

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

ANA CAROLINA DIAS

***INFLUÊNCIA DO HIPOTIREOIDISMO NA EXPRESSÃO DO RECEPTOR DE
HORMÔNIO TIREOIDIANO BETA 1 EM GLÂNDULA LACRIMAL, NA
DISFUNÇÃO LACRIMAL E SUPERFÍCIE OCULAR DE RATO***

**Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Oftalmologia da FMRP da
Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre.**

ORIENTADOR: PROF. DR. EDUARDO MELANI ROCHA

**DEPARTAMENTO DE OFTALMOLOGIA, OTORRINOLARINGOLOGIA E CIRURGIA
CABEÇA E PESCOÇO.**

- 2007-

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Ficha catalográfica

Dias, Ana Carolina

Influência do hipotireoidismo na expressão do receptor de hormônio tireoidiano beta 1 em glândula lacrimal e na disfunção lacrimal e superfície ocular de rato.

Ana Carolina Dias-Ribeirão Preto, 2007. 66 p; 25 cm.

Tese (Mestrado – Clínica Médica)

Universidade de São Paulo

1. Hormônio tireoidiano. 2. Olho seco. 3. Glândula lacrimal 4. Hipotireoidismo

5. Estresse oxidativo

Banca Examinadora da Tese de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Melani Rocha

Membros:

1. Eduardo Melani Rocha

2. Lucila Leico Kagohara Elias

3. Mônica de Cássia Alves de Paula

DATA: 10/12/2007

**Curso de Pós-Graduação em Oftalmologia, área de concentração
Oftalmologia, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-Universidade
de São Paulo.**

DEDICATÓRIA

A Deus e à minha família

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Eduardo Melani Rocha por toda a dedicação no acompanhamento para obtenção dos dados e confiança depositada em mim durante a realização deste trabalho.

À prof. Dra. Lucila e Dra.Mônica pelo tempo dedicado à leitura da tese e pelas sugestões que foram de grande importância para o enriquecimento do conteúdo dessa tese.

À Carolina, Angélica e Alexandre pela amizade e por toda a colaboração na realização dos experimentos.

À Vani pelo cuidadoso trabalho no preparo do material histológico.

Ao Professor Alceu, Rubens, Renata, Fabíola por me darem oportunidade de aprender algumas técnicas, me dando sugestões e pela atenção na realização dos experimentos.

Aos meus queridos pais Cezar e Ana Esméria que sempre me incentivam e torcem por mim.

Ao meu marido Maurício por sempre me apoiar em tudo e acreditar em mim.

Aos meus irmãos Guilherme e Lara pelo carinho.

À Miriã pela amizade e atenção que me foi dada durante a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pelo apoio a este estudo.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ach: Acetilcolina

BSA: “bovine serum albumin”, albumina de soro bovino

°C: Graus Celsius

Ca⁺: Cálcio

Cl: Citologia de impressão

Cl⁻: Cloro

DAB: Diaminobenzidina

EDTA: Ácido Etileno-Diamino-Tetra Acético

EGF: “Epidermal Growth Factor”

EPM: Erro-padrão médio

EUA: Estados Unidos da América

FT4: Tiroxina livre

g: grama, precedida pelas notações de ordem de grandeza do sistema internacional de unidades; p-pico (10^{-12}), n-nano (10^{-9}), μ -micro (10^{-6}), m-mili (10^{-3}), K-kilo (10^3)

GL: Glândula lacrimal

GSH: Glutathiona reduzida

HCO₃: Carbonato de hidrogênio

HT: Hormônio tireoidiano

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

IGF-1: “Insulin-like Growth Factor-1”, Fator de crescimento de insulina

K: Potássio

l: litros; precedida pelas notações de ordem de grandeza do sistema internacional de unidades; μ -micro, m-mili

MDA: Ácido malonaldeído

M: Molar; precedida pelas notações de ordem de grandeza do sistema internacional de unidades; p-pico, n-nano, μ -micro

Mg⁺: Magnésio

μ l: Microlitros

n: número de amostras ou animais utilizados no experimento

Na⁺: Sódio

P: Probabilidade associada à ocorrência sob a hipótese nula (H_0) de um valor tão extremo quanto o valor mais extremo observado

pH: $-\log$ da concentração H^+

RNA: Ácido ribonucléico

RT: Receptor tireoidiano

SO: Superfície ocular

SNC: Sistema nervoso central

TA: Temperatura ambiente

TGF-beta: “Transforming growth factor beta”, fator de crescimento transformador-beta

Thrb: “Thyroid hormone receptor beta”, Receptor do hormônio tireoidiano β

TRH: Hormônio liberador de tireotropina

TSH: Hormônio tireoestimulante

TSHR: Hormônio receptor de tireotropina

T3: Triiodotironina

T4: Tiroxina

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Tabela 1. Comparação dos parâmetros estruturais e bioquímicos de GL entre ratos hipotireoideos e controles. Dados são relatados em média \pm EPM.

(* $P < 0,05$). (Pág.36).

Figura 1. Análise de MDA (nmol/g) (A), atividade de peroxidase (%) (B), GSH (μ M/g) (C) e Ach (D) em homogeneizados de glândula lacrimal de ratos controles e hipotireoideos (n=5-8/grupo). Após 10 semanas de tratamento com tiamazol, os tecidos foram homogeneizados e expostos a reações colorimétricas como descrito em material e métodos. Análises espectrofotométricas foram feitas e comparadas a padrões. * $P < 0,05$ (teste Mann-Whitney U). (Pág.37)

Figura 2. Ilustrativa similiaridade das glândulas de meibomius (GM) em ratos controles (A) e hipotireoideos (B). Lâminas foram excisadas, congeladas, fixadas e coradas com HE. Imagens digitais obtidas de cortes da região central das GMs foram comparadas entre os grupos (100x). (Pág.38).

Figura 3. Representação microfotográfica de citologia de impressão de córnea de ratos controles (A) e hipotireoideos (B) (n=8/grupo). Estágios de 0 a 3 foram atribuídos para cada amostra de maneira mascarada, considerando o formato de célula, tamanho do núcleo e presença de muco. Dados diferem significativamente entre ratos hipotireoideos e controles ($P = 0,002$; Teste de Fisher). (Pág. 39).

Figura 4. Efeito do hipotireoidismo na expressão de Thrb em GL. Após 10 semanas de tratamento com tiamazol as GLs foram extraídas, homogeneizadas (n=5 animais por grupo) e analisadas por *western blot* usando um anticorpo anti-Thrb1. Valores foram relatados como significativo \pm EPM. Valores obtidos do grupo controle foram definidos com 100%, e valores obtidos de animais diabéticos foram expressos com uma porcentagem deste valor. Resultados estão representados de três experimentos independentes. A alta expressão de Thrb1 foi detectada em GL de animais hipotireoideos. (*P=0,02). (Pág. 40).

Figura 5. Representação imunoistoquímica de GL de ratos machos normais. (A) A coloração demonstra Thrb1 no núcleo de células acinares e ductos de GL de ratos controles, (B) ratos hipotireoideos. (C) Controle negativo demonstra apenas a presença de *background*. As micrografias são representadas de três experimentos independentes com 5 animais cada. (Pág. 41).

Figura 6. Representação imunoistoquímica demonstrando Thrb1 na conjuntiva de ratos normais (A), ratos hipotireoideos (B), e controle negativo (C). As micrografias são representadas de três experimentos independentes com 5 animais cada. (Pág. 42).

SUMÁRIO

RESUMO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Superfície ocular e glândula lacrimal	2
1.2. Hormônios tireoidianos e seus receptores	5
1.3. Hipotireoidismo e estresse oxidativo	10
1.4. Olho seco	16
2. OBJETIVOS	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. Animais experimentais	24
3.2. Teste de schirmer e citologia de impressão	25
3.3. Análise de tiroxina	26
3.4. Análises histológicas das glândulas de meibomius	28
3.5. Ensaio de acetilcolina e peroxidase na glândula lacrimal	28
3.6. Peroxidação lipídica e níveis de GSH	30
3.7. Avaliação da expressão de Thrb1 na superfície ocular e na glândula lacrimal	30
3.8. Localização imunoistoquímica de Thrb1 na glândula lacrimal, conjuntiva e córnea de ratos	33
3.9. Análise estatística	34
4. RESULTADOS	35
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÕES	47
7. SUMMARY	49
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
9. ANEXO	60

RESUMO

Doenças hormonais induzem alterações na glândula lacrimal (GL) e superfície ocular (SO). Hormônios tireoidianos (HT) induzem proliferação celular e metabolismo de lipídeos através da ativação dos receptores dos hormônios tireoidianos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a localização e comparar a expressão do receptor do hormônio tireoidiano β -1 (Thrb1) em GL de ratos com hipotireoidismo e controles e o impacto desta doença na estrutura e função da GL e SO. O hipotireoidismo foi induzido em ratos Wistar machos com uso crônico de tiamazol. Após dez semanas, células da córnea foram colhidas para citologia de impressão (CI). Os ratos foram submetidos a eutanásia e tecidos avaliados por imunoperoxidase e *western blot* para Thrb1. A quantidade de malonaldeído (MDA) e acetilcolina (Ach) na GL foi determinada por espectrofotometria (n=5/grupo em todos experimentos). O peso corpóreo e peso da GL foram significativamente reduzidos em ratos hipotireoideos ($P < 0,05$). O *western blot* indicou que a GL expressa Thrb1 e que o hipotireoidismo induz aumento na expressão deste receptor. A CI apresentou metaplasia significativa e Ach foi significativamente mais baixa em ratos hipotireoideos ($P < 0,05$). A imunistoquímica demonstrou a presença de Thrb1 no núcleo de células acinares e ductos da GL dos grupos controle e hipotireoideo. Reduções crônicas nos níveis de HT induziram alterações bioquímicas e estruturais e modularam a expressão níveis de Thrb na GL. Esses achados confirmam que a GL é tecido-alvo para HT e podem ajudar a entender os mecanismos relacionados a olho seco observado no hipotireoidismo.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A glândula lacrimal (GL) e a superfície ocular (SO) são alvos da ação de diversos hormônios (Sullivan D, et al. 1998). Em estudos anteriores se observou que os hormônios sexuais e a insulina possuem ação local nesses tecidos por meio de receptores específicos e que existe uma correlação entre os níveis desses hormônios e aspectos morfológicos e funcionais da GL (Sullivan DA, 1998; Cunha DA, 2005). Por outro lado, apesar de evidências epidemiológicas e experimentais da influência dos hormônios tireoidianos na GL, pouco se sabe do seu papel na fisiopatologia do olho seco (LowryMiller & Panciera, 1994; Moss *et al.*, 2000; Eckstein *et al.*, 2004).

1.1. Superfície ocular e glândula lacrimal

A SO compreende anatomicamente a mucosa margeada pelas bordas palpebrais estendendo-se da conjuntiva tarsal à superfície anterior do globo ocular, composta pela conjuntiva bulbar, limbo e córnea (Nelson, 1982). Histologicamente, a superfície ocular é composta por epitélio estratificado não queratinizado da conjuntiva e da córnea. Estas células encontram-se firmemente aderidas umas às outras, apresentam distribuição uniforme em camadas e características próprias e do tecido de sustentação subjacente que variam conforme cada região (Tseng & Tsubota, 1997) .

As GLs atuam carreando além de água, nutrientes e eletrólitos utilizados para umidificar e manter o metabolismo da SO, o que é fundamental para que se obtenha uma ótima qualidade óptica da imagem e vitalidade da córnea

(Rieger, 1992; Goto *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2002). A lágrima também contém agentes envolvidos em vigilância imunológica tais como imunoglobulinas, lisozima e lactoferrina que protegem contra a adesão e invasão microbiana, e fatores de crescimento responsáveis por proporcionar estímulo de diferenciação e crescimento celular necessários no reparo de lesões ou na longevidade e renovação do epitélio ocular (Wilson *et al.*, 1991; Rocha *et al.*, 2002) .

A face superior da camada apical do epitélio que compõe a SO é caracterizada pela interação entre glicocálice das células epiteliais e os receptores celulares para mucina. Essa camada forma um gradiente em toda a extensão do filme lacrimal garantindo sua estabilidade. Assim, o filme lacrimal estável protege o epitélio da superfície ocular e este por sua vez participa na formação de alguns de seus constituintes (Nelson, 1982; Lemp, 1995; Tseng & Tsubota, 1997) . Diante de problemas na interação entre SO e filme lacrimal podem ser observadas alterações na forma das células epiteliais da córnea e da conjuntiva e diminuição na produção de mucina (Tseng & Tsubota, 1997) .

No filme lacrimal, estão presentes ainda glicose, lactato, uréia, alguns hormônios como insulina, prolactina e hormônio tireoidiano, fatores de crescimento como EGF, TGF-beta e IGF-1, vitamina A, diversos eletrólitos como Na⁺, K⁺, Ca⁺, Mg⁺, Cl⁻ e HCO₃⁺ (Rocha *et al.*, 2006 ; Sullivan *et al.*, 1998 ; Ubels *et al.*, 1986 ; Sullivan & Hann, 1989).

