

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA

CAROLINA FONSECA DE BARROS

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO HIPOTIREOIDISMO NA MEMÓRIA DE
ROEDORES DE ACORDO COM O SEXO E FASE DO DIA

Belo Horizonte, MG
2023

Carolina Fonseca de Barros

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO HIPOTIREOIDISMO NA MEMÓRIA DE
ROEDORES DE ACORDO COM O SEXO E FASE DO DIA

Versão final

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia (PPGFISFAR) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

Orientação: Profa. Dra. Paula Bargi de Souza

Coorientação: Profa. Dra. Grace Schenatto Pereira
Moraes

043

Barros, Carolina Fonseca de.

Avaliação do efeito do hipotireoidismo na memória de roedores de acordo com o sexo e fase do dia [manuscrito] / Carolina Fonseca de Barros. – 2023. 57 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientação: Profa. Dra. Paula Bargi de Souza. Coorientação: Profa. Dra. Grace Schenatto Pereira Moraes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Memória. 3. Hormônios Tireóideos. 4. Caracteres Sexuais. 5. Relógios Circadianos. 6. Hipotireoidismo. I. Souza, Paula Bargi de. II. Moraes, Grace Schenatto Pereira. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 566 DE CAROLINA FONSECA DE BARROS

Às 14:00 horas do dia 10 do mês de março de 2023, na sala Prof. Wilson Beraldo, A4-175, Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB-UFMG, realizou-se a sessão pública para a defesa da Dissertação de **Carolina Fonseca de Barros**. A presidência da sessão coube à **Profa. Dra. Paula Bargi de Souza**, orientadora. Inicialmente, a presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Prof. Dr. Cleiton Lopes Aguiar**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Profa. Dra. Aline Silva de Miranda**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Profa. Dra. Grace Schenatto Pereira Moraes**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, coorientadora, e **Profa. Dra. Paula Bargi de Souza**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, orientadora. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Dissertação de Mestrado**, intitulada: "**Avaliação do Efeito do Hipotireoidismo na Memória de Roedores de Acordo Com o Sexo e Fase do Dia**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Dissertação de Mestrado. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pela presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 10 de março de 2023.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Aline Silva de Miranda, Servidor(a)**, em 14/03/2023, às 16:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paula Bargi de Souza, Professora do Magistério Superior**, em 14/03/2023, às 20:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cleiton Lopes Aguiar, Professor do Magistério Superior**, em 22/03/2023, às 09:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Grace Schenatto Pereira Moraes, Professora do Magistério Superior**, em 31/03/2023, às 17:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamentono art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2116046** eo

código CRC **8DC845FB**.

Referência: Processo nº 23072.211121/2023-31 SEI nº 2116046



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 566 DE CAROLINA FONSECA DE BARROS

"Avaliação do Efeito do Hipotireoidismo na Memória de Roedores de Acordo Com o Sexo e Fase do Dia"

CAROLINA FONSECA DE BARROS

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **10 de março de 2023**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Prof. Dr. Cleiton Lopes Aguiar, ICB/UFMG

Profa. Dra. Aline Silva de Miranda, ICB/UFMG

Profa. Dra. Grace Schenatto Pereira Moraes, ICB/UFMG – Coorientadora

Profa. Dra. Paula Bargi de Souza, ICB/UFMG - Orientadora

Belo Horizonte, 10 de março de 2023

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Aline Silva de Miranda, Servidor(a)**, em 14/03/2023, às 16:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Paula Bargi de Souza, Professora do Magistério Superior**, em 14/03/2023, às 20:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Cleiton Lopes Aguiar, Professor do Magistério Superior**, em 22/03/2023, às 09:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Grace Schenatto Pereira Moraes, Professora do Magistério Superior**, em 31/03/2023, às 17:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2116053** e o código CRC **3524D8FD**.

Agradecimentos

Finalizar esse processo não foi fácil, eu sempre penso como foi difícil e como eu tive que me reinventar em muitos momentos. Claro que existem várias pessoas que fizeram parte dessa trajetória.

Agradeço à minha família que sempre está do meu lado e me forneceu todo apoio necessário.

Agradeço às minhas orientadora e coorientadora, Paula Bargi de Souza e Grace Schenatto Pereira Moraes, pela orientação e todo o apoio nessa trajetória.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia (PPG-FISFAR) da UFMG que me acolheu desde o início e me proporcionou um processo formativo enriquecedor.

Agradeço à todos meus amigos e colegas de pós-graduação que foram muito importantes nesse processo formativo.

Agradeço aos meus colegas e professores do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo e do Núcleo de Neurociências que proveram diálogos e discussões enriquecedoras.

Agradeço também aos meus amigos da dança, que estiveram comigo em muitas etapas e foram essenciais para o meu processo.

Agradeço às agências de fomento CAPES, pela minha bolsa de mestrado, CNPQ e FAPEMIG pelo apoio financeiro que viabilizaram o desenvolvimento deste estudo.

“O ignorante afirma, o sábio duvida, o sensato reflete”

Aristóteles

Resumo

O hipotireoidismo é um distúrbio metabólico endócrino comum, diagnosticado por altos níveis de Hormônio Estimulante da Tireoide (TSH) e baixos níveis de tiroxina (T4) e triiodotironina (T3), com maior prevalência em mulheres e idosos. Entre a ampla variedade de sintomas, os pacientes com hipotireoidismo frequentemente relatam um comprometimento da memória. Além disso, existe uma associação entre distúrbios da tireoide e dessincronização do relógio circadiano, este último, por sua vez, também está relacionado à deficiência de memória. Assim, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos do hipotireoidismo na memória de reconhecimento de objetos (MRO) em camundongos C57BL/6J machos e fêmeas durante as fases de atividade e repouso. Os animais foram divididos nos grupos: Controle (C) e Hipotireoideo (H). O hipotireoidismo foi induzido quimicamente através da administração de Metimazol (0,01%) e Perclorato de sódio (0,1%) na água de beber por 24 dias. A MRO foi avaliada nos intervalos correspondentes aos ZTs 2-4 (fase de repouso) e 14-16 (fase de atividade), antes e após a indução do hipotireoidismo. Em seguida, os animais foram eutanasiados a cada 4h por 24h. O peso do coração e o comprimento da tíbia foram aferidos. A adenohipófise e o cérebro foram coletados e imediatamente congelados. Posteriormente foi realizada a extração de RNA e RT-qPCR para avaliar a expressão dos transcritos que codificam o *Tshb* na adenohipófise e os componentes do relógio (*Bmal1*, *Per2*, *Nr1d1* e *Cry1*) no hipocampo dorsal pela técnica de RT-qPCR. A eficácia do tratamento foi confirmada pelo aumento da expressão de RNAm de *Tshb* na hipófise anterior e pela redução da relação peso do coração/comprimento da tíbia. Nossos resultados mostraram que camundongos machos e fêmeas em condições de controle (eutireoideos) reconheceram o objeto familiar independentemente da hora do dia, não apresentando diferenças no desempenho da tarefa. Após a indução do hipotireoidismo, os animais de ambos os sexos não foram capazes de realizar o paradigma na fase de repouso (ZTs 2-4). Entretanto, na fase de atividade (ZTs 14-16), as fêmeas apresentaram prejuízos na MRO, enquanto os machos foram capazes de invocar a memória e reconhecer o objeto familiar, porém, apresentaram uma execução mais lenta da tarefa, sugerindo prejuízo no desempenho. Além disso, o padrão de oscilação diário de expressão gênica dos componentes do relógio circadiano do hipocampo dorsal apresentou alterações significativas para os fatores tempo (ZT), tratamento e/ou sexo. Dessa forma, podemos concluir que o hipotireoidismo prejudica diferencialmente a memória de camundongos de acordo com sexo e a hora do dia. Além disso, nossos resultados sugerem um papel funcional dos hormônios tireoidianos, incluindo a sinalização para o relógio biológico de áreas cerebrais relacionadas a processos mnemônicos.

Palavras-chave: memória, hormônios tireoidianos, dimorfismo sexual, relógio circadiano, hipotireoidismo

Abstract

Hypothyroidism is a common endocrine metabolic disorder diagnosed by high levels of Thyroid Stimulating Hormone (TSH) and low levels of thyroxine (T4) and triiodothyronine (T3), with higher prevalence in woman and elderly. Among the wide variety of symptoms, hypothyroid patients often complain about the memory's impairment. Moreover, there is an association between thyroid disorders and circadian clock disruption, which in turn, is linked with memory deficiency. Thus, the present study aimed to investigate the effects of hypothyroidism on object recognition memory (MRO) in male and female C57BL/6J mice during active and rest phases. The animals were divided into Control (C) and Hypothyroid (H) groups. Hypothyroidism was induced by methimazole (0.01%) and perchlorate (0.1%) treatment in the drinking water for 21 days. MRO was evaluated at ZTs 2-4 (rest phase) and ZT14-16 (active phase), before and after hypothyroidism induction. After that, the animals were euthanized every 4h for 24h. Heart weight and tibia length were measured. The anterior pituitary and the brain were collected and immediately frozen. Subsequently, RNA extraction and RT-qPCR were performed to evaluate the expression of the transcripts that encode *Tshb* in anterior pituitary and the core clock components (*Bmal1*, *Per2*, *Nr1d1* and *Cry1*) in the dorsal hippocampus by RT-qPCR. The treatment's effectiveness was confirmed by the increased *Tshb* mRNA expression in anterior pituitary gland and the reduced heart weight / tibia length ratio. The results showed that under Control conditions, male and female mice recognize the familiar object in a time-independent way, showing no differences in task performance. After the hypothyroidism induction, animals of both sexes were not able to perform the task in the rest phase (ZTs 2-4). In the active phase (ZTs 14-16), the females showed a loss in ORM, while the males performed the task and recognized the familiar object, however, they presented a slower execution of the task, suggesting a lower performance. Moreover, the daily oscillation pattern of dorsal hippocampus circadian clock gene expression showed significant changes for time (ZT), treatment and/or sex main factors. Thus, we conclude that hypothyroidism differentially impairs the memory of mice according to sex and time-of-day. Furthermore, our results suggest a functional role of thyroid hormones, including signaling to the biological clock of brain areas related to mnemonic processes.

Keywords: memory, thyroid hormones, sexual dimorphism, circadian clock, hypothyroidism

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1	O eixo tireoidiano.....	10
Figura 2	Taxonomia de sistemas de memória de mamíferos	14
Figura 3	Arquitetura molecular do relógio circadiano dos mamíferos.....	17
Figura 4	Avaliação do ciclo estral de fêmeas controle (C) e hipotireoideas (H)	25
Figura 5	Protocolo experimental utilizado para avaliação da MRO em animais Controles e Hipotireoideos.....	26
Figura 6	Avaliação da tarefa de MRO em machos e fêmeas eutireoideos durante as fases de repouso e atividade.....	30
Figura 7	Avaliação da tarefa de MRO em machos e fêmeas, eutireoideos ou hipotireoideos, durante as fases de repouso e atividade.....	32
Figura 8	Expressão diária dos componentes do relógio central no hipocampo dorsal em camundongos machos e fêmeas dos grupos controle (C) e Hipotireoideo (H)....	34
Tabela 1	Sequências de <i>primers</i> utilizados para o ensaio de PCR.....	26
Tabela 2	Valores de inclinação da curva (<i>slope</i>), eficiência, coeficiente de correlação (R ²) e concentração utilizada no ensaio de PCR.....	27
Tabela 3	Desempenho dos camundongos machos e fêmeas eutireoideos durante o treino da tarefa MRO.....	30
Tabela 4	Eficácia do tratamento para indução de hipotireoidismo.	31
Tabela 5	Desempenho dos camundongos machos e fêmeas nas condições controle ou hipotireoideos durante o treino da tarefa MRO.....	33

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BMAL1	<i>Basic Helix-Loop-Helix ARNT Like 1</i>
C	Grupo Controle
CCGs	Genes controlados pelo relógio (do inglês: <i>Clock controlled genes</i>)
CLOCK	<i>Clock Circadian Regulator</i>
CRY1	<i>Cryptochrome circadian regulator 1</i>
CRY2	<i>Cryptochrome circadian regulator 2</i>
E-box	<i>Enhancer box</i>
DBP	<i>D-box binding protein</i>
FBXL21	<i>F-box and leucine-rich repeat protein 21</i>
FBXL3	<i>F-box and leucine-rich repeat protein 3</i>
FT3	Triiodotironina livre
FT4	Tiroxina livre
H	Grupo Hipotireoideo
HHT	Eixo hipotálamo-hipófise-tireóide
HS	Hipotireoidismo subclínico
HTs	Hormônios tireoidianos
MRO	Memória de Reconhecimento de Objetos
NFIL3	<i>interleukin-3 regulated protein</i>
NPV	Núcleo Paraventricular do Hipotálamo
PER1	<i>Period1</i>
PER2	<i>Period2</i>
REV-ERBA	<i>Nuclear Receptor Subfamily 1 Group D Member 1 (Nr1d1)</i>
ROR α	<i>RAR Related Orphan Receptor Alpha</i>
ROR β	<i>RAR Related Orphan Receptor Beta</i>
ROR γ	<i>RAR Related Orphan Receptor Gamma</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
THRA	<i>Thyroid hormone receptor alpha</i>
THRB	<i>Thyroid hormone receptor beta</i>
TRH	Hormônio Liberador de Tireotrofina
TSH	Hormônio Estimulante da Tireoide ou Tireotrofina
ZT	Zeitgeber Time

Sumário

1	Introdução e revisão de literatura	13
1.1	O eixo tireoidiano	13
1.2	Prevalência do hipotireoidismo e seus principais sintomas	15
1.3	Memória e aprendizado.....	16
1.4	Memória de reconhecimento de novo objeto.....	18
1.5	Importância do ciclo circadiano para os processos mnemônicos.....	20
1.6	Memória e Hipotireoidismo	21
2	Justificativa e relevância.....	23
3	Objetivos	24
3.1	Objetivo geral	24
3.2	Objetivos específicos	24
4	Material e métodos	25
4.1	Animais e protocolo experimental	25
4.2	Monitoramento do ciclo estral por esfregaço vaginal.....	26
4.3	Tarefa de Memória de Reconhecimento de novo Objeto (MRO)	27
4.4	Avaliação da expressão gênica por Transcrição Reversa seguida de PCRem tempo real (RT-qPCR)	28
4.5	Análise estatística.....	31
5	Resultados	32
5.1	Camundongos machos e fêmeas eutireoideos realizam o teste de MRO independente da fase do dia	32
5.2	Eficácia do tratamento para indução do hipotireoidismo	33
5.3	O hipotireoidismo afeta diferencialmente a MRO em camundongos machos e fêmeas de acordo com a fase do dia	34
5.4	O perfil diário de oscilação da expressão dos genes do relógio do	36
6	Discussão	38
7	Conclusões	42
	Referências bibliográficas.....	44
	ANEXO 1	50

1 Introdução e revisão de literatura

1.1 O eixo tireoidiano

A glândula tireoide é responsável pela síntese e secreção dos hormônios tireoidianos (HTs). Em humanos, 80% dos HTs é secretado sob a forma de Tiroxina (T4) e cerca de 20% como triiodotironina (T3). A função da glândula tiroide é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-tireoide (HHT) (ORTIGA-CARVALHO,2016). O hormônio liberador de tireotrofina (TRH) produzido e liberado pelos neurônios do Núcleo Paraventricular do hipotálamo (NPV) estimula a síntese e secreção do Hormônio Estimulante da Tireoide (TSH ou tireotrofina) pelas células adenohipofisárias denominadas tireotrofos. O TSH, por sua vez, é o principal hormônio trófico da tireoide e a sua interação com os receptores de membrana no tireócito estimula um aumento no metabolismo da glândula tireoidiana como um todo, estimulando conseqüentemente a síntese e a secreção do T4 e T3 como também o crescimento da glândula (FELDT-RASMUSSEN et al., 2021). Esse eixo é controlado por um mecanismo de retroalimentação (*feedback*) negativo clássico em que as concentrações séricas dos HTs livres influenciam a biossíntese e a secreção do TRH hipotalâmico e do TSH adenohipofisário (LECHAN et al., 2016) (*feedback* longo) (Figura 1). Além disso, o TSH exerce um *feedback* de alça curta no hipotálamo, podendo, assim, regular a secreção de TRH (PRUMMEL et al., 2004). Adicionalmente, as concentrações séricas dos HTs são reguladas por complexos mecanismos extratireoidianos, que são resultantes do metabolismo periférico dos HTs através da ação enzimática das selenioproteínas desidases e da disponibilidade de iodo no organismo (MENDOZA & HOLLENBERG 2017; MARIOTTI & BECK-PECCOZ,2021).

