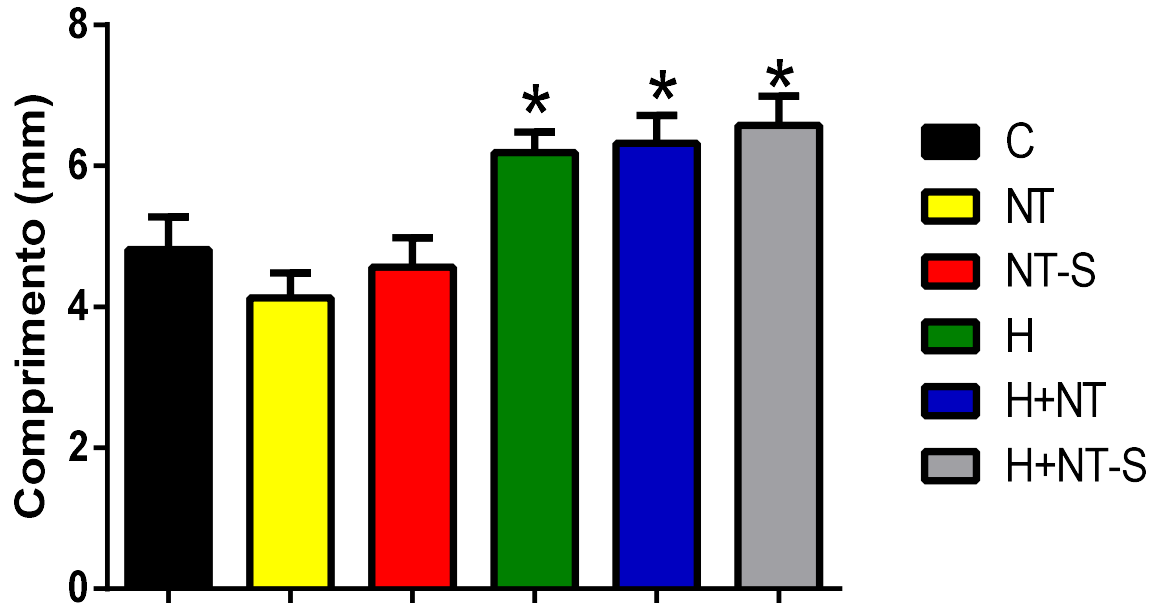


Fotografia de tireoides coletadas durante as eutanásias dos grupos experimentais, mostrando a diferença morfológica entre uma tireoide de animal com hipotireoidismo (hipertrofiada da glândula) e uma de animal sem hipotireoidismo.

Fonte: Fotografada e editada pelo próprio autor.

Inicialmente, foram analisados os comprimentos craniocaudais médios dos lobos da tireoide dos ratos de todos os grupos experimentais avaliados (Gráfico 3). Nesta análise, observamos que o comprimento médio das tireoides nos grupos de animais que receberam PTU (H: $6,19 \pm 0,28$ mm, H+NT: $6,32 \pm 0,39$ mm, H+NT-S: $6,57 \pm 0,41$ mm) mostrou-se significativamente aumentado em relação ao comprimento médio das tireoides dos grupos de animais que não receberam PTU (C: $4,81 \pm 0,45$ mm, NT: $4,13 \pm 0,35$ mm, NT-S: $4,56 \pm 0,41$ mm) ($p < 0,0001$; Gráfico 3; ver Apêndice E).

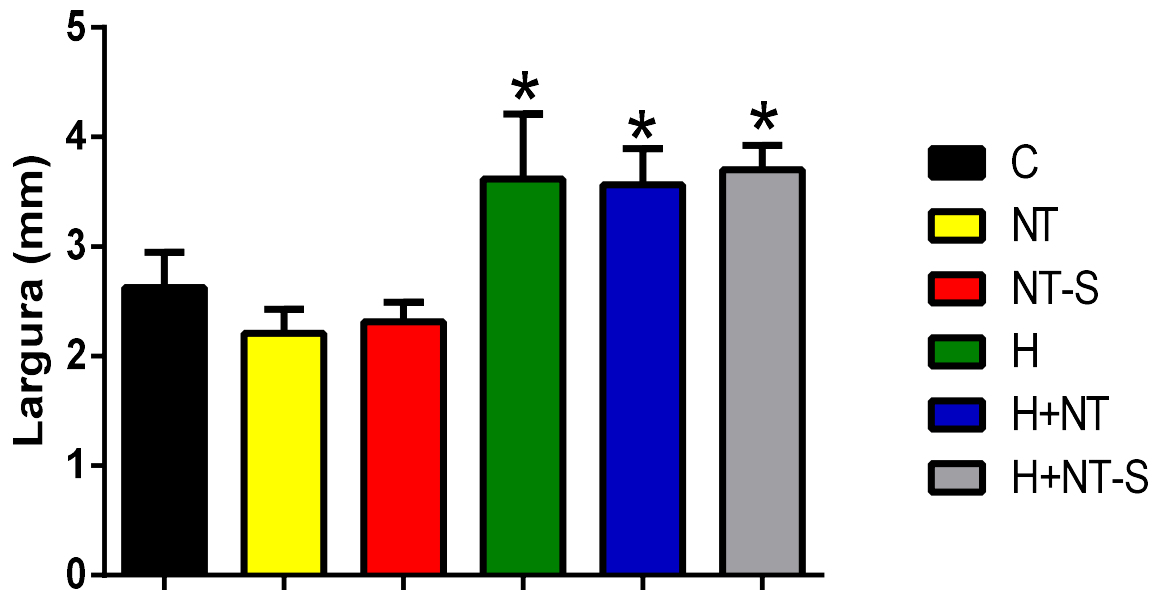
Gráfico 3 - Comprimento craniocaudal dos lobos da glândula tireoide



O gráfico representa os comprimentos craniocaudal médios das tireoides dos ratos de todos os grupos experimentais, tratados e não tratados com PTU, no dia 42 do experimento. Os grupos tratados com PTU (H, H+NT e H+NT-S) apresentaram diferença estatística significativa comparado aos grupos não tratados (C, NT e NT-S). *, $p < 0,0001$ comparando os grupos que receberam PTU aos grupos que não receberam ao dia 42 (ANOVA one way, teste pos-hoc de Tukey).

Posteriormente, avaliamos as medições da largura médio-lateral média dos lobos da tireoide dos ratos de todos os grupos experimentais analisados (Gráfico 4). Observamos que a largura média das tireoides nos grupos de animais que receberam PTU (H: $3,61 \pm 0,59$ mm, H+NT: $3,56 \pm 0,32$ mm, H+NT-S: $3,70 \pm 0,22$ mm) mostrou-se significativamente aumentada em relação a largura média das tireoides dos grupos de animais que não receberam PTU (C: $2,62 \pm 0,32$ mm, NT: $2,21 \pm 0,21$ mm, NT-S: $2,31 \pm 0,17$ mm) ($p < 0,05$; Gráfico 4; ver Apêndice F).

Gráfico 4 - Largura médio-lateral dos lobos da Glândula Tireoide

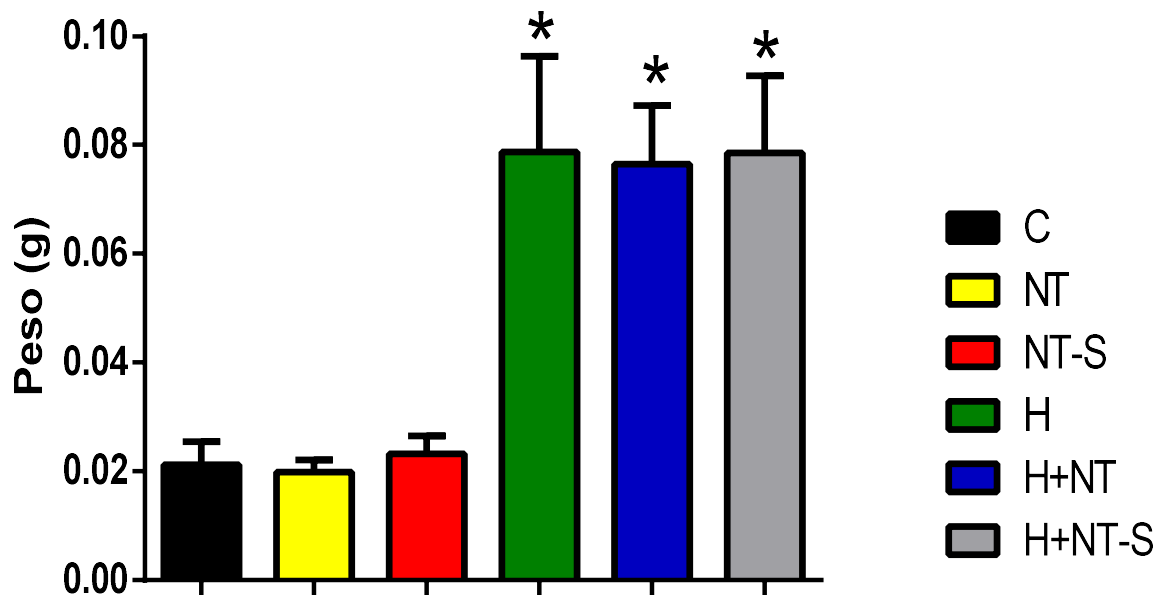


O gráfico representa as larguras médio-lateral médias das tireoides dos ratos de todos os grupos experimentais, tratados e não tratados com PTU, ao dia 42 do experimento. Os grupos tratados com PTU (H, H+NT e H+NT-S) apresentaram diferença estatística significativa comparado aos grupos não tratados (C, NT e NT-S). *, $p < 0,05$ comparando os grupos que receberam PTU aos grupos que não receberam ao dia 42 (ANOVA one way, teste pos-hoc de Games-Howell).

Por fim, foram aferidos os pesos médios dos lobos da tireoide dos ratos de todos os grupos experimentais analisados (Gráfico 5). Para esta análise, identificamos que o peso das tireoides nos grupos que receberam PTU (H: $0,078 \pm 0,017$ mm, H+NT: $0,076 \pm 0,010$ mm, H+NT-S: $0,078 \pm 0,014$ mm) mostrou-se significativamente aumentado em relação ao peso das tireoides dos grupos que não receberam PTU (C: $0,021 \pm 0,004$ mm, NT: $0,019 \pm 0,002$ mm, NT-S: $0,023 \pm 0,002$ mm) ($p < 0,001$; Gráfico 5; ver Apêndice G).

Assim, após as análises de todos estes dados morfométricos, podemos inferir que o hipotireoidismo induzido por PTU, leva a glândula tireoide a uma hipertrofia significativa (Figura 21).

Gráfico 5 - Peso médio da Glândula Tireoide



O gráfico representa o peso médio das tireoides dos ratos de todos os grupos experimentais, tratados e não tratados com PTU, ao dia 42 do experimento. Os grupos tratados com PTU (H, H+NT e H+NT-S) apresentaram diferença estatística significativa comparado aos grupos não tratados (C, NT e NT-S). *, $p < 0,0001$ comparando os grupos que receberam PTU aos grupos que não receberam ao dia 42 (ANOVA one way, teste pos-hoc de Games-Howell).

6.1.4 Correlação entre as concentrações plasmáticas de T4 e a morfometria e peso da Tireoide

As análises de correlação entre as concentrações plasmáticas de T4 sanguíneo e as dimensões e pesos das glândulas tireoide (hipertrofia) (Gráficos 6, 7 e 8), foram obtidas a partir da análise do teste de correlação de *Spearman* (R) com obtenção do r^2 (*R square*), a fim de definir a influência que o hormônio T4 exerce sobre o desenvolvimento da glândula tireoide.

Inicialmente, observou-se que há uma forte correlação negativa entre as concentrações plasmáticas de T4 sanguíneo e o comprimento ($r = -0,774524$, $p < 0,000001$), demonstrando que o nível de T4 é responsável por 81,7% ($r^2 = 0,817$) da variação do comprimento dos lobos da glândula tireoide (Gráfico 6; ver Apêndice H).

Gráfico 6 - Correlação entre as concentrações plasmáticas de T4 e o comprimento craniocaudal dos lobos da glândula tireoide após ingestão de PTU

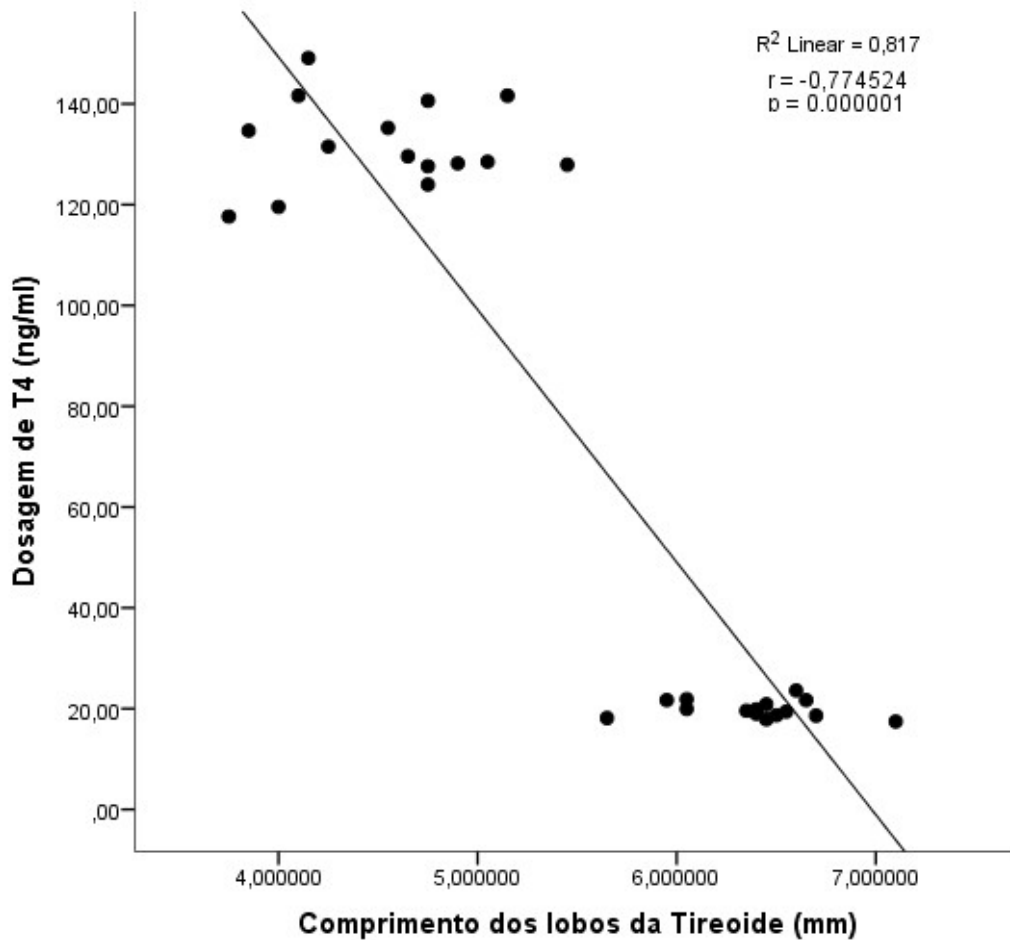


Gráfico mostrando a correlação entre as concentrações plasmáticas de T4 livre (nm/ml) e o comprimento (mm) dos lobos das tireoides, há uma forte correlação negativa entre o comprimento dos lobos das tireoides e as concentrações plasmáticas de T4 ($r = -0,774$ em $R^2 = 0,817$) (Correlação de Spearman).

Posteriormente, identificou-se que há uma forte correlação negativa entre as concentrações plasmáticas de T4 sanguíneo e a largura ($r = -0,773001$, $p < 0,000001$), demonstrando que o nível de T4 é responsável por 76,2% ($r^2 = 0,762$) da variação da largura dos lobos da glândula tireoide (Gráfico 7; ver Apêndice H).

Gráfico 7 - Correlação entre as concentrações plasmáticas de T4 e a largura (médio-lateral) dos lobos da glândula tireoide após ingestão de PTU

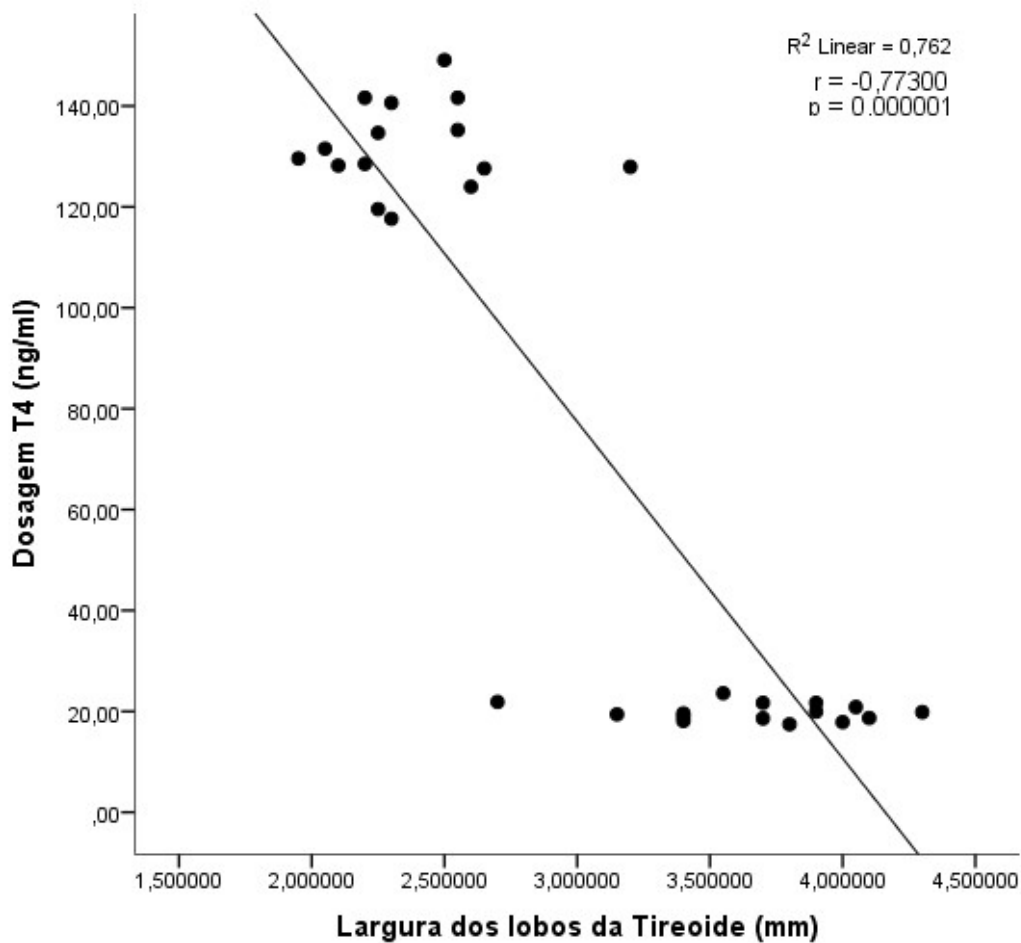


Gráfico mostrando a correlação entre as concentrações plasmáticas de T4 livre (nm/ml) a largura (mm) dos lobos das tireoides, Há uma forte correlação negativa entre a largura dos lobos das tireoides e as concentrações de T4 ($r = -0,773$ em $R^2 = 0,762$) (Correlação de Spearman).

Por fim, verificou-se que há uma forte correlação negativa entre as concentrações plasmáticas de T4 sanguíneo e o peso ($r = -0,743213$, $p = 0,000166$) demonstrando que o nível de T4 é responsável por 88,5% ($r^2 = 0,885$) da variação do peso dos lobos da glândula tireoide (Gráfico 8; ver Apêndice H).

Gráfico 8 - Correlação entre as concentrações plasmáticas de T4 e o peso dos lobos da glândula tireoide após ingestão de PTU

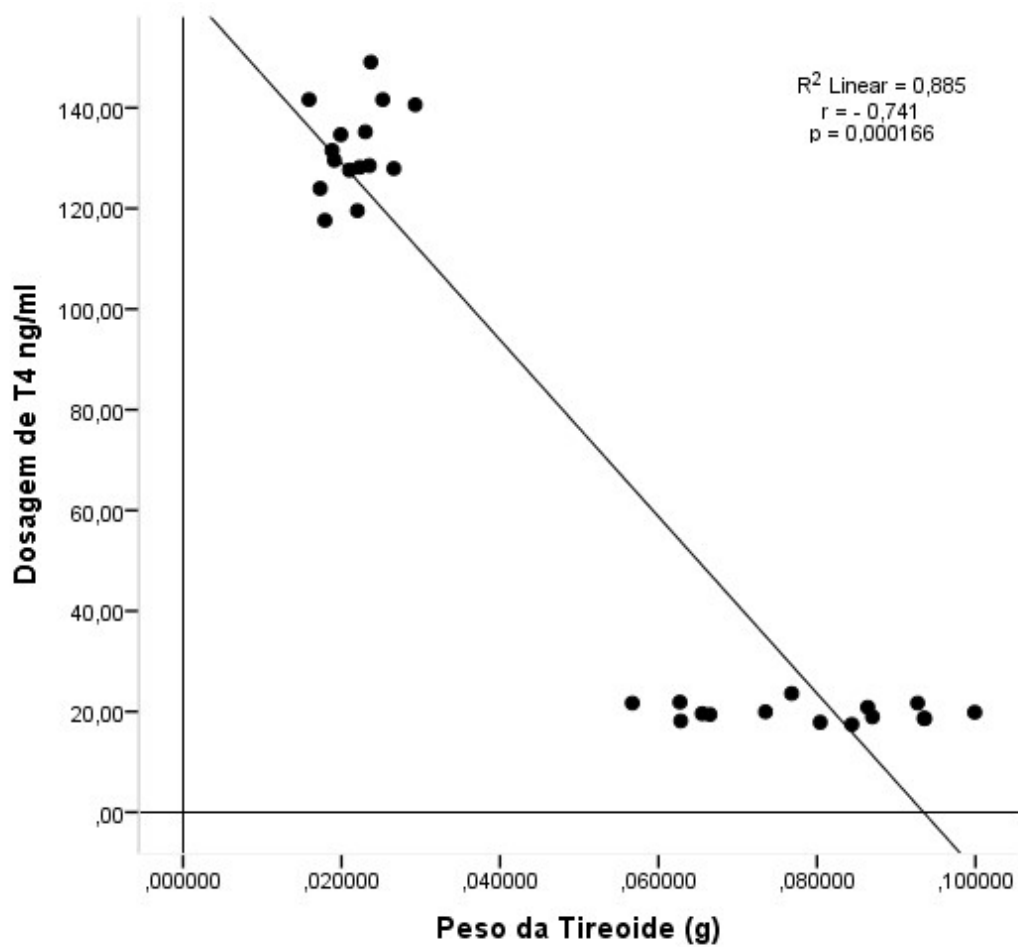


Gráfico mostrando a correlação entre as concentrações plasmáticas séricas de T4 livre (nm/ml) o peso (g) dos lobos das tireoides, há uma forte correlação negativa entre o peso dos lobos das tireoides e concentrações de T4 ($r = -0,741$ em $R^2 = 0,885$) (Correlação de Spearman).

6.1.5 Análise histopatológica da glândula tireoide

Foram preparadas lâminas histológicas das glândulas tireoides coletadas dos animais na eutanásia após 42 dias de protocolo de indução do hipotireoidismo por PTU para todos os grupos analisados (C, NT, NT+S, H, H+NT E H+NT-S) (Figura 22). Primeiramente, identificamos que nos grupos de animais que fizeram uso do PTU (H, H+NT E H+NT-S) houve uma diminuição parcial ou total do material colóide (indicado pelas setas pretas nas imagens histológicas presentes nos grupos de animais sem Hipotireoidismo), bem como alterações na morfologia dos folículos tireoidianos, onde ocorreu perda do formato folicular (circular) e hiperplasia das células foliculares, indicadas pelas setas vermelhas (Figura 22). Os grupos C, NT e NT+S, não apresentaram tais alterações, mantendo sua morfologia usual (Figura 22).

Assim, após as análises histopatológicas, podemos inferir que o hipotireoidismo induzido por PTU induziu a glândula tireoide a uma hiperplasia significativa (Figura 22).

Figura 22 - Imagens histológicas das glândulas tireoides de todos os grupos experimentais

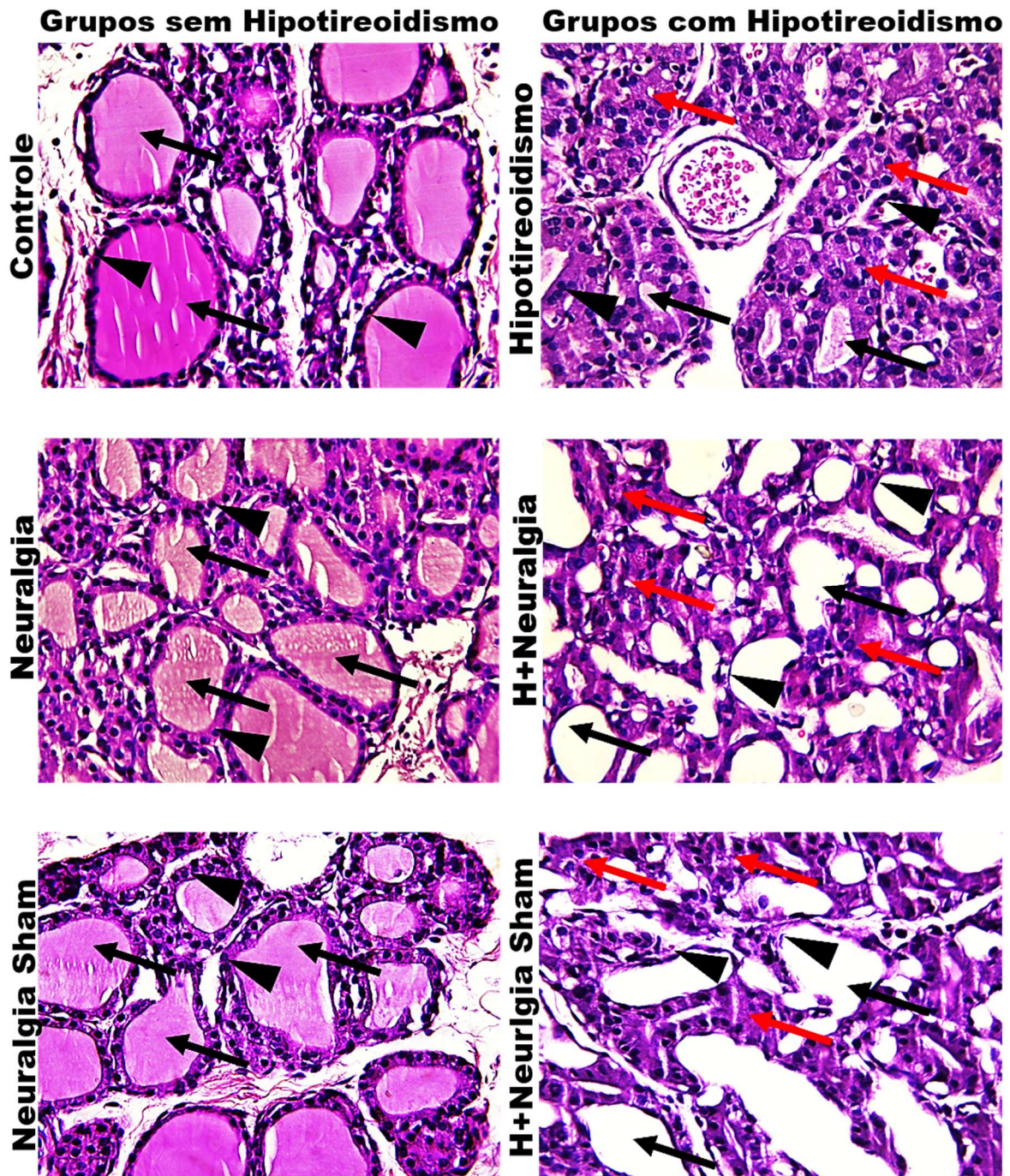


Ilustração contendo fotomicrografias de cortes histológicos de tireoides em HE, mostrando a área folicular nos grupos experimentais. Conforme indicam as setas pretas, visualizamos a presença de coloide (tiroglobulina) no interior dos folículos tireoidianos, bem como seus formatos arredondados nos grupos sem hipotireoidismo, nas setas vermelhas visualizamos ausência de coloide total ou parcial deformação na morfologia do folículo e ainda hiperplasia. Imagens observadas em fotomicrografias em aumento de 400x.

6.2 Avaliação do Limiar nociceptivo no teste de hiperalgesia mecânica na almofada vibrissal esquerda

O limiar nociceptivo foi aferido em todos grupos durante todo período experimental, semanalmente, durante a fase de indução do hipotireoidismo (primeiros 21 dias), e, após a realização das cirurgias, na fase de indução da neuropatia trigeminal, foi aferido 2 vezes por semana (por mais 21 dias) até o 42º dia (dia da eutanásia) (Gráfico 9A).

Ao início do protocolo de indução do hipotireoidismo (dia 0), pela análise da ANOVA *two-way*, não foram observadas diferenças estatísticas entre os limiares nociceptivos dos grupos experimentais avaliados (C: $75,99 \pm 2,98$ g, NT: $73,25 \pm 4,68$ g, NT-S: $76,46 \pm 9,45$ g, H: $77,69 \pm 2,17$ g, H+NT: $74,14 \pm 4,77$ g, H+NT-S: $74,30 \pm 10,37$ g, $p > 0,05$) (Gráficos 9A, 9B; ver Apêndice I). Ainda no Gráfico 9A, podemos observar a evolução temporal do limiar nociceptivo no período de indução do hipotireoidismo, o qual manteve-se sem diferença estatística nas análises intergrupos ($p > 0,05$) até a instalação do hipotireoidismo por volta do 21º dia, confirmada pela dosagem de T4 (Gráfico 1).