O filme lacrimal também é composto por lipídeos, produzidos pelas glândulas de meibomius. Os lipídeos compõem a barreira mais externa do filme lacrimal e são secretados por cerca de 30 a 40 glândulas de meibomius em cada pálpebra. São ésteres de colesterol, ésteres de ácidos graxos,

triacilgliceróis, colesterol, ácidos graxos, além de outros 25% lipídeos polares e não-polares ainda não identificados. As propriedades físico-químicas destas combinações de lipídeos e a temperatura dão a essa fração do filme lacrimal características de solidificação e fluidez que repercutem na sua função, desde a secreção, através dos ductos e formação da película sobre a camada mucogelatinosa, até o contato entre as duas camadas (hidrofílica e hidrofóbica, respectivamente), aderência à pele palpebral, protegendo-a da contínua umidificação e redução da velocidade de evaporação do conteúdo aquoso do filme lacrimal (Driver & Lemp, 1996) .

Em condições normais de concentração e distribuição de todos os componentes da lágrima, a formação do filme lacrimal estável recobrimdo toda a SO é garantida pelo hidrodinâmico fechamento completo e periódico das pálpebras durante o piscar. O mecanismo de piscar garante a distribuição homogênea da lágrima pela SO e posterior drenagem para o sistema nasolacrimal propiciando a estabilidade do filme lacrimal e renovação de seus constituintes.

A integração neuroanatômica localizada na SO, que leva à secreção e distribuição da lágrima é controlada por dois arcos reflexos mediados pelo nervo trigêmio. As vias aferentes de ambos os arcos reflexos estão localizadas nas terminações sensitivas do nervo trigêmio na superfície ocular e comandam respostas eferentes motoras para as pálpebras e secretórias para a GL através de raízes motoras e parassimpáticas do nervo facial, respectivamente (Tsubota & Nakamori, 1995).

Diversas doenças podem acometer as GLs determinando diminuição da secreção, alterações de SO e manifestações de olho seco. Alterações auto-

imunes como a Síndrome de Sjögren (Toda *et al.*, 1999) , alterações de caráter indeterminado presentes em doenças crônicas como o diabetes (Ramos-Remus *et al.*, 1994) ; (Seifart & Stempel, 1994) ; influências hormonais (Sullivan & Edwards, 1997) e ainda processos fisiológicos relacionados ao envelhecimento (Bromberg & Welch, 1985); (Schein *et al.*, 1997a) figuram como principais mecanismos que acometem as GLs.

1.2. Hormônios tireoidianos e seus receptores

A glândula tireóide, localizada de cada lado anteriormente à traquéia e imediatamente abaixo da laringe, é uma das maiores glândulas endócrinas, normalmente pesando de 15 a 20 gramas no adulto. Secreta dois hormônios importantes, a tiroxina e a triiodotironina, chamados respectivamente de T4 e T3, que possuem um profundo efeito sobre a diferenciação, crescimento e metabolismo corporal (Yen, 2001) . Os hormônios tireoidianos são os únicos compostos conhecidos com atividade biológica que contêm iodo e desempenham funções importantes (Brent, 1994) .

No adulto, os hormônios tireoidianos atuam para manter a homeostasia metabólica, afetando a função de praticamente todos os sistemas orgânicos. O metabolismo dos hormônios tireoidianos ocorre principalmente no fígado, embora possa também haver algum metabolismo local nos tecidos-alvo, tais como o cérebro. As concentrações séricas dos hormônios tireoidianos são reguladas com precisão pelo hormônio hipofisário, a tireotropina, em um sistema clássico de retroalimentação negativa. As ações predominantes do hormônio tireoidiano são mediadas pela sua ligação a receptores nucleares de

hormônios tireoidianos (RT) e pela modulação da transcrição de genes específicos (Brent, 1994) .

A maior parte dos HTs circulantes está na forma do pró-hormônio tiroxina (T4), sendo que sua concentração é cerca de quarenta vezes maior que a do hormônio ativo 3,5,3'-triiodotironina (T3) (Yen, 2001). Para formar os hormônios tireoidianos (HT), as células da tireóide realizam o seqüestro de iodetos presentes no sangue, concentrando-os em até 30 vezes, sintetizam e secretam uma glicoproteína, com cerca de 660 kDa, chamada de tireoglobulina, cada uma contendo cerca de 70 aminoácidos tirosina que constituem os principais substratos que se combinam com o iodeto para formar T3 e T4. Embora T3 seja secretada pela tireóide, o metabolismo da T4 por monodesiodação seqüencial nos tecidos periféricos responde pela maior parte de T3 circulante. A remoção do iodo 5" ou do anel externo leva à formação de T3, constituindo a via metabólica ativadora. O principal local de conversão de T4 em T3 além da tireóide é o fígado. Por conseguinte, quando se administra T4 a pacientes hipotireoidianos, em doses que produzem concentrações plasmáticas normais de T4, a concentração plasmática de T3 também se normaliza (Braverman *et al.*, 1970) .

A maioria dos tecidos-alvo periféricos utiliza a T3 derivada do hormônio circulante. Em condições normais, cerca de 40% da T4 são convertidos em T3, 38% são convertidos em T3 reversa e 21% são metabolizados por outras vias, tais como conjugação no fígado e excreção na bile. As razões para que T3 seja mais ativo que T4 são que os receptores celulares para hormônio tireoidiano têm cerca de 10 vezes mais afinidade por T3, e as proteínas sangüíneas ligam T4 mais fixamente que T3 (Baxter *et al.*, 1979) .

A T3 regula a expressão gênica ao se ligar a receptores de HT de alta afinidade, sendo que o complexo hormônio-receptor se liga a elementos sinalizadores no núcleo das células de resposta específicos presentes nos promotores dos genes-alvo da T3, ativando ou reprimindo sua transcrição. Esta ação genômica possui um período de latência considerável, com resposta variando de horas até dias (Bassett *et al.*, 2003) .

A maior parte do iodo orgânico está ligada a T4 (90 a 95%), enquanto a ligação a T3 representa uma fração relativamente mínima (cerca de 5%) (Bassett *et al.*, 2003).

O gene do Thrb gera, pelo uso de diferentes promotores, duas isoformas Thrb1, Thrb2 e Thrb3 que se diferenciam somente na porção N-terminal. Já o gene que codifica para o Thra gera duas isoformas através do *splicing* alternativo do pré-RNA, Thra1 e Thra2 (Ribeiro *et al.*, 1998). Thra1 e Thrb1 são expressos em praticamente todos os tecidos que respondem aos hormônios tireoidianos, enquanto as outras isoformas exibem uma distribuição mais restrita. Thra1 é abundante nos músculos esqueléticos, gordura marron e no coração. Thrb1 é expresso em grande quantidade no fígado, rim e cérebro. O Thrb2 é expresso principalmente na glândula pituitária e em outras áreas do cérebro e Thrb3 em ratos é expresso no fígado, rim e pulmão (Williams,2000).

A isoforma Thra2, devido à sua seqüência carboxiterminal alterada, não se liga ao HT e, portanto, não funciona como um receptor de HT constitui a isoforma mais abundante no cérebro (Strait *et al.*, 1990) . A influência do Thrb já foi observada em anexos de pele como folículo piloso (Billoni *et al.*, 2000) .

A deficiência de Thrb exibe um déficit permanente na função auditiva sendo este receptor um fator de transcrição essencial para o desenvolvimento

auditivo (Forrest *et al.*, 1996). O camundongo *Thrb knockout* (ausência de expressão das isoformas b1 e b2) possui TSH elevado, níveis elevados de hormônios tireoidianos, bócio e surdez neurossensorial, portanto, com fenótipo idêntico ao observado em humanos com deleção do gene *Thrb* (Forrest *et al.*, 1996). A síndrome de resistência ao hormônio tireoidiano (RHT) é caracterizada pela reduzida resposta dos tecidos-alvo ao hormônio tireoidiano (HT), apesar das elevadas concentrações séricas de T3 e T4 livres, associada a um TSH elevado. Existem características clínicas comumente encontradas na síndrome que são bócio, retardo do crescimento, níveis séricos elevados de T3 e T4 livres, níveis normais ou discretamente elevados de TSH, o qual responde ao TRH e ausência dos sintomas comuns e das alterações metabólicas provocadas pelo excesso de HT. (Ribeiro *et al.*, 1995). O bócio endêmico é a anormalidade mais comumente encontrada no exame físico, ocorrendo em 85% dos casos da RHT e a taquicardia que ocorre em 90% dos indivíduos é causada pela ação do HT em níveis elevados no *Thra* (Refetoff, 1993).

Algumas ações de T3 e T4 ocorrem rapidamente e não são afetadas por inibidores de transcrição ou da síntese protéica, sugerindo um mecanismo de ação não-genômico. Estas ações não-genômicas incluem regulação de canais iônicos, fosforilação oxidativa, transcrição de genes mitocondriais e envolvem a geração de mensageiros secundários, como AMP cíclico e cascatas de sinalização por proteínas-quinase (Bassett *et al.*, 2003).

A síntese e secreção dos HTs são reguladas por um mecanismo de *feedback* negativo que envolve o eixo hipotálamo-hipófise-tireóide. O hormônio liberador da tireotropina (TRH) é um tripeptídeo, sintetizado no núcleo paraventricular do hipotálamo e transportado até a hipófise anterior, pelos

axônios presentes no sistema porta-hipotálamo-hipófise. O TRH se liga aos seus receptores nas células hipofisárias estimulando a síntese e a liberação de TSH pré-formado dos grânulos secretores e também estimula a síntese subsequente das subunidades α e β do TSH. O hormônio estimulador da tireóide (TSH) é um hormônio glicoproteico com subunidades alfa e beta análogas às das gonadotropinas, produzido na hipófise anterior. A secreção de TSH é precisamente controlada pelo TRH, e pela concentração de hormônios tireoidianos livres na circulação.

O receptor de tireotropina (TSHR), presente nas células da tireóide, quando ligado ao TSH aumenta a secreção de T3 e T4, na medida em que estimula a transcrição e clivagem da molécula de tireoglobulina, aumenta a atividade da bomba de iodeto e também o tamanho, atividade e número das células tireóideas (Davies, 2002) .

A tiroxina (T4) é útil no diagnóstico do hipertireoidismo e do hipotireoidismo. Nos casos de hipotireoidismo primário, ocorre a elevação do TSH e diminuição de T4, podendo T3 ainda permanecer em níveis normais. Apenas nos estados mais avançados da doença ocorrerá diminuição de T3 (Liewendahl *et al.*, 1987).

A tiroxina livre (FT4) reflete o efeito metabólico do hormônio, sendo indicada para avaliação do hipertireoidismo e do hipotireoidismo, minimizando a influência das proteínas séricas. Torna-se, assim, mais valiosa do que a dosagem de T4 total, especialmente em grávidas ou em mulheres em uso de anticoncepcionais (Liewendahl *et al.*, 1987) .

A concentração plasmática de T3 é a última a se alterar no hipotireoidismo, podendo ainda permanecer normal mesmo com TSH elevado

e T4 diminuído. Pode também estar diminuída nas doenças graves em geral, no uso de betabloqueadores ou corticóides (Liewendahl *et al.*, 1987) .

A doença ocular mais comumente descrita ligada a disfunções da tireóide é uma desordem inflamatória e não infecciosa associada muitas vezes ao hipertireoidismo, chamada de oftalmopatia de Graves. Acomete seis vezes mais mulheres do que homens. O sinal clínico mais comum é a retração palpebral, podendo haver exoftalmo, além de compressão de nervos levando a diplopia, por acometimento dos nervos oculomotor, abducente e/ou troclear e perda de visão por acometimento do nervo óptico (Fatourechí *et al.*, 1994) .

Os HTs promovem proliferação celular, síntese protéica, produção de calor e metabolismo de lipídeos, entre outras ações. Isso se dá através da ligação com uma família de receptores tireoidianos (RT) localizados nos núcleos celulares que por sua vez se ligam ao DNA dos genes promotores da ação desses HTs (Brent, 1994) .

Estudos anteriores indicam que a deficiência prolongada de HT reduz o peso da GL, e que o tratamento com HT chega a modificar o dimorfismo sexual dessa glândula exócrina, aproximando aspectos histológicos de GL das fêmeas aos dos machos. Porém, não há informações se esses eventos ocorrem por ação direta dos HT, ou se há repercussão na secreção lacrimal ou superfície ocular (Hoffman *et al.*, 1989).

Além disso, esses eventos podem não estar limitados à GL, mas também afetar as glândulas de meibomius (GM) (produtoras de lipídes para compor o filme lacrimal), uma vez que HTs atuam na regulação da secreção lipídica de anexos da pele (Goolamali *et al.*, 1976; Campbell & Davis, 1990) . Apesar das ações dos hormônios tireoidianos (HT) sobre diferentes tecidos,

além das suas interações com outros hormônios, pouco se sabe sobre o seu papel na GL e na SO (Carriere, 1964 ; Boas & Bates, 1954) .