O eixo HHT pode ser ainda modulado por diferentes fatores estimulatórios ou inibitórios. Algumas substâncias como a leptina, os glicocorticoides, a arginina-vasopressina (AVP), os agonistas alfa-adrenérgicos e os opióides são capazes de estimular a secreção de TSH e TRH, enquanto a dopamina, a somatostatina, a serotonina e o neuropeptídeo Y (NPY) inibem a secreção do TRH, conseqüentemente, reduzindo a atividade do eixo tireoidiano (MARIOTTI & BECK-PECCOZ, 2021).

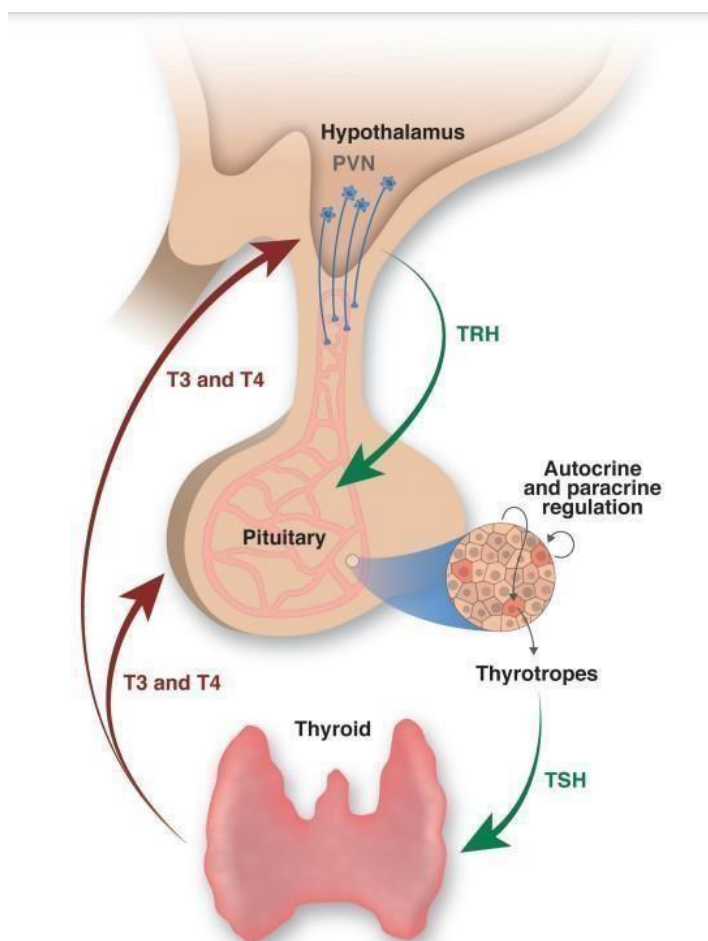


Figura 1. O eixo tireoidiano [Adaptado Ortiga- Carvalho, *Comprehensive Physiology*, v. 6, n. 3, p. 1387-1428 (2016)].

Os HTs são essenciais para o crescimento, desenvolvimento e metabolismo, atuando em todos os tecidos por meio de ações transcricionais e pós-transcricionais e modulando diversas vias de sinalização celular (CHENG et al., 2010). Dentre suas principais ações, podemos destacar o importante papel neuromodulador dos HTs para diversas funções do Sistema Nervoso Central (SNC) como a sinaptogênese, a síntese de mielina, a neovascularização, a modulação da síntese de neurotransmissores, entre outros (CHAALAL et al., 2018). Além disso, os HTs aumentam o metabolismo basal, o consumo de oxigênio e a termogênese por meio de ações em diferentes tecidos periféricos como o coração, músculos esqueléticos, tecidos adiposos branco e marrom e fígado, entre outros (MULLUR et al., 2017; SHAHID et al., 2022). Os HTs são hormônios essenciais para diversas funções, e interessante, atuam tanto em ações necessárias para que aconteça o aumento no consumo de energia, no caso da glicólise e aumentam a sensibilidade da musculatura esquelética em captar glicose, como também atuam em vias de gliconeogênese no fígado (MULLUR et al., 2017).

Dessa forma, os HTs são essenciais para a homeostase corporal e bom funcionamento das funções fisiológicas.

1.2 Prevalência do hipotireoidismo e seus principais sintomas

O hipotireoidismo é um distúrbio endócrino-metabólico caracterizado como a insuficiência da tireoide, diagnosticado pela elevada concentração do hormônio estimulante da tireoide (TSH) (acima dos limites de referência) e níveis baixos da tiroxina livre (FT4) e triiodotironina livre (FT3) (HEGEDÜS et al., 2022). O hipotireoidismo pode ser classificado como leve (TSH sérico: 4,5 a 9 mU/L) ou severo (TSH \geq 10 mU/L), sendo que 75 % dos pacientes apresentam o hipotireoidismo leve. De fato, as causas do hipotireoidismo podem ser inúmeras, no entanto cerca de 60-80 % dos casos de hipotireoidismo estão relacionados com a presença de anticorpos anti-tireoperoxidase, um marcador molecular da tireoidite linfocítica crônica, a tireoidite de Hashimoto e o restante está associado à deficiência na ingestão de iodo.

Notavelmente, a função tireoidiana depende da adequada ingestão do iodo, por ser o oligoelemento essencial para a síntese dos HTs (LIU & BRENT, 2010), consequentemente, a sua falta em regiões geográficas específicas, geralmente afastadas das regiões costeiras, é uma das causas do Hipotireoidismo congênito (WASSNER et al., 2018). Em humanos, o hipotireoidismo congênito não diagnosticado/tratado resulta no cretinismo que é caracterizado como um quadro irreversível de prejuízos cognitivos (retardo mental), no desenvolvimento e no crescimento (CHEN & HETZEL, 2010). Essa deficiência crônica na ingestão de iodo é uma das principais causas do bócio endêmico no hipotireoidismo severo, sendo um problema grave de saúde pública, em muitos países do mundo (GIANTOMASSI et al., 2021). Uma das medidas preventivas para combater o bócio endêmico na década de 50 foi a iodação do sal de cozinha, com o intuito que a população em geral consiga atingir o mínimo recomendado de pelo menos 150 μ g/dia para um adulto normal (REIS et al., 2021; WHO et al., 2004).

Além disso, o eixo tireoidiano também apresenta uma importante resposta adaptativa alostática que está associada aos quadros subclínicos de hipotireoidismo e hipertireoidismo. O hipotireoidismo subclínico (HS) pode ser caracterizado por níveis elevados de TSH com níveis normais dos hormônios tireoidianos (HTs) (BIONDI; CAPPOLA; COOPER, 2019). Quando aparentes, os sintomas são semelhantes ao hipotireoidismo, porém em menor grau. Um aspecto importante do HS, é que muitos casos assintomáticos e/ou não tratados tendem a evoluir para o hipotireoidismo clínico

(ASVOLD, VATTEN, & BJØRO, 2013).

Em vista, na clínica, o hipotireoidismo apresenta uma alta prevalência na população geral. Nos EUA, a prevalência do hipotireoidismo varia entre 0-3 % e 3-7 %, na Europa é entre 0-2 % e 3-5 %, dependendo da definição utilizada (ASVOLD, VATTEN; BJØRO, 2013; GARMENDIA et al., 2014). Já no Brasil, cerca de 1,98 % da população apresenta hipotireoidismo enquanto cerca de 6,7 % da população manifesta HS ao ano (BENSEÑOR et al., 2021).

Os sintomas clínicos podem ser variados dependendo da idade, sexo e tempo entre o início e o diagnóstico (CHAKER et al., 2017) Dentre os principais sintomas destacam-se a fadiga, a depressão, a ansiedade, a perda de memória e concentração, a constipação, alteração do reflexo de Aquiles, ganho de peso, intolerância ao frio, letargia e pele seca (CHAKER et al., 2017). Além disso, o hipotireoidismo pode predispor a complicações metabólicas e cardiovasculares, como o aumento dos níveis séricos de lipídios, aterosclerose, e infarto do miocárdio (REDFORD & VAIDYA, 2017). Contudo, a apresentação clínica leve dos sintomas dificulta em muitas situações a avaliação do impacto causado pela doença, principalmente no que concerne às funções cognitivas.

Atualmente, o tratamento é feito com a monoterapia de reposição hormonal, utilizando a levotiroxina (T4), que deve ser ingerida durante o jejum das primeiras horas da manhã (CHAKER et al., 2017; MCANINCH & BIANC, 2016), embora alguns pesquisadores e clínicos recomendem que o tratamento seja feito com a combinação de T4 e T3 (JONKLAAS et al., 2021). No entanto, já foi visto na clínica que o tratamento com a reposição hormonal pode não reverter os prejuízos gerados pelo hipotireoidismo, assim, indivíduos tratados com levotiroxina podem continuar apresentando prejuízo na memória (WIERSINGA et al., 2019).

1.3 Memória e aprendizado

O nosso cérebro é o órgão que coordena diversas funções importantes para a sobrevivência e a homeostase corporal. Em que uma das suas principais funções é ser o responsável pelo que chamamos de mente. De fato, o nosso cérebro é o maestro do pensar, sentir, querer, perceber, aprender e da memória, da curiosidade e do comportamento. Uma das funções cognitivas de importância fundamental para a sobrevivência de qualquer espécie é a memória, sendo ela a causa de sermos muito mais que movimentos e comportamentos estereotipados (OKANO et al., 2000). Portanto,

tanto aprendizagem como a memória são um dos assuntos mais intensamente estudados no campo da neurociência.

Atualmente, apesar dos conceitos de memória e aprendizado serem bastante discutidos, dificilmente conseguimos ver uma ideia completamente fechada. De acordo com Kandell (2021), o ato de aprender está ligado ao fato de que o conhecimento sobre o mundo acontece a partir de mudanças no comportamento. Já a memória seria um processo em que o conhecimento adquirido pela mudança de comportamentos seria aprendido, armazenado e assim evocado. Já para MOSCOVITCH (2007) o conceito de memória estaria ligado a uma representação interna e duradoura de um acontecimento ou evento passado, que poderia se refletir em algum tipo de comportamento ou pensamento e, além disso, essa memória só de fato poderia existir caso ela fosse evocada. Por isso, a memória seria o resultado da interação entre o engrama e a evocação da memória. No caso, o engrama seria o que chamamos de traço de memória, ou seja, a representação física no cérebro que quando ocorre a interação com pistas, esse engrama é capaz de ser estimulado e, conseqüentemente, evocar essa memória (MOSCOVITCH, 2007; JOSSELYN & TONEGAWA, 2020). Já de acordo com Izquierdo (2018), a memória seria dividida em processos, os quais denominam-se: a aquisição, formação, conservação e evocação. A aquisição poderia também ser chamada de aprendizado ou aprendizagem, enquanto a evocação seria chamada de lembrança, recuperação ou recordação (IZQUIERDO, 2018). De certa forma, esses conceitos não englobam toda a ideia do que seria a memória, portanto, somando esses conceitos podemos dizer que a memória é a forma que adquirimos conhecimento do mundo, advindo de um processo de aquisição, conservação e evocação, em que o engrama seria a representação física dessa memória no nosso cérebro.

Outro aspecto importante da memória, é que já se tem a ideia de que o processo de formação seria muito mais complexo do que pensamos, no qual diversos sistemas e mecanismos neuronais estão direta ou indiretamente envolvidos (DUDAI et al., 2015). Conseqüentemente, existem diversos tipos de memória que interagem e operam com várias estruturas para que ocorra a formação de novas memórias. Neste sentido, as memórias podem ser divididas de acordo com o seu conteúdo em dois grandes grupos: as memórias declarativas, as quais estão relacionadas ao registro de fatos, eventos ou

conhecimentos e, as não declarativas ou procedurais. As memórias declarativas estão ligadas principalmente ao fato, da espécie humana ser capaz de declarar algo, portanto, são memórias declarativas aquelas que somos capazes de falar sobre, as quais podemos declarar (IZQUIERDO, 2018; RIEDEL & BLOKLAND, 2015). Dentro desse grupo podemos ainda ter as memórias chamadas episódicas ou autobiográficas, que seriam os eventos os quais assistimos ou dos quais participamos e, as semânticas relacionadas ao conhecimento de fatos (IZQUIERDO, 2018; RIEDEL & BLOKLAND, 2015). No caso das memórias não declarativas, tais memórias não estariam ligadas de fato a algum sistema específico, portanto, seriam um sistema de memórias que não se encaixariam na classificação das memórias declarativas

Na Figura 2 estão representados os tipos de memória na divisão clássica em declarativas e não declarativas (SQUIRE, 2004).