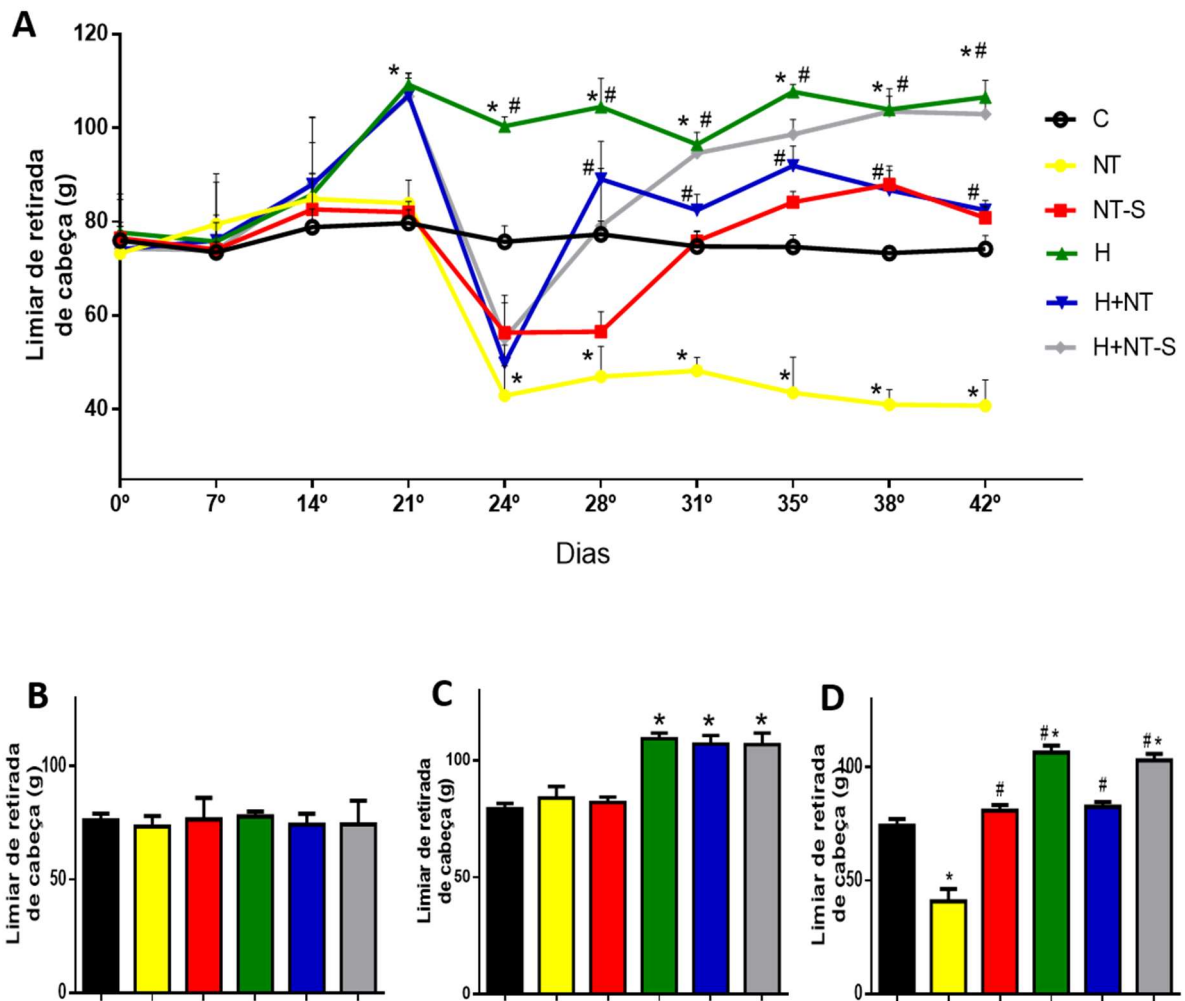
Ao 21º dia, confirmada a instalação do hipotireoidismo (Gráfico 1), foi observado uma diferença significativa entre os limiares nociceptivos dos grupos de animais com hipotireoidismo induzido (H: $109,25 \pm 2,39$ g, H+NT: $106,94 \pm 3,64$ g e H+NT-S: $106,71 \pm 4,96$ g) e os grupos de animais hipotireoidismo não induzido (C: $79,28 \pm 2,28$ g, NT: $83,90 \pm 4,92$ g e NT-S: $81,99 \pm 2,30$ g) ($p < 0,000001$; Gráficos 9A e 9C; ver Apêndice J).

Após a cirurgia de indução da neuralgia trigeminal, entre o 21º e o 28º dias, aproximadamente, observou-se uma queda no limiar nociceptivo de todos grupos que receberam intervenção cirúrgica (NT, NT-S, H+NT e H+NT-S) ($p < 0,0001$) quer seja com ligadura do nervo, quer seja *Sham* (Gráfico 9A). Podemos ainda constatar no mesmo gráfico que, passada a fase inflamatória pós-cirúrgica (entre o 21º e o 28º dias): 1. nos grupos *Sham*, o limiar nociceptivo retornou ao patamar anterior (do 21º dia); 2. no grupo NT, o limiar manteve-se baixo, e 3. no grupo H+NT, o limiar elevou-se, mas mantendo-se próximo aos valores referentes ao grupo controle (Gráfico 9A).

Ao final do protocolo experimental (42º dia), os limiares nociceptivos de todos os grupos foram aferidos momentos antes da eutanásia e coleta de material. Referente ao 42º dia, identificamos que não houveram diferenças significantes entre os grupos C ($74,19 \pm 2,85$ g), NT-S ($80,81 \pm 2,42$ g) e H+NT ($82,46 \pm 2,05$ g) ($p > 0,05$; Gráfico 9A e 9D; ver Apêndice K). Contrariamente, foi possível identificar que o limiar de nocicepção do grupo NT ($40,75 \pm 5,45$ g) foi significativamente menor quando comparado a todos os grupos (complementa-se com os

valores de H: $106,41 \pm 3,06\text{g}$ e H+NT-S: $102,93 \pm 2,84\text{g}$ ($p < 0,000001$; Gráficos 9A e 9D; ver Apêndice K).

Gráficos 9A, 9B, 9C e 9D - Evolução temporal do Limiar nociceptivo de todos os grupos experimentais entre os dias 0 e 42 e limiares nos dias 0, 21 e 42



Gráficos representando o limiar nociceptivo dos grupos experimentais no decorrer dos 42 dias de protocolo experimental. Gráfico 9A representando a evolução temporal do limiar nociceptivo, na fase de indução do hipotireoidismo e na fase de indução da neuralgia (ANOVA two way, teste pos-hoc de Tukey), *, Diferença em relação ao controle ($p < 0,0001$), #, diferença em relação ao grupo Neuralgia Trigeminal ($p < 0,001$). No gráfico 9B representando o limiar nociceptivo dos grupos no dia 0 do protocolo experimental, onde não havia diferença entre os limiares nociceptivos dos grupos no dia 0 ($p > 0,05$). No gráfico 9C representando o limiar nociceptivo dos grupos no dia 21 do protocolo experimental, *, diferença entre os grupos com hipotireoidismo (H, H+NT e H+NT-S) e o controle no dia 21 ($p < 0,000001$) e gráfico 9D representando o limiar nociceptivo dos grupos no dia 42 do protocolo experimental, *, diferença em relação ao Controle ($p < 0,000001$), #, diferença em relação ao grupo NT (ANOVA one way, teste pos-hoc de Tukey).

6.3 Correlação entre as concentrações plasmáticas de T4 e o limiar nociceptivo

As análises de correlação entre as concentrações plasmáticas de T4 sanguíneo e o limiar nociceptivo ao final dos 42 dias de protocolo experimental (Gráfico 10), foram obtidas a partir da análise do teste de correlação de *Spearman* (R) com obtenção do r^2 (*R square*), a fim de definir a influência que o hormônio T4 exerce sobre a flutuação do limiar nociceptivo dos animais dos grupos experimentais.

Inicialmente, observou-se que há uma forte correlação negativa entre as concentrações plasmáticas de T4 sanguíneo e o limiar nociceptivo ($r = -0,745$, $p < 0,000166$), demonstrando que a concentração de T4 é responsável por 81,7% ($r^2 = 0,817$) da variação do limiar nociceptivo (Gráfico 10; ver Apêndice L).

Gráfico 10 - Correlação entre as concentrações plasmáticas de T4 e o limiar nociceptivo 42 dias de protocolo experimental

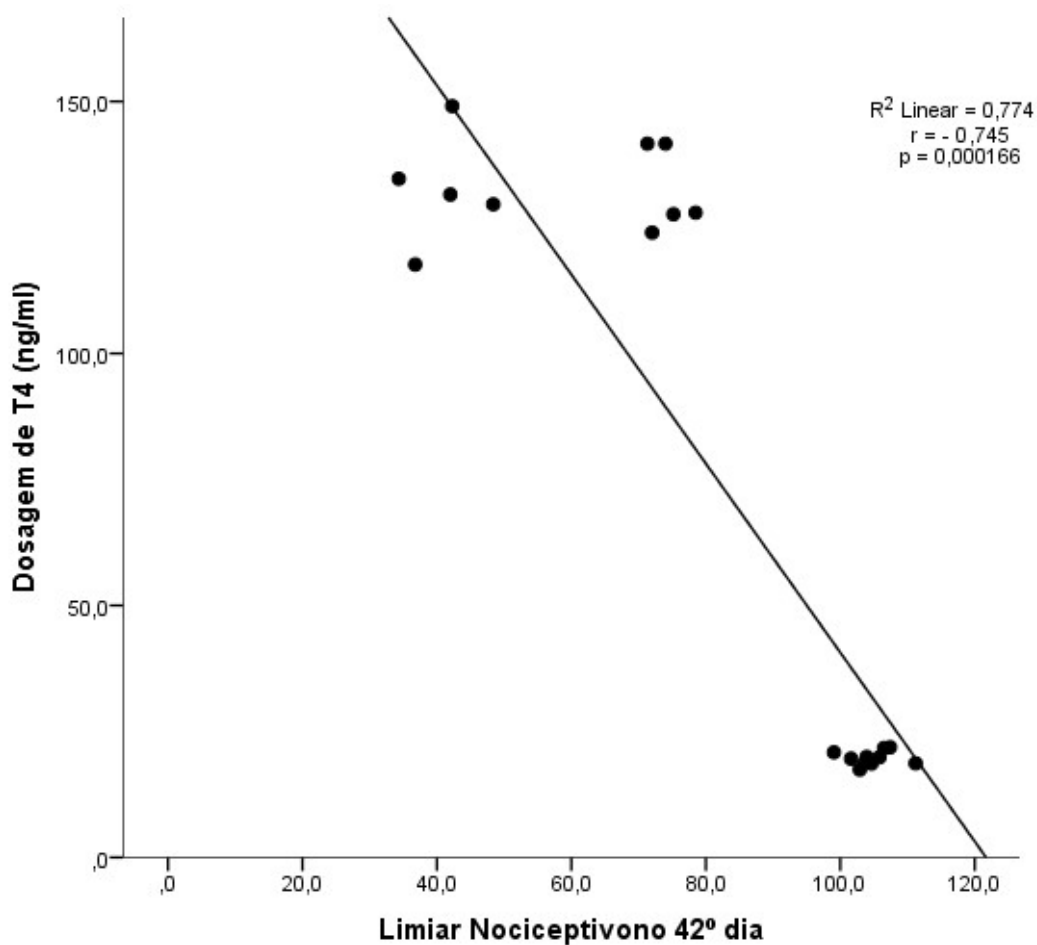


Gráfico mostrando a correlação entre as concentrações plasmáticas de T4 livre ($\eta\text{m/ml}$) e o limiar nociceptivo. Há uma forte correlação negativa entre concentrações de T4 e o limiar nociceptivo ($r = - 0,741$ em $R^2 = 0,885$) (Correlação de Spearman).

6.4 Imunofluorescência para c-Fos de gânglio trigeminal de ratos submetidos a indução de hipotireoidismo e indução de neuralgia trigeminal

A imunofluorescência para c-Fos em gânglio trigeminal de ratos, para todos os grupos experimentais, foi analisada, a partir de fotomicrografias, pela estimativa da área marcada com c-Fos em relação a área total celular marcada com NeuN (Figura 23). Para esta análise, foi observado que os grupos NT ($6,55 \pm 0,942\%$), H ($1,60 \pm 0,13\%$), H+NT ($1,82 \pm 0,10\%$) e H+NT-S ($1,76 \pm 0,10\%$) apresentavam aumento significativo da expressão de c-Fos quando comparados aos grupos C ($0,85 \pm 0,13\%$), NT-S ($0,47 \pm 0,61\%$) ($p < 0,0001$; Gráfico 11; ver Apêndice M). Além disto, especificamente o grupo NT apresentou um significativo aumento de expressão de c-Fos quando comparado aos grupos H, H+NT e H+NT-S ($p < 0,0001$, Gráfico 11; ver Apêndice M).

Gráfico 11 - Expressão de c-Fos em gânglio trigeminal

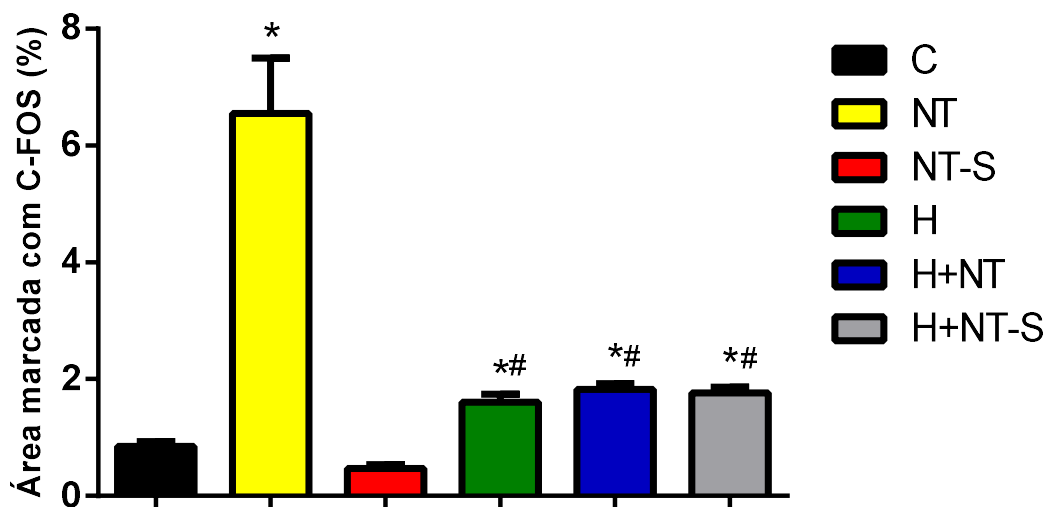
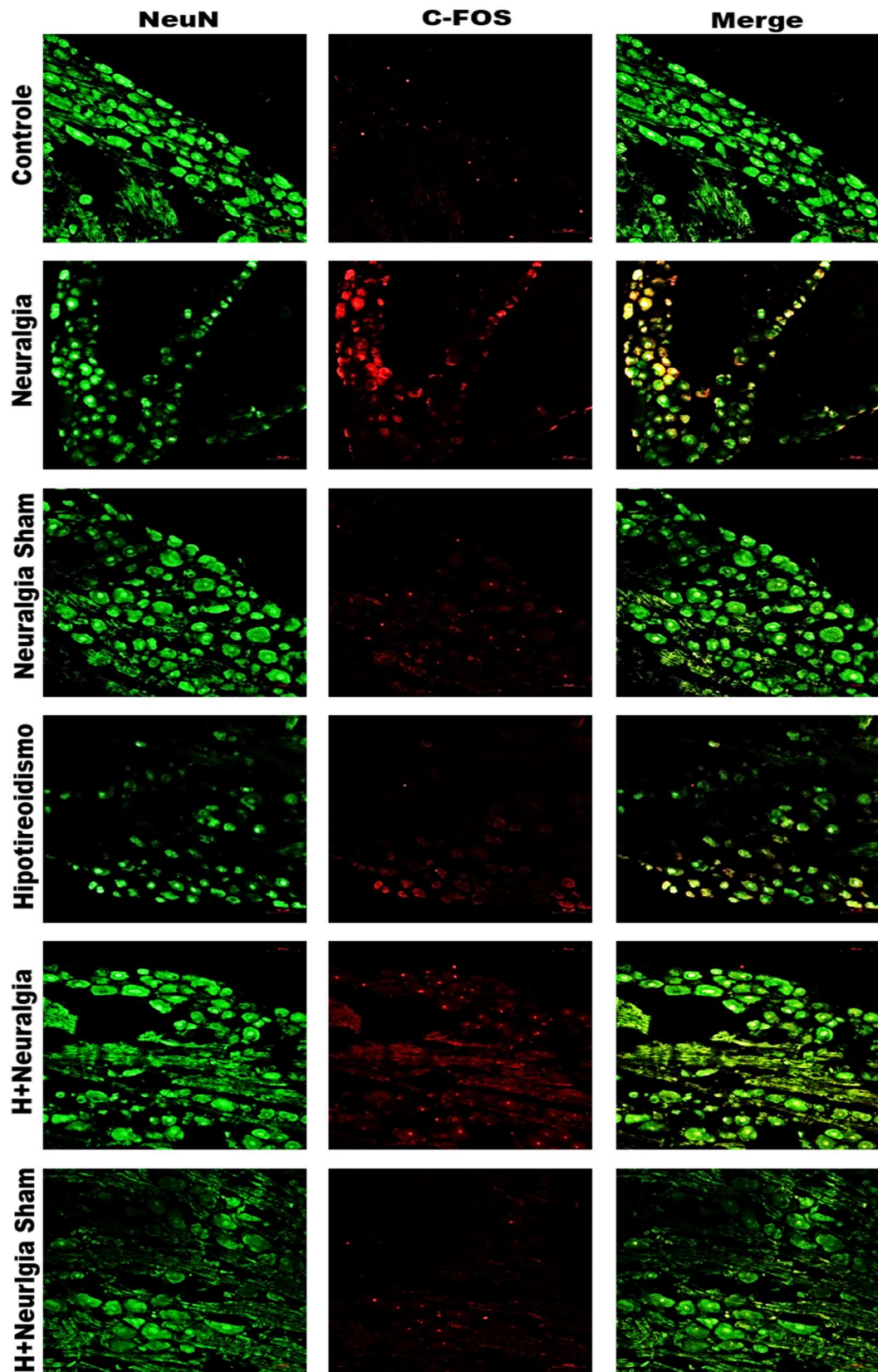


Gráfico representa a quantificação da expressão de c-Fos pela área marcada em gânglio trigeminal. *, a expressão de c-Fos apresenta-se aumentada nos grupos neuropáticos (NT, H, H+NT e H+NT-S) em relação aos demais grupos, $p < 0,0001$ e #, apresenta diferença significantes com o grupo NT, $p < 0,0001$ (ANOVA one way, pos-hoc Games-Howell).

Figura 23 - Fotomicrografia de imunoeexpressão de c-Fos em gânglio trigeminal



Fotomicrografias de gânglio trigeminal mostrando em verde: NeuN (corpo celular), em Vermelho: c-Fos e em Laranja: fusão dos canais, para todos os grupos (Magnitude 200x).

6.5 Imunofluorescência para c-Fos de subnúcleo caudal do trato espinal do nervo trigêmeo de ratos submetidos a indução de hipotireoidismo e indução de neuralgia trigeminal

A imunofluorescência para c-Fos em subnúcleo caudal do trato espinal do trigêmeo de ratos, para todos os grupos experimentais, foi analisada, a partir de fotomicrografias, pela estimativa da área marcada com c-Fos em relação a área total celular marcada com NeuN (Figura 24). Para esta análise, foi observado que os grupos NT ($4,18 \pm 0,45\%$), H ($2,37 \pm 0,19\%$), H-NT ($8,65 \pm 0,59\%$) e H+NT-S ($2,85 \pm 0,35\%$) ($p < 0,0001$; Gráfico 12; ver Apêndice N) apresentavam aumento significativo da expressão de c-Fos quando comparados aos grupos C ($0,50 \pm 0,10\%$) e NT-S ($0,79 \pm 0,57\%$). Além disto, especificamente o grupo H+NT apresentou um significativo aumento de expressão de c-Fos quando comparado aos grupos NT, H e H+NT-S ($p < 0,0001$, Gráfico 12; ver Apêndice N).

Gráfico 12 - Expressão de c-Fos em subnúcleo caudal do trato espinal do nervo trigêmeo

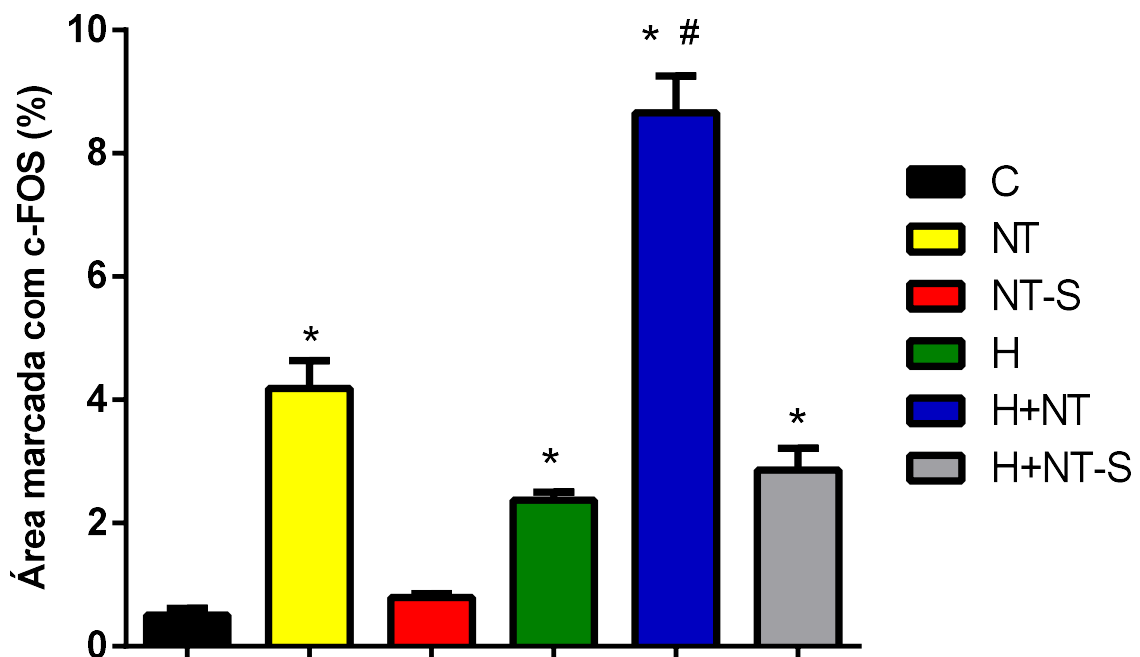
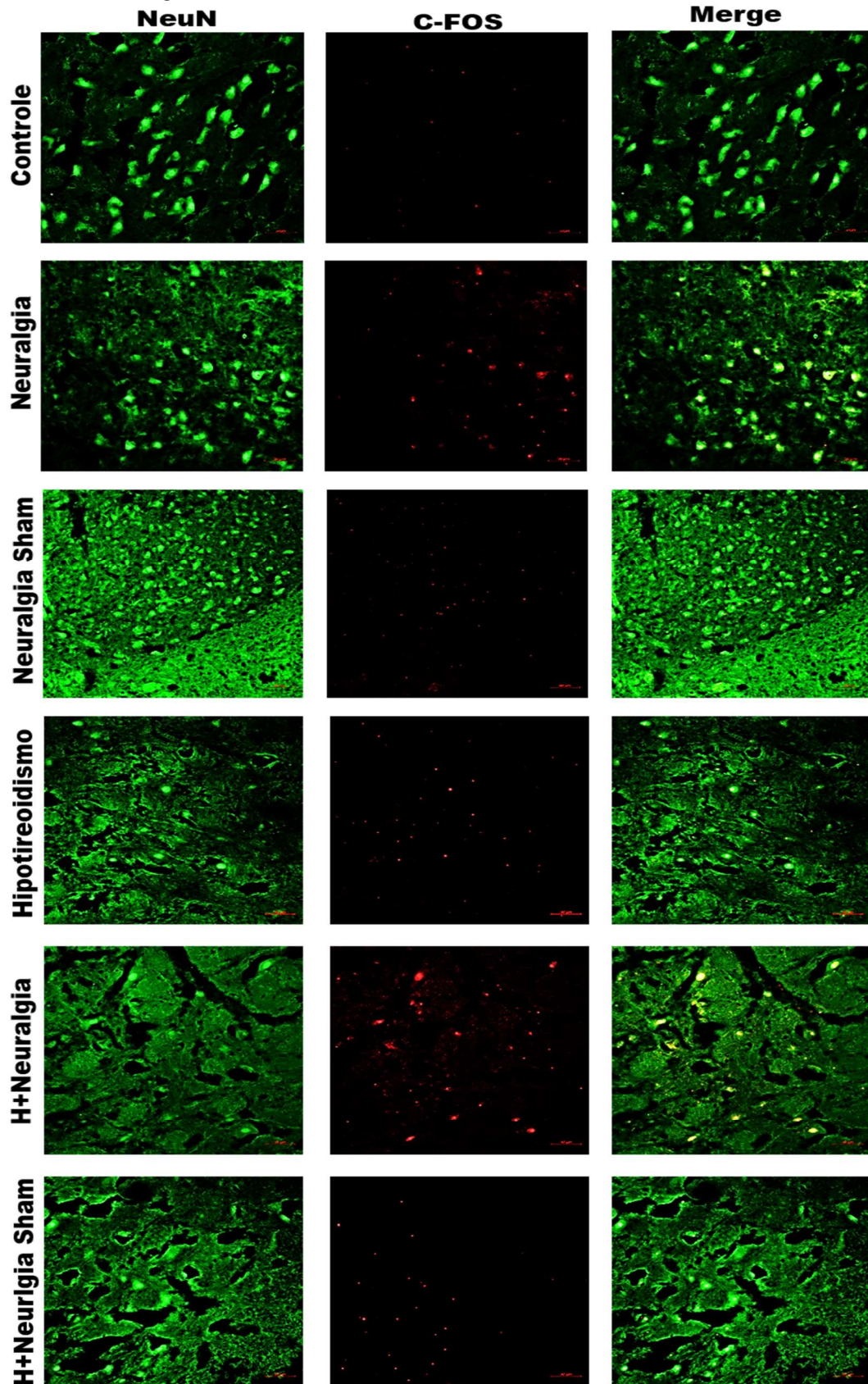


Gráfico representa a quantificação da expressão de c-Fos pela área marcada em subnúcleo caudal do trato espinal do nervo trigêmeo. *, a expressão de c-Fos apresenta-se aumentada nos grupos NT, H, H+NT e H+NT-S em relação aos demais grupos (C e NT-S), $p < 0,0001$ e #, o grupo H+NT apresenta diferença significantes com os grupos NT, H e H+NT-S, $p < 0,0001$ (ANOVA one way, pos-hoc Games-Howell).

Figura 24 - Fotomicrografia de imunopexpressão de c-Fos em subnúcleo caudal do trato espinhal do nervo trigêmeo



Fotomicrografias subnúcleo caudal do trato espinhal do nervo trigêmeo mostrando em verde: NeuN (corpo celular), em Vermelho: c-FOS e em Laranja: fusão dos canais, para todos os grupos (Magnitude 200x).

6.6 Imunofluorescência para ATF3 de gânglio trigeminal de ratos submetidos à indução de hipotireoidismo e indução de neuralgia trigeminal

A imunofluorescência para ATF3 em gânglio trigeminal de ratos, para todos os grupos experimentais, foi analisada, a partir de fotomicrografias, pela estimativa da área marcada com ATF3 em relação a área total celular marcada com NeuN (Figura 25). Para esta análise, foi observado que os grupos NT ($8,34 \pm 1,92\%$) e H-NT ($9,32 \pm 3,95\%$) apresentavam aumento significativo da expressão de ATF3 quando comparados aos grupos C ($0,42 \pm 0,14\%$), NT-S ($0,37 \pm 0,20\%$), H ($0,39 \pm 0,15\%$) e H+NT-S ($0,25 \pm 0,08\%$), não diferença significativa entre os grupos NT e H+NT ($p < 0,05$; Gráfico 13; ver Apêndice O).

Gráfico 13 - Expressão de ATF3 em gânglio trigeminal

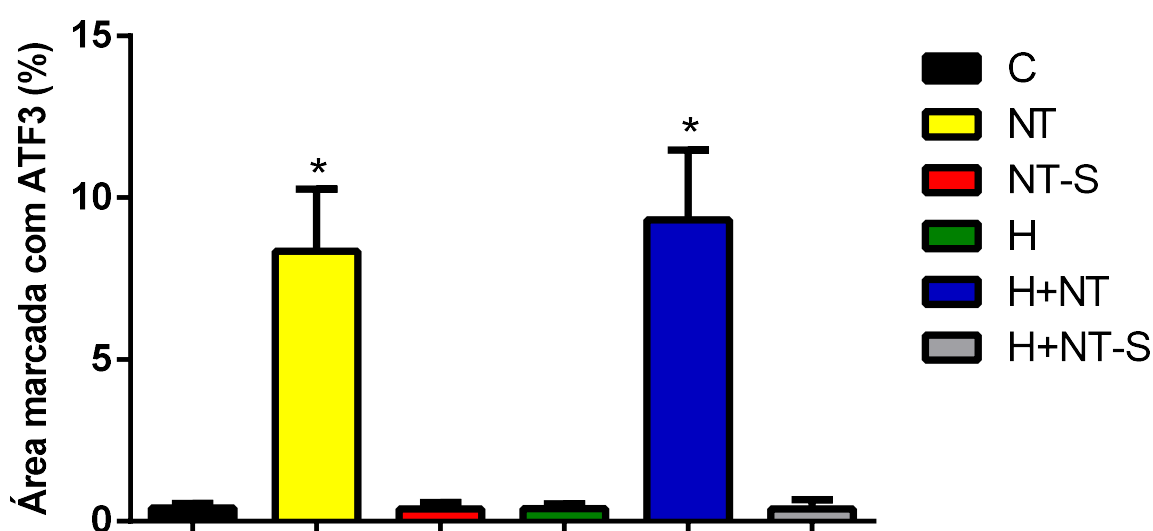
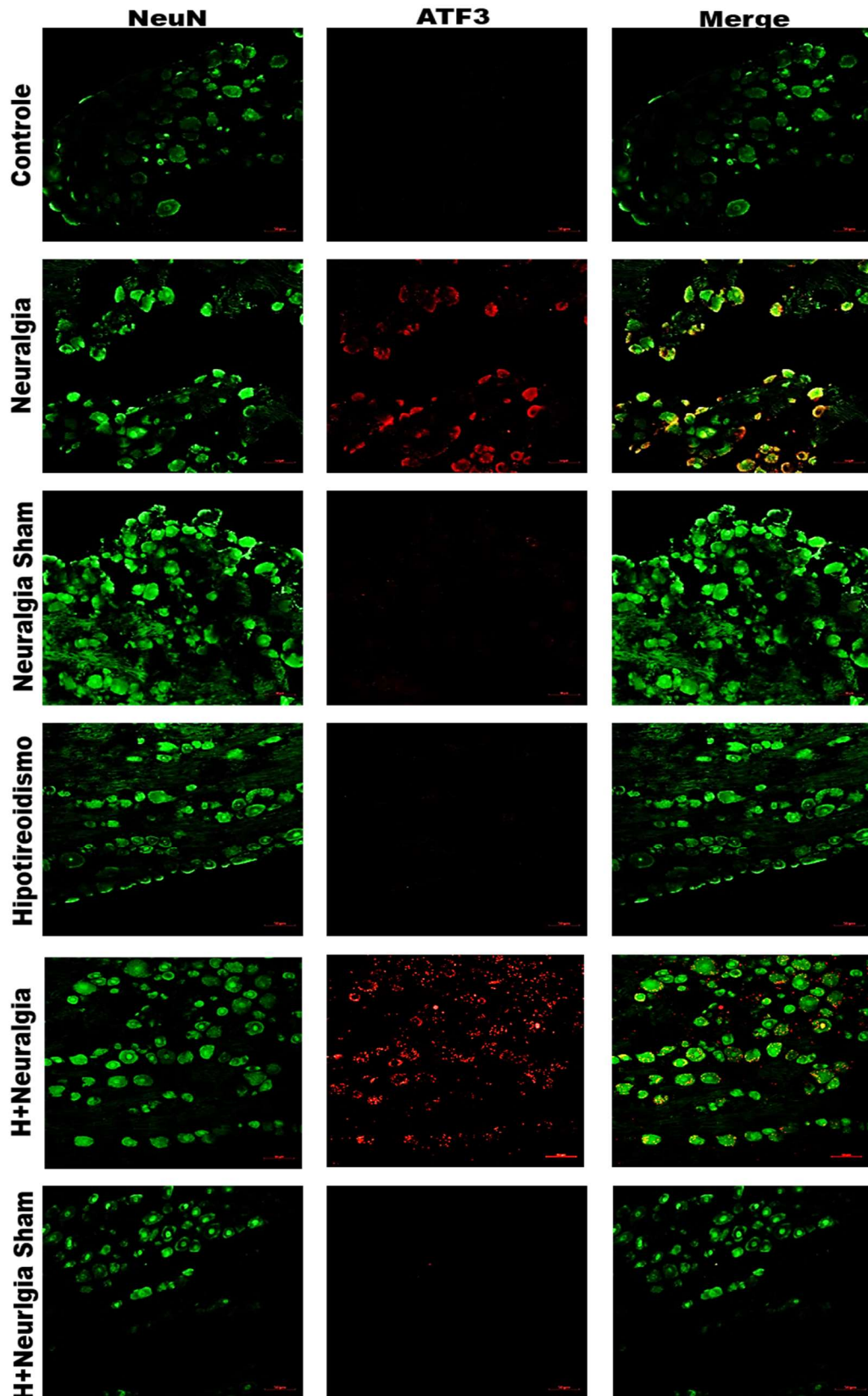


Gráfico representa a quantificação da expressão do fator de ativação de transcrição (ATF3) pela área marcada em gânglio trigeminal. *, a expressão de ATF3 apresenta-se aumentada nos grupos neuropáticos (NT e H+NT) em relação aos demais grupos, $p < 0,05$ (ANOVA one way, pos-hoc Games-Howell).