1.3. Hipotireoidismo e estresse oxidativo

O hipotireoidismo é uma síndrome clínica relativamente comum que resulta em uma deficiência do hormônio tireoidiano e pode ser classificado em primário, secundário ou terciário. Primário quando há um defeito ou uma destruição da própria tireóide, como por exemplo, na atrofia tireoideana ou na tireoidite de Hashimoto, ambas de origem auto-imune. Secundário quando a causa é hipotalâmica ou hipofisária, ou seja, tem origem fora da glândula com repercussões nela (Woeber, 2000). Normalmente isso ocorre quando há diminuição da produção do Hormônio Estimulante da Tireóide (TSH), resultado de alterações na hipófise. Pode ainda, o hipotireoidismo, ser terciário, cuja origem é uma falha na secreção TRH no hipotálamo.

Em caso de hipotireoidismo, a concentração plasmática de T4 total e/ou T4 livre estão diminuídas. A vantagem de fazer a dosagem de T4 livre é por se tratar de um método direto, rápido e preciso. O TSH, por sua vez, está alto, devido à falta do *feedback* (retrocontrole) dos hormônios produzidos pela glândula, já que eles estão baixos. Quando o defeito não está na hipófise, nem no hipotálamo (hipotireoidismo secundário), a estimulação da hipófise com o TRH tem uma pronta resposta na secreção de TSH, mas os hormônios tireoideanos não aumentam (hipotireoidismo primário).

As causas do hipotireoidismo primário podem ser variadas, sendo que o seu tratamento consiste na reposição de T4. As principais etiologias para o

hipotireoidismo primário são: doença auto-imune de tireóide, também denominada de tireoidite de Hashimoto (caracterizada pela presença de auto-anticorpos), deficiência de iodo, redução do tecido tireoidiano por iodo radioativo ou por cirurgia usada no tratamento de Doença de Graves ou do câncer de tireóide. Raramente a etiologia é devido à doença neoplásica ou infecciosa da tireóide (Woeber, 2000) .

No caso de níveis normais de T4 e aumento de TSH, sem sinais clínicos clássicos da doença, o diagnóstico de hipotireoidismo subclínico vem sendo empregado. A prevalência de hipotireoidismo subclínico varia com o estudo e com a população analisada, apresentando freqüência aumentada em mulheres, idosos e naqueles com ingesta de iodo muito elevada. Entre mecanismos sugeridos para o hipotireoidismo subclínico estão a resistência aos HTs, distúrbios de outros hormônios (adrenais, prolactina, etc.), interações medicamentosas e outras doenças (Kek *et al.*, 2003).

Como os HTs regulam o metabolismo oxidativo, a fisiopatologia das manifestações do hipotireoidismo pode envolver dano oxidativo nos tecidos-alvo. Essa possibilidade é apontada em estudos que mostram aumento no estresse oxidativo em hipotireoideos (Sarandol *et al.*, 2005) . De uma forma paradoxal, em hipotireoidismo, uma diminuição na produção de radicais livres seria esperada por causa da supressão metabólica gerada pela diminuição nos níveis dos hormônios tireoidianos (Paller, 1986) .

Ainda que a confirmação laboratorial do hipotireoidismo e a distinção entre primário e secundário possam ser simples (i.e., observando níveis séricos de T4 e TSH e comparando aos valores normais), a avaliação do estresse

oxidativo nessas condições é feita idealmente em modelos animais, onde tecidos-alvo e *status* frente ao tratamento podem ser monitorados.

Um radical livre é qualquer espécie que contém um ou mais elétrons não pareados, ou seja, elétrons livres ocupando um orbital atômico ou molecular (Halliwell e Whiteman 2004). Por serem os elétrons mais estáveis quando estão pareados nas orbitais, os radicais livres geralmente reagem com outras espécies (Halliwell, 1989).

Estresse oxidativo é convencionalmente definido como um desequilíbrio entre o estresse pró-oxidante e a defesa antioxidante. Contudo, recente evidência indica que o rompimento da sinalização redução-oxidação é um importante aspecto do estresse oxidativo, às vezes mais importante que o desequilíbrio (Halliwell, 1989).

As conseqüências do estresse oxidativo podem ser muito sutis ou muito sérias (incluindo dano oxidativo das biomoléculas, interrupção do sinal de transdução, mutação e morte celular) dependendo do balanço entre a geração de espécies reativas e a defesa antioxidante (Halliwell, 2004).

O estresse oxidativo pode ser avaliado na medida de radicais livres, produtos de oxidação ou ainda da atividade de enzimas antioxidantes. Entre os marcadores biológicos mais comumente usados estão as dosagens de malonaldeído (MDA), glutatona reduzida (GSH) e peroxidase (Halliwell, 2006).

O MDA é um aldeído de cadeia curta, sendo um dos compostos medidos pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). A formação de malonaldeído ocorre pela decomposição dos hidroperóxidos lipídicos e sua concentração tem sido utilizada para estimar a intensidade de peroxidação lipídica em sistemas biológicos, células e tecidos (Bonnes & Guérin, 1992).

A peroxidação lipídica pode ser inibida por antioxidantes que interrompem a cadeia de peroxidação, interagindo com o oxigênio e fornecendo átomos de hidrogênio para o radical peroxila dos ácidos graxos, impedindo desta forma a reação em cadeia que se propaga nas membranas lipídicas (Tiidus & Houston, 1993) .

Os efeitos gerais da peroxidação lipídica são a diminuição da fluidez da membrana, aumento da quebra de membrana e dano das proteínas de membrana, desse modo ocorre inativação de receptores, enzimas e canais de íon (Halliwell,2006).

Como a maior parte de GSH reduzida compreende os grupos sulfidril não protéicos, a quantificação de tióis solúveis em ácido é empregada na quantificação de níveis teciduais de GSH (Sedlak & Lindsay, 1968).

As peroxidases são oxiredutases, as quais usam H_2O_2 como acceptor de elétrons para catalisar diferentes reações oxidativas. A sua medida atua como marcador biológico de estresse oxidativo (Halliwell, 2006) .

Os antioxidantes provêm proteção contra o estresse oxidativo pela neutralização ou pela limpeza das espécies reativas ou ainda pela quebra das reações (Scandalios,2005). Os antioxidantes são divididos em enzimáticos e não enzimáticos; Os enzimáticos são:

- superóxido dismutase (SOD): enzima responsável por dismutar o superóxido em peróxido de hidrogênio. Existem três tipos de SOD específicos: manganês SOD (MnSOD) encontrado na mitocôndria; extra-celular SOD (EC SOD) encontrado no extra-celular e o cobre-zinco SOD (CuSOD) encontrado no citosol celular.

- catalase e a glutathione peroxidase: responsáveis por degradar o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio.

Os antioxidantes não-enzimáticos são a vitamina C e E, a glutathione (forma reduzida GSH) e o beta caroteno. A glutathione reduzida (GSH) é um antioxidante solúvel sintetizado endogenamente no fígado e é a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo pró-oxidante, combatendo os radicais livres e protegendo as células contra apoptose (Nicolson & Orrenius, 1986).

Como a maior parte de GSH reduzida compreende os grupos sulfidril não protéicos, a quantificação de tióis solúveis em ácido é empregada na quantificação de níveis teciduais de GSH (Sedlak & Lindsay, 1968).

A transferrina, ceruloplasmina e a albumina também possuem papel antioxidante por seqüestrarem íons de metais de transição, como o ferro e o cobre, os quais reagem rapidamente com H₂O₂ para produzir o radical livre hidroxila altamente tóxico pela reação de Fenton (Halliwell, 1989).

Contudo, as espécies reativas nem sempre são prejudiciais. Elas ajudam os fagócitos a eliminarem microorganismos e a regularem eventos sinalizadores pela via redox (redução e oxidação) e dessa forma influenciar na fosforilação e desfosforilação de enzimas e fatores de transcrição (Halliwell 2006).

O tratamento do hipotireoidismo consiste na reposição por via oral do hormônio tireoidiano deficitário. A terapia de reposição tende a eliminar os sintomas, sinais e anormalidades laboratoriais. A terapia com L-tiroxina sintética é a preferida e feita de forma contínua. Com sua meia-vida longa (6-7 dias), resulta em concentrações plasmáticas de T₄ estáveis, o que não atenua efeitos dos eventuais esquecimentos por parte do paciente. A adequação da

terapia é observada com avaliações clínicas e medidas da T4 livre e também do TSH (Woeber, 2002) .

Modelos animais para estudar o hipotireoidismo podem ser induzidos por manipulação genética, através da eliminação (*knock-out*) de receptores de HT, também de forma cirúrgica com a tireoidectomia ou com inibidores da captação de iodo (KClO₄) ou medicamentos depressores da atividade hormonal tireoidiana (Hoffman *et al.*, 1989; Miller & Panciera, 1994) .

O tiamazol inibe a síntese dos hormônios tiroideanos, sendo assim eficaz no tratamento do hipertireoidismo e indução do hipotireoidismo em modelos animais. Essa droga não inativa T4 ou T3 que estão armazenadas na tireóide ou circulante no sangue nem interfere na eficácia de hormônios tireoidianos administrados por via oral ou parenteral (Andrade *et al.*, 1992; Vargas *et al.*, 1992).

1.4. Olho seco

O olho seco pode ser definido como uma síndrome onde ocorre alteração do filme lacrimal causada por deficiência na produção de lágrimas ou evaporação excessiva que causa dano à superfície ocular interpalpebral e se associa a sintomas de desconforto ocular (Lemp, 1995) .

Essa síndrome está associada a várias doenças bem distintas, porém os sinais clínicos não se correlacionam bem com os sintomas e os testes aplicados na prática clínica ainda apresentam limitações, principalmente em casos leves e moderados (Lemp, 1995) . As alterações patológicas do olho seco são bastante variadas quanto à intensidade dos sinais e sintomas e das

suas relações com outras doenças e podem produzir danos à SO, aumento do risco de infecções e em alguns casos pode levar à importante redução da visão (Rocha *et al.*, 2006) .

Uma classificação estabelecida se refere ao mecanismo ser evaporativo, quando a causa predominante está relacionada à deficiência na produção da fração lipídica e/ou alterações palpebrais em contraponto à deficiência da fração aquosa, onde a característica dominante é a redução na produção da fração aquosa (Lemp, 1995) .

Estima-se que, nos EUA, entre 7 e 10 milhões de pessoas sofram de olho seco e que cerca de metade desses indivíduos teria mais de 65 anos (Schein *et al.*, 1997b ; Sullivan & Sato, 1992) . Entre as doenças auto – imunes, a síndrome de Sjögren, que se associa ao olho seco – é a segunda mais comum afetando cerca de 1% da população geral, com um predomínio em mulheres de 9:1 (Sullivan & Sato, 1992) . Entre os indivíduos que procuram cuidados oculares no Canadá, mais de 20% queixam-se de olho seco e estima-se que este quadro seja grave em 45 de cada 10 mil habitantes (Caffery *et al.*, 1998) .

A deficiência ou ausência do filme lacrimal pode afetar seriamente a SO, produzindo ressecamento epitelial, ulceração e perfuração corneana, predisposição a infecções e até cegueira (Scherz & Dohlman, 1975) (Sullivan *et al.*, 1999) . Uma vez que não se conhecem, até o momento, tratamentos curativos para o olho seco, as estratégias se limitam à umidificação com lágrimas artificiais ou recursos para aumentar a retenção do filme lacrimal como oclusores do ponto de drenagem da lágrima ou óculos fechados para reduzir a evaporação. Em casos de olho seco grave, o uso de soro autólogo

vem sendo recomendado tanto para a síndrome de Sjögren como para a doença do enxerto *versus* hospedeiro (Tsubota *et al.*, 2000); (Rocha *et al.*, 2000b).

As causas de olho seco podem estar associadas a malformações genéticas, distúrbios nutricionais, disfunções do sistema endócrino, imune ou alterações neurológicas e podem ser potencializadas por agentes externos, como infecções e condições ambientais que reduzam a umidade do ar (Rocha *et al.*, 2006).

O papel de outros hormônios além dos tireoidianos na fisiopatologia das disfunções lacrimais e SO vêm sendo investigado (Rocha *et al.*, 1993) ; (Sullivan *et al.*, 1998) ; (Toda *et al.*, 1999; Rocha *et al.*, 2000b), inclusive, com perspectivas de tratamento usando hormônios com andrógenos e estrógenos para promover a regularização de secreção lacrimal (Sullivan *et al.*, 1999); (Akramian *et al.*, 1998); (Esmaeli *et al.*, 2000).