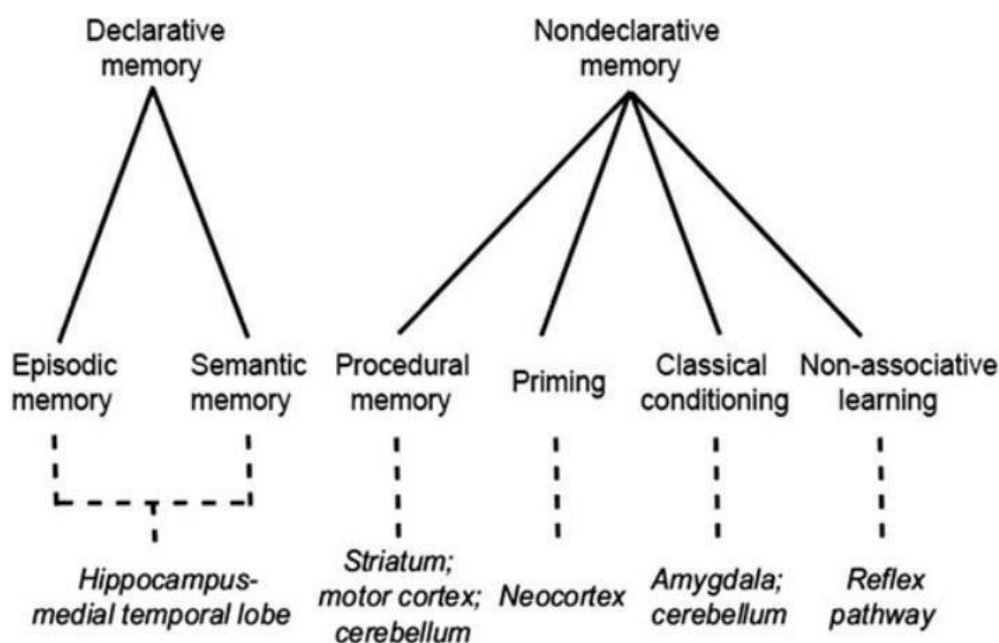


Figura 2. Taxonomia de sistemas de memória de mamíferos. (Adaptado RIEDEL & BLOKLAND, 2015)

1.4 Memória de reconhecimento de novo objeto

No caso de modelos animais, o estudo do processo de formação da memória vem sendo realizado, principalmente, para o entendimento dos mecanismos neurais e moleculares envolvidos nestes processos. Apesar da divisão clássica que é vista na literatura e de acordo com definição das memórias declarativas, alguns paradigmas

nos permitem ter acesso a memória declarativas em modelos animais. Em laboratórios de pesquisa básica, os roedores correspondem ao modelo mais amplamente utilizado e as tarefas de reconhecimento de objetos permitem o estudo das memórias declarativas nestes animais (ANTUNES & BIALA, 2012; BIRD, 2017; CLARKE et al., 2010).

A tarefa de reconhecimento de objeto é particularmente utilizada por ser de fato bastante interessante para o estudo da memória, principalmente porque não requer motivação externa, recompensa ou punição, necessitando apenas de um pouco de treinamento ou habituação, além disso, pode ser concluída em um tempo relativamente curto (SILVERS et al., 2007). O uso da “novidade” é o estímulo mais importante nessa tarefa, pois esses estímulos podem mudar o comportamento do animal gerando aproximação do objeto (BEVINS et al., 2002). Dessa forma, as memórias de reconhecimento utilizam a ideia do indivíduo ter como estímulo algo que seja novo, pois esse indivíduo já foi exposto a algo que ele classificou como familiar (ANTUNES & BIALA, 2012).

Assim, no teste de reconhecimento espera-se que, a partir do conhecimento do estímulo/objeto familiar, o indivíduo explore-o menos, por já ter tido contato prévio, ao passo que a novidade/novo objeto, que seria o estímulo novo, faria com que o indivíduo mantivesse mais tempo de contato/exploração (ANTUNES & BIALA, 2012; ENNACEUR, 2010). Essa memória apresentaria uma ideia que é a familiaridade, o reconhecimento de algo que já é conhecido e o ato de recordar um estímulo que é familiar (BIRD, 2017; ENNACEUR, 2010; ANTUNES & , 2012; LUEPTOW, 2017).

Uma característica dessa tarefa consiste em que o animal é apresentado a pergunta de “qual” objeto, o que seria uma das dimensões da memória de reconhecimento (CRUZ-SANCHEZ et al., 2020).

Sabe-se que o hipocampo é a estrutura chave para o processo e formação da memória, no entanto, a memória é um processo amplo que pode envolver muitas regiões neuronais. As estruturas do lobo temporal medial, principalmente o hipocampo, estão relacionadas aos processos neurobiológicos das memórias de reconhecimento (GUARNIERI et al., 2020; CLARKE et al., 2010; FERBINTEANU, 2019). Em relação a memória de reconhecimento de objetos, já foi descrito na literatura o hipocampo e o córtex perirrinal são áreas muito importantes envolvidas no seu processamento (ANTUNES & BIALA, 2012; CLARKE et al., 2010). De acordo com essa ideia, o córtex perirrinal seria necessário no estímulo de familiaridade e o hipocampo seria crucial para a lembrança do estímulo (ANTUNES & BIALA, 2012; BIRD, 2017).

Portanto, o uso da tarefa de memória de reconhecimento de objeto é uma estratégia interessante para o estudo da memória em diversos modelos, como também o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos nestes processos.

1.5 Importância do ciclo circadiano para os processos mnemônicos

Os ritmos circadianos são extremamente importantes para regular diversos processos fisiológico, biológicos e comportamentais frente às demandas diárias.

O núcleo supraquiasmático (NSQ) hipotalâmico é reconhecido como o relógio circadiano central em mamíferos, contudo, os componentes do relógio denominados genes do relógio, são expressos em todos os tecidos (Figura 3).

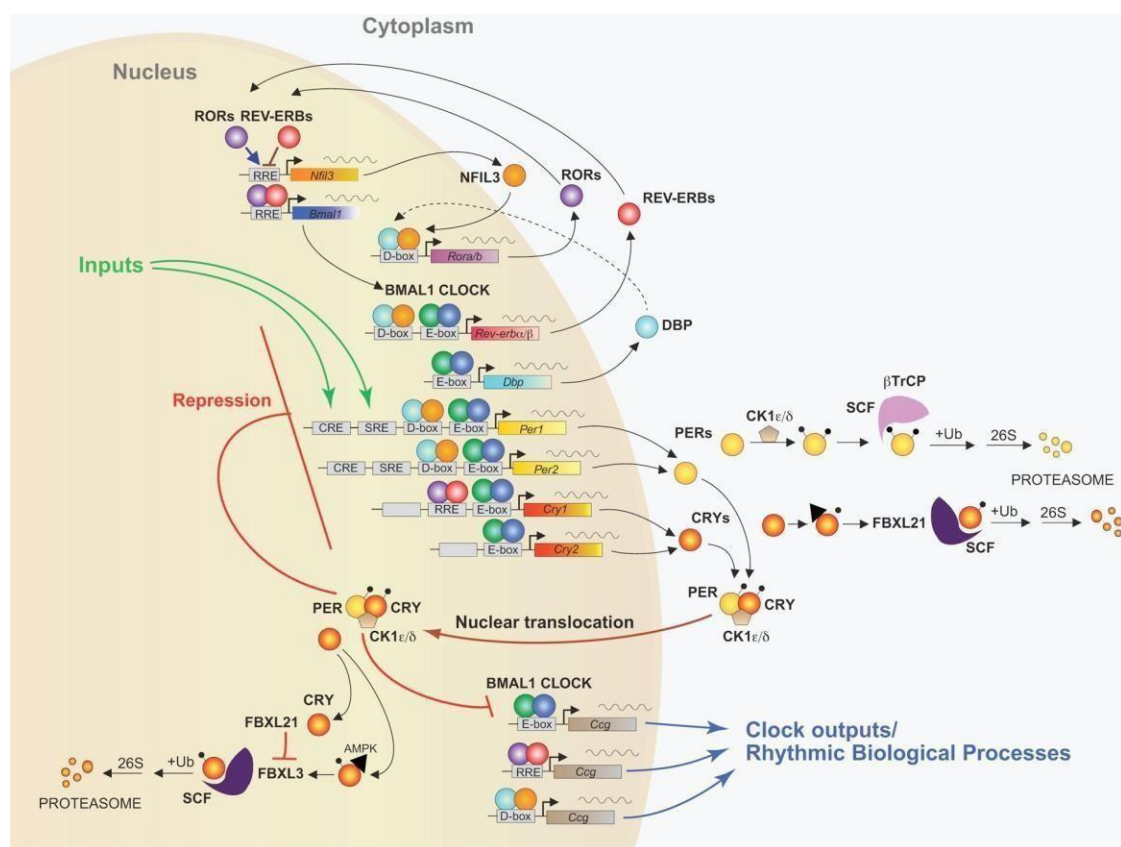


Figura 3. Componentes centrais do relógio circadiano dos mamíferos. Na alça de retroalimentação central, os fatores de transcrição BMAL1 (círculos verdes) e CLOCK (círculos azuis) se heterodimerizam e se ligam aos domínios E-box nos promotores de genes, incluindo os genes que codificam o *Per1* e *Per2* (amarelo), *Cry1* e *Cry2* (vermelho com centro amarelo), REV-ERB α e β (círculos vermelhos, também denominados de *Nr1d1* e *NR1d2*), os RORs (α , β e γ círculos roxos) e dos genes controlados pelo relógio (CCG). Os produtos proteicos PER (círculos amarelos) e CRY (círculos vermelhos/amarelos) se heterodimerizam e translocam para o núcleo após ligação com caseína quinase δ ou ϵ , CK1 δ e ϵ , respectivamente, onde interferem com a atividade do BMAL1/CLOCK. A estabilidade de PER e CRY é regulada por FBXL21 e FBXL3. Os componentes REV-ERB α e β , competem com os RORs para ligação a elementos RRE no promotor do gene *Bmal1*, regulando positiva e negativamente, respectivamente, a transcrição de *Bmal1*. (Figura obtida no artigo de Cox e Takahashi, 2019).

A geração dos ritmos circadianos, em todas as células de mamíferos, baseia-se na auto regulação dos componentes centrais do relógio biológico, dentre os quais

destacamos os genes: *Bmal1*, *Clock*, *Per1*, *2 e 3*, *Cry1 e 2*, *Nr1d1 e Rora* (CERMAKIAN& SASSONE-CORSI, 2000; KING & TAKAHASHI, 2000). A expressão rítmica dos genes do relógio é controlada através de uma alça de retroalimentação negativa em que produtos gênicos resultantes (PERs e CRYs) inibem a transcrição mediada pelo heterodímero BMAL1/CLOCK (CERMAKIAN& SASSONE-CORSI, 2000; KING & TAKAHASHI, 2000). Esse mecanismo gera um ritmo endógeno com duração de ‘cerca de um dia’, daí o nome ritmo circadiano (Figura 3).

As funções cognitivas superiores, como a memória e aprendizado são moduladas por fatores e condições ambientais e apresentam modulação circadiana tanto em humanos como em roedores (MAURY & QUEINNEC, 1992; VALENTINUZZI, MENNA-BARRETO, XAVIER, 2004). Neste sentido, estudos em animais e seres humanos fortalecem a ideia que existe uma modulação circadiana no desempenho da memória e/ou aprendizado no período de atividade (MAURY & QUEINNEC, 1992; KOULACK, 1997; MARTIN-FAIREY & NUNEZ, 2014; VALENTINUZZI et al., 2004). No estudo de Valentinuzzi et al. (2004) encontrou uma melhora na aquisição e na evocação da memória quando avaliou ratos durante a fase de atividade na tarefa do labirinto aquático. Apesar desses dados, TAKAHASHI & OKADA (2013) os animais apresentaram uma melhora no desempenho no teste de localização de novo objeto, enquanto no teste de reconhecimento de objeto, o desempenho foi independente do horário do dia. De acordo com Shimuzi et al., (2016), os camundongos apresentam um desempenho melhor no teste de reconhecimento de objetos quando este é realizado no meio da noite que corresponde ao seu período de atividade. Essas evidências mostram que a influência da modulação circadiana depende do tipo de memória a ser testada.

Outro ponto importante é que lesões no NSQ ou a ablação total dos genes do relógio prejudicam a formação e consolidação da memória espacial de longo prazo (GARCIA et al., 2000; RAWASHDEH et al., 2014. WARDLAW et al., 2014). A partir disso, de acordo com o estudo de RAWASHDEH et al. (2014), utilizando animais *Per1* (-/-) encontrou prejuízo na memória como também nas vias de sinalização para o processo de formação da memória como a sinalização para a fosforilação da proteína CREB. Portanto, parece existir uma relação estreita entre a memória e o relógio biológico, de modo que o ciclo circadiano parece interferir principalmente na formação da memória de longo prazo de maneira dependente do tipo de memória

1.6 Memória e Hipotireoidismo

Sabe-se que os HTs são importantes para diversas funções cognitivas tanto no

desenvolvimento como também na manutenção no adulto (RAYMAEKERS & DARRAS, 2017; ACCORRONI et al., 2017). Dessa forma, o bom funcionamento do eixo HHT é importante para o funcionamento do sistema nervoso central (SNC), como um todo.

Em humanos, o hipotireoidismo durante os períodos fetal e pós-natal, se não tratado, gera déficits neurológicos, cognitivos e motores, levando a uma deficiência intelectual (BERNAL, 2007). Em adultos, os HTs são fundamentais para a manutenção das funções cognitivas, como a memória e aprendizado (ACCORRONI et al., 2017) e distúrbios tireoidianos, como o hipotireoidismo, estão associados com prejuízos na memória e no aprendizado tanto em seres humanos como em roedores (ALZOUBI et al., 2005, 2009, 2014; CHAMAS et al., 2022; CHALAAL et al., 2018; ALKADHI & ALZOUBI et al., 2020; BURMEISTER et al., 2001; SAMUELS et al., 2007). Neste contexto, Cooke et al. (2014) encontraram importantes alterações morfológicas em regiões associadas a memória e aprendizagem através do uso da técnica de ressonância magnética em humanos com hipotireoidismo não tratado. Adicionalmente, prejuízos como lentidão no pensamento, incapacidade de concentração e de realizar cálculos, como também prejuízos na capacidade de compreender questões complexas e na memória já foram descritos (BURMEISTER et al., 2001; SAMUELS et al., 2007).

Em estudos com modelo animal, encontrou-se perdas na memória e aprendizado, principalmente relacionados ao hipocampo (CHAMAS et al., 2022; ALZOUBI et al., 2005). Estudos anteriores de Dias et al. (2012), observaram prejuízo na memória espacial de ratas cujo hipotireoidismo foi quimicamente induzido através do tratamento com metimazol durante 3 meses. Em ratos tireoidectomizados foi visto um prejuízo tanto no aprendizado como também na memória de curto e longo prazo, ambos prejuízos relacionados a potenciação ao longo prazo e na área CA1 no hipocampo (ALZOUBI et al., 2005; ARTIS et al., 2012). Assim, o hipotireoidismo parece prejudicar importantes vias para a consolidação da memória de longo prazo, dentre elas a via da MAPK/ERK-CREB e do Ca^{2+} /Calmodulina (CHALAAL et al., 2019; ALZOUBI et al., 2009, 2005; ALKADHI & ALZOUBI, 2020; YOUSEF et al., 2019).

Além disso, camundongos com hipotireoidismo apresentaram uma redução de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) tanto no hipocampo como no córtex pré-

frontal (BORTOLOTTO et al., 2021; GE et al., 2015; MADHUSUDHAN et al., 2022), demonstrando que o hipotireoidismo interfere não apenas na via da plasticidade sináptica da memória, mas também no conteúdo de substratos essenciais para a formação da memória.