Figura 25 - Fotomicrografias de imunexpressão de ATF3 em gânglio trigeminal



Fotomicrografias de gânglio trigeminal mostrando em verde: NeuN (corpo celular), Vermelho: Fator de ativação de transcrição – ATF3 e em Laranja: fusão dos canais, para todos os grupos (Magnitude 200x).

6.7 Imunofluorescência para ATF3 de subnúcleo caudal do trato espinhal do nervo trigêmeo de ratos submetidos a indução de hipotireoidismo e indução de neuralgia trigeminal

A imunofluorescência para ATF3 em subnúcleo caudal do trato espinhal do trigêmeo de ratos, para todos os grupos experimentais, foi analisada, a partir de fotomicrografias, pela estimativa da área marcada com ATF3 em relação a área total celular marcada com NeuN (Figura 26). Para esta análise, foi observado que não houve expressão significativa de ATF3 no subnúcleo caudal do trato espinhal do trigêmeo, haja visto não haver diferença entre o controle e os demais grupos experimentais (C: $1,50 \pm 0,25$ %, NT: $1,54 \pm 0,20$ %, NT-S: $1,44 \pm 0,18$ %, H: $1,52 \pm 0,06$ %, H+NT: $1,66 \pm 0,10$ %, H+NT-S: $1,46 \pm 0,11$ %) ($p > 0,05$; Gráfico 14; ver Apêndice P).

Gráfico 14 - Expressão de ATF3 em subnúcleo caudal do trato espinhal do trigêmeo

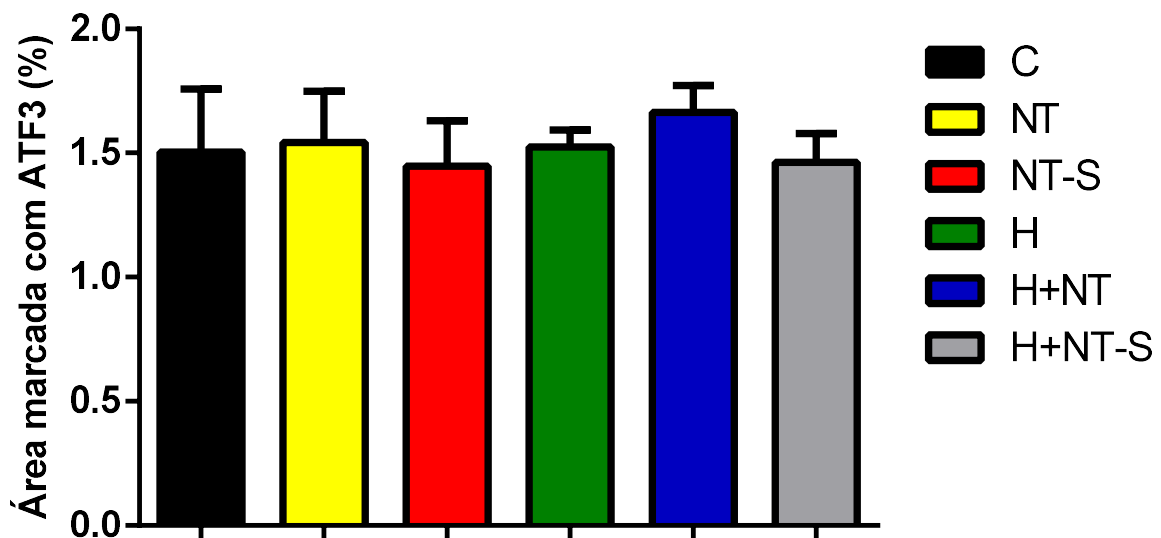
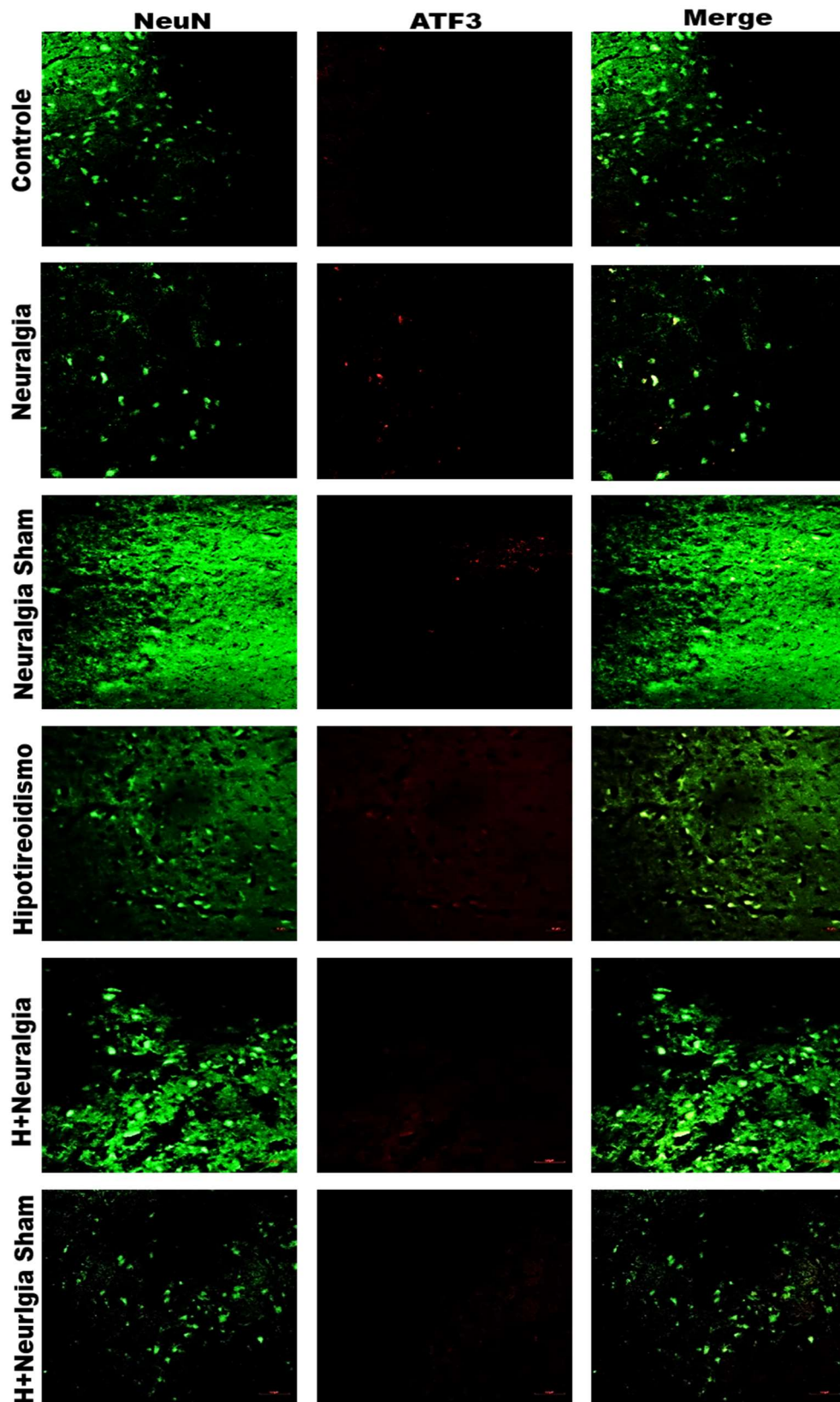


Gráfico representa a quantificação da expressão do fator de ativação de transcrição (ATF3) pela área marcada em subnúcleo caudal do trato espinhal do trigêmeo. A expressão de ATF3 não apresentou diferença significativa entre os grupos experimentais, $p > 0,05$ (ANOVA one way, pos-hoc Games-Howell).

Figura 26 - Fotomicrografia de imunopressão de ATF3 em subnúcleo caudal do trato espinhal do nervo trigêmeo



Fotomicrografias de subnúcleo caudal do trato espinhal do nervo trigêmeo, em verde: NeuN (corpo celular), em Vermelho: ATF3 e em Laranja: fusão dos canais, para todos os grupos (Magnitude 200x).

6.8 Imunofluorescência para PBM de nervo infraorbital de ratos submetidos a indução de hipotireoidismo e indução de neuralgia trigeminal

A imunofluorescência para PBM de nervo infraorbital de ratos, para todos os grupos experimentais, foi analisada, a partir de fotomicrografias, pela estimativa da densidade da marcação em pixels com PBM em relação a área total celular também marcada com PBM (Figura 27). Para esta análise, foi observado que os grupos NT ($56,16 \pm 4,44\%$), H ($32,68 \pm 4,47\%$), H-NT ($60,80 \pm 0,93\%$) e H+NT-S ($34,23 \pm 2,87\%$) ($p < 0,0001$; Gráfico 15; ver Apêndice Q) apresentavam aumento significativo da expressão de PBM quando comparados aos grupos C ($9,90 \pm 1,30\%$) e NT-S ($10,91 \pm 1,60\%$). Além disso, especificamente os grupos NT e H+NT apresentaram um significativo aumento de expressão de PBM quando comparado aos grupos H e H+NT-S ($p < 0,0001$, Gráfico 15; ver Apêndice Q).

Gráfico 15 - Expressão de PBM em nervo infraorbital

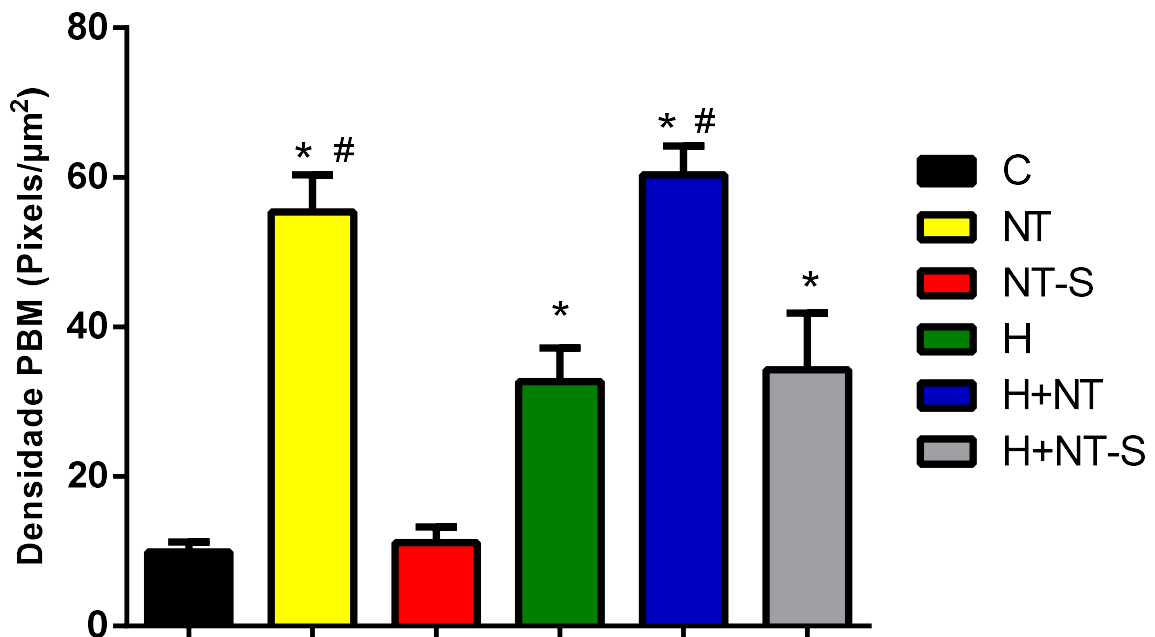


Gráfico representa a quantificação da expressão de PBM pela densidade da marcação em nervo infraorbital. *, a expressão de PBM apresenta-se aumentada nos grupos NT, H, H+NT e H+NT-S em relação aos demais grupos (C e NT-S), $p < 0,0001$ e #, os grupos NT e H+NT apresentam diferença significantes em relação aos grupos H e H+NT-S, $p < 0,0001$ (ANOVA one way, pos-hoc Games-Howell).

6.9 Imunofluorescência para DAPI de nervo infraorbital de ratos submetidos a indução de hipotireoidismo e indução de neuralgia trigeminal

A imunofluorescência para DAPI em nervo infraorbital de ratos, para todos os grupos experimentais, foi analisada, a partir de fotomicrografias, pela estimativa da área marcada com DAPI em relação a área total do nervo demarcada manualmente (Figura 7). Para esta análise, foi observado que os grupos NT ($10,45 \pm 2,28\%$) e H-NT ($8,88 \pm 2,61\%$) apresentavam aumento significativo da expressão de DAPI quando comparados aos grupos C ($2,47 \pm 0,68\%$), NT-S ($1,93 \pm 0,76\%$), H ($1,47 \pm 0,18\%$) e H+NT-S ($2,10 \pm 0,08\%$) ($p < 0,05$; Gráfico 16; ver Apêndice R).

Gráfico 16 - Marcação de DAPI em nervo infraorbital

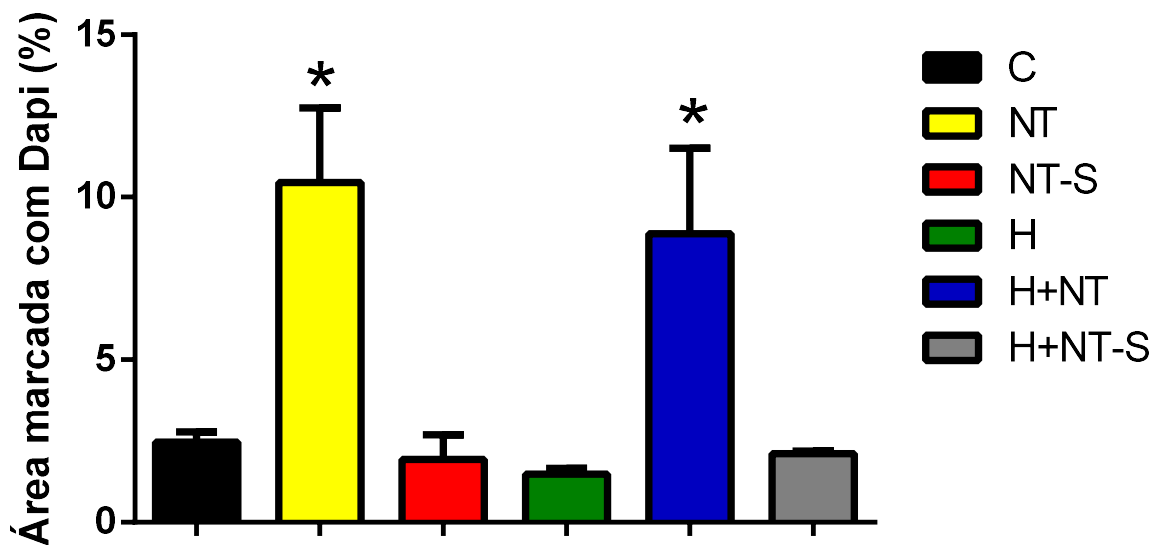
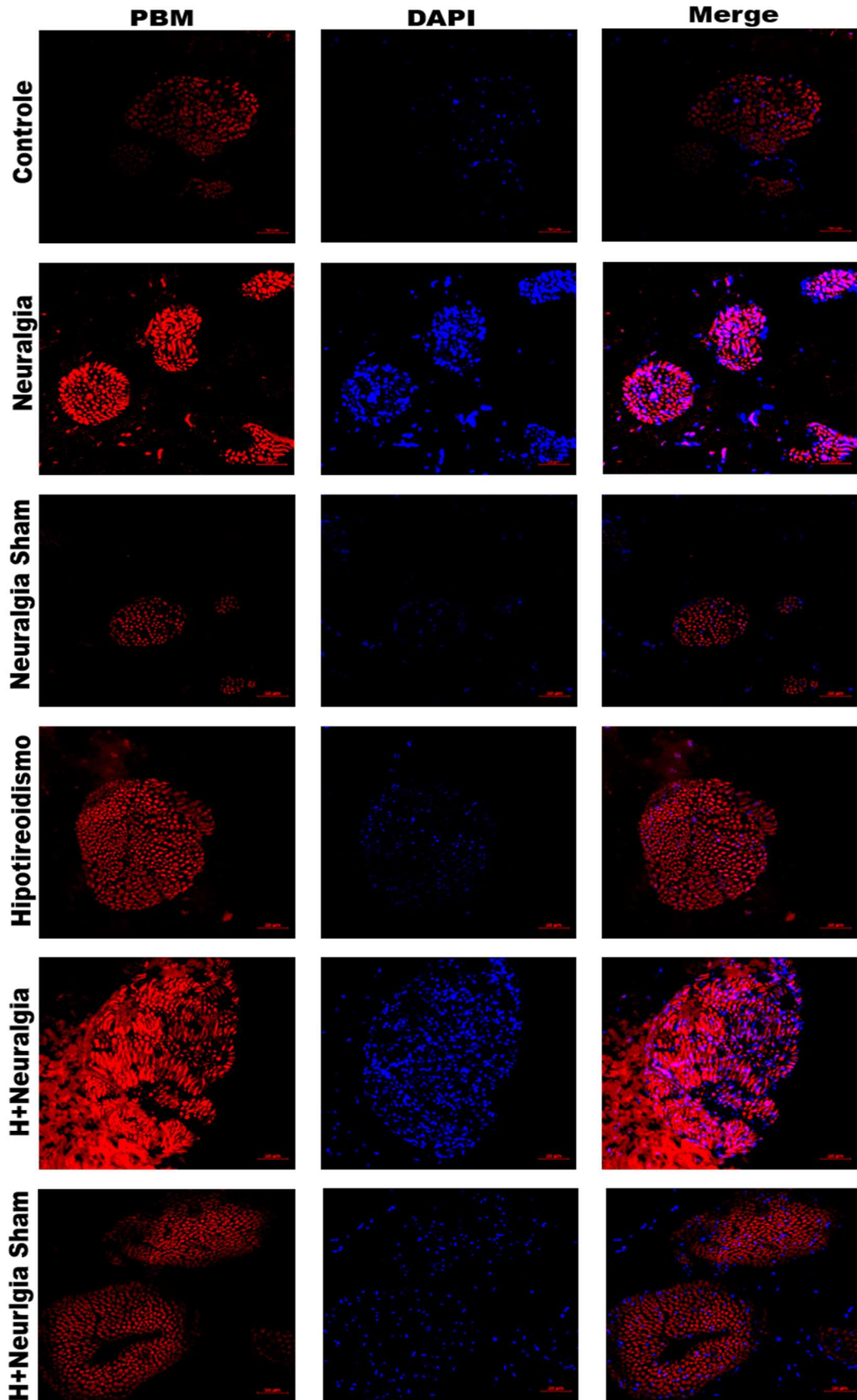


Gráfico representa a quantificação da marcação de DAPI pela área total do nervo infraorbital. *, a expressão de DAPI apresenta-se aumentada nos grupos neuropáticos (NT e H+NT) em relação aos demais grupos, $p < 0,05$ (ANOVA one way, pos-hoc Games-Howell).

Figura 27 - Fotomicrografia de imunexpressão de PBM e DAPI em nervo infraorbital

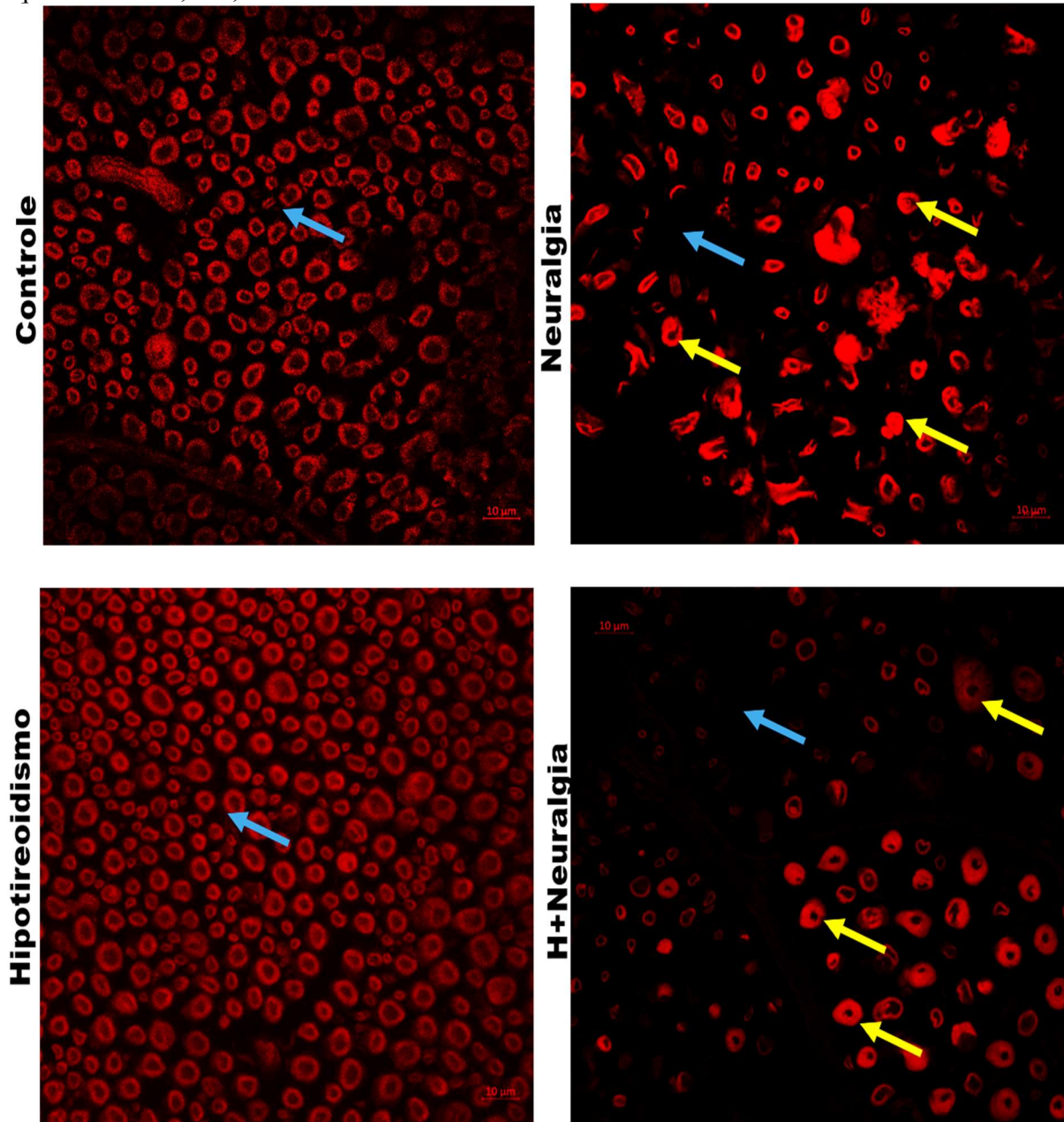


Fotomicrografias de fibras nervosas de nervo infraorbital mostrando em Vermelho: PBM e em Azul: DAPI (núcleos celulares), para todos os grupos (Magnitude 200x).

6.10 Análise Morfológica da Expressão de PBM no Nervo Infraorbital

Além dos achados de expressão de PBM e marcação de DAPI nos nervos infraorbitais, foram observadas alterações morfológicas na composição histológica dos nervos dos grupos NT e H+NT (Figura 28). No grupo NT, podemos observar diminuição do número de fibras nervosas, aumento do espaçamento entre fibras e algumas fibras com sinais de deformação e delaminação. No grupo H+NT, a combinação da neuropatia induzida com o hipotireoidismo mostra um conjunto de alterações morfológica bem mais acentuado, no qual podemos visualizar diminuição do número de fibras nervosas, aumento do espaçamento entre fibras nervosas, e uma quantidade expressiva de fibras com deformações, delaminação e retração axonal.

Figura 28 - Fotomicrografia de imunoposição de PBM em nervo infraorbital dos grupos experimentais C, NT, H e H+NT



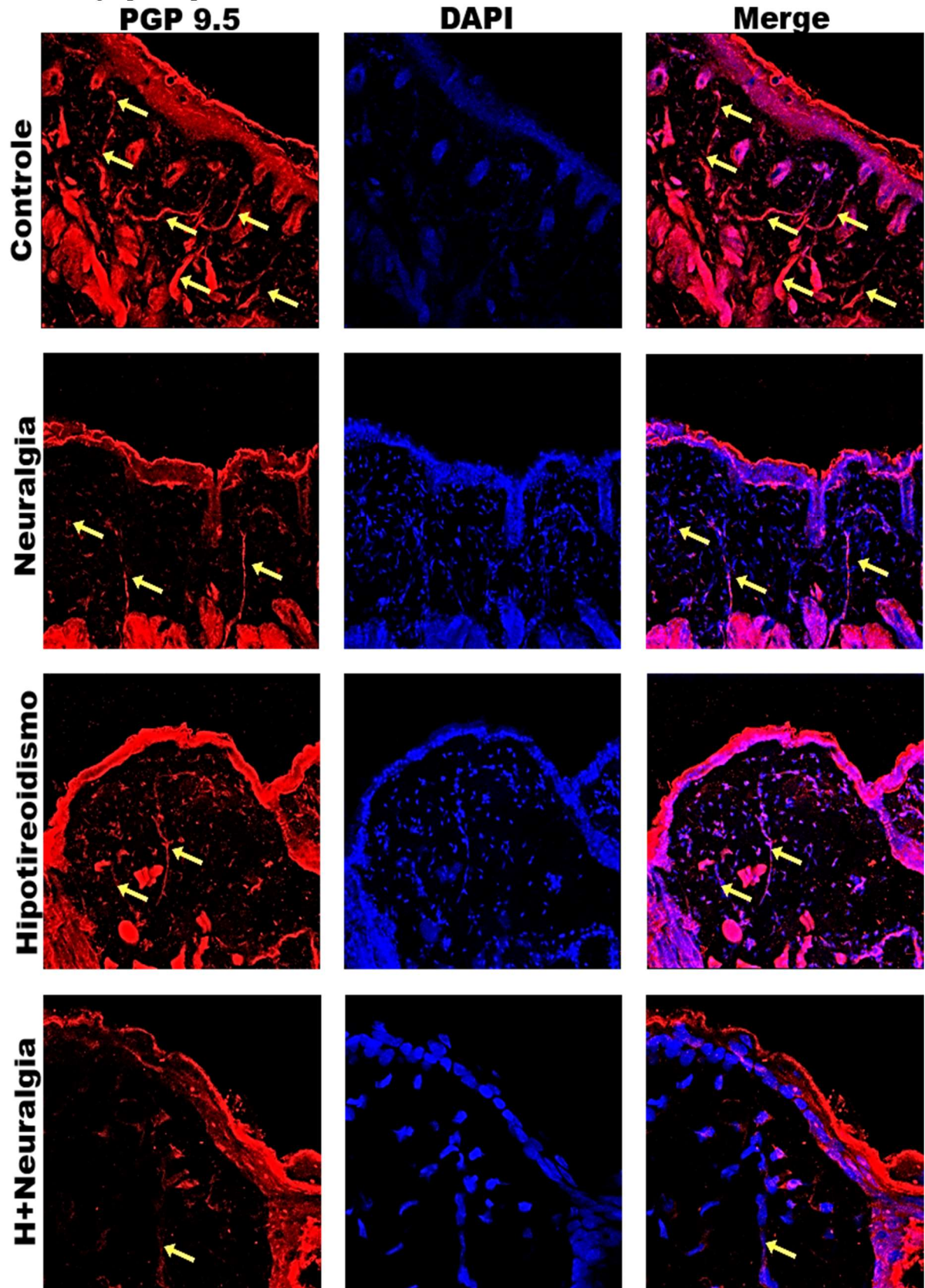
Fotomicrografias de fibras nervosas de nervo infraorbital mostrando em Vermelho expressão de PBM para todos os grupos C, NT, H e H+N, setas azuis mostrado o espaçamento entre as fibras e as setas amarelas mostrando alterações morfológicas das fibras (deformação, delaminação e retração axonal) (Magnitude 630x).