Estudos epidemiológicos que podem orientar pesquisas experimentais e clínicas têm sido realizados na tentativa de delinear características populacionais e fatores de riscos associados aos sinais e sintomas de olho seco. A prevalência de olho seco é bastante variável dependendo do desenho do estudo e da população analisada (Schein *et al.*, 1997a; Shimmura *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2002). Alguns fatores de risco associam-se à maior ocorrência de sintomas de desconforto ocular relacionados ao olho seco como história de artrite reumatóide, tireiodopatia, diabetes, hábito de fumar, uso de lentes de contato e o uso de algumas medicações como antidepressivos, diuréticos, anti-histamínicos (Lemp, 1995 ; Schein *et al.*, 1997b ; McCarty *et al.*, 1998 ; Moss *et al.*, 2000 ; Moss *et al.*, 2004).

A deficiência lacrimal causa alteração epitelial da SO e cria um ambiente inflamatório onde células epiteliais e linfócitos são estimulados a produzir e secretar diversas citocinas. Níveis aumentados de citocinas no filme lacrimal, combinados à redução de promotores de crescimento como *epidermal growth factor* (EGF) e retinol, afetam a proliferação e diferenciação epitelial na SO e conseqüentemente induzem diminuição da atividade mitótica, expressão diminuída de moléculas de proteção como a mucina, diminuição de células caliciformes e aumento de células inflamatórias, com metaplasia e queratinização epitelial (Pflugfelder *et al.*, 1997; Rocha *et al.*, 1998; Pflugfelder *et al.*, 1999 ;Solomon *et al.*, 2001 ; Zoukhri & Kublin, 2001).

A acetilcolina é o principal neurotransmissor estando presente em todas as terminações nervosas autonômicas pré-ganglionares (receptores nicotínicos), todas as terminações parassimpáticas e algumas terminações nervosas simpáticas pós ganglionares (receptores muscarínicos), junção neuromuscular (receptores nicotínicos) e em algumas sinapses do SNC. Sendo também o principal neurotransmissor responsável pelo estímulo da GL (Dartt, 2001) . Dessa forma, dosagens de acetilcolina nesse tecido têm ajudado a avaliar sua capacidade secretora (Rios *et al.*, 2005) .

Do ponto de vista clínico, pacientes com alterações tireoidianas têm risco maior para desenvolver sinais e sintomas de olho seco, ainda que pelo menos em um estudo epidemiológico, em idosos não tenha observado essa relação (Williamson *et al.*, 1967; Moss *et al.*, 2000) . A associação entre disfunção lacrimal e doença tireoidiana sugere que a disfunção hormonal, relacionada ou não a um distúrbio imunológico, possa ser o desencadeante do olho seco.

Assim, o olho seco secundário ao hipotireoidismo poderá estar relacionado com a diminuição da ação dos hormônios sobre a GL, a redução da ação de neurotransmissores sobre a GL, ao ambiente inflamatório das doenças auto-imunes relacionadas à tireoidopatias, ao aumento de espécies reativas de oxigênio nos tecidos ou à combinação de dois ou mais desses fatores (Clos *et al.*, 1989; Coll *et al.*, 1997; Eckstein *et al.*, 2004; Sarandol *et al.*, 2005).

A hipótese deste trabalho é de que os HTs atuem diretamente na GL, sua deficiência prolongada leva a alterações compatíveis ao olho seco e alterações da SO. Diante do exposto acima, é possível que os hormônios tireoidianos tenham efeitos diretos sobre os tecidos oculares, como, por exemplo, a conjuntiva e as glândulas de meibomius, como já foi observado para outros hormônios. Esses tecidos possuem receptores para o hormônio tireoidiano, portanto, aspectos histológicos e alterações bioquímicas indicam a possibilidade da ação direta do HT sobre esses tecidos-alvo através de receptor específico que poderia estar alterada no hipotireoidismo.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo é avaliar as relações do hormônio tireoidiano e a sua deficiência sobre a glândula lacrimal e a superfície ocular.

Objetivos específicos

- 2.1. Avaliar a presença do receptor para o HT (Thrb) em GL e tecidos oculares de ratos.
- 2.2. Avaliar a expressão do Thrb em GL de ratos, em condições normais e de hipotireoidismo.
- 2.3. Observar as alterações bioquímicas relacionadas ao estresse oxidativo e/ou de neurotransmissão da GL no hipotireoidismo.
- 2.4. Analisar as alterações histológicas e do filme lacrimal com a supressão do hormônio tireoidiano.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais experimentais

Ratos Wistar machos e fêmeas de 8 semanas foram obtidos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto do Biotério Animal Central, Ribeirão Preto, SP, Brasil. Os animais foram mantidos com dieta padrão e água *ad libitum*. Foi induzido o hipotireoidismo com tiamazol (Biolab Sanus, Taboão da Serra, São Paulo, Brasil) a 500 mg/l diluído na água do bebedouro durante 10 semanas. Todos os procedimentos experimentais aderiram às orientações para pesquisas com animais da “Association of Research in Vision and Ophthalmology e foram aprovados pelo comitê de estudo com animais de experimentação da FMRP-USP.

Estudos comparativos entre os dois grupos foram avaliados após 10 semanas com o uso diário de tiamazol, sob anestesia de éter etílico, após verificar se os reflexos corneanos e caudais tinham sido abolidos.

Coleta de tecido

O peso corpóreo foi medido no final do experimento, as glândulas lacrimais e tecidos oculares foram coletados, colocados em moldes submersos em gelo- seco diretamente fixado em OCT-tissue tek (Sakura Fine Tek Inc., Torrance, CA, USA) e congelados em nitrogênio líquido.

As glândulas lacrimais exoftálmicas foram homogeneizadas em solução-tampão (50mM tris HCl – pH: 7,5, 50mM NaCl, 0,1% triton e inibidor de

protease coquetel III (calbiochem), a sonicação foi feita com o uso do politron (Virsonic, Biopharma, Winchester, UK).

As amostras foram congeladas a -80°C até a realização dos procedimentos experimentais.

3.2. Teste de Schirmer e Citologia de Impressão

A secreção lacrimal foi medida do olho direito dos ratos de ambos os grupos, sob anestesia com éter, usando um teste de Schirmer modificado (Ophthalmos, São Paulo, Brasil), a 1 mm de largura e 20 mm de comprimento do papel do teste de Schirmer no fundo de saco de olho por 5 minutos, verificando o volume lacrimal dos ratos de ambos os grupos. Esse é um teste quantitativo da secreção das glândulas lacrimais que avalia diretamente a deficiência da camada aquosa da lágrima (Barabino & Dana, 2004).

As amostras de células do epitélio corneano foram obtidas através da citologia de impressão, teste laboratorial que permite a avaliação quantitativa do número de células caliciformes da conjuntiva e permite o estudo qualitativo da metaplasia epitelial. As amostras foram coletadas da mesma área (temporal) usando papel de filtro $0,45\ \mu\text{m}$ (Millipore, Billerica, MA, USA), após anestesia e transferidas para cassetes onde foram fixadas com etanol 70%, ácido acético glacial e formaldeído por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram reidratadas em etanol 70% por 2 minutos, imersas em ácido periódico a 0,5% por 5 minutos e em água destilada por 2 minutos. Foi preparada uma solução de reagente de Schiff na proporção 1:3 com água destilada onde as amostras ficaram imersas por 5 minutos. As amostras ficaram em solução de

metabissulfito de sódio a 0,5% por 2 minutos, lavadas em água de torneira e então coradas com hematoxilina de Harris durante 1 minuto. As amostras foram desidratadas em etanol e em seguida em xilol (processo de diafanização). Os papéis de filtro foram retirados dos cassetes e transferidos para lâminas que foram identificadas, montadas com Permount (Fisher) e cobertas com uma lamínula como proteção.

O grau de metaplasia escamosa avalia o estado da superfície ocular correlacionando-o com a sua gravidade e/ou cronicidade da deficiência lacrimal. Entre seus achados citológicos estão: diminuição da densidade de células caliciformes, aumento no tamanho e volume das células epiteliais não secretoras, aumento na estratificação celular, alterações metacromáticas na coloração citoplasmática, separação intercelular, alterações morfológicas no núcleo, aumento da relação núcleo citoplasmático das células epiteliais e aparecimento de queratinização. Estágios do epitélio foram avaliados de acordo com a classificação das células epiteliais em 4 estágios: estágio 0 (morfologia normal) a estágio 3 (metaplasia escamosa) (Barros *et al.*, 2001).

3.3. Análise de tiroxina

Tiroxina (T4) total e livre foram medidas através de imunoensaio em amostras sangüíneas dos animais de ambos os grupos e reveladas por quimioluminescência com o Immulite 2000, de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante (Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA, EUA).

A dosagem de T4 livre corresponde a um imunoensaio competitivo, quimioluminescente em fase sólida com análogo de T4. Os ciclos de incubação são de 2 de 30 minutos. É um teste direto na medida em que os resultados não são calculados em função dos valores de T4 total, mas por interpolação na curva de calibração armazenada, executada a partir de padrões com concentração de T4 livre conhecida. Isso ocorre porque a afinidade do anticorpo utilizado para T4 é semelhante à afinidade da albumina por T4, evitando assim deslocamento de T4 das proteínas onde se encontra ligado, para se ligar a esse anticorpo. O ensaio ocorre em condições fisiológicas de temperatura, pH e força iônica.

As pérolas de T4 livre são revestidas com anticorpo monoclonal de rato anti-T4. Os reagentes de T4 livre são líquidos. O primeiro e segundo reagentes consistem em T4 análogo ligado a marcador em tampão, com conservante. O terceiro reagente é constituído por fosfatase alcalina (de intestino de vitela) conjugado a antiligante em tampão, com conservante.

A dosagem de T4 total é também um imunoensaio competitivo de fase sólida de enzimas quimioluminescentes. O ciclo de incubação é de 30 minutos. As pérolas de T4 total são revestidas com anticorpo monoclonal de rato anti-T4. Os reagentes de T4 total são fosfatase alcalina (de intestino de vitela) conjugados com T4 e conservante.

Esse ensaio permitiu comparar as concentrações de T4 total e livre entre os dois grupos e assim confirmar a indução de hipotireoidismo com tiamazol.

3.4. Análises histológicas das glândulas de meibomius

Lâminas de parafina a partir da 10^o a 14^o secções do globo ocular com pálpebras de ambos os grupos foram submetidas à coloração por hematoxilina e eosina (5 amostras por animal, n = 5/grupo). As lâminas foram lavadas em água corrente por 3 min e em água destilada, coradas em hematoxilina durante 1 min, lavadas novamente durante 3 minutos, coradas com eosina por 2 min e eosina floxina por 1 min. As lâminas foram desidratadas em etanol, diafanizadas em xilol e a montagem foi feita com Permount em lâmina de microscopia.

3.5. Ensaio de acetilcolina e peroxidase na GL

Acetilcolina (Ach) e peroxidase foram medidas usando o “acetylcholine assay kit” (Amplex Red; Molecular Probes) com o propósito de comparar quantidades de neurotransmissores-chave e enzimas relacionadas com estresse oxidativo na GL de ambos os grupos (n=5/grupo), como previamente descrito (Zoukhri & Kublin, 2001) .

Para medir a Ach, 200 µg de proteínas do homogeneizado de tecido foram preparados em duplicata em placas com 96 poços. Uma curva-padrão de Ach foi traçada em cada experimento utilizando 100 mM de solução estoque de Ach em solução-tampão 1x produzindo uma concentração variável de 0 a 100uM. Foi preparada como controle negativo uma solução-tampão 1% sem Ach. E como controle positivo foi utilizado H₂O₂ a 20mM em 10uM de solução-tampão. Em cada poço foram adicionados 0,1ml de solução-tampão (50 mM

de Tris-HCl, pH 7.5) e 0,2M do reagente Amplex Red, 2 U/ml de peroxidase, 0,2 U/ml de colina oxidase e 10 U/ml de acetil colinesterase. A reação foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente e protegida da luz. Após a incubação, a absorbância foi determinada em espectrofotômetro (Beckman, DU 640, USA) usando um comprimento de onda de 590 nm.

Para o ensaio de peroxidase, comparando os dois grupos, foi preparada uma curva de calibração de 0,05mM, 0,1mM, 0,2mM e 0,4mM de peróxido de hidrogênio. O volume foi completado para 100 µl com tampão Tris-HCl a 50mM e pH:8,0.

Foi feita uma dosagem de proteínas do homogeneizado de glândula lacrimal, pelo método de Bradford, normalizando as concentrações das amostras com 40 µg de proteínas de cada amostra.

Foi preparado o reagente Amplex com 200 µl do amplex Red, 200 µl de H₂O₂ diluído em tampão Tris-HCl a 50mM e pH: 8,0 sob proteção da luz. Em seguida, foram adicionados 100 µl do reagente Amplex em cada amostra, a leitura foi feita logo em seguida e após 30 min de incubação em espectrofotômetro a 530 nm (Molecular Devices 250). Foi preparado um controle positivo com H₂O₂, tampão e reagente Amplex e como controle negativo foi usado tampão e reagente Amplex, sem H₂O₂.

A atividade de peroxidase de cada amostra foi obtida, comparando a absorbância com o dado da curva-padrão com concentração conhecida no mesmo momento. As comparações foram feitas entre os grupos com 30 minutos de incubação (Stoppiglia *et al.*, 2002) .