O hipocampo é uma região com alta sensibilidade, expressando as isoformas alfa (THRA) e beta (THRB) dos receptores para os HTs e suas variantes (MACCHIA et al., 2001). No estudo de Wilcoxon et al. (2007), foi demonstrado que camundongos deficientes em ambas THRA1 e THRA2 (camundongos TR α o/o), submetidos ou não ao hipotireoidismo, apresentaram prejuízo na aprendizagem e na memória. Além disso, o autor encontrou redução da expressão de receptores de glicocorticoides e danurogranaína (RC3). Assim, o prejuízo do hipotireoidismo na memória e aprendizado parece estar relacionado com o papel funcional dos seus receptores no hipocampo. Além disso, alguns autores sugerem que hipotireoidismo induz um quadro de neuroinflamação no hipocampo que, por sua vez, estaria relacionada aos prejuízos na memória associada à esta desordem tireoidiana (CHAMAS et al., 2022; CHALAAL et al., 2019). Assim, no trabalho de Chamas et al., 2022, utilizando camundongos machos das linhagens C57BL/6J e WSB/EiJ e tratados por sete semanas com propiltiouracil (PTU), inibidor da função tireoidiana, os autores encontraram que os WSB/EiJ não apresentaram respostas inflamatórias e não houve prejuízo na sinalização hipocampal que é responsiva aos HTs, apesar dos baixos valores séricos de HTs no hipocampo. Enquanto, que os C57BL/6J apresentaram um processo inflamatório hipocampal acompanhado de prejuízo na sinalização intracelular. Assim, os autores sugerem que os níveis hipocampais de HTs podem ser importantes para a função glial no hipocampo em camundongos C57BL/6J, e que o hipotireoidismo prejudica a sua função.

De fato, os mecanismos moleculares desencadeados pelos HTs na regulação dos processos mnemônicos bem como os prejuízos desencadeados pelo hipotireoidismo nestes processos ainda não estão completamente elucidados.

2 Justificativa e relevância

Como mencionado anteriormente, existe uma importante correlação entre o ciclo circadiano, memória e aprendizado (MAURY & QUEINNEC, 1992; KOULACK, 1997; MARTIN-FAIREY & NUNEZ, 2014; VALENTINUZZI et al., 2004) e o hipotireoidismo prejudica a memória tanto em humanos como também em roedores por mecanismos ainda não completamente elucidados (ALZOUBI et al., 2005, 2009, 2014; CHAMAS et al., 2022; CHALAAL et al., 2019; ALKADHI & ALZOUBI et al., 2020;

BURMEISTER et al., 2001; SAMUELS et al., 2007).

Adicionalmente, nosso grupo demonstrou que alterações na função tireoidiana, como o hipotireoidismo e hipertireoidismo, estão associadas à dessincronização do relógio biológico de importantes órgãos alvos da ação dos HTs, como o coração (PELICIARI-GARCIA et al., 2018) e a adenohipófise (BARGI-SOUZA et al., 2019). Tais achados sugerem um importante papel modulador dos HTs sobre a maquinaria do relógio biológico que poderia explicar a ampla variedade de distúrbios endócrino- metabólicos e cardiovasculares associados ao hipotireoidismo.

Neste sentido, ainda não se sabe se: a) os prejuízos na memória resultantes do hipotireoidismo são observados tanto na fase de atividade quanto na fase de repouso dos animais, ou se exibem uma faixa temporal de maior susceptibilidade e; b) os HTs modulam o padrão diário de oscilação dos componentes do relógio no hipocampo. Assim, nossa hipótese central é que o prejuízo hormonal tireoidiano resultante do hipotireoidismo desencadeia alterações moleculares e rítmicas no relógio biológico do hipocampo afetando o processo de consolidação e evocação da memória espacial.

Além disso, considerando a alta prevalência do hipotireoidismo em mulheres (1 em cada 8 mulheres adultas) e a carência de estudos comparativos utilizando ambos os sexos, principalmente mediante a um quadro de hipotireoidismo, o presente estudo teve como objetivo comparar os efeitos do hipotireoidismo na memória de camundongos machos e fêmeas nas fases de atividade e repouso.

3 Objetivos

3.1 *Objetivo geral*

Investigar os efeitos hipotireoidismo na memória de longo prazo de camundongos fêmeas e machos da linhagem C57BL/6J durante as fases de atividade e repouso.

3.2 *Objetivos específicos*

- Avaliar a memória de reconhecimento de objetos (MRO) em camundongos eutireoideos (controle) machos e fêmeas C57BL/6J nos intervalos que correspondem aos ZTs 2 - 4 (fase de repouso/descanso) e dos ZTs 14 -16 (fase de atividade);
- Investigar os efeitos do hipotireoidismo na MRO em camundongos

machos e fêmeas C57BL/6J durante as fases de repouso/descanso e de atividade;

- Avaliar o padrão de expressão diário e oscilatório dos principais componentes do relógio circadiano no hipocampo dorsal em camundongos machos e fêmeas da linhagem C57BL/6J sob condições de eutireoidismo (controle) ou hipotireoidismo.

4 Material e métodos

4.1 Animais e protocolo experimental

O presente estudo foi realizado com camundongos machos e fêmeas C57BL/6J adultos provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram distribuídos em grupos de 4 a 5 em caixas de camundongos padrão (28cm x 17cm x 12cm) com temperatura ambiente controlada ($25\pm 1^\circ\text{C}$) e comida/água *ad libitum*. As condições de luz controladas foram: ciclo claro-escuro 12 h/12 h; *Zeitgeber Time* (ZT) 0 corresponde às 07:00 h); no período de luz (07:00 h às 19:00 h) 200/300 lux; e no período escuro (19:00h às 07:00 h): filtro vermelho Kodak 1A, 0,5-1 lux.

Inicialmente, os animais com 8-9 semanas de idade passaram por um tempo de habituação, no qual o ciclo estral das fêmeas foi avaliado durante 10 dias. Com 11 semanas de idade, os animais foram divididos em dois grupos e foram testados de acordo com o protocolo para o teste de memória de reconhecimento de objetos (MRO) sob condições controles (eutireoideos) nos ZTs 2 a 4 e ZTs 14 a 16. Após isso, os animais foram redivididos nos grupos Controle (C – Eutireoideos) ou Hipotireoideo (H). Os animais do grupo C tiveram acesso à água *ad libitum* enquanto o grupo H foi submetido à indução química do hipotireoidismo por meio da administração de metimazol (0,01%) e perclorato de sódio (0,1%) (inibidores da atividade tireoidiana) dissolvido na água de bebida (MARSILI et al., 2010; YI et al., 2014). Após 24 dias de indução do hipotireoidismo, os animais realizaram novamente o teste MRO nos seus respectivos ZTs. Ao atingirem 17 semanas de idade, os animais foram anestesiados com isoflurano e eutanasiados a cada 4 h por 24 h. O cérebro, a adenohipófise, o coração e o sangue do tronco foram coletados e armazenados para análises posteriores. O peso dos animais, o consumo de ração e água foram avaliados ao longo do experimento.

Os protocolos experimentais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob o protocolo CEUA: 104/2022 (ANEXO 1).

4.2 Monitoramento do ciclo estral por esfregaço vaginal

No presente estudo, as fêmeas passaram por um período de adaptação à técnica do esfregaço vaginal por 10 dias antes do início dos experimentos comportamentais para minimizar o estresse causado pela coleta do lavado vaginal no dia do teste comportamental. O esfregaço vaginal é uma técnica utilizada para avaliar o ciclo estral de modo indireto, através da análise da citologia vaginal (CORA et al., 2015). O proestro é caracterizado pelo predomínio de células nucleadas e pode durar 12 h. Em seguida, a fase estral é caracterizada por células epiteliais queratinizadas anucleadas em forma de folha seca, que predominam na lavagem. No metaestro, observa-se a presença de todos os tipos celulares: as células epiteliais nucleadas ocorrem em menor número, enquanto as células queratinizadas e os neutrófilos predominam. Finalmente, no diestro, os neutrófilos estão amplamente presentes e é possível observar um corrimento vaginal mucoso. Ao final do diestro, quando os níveis de estradiol voltam a subir, algumas células epiteliais nucleadas são observadas, mas os neutrófilos ainda são predominantes (CALIGIONI, 2010; CORA et al., 2015).

A técnica de esfregaço vaginal foi realizada diariamente no intervalo dos ZTs 3-11. As fêmeas foram contidas manualmente na grade de sua gaiola e suavemente imobilizadas. Em seguida, com o auxílio de um conta-gotas contendo 10 µL de soro fisiológico, a ponta aproximou-se suavemente da abertura do trato vaginal sem penetração. O lavado obtido, contendo as células epiteliais da mucosa vaginal, foi colocado em lâmina e analisado a fresco em microscópio óptico AXIO IMAGER M2® em objetiva de 100X.

Os dados de ciclo estral coletados durante os dez dias que antecederam a experimentação em camundongos fêmeas do grupo C e H estão ilustrados na Figura 4.

	Dias antes da tarefa de memória (MRO)										MRO		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Habituação	Treino	Teste
C	e	d	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e
	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e
	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e
	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e
	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e
	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e
	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e
	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e
	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e
	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e
	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e
	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e
	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e
	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e
e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	
H	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e
	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e
	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e
	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e
	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e
	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e
	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e
	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e
	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e
	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e
	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e
	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e
	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e
	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e
e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	

Figura 4. Avaliação do ciclo estral de fêmeas controle (C) e hipotireoideas (H). Na figura estão representados os resultados da avaliação do ciclo estral durante os dez dias de indução do hipotireoidismo que antecederam ao teste de MRO e nos dias correspondentes ao teste de MRO. Os dias correspondentes ao estro (e), diestro (d) e proestro (p) estão representados pelas cores vermelho, azul e amarelo, respectivamente.

4.3 Tarefa de Memória de Reconhecimento de novo Objeto (MRO)

A tarefa de Memória de Reconhecimento de novo Objeto (MRO) foi usada para avaliar a memória de longo prazo dos animais. O protocolo seguido foi de acordo com o publicado por Gresack e Frick (2006) também utilizado por Pereira e colaboradores (PEREIRA et al., 2014). O teste consistiu em três fases: habituação (1º dia), treinamento (2º dia) e teste (3º dia). Cada animal realizou a tarefa individualmente em um aparato que consistia em: (1) uma caixa preta medindo 50 cm x 30 cm x 16 cm, e (2) objetos com diversas formas e tamanhos, em que existiam pares, para serem utilizados no dia do treino e no dia do teste, existia objetos diferentes para serem colocados representando o objeto novo. Todo o aparato foi higienizado com álcool 70% entre os treinos e testes dos diferentes animais.

Inicialmente, um grupo foi avaliado na fase de repouso (ZTs 2-4) e a outro na fase de atividade (ZTs 14-16). Habituação: os animais foram habituados por 5 min na caixa preta vazia no primeiro dia do protocolo. Treinamento: Após 24 h da habituação, no segundo dia, os animais foram posicionados novamente na caixa preta por 1 min para

a habituação, após isso, foi colocado dois objetos iguais na caixa igualmente espaçados da parede e do centro e denominados objeto à direita (Right – R) ou à esquerda (Left – L). Os animais foram mantidos na caixa por no máximo 15 min para explorar os objetos até que a soma do tempo de exploração correspondesse a 30 s. Teste: os animais foram colocados novamente na caixa no terceiro dia da mesma forma como realizado no segundo dia, nos seus respectivos ZTs, na presença de um objeto familiar (F) previamente utilizado e de um novo (N) objeto em substituição a um dos objetos usados anteriormente. O animal foi mantido na caixa para explorar ambos os objetos até que a soma da exploração dos dois objetos atingisse 30 s. O lado em que o novo objeto foi colocado foi alternado aleatoriamente entre os animais nos diferentes ZTs. Os mesmos procedimentos foram repetidos e avaliados após a indução química do hipotireoidismo, na presença de novos objetos. A Figura 4 ilustra o protocolo experimental acima descrito.



Figura 5. Protocolo experimental utilizado para avaliação da MRO em animais Controle e Hipotireoideos (Ilustração feita por Ayla Secio-Silva).

O tempo de exploração dos objetos e o tempo total das sessões de treinamento e teste foram mensurados com o auxílio de cronômetros manuais. A exploração de objetos foi padronizada como o posicionamento da cabeça do sujeito em direção ao objeto, num raio de aproximadamente 2 cm. Não foi contabilizado como exploração caso o animal se apoiasse com as patas dianteiras no objeto e as patas traseiras no chão da caixa.

Para análise da memória, foi comparada a média de cada grupo para o tempo de exploração em cada objeto (R ou L; N ou F) com a chance de investigação dos itens caso ambos fossem desconhecidos, ou seja, 50% do tempo total de exploração (15 s). Consideramos que o grupo apresentou MRO funcional quando a média de investigação do objeto familiar (F) foi significativamente menor que 15s e a do objeto novo (N) foi significativamente maior que 15s (GRESACK; FRICK, 2006; PEREIRA et al., 2014).

4.4 Avaliação da expressão gênica por Transcrição Reversa seguida de PCR em tempo real (RT-qPCR)

4.4.1 *Extração do RNA total das amostras de adenohipófise e hipocampo dorsal*

A expressão de RNAm de *Tshb* da hipófise anterior e o perfil diário de expressão dos componentes do relógio circadiano do hipocampo dorsal (*Bmal1*, *Per2*, *Nr1d1* e *Cry1*) foram avaliados por RT-qPCR. Os cérebros e as adenohipófises foram mantidos congelados a -80 C até o momento do processamento. A porção do hipocampo dorsal foi coletada pela técnica de *punch* de acordo com as coordenadas descritas no Paxinos (2001) (Bregma -0,94mm a Bregma -2,18m). O RNA total foi obtido de acordo com o protocolo de extração de reagente TRIZOL (Lifetechnologies). A concentração total de RNA foi estimada por espectrofotometria, considerando a absorbância de 260 nm para o cálculo da concentração de RNA, tendo como referência o valor de 40 µg/ml para cada unidade de densitometria óptica. A integridade do RNA foi confirmada pela visualização das bandas de RNA ribossômico 28S e 18S no transiluminador após eletroforese com 1 µg de RNA total em gel de agarose (1%), corado com *SYBR™ Safe DNA Gel Stain* (ThermoScientific).

4.4.2 *Ensaio de Transcrição Reversa (RT) e Reação em Cadeia da Polimerase (qPCR)*

Quinhentos nanogramas (500 ng) de RNA total obtido das amostras de adenohipófise e da região correspondente ao hipocampo dorsal (hemisfério esquerdo) foram utilizadas para o ensaio de Transcrição Reversa, seguindo o protocolo do kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription com inibidor de RNase (ThermoFisher Scientific).

A amplificação e a semiquantificação dos transcritos alvo foram realizadas por PCR em tempo real usando o reagente PowerUP™ SYBR™ Green Master Mix (ThermoFisher Scientific) e com *primers* específicos para as sequências estudadas (Tabela 1). A especificidade da reação com SYBR Green foi confirmada pela análise da curva de dissociação baseada na temperatura de dissociação – “ponto de fusão”, que consiste em aquecer lentamente as amostras de 58° C (emparelhamento/alongamento) a 95° C, e que deve resultar em apenas uma ampliação (pico) por amostra.

Tabela 1. Sequências de *primers* utilizados para o ensaio de PCR.