6.11 Imunofluorescência para PGP 9.5 de pele da almofada vibrissal de ratos submetidos a indução de hipotireoidismo e indução de neuralgia trigeminal

A imunofluorescência para PGP 9.5 da pele da almofada vibrissal de ratos, em todos os grupos experimentais, para verificar possíveis alterações em terminações nervosas, foi analisada de forma descritiva, a partir de fotomicrografias 3D. Devido as características e disposição das terminações nervosas, que passam entre as células que compõem as camadas da pele, atravessado diversos planos, foi necessário executar uma varredura do microscópio confocal dos cortes de tecido em diversos focos (planos) para formar uma imagem em três dimensões (3D) que possibilitasse a visualização da maior quantidade de secções das fibras nervosas. As imagens 3D foram usadas para formar imagens em duas dimensões (2D) pela sobreposição de imagens (Figura 29).

Foi observado pelas imagens obtidas, uma quantidade significativa de fibras nervosas no grupo controle (setas amarelas), enquanto nos grupos NT e H, o número de fibras nervosas aparentava estar bastante reduzido em relação ao grupo C. Adicionalmente, no grupo H+NT as fibras nervosas foram encontradas em quantidade bastante reduzidas (Figura 29).

Figura 29 - Fotomicrografia de imunopressão de PGP 9.5 em pele da almofada vibrissal de ratos dos grupos experimentais



Fotomicrografias de pele da almofada vibrissal mostrando em Vermelho: PGP 9.5 e em Azul: DAPI (núcleos celulares), para todos os grupos. Setas amarelas: terminações nervosas (Magnitude 100x).

7 DISCUSSÃO

Foram analisados neste estudo os efeitos do hipotireoidismo sobre a nocicepção, associado a alterações morfofuncionais na via nociceptiva trigeminal (nervo, gânglio e subnúcleo caudal do trato espinhal), com e sem a presença de uma desordem neuropática induzida, a neuralgia trigeminal.

Após o protocolo experimental realizado nesta pesquisa, em primeiro lugar, confirmamos a indução do hipotireoidismo por ingestão de propiltiuracil (PTU) a 0,05% em água de beber por 21 dias, proposto por Blake e Henning (1985), através da dosagem de T4, acompanhamento da evolução ponderal, análise anátomo-patológica da glândula tireoide e achados clínicos.

O protocolo proposto por Blake e Henning (1985) corresponde ao método mais eficiente para a indução de hipotireoidismo em modelos murinos (BLAKE; HENNING, 1985; SARKAR, 2016), haja visto as doses usadas de PTU levam a uma diminuição severa nas concentrações plasmáticas dos hormônios tireoidianos (HTs), como demonstra nosso estudo e a literatura (RIAL, 1987; YU, 2014; SARKAR, 2016).

Apesar de Shiraki *et al* (2015) propor o uso de PTU a 0,5% administrado por 28 dias por gavagem, a metodologia tem recebido críticas pelos conselhos de ética animal, pelo período prolongado de estresse animal com gavagens (SARKAR, 2016). No nosso estudo, consideramos que o protocolo de Shiraki *et al* (2015) é mais longo e dificulta a realização de outros protocolos posteriores, por questões temporais, e pelo aumento da debilidade dos animais, aumentando riscos de perdas.

Os animais tratados com PTU do nosso estudo, também manifestaram sinais comportamentais, clínicos e anátomo-patológicos característicos da doença, tanto em ratos, como em humanos em fase de crescimento, tais como: retardo no crescimento, diminuição no ganho ponderal, anorexia, apatia e letargia, além de hipertrofia da glândula tireoide, com aumento de suas dimensões e peso, e a presença de hiperplasia folicular acompanhada de alterações morfológicas e estruturais severas (SARKAR, 2016; LOPES; VALE; OGAWA, 2016).

Nosso trabalho foi o primeiro a confirmar o modelo, demonstrando sua eficácia em reproduzir os efeitos do hipotireoidismo a níveis sorológicos, anatomopatológicos e clínicos, que, apesar do modelo já ser bem estabelecido e aceito, até então, só havia sido confirmado pela dosagem de HTs, e em alguns poucos estudos, também pela evolução ponderal (YU, 2014; GHENIMI, *et al*, 2010; SARKAR, 2016).

Nossos achados macroscópicos, onde as tireoides dos animais hipotireoideos apresentavam aumento em suas dimensões e pesos, corroboram com os achados encontrados em algumas formas da doença em humanos, onde o hipotireoidismo primário está associado a hipertrofia da glândula tireoide (SCHEITHAUER *et al.*, 1985).

Verificamos também, em achados histopatológicos, a presença de hiperplasia das células foliculares e uma redução do coloide de tiroglobulina, com perda da morfologia estrutural folicular, que acompanham as alterações encontradas na literatura, em modelos animais de hipotireoidismo, onde essa glândula também se encontra aumentada, com sinais de hiperplasia folicular (LOPES; VALE; OGAWA, 2016).

Nossos achados, mostram uma forte correlação negativa entre as concentrações plasmáticas do T4 livre e as dimensões e peso da glândula tireoide, corroborando com alterações encontradas macro e microscopicamente.

A hipertrofia da glândula tireoide e hiperplasia folicular funcionam como uma resposta glandular e tecidual aos possíveis maiores concentrações de TSH, que apesar de não terem sido dosados em nosso estudo, é sabido que, as concentrações plasmáticas de TSH se elevam, estimulados pelo feedback negativo a baixas as concentrações plasmáticas de T4 encontrado, em uma tentativa de suprir as funções reduzidas da glândula (QUATTRINI *et al.*, 1993; SIDENIUS *et al.*, 1997, UKIBE, *et al.*, 2017).

Ainda em relação aos efeitos do hipotireoidismo induzido nos animais, a ausência de ganho ponderal, ou até mesmo a perda ponderal, torna evidente o estado de catabolismo proteico, com conseqüente perda de massa muscular, devido a diminuição das concentrações plasmáticas dos HTs, que estão intrinsecamente envolvidos com as funções metabólicas, seja na ação dos fatores de crescimento, de vitaminas ou na absorção no trato gastrointestinal de carboidratos (FERREIRA *et al.*, 2007), corroborando, assim, com nossos achados.

Podemos ainda relacionar a perda de peso significativa observada nos animais hipotireoideos de nosso estudo, às alterações de apetite como também mostrado por Yu (2014), onde os animais hipotireoideos induzidos com PTU mostravam, além de alterações comportamentais em suas atividades, uma baixa procura por alimentos (TOHEI *et al.*, 1997; HASEBE *et al.*, 2008). Lopes, Vale e Ogawa (2016), afirmam que esta condição deve estar associada a uma correlação negativa entre as concentrações plasmáticas de hormônios tireoidianos e da leptina secretada por células adiposas, hormônio indutor da sensação de saciedade, resultando na supressão da regulação na saciedade alimentar a nível hipotalâmico (TOHEI *et al.*, 1997; HASEBE *et al.*, 2008; EBLING, 2014).

Portanto, apontamos o protocolo de Blake e Henning de 1985, como ainda sendo o mais eficaz para uso como modelo experimental de hipotireoidismo, visto que nosso estudo demonstrou que o modelo reproduz, tanto alterações nas concentrações plasmáticas de T4, como alterações clínicas, comportamentais, anatômicas e histopatológicas semelhantes as encontradas em humanos na mesma faixa etária correspondente (SCHEITHAUER et al., 1985; LOPES; VALE; OGAWA, 2016).

Em relação aos resultados comportamentais de avaliação do limiar nociceptivo, observamos que, no decorrer de todo período experimental, os animais apresentaram, primeiramente, uma elevação no limiar nos grupos com hipotireoidismo induzido após o período de indução de 21 dias, mostrando um efeito antinociceptivo do hipotireoidismo, como demonstrado por Lopes, Vale e Ogawa (2016). Estes autores avaliaram a nocicepção a partir de testes térmicos de alodinia, os quais são compatíveis com os achados em estudos anteriores que mostram que o hipotireoidismo pode levar, além de neuropatias periféricas, a alterações na resposta nociceptiva. Tal fato se confirma quando se observamos o estudo clínico de ØRSTAVIK et al. (2006) que mostrou que o hipotireoidismo influenciava na redução da sensibilidade térmica de pacientes com dor espontânea associada.

Em um segundo momento, após a indução de uma neuropatia periférica nociceptiva (neuralgia trigeminal), o limiar nociceptivo que, normalmente deveria estar reduzido na presença da dor neuropática, como demonstrado no grupo NT, apresentou padrões normais na resposta ao estímulo mecânico nos animais com hipotireoidismo e neuropatia associada (H+NT), levando, assim, os sinais nociceptivos da neuropatia trigeminal a níveis subclínicos.

Até então, as pesquisas realizadas apenas relacionavam a diminuição das concentrações plasmáticas de HTs a alterações na resposta nociceptiva (CHEN et al, 2016), entretanto, nossos resultados são os primeiros a demonstrar como se comporta a resposta nociceptiva em quadros neuropáticos na presença do hipotireoidismo. Os resultados nos levam, em um primeiro momento, sem considerar os resultados obtidos na avaliação morfofuncional da injúria, a entender que o hipotireoidismo poderia de alguma forma, diminuir ou reverter os efeitos nociceptivos da neuropatia, em uma possível diminuição do dano causado pela indução da neuralgia.

Por outro lado, também constatamos que as concentrações dos HTs estão relacionados com a resposta nociceptiva, através de uma correlação negativa entre as concentrações plasmáticas de T4 e o limiar nociceptivo, independentemente de haver patologia neuronal ou não. Tal fato pode estar relacionado a redução da condutibilidade elétrica das vias periféricas na presença de baixas concentrações de HTs, como demonstrou Sousa (2006), em

testes eletrofisiológicos em ratos hipotireoideos, que comprovou a redução da velocidade de condução nervosa e diminuição da excitabilidade neural em nervo isquiático em fibras nervosas de grande, médio e pequenos calibres.

Com relação a alterações na respostas nociceptiva, apenas aparecerem após a segunda semana de indução, bem como alteração na curva ponderal, podemos atribuir, o início do aparecimento de tais alterações a depleção das reservas corpóreas de HTs, na própria glândula tireoide, fígado, sangue demais tecidos (KRONENBERG, *et al*, 2010)

Trabalhos encontrados na literatura, mostram que, a relação entre as concentrações dos HTs e as alterações na resposta nociceptiva variam de acordo com a fase do desenvolvimento a qual a diminuição ou aumento destas concentrações ocorreu (BRUNO *et al*. 2005a; BRUNO *et al*, 2005b; ALVES, 2013; YI, 2014). Por exemplo, no trabalho de Bruno *et al* (2005a), que induziu hipotireoidismo em ratas durante a gestação e em ratos com 60 e 420 dias de idade, a prole das ratas hipotireoideas apresentava, em testes térmicos, hipoalgesia e os ratos hipotireoideos aos 60 e 420 dias apresentavam hiperalgesia e hipoalgesia respectivamente. Já em um segundo artigo de Bruno *et al* (2005b), onde foi induzido hipertireoidismo em ratos aos 5, 60 e 420 dias de idade, observaram que os animais hipertireoideos apresentavam, em teste térmico, hipoalgesia aos 5 e hiperalgesia aos 60 e 420 dias.

Adicionalmente, o mesmo foi verificado por Alves (2013) em prole de ratas com hipotireoidismo gestacional, onde os neonatos apresentavam hiperalgesia térmica, mostrando a importância dos HTs maternos no desenvolvimento das vias nociceptiva embrionárias. Alves (2013) também demonstrou que o hipotireoidismo materno, além de afetar o desenvolvimento das vias nociceptivas, prejudicava o desenvolvimento das vias motoras.

Yi *et al* (2014) também demonstraram o aumento da sensibilidade térmica em camundongos hipotireoideos de 2 semanas, entretanto, o mesmo não aconteceu com o limiar mecânico, Yi *et al* (2014) também verificaram que a reposição hormonal reverteu o efeito hiperalgésico. Já Rohani (2009), verificou hiposensibilidade a estimulação nociceptiva com formalina em ratos jovens. Em contrapartida, Lopes *et al*. (2016) e Sousa (2017) demonstraram que o limiar nociceptivo mecânico pode estar aumentado em animais hipotireoideos, corroborando com os resultados encontrados em nossa pesquisa que também demonstrou esse efeito hipoalgésico no limiar nociceptivo mecânico em ratos hipotireoideos com e sem lesão neuropática periférica associada.

Apesar, de alguns trabalhos mostrarem diferentes comportamentos da resposta a dor em animais hipotireoideos (BRUNO *et al*. 2005a; BRUNO *et al*, 2005b; ROHANI, 2009; ALVES, 2013; YI, 2014; LOPES *et al*, 2016, SOUSA, 2017), está claro que os efeitos dos HTs

na modulação da dor, estão relacionados diretamente ao papel destes HTs no desenvolvimento das vias nociceptivas em seus diferentes estágios, podendo levar tanto a hiperalgesia como uma analgesia transitória, dependendo da fase de desenvolvimento em que o indivíduo ou animal foi acometido pelo hipotireoidismo ou pela falta dos HTs maternos (ROHANI *et al*, 2009; ALVES, 2013).

Sabe-se que o papel do HTs no desenvolvimento de estruturas fundamentais do sistema nervoso dos vertebrados pode estar relacionado a regulação da transcrição de genes críticos do desenvolvimento neuronal através da ativação de receptores nucleares pelos HTs dos TR α 1, TR β 1 e TR β 2 (EVANS, 1988; LARSEN, 1981; YEN, 2001). Assim, a sensibilidade à dor está relacionada ao estado da tiroide e as concentrações dos HTs através da regulação do desenvolvimento e das funções neuronais nas vias nociceptivas (OPPENHEIMER, 1997; KEMPERS, 2006; GUASTI, 2007).

Para avaliar a ativação das vias nociceptivas trigeminais, periférica e centralmente, em condições de neuralgia, na presença do hipotireoidismo e em condições eutireoideas, foram realizadas a imunomarcação por fluorescência do gene imediato c-Fos, que se expressa em várias estruturas do SNP, como o gânglios, e do SNC (NESTLER, 2012), envolvidas no processo nociceptivo, incluindo medula espinhal, substância periaquedutal mesencefálica, os núcleos parabraquiais e tálamo após estimulação dolorosa (AHMAND, 2002; TEIXEIRA, 2009).

Nas lesões do SNP acontecem eventos que levam ao processo de regeneração, causando modificações estruturais e funcionais que levam a alterações de condução nervosa, induzindo a sensibilização central e periférica (SCHWARTZMAN *et al.* 2001; NICHOLSON, 2004). Tais sensibilizações, ativam genes imediatos como o c-Fos, que é um marcador útil para rastrear os efeitos de estímulos farmacológicos, elétricos e fisiológicos no sistema nervoso, e tem sido utilizado para marcar evidências de dor e neuroplasticidade (AZEVEDO *et al.*, 2013).

Baseado neste contexto, nossos resultados mostraram um aumento bastante significativo da expressão de c-Fos no gânglio trigeminal no grupo com neuralgia trigeminal (NT), mostrando a ativação das vias nociceptivas e condução de estímulos dolorosos. Esse achado, se confirma com os resultados obtidos nos testes de avaliação do limiar nociceptivo, que se mostravam reduzidos, evidenciando uma maior resposta nociceptiva da via trigeminal. Ainda encontramos, que, embora ainda que significativamente expressado em relação ao grupo controle (C), o grupo com neuralgia trigeminal e hipotireoidismo (H+NT), apresentou uma redução significativa na expressão de c-Fos comparado ao grupo NT, mostrando uma diminuição da ativação das vias nociceptivas em animais neuropáticos com hipotireoidismo,

resultado que também se confirmam comportamentalmente com a elevação do limiar nociceptivo do mesmo grupo, a níveis próximos do grupo controle, podendo ser considerados como sinais de dor subclínica.

Tal resultado deixa claro a interferência do hipotireoidismo na resposta nociceptiva, não somente comportamentalmente elevando o limiar nociceptivo em animais com e sem neuropatia, mas também através da confirmação do decréscimo da ativação da via nociceptiva trigeminal periféricamente.

No subnúcleo caudal do trato espinhal do nervo trigêmeo, a expressão de c-Fos mostrou-se diferenciada da ocorrida periféricamente no gânglio trigeminal, onde, assim como no gânglio houve uma grande expressão de c-Fos, mostrando a ativação central das vias nociceptivas no processo neuropático. Entretanto, na presença de baixas concentrações dos HTs, ao contrário do ocorrido periféricamente, não levou a diminuição da expressão de c-Fos, e sim um super-expressão. Também foi verificado uma maior expressão de c-Fos no subnúcleo caudal do trato espinhal em animais hipotireoideos mesmo sem indução de estado neuropático.

O estudo de Schmidt, Cramer e Offringa (1993) evidencia que a expressão de c-Fos pode ser regulada pelos hormônios tireoidianos, através do receptor nuclear tireoidiano que reprime a ativação do fator de transcrição funcional ou proteína-ativadora-1 (AP-1), portanto suprimindo a expressão de c-Fos. Vê-se que os HTs atuam como silenciadores transcripcionais de proteínas que se acoplam ao local de ligação da AP-1. Assim, na ausência dos HTs circulantes, há uma maior expressão de c-Fos a nível de SNC (YUAN & YANG, 2005), justificando os resultados encontrados em nosso estudo.

Além disso, IEGs como o c-Fos podem induzir ou inibir a transcrição de genes tardios, que levam mudanças de longo prazo, como, por exemplo, alterações neuroplásticas que levam maior expressão de receptores e neurotransmissores da via nociceptiva, bem como inibição da via inibitória descendente (SUPRONSINCHAI; STORER, 2015; MILDE-LANGOSCH, 2005; NESTLER, 2012), que pode também influenciar na diferente expressão de c-Fos em vias periféricas e centrais no decorrer da evolução do processo de instalação e manutenção da neuropatia.

Tais resultados e achados na literatura, nos levam a crer que os mecanismos, que levam a menor resposta nociceptiva em animais hipotireoideos, estejam mais fortemente relacionados a alterações periféricas, que possam levar a uma diminuição na condução dos estímulos nociceptivo, como relata Sousa (2006) em estudo eletrofisiológico de animais hipotireoideos, visto que, a nível periférico no gânglio trigeminal houve redução da resposta

nociceptiva e a nível central no subnúcleo caudal, o hipotireoidismo não suprimiu ativação da via nociceptiva.

Também podemos hipotetizar que ativação central da via nociceptiva trigeminal deve ter ocorrido no início da lesão, e como os efeitos desta ativação levam a modificações a longo prazo (SUPRONSINCHAI; STORER, 2015; MILDE-LANGOSCH, 2005; NESTLER, 2012), e a falta de HTs é importante na supressão de c-Fos (YUAN & YANG, 2005), isso levou a uma maior expressão de c-Fos no subnúcleo caudal ao final do período experimental, fato que provavelmente não ocorreu periféricamente por se tratar justamente das próprias células injuriadas.

Podemos ainda hipotetizar que, os diferentes resultados encontrados por Bruno *et al* (2005a e 2005b), Alves *et al* (2013), Yi *et al* (2014), Lopes, Vale e Ogawa (2016) e Sousa (2017), em fases diferentes de desenvolvimento, possam estar relacionados a diferenças de maturação e desenvolvimento de componentes das vias nociceptivas periféricas e centrais, podendo, assim, manifestar tanto quadros hiperalgésicos como analgésicos, tornando necessário maiores investigações em fases diferentes de desenvolvimento das vias periféricas e centrais, bem como em sob níveis diferentes de hipotireoidismo.

As análises de imunofluorescência de ATF3, para verificação de injúria neuronal, mostraram uma elevação na expressão de ATF3 nos gânglios trigeminiais nos grupos cuja a neuralgia trigeminal foi induzida por constrição do nervo infraorbital (NT e H+NT), independentes da presença ou não do hipotireoidismo, onde os grupos hipotireoideos não apresentaram alterações na expressão de ATF3. Estes resultados demonstraram, a princípio, que a ligadura do nervo infraorbital levou a um dano no nervo, seguido de uma resposta celular, com expressão de tais fatores de ativação gênica, haja vista o ATF3 ser considerado um importante marcador tanto de lesão neuronal como da capacidade regenerativa neuronal periférica (LINDA *et al*, 2011, HUNT, *et al*, 2012) e não ser um marcador expressado significativamente em níveis basais nas células não expostas a agressões (BOESPFLUG *et al*, 2017) como também mostram nossos resultados nos gânglios trigeminiais.

Neste caso, os HTs, apesar de sua importância para o metabolismo celular e reparo neuronal periférico, em níveis baixos, não impediram a célula de iniciar uma resposta ou uma reação primária a agressão, a níveis periféricos, o que não quer dizer que os HTs não possam interferir no reparo neuronal, atuando em outra via como, por exemplo, na remielinização axonal ou na regeneração axonal. Assim, tal resultado deixa claro que a influência das baixas concentrações plasmáticas de HTs sobre a resposta nociceptiva, não está relacionada a

diminuição da injúria causada pela constrição do nervo infraorbital associada ao hipotireoidismo.

Apesar do ATF3 expressar-se em níveis elevados no gânglio trigeminal em animais neuropáticos, o mesmo não aconteceu na avaliação de sua expressão no subnúcleo caudal do trato espinhal do nervo trigêmeo, onde seus níveis mostraram-se basais, semelhantemente aos dos grupos controle, e grupos não submetidos a protocolo de indução de neuropatia por constrição. Tal resultado confirma os achados da literatura que mostraram que o ATF3, apesar de se expressar a nível central no corno dorsal da medula espinhal após injúria periférica (SEIJFFERS *et al*, 2006; TSUJINO *et al*, 2000), não se expressa no subnúcleo caudal do trato espinhal do trigêmeo nas mesmas condições de injúria periférica (LATRÉMOLIÈRE, *et al*, 2008).

Sabemos que a simples estimulação nociceptiva executada durante o protocolo de aferição do limiar nociceptivo não é suficiente para elevar ATF3 dos níveis basais (TSUJINO *et al*, 2000). O que nos mostra que o ATF3 é um bom marcador de dano neuronal periférico expressando-se tanto em gânglio periféricamente como em corno dorsal da medula espinhal, com exceção da via trigeminal que não se expressa a níveis centrais no subnúcleo caudal do trato espinhal do trigêmeo após dano periférico (LATRÉMOLIÈRE, *et al*, 2008; COSTA-SOBRINHO *et al*, 2017).

Assim, tais resultados e considerações da literatura a respeito da expressão de ATF3 nos mostram que, apesar do hipotireoidismo exercer um efeito na resposta nociceptiva, através da elevação do limiar nociceptivo, mesmo em condições neuropáticas nociceptivas, as baixas concentrações plasmáticas dos HTs não exercem influência sobre a reação neuronal periférica das vias trigeminais a agressões externas. Ou seja, o hipotireoidismo pode causar um efeito antinociceptivo (analgésico) durante processos neuropáticos sem diminuição do dano neuronal ou da resposta ao dano nas vias trigeminais.

Tal constatação, corrobora com nossa hipótese de que a diminuição da ativação via nociceptiva trigeminal periférica no hipotireoidismo está ligada a injúria axonal e possível dano no mecanismo de reparo, que por sua vez pode levar a diminuição da capacidade de condução do nervo dos impulsos nociceptivos, corroborando também com os achados de Sousa (2006).

Para verificar a integridade e regeneração axonal no NIO, foi analisada a expressão da proteína constitutiva PBM da bainha de mielina e de DAPI para evidenciação dos núcleos de células de Schwann e possíveis infiltrados de macrófagos por imunofluorescência. Nesta análise, foi verificado um aumento da expressão de PBM nos grupos neuropáticos e hipotireoideos, onde nos grupos neuropáticos a expressão mostrou-se evidentemente mais

acentuada, além disso nos grupos neuropáticos houve um aumento expressivo da marcação de DAPI.

O aumento de PBM, após 21 dias da injúria neuronal, observado em nossos resultados, corroboram com dados achados na literatura, que mostram que as células de Schwann diminuem e, em seguida, interrompem totalmente a sua síntese de mielina logo nos 2 primeiros dias após injúria (VARGAS; BARRES 2007), entrando em novo ciclo celular, onde proliferam e realizam a remoção da mielina (PELLEGRINO *et al.*, 1986; LIU *et al.*, 1999; MURINSON *et al.*, 2005; VARGAS; BARRES 2007), sofrendo uma remodelagem e retomando a produção de mielina no local da lesão, aumentando consideravelmente a quantidade de PBM (HARRISINGH *et al.*, 2004, CÂMARA *et al.*, 2015), estimulada pela sinalização axonal (GUPTA *et al.*, 1993; CÂMARA *et al.*, 2015). Tal aumento de expressão de PBM, evidencia a tentativa neuronal de reparo axonal.

O aumento de PBM no nervo infraorbital dos animais hipotireoideos não neuropáticos, evidenciam a correlação negativa encontrada entre baixas concentrações plasmáticas dos HTs e o aumento do limiar nociceptivo, que, provavelmente se deve a uma resposta compensatória a redução da condutibilidade aumentando a produção de mielina.

Além disso, Câmara *et al.* (2015) demonstraram haver um influxo de macrófagos periférico para dentro do endoneuro após o 6º dia da injúria, que atuam na remoção da mielina liberando sinalizadores que levam a proliferação das células de Schwann, corroborando com a intensa marcação de DAPI em nosso que resultados, que podem ser interpretados como um possível infiltrado de macrófagos no nervo infraorbital lesionado por constrição.

A avaliação e quantificação da PBM são importantes ferramentas na avaliação de injúria axonal, bem como da capacidade de reparo, e ainda possibilita avaliar comparativamente, juntamente com outros parâmetros (principalmente comportamentais) e a influência da injúria na funcionalidade neuronal (GUPTA *et al.*, 1993; CÂMARA, 2015).

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 (GUPTA *et al.*, 1993; CÂMARA, 2015), visto que, após injúria neural, verificamos uma diminuição da expressão de PBM, devido a reabsorção da mielina, seguida de uma retomada de sua síntese mais tardiamente (GARBAY *et al.*, 2000).

Além do aumento da expressão de PBM e DAPI no 21º dia após injúria, também foi verificado qualitativamente alterações morfológicas na expressão de PBM na estrutura do nervo infraorbital, nos levando a identificar diminuição da quantidade de fibras nervosas com aumento do espaço entre as fibra e alterações no formato das fibras (espessamento da bainha

de mielina, degeneração axonal) nos grupos com neuralgia trigeminal induzida por constrição. Estes achados podem ser interpretados como sinais de morte ou degeneração axonal, visto que tal espessamento da bainha de mielina, na verdade é um “afrouxamento” das lamelas formadas pelas células de Schwann, que acontece devido a retração ou degeneração do axônio (FERNANDEZ-VALLE et al., 1995).

Tais achados se confirmam com nossos resultados de marcação de PGP 9.5, usado para identificar a presença de terminações nervosas nos cortes de pele da almofada vibrissal, onde encontramos, apesar de uma avaliação apenas qualitativa, uma diminuição na quantidade de terminações nervosas chegando no local de inervação do nervo infraorbital.

Sabemos que as concentrações normais de HTs estão intrinsecamente relacionados com o desenvolvimento e função do sistema nervoso central (MWANGI, 1998; BERNAL, 2002), onde alterações nas concentrações dos HTs podem afetar a maturação de populações específicas de neurônios, que têm resultados no desenvolvimento do aprendizado, memória e habilidades motoras e sensitivas (CHAN, 2000; SCHWARTZ et al., 1997).

A ausência ou deficiência nas concentrações plasmáticas dos HTs no período inicial do desenvolvimento neural ou em fase de reparo após injúria, leva a danos ao sistema nervoso de caráter irreversível, tais como falhas na mielinização dos axônios, podendo levar a alterações levam a mudanças drásticas na morfologia cerebral (DUSSAULT; RUEL, 1987; OPPENHEIMER; SCHWARTZ, 1997, ANDERSON, 2001).

Os HTs estimulam a formação, reorganização, o transporte, a estabilidade e a plasticidade axonal, onde proteínas estruturais estão relacionadas com o crescimento e transporte axonal, responsáveis pela estabilidade citoesqueleto e pela regeneração de nervos periféricos (HOFFMAN; CLEVELAND, 1988; SCHENKER *et al.*, 2002), que influenciam indiretamente a remielinização do axônio em reparo (CÂMARA *et al.*, 2015). Processos de remielinização, divisão das células de Schwann, podem ocorrer de forma errônea levando a geração de alodinia, excitação cruzada e disparos espontâneos (MURRAY, 2005; KRAYCHETE et al., 2008).

Os mecanismos moleculares os quais os HTs levam a defeitos no desenvolvimento do sistema nervoso ainda são pouco elucidados, e acredita-se que em sua grande maioria sejam através da ativação de receptores nucleares, modulando a expressão de genes específicos que transcrevem proteínas essenciais ao desenvolvimento e ao reparo do sistema nervoso (ANDERSON, 2001; BERNAL et al., 2002).

Tais considerações nos levam a acreditar ainda, que a dificuldade na condução nervosa causada pelo hipotireoidismo (SOUSA, 2006), associado ou não a uma lesão axonal, é

suficiente para estimular as células de schwann a uma maior produção de PBM na tentativa de compensar a deficiência na transmissão como observado em nosso estudo. Assim hipotetizamos que os níveis aumentados de PBM nos grupos não neuropáticos com hipotireoidismo se deva a uma resposta compensatória aos distúrbios eletrofisiológicos (redução da velocidade de condução e diminuição dos potenciais sensoriais) descritos por Sousa (2006), merecendo maiores investigações, e corroborando com os resultados encontrados por Sousa (2017) e Costa-Sobrinho (2017).

Por fim, considerando os resultados encontrados em nosso trabalho, e as informações achadas na literatura, relacionamos a diminuição dos sinais comportamentais de dor em animais neuropáticos com hipotireoidismo, a uma inibição da capacidade de reparo axonal por parte das baixas concentrações plasmáticas dos HTs, quando comparamos os resultados de PBM e DAPI a aos achados da expressão de ATF3, com conseqüente falha na remielinização, perda axonal e degeneração das fibras e terminações nervosas, que levam a falhas na condução nervosa dos sinais nociceptivos confirmados quando confrontamos os resultados obtidos na avaliação do limiar nociceptivo a expressão do marcador de dor c-Fos. Mostrando-nos, ainda, que os efeitos do hipotireoidismo na resposta nociceptiva estão mais fortemente ligados a desordens de reparo neuronal periférica que centrais, sugerindo uma degeneração do tipo Walleriana após injúria periférica no hipotireoidismo em vias trigeminais.