3.6. Peroxidação lipídica e níveis de GSH

A peroxidação lipídica foi determinada por estimar a presença de malonaldeído usando o teste do ácido tiobarbitúrico. Após a normalização dos níveis de proteínas do homogeneizado de GL de ambos os grupos, as amostras foram desproteinizadas com 20% de ácido tricloroacético, agitadas por 30 min, centrifugadas a 3000 rpm. O sobrenadante foi exposto a 0,7% do ácido tiobarbitúrico e aquecido por 95° C por 45 min, e após esfriar a absorbância foi lida em 530 nm em espectrofotômetro Spectra Max 250 (Esterbauer & Cheeseman, 1990) .

Para o ensaio de GSH foi preparada uma curva de calibração de 25 µmol, 50 µmol, 100 µmol de padrão GSH nos quais foram adicionados EDTA. Em seguida foram adicionados em cada tubo 2 ml de tampão Tris HCl a 0,4M e pH: 8,9 e 50uL de dodecil ditio 5-(ácido 2 nitrobenzóico). Após a incubação por 5 minutos, a absorbância foi lida a 412 nm no espectrofotômetro (Beckman, DU 640, EUA).

3.7. Avaliação da expressão de Thrb1 na superfície ocular e na glândula lacrimal

Foi realizado o *western blot* para avaliar a expressão de Thrb em lisados de células da GL obtidas de ratos de ambos os grupos.

Eletrforese em gel de poliacrilamida

Géis de poliacrilamida foram preparados em duas fases. A fase de empilhamento foi disposta superiormente, contendo 4,2 ml de água desionizada, 1,25 ml de poliacrilamida a 40%, 25 µl de Temed, 270 µl de APS a 10% e 5,6 ml de solução-tampão de empilhamento com pH de 6,7 composta de EDTA a 4mM, SDS a 10%, 50 mM de Trisma base, diluídos em água desionizada completando 1 litro. A fase de resolução, disposta inferiormente, composta de acrilamida nas concentrações de 10%, 1,9 ml de água desionizada, 1,8 ml de glicerol, 4,2 ml de acrilamida 40%, Temed e APS nos volumes descritos acima e 9 ml da solução-tampão de resolução com pH de 8,9 composta de EDTA a 4mM, SDS a 2%, 750 mM de Trisma base e água desionizada para completar 2 litros.

Alíquotas com concentrações protéicas semelhantes, quantificadas pelo teste de Bradford foram aplicadas nos géis SDS-PAGE em aparelho minigel (Miniprotean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EUA) em paralelo com marcadores de pesos moleculares conhecidos (BioRad, Hercules, CA, EUA) em tampão de corrida composto por 200mM de Trisma base, 1,52 mM de glicina, 7,18 mM de EDTA, SDS a 0,4%, diluídos em água desionizada. Foram adicionados ainda 50 µl de beta-mercapto-etanol (BioRad, Hercules, CA, EUA) para aumentar a permeabilidade das proteínas de alto peso molecular. A voltagem, inicialmente de 20 volts, foi sistematicamente ajustada para 100 volts à medida que as amostras passavam da fase de empilhamento para a fase de resolução, segundo o método já descrito (Carvalho *et al.*, 1996).

Transferência e *immunoblotting*

Após a separação por eletroforese, as proteínas isoladas foram transferidas para membranas de nitrocelulose Hybond ECL (Amersham Biosciences, Freiburg, Alemanha), realizada durante 120 minutos a 120 v em aparelho miniaturizado de transferência (BioRad Laboratories, Richmond, CA, EUA) em solução de transferência composta por 25 mM de Trisma base, 192 mM de glicina, metanol a 20%, SDS a 0,02% e água desionizada completando o volume de 2 litros, conforme descrito anteriormente (Carvalho *et al.*, 1996) . As membranas foram então incubadas por duas horas em solução bloqueadora de soro-albumina bovina (BSA) 3%, para diminuir as ligações inespecíficas das proteínas contendo 0,3 g de BSA, 2 mg de azida sódica, Tris a 10mM, NaCl a 150 mM e Tween 20 a 0,02% em 10 ml de água desionizada. Após o bloqueio, as membranas foram então incubadas *overnight* usando o anticorpo policlonal de coelho anti-Thrb1 (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA) numa concentração de 0,4 µg/µl em um tampão com 3% de soro de albumina bovina (BSA), e então lavadas três vezes como descrito acima. Os blots foram então incubados com fosfatase e revelados com DAB (Amersham, Buckinghamshire, UK). Membranas foram escaneadas, convertidas para imagens digitais e analisadas pelo Scion Image Análises Software (Scion Corp, Frederick, MD, USA).

3.8. Localização imunohistoquímica de Thrb1 na GL, conjuntiva e córnea de ratos

A expressão de Thrb1 foi avaliada na GL, conjuntiva e córnea de ratos através da imunohistoquímica. As amostras de tecido congeladas (i.e., glândulas lacrimais e globo ocular de ratos) foram colocadas em formas e embebidas em OCT-tissue tek (Miles, Elkhart, IN), resfriadas a -20 °C, seccionadas na espessura de 6µm (Microm HM 505 E, Carl Zeiss Inc., NY) e, em seguida, transferidas para lâminas de microscopia (Perfecta, São Paulo, SP, Brasil), previamente tratadas com polilisina – L (Sigma, St. Louis, MO).

Essas secções foram fixadas em acetona por 5 min a -20 °C, depois incubadas com H₂O₂ a 0,1% por 5 minutos, lavadas em solução-tampão fosfato, contendo 50mM de fosfato de sódio, 150mM de cloreto de sódio, com pH ajustado para 7,3. Em seguida foram processadas para imunohistoquímica como previamente descrito (Rocha *et al.*, 2000b) . Em resumo, as secções foram então expostas a soro de ovelha a 2% por 20 minutos a 4°C (Vector, Burlingame, CA, USA), a fim de bloquear ligações específicas. Em seguida, anticorpos policlonais de coelho anti-Thrb1 (Santa Cruz Biotechnologies) numa concentração de 4 µg/µl em solução-tampão de fosfato e albumina bovina a 1% (Gibco BRL, USA) foram colocados sobre as lâminas e mantidos em câmara úmida a 4 °C por 4 horas.

Após lavar com solução-tampão de fosfato, as secções foram incubadas com anticorpo biotinizado de ovelha anti-IgG de coelho (Vector Laboratories, Burlingame, CA) e depois de 35 minutos foram novamente lavadas com solução-tampão de fosfato. O reagente complexo avidina-biotina (ABC) (Vector

Laboratories, Burlingame, CA) foi colocado e após 40 minutos de incubação, seguiu-se nova lavagem com solução-tampão de fosfato, e por fim, as secções foram expostas por 5 minutos a uma solução reveladora contendo diaminobenzidina (DAB) e H₂O₂ (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Depois disso, as secções foram contracoradas com hematoxilina de Harris (Sigma, St. Louis, MO), cobertas com Permount (Fisher) e em seguida com uma lamínula de vidro. A documentação fotográfica foi feita usando Nikon Eclipse E 800 (Nikon USA, Melville, NY).

3.9. Análise estatística

Os resultados numéricos foram expressos com a média, seguida do erro-padrão médio (média \pm E. P. M). Comparações foram feitas usando o teste “Mann-Whitney U” para dados contínuos (Statview software, Abacus, CA USA) e teste de Fisher para dados categóricos (Graphpad 3.0 software, Prisma, São Diego, CA, USA). Valores densitométricos foram expressos em porcentagem da média dos valores obtidos para o grupo controle, os quais foram definidos como 100% em cada ensaio experimental. O nível de significância usado foi $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

O peso corpóreo, peso da glândula lacrimal, teste de schirmer e concentração plasmática de T4 (*i.e*, total e livre) foram mais baixos nos grupos hipotireoideos.

	Controle	Hipotireoideo	P
Peso Corpóreo (g) *	555±17,8	284±8,9	< 0, 0001
Peso da GL (mg)*	65±5,8	26±3,1	< 0, 0001
PGL/PC	123,9±14,1	91,9±13,9	0,1437
T4 total (ng/dl)*	3,11±0,16	<1,00±0, 001	0, 0003
T4 livre (ng/dl)*	2,03±0,14	<0,31±0,01	0, 0003

Tabela 1. Comparação dos parâmetros estruturais e bioquímicos de GL entre ratos hipotireoideos e controles. Dados são relatados em média ± EPM. (* P<0,05).

Animais controles e hipotireoideos apresentaram o conteúdo na GL, similares de MDA (P=0,7), contudo, GSH foi significativamente mais alto (P=0,008), Ach e peroxidase foram significativamente mais baixos no grupo hipotireoideo (P= 0,01 e 0,008, respectivamente, “Mann-Whitney U”)

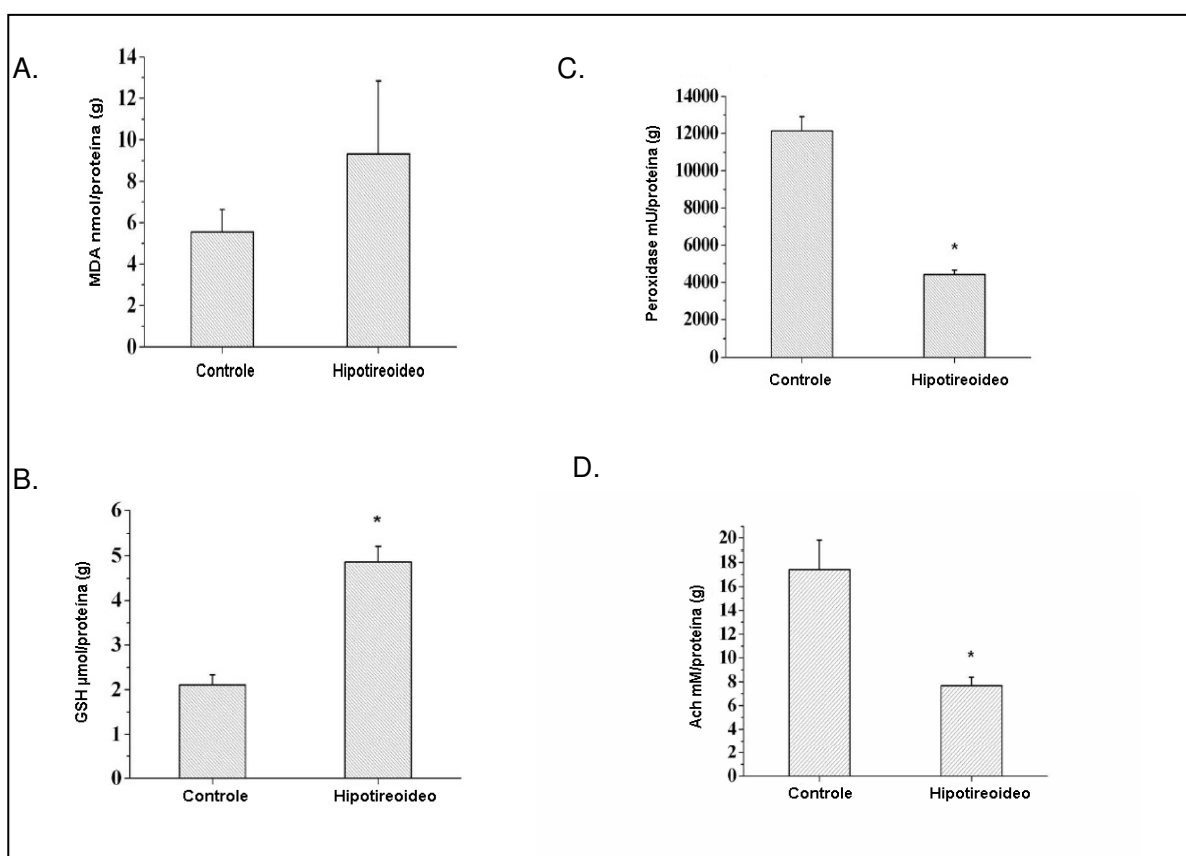


Figura 1. Análise de MDA (nmol/g) (A), atividade de peroxidase (%) (B), GSH (µM/g) (C), e Ach (D) em homogeneizado de GL de ratos controles e hipotireoideos (n=5-8/grupo). Análises espectrofotométricas foram feitas e comparadas a padrões. *P<0,05 (teste “Mann-Whitney U”).

A avaliação estrutural dos cortes das GMs corados pela hematoxilina/eosina não revelou diferenças significativas na sua área ou estrutura.