Gene/GenBank#	Primers	Sequências (5'- 3')	Tamanho do fragmento (pb)
<i>Tshb</i> NM_009432.2	Forward	GGCAAAC TGTTCCTCCCAA	198
	Reverse	GTTGGTTCTGACAGCCTCGT	
<i>Bmal1 (Arntl1)</i> NM_007489.5	Forward	GATGACGAACTGAAACACC	76
	Reverse	TCTTCCCTCGGTCACATCCT	
<i>Per2</i> NM_011066.3	Forward	GCTGCAGTAGTGAGCAGTCT	261
	Reverse	AGGTAATGCCCTCAACCTGC	
<i>Nr1d1</i> NM_145434.4	Forward	AGGTGACCCTGCTTAAGGCTG	82
	Reverse	ACTGTCTGGTCCTTCACGTTGA	
<i>Cry1</i> NM_007771.3	Forward	TTCGCCGGCTCTTCCAA	75
	Reverse	ATTGGCATCAAGATCCTCAAGA	
<i>Gapdh</i> NM_001289726.2	Forward	GGCAAATTCAACGGCACAGT	70
	Reverse	AGATGGTGATGGGCTTCCC	
<i>Rn18s</i> NR_003278.3	Forward	GCGAATGGCTCATTAAATCAGTTA	150
	Reverse	TGGTTTTGATCTGATAAATGCACG	

4.4.3 Validação da eficiência do ensaio de qPCR e normalização

A eficiência da reação de PCR foi calculada através da curva de amplificação dos produtos de RT (cDNA) diluídos em água livre de RNase com o intuito de assegurar que o qPCR fosse efetuado com os melhores valores de eficiência e *slope* paracada gene estudado (DUSSAULT; POULIOT, 2006). Para tal, foram testadas diluições seriadas de 25 a 0,025 ng/uL de cDNA. Cada reação foi realizada em duplicata e a curva de regressão linear obtida pela média dos valores de *Threshold Cycle* (CT) para cada diluição seriada plotada como fator dependente (eixo y) em função do logaritmo da diluição do produto de RT como fator independente (eixo x). A eficiência (E) foi calculada usando os valores de *slope* obtidos na regressão linear para cada gene, por meio da equação abaixo:

$$E = [10^{(-1/slope)}] - 1$$

Considerou-se como valores ótimos de inclinação da curva os valores próximos a -3,322 e o intervalo de 0,9 a 1,1 para eficiência (DUSSAULT; POULIOT, 2006). Os

valores obtidos com as curvas de eficiência para cada primer no hipocampo dorsal estão descritos na tabela 2. A escala dinâmica linear foi determinada pela curva padrão e um coeficiente de correlação ($R^2 \geq 0,98$) foi considerado como satisfatório, conforme previamente reportado (NOLAN; HANDS; BUSTIN, 2006). A eficiência das reações de PCR para *Rn18s* e mRNA de *Tshb* nas amostras de adenohipófise seguiram o protocolo previamente publicado (LOSACCO et al., 2018).

Tabela 2. Valores de inclinação da curva (*slope*), eficiência, coeficiente de correlação (R^2) e concentração utilizada no ensaio de PCR em amostras de hipocampo dorsal.

Gene	Inclinação da		R^2	cDNA	
	reta (<i>Slope</i>)	Eficiência		(ng/uL)	Primer (μ M)
<i>Per2</i>	-3,17	1,06	0,96	0,416	0,83
<i>Bmal1</i>	-3,07	1,12	0,99	0,416	0,83
<i>Nr1d1</i>	-3,42	0,96	0,99	0,416	0,83
<i>Cry1</i>	-3,89	0,81	0,93	0,416	0,83
<i>Gapdh</i>	-3,47	0,94	0,99	0,416	0,83

A expressão gênica foi quantificada usando o cálculo Δ Ct (“*cycle threshold*”) conforme descrito anteriormente (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; PFAFFL, 2001) e os resultados foram expressos em unidades arbitrárias relativas à variação de expressão dos transcritos de interesse normalizados com os valores obtidos para controles internos. Os controles internos utilizados foram *Rn18s* para as amostras de adenohipófise e o RNAm de *Gapdh* para as amostras de hipocampo dorsal.

4.5 Análise estatística

Todos os resultados obtidos foram testados para normalidade utilizando o teste Shapiro-Wilk e estão apresentados em valores de média \pm erro padrão. Testes não paramétricos foram apropriadamente utilizados quando os dados não apresentaram distribuição normal. O teste “*One sample test*” foi realizado para avaliar a perfil exploratório dos animais, utilizando o valor de 15 s como padrão para 50% de chance para a realização do teste pelos animais. O teste de Análise de Variância (ANOVA) de duas ou três vias foi aplicado, considerando as variáveis tempo (ZT), tratamento (H) e sexo, de acordo com a comparação desejada, seguido do pós-teste de *Tukey* ou *Bonferroni*. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$. O software *GraphPad Prism 9.4.1* (San Diego, CA, USA) foi utilizado para todas as análises estatísticas.

5 Resultados

5.1 Camundongos machos e fêmeas eutireoideos realizam o teste de MRO independente da fase do dia

Os resultados obtidos nos testes de MRO em machos e fêmeas eutireoideos nos dois horários do dia (ZTs 2-4 – indicado pela barra horizontal branca; ZTs 14-16- indicado pela barra horizontal preta e fundo cinza) estão demonstrados na Figura 6.

Independente, do horário do dia os animais controle (eutireoideos) foram capazes de realizar a tarefa.

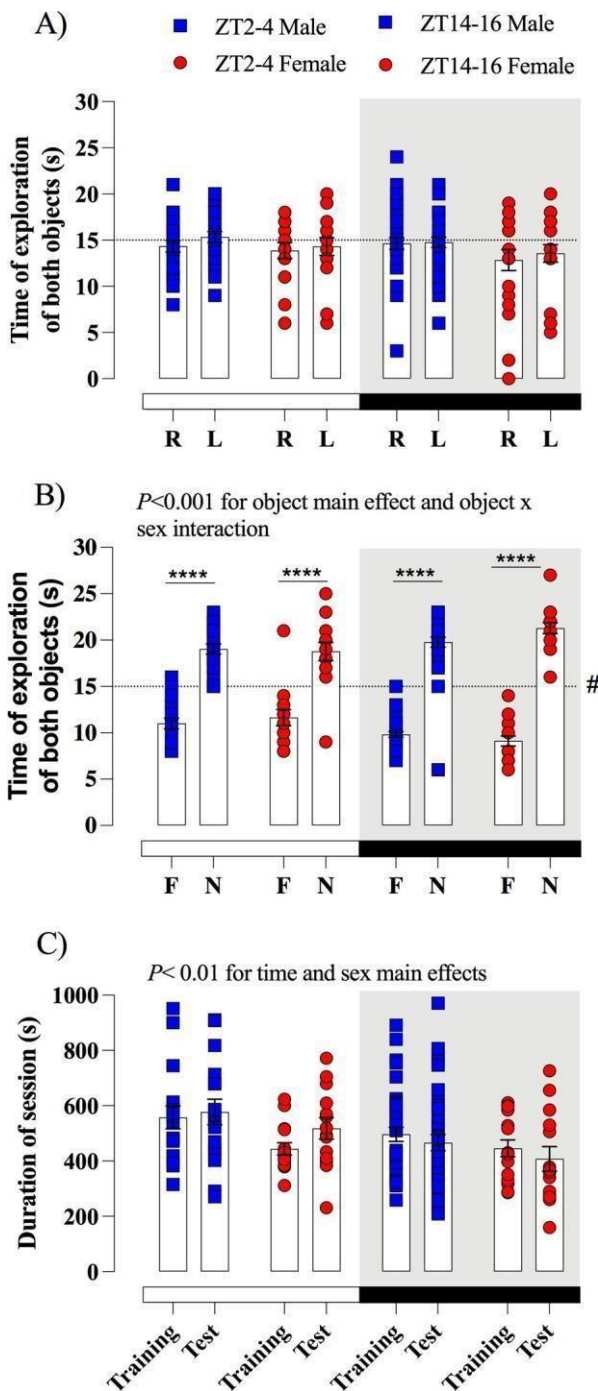


Figura 6. Avaliação da tarefa de MRO em machos e fêmeas eutireoideos durante as fases de repouso e atividade. **A)** Dia 2 - Treino: tempo de exploração dos objetos posicionados à direita (R, *right*) e esquerda (L, *left*) da caixa. **B)** Dia 3 - Teste: tempo de exploração dos objetos novo (N) e familiar (F). **C)** Duração das sessões de treino e do teste. Os machos estão representados pelos quadrados azuis e as fêmeas pelos círculos vermelhos. O período correspondente aos ZTs 2-4 está indicado pela barra horizontal branca; e o período dos ZTs 14-16- está indicado pela barra horizontal preta e fundo cinza. Os valores são representados como média \pm SEM. Os resultados obtidos na ANOVA de três vias (*Three-way ANOVA*) estão descritos acima do respectivo gráfico, sendo as variáveis Objeto, Sexo e ZT.

**** $P < 0,001$ na comparação F vs N no pós-teste Tukey. # $P < 0,05$ para todos os grupos no “One sample Test” com o valor hipotético de 15s (linha pontilhada). N = 24-37 para camundongos machos e N = 16-22 para as fêmeas.

Os animais nas condições controle (eutireoideos), independente do sexo ou horário do dia, são capazes de alcançar o somatório de 30 s no treino com os objetos idênticos (R e L) (Figura 6A). O desempenho dos animais eutireoideos no treino foi avaliado pela porcentagem de camundongos machos e fêmeas que completaram o treino nas diferentes fases do dia (Tabela 3).

Tabela 3. Desempenho dos camundongos machos e fêmeas eutireoideos durante o treino da tarefa MRO.

ZTs	Sexo	Grupo	N total	N 30s	%
2-4	Macho	C	16	14	87,5
	Fêmea	C	24	22	91,6
14-16	Macho	C	25	24	96
	Fêmea	C	22	17	77,2

Os resultados obtidos no terceiro dia da tarefa MRO demonstraram que, independentemente do sexo e do horário do dia, machos e fêmeas nas condições controle reconheceram o objeto familiar e apresentaram maior tempo de exploração no objeto novo, evidenciado pelo “*One sample Test*” com o valor hipotético de 15s (Figura 6B). O ANOVA de três vias indicou alterações significativas para a variável Objeto e uma interação entre as variáveis Objeto e Sexo. Além disso, houve diferenças entre os objetos N e F evidenciado pelo pós teste de *Tukey*, nas duas fases do dia e em ambos os sexos ($P < 0,001$). Assim, machos e fêmeas eutireoideos podem aprender e memorizar independentemente da fase do dia.

A Figura 6C apresenta o tempo de duração dos animais no treino e no teste com $P < 0,01$ para as variáveis de sexo e ZT, embora não ocorreram diferenças significativas no pós teste pareado de *Tukey*. A partir disso, os resultados sugerem que tanto machos como fêmeas nas condições controle, ou eutireoideos, apresentam o mesmo desempenho tanto no treino como no teste da tarefa.

5.2 Eficácia do tratamento para indução do hipotireoidismo

Após 24 dias da indução do hipotireoidismo, os animais foram novamente testados durante os ZTs 2-4 e 14-16 usando o mesmo teste MRO e os resultados serão apresentados adiante. Ao final do protocolo experimental, os animais foram eutanasiados e os parâmetros de peso corporal, razão entre o peso do coração e o comprimento da tíbia e o conteúdo de RNAm do *Tshb* adenohipofisário foram utilizados

para validar a eficácia do tratamento e indução do hipotireoidismo (Tabela 4).

Tabela 4. Eficácia do tratamento para indução de hipotireoidismo. Os parâmetros utilizados foram a expressão do RNAm de *Tshb* adenohipofisário, o peso corporal (g) e a razão entre peso do coração (g) e comprimento da tíbia de camundongos machos e fêmeas divididos em controles (C) e hipotireoideos (H) nos ZTs 2-4 e 14-16.

ZTs	Sexo	Grupo	RNAm de <i>Tshb</i> ^a	Peso corporal (g)	Peso do coração (g) / comprimento de Tíbia (cm) ^a
2-4	Macho	C	2.48 ± 0.77	25.68 ± 0.54	79.10 ± 3.90
		H	34.80 ± 6.78***	21.29 ± 0.75**	50.95 ± 2.09**
	Fêmea	C	0.15 ± 0.06	19.63 ± 0.27	56.22 ± 1.28 [#]
		H	5.64 ± 3.13*	17.50 ± 0.45	42.55 ± 1.46*
14-16	Macho	C	1.86 ± 0.46	27.46 ± 0.42	70.48 ± 2.34
		H	22.80 ± 3.49***	21.30 ± 0.42**	48.97 ± 3.88**
	Fêmea	C	0.58 ± 0.56	19.69 ± 0.23	59.63 ± 2.38
		H	6.09 ± 2.90 [§]	17.93 ± 0.38	43.75 ± 1.74*

Os valores estão expressos como média ± SEM (n = 7-12 / grupo / ZT). ^aValores multiplicados por 1000. * P < 0,01; ** P < 0,001 e *** P < 0,0001 vs respectivo grupo controle; # P < 0,0001 vs C-Macho (ZT2-4); § P = 0,051 vs respectivo grupo de controle.

Animais machos nas condições de hipotireoidismo apresentaram redução no peso corporal comparado aos respectivos controles, enquanto que não foram observadas alterações significativas no peso das camundongos fêmeas hipotireoideas. A eficácia do tratamento para indução do hipotireoidismo foi comprovada pela redução na razão peso do coração / comprimento da tíbia e principalmente pelo aumento no conteúdo de RNAm do *Tshb*, tanto em machos quanto em fêmeas, tratados com metimazol e perclorato, comparados ao grupo controle. Tais alterações são observadas independentemente da fase do dia (ZT) avaliada.

5.3 O hipotireoidismo afeta diferencialmente a MRO em camundongos machos e fêmeas de acordo com a fase do dia

Os resultados obtidos no treino e no teste de MRO em camundongos machos e fêmeas nas condições controle e hipotireoideos estão representados na Figura 7. O

desempenho dos animais eutireoideos e hipotireoideos durante o treino está descrito na Tabela 5.

De acordo com o presente resultado, durante a fase de repouso (ZTs 2-4) os animais hipotireoideos não foram capazes de realizar o somatório de 30 s no segundo dia equivalente ao treino, apresentando um tempo médio de exploração menor que 15s (Figura 7A).