8 CONCLUSÃO

Baseado no exposto em nosso estudo, concluímos que:

- 1) O modelo de indução do hipotireoidismo com PTU em ratos, é eficiente em reproduzir as alterações encontradas em humanos com hipotireoidismo, onde nosso trabalho foi o primeiro a demonstrar isso, através de estudos sorológicos, comportamentais, anatomopatológicos e histopatológicos.
- 2) O hipotireoidismo leva a modificação da resposta nociceptiva trigeminal em ratos, elevando o limiar nociceptivo de ratos normais e neuropáticos.
- 3) A alteração do limiar nociceptivo correlaciona-se negativamente com as concentrações plasmáticas de hormônio T4.
- 4) O hipotireoidismo leva a uma redução da expressão de c-Fos no gânglio trigeminal em animais neuropáticos evidenciando a baixa resposta nociceptiva, entretanto eleva o c-Fos no subnúcleo caudal do trato espinhal, evidenciando o efeito periférico predominante sobre a resposta nociceptiva.
- 5) O hipotireoidismo não alterou a expressão de ATF-3 em gânglio trigeminal de animais normais e neuropáticos, sugerindo que há uma preservação da capacidade de resposta a injúria pelo nervo infraorbital.
- 6) O hipotireoidismo promove alterações estruturais periféricas, diminuindo a quantidade de terminações nervosas periféricas na pele da almofada vibrissal, e mostra sinais de diminuição da capacidade de reparo axonal pela diminuição do número de fibras do nervo infraorbital e aumento da expressão de PBM.
- 7) O hipotireoidismo leva a uma modificação da quantidade e morfologia da expressão de PBM em animais neuropáticos e não neuropáticos, o que sugere uma compensação da diminuição de condução e desorganização e possível perda axonal.

9 REFERÊNCIAS

- AGUGGIA, M., Neurophysiology of pain. **Neurological Sciences**, v. 24, n. 2, p. 57–60, 2003.
- AHMAD, A. H.; ISMAIL, Z., c-Fos and its Consequences in Pain. **Malays Journal of Medical Science**, v. 9, n.1, p. 3-8, 2002.
- AHMAD, A. H.; AZIZ, C, B, A, The Brain in Pain, **Malays Journal of Medical Science**, Special Issue, p. 46-54, 2014.
- ALVES, I. G. N.; CRUZ, K. M. L.; MOTA, C. M. D.; SANTANA, D. S.; et al, Experimental hypothyroidism during pregnancy affects nociception and locomotor performance of offspring in rats, **European Journal of Pain**, v. 17, p. 1291-1298, 2013.
- ALVES-NETO, O.; COSTA, C. M. C.; SIQUEIRA, J. T. T.; TEIXEIRA, M. J. et al, **Dor: Princípios e Prática**. São Paulo-SP, Artmed Editora, 2009, p.165.
- ANDERSON, G. W., Thyroid hormones and the brain. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 22, p. 1-17, 2001.
- ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S., **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. p. 388.
- ASIPU, A.; BLAIR, G. E., Regulation of myelin basic protein-encoding gene transcription in rat oligodendrocytes, **Gene**, v. 150, n. 2, p. 227-234, 1994.
- AVERILL, S.; MICHAEL, G. J.; SHORTLAND, P. J.; LEAVESLEY, R. C.; KING, V. R.; BRADBURY, E. J.; ANDMCMAHON, S. B., NGF and GDNF ameliorate the increase in ATF3 expression which occurs in dorsal root ganglion cells in response to peripheral nerve injury. **European Journal of Neuroscience**. V. 19, p. 1437–1445, 2004.
- ATHMANATHAN, S.; VYDEHI, B. V.; SUNDARAM, S.; VEMUGANTI, G. K.; MURTHY, J. M. K. Neuronal apoptosis in herpes simplex virus - 1 Encephalitis (HSE). **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 127-131, 2001.
- AXELROD, F. B.; HILZ, M. Inherited autonomic neuropathies, **Seminars of Neurology**. V. 23, n. 4, p. 381-390, 2003.

AZEVEDO, M. I.; PEREIRA, A. F.; NOGUEIRA R. B.; ROLIM F. E.; BRITO G. A.; WONG D. V.; LIMA, R. C. P.; RIBEIRO, R. A. VALE, M. L., The antioxidant effects of the flavonoids rutin and quercetin inhibit oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy. **Molecular Pain**, v. 9, n. 53, p. 1-14, 2013.

BEGHI, E. et al, Hypothyroidism and polyneuropathy, **Journal of neurology, neurosurgery e psychiatry**, v. 52, p. 1420-1423, 1989.

BENNETT, G. J., An animal model of neuropathic pain: a review. **Muscle and Nerve**, v. 16, n.10, p. 1040- 1048, 1993.

BENNETT, G. J., Hypotheses on the pathogenesis of herpes zoster-associated pain. **Annals of Neurology**, v. 35, Supplement. p. 38-41, 1994.

BENNET, G. J.; XIE, Y. K., A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, v.33, n. 1, p. 87-107, 1988.

BERNAL, J., Action of thyroid hormone in brain. **Journal of Endocrinology Investigations**, v. 25, n. 268-288, 2002.

BHUMIKA, S.; DARRAS, M. V., Role of thyroid hormones in different aspects of nervous system regeneration in vertebrates, **General and Comparative Endocrinology**. v.203, p. 86-94, 2014.

BIANCO, A. C., KIM, B. W. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, p. 2571–2579, 2006.

BLAKE, H. H.; HENNING, S. J. Effect of propylthiouracil dose on serum thyroxine, growth, and weaning in young rats. **American Journal of Physiology**, v. 248, p. 524-530, 1985.

BOESPFLUG, N. D.; KUMAR, S.; MCALEES, J. W.; PHELAN, J. D.; GRIMES, H. L.; HOEBE, K.; HAI, T.; FILIPPI, M. D.; KARP, C. L., ATF3 is a novel regulator of mouse neutrophil migration, **Blood Journal**, v. 123, n. 13, p. 2084-2093, 2017.

BRADY, S. T.; SIEGEL G. J.; ALBERS, R. W.; PRICE, D. L, **Basic neurochemistry**, London, Academic Press, 8^a ed., 2011, p. 928-937.

BRASIL - DIRETRIZ BRASILEIRA PARA O CUIDADO E A UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA FINS CIENTÍFICOS E DIDÁTICOS – DBCA - MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CONCEA, 2013.

BRUNO, A. N.; FONTELLA, F. U.; CREMA, L. M.; BONAN, C. D.; DALMAZ, C.; BARRETO-CHAVES, M. L., et al., Hyperthyroidism changes nociceptive response and ectonucleotidase activities in synaptosomes from spinal cord of rats in different phases of development. **Comparative Biochemical Physiology** v. 140, p. 111–116, 2005a.

BRUNO, A. N.; POCHMANN, D.; RICACHENEVSKY, F. K.; FONTELLA, F. U.; BONAN, C. D.; DALMAZ, C., et al., Nociceptive response and adenine nucleotide hydrolysis in synaptosomes isolated from spinal cord of hypothyroid rats. **Neurochemical Research**. v. 30, p. 1155–1161, 2005b.

CALIXTO, J. B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J.; SANTOS, A. S.; FILHO, C. V.; YUNES R. A. Naturally Occurring Antinociceptive substances from plants. **Phytotherapy Research** v.14, p. 401-118, 2000.

CÂMARA, C. C.; ARAÚJO, C. V.; SOUSA, K. K. O.; BRITO, G. A. C. VALE, M. L.; RAPOSO, R. S., MENDONÇA, F. E.; MIETTO, B. S.; MARTINEZ, A. M. B., ORÍA, R. B., Gabapentin attenuates neuropathic pain and improves nerve myelination after chronic sciatic constriction in rats, **Neuroscience Letters**, v. 607, p. 52-58, 2015.

CHAALAL et al, PTU-Induced Hypothyroidism in Rats Leads to Several Early Neuropathological Signs of Alzheimer's Disease in the Hippocampus and Spatial Memory Impairments, **Hippocampus**, v. 24, p. 1381 – 1393, 2014.

CHAN, S.; KILBY, M. D., Thyroid hormone and central nervous system development. **Journal Endocrinology**, v. 165, n. 1, 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.

CHATTIPAKORN, S.; CHATTIPAKORN, N.; LIGHT, A. R.; NARHI, M.; MAIXNER, W., Comparison of Fos expression within the ferrets spinal trigeminal nuclear complex evoked by electrical or noxious-thermal pulpal stimulation. **Journal of Pain**, v. 6, p. 569-580, 2005.

CHATTIPAKORN, S. C.; SIGURDSSON, A.; LIGHT, A. R.; NARHI, M.; MAIXNER, W., Trigeminal c-Fos expression and behavioral responses to pulpal inflammation in ferrets. **Pain**, v. 99, p. 61-69, 2002.

CHEN, X.; ZHANG, J.; WANG, X., Hormones in pain modulation and their clinical implications for pain control: a critical review, **Hormones**, v. 15, n. 3, p. 313-320, 2016.

CHIU, R., BOYLE, W. J.; MEEK, J.; SMEAL, T.; HUNTER, T.; KARIN, M., The c-Fos protein interacts with c-Jun / AP-1 to stimulate the transcription of AP-1-sensitive genes, **The Cell**, v. 54, n. 4, p. 541-552, 1988.

CHRISTENSEN, D.; GAUTRON, M.; GUILBAUD, G.; KAYSER, V., Combined systemic administration of the glycine/NMDA receptor antagonist, \pm HA966 and morphine attenuates pain-related behaviour in a rat model of trigeminal neuropathic pain. **Pain**, v. 83, p. 433-440, 1999.

CHUDLER, E. H., ANDERSON, L. C. Behavioral and electrophysiological consequences of deafferentation following chronic constriction of the infraorbital nerve in adult rats. **Archives of Oral Biology**, v. 47, p. 165-172, 2002.

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.

CORTELLI, P., PIERANGELI, G., Chronic pain-autonomic interactions. **Neurological Sciences**, v. 24, suplemento 2, p. S68 - S70, 2003.

COSTA-SOBRINHO, O. P.; SILVEIRA, H. F.; VIEIRA, L. C. A.; SOUSA, K. K. O.; DIAS, D. B. S.; GONDIM, D.V.; VALE, M. L. Trigeminal Neuralgia in rats with hypothyroidism: a morphological study, **The FASEB Journal**, v. 31, n. 1, p. 744-747, 2017.

COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J., Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. **Annual Review of Neuroscience**, v. 32, p. 1-32. 2009.

DECOSTERD, I.; JI, R. R.; ABDIC, S.; TATED, S.; WOOLF, C. J., The pattern of expression of the voltage-gated sodium channels Nav1.8 and Nav1.9 does not change in uninjured primary sensory neurons in experimental neuropathic pain models, **Pain**, v. 96, n. 3, p. 269–277, 2002.

DECOSTERD, I.; ALLCHORNEC, A.; WOOLF, C. J., Progressive tactile hypersensitivity after a peripheral nerve crush: non-noxious mechanical stimulus-induced neuropathic pain, **Pain**, v. 100, n. 1, p. 155–162, 2002.

DE LEEUW, R., **Orofacil pain: guidelines for assessment, diagnosis and management**. 5^a ed. Quintessence, Chicago, 2013, p. 91 – 100.

DEVOR, M.; SELTZER, Z., **Pathophysiology of damaged nerves in relation to chronic pain**. Textbook of pain. 4^a ed. London, Churchill and Livingstone, 1999, p. 129–64.

DICKENSON A. H., MATTHEUS E. A, SUZUKI R. Neurobiology of neuropathic pain: mode of action of convulsivants, **European Journal of Pain**, v. 6, supplement A, p. 51-56, 2002.

DUSSAULT J.H.; RUEL J., Thyroid hormones and brain development. **Annals Reviews of Physiology**, v. 49, p. 321-34, 1987.

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.

ENGSTRÖM, G.; SVENSSON, T. H.; WALDECK B., Thyroxine and brain catecholamines: increased transmitter synthesis and increased receptor sensitivity. **Brain Research**, v. 77, p. 471-83, 1974.

ESKANDAR, E.; BARKER, F. G.; RABINOV, J. D. Case records of the Massachusetts General Hospital: A 61-year-old man with left-sided facial pain. **New England Journal of medicine**, v. 355, n. 2, p. 183-188. 2006.

EVANS, R. M., The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. **Science**, v. 240, p. 889–895, 1988.

FARIA, L. G. MUZZI, L. A.; SAMPAIO, R. G.; MUZZI, R. A. L.; CURTI, F.; KAWAMOTO, Y. F.; BARROS, R.; MESQUITA, L. R.; BARROS, B. S., Neuropatia periférica associada ao hipotireoidismo em cão. **Revista de Educação continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 10, n. 1, p. 60-61, 2012.

FEIN, A., **Nociceptores: as células que sentem dor**. São Paulo, Dor on Line, p. 106, 2011.

FEIN, A., **Nociceptor and perception of pain**. Seminars of Neurology. University of Connecticut Health Center. Farmington, p. 1, 2012.

FELIX, S. P.; PEREIRA LOPES, F. R.; MARQUES, S. A.; MARTINEZ, A. M. Comparison between suture and fibrin glue on repair by direct coaptation or tubulization of injured mouse sciatic nerve. **Microsurgery**, v. 33, n. 6, p. 468-477, 2013.

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, A. E.; SERAKIDES, R.; GOMES, A. E. S.; CASSALI, G. D., Model of induction of thyroid dysfunctions in adult female mice. **Arquivos Brasileiros de Veterinária e Zootecnia**, v. 59, p. 1245-1249, 007.

FIELD, A., **Discovering Statistics using SPSS**, 4. Ed. Los Angeles, Sage, 2013.

FIELDS, H. L., Pain modulation: expectation, opioid analgesia and virtual pain. **Progress in Brain Research**. v. 122, p. 245–253, 2000.

FONTES, K. B.; JAQUES A. E., O papel da enfermagem frente ao monitoramento da dor como 5º sinal vital. **Ciência, cuidado e Saúde**, v. 6, p. 481-487. 2008.

FRIED, K.; BONGENHIELM, U. BOISSONADE, F. M.; ROBINSON P. P.; Nerve injury-induced pain in the trigeminal system. **The Neuroscientist**, v. 7, n. 2, p. 155-65. 2001.

FROMM, G. H.; TERRENCE, C. F.; CHATTHA, A.S.; GLASS, J. D., Baclofen in trigeminal neuralgia. Its effect on the spinal trigeminal nucleus: a pilot study. **Archives of Neurology**, v. 37, n. 12, p. 786-771, 1980.

GARRISON, C. J.; DOUGHERTY, P. M.; KAJANDER, K. C.; CARLTON, S. M. Staining of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in lumbar spinal cord increases following a sciatic nerve constriction injury. **Brain Research**, v. 565, n. 1, p. 1-7, 1991.

GAMBORINO, M. J.; SEVILLA-ROMERO, E.; MUÑOZ, A.; HERNÁNDEZ-YAGO, J.; RENAU-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.

GARBAY, B.; HEAPE, A. M.; SARGUEIL, F.; CASSAGNE, C., Myelin synthesis in peripheral nervous system, **Progress in Neurobiology**, v. 61, p. 267-304, 2000.

GAUTRON, M.; JAZAT, F.; RATINAHIRANA, H.; HAUW, J. J.; GUILBAUD, G. Alterations in myelinated fibres in the sciatic nerve of rats after constriction: possible relationships between the presence of abnormal small myelinated fibres and pain-related behaviour. **Neuroscience Letters**, v. 111, n. 1-2, p. 28-33, 1990.

GARNER, D. G.; SHOBACK, D., **Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology**. 9. ed. McGraw Hill Lange, London, 2011.

GHENIMI, N.; ALFOS, S.; RODONNET, A.; HIGUERET, P; PALLET, V.; ENDEERLIN, V., Adult-Onset Hypothyroidism Induces the Amyloidogenic Pathway of Amyloid Precursor Protein Processing in the Rat Hippocampus, **Journal of Neuroendocrinology**, v. 22, p. 951-959, 2010.

GREGG, J. M., A surgical approach to the ophthalmic-maxillary nerve trunks in the rat. **Journal of Dental Research**, v. 52, n. 2, p. 392, 1973.

GROSSIE, J.; TURNER, C. W., Effect of thyro-parathyroidectomy and adrenalectomy on food intake in Rats, **Proceedings of Society of Experimental Biology and Medicine**, v. 118, p. 28-30, 1965.

GUASTI, L.; MARINO, F.; COSENTINO, M.; et al, Pain perception, blood pressure levels, and peripheral benzodiazepine receptors in patients followed for differentiated thyroid carcinoma: a longitudinal study in hypothyroidism and during hormone treatment. **Clinical Journal of Pain**, v. 23, p. 518-523, 2007.

GUILBAUD, G.; BENOIST, J. M.; JAZAT, F.; GAUTRON, M. Neuronal responsiveness in the ventrobasal thalamic complex of rats with an experimental peripheral mononeuropathy. **Journal of Neurophysiology**, v. 64, n. 5, p. 1537-1554, 1990.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E., **Tratado de fisiologia médica**. 12 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011, p. 931-959.

GUIMARÃES, J., SILVEIRA, F. Abordagem diagnóstica das neuropatias periféricas, **Acta Medica Portuguesa**; v. 21, p. 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. **Journal of Neurosciences Research**, v. 34, n. 1, p. 14-23, 1993.

HAANPAA, M.; ATTAL, N.; BACKJONJA, M.; BARON, R.; BENNET, M.; BOUHASSIRA, D., Guidelines on neurophatic pain assessment, **Pain**, v. 152, n. 1, p. 14-27, 2011.

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.

HALAZONETIS, T. D.; GEORGOPOULOS, K.; GREENBERG, M. E.; LEDER, P., C-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities, **The Cell** . v. 55, n. 5, p. 917-924, 1988.

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**, v. 26, p. 409-414, 2008.

HARRISINGH, M. C.; PEREZ-NADALES, E.; PARKINSON, D. B.; MALCOLM, D. S.; MUDGE, A. W.; LLOYD, A. C., The Ras/Raf/ERK signalling pathway drives Schwann cell dedifferentiation. **The European Molecular Biology Organization Journal**, v. 23, n. 15, p. 3061-3071, 2004.

HARSTALL, C.; OSPINA M., How prevalent is chronic pain. **Pain Clinical Updates**, v. 11, n. 2, p. 1-4. 2003.

HERRERA, D. G.; ROBERTSON, H. A. Ativation of c-Fos in Brain, **Progress in Neurobiology**, v. 50, p. 83-107, 1996.

HIROI, Y. et al. Rapid nongenomic actions of thyroid hormone. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 103, n. 38, p. 14104-14109, 2006.

HODKINSON, C. F. et al., Preliminary evidence of immune function modulation by thyroid hormones in healthy men and women aged 55–70 years. **Journal of Endocrinology**. v. 202, p. 55–63, 2009.

HOFFMAN, P. N.; CLEVELAND, D. W., Neurofilament and tubulin expression. Recapitulates the developmental program during axonal regeneration: induction of a specific beta-tubulin isotype. **Proceeding of National Academy of Science of U.S.A.** v. 85, n. 12, p. 4530–4533, 1998.

HUNT, D.; RAIVICH, P.; ANDERSON, P. N., Activating Transcription Factor 3 and the nervous system, **Frontiers in molecular Neuroscience**, v. 5, n. 7, p. 1-17, 2012.

HUNT, S. P.; PINI, A.; EVAN, G., Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. **Nature**, v. 328 p. 632-634, 1987.

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

IASP. Part III: Pain Terms, **A Current List with Definitions and Notes on Usage. Classification of Chronic Pain**, 2ed, Seattle, IASP Press, 2012.

IMAMURA, Y.; KAWAMOTO, H.; NAKANISHI, O., Characterization of heat-hyperalgesia in an experimental trigeminal neuropathy in the rats. **Experimental Brain Research** v. 116, p. 97–103, 1997.

JACKSON, P.; THOMPSON, R. J., The demonstration of new human brain-specific proteins by high-resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Journal Neurology Science**, v. 49, p. 429–438, 1981.

JANNETTA, P. J., Gross Mesoscopic description of the human trigeminal nerve and ganglion, **Journal of Neurosurgery**, v. 20, n. 1, p. 109-111, 1963.

KATUSIC, S.; BEARD, C. M.; BERGSTRALH, E.; KURLAND, L. T., Incidence and clinical features of trigeminal neuralgia, **Annals of Neurology**. v. 27, n.1, p. 89-95. 1990.

KEMPERS, M. J.; SLUIJS, V. L.; SANDEN, M. W.; et al, Intellectual and motor development of young adults with congenital hypothyroidism diagnosed by neonatal screening. **Journal Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 91, p. 418–424, 2006.

KLEIN, J. R., The Immune System as a Regulator of Thyroid Hormone Activity. **Experimental biology and medicine**. v. 231, n. 3, p. 229-236, 2006.

KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H. G., **Anatomia dos animais domésticos, Texto e Atlas**, Artred, 6 ed, 2016, p. 571-573.

KOOPMAN, J.S.; DIELEMAN, J. P.; HUYGEN. F. J.; DE MOS, M.; MARTIN, C. G.; STURKENBOOM, M. C., Incidence of facial pain in the general population. **Pain**. v. 147, n. 1-3, p. 122-127, 2009.

KRAYCHETE, D. C.; GOZZANI, J. L.; KRAYCHETE, A. C., Dor neuropática: aspectos neuroquímicos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 58, p. 492-505. 2008.

KRATZSCH, J.; PULZER, F., Thyroid gland development and defects, **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 22, n. 1, p. 57–75, 2008.

KRONENBERG, H. M.; MELMED, S.; POLONSKY, K. S., Willians Tratado de endocrinologia, ed. 11, Rio de Janeiro, Elsevier, 2010.

LAI, J.; GOLD, M. S.; KIM, C. S. - Inhibition of neuropathic pain by decreased expression of the tetrodotoxin-resistant sodium channel, Nav1.8. **Pain**, v. 95, n. 1, p. 143-152, 2002.

LANG, E.; KALTENHAUSEN, M.; SEIDLERM, S.; MATTENKLODT, P.; NEUNDORFER, B., Persistent idiopathic facial pain exists independent of somatosensory input from the painful region: findings from quantitative sensory functions and somatotopy of the primary somatosensory cortex. **Pain**, v. 118, n. 1-2, p. 80-91, 2005.

LARSEN, P. R.; SILVA, J. E.; KAPLAN, M. M., Relationships between circulating and intracellular thyroid hormones: physiological and clinical implications. **Endocrinology Reviews**, v. 2, p. 87–102, 1981.

LATRÉMOLIÈRE, A.; MAUBORGNE, A.; MASSON, J.; BOURGOIN, S.; KAYSER, V.; HAMON, M.; POHL, M., Differential Implication of Proinflammatory Cytokine Interleukin-6

in the Development of Cephalic versus Extracerebral Neuropathic Pain in Rats, *The Journal of neuroscience*, v. 28, n. 34, p. 8489-8501, 2008.

LEE, P. R.; BRAD, Y. D.; KOENIG, J. I. Thyroid hormone regulation of N-methyl-D-aspartic acid receptor subunit mRNA expression in adult brain. ***Journal of Neuroendocrinology***, v. 15, n. 1, p. 87-92, 2003.

LINDA, H.; SKÖLD, M. K.; OCHSMANN, T., Activating transcription factor 3, a useful marker for regenerative response after nerve root injury. ***Frontiers in Neurology***, v. 2, n. 30, p. 1-6, 2011.

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.

LOPES, V. G. C.; VALE, B. N.; OGAWA, W. N., Nocicepção térmica em ratos tratados com propiltiouracil, ***Revista Amazônia Science & Health***, v. 4, n. 4, p. 25-31, 2016.

LOEVNER, A. L.; KAPLAN, L. S.; CUNNANE, M. E.; MOONIS, G., Cross-sectional Imaging of the thyroid gland, ***Neuroimaging Clinics of North America***. v. 18, n. 3, p.445-461, 2008.

NETTER, F., ***Atlas de Anatomia Humana***, 5ª ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2011, p. 44.

MACFARLANE, B. V.; WRIGHT, A., O'CALLAGHAN, J.; BENSON, H. A. E., Chronic neuropathic pain and its control by drugs. ***Pharmacology & Therapeutics***, v.75, n.1, p.1-19. 1997.

MACHADO, A., ***Neuroanatomia Funcional***, 3 ed, Atheneu, São Paulo, 2013, p. 113-120.

MACIANSKYTE, D.; JANUZIS, G.; KUBILIUS, R.; ADOMAITIENE, V.; SCIUPOKAS, A. Associations between chronic pain and depressive symptoms in patients with trigeminal neuralgia. ***Medicina (Kaunas)***, v. 47, n.7, p. 386–392, 2011.

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. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**. v. 57, n. 3, p. 205-231, 2013.

MALMIERCA, M. S.; MERCHÁN, M. A., **The Rat Auditory System**, 1ª ed. Salamanca, University of Salamanca, 2002, p. 32.

MARTIN, J. H., **Neuroanatomia Texto e Atlas**, 4ª ed. AMGH Editora, São Paulo, 2013, p. 137-148.

MARTIN, R.; FRAILE, B.; PEINADO, F.; ARENAS, M. I.; ELICES, M.; ALONSO, L.; *et al.* Immunohistochemical localization of protein gene product 9.5, ubiquitin, and neuropeptide Y immunoreactivities in epithelial and neuroendocrine cells from normal and hyperplastic human prostate. **Journal of Histochemistry Cytochemistry**, v. 48, p. 1121–1130, 2000.

MAHAI, R., Physiology of the pituitary, thyroid, parathyroid and adrenal glands, **Sugery Oxford**. v. 32, n. 10, p. 504-512, 2014.

MERSKEY, H. et al. Pain terms: a list with definitions and notes on usage: recommended by the IASP subcommittee on taxonomy. **Pain**, v. 6, p.249-252, 1979.

MILDE-LANGOSCH, K., The Fos family of transcription factors and their role in tumorigenesis. **European Journal of Cancer**, v. 41, n. 16, 2449-24461, 2005.

MOURA, L.; OLIVEIRA, A. S. B.; ZANOTELI, E.; CARDOSO, R.; SCHIMIDT, B.; GABBAI, A. A. Padronização normal das fibras nervosas intraepidérmicas em 30 voluntários saudáveis com PGP 9,5. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 64, n. 2ª, p. 271-275, 2004.

MURINSON, B. B.; ARCHER, D. R.; LI, Y.; GRIFFIN, J. W., Degeneration of myelinated efferent fibers prompts mitosis in Remak Schwann cells of uninjured Cfiber afferents. **Journal of Neuroscience**, v. 25, p. 1179-1187, 2005.

MWANGI, D. K. Cerebellar parameters in developing 15 day old rat pups treated with propylthiouracil in comparison with 5 and 24 day old. **East Africa Medicine Journal**, v. 78, n. 6, p. 322- 326, 2001.

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 Africa Medicine Journal**. v. 75, n. 10, p. 602-608, 1998.

MWANGI, D. K. Stereological analysis of the cerebellum of 24-day old rats with propylthiouracil-induced hypothyroidism, **East Africa Medicine Journal**, v. 77, n. 4, p. 221 – 227, 2000.

MUKAKA, M.M. Statistics Corner: A guide to appropriate use of Correlation coefficient in medical research. **Malawai Medical Journal**. v. 24, n. 3, p. 69–71, 2012.

MUZZIO, D.; ZYGMUNT, M.; JENSEN, F., The role of pregnancy-associated hormones in the development and function of regulatory B cells. **Frontiers in Cellular Endocrinology** v. 5, n. 39, p.1-6, 2014.

MURRAY, B. **Trauma of the nervous system: Pheripheral nerve trauma**. Neurology in Clinical Prattice: Principles of diagnosis and management. 4^a ed. London, Butterworth Heinemann, 2005. p. 1179-1198.

NARAYANAN, C. H.; NARAYANAN, Y.; BROWNE, R.C. Development of the spinal tract of the trigeminal nerve and its relation to early fetal behavior in rats under normal and hypothyroid conditions. **Experimental Brain research**, v. 62, n. 1, p. 61-76. 1986

NESTLER, E. J., Mechanisms of transcription of drug addiction. **Clinical Psicofarmacologic Neuroscience**, v. 10, n. 3, p. 136-143, 2012.

NEVILLE, B. W.; DAMN, D. D.; ALLEN, C. M.; BOUQUOT, J. E. Patologia Oral e Maxilofacial. 3^a ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2009.

NICHOLSON B. D, Evolution and tratament of central pain syndromes. **Neurology**, v. 62, n. 5, supplement 2, p. 30-36, 2004.

OBATA, K.; YAMANAKA, H.; FUKUOKA, T.; YI, D.; TOKUNAGA, A.; HASHIMOTO, N.; YOSHIKAWA, H.; ANDNOGUCHI, K., Contribution of injured and uninjured dorsal root ganglion neurons to pain behavior and the changes in gene expression. following chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. **Pain** v. 101, p. 65–77, 2003.

OKESON, J. P., **Orofacil Pains: The Clinical Management of Orofacila Pain**, 6^a ed. Chicago, Quintessence, 2005, p. 449- 490.

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

OPPENHEIMER, J. H.; SCHWARTZ, H. L., Molecular basis of thyroid hormone-dependent brain development. **Endocrine Reviews**, v. 18, n. 4, p. 462-475, 1997.

ØRSTAVIK, K.; NORHEIM, I.; JØRUM, E., Pain and small-fiber neuropathy in patients with hypothyroidism. **Neurology** v. 67, n. 5, p.786–791, 2006.

PATEL J.; LANDERS, K.; LI, H.; MORTIMER R.H.; RICHARD K., Thyroid hormones and fetal neurological development. **Journal of Endocrinology**. v. 209, n. 1, p. 1-8, 2011.

PAXINOS, G; WATSON, C, **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**, 6^a ed, London, Elsevier, 2007, p. 193-203, 405-415.

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 nerve fibre degeneration, **Journal of Neurocytology**, v. 15, n. 1, p. 17-28, 1986.

PETERS, C. M.; JIMENEZ-ANDRADE, J. M.; JONAS, B. M.; SEVCIK, M. A.; KOEWLER, N. J.; GHILARDI, J. R.; WONG, G. Y.; MANTYH, P. W., Intravenous paclitaxel administration in the rat induces a peripheral sensory neuropathy characterized by macrophage infiltration and injury to sensory neurons and their supporting cells. **Experimental Neurology**, v. 203, p. 42–54, 2007.

PEETERS, R. P., Reduced activation and increased inactivation of thyroid hormone in tissues of critically ill patients. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. v. 88, p. 3202–3211, 2003.

PENZA, P.; LOMBARDI, R.; CAMOZZI, F.; CIANO, C.; LAURIA, G., Painful neuropathy in subclinical hypothyroidism: clinical and neuropathological recovery after hormone replacement therapy, **Neurology Science**, v. 30, p. 149-151, 2009.