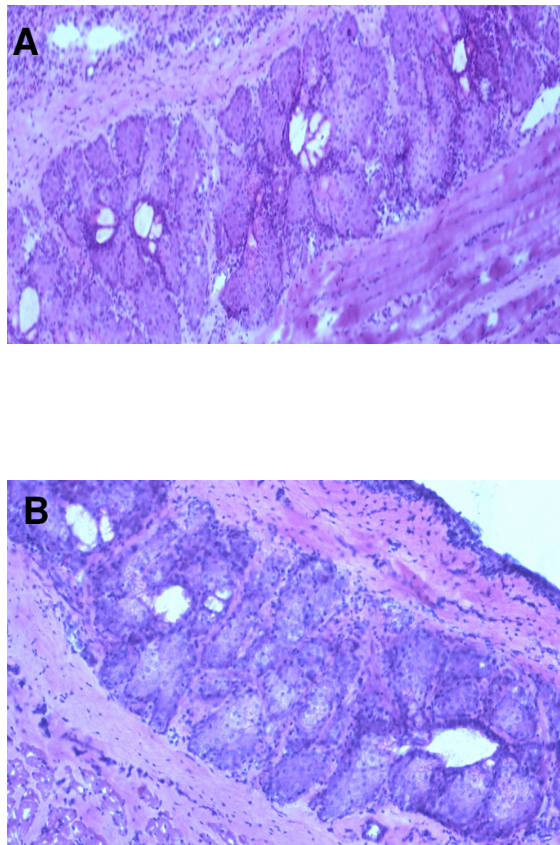


Figura 2. Foto representativa ilustrando a similaridade das glândulas de meibomius (GM) em ratos controles (A) e hipotireoideos (B). Lâminas foram excisadas, congeladas, fixadas e coradas com HE. Imagens digitais obtidas de cortes da região central das GMs que foram comparadas entre os grupos (100x).

Através da citologia de impressão do epitélio corneano observamos um alto nível de alteração epitelial celular, mas sem queratinização metaplásica no grupo hipotireoideo ($P= 0,002$, teste de Fisher).

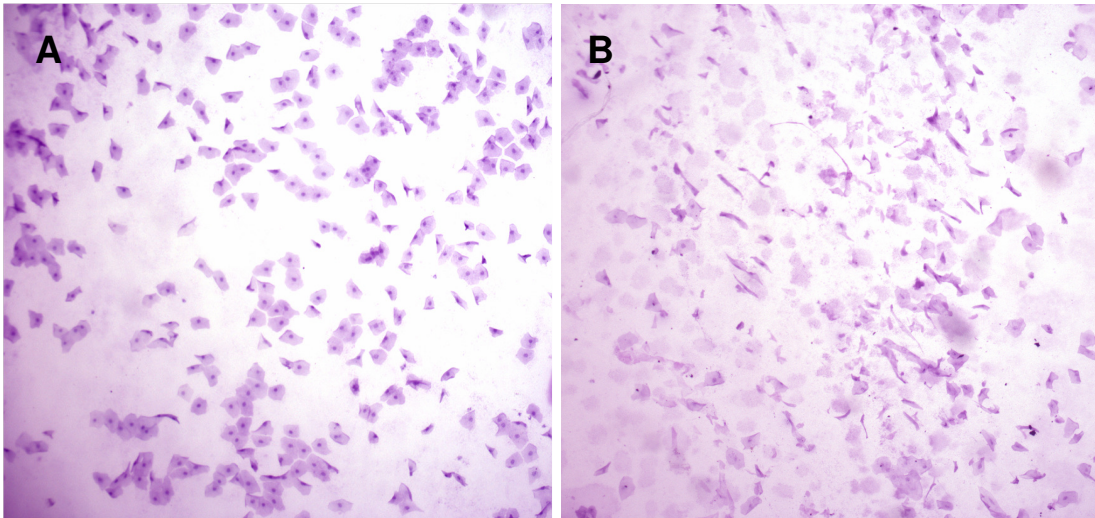


Figura 3. Representação microfotográfica de citologia de impressão de córnea de ratos controles (A) e hipotireoideos (B) ($n=8$ /grupo). Estágios de 0 a 3 foram atribuídos para cada amostra de maneira mascarada, considerando o formato de célula, tamanho do núcleo e presença de muco. Dados diferem significativamente entre ratos hipotireoideos e controles ($P= 0,002$; Teste de Fisher).

A expressão de relação entre o receptor Thrb e a proteína estrutural de célula, a tubulina, foi detectada em GL de ratos e o aumento da expressão de Thrb1 foi detectado em homogeneizados de GL de animais hipotireoideos comparados aos controles (n=5 por grupo) (P=0, 001). Esses resultados foram confirmados em três experimentos independentes.

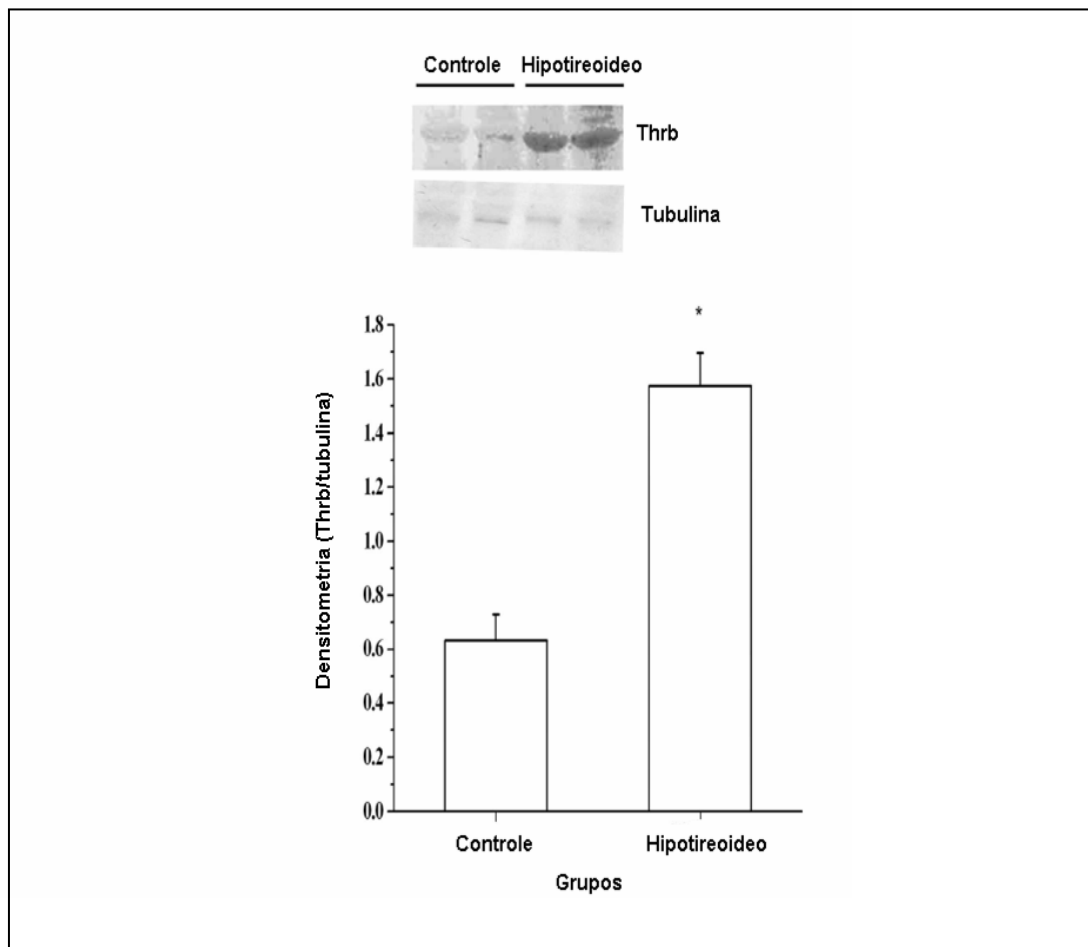


Figura 4. Efeito do hipotireoidismo na expressão de Thrb em GL. Após 10 semanas de tratamento com tiamazol, GLs foram extraídas, homogeneizadas (n=5 animais por grupo) e analisadas por *western blot* usando um anticorpo anti-Thrb1. Valores foram relatados como significativos \pm EPM. Valores obtidos do grupo controle foram definidos com 100%, e valores obtidos de animais hipotireoideos foram expressos como uma porcentagem deste valor.

As imagens obtidas pela imunohistoquímica demonstraram a expressão de Thrb no núcleo de células acinares e ductos de GL. Houve uma maior expressão de Thrb1 nas GLs do grupo hipotireoideo.

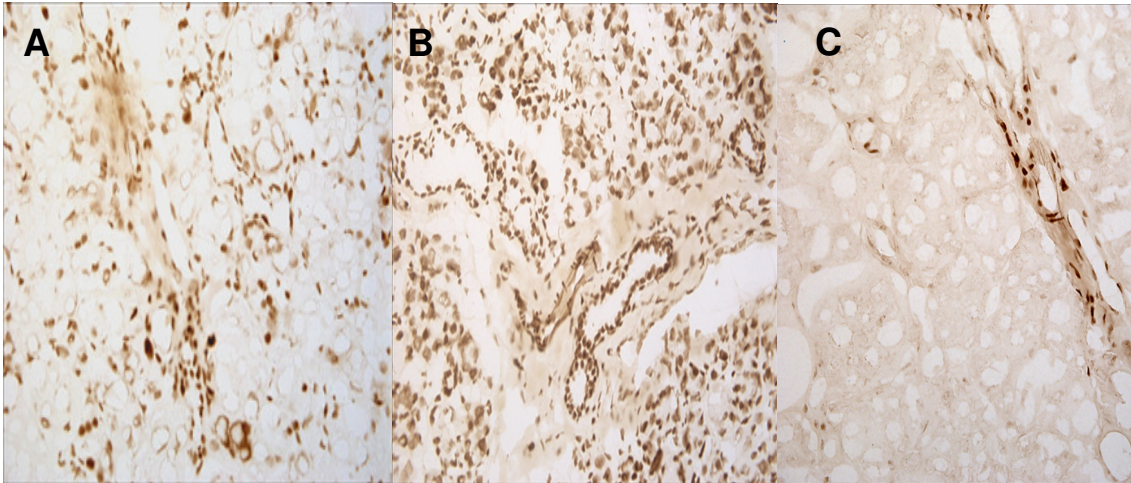


Figura 5. Representação imunohistoquímica de GL de ratos machos. (A) A coloração demonstra Thrb1 no núcleo de células acinares e ductos de GL de ratos controles, (B) de ratos hipotireoideos. (C) Controle negativo apenas a presença de *background*. As micrografias são representativas de três experimentos independentes com 5 animais cada.

A expressão de Thrb também foi observada no epitélio da conjuntiva, com alta densidade nas camadas basais.

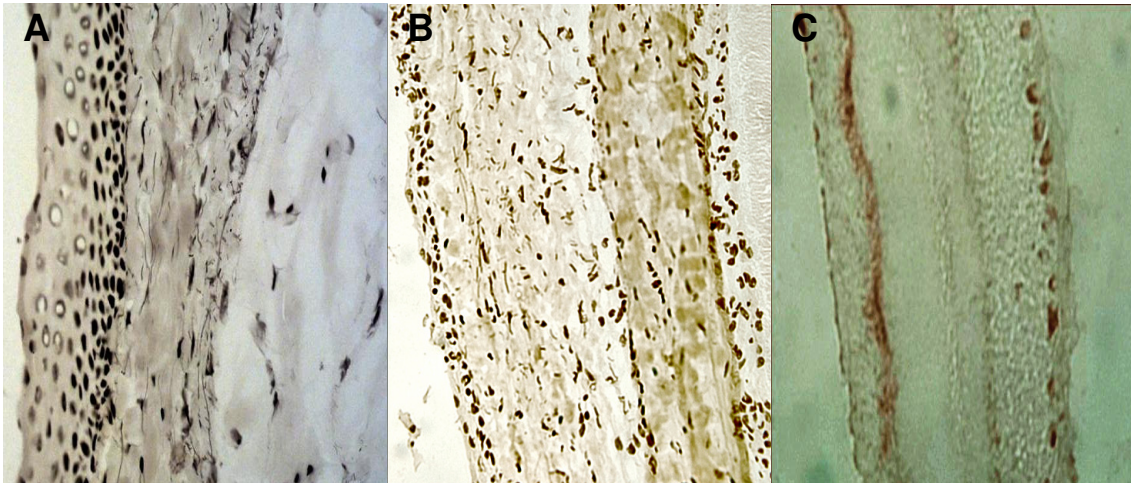


Figura 6. Representação imunoistoquímica demonstrando Thrb1 na conjuntiva de ratos controles (A), ratos hipotireoideos (B) e controle negativo (C). As micrografias são representativas de três experimentos independentes com 5 animais cada.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Como sugerido previamente, o nosso estudo confirma que o HT regula a estrutura e função da GL e a supressão de HT, como ocorre no hipotireoidismo pode predispor à síndrome do olho seco e a um desarranjo na SO. O presente estudo demonstra a presença de Thrb1, predominantemente no núcleo de células epiteliais acinares de GL, córnea e conjuntiva. A alta expressão de Thrb1 em GL de hipotireoideos indica que esta estrutura é tecido-alvo para o HT, como já observado para outros hormônios, previamente investigados (Rocha *et al.*, 2000a; Rocha *et al.*, 2000b) .