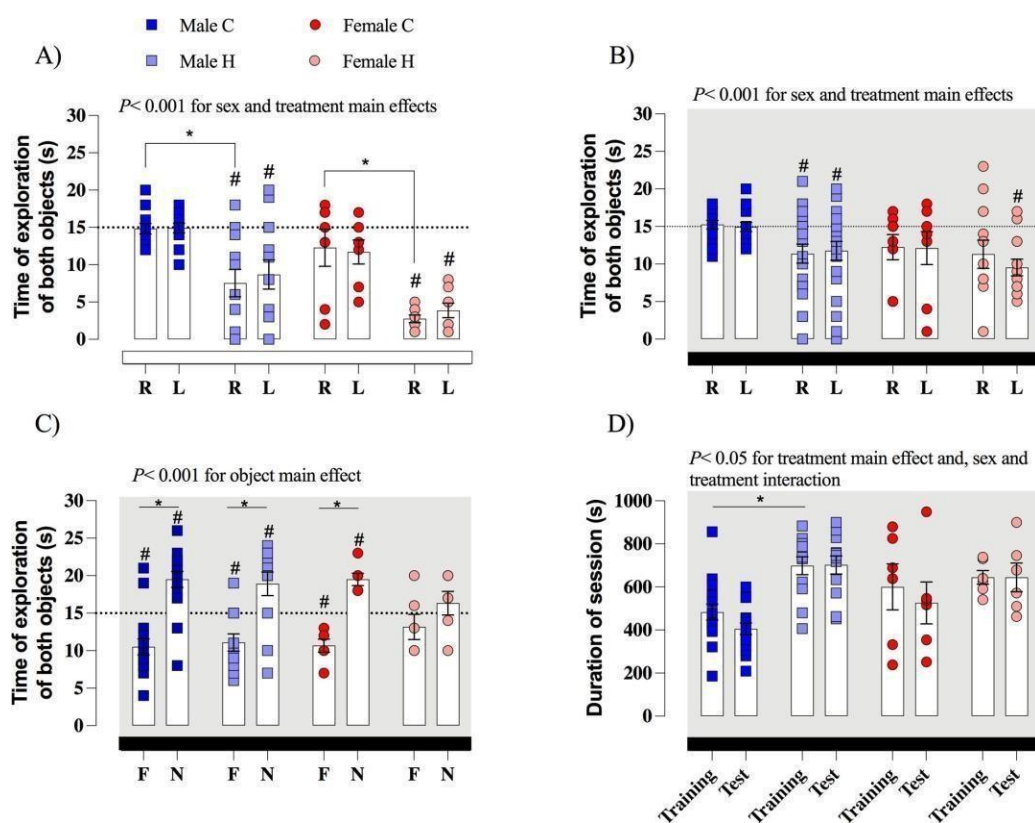


Figura 7. Avaliação da tarefa de MRO em machos e fêmeas, eutireoideos ou hipotireoideos, durante as fases de repouso e atividade. **A e B)** Dia 2 - Treino: tempo de exploração dos objetos posicionados à direita (R, *right*) e esquerda (L, *left*) da caixa nos ZTs 2-4 (A) ou 14-16 (B). **C)** Dia 3 - Teste: tempo de exploração dos objetos novo (N) e familiar (F) nos ZTs 14-16. **D)** Duração das sessões no dia 2 e no dia 3 nos ZTs 14-16. Os machos controle e hipotireoideos estão representados pelos quadrados azuis escuros e claros, respectivamente. As fêmeas controle e hipotireoideas estão representadas pelos círculos vermelhos e rosa, respectivamente. Cada quadrado/círculo representa um animal. O período correspondente aos ZTs 2-4 está indicado pela barra horizontal branca; e o período dos ZTs 14-16 está indicado pela barra horizontal preta e fundo cinza. Os valores são representados como média \pm SEM. Os resultados obtidos na ANOVA de três vias (*Three-way ANOVA*) estão descritos acima do respectivo gráfico, sendo as variáveis Objeto, Sexo e Tratamento. # $P < 0,05$ no “One sample Test” com o valor hipotético de 15s (linha pontilhada).

* $P < 0,001$ no pós-teste Tukey. Os valores de N amostral estão descritos na Tabela 5 para cada grupo / sexo / ZT.

Conforme apresentado na Tabela 5, apenas 1 camundongo macho hipotireoideo alcançou os 30s de exploração no treino de MRO, enquanto que este feito não foi alcançado por nenhuma fêmea com hipotireoidismo.

Tabela 5. Desempenho dos camundongos machos e fêmeas nas condições controle ou hipotireoideas durante o treino da tarefa MRO.

ZTs	Sexo	Grupo	N total	N 30s	%
2-4	Macho	C	12	12	100
		H	12	1	8,3
	Fêmea	C	8	6	75
		H	8	0	0
14-16	Macho	C	12	11	91,6
		H	12	6	50
	Fêmea	C	10	6	60
		H	13	6	46,1

Portanto, machos e fêmeas com hipotireoidismo não foram capazes de realizar o treino no segundo dia da tarefa MRO quando avaliados durante a fase de repouso (ZTs 2-4). Os animais eutireoideos repetiram o padrão normal previamente observado (Tabela 3), de modo que 100 % dos machos eutireoideos e 75 % das fêmeas nas mesmas condições concluíram os 30 s de exploração no dia do treino (Tabela 5).

No entanto, quando os animais foram avaliados durante a fase ativa (ZTs 14- 16), houve um aumento no número de animais, tanto machos (50 %) quanto fêmeas (46,1 %) que foram capazes de realizar o treino adequadamente mesmo numa condição de hipotireoidismo (Tabela 5 e Figura 7B), embora tenha sido observada uma diferença significativa no *One Sample Test*, tendo 15 s como valor hipotético, para ambos objetos (R e L) no grupo de animais machos com hipotireoidismo e no tempo de exploração do objeto à esquerda (L) nas fêmeas com hipotireoidismo.

No terceiro dia correspondente ao teste da tarefa de MRO (Figura 7C), os resultados observados demonstram que os camundongos machos, sejam eles pertencentes ao grupo C ou grupo H, são capazes de reconhecer o objeto familiar (F) [$P < 0,05$ no “*One sample Test*” com o valor hipotético de 15s (linha pontilhada)], embora uma duração maior da sessão foi necessária para a conclusão do teste pelos machos com hipotireoidismo (Figura 7D). As fêmeas dos grupos C e H foram capazes de realizar a tarefa atingindo o tempo de exploração de 30 s necessário (Tabela 5), porém, as fêmeas em condições controle (eutireoideas) reconheceram o objeto, enquanto que as fêmeas hipotireoideas não foram capazes de reconhecer o objeto familiar, explorando igualmente os objetos familiar (F) e novo (N) (Figura 7C).

5.4 O perfil diário de oscilação da expressão dos genes do relógio do

*hipocampo apresenta alterações de acordo com as variáveis testadas
(sexo, tempo e tratamento)*

A expressão temporal dos componentes do relógio central do hipocampo dorsal foi avaliada em amostras obtidas a cada 4h durante 24 h de camundongos machos e fêmeas dos grupos C e H, e os resultados estão demonstrados na Figura 8.

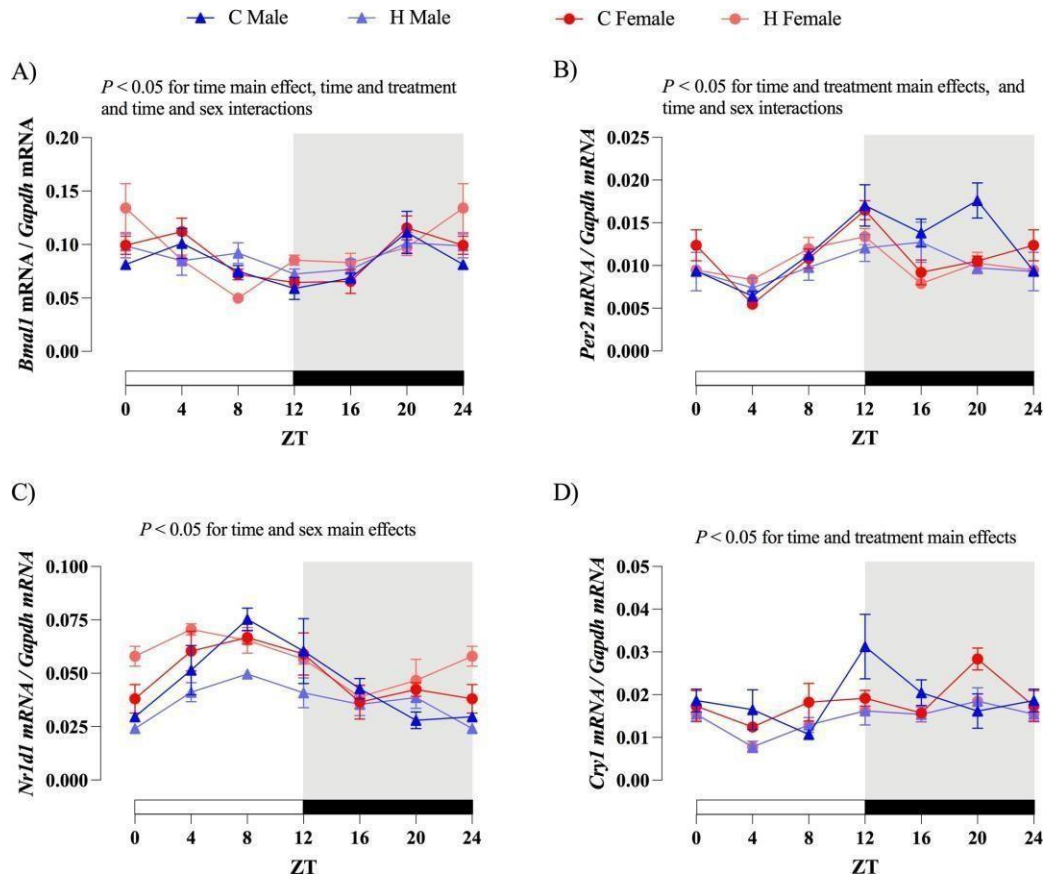


Figura 8. Expressão diária dos componentes do relógio central no hipocampo dorsal em camundongos machos e fêmeas dos grupos controle (C) e Hipotireoideo (H). Os resultados foram normalizados pela expressão do RNAm *Gapdh* e expressos como média \pm SEM. Os machos controle e hipotireoideos estão representados pelos triângulos azuis escuros e claros, respectivamente. As fêmeas controle e hipotireoideas estão representadas pelos círculos vermelhos e rosa, respectivamente. O período correspondente aos ZTs 2-4 está indicado pela barra horizontal branca; e o período dos ZTs 14-16 está indicado pela barra horizontal preta e fundo cinza. Os resultados obtidos na ANOVA de três vias (*Three-way ANOVA*) estão descritos acima de cada gráfico, sendo as variáveis Tempo, Sexo e Tratamento: $P < 0,05$ para Tempo e interações Tempo-Tratamento e Tempo-Sexo para *Bmal1* (A); Tempo e Tratamento e interações Tempo-Sexo para *Per2* (B); Tempo e Sexo para *Nr1d1* (C) e; Tempo e Tratamento para *Cry1* (D). ZT: Zeitgeber time; n=2-4 por grupo/ZT.

De acordo com os resultados obtidos na ANOVA de três vias, sendo as variáveis correspondentes a Tempo, Sexo e Tratamento, a variável Tempo é um fator significativo na expressão de todos os componentes centrais do relógio circadiano avaliados (*Bmal1*, *Per2*, *Nr1d1* e *Cry1*), como esperado. O tratamento (hipotireoidismo) é uma importante

variável para a expressão dos transcritos que codificam o *Per2* (Figura 8B) e *Cry1* (Figura 8D), e a interação Tempo-Tratamento foi observadas na expressão de *Bmall* (Figura 8A). O fator sexo foi importante para a oscilação diária na expressão gênica de *Nr1d1* (Figura 8C), e interações entre as variáveis Tempo-Sexo foram observadas na expressão de *Bmall* e *Per2*.

6 Discussão

O presente trabalho avaliou os efeitos do hipotireoidismo na MRO de machos e fêmeas em diferentes fases do dia (repouso ou atividade). De acordo com os resultados:

(1) A MRO é efetiva, independentemente da fase do dia e do sexo sob condições controle (eutireoideos), ou seja, machos e fêmeas apresentam o mesmo desempenho nas tarefas e, conseqüentemente, aprendem e são capazes de memorizar quando avaliados tanto na fase de repouso como na fase de atividade; (2) Animais com hipotireoidismo não são capazes de realizar a tarefa de MRO durante a fase de repouso, pois não atingem o tempo mínimo de 30 s no 2º dia de treinamento, apresentando então prejuízos no aprendizado; (3) Durante a fase de atividade do ciclo circadiano, o hipotireoidismo afeta diferencialmente a memória de camundongos machos e fêmeas. Camundongos fêmeas não distinguem os objetos familiar e novo, demonstrando um evidente prejuízo no aprendizado e/ou na memória, ao passo que os machos distinguem os objetos, porém, apresentam lentidão para concluir a tarefa; (4) Existe uma interação entre os fatores tempo, tratamento e sexo modulando o padrão diário de expressão dos genes do relógio do hipocampo dorsal. Assim, o principal achado do presente trabalho é que o hipotireoidismo afeta diferencialmente a memória de roedores, de maneira dependente do sexo e da fase do ciclo circadiano que o animal se encontra sugerindo os HTs desempenham um papel importante na sinalização e sincronização do relógio biológico de áreas hipocampais relacionadas a processos mnemônicos.

A memória é uma importante função cognitiva e comportamental essencial para a sobrevivência das diversas espécies. De acordo com estudos anteriores, a formação e evocação da memória é influenciada pela oscilação circadiana (GERSTNER & YIN, 2010). De acordo com SHIMUZI et al. (2016), há uma melhora no desempenho da MRO quando os animais são treinados e testados na fase de atividade (ZT16). Este trabalho foi inicialmente utilizado como referência para a escolha dos ZTs no qual as tarefas de MRO seriam avaliadas no nosso estudo, porém, nossos resultados não apontaram para alterações temporais significativas na MRO de camundongos machos e

fêmeas em condições controle. Vale ressaltar que, qualquer diferença entre os protocolos pode interferir no resultado de testes comportamentais, como, o tamanho da caixa, o posicionamento, os objetos como também a temperatura. É importante mencionar que no estudo desenvolvido por Shimuzi *et al.* (2016), os animais foram mantidos isolados antes de executarem a tarefa de MRO e sabe-se que o isolamento social altera o padrão diário dos ritmos circadianos, prejudicando a formação da memória em roedores (FERNANDES *et al.* 2021, ALMEIDA-SANTOS *et al.*, 2019; MCLEAN *et al.*, 2010; BIANCHI *et al.*, 2006). Tal fato poderia explicar, ao menos em parte, as disparidades acima mencionadas, uma vez que, nos nossos experimentos os camundongos foram mantidos em grupos de 4-5 por caixa.

Os HTs são essenciais para o desenvolvimento do sistema nervoso central, bem como para a modulação de diversas funções fisiológicas, como proliferação e maturação neuronal (PREZIOSO *et al.*, 2018). Além disso, o hipocampo expressa as isoformas alfa (THRA) e beta (THRB) dos receptores tireoidianos (ESPINA & BAGAMASBAD, 2022; GUADAÑO-FERRAZ *et al.*, 1997). Existem evidências de que o hipotireoidismo prejudica o aprendizado e a memória em modelo animais como também em seres humanos (CHALAAL *et al.*, 2019; ALKADHI & ALZOUBI *et al.*, 2020; BURMEISTER *et al.*, 2001; SAMUELS *et al.*, 2007; CORREIA *et al.*, 2017; GERGES *et al.*, 2004) Contudo, a maioria dos estudos foi desenvolvida exclusivamente em machos e os experimentos realizados numa faixa de horário do dia, a qual, na maioria das vezes, corresponde a fase de repouso do animal com hábitos noturnos.

De acordo com os nossos resultados, o hipotireoidismo prejudica o aprendizado e desempenho na tarefa de MRO quando os animais hipotireoideos são treinados durante a fase de repouso (ZTs 2-4), de modo que tanto machos quanto fêmeas não são capazes de realizar o teste no segundo dia, ou seja, na fase de aquisição do aprendizado. É importante ressaltar que a MRO é uma tarefa de memória na qual o animal precisa ter vontade própria para realizá-la, sem o uso de recompensas como no condicionamento clássico. Uma possível explicação para esse prejuízo no aprendizado dos animais hipotireoideos é a letargia e fadiga, decorrentes da redução do metabolismo basal, sintomas clássicos do hipotireoidismo (WALCZAK & SIEMINSKA, 2021). Essas características podem ter levado à falta de motivação dos animais para realizar a tarefa. Em concordância, Chalaal *et al.* (2019) encontraram lentidão no aprendizado de animais hipotireoideos quando treinados e testados na fase de repouso. Portanto, o

hipotireoidismo resulta num prejuízo no treino da tarefa de MRO, associado a falta de motivação, fadiga e lentidão, que parecem ser acentuadas na fase de repouso dos roedores, de maneira independente do sexo.