PIMENTA, C. A. M., **Atitudes de doentes com dor crônica frente à dor** (tese livre-docência, 1999). São Paulo, Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo; 1999.

POLLARD, J. D.; McLEOD, J. G.; HONNIBAL, A. T. G.; VERHEIJDEN, M. A. Clinical, electrophysiological and nerve biopsy findings in two cases. **Journal of the Neurological Sciences**. v. 53, n. 3, p. 461-471, 1982.

PRADO, P. T.; DEL BEL, E. A., C-Fos, um gene de ativação imediata como marcador neural de nocicepção. **Revista Medicina de Ribeirão Preto**, v. 21, p. 424-433, 2009.

PRASAD, S.; GALETTA, S., Trigeminal neuralgia: historical notes and current concepts. **Neurologist**. V. 15, n.2, p. 87-94. 2009

RENTON, T.; THEXTON, A.; HANKINS, M.; MCGURK, M., Quantitative thermosensory testing of the lingual and inferior alveolar nerves in health and after iatrogenic injury. **The British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, v. 41, n. 1, p. 36-42, 2003.

RIBEIRO, N. C. A., *et al.* O enfermeiro no cuidado à vítima de trauma com dor: o quinto sinal vital. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 45, n. 1, p. 146-152, 2011.

ROCHA, A.P.C.; KRAYCHETE, D.C.; LEMONICA, L.; CARVALHO, L.R.; BARROS, G.A.M.; GARCIA, J.B.S.; SAKATA, R.K.; Pain: Current Aspects on Peripheral and Central Sensitization, **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 57, n. 1, p. 94-105, 2007.

ROHANI, M. H.; AKBARI, Z.; BEHZADI, G., Congenital hypothyroidism alters formalin-induced pain response in neonatal rats, **International Journal of developmental Neuroscience**, v. 27, p. 53-57, 2009.

RIAL, R. V. TUR, J. A. PALMER, A. M. TUR, J. Altered Responsiveness to Ambient Stimuli in Altered Thyroidal States, **Physiology & Behavior**, v. 41, p. 119–123, 1987.

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

SARKAR D.; SINGH K. S., Effect of neonatal hypothyroidism on prepubertal mouse testis in relation to thyroid hormone receptor alpha 1 (THR α 1) **General and Comparative Endocrinology**. v. 239, p. 1-12, 2016.

SCHEITHAUER, B. W.; KOVACS, K.; RANDALL, R. V.; RYAN, N., Pituitary gland in hypothyroidism. Histologic and immunocytologic study. *Archives of Pathology & Laboratory of Medicine*, v. 109, n. 6, p. 499-504, 1985.

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 Research*** v. 957, n.2, p. 259-270, 2002.

SCHROEDER, A. C.; PRIVALSKY, M. L., Thyroid hormones, T3 and T4, in the brain. ***Frontiers in Endocrinology***. v. 5, n. 40, p. 1-6, 2014.

SCHESTATSKY, P. Definition, diagnosis and treatment of neuropathic pain. ***Revista do Hospital das Clínicas de Porto Alegre***. v. 28, n. 3. p. 177-187, 2008.

SCHWARTZMAN, R. J.; GROTHUSEN, J.; KIEFER, T. R.; RORH, P., Neuropathic central pain: epidemiology, etiology, and treatment options, ***Archives of Neurology***, v. 58, p. 1547-1550. 2001.

SCHWARTZ, H. L.; ROSS, M. E.; OPPENHEIMER, J. H., Lack of Effect of Thyroid Hormone on Late Fetal Rat Brain Development. ***Endocrinology***, v. 138, n. 8, p. 3119-3124, 1997.

SEIFFERS, R.; ALLCHORNE, A. J.; WOOLF, C. J., The transcription factor ATF-3 promotes neurite out growth. ***Molecular and Cellular Neuroscience***, v. 32, p. 143–154, 2006.

SELTZER, Z.; DUBNER, R.; SHIR, Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. ***Pain***, v.43, n. 2, p. 205–218, 1990.

SCHMIDT, E. D.; CRAMER, S. J.; OFFRINGA, R., The thyroid hormone receptor interferes with transcriptional activation via the AP-1 complex. ***Biochemical Biophysics Research Community***, v. 192, p. 151–160, 1993.

SHIRAKI, A. et al. Gene expression profiling of the hippocampal dentate gyrus in an adult toxicity study captures a variety of neurodevelopmental dysfunctions in rat models of hypothyroidism, ***Journal of Applied Toxicology***, v. 36, n. 1, p. 24-34, 2015.

SHUAIB, A.; IJAZ, S.; HEMMINGS, S.; GALAZKA, P.; ISHAQZAY, R.; LIU, L.; RAVINDRAN, J.; MIYASHITA, H. Decreased glutamate release during hypothyroidism may contribute to protection in cerebral ischemia. ***Experimental Neurology***, 128: 260-5, 1994.

SILVERTHORN, D. U., **Fisiologia Humana - Uma Abordagem Integrada**, São Paulo, Artmed, 7 ed, 2017, p. 764-767.

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

SIQUEIRA, S. R.; ALVES, B.; MALPARTIDA, H. M., TEIXEIRA, M. J.; SIQUEIRA, J. T., Abnormal expression of voltage-gated sodium channels Nav1.7, Nav1.3 and Nav1.8 in trigeminal neuralgia. **Neuroscience**, v. 164, n. 2, p. 573-577, 2009.

SIQUEIRA, S. R.; TEIXEIRA, M. J.; DE SIQUEIRA, J. T., Severe psychosocial compromise in idiopathic trigeminal neuralgia: case report. **Pain Medical**, v. 11, n. 3, p. 453-455, 2010.

SMITH, H.; JOINT, C., SCHLUGMAN, D., NANDI, D., STEIN J. F., AZIZ, T. Z., Motor cortex stimulation for neuropathic pain. **Neurosurgery in Focus**, v. 11, n. 3, p. 2. 2001.

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, K. K. O., **Ação dos Hormônios Tireoidianos sobre o Potencial de Ação Composto do Nervo Ciático de Rato**, (Dissertação de Mestrado Acadêmico, 2006), Universidade Estadual do Ceará, Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas, 2006. p. 116.

SOUSA, K. K. O., **Efeitos do hipotireoidismo no sistema nervoso em ratos no desenvolvimento da neuropatia periférica por constrição crônica do nervo ciático**, (Tese de Doutorado, 2017) Universidade Federal do Ceará, Doutorado em Ciências Médicas, 2017. p. 114.

SOUNVORAVONG, S.; NAKASHIMA, M. N.; WADA, M.; NAKASHIMA, K. Decrease in serotonin concentration in raphe magnus nucleus and attenuation of morphine analgesia in two mice models of neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 484, n. 2-3, p. 217-223, 2004.

SOUSA, A. M.; LAGES, G. V.; PEREIRA, C. L., SLULLITEL, A., Experimental models for the study of neuropathic pain, **Revista Dor**, v. 17, suplemento 1, p. 27-30, 2016.

SUGIMOTO, T.; HE, Y. F.; FUNAHASHI, M.; ICHIKAWA, H., Induction of immediate-early genes c-fos and zif 268 in the subnucleus oralis by noxious tooth pulp stimulation. **Brain Research**. v. 794, p. 353-38, 1998.

SUPRONSINCHAI, W.; STORER, R.J., c-Fos: a neural activity marker for craniofacial pain research, **Chulalongkorn University Journal**, v. 38, p. 77-98, 2015.

TAL, M.; DEVOR, M., Ectopic discharge in injured nerves: comparison of trigeminal and somatic afferents. **Brain Research**, v. 579, p. 148–51, 1992.

TAVARES, I.; LIMA, D.; COIMBRA, A., Neurons in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord projecting to the medullary ventrolateral reticular formation express c-fos after noxious stimulation of the skin. **Brain Research**. v. 623, p. 278-286, 1993.

TEIXEIRA, M. J., **A lesão por radiofrequência e a descompressão neurovascular para o tratamento da neuralgia do trigêmeo** (dissertação de Mestrado Acadêmico, 1984). São Paulo, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1984.

TEIXEIRA, M. J. Fisiopatologia da nocicepção e da supressão da dor. **Jornal Brasileiro de Oclusão, ATM e Dor Orofacial**, v.1, n.4, p. 329-334, 2001.

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

THOMPSON, R. J.; DORAN, J. F.; JACKSON, P.; DHILLON, A. P.; RODE, J., PGP 9.5—a new marker for vertebrate neurons and neuroendocrine cells. **Brain Research**, v. 278, p. 224–228, 1983.

TOHEI, A.; AKAI, M.; TOMABECHI, T.; MAMADA, M.; TAYA, K., Adrenal and gonadal function in hypothyroid adult male rats. **Journal of Endocrinology**. v. 152, p. 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. **The Journal Veterinary Medical Science**. v. 60, n. 4, p. 439–446, 1998.

TREEDE, R. D.; JENSEN, T. S.; CAMPBELL, J. N.; CRUCCU, G.; DOSTROVSKY, J. O.; GRIFFIN, J. W.; HANSSON, P.; HUGHES, R.; NURMIKKO, T.; SERRA, J., Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. **Neurology**, v. 70, n. 18, p.1630-1635. 2008.

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.

UKIBE, N. R.; UKIBE, S. N.; EMELUMADU, O. F.; ONYENEKWE, C. C.; AHANEKU, J. E.; IGWEGBE, A. O.; *et al.* Impact of thyroid function abnormalities on reproductive hormones during menstrual cycle in premenopausal. **PLoS ONE** v. 12, n. 7, p. 1-15, 2017.

VALSESIA, A. *et al.* GH deficiency status combined with GH receptor polymorphism affects response to GH in children, **European Journal of Endocrinology**, v. 173, n. 6, p. 777-789, 2015.

VAN KLEEF, M.; VAN GENDEREN, W. E.; NAROUZE, S.; MURMIKKO, T. J.; VAN ZUNDERT, J.; GEURTS, J. W. *et al.* Trigeminal Neuralgia. **Pain Practice**, v. 9, n. 4, 2009.

VARGAS, M. E.; BARRES, B. A., Why is wallerian degeneration in tehe CNS so slow? **Annual Reviews of Neuroscience**, v. 30, p. 153-179, 2007.

VISSER, W. E.; FRIESEMA, E. C.; VISSER, T. J., Minireview: thyroid hormone transporters: the knowns and the unknowns. **Molecular Endocrinology**, v. 25, p. 1–14, 2011.

VOS, B. P.; STRASSMAN, A. M.; MACIEWICZ, R. J. Behavioural evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve. **Journal of Neuroscience**, v. 14, p. 2708–2723, 1994.

WAJNER, S. M.; WAGNER, M. S.; FERNENDES, N. S.; MAIA, A. L., Thyroid hormones and testicular function. **Revista do Hospital das Clinicas de Porto Alegre**, v. 28, n. 1, p.41-48, 2008.

WALLACE, J. Update on pharmacotherapy guidelines for treatment of neuropathic pain. **Pain & Headache**, v. 11, n. 3, p. 208-214, 2007.

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.

WILKINS, R. H. A problem of cervical pain. **Neurosurgery**, v. 36, n. 1, p. 158-65, 1995.

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

WOOLF, C. J.; MAX, M. B. Mechanism-based pain diagnosis: issues for analgesic drug development. **Anesthesiology**, v.95, n. 1, p. 241-9, 2001.

XIAO, Q.; NIKODEM, V. M., Apoptosis in the developing cerebellum of the thyroid hormone deficient rat, **Frontiers of Bioscience**, v. 3, p. 52-57, 1998.

XU, M.; AITA, M.; CHAVKIN, C. Partial infra-orbital nerve ligation as a model of trigeminal nerve injury in the mouse: behavioral, neural, and glial reactions. **The Journal of Pain**, v. 9, n. 11, p. 1036-1047, 2008.

YEN, P. M., Physiological and Molecular Basis of Thyroid Hormone Action. **Physiology Reviews**, v.81, n.3, p. 1097- 1142, 2001.

YI, J.; ZHENG, J.; ZHANG, W.; WANG, S.; YANG, Z.; DOUL, K., Decreased pain threshold and enhanced synaptic transmission in the anterior cingulate cortex of experimental hypothyroidism mice, **Molecular Pain**, v. 10, n. 38, p. 1-8, 2014.

YU, J.; TANG, Y. Y.; FENG, H.B.; CHENG, X. X. behavioral and micro positron emission tomography imaging study in a rat model of hypothyroidism, **Behavioral Brain Research**. v. 271, p. 228–233, 2014.

YUAN, P. Q.; YANG, H., Hypothyroidism increases Fos immunoreactivity in cholinergic neurons of brain medullary dorsal vagal complex in rats. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, v. 289, p. 892–899, 2005.

ZHAO *et al*, Rat Model of Trigeminal Neuralgia Using Cobra Venom Mimics the Electron Microscopy, Behavioral, and Anticonvulsant Drug Responses Seen in Patients, **Pain Physician**, v. 18, p. 1083-1090, 2015.

ZIMMERMANN, M. Pathobiology of neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**. v. 429, p. 23-37, 2011.

APÊNDICE A – Teste de normalidade, homogeneidade de variâncias e ANOVA com teste *pos-hoc* de Games-Howell para dosagem de T4

Tests of Normality

Grupos	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
DOSAGEM DE T4 C	,309	6	,135	,804	6	,088
NT	,224	6	,200 [*]	,960	6	,807
NT-S	,195	6	,200 [*]	,971	6	,882
H	,272	6	,200 [*]	,890	6	,359
H+NT	,217	6	,200 [*]	,905	6	,441
H+NT-S	,164	6	,200 [*]	,978	6	,924

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

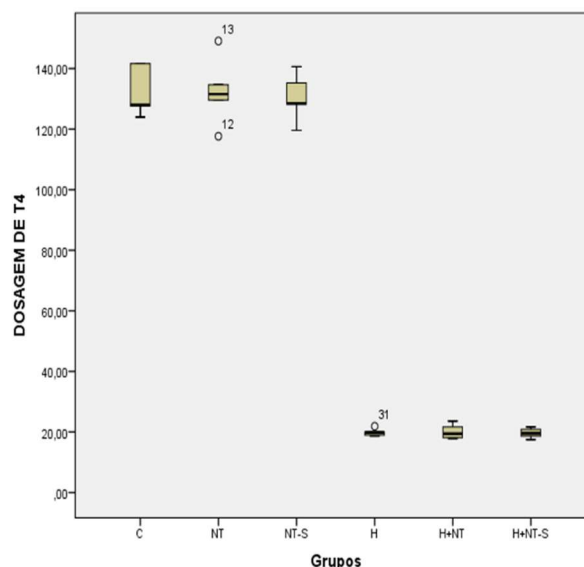
Test of Homogeneity of Variances

DOSAGEM DE T4

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3,456	5	24	,017

DOSAGEM DE T4

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	94009,268	5	18801,854	414,093	,000
Within Groups	1089,718	24	45,405		
Total	95098,986	29			



Multiple Comparisons

Dependent Variable: DOSAGEM DE T4

(I) Grupos	(J) Grupos	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Games-Howell C	NT	,05000	6,30109	1,000	-23,4532	23,5532
	NT-S	2,13600	5,18519	,998	-16,8245	21,0965
	H	112,69600*	3,80944	,000	95,0325	130,3595
	H+NT	112,41800*	3,92487	,000	95,1770	129,6590
	H+NT-S	112,91800*	3,84407	,000	95,4034	130,4326
NT	C	-,05000	6,30109	1,000	-23,5532	23,4532
	NT-S	2,08600	6,17991	,999	-21,1519	25,3239
	H	112,64600*	5,08104	,000	88,8565	136,4355
	H+NT	112,36800*	5,16814	,000	88,9584	135,7776
	H+NT-S	112,86800*	5,10705	,000	89,2024	136,5336
NT-S	C	-2,13600	5,18519	,998	-21,0965	16,8245
	NT	-2,08600	6,17991	,999	-25,3239	21,1519
	H	110,56000*	3,60546	,000	93,8848	127,2352
	H+NT	110,28200*	3,72721	,000	94,0315	126,5325
	H+NT-S	110,78200*	3,64203	,000	94,2598	127,3042
H	C	-112,69600*	3,80944	,000	-130,3595	-95,0325
	NT	-112,64600*	5,08104	,000	-136,4355	-88,8565
	NT-S	-110,56000*	3,60546	,000	-127,2352	-93,8848
	H+NT	-,27800	1,23199	1,000	-5,1972	4,6412
	H+NT-S	,22200	,94343	1,000	-3,3038	3,7478
H+NT	C	-112,41800*	3,92487	,000	-129,6590	-95,1770
	NT	-112,36800*	5,16814	,000	-135,7776	-88,9584
	NT-S	-110,28200*	3,72721	,000	-126,5325	-94,0315
	H	,27800	1,23199	1,000	-4,6412	5,1972
	H+NT-S	,50000	1,33521	,999	-4,5353	5,5353
H+NT-S	C	-112,91800*	3,84407	,000	-130,4326	-95,4034
	NT	-112,86800*	5,10705	,000	-136,5336	-89,2024
	NT-S	-110,78200*	3,64203	,000	-127,3042	-94,2598
	H	-,22200	,94343	1,000	-3,7478	3,3038
	H+NT	-,50000	1,33521	,999	-5,5353	4,5353

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

APÊNDICE B – Teste de normalidade, homogeneidade de variâncias e ANOVA com teste *pos-hoc* de Games-Howell para peso dos ratos no dia 0

Tests of Normality

peso_dia_0	Grupos	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
	C	,329	6	,083	,805	6	,089
	NT	,311	6	,128	,819	6	,115
	NT-S	,202	6	,200 [*]	,908	6	,458
	H	,255	6	,200 [*]	,938	6	,649
	H+NT	,314	6	,122	,785	6	,060
	H+NT-S	,250	6	,200 [*]	,953	6	,760

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

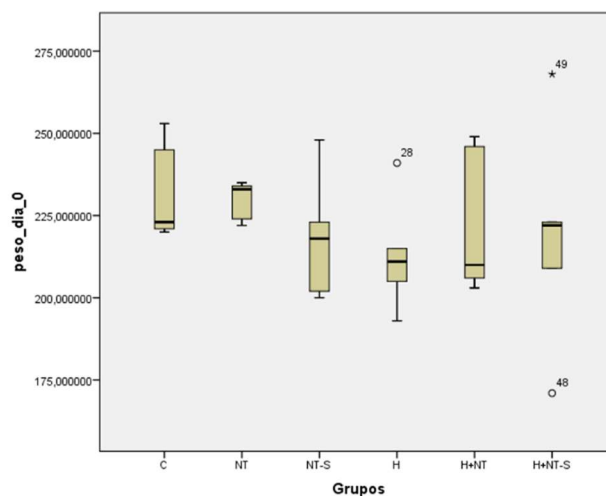
peso_dia_0

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,315	5	24	,291

ANOVA

peso_dia_0

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1362,167	5	272,433	,608	,695
Within Groups	10757,200	24	448,217		
Total	12119,367	29			



Multiple Comparisons

Dependent Variable: peso_dia_0

	(I) Grupos	(J) Grupos	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	C	NT	2,80000000	13,38979711	1,000	-38,60033102	44,20033102
		NT-S	14,20000000	13,38979711	,892	-27,20033102	55,60033102
		H	19,40000000	13,38979711	,698	-22,00033102	60,80033102
		H+NT	9,60000000	13,38979711	,978	-31,80033102	51,00033102
		H+NT-S	13,80000000	13,38979711	,903	-27,60033102	55,20033102
	NT	C	-2,80000000	13,38979711	1,000	-44,20033102	38,60033102
		NT-S	11,40000000	13,38979711	,954	-30,00033102	52,80033102
		H	16,60000000	13,38979711	,813	-24,80033102	58,00033102
		H+NT	6,80000000	13,38979711	,995	-34,60033102	48,20033102
		H+NT-S	11,00000000	13,38979711	,961	-30,40033102	52,40033102
	NT-S	C	-14,20000000	13,38979711	,892	-55,60033102	27,20033102
		NT	-11,40000000	13,38979711	,954	-52,80033102	30,00033102
		H	5,20000000	13,38979711	,999	-36,20033102	46,60033102
		H+NT	-4,60000000	13,38979711	,999	-46,00033102	36,80033102
		H+NT-S	-,40000000	13,38979711	1,000	-41,80033102	41,00033102
	H	C	-19,40000000	13,38979711	,698	-60,80033102	22,00033102
		NT	-16,60000000	13,38979711	,813	-58,00033102	24,80033102
		NT-S	-5,20000000	13,38979711	,999	-46,60033102	36,20033102
		H+NT	-9,80000000	13,38979711	,976	-51,20033102	31,60033102
		H+NT-S	-5,60000000	13,38979711	,998	-47,00033102	35,80033102
	H+NT	C	-9,60000000	13,38979711	,978	-51,00033102	31,80033102
		NT	-6,80000000	13,38979711	,995	-48,20033102	34,60033102
		NT-S	4,60000000	13,38979711	,999	-36,80033102	46,00033102
		H	9,80000000	13,38979711	,976	-31,60033102	51,20033102
		H+NT-S	4,20000000	13,38979711	1,000	-37,20033102	45,60033102
	H+NT-S	C	-13,80000000	13,38979711	,903	-55,20033102	27,60033102
		NT	-11,00000000	13,38979711	,961	-52,40033102	30,40033102
		NT-S	,40000000	13,38979711	1,000	-41,00033102	41,80033102
		H	5,60000000	13,38979711	,998	-35,80033102	47,00033102
		H+NT	-4,20000000	13,38979711	1,000	-45,60033102	37,20033102

APÊNDICE C – Teste de normalidade, homogeneidade de variâncias e ANOVA com teste *pos-hoc* de Tukey para peso dos ratos no dia 21

Tests of Normality

Grupos	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
peso_dia_21 C	,223	6	,200 [*]	,856	6	,216
NT	,228	6	,200 [*]	,838	6	,160
NT-S	,254	6	,200 [*]	,842	6	,171
H	,310	6	,131	,845	6	,180
H+NT	,194	6	,200 [*]	,948	6	,723
H+NT-S	,285	6	,200 [*]	,917	6	,510

*. This is a lower bound of the true significance.

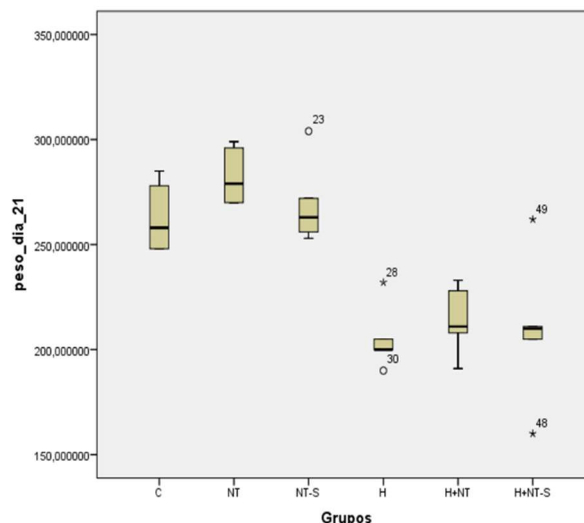
a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

peso_dia_21				
Levene Statistic	df1	df2	Sig.	
,412	5	24	,836	

ANOVA

peso_dia_21					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	30191,767	5	6038,353	13,153	,000
Within Groups	11018,400	24	459,100		
Total	41210,167	29			



Multiple Comparisons

Dependent Variable: peso_dia_21

	(I) Grupos	(J) Grupos	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	C	NT	-19,40000000	13,55138369	,708	-61,29994561	22,49994561
		NT-S	-6,20000000	13,55138369	,997	-48,09994561	35,69994561
		H	58,00000000 [*]	13,55138369	,003	16,10005439	99,89994561
		H+NT	49,20000000 [*]	13,55138369	,015	7,30005439	91,09994561
		H+NT-S	53,80000000 [*]	13,55138369	,007	11,90005439	95,69994561
	NT	C	19,40000000	13,55138369	,708	-22,49994561	61,29994561
		NT-S	13,20000000	13,55138369	,922	-28,69994561	55,09994561
		H	77,40000000 [*]	13,55138369	,000	35,50005439	119,2999456
		H+NT	68,60000000 [*]	13,55138369	,000	26,70005439	110,4999456
		H+NT-S	73,20000000 [*]	13,55138369	,000	31,30005439	115,0999456
	NT-S	C	6,20000000	13,55138369	,997	-35,69994561	48,09994561
		NT	-13,20000000	13,55138369	,922	-55,09994561	28,69994561
		H	64,20000000 [*]	13,55138369	,001	22,30005439	106,0999456
		H+NT	55,40000000 [*]	13,55138369	,005	13,50005439	97,29994561
		H+NT-S	60,00000000 [*]	13,55138369	,002	18,10005439	101,8999456
H	C	-58,00000000	13,55138369	,003	-99,89994561	-16,10005439	
	NT	-77,40000000 [*]	13,55138369	,000	-119,2999456	-35,50005439	
	NT-S	-64,20000000 [*]	13,55138369	,001	-106,0999456	-22,30005439	
	H+NT	-8,800000000	13,55138369	,986	-50,69994561	33,09994561	
	H+NT-S	-4,200000000	13,55138369	1,000	-46,09994561	37,69994561	
H+NT	C	-49,20000000	13,55138369	,015	-91,09994561	-7,30005439	
	NT	-68,60000000 [*]	13,55138369	,000	-110,4999456	-26,70005439	
	NT-S	-55,40000000 [*]	13,55138369	,005	-97,29994561	-13,50005439	
	H	8,800000000	13,55138369	,986	-33,09994561	50,69994561	
	H+NT-S	4,600000000	13,55138369	,999	-37,29994561	46,49994561	
H+NT-S	C	-53,80000000	13,55138369	,007	-95,69994561	-11,90005439	
	NT	-73,20000000 [*]	13,55138369	,000	-115,0999456	-31,30005439	
	NT-S	-60,00000000 [*]	13,55138369	,002	-101,8999456	-18,10005439	
	H	4,200000000	13,55138369	1,000	-37,69994561	46,09994561	
	H+NT	-4,600000000	13,55138369	,999	-46,49994561	37,29994561	

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

APÊNDICE D – Teste de normalidade, homogeneidade de variâncias e ANOVA com teste *pos-hoc* de Tukey para peso dos ratos no dia 42

Tests of Normality

Grupos	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Peso dos Ratos no 42º dia						
C	,202	6	,200 [*]	,944	6	,696
NT	,238	6	,200 [*]	,895	6	,381
NT-S	,267	6	,200 [*]	,843	6	,173
H	,350	6	,044	,841	6	,167
H+NT	,263	6	,200 [*]	,911	6	,475
H+NT-S	,251	6	,200 [*]	,932	6	,608

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

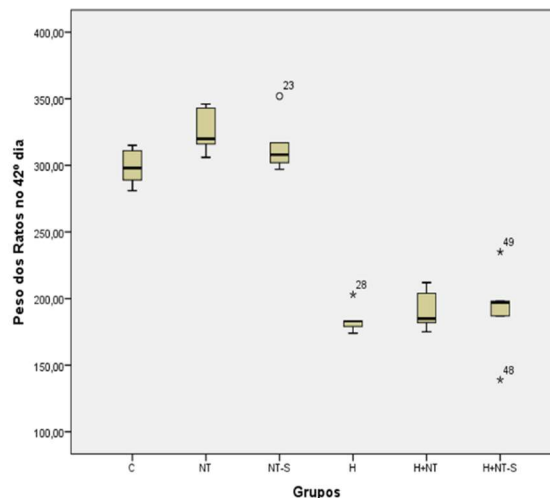
Peso dos Ratos no 42º dia

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,847	5	24	,530

ANOVA

Peso dos Ratos no 42º dia

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	118005,767	5	23601,153	55,676	,000
Within Groups	10173,600	24	423,900		
Total	128179,367	29			



Multiple Comparisons

Dependent Variable: Peso dos Ratos no 42º dia

	(I) Grupos	(J) Grupos	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	C	NT	-27,40000	13,02152	,318	-67,6616	12,8616
		NT-S	-16,40000	13,02152	,803	-56,6616	23,8616
		H	114,40000 [*]	13,02152	,000	74,1384	154,6616
		H+NT	107,20000 [*]	13,02152	,000	66,9384	147,4616
		H+NT-S	107,60000 [*]	13,02152	,000	67,3384	147,8616
	NT	C	27,40000	13,02152	,318	-12,8616	67,6616
		NT-S	11,00000	13,02152	,956	-29,2616	51,2616
		H	141,80000 [*]	13,02152	,000	101,5384	182,0616
		H+NT	134,60000 [*]	13,02152	,000	94,3384	174,8616
		H+NT-S	135,00000 [*]	13,02152	,000	94,7384	175,2616
	NT-S	C	16,40000	13,02152	,803	-23,8616	56,6616
		NT	-11,00000	13,02152	,956	-51,2616	29,2616
		H	130,80000 [*]	13,02152	,000	90,5384	171,0616
		H+NT	123,60000 [*]	13,02152	,000	83,3384	163,8616
		H+NT-S	124,00000 [*]	13,02152	,000	83,7384	164,2616
	H	C	-114,40000 [*]	13,02152	,000	-154,6616	-74,1384
		NT	-141,80000 [*]	13,02152	,000	-182,0616	-101,5384
		NT-S	-130,80000 [*]	13,02152	,000	-171,0616	-90,5384
		H+NT	-7,20000	13,02152	,993	-47,4616	33,0616
		H+NT-S	-6,80000	13,02152	,995	-47,0616	33,4616
	H+NT	C	-107,20000 [*]	13,02152	,000	-147,4616	-66,9384
		NT	-134,60000 [*]	13,02152	,000	-174,8616	-94,3384
		NT-S	-123,60000 [*]	13,02152	,000	-163,8616	-83,3384
		H	7,20000	13,02152	,993	-33,0616	47,4616
		H+NT-S	,40000	13,02152	1,000	-39,8616	40,6616
	H+NT-S	C	-107,60000 [*]	13,02152	,000	-147,8616	-67,3384
		NT	-135,00000 [*]	13,02152	,000	-175,2616	-94,7384
		NT-S	-124,00000 [*]	13,02152	,000	-164,2616	-83,7384
		H	6,80000	13,02152	,995	-33,4616	47,0616
		H+NT	-,40000	13,02152	1,000	-40,6616	39,8616

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

APÊNDICE E – Teste de normalidade, homogeneidade de variâncias e ANOVA com teste *pos-hoc* de Tukey para comprimento das tireoides

Grupos		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Comprimento dos polos da Glândula Tireoide							
C		,233	6	,200 [*]	,943	6	,684
NT		,184	6	,200 [*]	,950	6	,738
NT-S		,174	6	,200 [*]	,934	6	,614
H		,265	6	,200 [*]	,896	6	,352
H+NT		,291	6	,123	,835	6	,118
H+NT-S		,126	6	,200 [*]	,983	6	,963

*. This is a lower bound of the true significance.