Após 10 semanas, com a deficiência do HT, ocorre maior expressão de Thrb1 em GL. Em contrapartida, após 10-16 dias de castração ou hipofisectomia de ratos machos para reduzir a expressão do receptor andrógeno na GL, e após 4 semanas de diabetes mellitus há uma redução na ativação, sem aumento na expressão do receptor de insulina (RI) (Rocha *et al.*, 1993; Rocha *et al.*, 2000a) . As diferenças relacionadas a receptores de diferentes hormônios na GL e a deficiência desses hormônios podem ser devido a vários fatores, incluindo período da doença e resposta específica do tecido para cada privação hormonal.

O nosso estudo revela que o hipotireoidismo tem impacto na secreção lacrimal e células epiteliais da córnea, confirmando estudos epidemiológicos, clínicos e experimentais no hipotireoidismo e síndrome do olho seco (Hoffman *et al.*, 1989; Moss *et al.*, 2000) .

Em estudos clínicos, os danos auto-imunes da GL e da glândula tireóide estão associados, sugerindo que o processo inflamatório seja a causa da

disfunção lacrimal, contudo um efeito sinérgico combinando a disfunção do filme lacrimal devido à inflamação e baixa estimulação do HT para glândulas exócrinas e tecidos epiteliais da superfície ocular é também uma hipótese clínica considerável. Uma vez que tanto no trabalho atual como em estudos experimentais anteriores, a supressão do HT foi o modelo adotado, havendo alteração funcional, sem nenhuma infiltração de linfócitos na GL, superfície ocular ou GM (Hoffman *et al.*, 1989; Coll *et al.*, 1997; Moss *et al.*, 2000) .

O hipotireoidismo é uma doença que tem grande impacto sobre o metabolismo basal nos tecidos. Em estudos anteriores sugeriu-se que os hormônios tireoidianos estão associados com o estado oxidante e antioxidante do organismo e que o hipotireoidismo está acompanhado do aumento do estresse oxidativo (Sarandol,2005).

Um mecanismo testado aqui para esclarecer a fisiopatologia das mudanças na GL foi de acúmulo de espécies reativas de oxigênio. Observamos altos níveis de GSH sugerindo que a GL está respondendo a um dano oxidativo podendo ter um papel no olho seco, relacionado ao hipotireoidismo como observado em outros órgãos (Sarandol *et al.*, 2005) .

O MDA apresentou maior expressão em GL de hipotireoideos, mas houve uma grande variação nos valores os quais não foram observados nem em outros tecidos nem em GLs de outros modelos animais. Embora esta tendência possa confirmar nossa hipótese, isto também sugere uma limitação deste método no modelo presente, como marcador de oxidação lipídica.

Além disso, a redução nos níveis de Ach na GL do grupo hipotireoideo indica que o mecanismo de doença é complexo, multifatorial e pode envolver redução nos impulsos neurais, sugerindo danos neurotróficos que contribuem

para a redução da secreção lacrimal nesta condição. Uma hipótese similar foi confirmada para os mecanismos bioquímicos relacionados a esse mesmo neurotransmissor em sistema nervoso central de ratos (Clos *et al.*, 1989) .

Estudos prévios indicaram que o hipotireoidismo reduziu o tamanho das glândulas de Harderian, responsáveis pela secreção lacrimal em roedores e que o HT pode mudar o dimorfismo sexual daquelas glândulas (Hoffman *et al.*, 1989), (Miller & Panciera, 1994) . Essa diminuição também ocorreu em nosso estudo com as GLs, mais especificamente as GLs extra-orbitárias, e esse evento pode ser por diminuição do estímulo neurotrófico, redução do estímulo hormonal direto sobre a GL, ou ainda a combinação desses com outros fatores.

As observações de dimorfismo sexual e sua alteração na GL, relacionados com supressão do HT não foram confirmadas comparando a estrutura de GL de ratos hipotireoideos do sexo feminino e masculino; ou a expressão de *Thrb1* na GL de machos e fêmeas normais de mesma idade (Sullivan *et al.*, 1998; Rocha *et al.*, 2002) .

Futuros estudos são necessários para determinar se os efeitos dos hormônios sexuais são alterados nos tecidos na vigência de outro distúrbio hormonal, como o hipotireoidismo ou o diabetes mellitus.

Em resumo, nosso estudo aponta relações entre o hipotireoidismo e a expressão do *Thrb1* em GL, mostra a expressão desse receptor hormonal em outros tecidos da superfície ocular e sugere que alterações bioquímicas e funcionais observadas no tratamento, em direção ao olho seco, podem ser direta e localmente causadas por essa hipofunção hormonal. O aprofundamento desse conhecimento pode permitir identificar mecanismos específicos de doença no olho seco e até potenciais medidas terapêuticas.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

6.1. O receptor Thrb1 está presente na GLs, córnea e conjuntiva de ratos.

6.2. O receptor Thrb1 apresentou uma maior expressão nas GL do grupo de ratos hipotireoideos.

6.3. O hipotireoidismo levou a diminuição significativa de marcadores de estresse oxidativo peroxidase e do neurotransmissor Ach em GL e aumento significativo de GSH.

6.4. O hipotireoidismo reduziu o peso da GL, alterou o epitélio da SO e levou à diminuição da produção lacrimal.

De forma geral, este estudo conclui que GL e SO são tecidos-alvo para o hormônio tireoídiano e que o hipotireoidismo induz alterações compatíveis com olho seco.

7. SUMMARY

7. SUMMARY

Hormone diseases induce alterations in lacrimal gland (LG) and ocular surface (OS). Thyroid hormone (TH) induces cell proliferation and lipid metabolism through activation of thyroid hormone receptors. The aim of the present work was to evaluate the location and comparative expression of thyroid hormone receptor β -1 (Thrb1) in LG of rats with hypothyroidism and controls and the impact of this disease in LG and OS structure and function. Hypothyroidism was induced in Wistar male rats with chronic use of tiamazole. Ten weeks later corneal cells were collected for impression cytology (IC). Rats were euthanized and tissues evaluated by immunoperoxidase and western blot for Thrb1. The content of malondialdehyde (MDA) and Acetylcholine (Ach) in LG were determined by spectrophotometry (n=5/group in all experiments). Body weight and LG weight was significantly lower in hypothyroid rats ($P<0.05$). Western blot indicated that LG express Thrb1 and that hypothyroidism induce higher expression of this receptor. The immunohistochemistry shows the presence of de Thrb1 in the nuclei of acinar and ductal cells of control and hypothyroid GL. IC significantly difference and Ach was significantly lower in hypothyroid rats ($P<0.05$). Chronic reduced levels of TH lead to biochemical and structural alterations and modulate the levels of Thrb1 in LG. These events confirm that LG is a target organ for TH and may help to understand the mechanism related to dry eye in hypothyroidism.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akramian J, Wedrich A, Nepp J & Sator M. (1998). Estrogen therapy in keratoconjunctivitis sicca. *Advances in experimental medicine and biology* **438**, 1005-1009.
- Andrade JL, Haro JM, Castillo MA, de Luna JD & Vargas F. (1992). Effects of methimazole on low-renal-mass hypertension: changes in blood pressure and pressor responsiveness to vasoconstrictors. *Pharmacology* **44**, 315-323.
- Barabino S & Dana MR. (2004). Animal models of dry eye: a critical assessment of opportunities and limitations. *Investigative ophthalmology & visual science* **45**, 1641-1646.
- Barros JN, Mascaro VL, Pereira Gomes JA, Freitas D & Lima ALH. (2001). Impression cytology of the ocular surface: examination technique and staining procedure. *Arq Bras Oftalmol* **64**, 127-131.
- Bassett JH, Harvey CB & Williams GR. (2003). Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. *Molecular and cellular endocrinology* **213**, 1-11.
- Bauer M & Whybrow PC. (2001). Thyroid hormone, neural tissue and mood modulation. *World J Biol Psychiatry* **2**, 59-69.
- Baxter JD, Eberhardt NL, Apriletti JW, Johnson LK, Ivarie RD, Schachter BS, Morris JA, Seeburg PH, Goodman HM, Latham KR, Polansky JR & Martial JA. (1979). Thyroid hormone receptors and responses. *Recent progress in hormone research* **35**, 97-153.
- Billoni N, Buan B, Gautier B, Gaillard O, Mahe YF & Bernard BA. (2000). Thyroid hormone receptor beta1 is expressed in the human hair follicle. *Br J Dermatol* **142**, 645-652.
- Boas NF & Bates RW. (1954). Role of the thyroid and anterior pituitary glands in the maintenance of the harderian glands of the rat. *Endocrinology* **55**, 601-612.
- Braverman LE, Ingbar SH & Sterling K. (1970). Conversion of thyroxine (T4) to triiodothyronine (T3) in athyreotic human subjects. *The Journal of clinical investigation* **49**, 855-864.
- Brent GA. (1994). The molecular basis of thyroid hormone action. *N Engl J Med* **331**, 847-853.
- Bromberg BB & Welch MH. (1985). Lacrimal protein secretion: comparison of young and old rats. *Experimental eye research* **40**, 313-320.

- Caffery BE, Richter D, Simpson T, Fonn D, Doughty M & Gordon K. (1998). CANDEES. The Canadian Dry Eye Epidemiology Study. *Advances in experimental medicine and biology* **438**, 805-806.
- Campbell KL & Davis CA. (1990). Effects of thyroid hormones on serum and cutaneous fatty acid concentrations in dogs. *American journal of veterinary research* **51**, 752-756.
- Canaris GJ, Manowitz NR, Mayor G & Ridgway EC. (2000). The Colorado thyroid disease prevalence study. *Archives of internal medicine* **160**, 526-534.
- Carriere R. (1964). The Influence of the Thyroid Gland on Polyploid Cell Formation in the External Orbital Gland of the Rat. *The American journal of anatomy* **115**, 1-15.
- Carvalho C, Geslin P & Vaz Pato MV. (1996). Pulsed field gel electrophoresis in *Streptococcus pneumoniae* isolated in France and Portugal. *Pathologie-biologie* **44**, 430-434.
- Clos J, Ghandour S, Eberhart R, Vincendon G & Gombos G. (1989). The cholinergic system in developing cerebellum: comparative study of normal, hypothyroid and underfed rats. *Dev Neurosci* **11**, 188-204.
- Coll J, Anglada J, Tomas S, Reth P, Goday A, Millan M, Pujol-Borrell R & Corominas J. (1997). High prevalence of subclinical Sjogren's syndrome features in patients with autoimmune thyroid disease. *The Journal of rheumatology* **24**, 1719-1724.
- Dartt DA. (2001). Regulation of lacrimal gland secretion by neurotransmitters and the EGF family of growth factors. *Experimental eye research* **73**, 741-752.
- Davies TF. (2002). Choosing a career in thyroid. *Thyroid* **12**, 537.
- Driver PJ & Lemp MA. (1996). Meibomian gland dysfunction. *Survey of ophthalmology* **40**, 343-367.
- Eckstein AK, Finkenrath A, Heiligenhaus A, Renzing-Kohler K, Esser J, Kruger C, Quadbeck B, Steuhl KP & Gieseler RK. (2004). Dry eye syndrome in thyroid-associated ophthalmopathy: lacrimal expression of TSH receptor suggests involvement of TSHR-specific autoantibodies. *Acta Ophthalmol Scand* **82**, 291-297.
- Esmaeli B, Harvey JT & Hewlett B. (2000). Immunohistochemical evidence for estrogen receptors in meibomian glands. *Ophthalmology* **107**, 180-184.

- Esterbauer H & Cheeseman KH. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* **186**, 407-421.
- Fatourechi V, Bergstralh EJ, Garrity JA, Bartley GB, Beatty CW, Offord KP & Gorman CA. (1994). Predictors of response to transantral orbital decompression in severe Graves' ophthalmopathy. *Mayo Clinic proceedings* **69**, 841-848.
- Forrest, D. (1996). Thyroid hormone receptor beta is essential for development of auditory function. *Nature genetics* **13**,354-357.
- Goolamali SK, Evered D & Shuster S. (1976). Thyroid disease and sebaceous function. *Br Med J* **1**, 432-433.
- Goto E, Yagi Y, Matsumoto Y & Tsubota K. (2002). Impaired functional visual acuity of dry eye patients. *Am J Ophthalmol* **133**, 181-186.
- Halliwell B. (1989). Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol* **70**, 737-57.
- Halliwell B. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British journal of pharmacology* **142**, 231-255.
- Halliwell B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology* **141**, 312-322.
- Hoffman RA, Wertz P & Habeeb P. (1989). Harderian glands of golden hamsters: morphological and biochemical responses to thyroid hormones. *Journal of comparative physiology* **159**, 293-299.
- Huang FC, Tseng SH, Shih MH & Chen FK. (2002). Effect of artificial tears on corneal surface regularity, contrast sensitivity, and glare disability in dry eyes. *Ophthalmology* **109**, 1934-1940.
- Huber G, Staub JJ, Meier C, Mitrache C, Guglielmetti M, Huber P & Braverman LE. (2002). Prospective study of the spontaneous course of subclinical hypothyroidism: prognostic value of thyrotropin, thyroid reserve, and thyroid antibodies. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **87**, 3221-3226.
- Kek PC, Ho SC & Khoo DH. (2003). Subclinical thyroid disease. *Singapore medical journal* **44**, 595-600.
- Lee AJ, Lee J, Saw SM, Gazzard G, Koh D, Widjaja D & Tan DT. (2002). Prevalence and risk factors associated with dry eye symptoms: a population based study in Indonesia. *Br J Ophthalmol* **86**, 1347-1351.