Para avaliar se os prejuízos decorrentes do hipotireoidismo apresentavam um padrão temporal, a tarefa de MRO foi realizada durante a fase de atividade dos camundongos, mais precisamente durante os ZTs 14-16. Interessantemente, a depleção de HTs decorrentes do hipotireoidismo evidenciam um dimorfismo sexual no desempenho da tarefa de MRO. Os machos hipotireoideos realizam a tarefa e eficazmente reconhecem os objetos no dia do teste, contudo, eles apresentam uma lentidão e necessitam de mais tempo para concluir a tarefa. Por outro lado, fêmeas com hipotireoidismo treinadas e testadas durante a fase de atividade, exploram os objetos, concluindo a somatória de 30 s de exploração dentro do período normal do teste, porém, não são capazes de reconhecer, apresentando assim um comprometimento da memória.

Tais achados corroboram as evidências nas quais foi sugerido que o hipotireoidismo induz um prejuízo no aprendizado e na memória. Acredita-se que esse dano induzido pelo hipotireoidismo na memória está associado a redução na expressão dos componentes centrais das duas principais vias de sinalização celular envolvidas na plasticidade sináptica do hipocampo e na formação da memória: MAPK/ERK-CREB e Ca²⁺/Calmodulina, alterações observadas em condições de depleção de HTs (CHALAAL et al., 2019; ALZOUBI et al., 2009, 2005, 2014; ALKADHI, & ALZOUBI, 2020; BORTOLOTTO et al., 2021). Além disso, Alzoubi et al. (2009, 2005) demonstraram que o hipotireoidismo induz um comprometimento na fase inicial da potencialização de longo prazo (LTP). Já de acordo com o trabalho de Xu et al. (2022) o comprometimento da memória promovidos pelo hipotireoidismo pode estar associado a propriedades eletrofisiológicas anormais dos neurônios colinérgicos *Basal forebrain* (BF), incluindo potencial de membrana de repouso despolarizado e limiar elevado. Somado a isso, níveis reduzidos de ácido gama-aminobutírico (GABA) na região do córtex pré-frontal foram observados em pacientes com hipotireoidismo e, inversamente, aumentos nos níveis de glutamato no giro cingular posterior (LIU et al., 2020). De fato, podemos então sugerir um desequilíbrio entre a atividade excitatória e inibitória em todo o sistema nervoso central sob condições de hipotireoidismo (ZHANG et al., 2015).

Embora estes dados contribuam para o entendimento das alterações moleculares desencadeadas pelo hipotireoidismo nos processos relacionados à memória, eles não explicam a resposta diferenciada entre machos e fêmeas hipotireoideos observada na tarefa de MRO durante a fase de atividade do ciclo circadiano dos camundongos. Nossos achados sugerem que o hipotireoidismo promove maiores prejuízos no sexo feminino quando comparado ao masculino nesta fase de atividade.

Sabe-se que existem uma importante correlação entre hipotireoidismo e infertilidade associada a baixa produção de gametas e síntese/secreção dos hormônios do eixo reprodutivo, tanto em machos quanto em fêmeas (ROMANO et al., 2013, 2018; SILVA et al., 2013) Embora não tenha sido o foco do presente estudo, os dados obtidos com a avaliação do estral em camundongos fêmeas, corroboram uma possível alteração no eixo reprodutor em decorrência do hipotireoidismo, evidenciado pelo predomínio de diestro nas fêmeas tratadas com inibidores de função tireoidiana. Somado a isso, trabalhos anteriores sugerem que o comportamento pode ser influenciado e modulado pelos hormônios sexuais (HAMSON et al., 2011). De fato, o hipocampo é uma estruturachave para a memória e o aprendizado e, adicionalmente, o estradiol (E2) é conhecido por ser um modulador crítico da plasticidade sináptica e dos circuitos responsáveis pela formação da memória (TAXIER et al., 2020). Embora, as flutuações normais dos hormônios ovarianos nas fêmeas ao longo dos ciclos parece não interferir no desempenho da formação da memória de longo prazo na tarefa MRO (SUTCLIFFE et al., 2007), não podemos descartar a hipótese de que as alterações induzidas pelo hipotireoidismo no balanço dos hormônios sexuais poderiam influenciar diferentemente a sensibilidade do hipocampo de camundongos hipotireoideos machos comparados com as fêmeas. Mais estudos são necessários para entender as consequências no hipocampo decorrentes do *cross-talk* entre os eixos tireoidiano e reprodutivo.

De maneira geral, o hipotireoidismo afeta a MRO em camundongos de maneira dependente do sexo e da fase do dia (repouso/atividade). Neste sentido, COST et al. (2012) demonstraram que fêmeas com níveis elevados de hormônios ovarianos, por conta de reposição hormonal, são capazes de superar os machos em tarefas de memória que envolvam o reconhecimento de objetos e localização. No entanto, mais estudos devem ser feitos para entender os mecanismos moleculares por trás desses resultados.

Considerando: a) a importância da ritmicidade circadiana para os processos relacionados à memória e; b) os achados recentes do nosso grupo relacionados ao

impacto das desordens tireoidianas na sincronização da maquinaria do relógio biológico dos tecidos alvos da ação dos HTs (PELICIARI-GARCIA et al., 2018; BARGI-SOUZA et al., 2019), nós hipotetizamos que o desequilíbrio hormonal tireoidiano poderia interferir na sincronização temporal da maquinaria do relógio biológico do hipocampo.

A análise temporal do padrão diário de expressão gênica dos principais componentes do relógio biológico do hipocampo dorsal evidenciou alterações significativas com relação a influência do fator tempo, o que já era esperado considerando a natureza oscilatória circadiana destes genes, porém, os fatores sexo e tratamento também constituem importantes variáveis para a modulação do relógio do hipocampo. Embora, não tenha sido possível avaliar o padrão rítmico destas oscilações, em decorrência do tamanho amostral utilizado neste estudo, tais achados fortemente sugerem que existe uma importante interação entre os fatores tempo, tratamento e sexo na modulação da ritmicidade do hipocampo dorsal. Vale destacar que para avaliar com maior precisão o padrão rítmico circadiano na expressão dos genes do relógio por meio de RT-qPCR seriam necessários cerca de 7 animais por tratamento / ZT / sexo, totalizando cerca de 168 animais, o que inviabilizou esta avaliação com o uso desta metodologia em questão.

Importantemente, vale ressaltar que é a primeira vez que o efeito do hipotireoidismo na memória foi avaliado em diferentes momentos do dia em camundongos machos e fêmeas, e nossos resultados demonstram que há uma influência dependente da fase do dia e do sexo nos prejuízos decorrentes do hipotireoidismo na memória. Assim, somado ao fato do hipotireoidismo ter maior prevalência no sexo feminino e a escassez de pesquisas básicas em modelos animais de ambos sexos, nossos dados reforçam a necessidade atual e crescente de desenvolver estudos tanto em machos quanto em fêmeas, visando um melhor entendimento da complexidade e disparidades observadas entre os sexos, considerando o *milieu* endócrino no qual o organismo se desenvolve desde o período embrionário, fase essa de extrema importância para o desenvolvimento do SNC que por sua vez está intimamente relacionado com a funcionalidade do eixo tireoidiano.

7 Conclusões

1. A MRO é efetiva em machos e fêmeas, independentemente da fase do dia e do sexo sob condições controle (eutireoideos);

2. Animais com hipotireoidismo não são capazes de realizar a tarefa de MRO durante a fase de repouso, apresentando então prejuízos no aprendizado;
3. Durante a fase de atividade do ciclo circadiano, o hipotireoidismo afeta diferencialmente a memória de camundongos machos e fêmeas. Camundongos fêmeas não distinguem os objetos familiar e novo, demonstrando um evidente prejuízo no aprendizado e/ou na memória, ao passo que os machos distinguem objetos, porém, apresentam lentidão para concluir a tarefa;
4. Existe uma interação entre os fatores tempo, tratamento e sexo modulando o padrão diário de expressão dos genes do relógio do hipocampo dorsal.

Assim, concluímos que o hipotireoidismo prejudica diferencialmente a memória de camundongos de acordo com sexo e hora do dia. Mais estudos são necessários para avaliar os mecanismos moleculares por trás dos diferentes efeitos do hipotireoidismo.

Referências bibliográficas

ACCORRONI, Alice; CHIELLINI, Grazia; ORIGLIA, Nicola. Effects of thyroid hormones and their metabolites on learning and memory in normal and pathological conditions. **Current Drug Metabolism**, v. 18, n. 3, p. 225-236, 2017.

ALKADHI, K. A.; ALZOUBI, K. H. Comparison of effects of spatial and non-spatial memory acquisition on the CaMKII pathway during hypothyroidism and nicotine treatment. **Molecular Neurobiology**, v. 57, n. 4, p. 1930-1937, 2020.

ALMEIDA-SANTOS, Ana F. et al. Social isolation impairs the persistence of social recognition memory by disturbing the glutamatergic tonus and the olfactory bulb-dorsal hippocampus coupling. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2019.

ALZOUBI, K. H.; ALKADHI, K. A. Levothyroxin replacement therapy restores hypothyroidism induced impairment of L-LTP induction: critical role of CREB. **Brain research bulletin**, v. 100, p. 29-37, 2014.

ALZOUBI, K. H.; GERGES, N. Z.; ALKADHI, K. A. Levothyroxin restores hypothyroidism-induced impairment of LTP of hippocampal CA1: electrophysiological and molecular studies. **Experimental Neurology**, v. 195, n. 2, p. 330-341, 2005.

ALZOUBI, Karem H. et al. Levothyroxin restores hypothyroidism-induced impairment of hippocampus-dependent learning and memory: Behavioral, electrophysiological, and molecular studies. **Hippocampus**, v. 19, n. 1, p. 66-78, 2009.

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

ARTIS, A. S. et al. Experimental hypothyroidism delays field excitatory post-synaptic potentials and disrupts hippocampal long-term potentiation in the dentate gyrus of hippocampal formation and Y-maze performance in adult rats. **Journal of neuroendocrinology**, v. 24, n. 3, p. 422-433, 2012.

ASVOLD, Bjørn Olav; VATTEN, Lars J.; BJORO, Trine. Changes in the prevalence of hypothyroidism: the HUNT Study in Norway. **Eur J Endocrinol**, v. 169, n. 5, p. 613-620, 2013.

BARGI-SOUZA, Paula; PELICIARI-GARCIA, Rodrigo A.; NUNES, Maria Tereza. Disruption of the pituitary circadian clock induced by hypothyroidism and hyperthyroidism: consequences on daily pituitary hormone expression profiles. **Thyroid**, v. 29, n. 4, p. 502-512, 2019.

BENSEÑOR, Isabela M. et al. Incidence of thyroid diseases: Results from the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil). **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 65, p. 468-478, 2021.

BERNAL, Juan. Thyroid hormone receptors in brain development and function. **Nature clinical practice Endocrinology & metabolism**, v. 3, n. 3, p. 249- 259, 2007.

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

BIANCHI, M. et al. Isolation rearing induces recognition memory deficits accompanied by cytoskeletal alterations in rat hippocampus. **European Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 10, p. 2894-2902, 2006.

BIONDI, Bernadette; COOPER, David S. The clinical significance of subclinical thyroid dysfunction. **Endocrine reviews**, v. 29, n. 1, p. 76-131, 2008.

BIRD, Chris M. The role of the hippocampus in recognition memory. **Cortex**, v. 93, p. 155-165, 2017.

BORTOLOTTI, Vandrezza Cardoso et al. Chrysin restores memory deficit in

hypothyroidism mice: Behavioral, neurochemical and computational approaches involving the neurotrophinergic system. **Journal of Psychiatric Research**, v. 144, p. 225-233, 2021.

BURMEISTER, Lynn A. et al. Hypothyroidism and cognition: preliminary evidence for a specific defect in memory. **Thyroid**, v. 11, n. 12, p. 1177-1185, 2001

CALIGIONI, Claudia S. Assessing reproductive status/stages in mice. **Current protocols in neuroscience**, v. 48, n. 1, p. A. 4I. 1-A. 4I. 8, 2009.

CERMAKIAN, Nicolas; SASSONE-CORSI, Paolo. Multilevel regulation of the circadian clock. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 1, n. 1, p. 59-67, 2000

CHAALAL, Amina et al. Thyroid hormone supplementation restores spatial memory, hippocampal markers of neuroinflammation, plasticity-related signaling molecules, and β -amyloid peptide load in hypothyroid rats. **Molecular neurobiology**, v. 56, n. 1, p. 722-735, 2019.

CHAKER et al. Hypothyroidism. *Lancet*, v. 390, n.10101, p. 1550-1562, 2017.

CHAMAS, Lamis et al. A Fine Regulation of the Hippocampal Thyroid Signalling Protects Hypothyroid Mice against Glial Cell Activation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 19, p. 11938, 2022.

CHEN, Zu-Pei; HETZEL, Basil S. Cretinism revisited. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 24, n. 1, p. 39-50, 2010.

CLARKE, Julia Rosauo et al. Plastic modifications induced by object recognition memory processing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.107, n. 6, p. 2652-2657, 2010.

COOKE, Gillian E. et al. Hippocampal volume is decreased in adults with hypothyroidism. **Thyroid**, v. 24, n. 3, p. 433-440, 2014.

CORA, Michelle C.; KOOISTRA, Linda; TRAVLOS, Greg. Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse: review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears. **Toxicologic pathology**, v. 43, n. 6, p. 776-793, 2015.

CORREIA, Neuman et al. Evidence for a specific defect in hippocampal memory in overt and subclinical hypothyroidism. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 94, n. 10, p. 3789-3797, 2009.

COST, Katherine Tombeau et al. Sex differences in object-in-place memory of adult rats. **Behavioral neuroscience**, v. 126, n. 3, p. 457, 2012.

COX, Kimberly H.; TAKAHASHI, Joseph S. Circadian Clock Genes and the Transcriptional Architecture of the Clock Mechanism. **J Mol Endocrinol**, v. 63(4): p. R93-R102, 2019.

CRUZ-SANCHEZ, Arely et al. Developmental onset distinguishes three types of spontaneous recognition memory in mice. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2020.

DIAS, Glaecir Roseni Mundstock et al. Diphenyl diselenide diet intake improves spatial learning and memory deficits in hypothyroid female rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 30, n. 2, p. 83-89, 2012.

DUDAI, Yadin; KARNI, Avi; BORN, Jan. The consolidation and transformation of memory. **Neuron**, v. 88, n. 1, p. 20-32, 2015.

DUSSAULT, Andrée-Anne; POULIOT, Marc. Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. **Biological procedures online**, v. 8, p. 1- 10, 2006.

ENNACEUR, Abdelkader. One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. **Behavioural brain research**, v. 215, n. 2, p. 244-254, 2010.