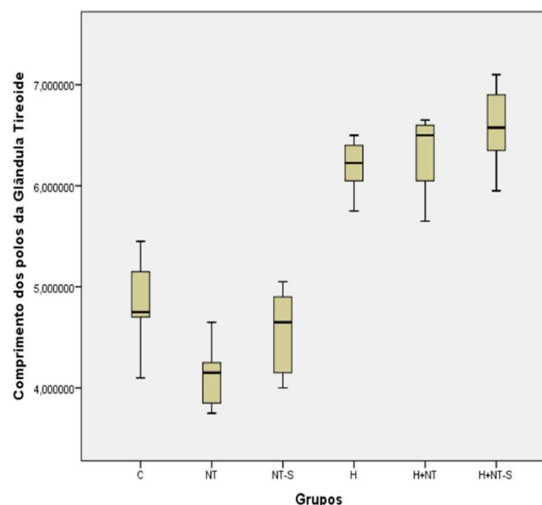
a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

Comprimento dos polos da Glândula Tireoide			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,193	5	29	,963

ANOVA

Comprimento dos polos da Glândula Tireoide					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	31,272	5	6,254	40,493	,000
Within Groups	4,479	29	,154		
Total	35,751	34			



Multiple Comparisons

Dependent Variable: Comprimento dos polos da Glândula Tireoide

(I) Grupos	(J) Grupos	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
					Lower Bound	Upper Bound	
Tukey HSD	C	NT	,686666667	,237979401	,072	-,03880861	1,41214195
		NT-S	,250000000	,226904456	,877	-,44171354	,94171354
		H	-1,375000000*	,226904456	,000	-2,06671354	-,68328646
		H+NT	-1,508333333*	,226904456	,000	-2,20004687	-,81661979
		H+NT-S	-1,758333333*	,226904456	,000	-2,45004687	-1,06661979
	NT	C	-,686666667	,237979401	,072	-1,41214195	,03880861
		NT-S	-,436666667	,237979401	,460	-1,16214195	,28880861
		H	-2,061666667*	,237979401	,000	-2,78714195	-1,33619139
		H+NT	-2,195000000*	,237979401	,000	-2,92047528	-1,46952472
		H+NT-S	-2,445000000*	,237979401	,000	-3,17047528	-1,71952472
	NT-S	C	-,250000000	,226904456	,877	-,94171354	,44171354
		NT	,436666667	,237979401	,460	-,28880861	1,16214195
		H	-1,625000000*	,226904456	,000	-2,31671354	-,93328646
		H+NT	-1,758333333*	,226904456	,000	-2,45004687	-1,06661979
		H+NT-S	-2,008333333*	,226904456	,000	-2,70004687	-1,31661979
H	C	1,375000000*	,226904456	,000	,68328646	2,06671354	
	NT	2,061666667*	,237979401	,000	1,33619139	2,78714195	
	NT-S	1,625000000*	,226904456	,000	,93328646	2,31671354	
	H+NT	-,133333333	,226904456	,991	-,82504687	,55838021	
	H+NT-S	-,383333333	,226904456	,549	-1,07504687	,30838021	
H+NT	C	1,508333333*	,226904456	,000	,81661979	2,20004687	
	NT	2,195000000*	,237979401	,000	1,46952472	2,92047528	
	NT-S	1,758333333*	,226904456	,000	1,06661979	2,45004687	
	H	,133333333	,226904456	,991	-,55838021	,82504687	
	H+NT-S	-,250000000	,226904456	,877	-,94171354	,44171354	
H+NT-S	C	1,758333333*	,226904456	,000	1,06661979	2,45004687	
	NT	2,445000000*	,237979401	,000	1,71952472	3,17047528	
	NT-S	2,008333333*	,226904456	,000	1,31661979	2,70004687	
	H	,383333333	,226904456	,549	-,30838021	1,07504687	
	H+NT	,250000000	,226904456	,877	-,44171354	,94171354	

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

APÊNDICE F – Teste de normalidade, homogeneidade de variâncias e ANOVA com teste *pos-hoc* de Games-Howell para largura das tireoides

Tests of Normality							
Grupos	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
Largura dos polos da Glândula Tireoide							
C	,303	6	,091	,871	6	,231	
NT	,173	6	,200 [*]	,970	6	,875	
NT-S	,205	6	,200 [*]	,932	6	,593	
H	,183	6	,200 [*]	,952	6	,756	
H+NT	,196	6	,200 [*]	,928	6	,563	
H+NT-S	,167	6	,200 [*]	,972	6	,908	

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

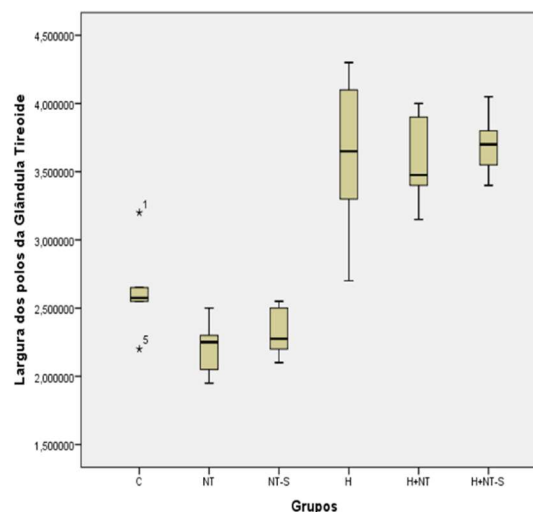
Largura dos polos da Glândula Tireoide

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,965	5	29	,028

ANOVA

Largura dos polos da Glândula Tireoide

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	13,886	5	2,777	23,647	,000
Within Groups	3,406	29	,117		
Total	17,291	34			



Multiple Comparisons

Dependent Variable: Largura dos polos da Glândula Tireoide

(I) Grupos	(J) Grupos	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
					Lower Bound	Upper Bound	
Games-Howell	C	NT	,415000000	,163732505	,212	-,17147806	1,00147806
		NT-S	,308333333	,150231303	,395	-,24611094	,86277761
		H	-,991666667	,276410524	,047	-2,01086277	,02752943
		H+NT	-,941666667	,187268375	,005	-1,59211208	-,29122125
		H+NT-S	-1,075000000	,160078106	,001	-1,64597373	-,50402627
	NT	C	-,415000000	,163732505	,212	-1,00147806	,17147806
		NT-S	-,106666667	,120254360	,939	-,55008436	,33675103
		H	-1,406666667	,261332058	,010	-2,41921068	-,39412265
		H+NT	-1,356666667	,164198389	,000	-1,94501856	-,76831477
		H+NT-S	-1,490000000	,132350545	,000	-1,96356315	-1,01643685
	NT-S	C	-,308333333	,150231303	,395	-,86277761	,24611094
		NT	,106666667	,120254360	,939	-,33675103	,55008436
		H	-1,300000000	,253091990	,017	-2,31556618	-,28443382
		H+NT	-1,250000000	,150738921	,000	-1,80669689	-,69330311
		H+NT-S	-1,383333333	,115229240	,000	-1,78786112	-,97880555
	H	C	,991666667	,276410524	,047	-,02752943	2,01086277
		NT	1,406666667	,261332058	,010	,39412265	2,41921068
		NT-S	1,300000000	,253091990	,017	,28443382	2,31556618
		H+NT	,050000000	,276686746	1,000	-,96952129	1,06952129
		H+NT-S	-,083333333	,259058123	,999	-1,09448683	,92782016
	H+NT	C	,941666667	,187268375	,005	,29122125	1,59211208
		NT	1,356666667	,164198389	,000	,76831477	1,94501856
		NT-S	1,250000000	,150738921	,000	,69330311	1,80669689
		H	-,050000000	,276686746	1,000	-1,06952129	,96952129
		H+NT-S	-,133333333	,160554594	,954	-,70632624	,43965958
	H+NT-S	C	1,075000000	,160078106	,001	,50402627	1,64597373
		NT	1,490000000	,132350545	,000	1,01643685	1,96356315
		NT-S	1,383333333	,115229240	,000	,97880555	1,78786112
		H	,083333333	,259058123	,999	-,92782016	1,09448683
		H+NT	,133333333	,160554594	,954	-,43965958	,70632624

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

APÊNDICE G – Teste de normalidade, homogeneidade de variâncias e ANOVA com teste *pos-hoc* de Tukey para o peso das tireoides

Grupos		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Peso da Glândula tireoide	C	,161	6	,200	,941	6	,664
	NT	,296	6	,173	,837	6	,156
	NT-S	,299	6	,099	,876	6	,250
	H	,181	6	,200	,944	6	,690
	H+NT	,192	6	,200	,949	6	,735
	H+NT-S	,329	6	,043	,871	6	,232

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

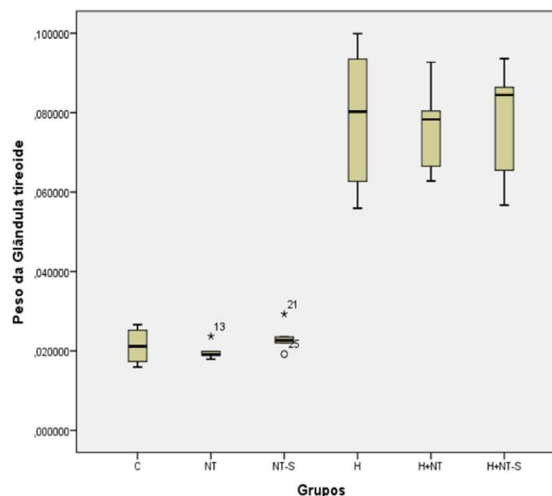
Peso da Glândula tireoide

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
7,161	5	29	,000

ANOVA

Peso da Glândula tireoide

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,028	5	,006	49,157	,000
Within Groups	,003	29	,000		
Total	,031	34			



Multiple Comparisons

Dependent Variable: Peso da Glândula tireoide

(I) Grupos	(J) Grupos	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Games-Howell C	NT	,001336667	,001991150	,980	-,00596985	,00864319
	NT-S	-,002000000	,002191625	,934	-,00969281	,00569281
	H	-,057533333*	,007368273	,002	-,08764543	-,02742124
	H+NT	-,055283333*	,004707541	,000	-,07352916	-,03703751
	H+NT-S	-,057300000*	,006038699	,001	-,08151235	-,03308765
NT	C	-,001336667	,001991150	,980	-,00864319	,00596985
	NT-S	-,003336667	,001693323	,425	-,00939687	,00272354
	H	-,058870000*	,007235715	,003	-,08925099	-,02848901
	H+NT	-,056620000*	,004497229	,000	-,07506116	-,03817884
	H+NT-S	-,058636667*	,005876224	,001	-,08311543	-,03415791
NT-S	C	,002000000	,002191625	,934	-,00569281	,00969281
	NT	,003336667	,001693323	,425	-,00272354	,00939687
	H	-,055533333*	,007293429	,003	-,08578391	-,02528276
	H+NT	-,053283333*	,004589511	,000	-,07159585	-,03497081
	H+NT-S	-,055300000*	,005947147	,001	-,07963962	-,03096038
H	C	,057533333*	,007368273	,002	,02742124	,08764543
	NT	,058870000*	,007235715	,003	,02848901	,08925099
	NT-S	,055533333*	,007293429	,003	,02528276	,08578391
	H+NT	,002250000	,008399514	1,000	-,02817485	,03267485
	H+NT-S	,000233333	,009211774	1,000	-,03204822	,03251489
H+NT	C	,055283333*	,004707541	,000	,03703751	,07352916
	NT	,056620000*	,004497229	,000	,03817884	,07506116
	NT-S	,053283333*	,004589511	,000	,03497081	,07159585
	H	-,002250000	,008399514	1,000	-,03267485	,02817485
	H+NT-S	-,002016667	,007261286	1,000	-,02761498	,02358164
H+NT-S	C	,057300000*	,006038699	,001	,03308765	,08151235
	NT	,058636667*	,005876224	,001	,03415791	,08311543
	NT-S	,055300000*	,005947147	,001	,03096038	,07963962
	H	-,000233333	,009211774	1,000	-,03251489	,03204822
	H+NT	,002016667	,007261286	1,000	-,02358164	,02761498

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

APÊNDICE H – Teste de normalidade e correlação de Spearman entre as dosagens de T4 e os comprimentos, larguras e os pesos das tireoides

Tests of Normality

GRUPO CORREL	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
DOSAGEM DE T4 PTU	,319	36	,000	,716	36	,000

a. Lilliefors Significance Correction

Tests of Normality

GRUPO CORREL	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Comprimento dos polos da Glândula Tireoide PTU	,171	36	,026	,915	36	,020

a. Lilliefors Significance Correction

Tests of Normality

GRUPO CORREL	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Largura dos polos da Glândula Tireoide PTU	,167	36	,032	,909	36	,014

a. Lilliefors Significance Correction

Tests of Normality

GRUPO CORREL	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Peso da Glândula tireoide PTU	,253	36	,000	,833	36	,000

a. Lilliefors Significance Correction

Correlations

			DOSAGEM DE T4	Comprimento dos polos da Glândula Tireoide
Spearman's rho	DOSAGEM DE T4	Correlation Coefficient	1,000	-,775**
		Sig. (2-tailed)	.	,000
		N	36	36
	Comprimento dos polos da Glândula Tireoide	Correlation Coefficient	-,775**	1,000
		Sig. (2-tailed)	,000	.
		N	36	36

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Correlations

			DOSAGEM DE T4	Peso da Glândula tireoide
Spearman's rho	DOSAGEM DE T4	Correlation Coefficient	1,000	-,743**
		Sig. (2-tailed)	.	,000
		N	36	36
	Peso da Glândula tireoide	Correlation Coefficient	-,743**	1,000
		Sig. (2-tailed)	,000	.
		N	36	36

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Correlations

			DOSAGEM DE T4	Largura dos polos da Glândula Tireoide
Spearman's rho	DOSAGEM DE T4	Correlation Coefficient	1,000	-,775**
		Sig. (2-tailed)	.	,000
		N	36	36
	Largura dos polos da Glândula Tireoide	Correlation Coefficient	-,773**	1,000
		Sig. (2-tailed)	,000	.
		N	36	36

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

APÊNDICE I – Teste de normalidade, homogeneidade de variâncias e ANOVA com este *pos-hoc* de Games-Howell para o limiar nociceptivo no dia 0 (zero)

Tests of Normality

Grupos	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
LIMAR_NOC_0						
C	,188	6	,200*	,901	6	,416
NT	,252	6	,200*	,895	6	,384
NT-S	,312	6	,125	,791	6	,068
H	,295	6	,179	,844	6	,176
H+NT	,215	6	,200*	,880	6	,311
H+NT-S	,231	6	,200*	,901	6	,417

*. This is a lower bound of the true significance.

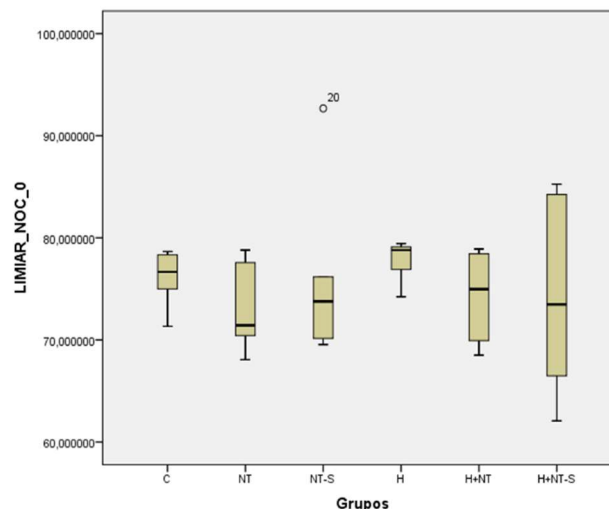
a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

LIMAR_NOC_0				
Levene Statistic	df1	df2	Sig.	
2,901	5	24	,035	

ANOVA

LIMAR_NOC_0					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	70,268	5	14,054	,330	,890
Within Groups	1021,695	24	42,571		
Total	1091,963	29			



Multiple Comparisons

Dependent Variable: LIMAR_NOC_0

	(I) Grupos	(J) Grupos	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Games-Howell	C	NT	2,737666000	2,484299274	,866	-6,75931694	12,23464894
		NT-S	-,467334000	4,436071127	1,000	-19,74044195	18,80577395
		H	-1,695666000	1,652855569	,896	-7,88316106	4,49182906
		H+NT	1,852666000	2,520187470	,970	-7,81632510	11,52165710
		H+NT-S	1,691000000	4,827088512	,999	-19,54207839	22,92407839
		NT	-2,737666000	2,484299274	,866	-12,23464894	6,75931694
	NT	NT-S	-3,205000000	4,719701042	,978	-22,15635450	15,74635450
		H	-4,433332000	2,308415563	,873	-13,82106585	4,95440185
		H+NT	-,885000000	2,991353501	1,000	-11,81571367	10,04571367
		H+NT-S	-1,046666000	5,088971839	1,000	-21,85421746	19,76088546
		NT-S	,467334000	4,436071127	1,000	-18,80577395	19,74044195
	NT-S	NT	3,205000000	4,719701042	,978	-15,74635450	22,15635450
		H	-1,228332000	4,340019191	1,000	-20,79258333	18,33591933
		H+NT	2,320000000	4,738689685	,995	-16,63180204	21,27180204
		H+NT-S	2,158334000	6,277309818	,999	-20,82661573	25,14328373
		H	1,695666000	1,652855569	,896	-4,49182906	7,88316106
	H	NT	4,433332000	2,308415563	,873	-4,95440185	13,82106585
		NT-S	1,228332000	4,340019191	1,000	-18,33591933	20,79258333
		H+NT	3,548332000	2,346994763	,972	-6,03369164	13,13035564
		H+NT-S	3,386666000	4,738968562	,970	-18,14283699	24,91616899
		C	-1,852666000	2,520187470	,970	-11,52165710	7,81632510
	H+NT	NT	,885000000	2,991353501	1,000	-10,04571367	11,81571367
		NT-S	-2,320000000	4,738689685	,995	-21,27180204	16,63180204
		H	-3,548332000	2,346994763	,972	-13,13035564	6,03369164
		H+NT-S	-,161666000	5,106587548	1,000	-20,95999718	20,63666518
		C	-1,691000000	4,827088512	,999	-22,92407839	19,54207839
	H+NT-S	NT	1,046666000	5,088971839	1,000	-19,76088546	21,85421746
		NT-S	-2,158334000	6,277309818	,999	-25,14328373	20,82661573
		H	-3,386666000	4,738968562	,970	-24,91616899	18,14283699
		H+NT	,161666000	5,106587548	1,000	-20,63666518	20,95999718

APÊNDICE J – Teste de normalidade, homogeneidade de variâncias e ANOVA com teste *pos-hoc* de Tukey para o limiar nociceptivo no dia 21

Tests of Normality

Grupos	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
LIMIAR_NOC_21						
C	,280	6	,200 [*]	,869	6	,262
NT	,201	6	,200 [*]	,936	6	,636
NT-S	,165	6	,200 [*]	,991	6	,983
H	,170	6	,200 [*]	,973	6	,891
H+NT	,262	6	,200 [*]	,929	6	,588
H+NT-S	,209	6	,200 [*]	,897	6	,396

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

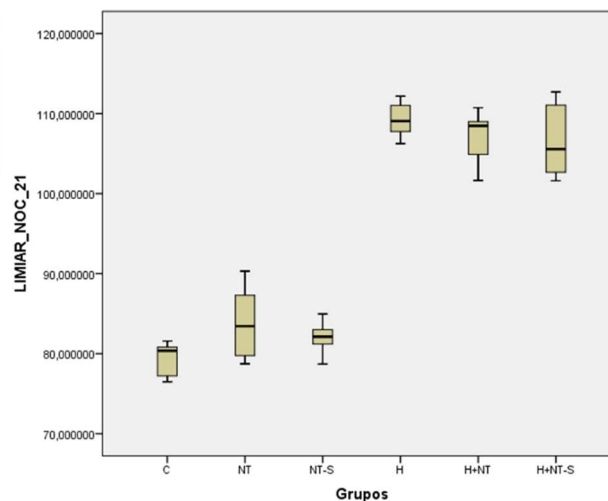
LIMIAR_NOC_21

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,453	5	24	,062

ANOVA

LIMIAR_NOC_21

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5108,573	5	1021,715	78,151	,000
Within Groups	313,766	24	13,074		
Total	5422,338	29			



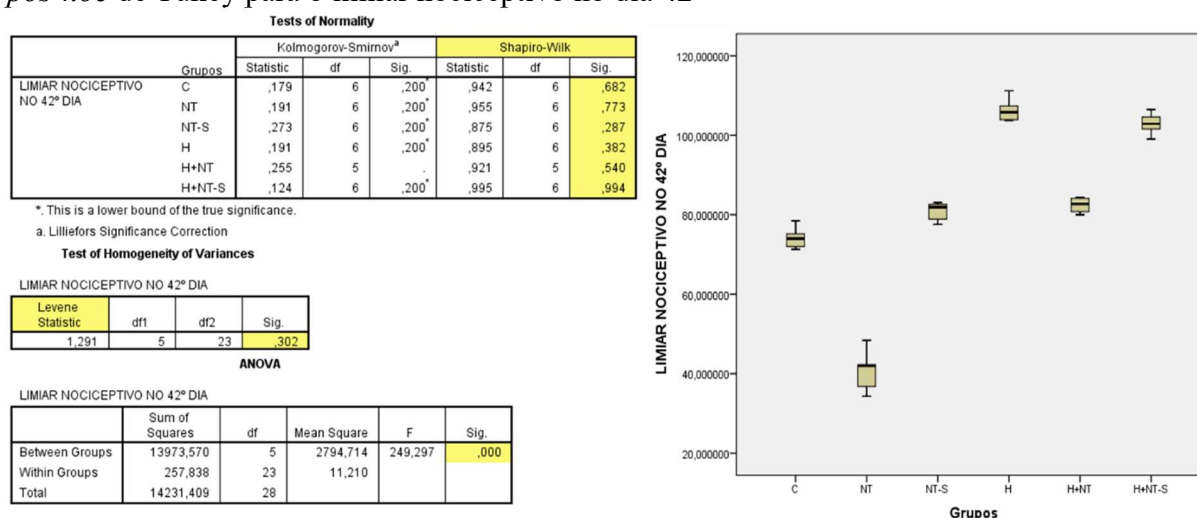
Multiple Comparisons

Dependent Variable: LIMAR_NOC_21

(I) Grupos	(J) Grupos	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
					Lower Bound	Upper Bound	
Tukey HSD	C	NT	-4,621666000	2,286793690	,360	-11,69227468	2,44894268
		NT-S	-2,710000000	2,286793690	,840	-9,78060868	4,36060868
		H	-29,9683400*	2,286793690	,000	-37,03894868	-22,89773132
		H+NT	-27,6616660*	2,286793690	,000	-34,73227468	-20,59105732
		H+NT-S	-27,4316680*	2,286793690	,000	-34,50227668	-20,36105932
	NT	C	4,621666000	2,286793690	,360	-2,44894268	11,69227468
		NT-S	1,911666000	2,286793690	,958	-5,15894268	8,98227468
		H	-25,3466740*	2,286793690	,000	-32,41728268	-18,27606532
		H+NT	-23,0400000*	2,286793690	,000	-30,11060868	-15,96939132
		H+NT-S	-22,8100020*	2,286793690	,000	-29,88061068	-15,73939332
	NT-S	C	2,710000000	2,286793690	,840	-4,36060868	9,78060868
		NT	-1,911666000	2,286793690	,958	-8,98227468	5,15894268
		H	-27,2583400*	2,286793690	,000	-34,32894868	-20,18773132
		H+NT	-24,9516660*	2,286793690	,000	-32,02227468	-17,88105732
		H+NT-S	-24,7216680*	2,286793690	,000	-31,79227668	-17,65105932
	H	C	29,96834000*	2,286793690	,000	22,89773132	37,03894868
		NT	25,34667400*	2,286793690	,000	18,27606532	32,41728268
		NT-S	27,25834000*	2,286793690	,000	20,18773132	34,32894868
		H+NT	2,306674000	2,286793690	,910	-4,76393468	9,37728268
		H+NT-S	2,536672000	2,286793690	,873	-4,53393668	9,60728068
	H+NT	C	27,66166600*	2,286793690	,000	20,59105732	34,73227468
		NT	23,04000000*	2,286793690	,000	15,96939132	30,11060868
		NT-S	24,95166600*	2,286793690	,000	17,88105732	32,02227468
		H	-2,306674000	2,286793690	,910	-9,37728268	4,76393468
		H+NT-S	,229998000	2,286793690	1,000	-6,84061068	7,30060668
	H+NT-S	C	27,43166800*	2,286793690	,000	20,36105932	34,50227668
		NT	22,81000200*	2,286793690	,000	15,73939332	29,88061068
		NT-S	24,72166800*	2,286793690	,000	17,65105932	31,79227668
		H	-2,536672000	2,286793690	,873	-9,60728068	4,53393668
		H+NT	-,229998000	2,286793690	1,000	-7,30060668	6,84061068

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

APÊNDICE K – Teste de normalidade, homogeneidade de variâncias e ANOVA com teste *pos-hoc* de Tukey para o limiar nociceptivo no dia 42



Multiple Comparisons

Dependent Variable: LIMIAR NOCICEPTIVO NO 42º DIA

	(I) Grupos	(J) Grupos	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	C	NT	33,44000000*	2,117580501	,000	26,86913913	40,01086087
		NT-S	-6,62500000*	2,117580501	,047	-13,19586087	-,05413913
		H	-32,22000000*	2,117580501	,000	-38,79086087	-25,64913913
		H+NT	-8,27041750*	2,246033298	,014	-15,23986792	-1,30096708
		H+NT-S	-28,74500000*	2,117580501	,000	-35,31586087	-22,17413913
	NT	C	-33,44000000*	2,117580501	,000	-40,01086087	-26,86913913
		NT-S	-40,06500000*	2,117580501	,000	-46,63586087	-33,49413913
		H	-65,66000000*	2,117580501	,000	-72,23086087	-59,08913913
		H+NT	-41,7104175*	2,246033298	,000	-48,67986792	-34,74096708
		H+NT-S	-62,18500000*	2,117580501	,000	-68,75586087	-55,61413913
	NT-S	C	6,625000000*	2,117580501	,047	,05413913	13,19586087
		NT	40,06500000*	2,117580501	,000	33,49413913	46,63586087
		H	-25,59500000*	2,117580501	,000	-32,16586087	-19,02413913
		H+NT	-1,645417500	2,246033298	,976	-8,61486792	5,32403292
		H+NT-S	-22,12000000*	2,117580501	,000	-28,69086087	-15,54913913
H	C	32,22000000*	2,117580501	,000	25,64913913	38,79086087	
	NT	65,66000000*	2,117580501	,000	59,08913913	72,23086087	
	NT-S	25,59500000*	2,117580501	,000	19,02413913	32,16586087	
	H+NT	23,94958250*	2,246033298	,000	16,98013208	30,91903292	
	H+NT-S	3,475000000	2,117580501	,581	-3,09586087	10,04586087	
H+NT	C	8,270417500*	2,246033298	,014	1,30096708	15,23986792	
	NT	41,71041750*	2,246033298	,000	34,74096708	48,67986792	
	NT-S	1,645417500	2,246033298	,976	-5,32403292	8,61486792	
	H	-23,9495825*	2,246033298	,000	-30,91903292	-16,98013208	
	H+NT-S	-20,4745825*	2,246033298	,000	-27,44403292	-13,50513208	
H+NT-S	C	28,74500000*	2,117580501	,000	22,17413913	35,31586087	
	NT	62,18500000*	2,117580501	,000	55,61413913	68,75586087	
	NT-S	22,12000000*	2,117580501	,000	15,54913913	28,69086087	
	H	-3,475000000	2,117580501	,581	-10,04586087	3,09586087	
	H+NT	20,47458250*	2,246033298	,000	13,50513208	27,44403292	

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

APÊNDICE L – Teste de normalidade e correlação de Spearman entre as dosagens de T4 e o limiar nociceptivo

Tests of Normality

GRUPO CORREL	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
DOSAGEM DE T4 PTU	,324	24	,000	,719	24	,000

a. Lilliefors Significance Correction

Tests of Normality

GRUPO CORREL	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
LIMIAR NOCICEPTIVO NO 42º DIA PTU	,245	24	,003	,843	24	,004

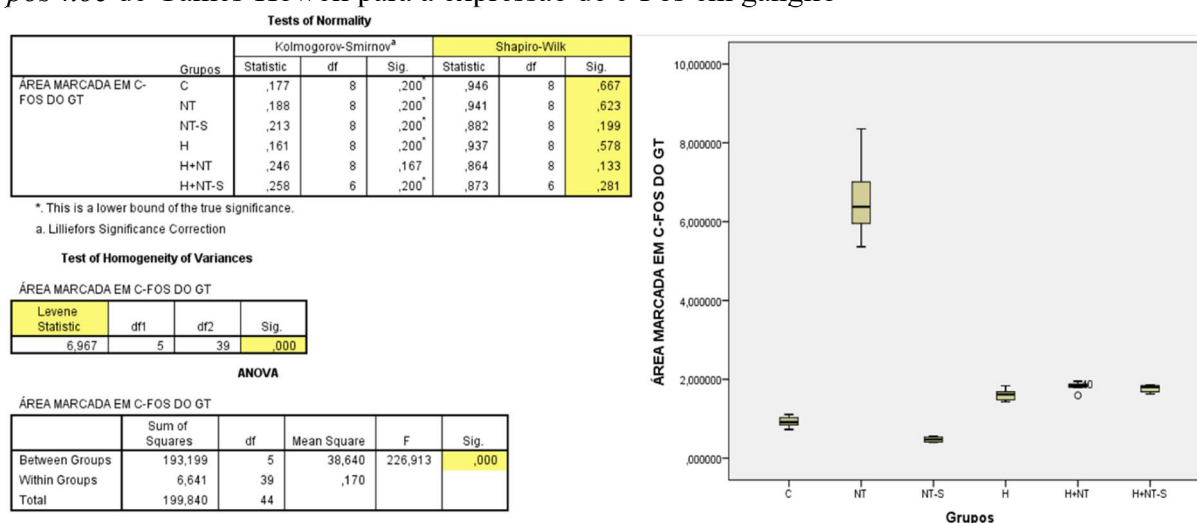
a. Lilliefors Significance Correction

Correlations

			DOSAGEM DE T4	LIMIAR NOCICEPTIVO NO 42º DIA
Spearman's rho	DOSAGEM DE T4	Correlation Coefficient	1,000	-,745**
		Sig. (2-tailed)	.	,000
		N	24	24
	LIMIAR NOCICEPTIVO NO 42º DIA	Correlation Coefficient	-,745**	1,000
		Sig. (2-tailed)	,000	.
		N	24	24