ESPINA, Jose Ezekiel C.; BAGAMASBAD, Pia D. Synergistic gene regulation by thyroid hormone and glucocorticoid in the hippocampus. In: **Vitamins and Hormones**. Academic Press, p. 35-81,2022.

FELDT-RASMUSSEN, Ulla; EFFRAIMIDIS, Grigoris; KLOSE, Marianne. The hypothalamus-pituitary-thyroid (HPT)-axis and its role in physiology and pathophysiology of other hypothalamus-pituitary functions. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 525, p. 111173, 2021.

FERBINTEANU, Janina. Memory systems 2018–Towards a new paradigm. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 157, p. 61-78, 2019.

FERNANDES, Paola et al. Social interaction masking contributes to changes in the activity of the suprachiasmatic nucleus and impacts on circadian rhythms. **Physiology & Behavior**, v. 237, p. 113420, 2021.

GARCIA, Joseph A. et al. Impaired cued and contextual memory in NPAS2-deficient mice. **Science**, v. 288, n. 5474, p. 2226-2230, 2000.

GARMENDIA MADARIAGA, Ane et al. The incidence and prevalence of thyroid dysfunction in Europe: a meta-analysis. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 99, n. 3, p. 923-931, 2014.

GE, Jin-Fang et al. Resveratrol improved the spatial learning and memory in subclinical hypothyroidism rat induced by hemi-thyroid electrocauterization. **Endocrine journal**, p. EJ15-0253, 2015.

GERGES, Nashaat Z. et al. Adverse effect of the combination of hypothyroidism and chronic psychosocial stress on hippocampus-dependent memory in rats. **Behavioural brain research**, v. 155, n. 1, p. 77-84, 2004.

GERSTNER, Jason R.; YIN, Jerry CP. Circadian rhythms and memory formation. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, n. 8, p. 577-588, 2010.

GIANTOMASSI, Eduarda et al. Hipotireoidismo relacionada a deficiência de iodo no Estado de São Paulo. **Revista Artigos. Com**, v. 28, p. e7348-e7348, 2021.

GRESACK, J. E.; FRICK, K. M. Post-training estrogen enhances spatial and object memory consolidation in female mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 84, n. 1, p. 112–119, 2006.

GUARNIERI, Leonardo O. et al. Pro-neurogenic effect of fluoxetine in the olfactory bulb is concomitant to improvements in social memory and depressive-like behavior of socially isolated mice. **Translational Psychiatry**, v. 10, n. 1, p. 33, 2020.

HAMSON, Dwayne K.; ROES, Meighen M.; GALEA, Liisa AM. Sex hormones and cognition: neuroendocrine influences on memory and learning. **Comprehensive Physiology**, v. 6, n. 3, p. 1295-1337, 2011.

HEGEDŰS, Laszlo et al. Primary hypothyroidism and quality of life. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 18, n. 4, p. 230-242, 2022.

IZQUIERDO, Ivan. **Memória-3**. Artmed Editora, 2018.

JONKLAAS, Jacqueline et al. Evidence-based use of levothyroxine/liothyronine combinations in treating hypothyroidism: a consensus document. **European thyroid journal**, v. 10, n. 1, p. 10-38, 2021.

JOSELYN, Sheena A.; TONEGAWA, Susumu. Memory engrams: Recalling the past and imagining the future. **Science**, v. 367, n. 6473, p. eaaw4325, 2020.

KANDEL, E.R. **Princípios de Neurociências**. Porto Alegre Ed. MC HILL 5a. Edição, 2021.

KING, David P.; TAKAHASHI, Joseph S. Molecular genetics of circadian rhythms in mammals. **Annual review of neuroscience**, v. 23, p. 713, 2000.

KOULACK, David. Recognition memory, circadian rhythms, and sleep. **Perceptual and motor skills**, v. 85, n. 1, p. 99-104, 1997.

LECHAN, Ronald M.; TONI, Roberto. Functional anatomy of the hypothalamus and pituitary. **Endotext [Internet]**, 2016.

LIU, Bo et al. Brain GABA+ changes in primary hypothyroidism patients before and after levothyroxine treatment: A longitudinal magnetic resonance spectroscopy

study. **NeuroImage: Clinical**, v. 28, p. 102473, 2020.

LIU, Yan-Yun; BRENT, Gregory A. Thyroid hormone crosstalk with nuclear receptor signaling in metabolic regulation. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 21, n. 3, p. 166-173, 2010.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LOSACCO, Mariana Cerqueira et al. High-fat diet affects gut nutrients transporters in hypo and hyperthyroid mice by PPAR- α independent mechanism. **Life Sciences**, v. 202, p. 35-43, 2018.

LUEPTOW, Lindsay M. Novel object recognition test for the investigation of learning and memory in mice. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 126, p. e55718, 2017.

MACCHIA, Paolo E. et al. Increased sensitivity to thyroid hormone in mice with complete deficiency of thyroid hormone receptor α . **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 1, p. 349-354, 2001.

MADHUSUDHAN, U. et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor-Mediated Cognitive Impairment in Hypothyroidism. **Cureus**, v. 14, n. 4, 2022.

MARIOTTI, Stefano; BECK-PECCOZ, Paolo. Physiology of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. **Endotext [Internet]**, 2021.

MARSILI, Alessandro et al. Type 2 iodothyronine deiodinase levels are higher in slow-twitch than fast-twitch mouse skeletal muscle and are increased in hypothyroidism. **Endocrinology**, v. 151, n. 12, p. 5952-5960, 2010.

MARTIN-FAIREY, Carmel A.; NUNEZ, Antonio A. Circadian modulation of memory and plasticity gene products in a diurnal species. **Brain research**, v. 1581, p. 30-39, 2014.

MAURY, Pascale; QUEINNEC, Yvon. Influence of time of 24-hour day on depth of processing in recall memory. **British journal of psychology**, v. 83, n. 2, p. 249-260, 1992.

MCANINCH, Elizabeth A.; BIANCO, Antonio C. The history and future of treatment of hypothyroidism. **Annals of internal medicine**, v. 164, n. 1, p. 50-56, 2016.

MCLEAN, Samantha L. et al. Isolation rearing impairs novel object recognition and attentional set shifting performance in female rats. **Journal of Psychopharmacology**, v. 24, n. 1, p. 57-63, 2010.

MENDOZA, Arturo; HOLLENBERG, Anthony N. New insights into thyroid hormone action. **Pharmacology & therapeutics**, v. 173, p. 135-145, 2017.

MOSCOVITCH, Morris. Memory: Why the engram is elusive. **Science of memory: Concepts**, p. 17-21, 2007.

MULLUR, Rashmi; LIU, Yan-Yun; BRENT, Gregory A. Thyroid hormone regulation of metabolism. **Physiological reviews**, 2014.

NOLAN, Tania; HANDS, Rebecca E.; BUSTIN, Stephen A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. **Nature protocols**, v. 1, n. 3, p. 1559-1582, 2006.

OKANO, Hideyuki; HIRANO, Tomoo; BALABAN, Evan. Learning and memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 23, p. 12403-12404, 2000.

ORTIGA-CARVALHO, Tania M. et al. Hypothalamus-pituitary-thyroid axis. **Comprehensive Physiology**, v. 6, n. 3, p. 1387-1428, 2011.

PAXIONS, G.; FRANKLIN, K. The mouse brain in stereotaxic coordinates 2001.

PELICIARI-GARCIA, Rodrigo A. et al. Repercussions of hypo and hyperthyroidism on the heart circadian clock. **Chronobiology international**, v. 35, n. 2,

p. 147-159, 2018.

PEREIRA, L. M. et al. Estradiol enhances object recognition memory in Swiss female mice by activating hippocampal estrogen receptor α . **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 114, p. 1–9, 2014.

PFÄFFL, Michael W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. e45-e45, 2001.

PREZIOSO, Giovanni; GIANNINI, Cosimo; CHIARELLI, Francesco. Effect of thyroid hormones on neurons and neurodevelopment. **Hormone research in paediatrics**, v. 90, n. 2, p. 73-81, 2018.

PRUMMEL, Mark F.; BROKKEN, Leon JS; WIERSINGA, Wilmar M. Ultra short-loop feedback control of thyrotropin secretion. **Thyroid**, v. 14, n. 10, p. 825-829, 2004.

RAWASHDEH, Oliver et al. PERIOD1 coordinates hippocampal rhythms and memory processing with daytime. **Hippocampus**, v. 24, n. 6, p. 712-723, 2014.

RAYMAEKERS, Sander R.; DARRAS, Veerle M. Thyroid hormones and learning-associated neuroplasticity. **General and Comparative Endocrinology**, v. 247, p. 26-33, 2017.

REDFORD, Christopher; VAIDYA, Bijay. Subclinical hypothyroidism: Should we treat?. **Post reproductive health**, v. 23, n. 2, p. 55-62, 2017.

REIS, Liana Cynthia de Macedo et al. The influence of Zinc, Selenium and Iodine on dietary supplementation in people with Hypothyroidism. 2021.

RIEDEL, Wim J.; BLOKLAND, Arjan. Declarative memory. **Cognitive Enhancement**, p. 215-236, 2015.

ROMANO, Renata Marino et al. Triiodothyronine differentially modulates the LH and FSH synthesis and secretion in male rats. **Endocrine**, v. 59, p. 191-202, 2018.

ROMANO, Renata Marino et al. Hypothyroidism in adult male rats alters posttranscriptional mechanisms of luteinizing hormone biosynthesis. **Thyroid**, v. 23, n. 4, p. 497-505, 2013.

SAMUELS, Mary H. Psychiatric and cognitive manifestations of hypothyroidism. **Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity**, v. 21, n. 5, p. 377, 2014. 2007.

SILVA, J. F. et al. Effects of Hypo- and Hyperthyroidism on Proliferation, Angiogenesis, Apoptosis and Expression of COX-2 in the Corpus Luteum of Female Rats. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. 4, p. 691-698, 2013.

SHAHID, Muhammad A.; ASHRAF, Muhammad A.; SHARMA, Sandeep. Physiology, thyroid hormone. In: **StatPearls [Internet]**. StatPearls Publishing, 2022.

SHIMIZU, Kimiko et al. SCOP/PHLPP1 β mediates circadian regulation of long-term recognition memory. **Nature communications**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2016.

SILVERS, Janelle M. et al. Automation of the novel object recognition task for use in adolescent rats. **Journal of neuroscience methods**, v. 166, n. 1, p. 99-103, 2007.

SQUIRE, L. R. Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 82, n. 3, p. 171–177, 2004.

SUTCLIFFE, J. S.; MARSHALL, K. M.; NEILL, J. C. Influence of gender on working and spatial memory in the novel object recognition task in the rat. **Behavioural brain research**, v. 177, n. 1, p. 117-125, 2007.

TAKAHASHI, Yoshiyuki; SAWA, Kosuke; OKADA, Takashi. The diurnal variation of performance of the novel location recognition task in male rats. **Behavioural brain research**, v. 256, p. 488-493, 2013.

TAXIER, Lisa R.; GROSS, Kellie S.; FRICK, Karyn M. Oestradiol as a neuromodulator of learning and memory. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 21, n. 10, p. 535-550, 2020.

VALENTINUZZI, Verónica S.; MENNA-BARRETO, Luiz; XAVIER, Gilberto F. Effect of circadian phase on performance of rats in the Morris water maze task. **Journal of biological rhythms**, v. 19, n. 4, p. 312-324, 2004.

WALCZAK, Krzysztof; SIEMINSKA, Lucyna. Obesity and thyroid Axis. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n.18, p. 9434, 2021.

WARDLAW, Sarah M. et al. Genetic disruption of the core circadian clock impairs hippocampus-dependent memory. **Learning & memory**, v. 21, n. 8, p. 417- 423, 2014.

WASSNER, Ari J. Congenital hypothyroidism. **Clinics in perinatology**, v. 45, n. 1, p. 1-18, 2018.

WIERSINGA, Wilmar M. T4+ T3 combination therapy: any progress?. **Endocrine**, v. 66, n. 1, p. 70-78, 2019.

WILCOXON, Jennifer Slone et al. Behavioral inhibition and impaired spatial learning and memory in hypothyroid mice lacking thyroid hormone receptor α . **Behavioural brain research**, v. 177, n. 1, p. 109-116, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Iodine status worldwide: WHO global database on iodine deficiency. 2004.

XU, Yong-Xia et al. Activation of cholinergic basal forebrain neurons improved cognitive functions in adult-onset hypothyroid mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 153, p. 113495, 2022.

YI, Jun et al. Decreased pain threshold and enhanced synaptic transmission in the anterior cingulate cortex of experimental hypothyroidism mice. **Molecular pain**, v. 10, p. 1744-8069-10-38, 2014.

YOUSEF, Marwa et al. Adult-Onset Hypothyroidism Alters the Metaplastic Properties of Dentate Granule Cells by Decreasing Akt Phosphorylation. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 68, n. 4, p. 647-657, 2019.

ZHANG, Qiujuan et al. Monitoring glutamate levels in the posterior cingulate cortex of thyroid dysfunction patients with TE-averaged PRESS at 3 T. **Magnetic resonance imaging**, v. 33, n. 6, p. 774-778, 2015.

ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Os possíveis efeitos do hipotireoidismo na ritmicidade dos processos relacionados memória de roedores", protocolo do CEUA: 104/2022 sob a responsabilidade de Paula Bargi de Souza que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 27/06/2022.

Vigência da Autorização	27/06/2022 a 26/06/2027
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6J
Nº de animais	7
Peso/Idade	25g / 8(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6J
Nº de animais	7
Peso/Idade	25g / 8(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6J
Nº de animais	7
Peso/Idade	25g / 8(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6J
Nº de animais	7
Peso/Idade	25g / 8(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6J
Nº de animais	7

Peso/Idade	25g / 8(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6J
Nº de animais	7
Peso/Idade	25g / 8(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6J
Nº de animais	7
Peso/Idade	25g / 8(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6J
Nº de animais	7
Peso/Idade	25g / 8(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6J
Nº de animais	7
Peso/Idade	25g / 8(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6J
Nº de animais	7
Peso/Idade	25g / 7(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6J
Nº de animais	7
Peso/Idade	25g / 7(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central da UFMG

Considerações posteriores:

27/06/2022	Aprovado na reunião ordinária on-line do dia 27/06/2022. Validade: 27/06/2022 à 26/06/2027.
------------	---

Belo Horizonte, 27/06/2022.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil

Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

DECLARAÇÃO

Declaro devidos fins

para os que os Doutores **Prof. Dr. Cleiton Lopes Aguiar**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Profa. Dra. Aline Silva de Miranda**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Profa. Dra. Grace Schenatto Pereira Moraes**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, coorientadora, e **Profa. Dra. Paula Bargi de Souza**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, orientadora, participaram da Banca Examinadora de **Dissertação** de **Carolina Fonseca de Barros** intitulada "**Avaliação do Efeito do Hipotireoidismo na Memória de Roedores de Acordo Com o Sexo e Fase do Dia**", do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, no Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB-UFMG.

Belo Horizonte, 10 de março de 2023.

Prof. Dr. Raphael Escorsim Szawka

Coordenador do Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia



Documento assinado eletronicamente por **Raphael Escorsim Szawka**, **Coordenador(a)**, em 03/03/2023, às 16:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2116063** e o código CRC **B10ACB77**.