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

APÊNDICE M - Teste de normalidade, homogeneidade de variâncias e ANOVA com teste *pos-hoc* de Games-Howell para a expressão de c-Fos em gânglio



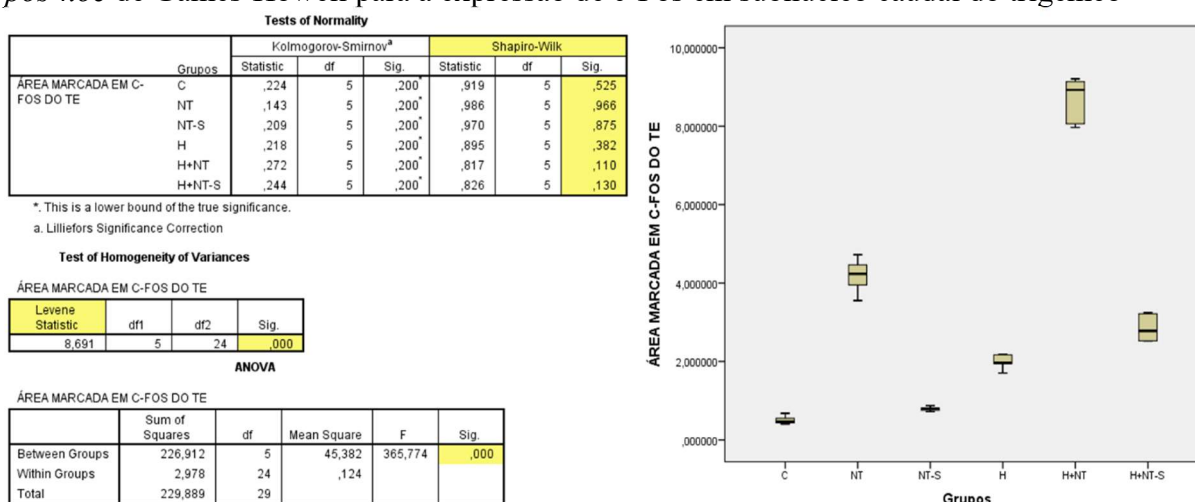
Multiple Comparisons

Dependent Variable: ÁREA MARCADA EM C-FOS DO GT

(I) Grupos	(J) Grupos	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
					Lower Bound	Upper Bound	
Games-Howell	C	NT	-,562482375*	,336989449	,000	-6,88815957	-4,36148793
		NT-S	,452536250*	,050976933	,000	,27528865	,62978385
		H	-,677356250*	,067552035	,000	-,89906496	-,45564754
		H+NT	-,895492500*	,059299661	,000	-1,09122627	-,69975873
		H+NT-S	-,837914250*	,064746069	,000	-1,06162509	-,61420341
		NT	C	5,624823750*	,336989449	,000	4,36148793
	NT-S	NT	6,077360000*	,334519439	,000	4,81281843	7,34190157
	H	NT-S	4,947467500*	,337443158	,000	3,68430022	6,21063478
	H+NT	H	4,729331250*	,335888459	,000	3,46551892	5,99314358
	H+NT-S	H+NT-S	4,786909500*	,336892655	,000	3,52344413	6,05037487
	NT-S	C	-,452536250*	,050976933	,000	-,62978385	-,27528865
	NT	NT-S	-,607736000*	,334519439	,000	-,734190157	-,481281843
	H	H	-,112989250*	,053894748	,000	-,131864322	-,94114178
	H+NT	H+NT	-,134802875*	,043102391	,000	-,149442003	-,120163747
	H+NT-S	H+NT-S	-,129045050*	,050333089	,000	-,149247342	-,108842758
	H	C	,677356250*	,067552035	,000	,45564754	,89906496
	NT	NT	-,494746750*	,337443158	,000	-,621063478	-,368430022
	NT-S	NT-S	1,129892500*	,053894748	,000	,94114178	1,31864322
	H+NT	H+NT	-,218136250*	,061825932	,034	-,42310201	-,01317049
	H+NT-S	H+NT-S	-,160558000	,067067500	,240	-,39092151	,06980551
	H+NT	C	,895492500*	,059299661	,000	,69975873	1,09122627
	NT	NT	-,472933125*	,335888459	,000	-,599314358	-,346551892
	NT-S	NT-S	1,348028750*	,043102391	,000	1,20163747	1,49442003
	H	H	,218136250*	,061825932	,034	,01317049	,42310201
	H+NT	H+NT	,057578250	,058747101	,913	-,15167382	,26683032
	H+NT-S	C	,837914250*	,064746069	,000	,61420341	1,06162509
	NT	NT	-,478690950*	,336892655	,000	-,605037487	-,352344413
	NT-S	NT-S	1,290450500*	,050333089	,000	1,08842758	1,49247342
	H	H	,160558000	,067067500	,240	-,06980551	,39092151
	H+NT	H+NT	-,057578250	,058747101	,913	-,26683032	,15167382

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

APÊNDICE N - Teste de normalidade, homogeneidade de variâncias e ANOVA com teste *pos-hoc* de Games-Howell para a expressão de c-Fos em subnúcleo caudal do trigêmeo



Multiple Comparisons

Dependent Variable: ÁREA MARCADA EM C-FOS DO TE

(I) Grupos	(J) Grupos	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
					Lower Bound	Upper Bound	
Games-Howell	C	NT	-3,67769400 [*]	,208633458	,000	-4,61370822	-2,74167978
		NT-S	-,283866000 [*]	,055256551	,016	-,50352162	-,06421038
		H	-1,48578400 [*]	,099396841	,000	-1,87434400	-1,09722400
		H+NT	-8,15095400 [*]	,272328787	,000	-9,39996977	-6,90193823
		H+NT-S	-2,35069400 [*]	,166945176	,000	-3,07893313	-1,62245487
	NT	C	3,677694000 [*]	,208633458	,000	2,74167978	4,61370822
		NT-S	3,393828000 [*]	,204394478	,000	2,44029895	4,34735705
		H	2,191910000 [*]	,220462124	,001	1,28063525	3,10318475
		H+NT	-4,47326000 [*]	,335986286	,000	-5,72412197	-3,22239803
		H+NT-S	1,327000000 [*]	,258059117	,009	,37075050	2,28324950
	NT-S	C	,283866000 [*]	,055256551	,016	,06421038	,50352162
		NT	-3,39382800 [*]	,204394478	,000	-4,34735705	-2,44029895
		H	-1,20191800 [*]	,090160496	,000	-1,59731323	-,80652277
		H+NT	-7,86708800 [*]	,269095060	,000	-9,13109454	-6,60308146
		H+NT-S	-2,06682800 [*]	,161616443	,001	-2,81362891	-1,32002709
	H	C	1,485784000 [*]	,099396841	,000	1,09722400	1,87434400
		NT	-2,19191000 [*]	,220462124	,001	-3,10318475	-1,28063525
		NT-S	1,201918000 [*]	,090160496	,000	,80652277	1,59731323
		H+NT	-6,66517000 [*]	,281493511	,000	-7,88445571	-5,44588429
		H+NT-S	-,864910000 [*]	,181511213	,021	-1,58076764	-,14905236
	H+NT	C	8,150954000 [*]	,272328787	,000	6,90193823	9,39996977
		NT	4,473260000 [*]	,335986286	,000	3,22239803	5,72412197
		NT-S	7,867088000 [*]	,269095060	,000	6,60308146	9,13109454
		H	6,665170000 [*]	,281493511	,000	5,44588429	7,88445571
		H+NT-S	5,800260000 [*]	,311816543	,000	4,59294713	7,00757287
	H+NT-S	C	2,350694000 [*]	,166945176	,000	1,62245487	3,07893313
		NT	-1,327000000 [*]	,258059117	,009	-2,28324950	-,37075050
		NT-S	2,066828000 [*]	,161616443	,001	1,32002709	2,81362891
		H	,864910000 [*]	,181511213	,021	,14905236	1,58076764
		H+NT	-5,800260000 [*]	,311816543	,000	-7,00757287	-4,59294713

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

APÊNDICE O - Teste de normalidade, homogeneidade de variâncias e ANOVA com teste *pos-hoc* de Games-Howell para a expressão de ATF3 em gânglio trigeminal

Tests of Normality

Grupos	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
ÁREA MARCADA EM ATF3 DO GT						
C	,209	6	,200 [*]	,966	6	,863
NT	,229	5	,200 [*]	,946	5	,708
NT-S	,227	5	,200 [*]	,897	5	,396
H	,343	6	,027	,811	6	,074
H+NT	,268	6	,200 [*]	,825	5	,128
H+NT-S	,374	5	.	,782	4	,074

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

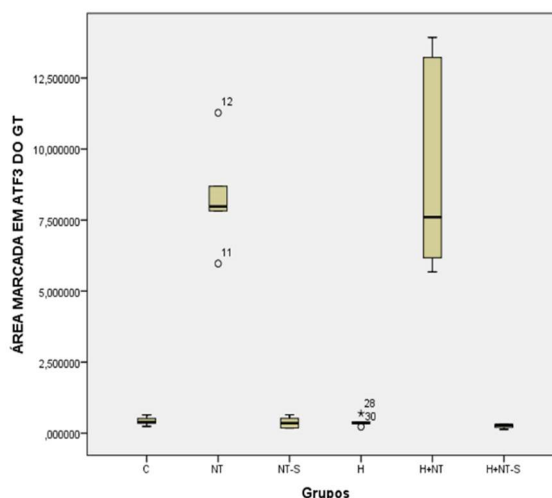
ÁREA MARCADA EM ATF3 DO GT

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
20,552	5	28	,000

ANOVA

ÁREA MARCADA EM ATF3 DO GT

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	487,879	5	97,576	31,351	,000
Within Groups	77,810	28	3,112		
Total	565,689	33			



Multiple Comparisons

Dependent Variable: ÁREA MARCADA EM ATF3 DO GT

(I) Grupos	(J) Grupos	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
					Lower Bound	Upper Bound	
Games-Howell	C	NT	-7,92792013*	,861191431	,004	-11,99273482	-3,86310544
		NT-S	,044883987	,108628601	,998	-,36946782	,45923579
		H	,028465033	,086089561	,999	-,27139665	,32832672
		H+NT	-8,90120093*	1,770519180	,041	-17,28796196	-,51443991
		H+NT-S	,167154767	,070191897	,266	-,08971294	,42402247
NT	C	NT	7,927920133*	,861191431	,004	3,86310544	11,99273482
		NT-S	7,972804120*	,864243188	,004	3,92353620	12,02207204
		H	7,956385167*	,861700370	,004	3,89422502	12,01854532
		H+NT	-,973280800	1,967194521	,994	-8,90252191	6,95596031
		H+NT-S	8,095074900*	,860257530	,004	4,02532787	12,16482193
NT-S	C	NT	-,044883987	,108628601	,998	-,45923579	,36946782
		NT-S	-7,97280412*	,864243188	,004	-12,02207204	-3,92353620
		H	-,016418953	,112592276	1,000	-,43596560	,40312769
		H+NT	-8,94608492*	1,772005580	,040	-17,32493471	-,56723513
		H+NT-S	,122270780	,100957964	,818	-,29429152	,53883308
H	C	NT	-,028465033	,086089561	,999	-,32832672	,27139665
		NT-S	-7,95638517*	,861700370	,004	-12,01854532	-3,89422502
		NT-S	,016418953	,112592276	1,000	-,40312769	,43596560
		H+NT	-8,92966597*	1,770766788	,040	-17,31510182	-,54423012
		H+NT-S	,138689733	,076182347	,505	-,14206780	,41944726
H+NT	C	NT	8,901200933*	1,770519180	,041	,51443991	17,28796196
		NT	,973280800	1,967194521	,994	-6,95596031	8,90252191
		NT-S	8,946084920*	1,772005580	,040	,56723513	17,32493471
		H	8,929665967*	1,770766788	,040	,54423012	17,31510182
		H+NT-S	9,068355700*	1,770065113	,038	,67915740	17,45755400
H+NT-S	C	NT	-,167154767	,070191897	,266	-,42402247	,08971294
		NT	-8,09507490*	,860257530	,004	-12,16482193	-4,02532787
		NT-S	-,122270780	,100957964	,818	-,53883308	,29429152
		H	-,138689733	,076182347	,505	-,41944726	,14206780
		H+NT	-9,06835570*	1,770065113	,038	-17,45755400	-,67915740

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

APÊNDICE P - Teste de normalidade, homogeneidade de variâncias e ANOVA com teste *pos-hoc* de Games-Howell para a expressão de ATF3 em subnúcleo caudal do trigêmeo

Tests of Normality

Grupos	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
TE_ATF3_NORM						
C	,213	6	,963		6	,795
NT	,200	6	,972		6	,855
NT-S	,297	6	,826		6	,157
H	,335	6	,867		6	,287
H+NT	,278	6	,865		6	,278
H+NT-S	,139	6	1,000		6	1,000

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

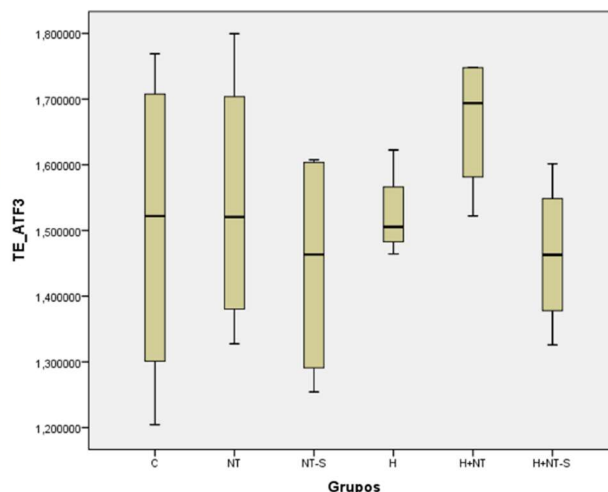
TE_ATF3_NORM

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3,350	5	18	,026

ANOVA

TE_ATF3_NORM

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,120	5	,024	,850	,532
Within Groups	,509	18	,028		
Total	,630	23			



Multiple Comparisons

Dependent Variable: TE_ATF3_NORM

(I) Grupos	(J) Grupos	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
					Lower Bound	Upper Bound	
Games-Howell	C	NT	-,037752000	,163320217	1,000	-,69651892	,62101492
		NT-S	,056998000	,156019507	,999	-,58516698	,69916298
		H	-,020163250	,130889423	1,000	-,69824027	,65791377
		H+NT	-,160376250	,137311270	,834	-,80714974	,48639724
		H+NT-S	,041026000	,138977179	,999	-,60107730	,68312930
	NT	C	,037752000	,163320217	1,000	-,62101492	,69651892
		NT-S	,094750000	,138145854	,977	-,45788701	,64738701
		H	,017588750	,108968946	1,000	-,52682111	,56199861
		H+NT	-,122624250	,116604353	,880	-,64339120	,39814270
		H+NT-S	,078778000	,118561573	,979	-,44028322	,59783922
	NT-S	C	-,056998000	,156019507	,999	-,69916298	,58516698
		NT	-,094750000	,138145854	,977	-,64738701	,45788701
		H	-,077161250	,097687383	,955	-,55228050	,39795800
		H+NT	-,217374250	,106137499	,430	-,67609337	,24134487
		H+NT-S	-,015972000	,108284071	1,000	-,47530224	,44335824
	H	C	,020163250	,130889423	1,000	-,65791377	,69824027
		NT	-,017588750	,108968946	1,000	-,56199861	,52682111
		NT-S	,077161250	,097687383	,955	-,39795800	,55228050
		H+NT	-,140213000	,063679848	,368	-,41001259	,12958659
		H+NT-S	,061189250	,067196685	,928	-,22885877	,35123727
	H+NT	C	,160376250	,137311270	,834	-,48639724	,80714974
		NT	,122624250	,116604353	,880	-,39814270	,64339120
		NT-S	,217374250	,106137499	,430	-,24134487	,67609337
		H	,140213000	,063679848	,368	-,12958659	,41001259
		H+NT-S	,201402250	,078979354	,243	-,11351420	,51631870
	H+NT-S	C	-,041026000	,138977179	,999	-,68312930	,60107730
		NT	-,078778000	,118561573	,979	-,59783922	,44028322
		NT-S	,015972000	,108284071	1,000	-,44335824	,47530224
		H	-,061189250	,067196685	,928	-,35123727	,22885877
		H+NT	-,201402250	,078979354	,243	-,51631870	,11351420

APÊNDICE Q- Teste de normalidade, homogeneidade de variâncias e ANOVA com teste *pos-hoc* de Games-Howell para a expressão de PBM em nervo infraorbital

Tests of Normality

Grupos	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
DENSIDADE DA MARCAÇÃO DE PBM NO NERVO IO						
C	,195	9	,200 [*]	,923	9	,420
NT	,165	8	,200 [*]	,929	8	,503
NT-S	,183	8	,200 [*]	,883	8	,200
H	,272	9	,054	,884	9	,174
H+NT	,181	8	,200 [*]	,963	8	,837
H+NT-S	,230	7	,200 [*]	,900	7	,330

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

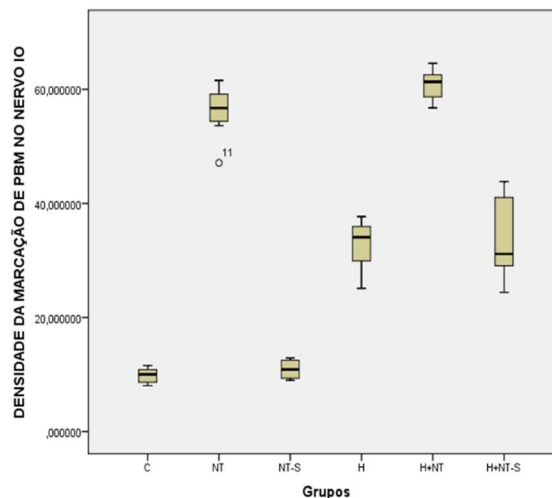
DENSIDADE DA MARCAÇÃO DE PBM NO NERVO IO

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
8,517	5	43	,000

ANOVA

DENSIDADE DA MARCAÇÃO DE PBM NO NERVO IO

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	19175,801	5	3835,160	226,984	,000
Within Groups	726,536	43	16,896		
Total	19902,337	48			



Multiple Comparisons

Dependent Variable: DENSIDADE DA MARCAÇÃO DE PBM NO NERVO IO

(I) Grupos	(J) Grupos	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
					Lower Bound	Upper Bound	
Games-Howell	C	NT	-46,2606350*	1,630912674	,000	-52,20592054	-40,31534946
		NT-S	-1,015760000	,724067227	,725	-3,40576231	1,37424231
		H	-22,7876489*	1,553444575	,000	-28,25918203	-17,31611574
		H+NT	-50,9071350*	1,033061534	,000	-54,49960041	-47,31466959
		H+NT-S	-24,3349029*	2,905143325	,001	-35,72313783	-12,94666789
	NT	C	46,26063500*	1,630912674	,000	40,31534946	52,20592054
		NT-S	45,24487500*	1,674945334	,000	39,27457363	51,21517637
		H	23,47298611*	2,166646850	,000	16,42026723	30,52570499
		H+NT	-4,646500000	1,829859190	,190	-10,84551215	1,55251215
		H+NT-S	21,92573214*	3,274297827	,001	10,40774702	33,44371727
	NT-S	C	1,015760000	,724067227	,725	-1,37424231	3,40576231
		NT	-45,2448750*	1,674945334	,000	-51,21517637	-39,27457363
		H	-21,7718889*	1,599611131	,000	-27,29288318	-16,25089460
		H+NT	-49,8913750*	1,101263754	,000	-53,60834921	-46,17440079
		H+NT-S	-23,3191429*	2,930089326	,001	-34,68273308	-11,95555264
	H	C	22,78764889*	1,553444575	,000	17,31611574	28,25918203
		NT	-23,4729861*	2,166646850	,000	-30,52570499	-16,42026723
		NT-S	21,77188889*	1,599611131	,000	16,25089460	27,29288318
		H+NT	-28,1194861*	1,761163977	,000	-33,94545548	-22,29351674
		H+NT-S	-1,547253968	3,236408528	,996	-12,99549108	9,90098315
	H+NT	C	50,90713500*	1,033061534	,000	47,31466959	54,49960041
		NT	4,646500000	1,829859190	,190	-1,55251215	10,84551215
		NT-S	49,89137500*	1,101263754	,000	46,17440079	53,60834921
		H	28,11948611*	1,761163977	,000	22,29351674	33,94545548
		H+NT-S	26,57223214*	3,021318627	,000	15,24863258	37,89583171
	H+NT-S	C	24,33490286*	2,905143325	,001	12,94666789	35,72313783
		NT	-21,9257321*	3,274297827	,001	-33,44371727	-10,40774702
		NT-S	23,31914286*	2,930089326	,001	11,95555264	34,68273308
		H	1,547253968	3,236408528	,996	-9,90098315	12,99549108
		H+NT	-26,5722321*	3,021318627	,000	-37,89583171	-15,24863258

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

APÊNDICE R - Teste de normalidade, homogeneidade de variâncias e ANOVA com teste *pos-hoc* de Games-Howell para a expressão de DAPI em nervo

Tests of Normality							
Grupos	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
Nervo Dapi							
C	,199	7	,200	,903	7	,348	
NT	,261	6	,200 [*]	,847	6	,149	
NT-S	,300	5	,161	,906	5	,441	
H	,213	5	,200 [*]	,914	5	,489	
H+NT	,242	6	,200 [*]	,904	6	,400	
H+NT-S	,232	5	,200 [*]	,875	5	,289	

*. This is a lower bound of the true significance.

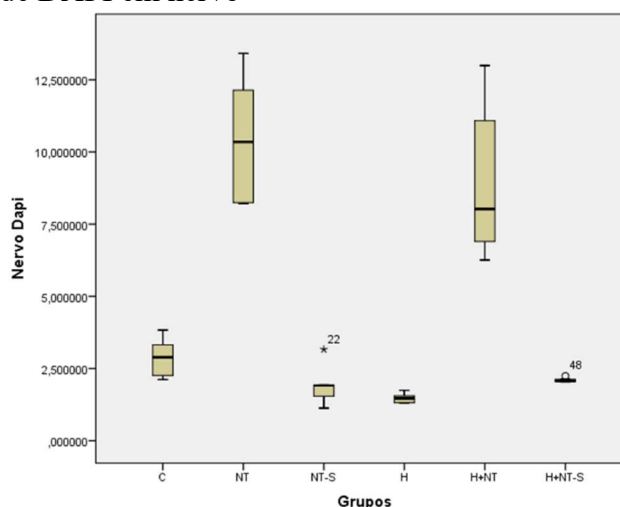
a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

Nervo Dapi				
Levene Statistic	df1	df2	Sig.	
12,190	5	28	,000	

ANOVA

Nervo Dapi					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	450,626	5	90,125	38,371	,000
Within Groups	65,766	28	2,349		
Total	516,391	33			



Multiple Comparisons

Dependent Variable: Nervo Dapi

(I) Grupos	(J) Grupos	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
					Lower Bound	Upper Bound	
Games-Howell	C	NT	-7,59511886 [*]	,969137665	,002	-11,50367566	-3,68656205
		NT-S	,921238143	,428174461	,349	-,63426960	2,47674588
		H	1,377785743 [*]	,272754063	,011	,35017984	2,40539165
		H+NT	-6,02628902 [*]	1,100497605	,014	-10,51757905	-1,53499899
		H+NT-S	,752486743	,262842640	,167	-,27953304	1,78450652
	NT	C	7,595118857 [*]	,969137665	,002	3,68656205	11,50367566
		NT-S	8,516357000 [*]	,993565560	,001	4,62168848	12,41102552
		H	8,972904600 [*]	,937141362	,001	5,00040505	12,94540415
		H+NT	1,568829833	1,419483755	,869	-3,37962379	6,51728346
		H+NT-S	8,347605600 [*]	,934304772	,002	4,36726357	12,32794763
	NT-S	C	-,921238143	,428174461	,349	-2,47674588	,63426960
		NT	-8,51635700 [*]	,993565560	,001	-12,41102552	-4,62168848
		H	,456547600	,349770621	,774	-1,11327825	2,02637345
		H+NT	-6,94752717 [*]	1,122069377	,006	-11,41680211	-2,47825222
		H+NT-S	-,168751400	,342097883	,994	-1,77081067	1,43330787
	H	C	-1,37778574 [*]	,272754063	,011	-2,40539165	-,35017984
		NT	-8,97290460 [*]	,937141362	,001	-12,94540415	-5,00040505
		NT-S	-,456547600	,349770621	,774	-2,02637345	1,11327825
		H+NT	-7,40407477 [*]	1,072427665	,006	-11,95681457	-2,85133496
		H+NT-S	-,625299000 [*]	,089957609	,004	-,99243137	-,25816663
	H+NT	C	6,026289024 [*]	1,100497605	,014	1,53499899	10,51757905
		NT	-1,568829833	1,419483755	,869	-6,51728346	3,37962379
		NT-S	6,947527167 [*]	1,122069377	,006	2,47825222	11,41680211
		H	7,404074767 [*]	1,072427665	,006	2,85133496	11,95681457
		H+NT-S	6,778775767 [*]	1,069949798	,010	2,21911382	11,33843771
	H+NT-S	C	-,752486743	,262842640	,167	-1,78450652	,27953304
		NT	-8,34760560 [*]	,934304772	,002	-12,32794763	-4,36726357
		NT-S	,168751400	,342097883	,994	-1,43330787	1,77081067
		H	,625299000 [*]	,089957609	,004	,25816663	,99243137
		H+NT	-6,77877577 [*]	1,069949798	,010	-11,33843771	-2,21911382

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Anexo A: Certificado de aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará (UFC)



Universidade Federal do Ceará
 Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
 Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
 Cep: 60430-970 Fortaleza-CE

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS ALTERAÇÕES PERIFÉRICAS E CENTRAIS NA NEURALGIA DO TRIGÊMEO EM RATOS COM HIPOTIREOIDISMO", protocolo nº45/2015, sob responsabilidade do Profa. Dra Mariana Lima Vale, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de nº8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 11 de novembro de 2015.

Vigência do projeto	20/05/2015 a 04/10/2017
Espécie/Linhagem	Ratos Heterogênico Wistar
Nº de Animais	96
Peso/Idade	180g – 02 meses
Sexo	Machos/Fêmeas
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 19 de novembro de 2015

Prof. Dr. Rodrigo Siqueira
 Coordenador do CEUA - UFC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
 RODRIGO JOSÉ BEZERRA DE SIQUEIRA
 COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM
 ANIMAIS - CEUA/UFC - Matrícula Sipe: 1520734

Anexo B – Artigo publicado em “The FASEB Journal” (JCR - 5.498, Web-Qualis 2016 para Ciências Biológicas II - A1) como uma “Short Communication”, com resultados parciais apresentados no “Experimental Biology 2017”



HOME | CURRENT ISSUE | NEW ARTICLES | ARCHIVE | ALERTS | RSS  | SUBMIT | HELP

TRIGEMINAL NEURALGIA IN RATS WITH HYPOTHYROIDISM: A MORPHOLOGICAL STUDY



Oswaldo P. da Costa Sobrinho¹, Helson Freitas da Silveira²,
Lúzia Clertiani Alves Vieira¹, Kalina Kelma Oliveira de Sousa¹,
Diego Bernarde Souza Dias¹, Delane Viana Gondim² and Mariana Lima Vale³

Author Affiliations

¹Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil

²Morphology Department, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil

³Pharmacology Department, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil

Abstract

Thyroid hormones (THs) are important growth and development factors, mainly of the Central Nervous System (CNS). The lack of THs decreases the neuronal volume, the number of cells of the glia and may causing defects in myelination, which includes the spinal tract of the trigeminal nerve. Hypothyroidism (HT) is associated with chronic peripheral lesion in rats, depressing neuronal excitability with absence of sensory potentials. Previously, our lab research group verified that rats with HT have a higher nociceptive threshold when stimulated in the infra-orbital region. The aim of this study was to evaluate the peripheral morphological changes in the trigeminal pathway in a HT model induced by propylthiouracil (PTU) drug in rats. 72 male Wistar rats (180–220 g), originating from the Central Animal Facility of the Federal University of Ceará – Brazil, kept at 22 °C, by day/night cycle – 12/12 h, with water and food *ad libitum*. The rats were divided into 6 groups: control (C), Trigeminal Neuralgia (TN), TN Sham, HT, HT+TN, HT+TN Sham. The

« Previous | Next Article »
Table of Contents

This Article

April 2017
The FASEB Journal
vol. 31 no. 1 Supplement
744.7

» Abstract

Article Usage Stats

Article Usage Statistics

Classifications

Anatomy
Neurobiology: Neuronal
and Spinal Cord
Degeneration, Repair and
Regeneration

Services

Email this article to a
colleague
Alert me when this article is
cited
Alert me if a correction is
posted
Similar articles in this journal
Download to citation
manager

 Get Permissions

Google Scholar

Articles by da Costa
Sobrinho, O. P.
Articles by Vale, M. L.

PubMed

Articles by da Costa
Sobrinho, O. P.

Anexo C – Premiação (2º lugar) na exposição “Arte sob o Microscópio”

CERTIFICADO

Certificamos que a imagem intitulada “Reveillon” de autoria de *Helson Freitas da Silveira; Luiza Clertiane Vieira Alves; Delane Viana Gondim e Mariana Lima Vale*, obteve o 2º lugar na categoria Microscopia Confocal na classificação final da 1ª Edição da Exposição de Arte Sob o Microscópio, realizada nos dias 29, 30 e 31 de Agosto de 2017.



Arte sob o microscópio

A arte que eu vejo na ciência que eu faço.

Fortaleza, 31 de Agosto de 2017.

Virginia Oliveira Carneiro Girão

Profa. Dra. Virginia Cláudia Carneiro Girão
Presidente da I Exposição de Arte Sob o Microscópio da UFC

Antônio Gomes de Souza Filho

Prof. Dr. Antônio Gomes de Souza Filho
Pró Reitor de Pós Graduação e Pesquisa da UFC

Pedro Eymar Barbosa Costa

Pedro Eymar Barbosa Costa
Diretor do Museu de Artes da UFC

Realização



Liga Acadêmica de Embriologia e
Microscopia Aplicada



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS
Departamento de Morfologia | Faculdade de Medicina | Universidade Federal do Ceará



CENTRAL ANALÍTICA
Central Analítica