- Lemp MA. (1995). Report of the National Eye Institute/Industry workshop on Clinical Trials in Dry Eyes. *Ciao J* **21**, 221-232.
- Liewendahl K, Helenius T, Lamberg BA, Mahonen H & Wagar G. (1987). Free thyroxine, free triiodothyronine, and thyrotropin concentrations in hypothyroid and thyroid carcinoma patients receiving thyroxine therapy. *Acta endocrinologica* **116**, 418-424.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL & Randall RJ. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275.
- McCarty CA, Bansal AK, Livingston PM, Stanislavsky YL & Taylor HR. (1998). The epidemiology of dry eye in Melbourne, Australia. *Ophthalmology* **105**, 1114-1119.
- Miller PE & Panciera DL. (1994). Effects of experimentally induced hypothyroidism on the eye and ocular adnexa of dogs. *American journal of veterinary research* **55**, 692-697.
- Moss SE, Klein R & Klein BE. (2000). Prevalence of and risk factors for dry eye syndrome. *Archives of ophthalmology* **118**, 1264-1268.
- Moss SE, Klein R & Klein BE. (2004). Incidence of dry eye in an older population. *Archives of ophthalmology* **122**, 369-373.
- Nelson JD. (1982). Ocular surface impressions using cellulose acetate filter material. Ocular pemphigoid. *Survey of ophthalmology* **27**, 67-69.
- Nicotera P & Orrenius S. (1986). Role of thiols in protection against biological reactive intermediates. *Advances in experimental medicine and biology* **197**, 41-51.
- Paller MS. (1986). Hypothyroidism protects against free radical damage in ischemic acute renal failure. *Kidney international* **29**, 1162-1166.
- Pflugfelder SC, Jones D, Ji Z, Afonso A & Monroy D. (1999). Altered cytokine balance in the tear fluid and conjunctiva of patients with Sjogren's syndrome keratoconjunctivitis sicca. *Curr Eye Res* **19**, 201-211.
- Pflugfelder SC, Tseng SC, Yoshino K, Monroy D, Felix C & Reis BL. (1997). Correlation of goblet cell density and mucosal epithelial membrane mucin expression with rose bengal staining in patients with ocular irritation. *Ophthalmology* **104**, 223-235.
- Ramos-Remus C, Suarez-Almazor M & Russell AS. (1994). Low tear production in patients with diabetes mellitus is not due to Sjogren's syndrome. *Clinical and experimental rheumatology* **12**, 375-380.
- Refetoff, S. (1993). The syndromes of resistance to thyroid hormone. *Endocrine reviews* **14**, 348-399

- Ribeiro RC, Kushner PJ, Baxter JD. (1995). The nuclear hormone receptor gene superfamily. *Annual review of medicine* **46**,443-453
- Ribeiro RC, Apriletti JW, Wagner RL, West BL, Feng W, Huber R, Kushner PJ, Nilsson S, Scanlan T, Fletterick RJ, Schaufele F & Baxter JD. (1998). Mechanisms of thyroid hormone action: insights from X-ray crystallographic and functional studies. *Recent progress in hormone research* **53**, 351-392; discussion 392-354.
- Rieger G. (1992). [Changes in Contrast Sensitivity after Iodine Treatment in Bad Hall in Patients with Age-Related Maculopathy]. *Ophthalmologica Journal international d'ophtalmologie International journal of ophthalmology* **205**, 100-104.
- Rios JD, Horikawa Y, Chen LL, Kublin CL, Hodges RR, Dartt DA & Zoukhri D. (2005). Age-dependent alterations in mouse exorbital lacrimal gland structure, innervation and secretory response. *Exp Eye Res* **80**, 477-491.
- Rocha EM, de MLMH, Carvalho CR, Saad MJ & Velloso LA. (2000a). Characterization of the insulin-signaling pathway in lacrimal and salivary glands of rats. *Curr Eye Res* **21**, 833-842.
- Rocha EM, Hirata AE, Carneiro EM, Saad MJ & Velloso LA. (2002). Impact of gender on insulin signaling pathway in lacrimal and salivary glands of rats. *Endocrine* **18**, 191-199.
- Rocha EM, Rocha FJ, Kara José Jr. N & Aguilar AJ. (2006). Olho Seco. In *Superfície Ocular*, ed. Gomes JAP & Alves MR, pp. 57-68. Cultura Médica, Rio de Janeiro.
- Rocha EM, Wickham LA, da Silveira LA, Krenzer KL, Yu FS, Toda I, Sullivan BD & Sullivan DA. (2000b). Identification of androgen receptor protein and 5alpha-reductase mRNA in human ocular tissues. *Br J Ophthalmol* **84**, 76-84.
- Rocha EM, Wickham LA, Huang Z, Toda I, Gao J, da Silveira LA & Sullivan DA. (1998). Presence and testosterone influence on the levels of anti- and pro-inflammatory cytokines in lacrimal tissues of a mouse model of Sjogren's syndrome. *Advances in experimental medicine and biology* **438**, 485-491.
- Rocha FJ, Wickham LA, Pena JD, Gao J, Ono M, Lambert RW, Kelleher RS & Sullivan DA. (1993). Influence of gender and the endocrine environment on the distribution of androgen receptors in the lacrimal gland. *J Steroid Biochem Mol Biol* **46**, 737-749.
- Sarandol E, Tas S, Dirican M & Serdar Z. (2005). Oxidative stress and serum paraoxonase activity in experimental hypothyroidism: effect of vitamin E supplementation. *Cell Biochem Funct* **23**, 1-8.

- Scandalios JG. (2005). Oxidative stress, molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian journal of medical and biological research* **38**, 995-1014
- Schein OD, Munoz B, Tielsch JM, Bandeen-Roche K & West S. (1997a). Prevalence of dry eye among the elderly. *Am J Ophthalmol* **124**, 723-728.
- Schein OD, Tielsch JM, Munoz B, Bandeen-Roche K & West S. (1997b). Relation between signs and symptoms of dry eye in the elderly. A population-based perspective. *Ophthalmology* **104**, 1395-1401.
- Scherz W & Dohlman CH. (1975). Is the lacrimal gland dispensable? Keratoconjunctivitis sicca after lacrimal gland removal. *Archives of ophthalmology* **93**, 281-283.
- Sedlak J & Lindsay RH. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical biochemistry* **25**, 192-205.
- Seifart U & Stempel I. (1994). [The dry eye and diabetes mellitus]. *Ophthalmologie* **91**, 235-239.
- Shimmura S, Shimazaki J & Tsubota K. (1999). Results of a population-based questionnaire on the symptoms and lifestyles associated with dry eye. *Cornea* **18**, 408-411.
- Solomon A, Dursun D, Liu Z, Xie Y, Macri A & Pflugfelder SC. (2001). Pro- and anti-inflammatory forms of interleukin-1 in the tear fluid and conjunctiva of patients with dry-eye disease. *Investigative ophthalmology & visual science* **42**, 2283-2292.
- Stoppiglia LF, Nogueira TA, Leite AR, Carneiro EM & Boschero AC. (2002). Protective effect of D-glucose, L-leucine and fetal calf serum against oxidative stress in neonatal pancreatic islets. *Biochim Biophys Acta* **1588**, 113-118.
- Strait KA, Schwartz HL, Perez-Castillo A & Oppenheimer JH. (1990). Relationship of c-erbA mRNA content to tissue triiodothyronine nuclear binding capacity and function in developing and adult rats. *The Journal of biological chemistry* **265**, 10514-10521.
- Sullivan DA & Edwards JA. (1997). Androgen stimulation of lacrimal gland function in mouse models of Sjogren's syndrome. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **60**, 237-245.
- Sullivan DA & Hann LE. (1989). Hormonal influence on the secretory immune system of the eye: endocrine impact on the lacrimal gland accumulation

- and secretion of IgA and IgG. *Journal of steroid biochemistry* **34**, 253-262.
- Sullivan DA, Krenzer KL, Sullivan BD, Tolls DB, Toda I & Dana MR. (1999). Does androgen insufficiency cause lacrimal gland inflammation and aqueous tear deficiency? *Investigative ophthalmology & visual science* **40**, 1261-1265.
- Sullivan DA & Sato EH. (1992). Potential therapeutic approach for the hormonal treatment of lacrimal gland dysfunction in Sjogren's syndrome. *Clinical immunology and immunopathology* **64**, 9-16.
- Sullivan DA, Wickham LA, Rocha EM, Kelleher RS, da Silveira LA & Toda I. (1998). Influence of gender, sex steroid hormones, and the hypothalamic-pituitary axis on the structure and function of the lacrimal gland. *Adv Exp Med Biol* **438**, 11-42.
- Surks MI, Ortiz E, Daniels GH, Sawin CT, Col NF, Cobin RH, Franklyn JA, Hershman JM, Burman KD, Denke MA, Gorman C, Cooper RS & Weissman NJ. (2004). Subclinical thyroid disease: scientific review and guidelines for diagnosis and management. *Jama* **291**, 228-238.
- Tiidus PM & Houston ME. (1993). Vitamin E status does not affect the responses to exercise training and acute exercise in female rats. *The Journal of nutrition* **123**, 834-840.
- Toda I, Sullivan BD, Rocha EM, Da Silveira LA, Wickham LA & Sullivan DA. (1999). Impact of gender on exocrine gland inflammation in mouse models of Sjogren's syndrome. *Experimental eye research* **69**, 355-366.
- Tseng SC & Tsubota K. (1997). Important concepts for treating ocular surface and tear disorders. *Am J Ophthalmol* **124**, 825-835.
- Tsubota K, Fujita H, Tsuzaka K & Takeuchi T. (2000). Mikulicz's disease and Sjogren's syndrome. *Investigative ophthalmology & visual science* **41**, 1666-1673.
- Tsubota K & Nakamori K. (1995). Effects of ocular surface area and blink rate on tear dynamics. *Archives of ophthalmology* **113**, 155-158.
- Ubels JL, Foley KM & Rismondo V. (1986). Retinol secretion by the lacrimal gland. *Investigative ophthalmology & visual science* **27**, 1261-1268.
- Usala SJ. (1995). Sidney H. Ingbar Distinguished Lectureship. *Thyroid* **5**, 77.
- Vargas F, Castillo MA & Haro JM. (1992). Methimazole treatment reduces cardiac hypertrophy and mortality without a concomitant reduction in blood pressure in established Goldblatt two-kidney one clip hypertension. *Experientia* **48**, 755-758.

- Williams, G. R. (2000). Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms. *Mol Cell Biol* **20**, 8329-42
- Williamson J, Cant JS, Mason DK, Greig WR & Boyle JA. (1967). Sjogren's syndrome and thyroid disease. *Br J Ophthalmol* **51**, 721-726.
- Wilson MR, Wooten F & Williams J. (1991). Frequency and characteristics of ocular trauma in an urban population. *Journal of the National Medical Association* **83**, 697-702.
- Woeber KA. (2000). Update on the management of hyperthyroidism and hypothyroidism. *Archives of family medicine* **9**, 743-747.
- Woeber KA. (2002). Levothyroxine therapy and serum free thyroxine and free triiodothyronine concentrations. *Journal of endocrinological investigation* **25**, 106-109.
- Yen PM. (2001). Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiological reviews* **81**, 1097-1142.
- Zoukhri D & Kublin CL. (2001). Impaired neurotransmitter release from lacrimal and salivary gland nerves of a murine model of Sjogren's syndrome. *Investigative ophthalmology & visual science* **42**, 925-932.

9. ANEXO

9. ANEXO

Anexo de publicação

Influence of Thyroid Hormone on Thyroid Hormone Receptor β -1 Expression and Lacrimal Gland and Ocular Surface Morphology

Ana Carolina Dias,¹ Carolina Maria Módulo,¹ Angélica Gobbi Jorge,¹
Alexandre Martins Braz,¹ Alceu A. Jordão, Jr.,² Rubens Bertazzoli Filho,¹
Jayter Silva de Paula,¹ and Eduardo Melani Rocha¹

PURPOSE. Hormone diseases induce changes in the lacrimal gland (LG) and ocular surface (OS). Thyroid hormone (TH) induces cell proliferation and lipid metabolism through the activation of TH receptors. The aim of the present study was to evaluate the location and comparative expression of TH receptor β -1 (Thrb) in LG of rats with hypothyroidism and in controls and to evaluate the impact of this disease on LG and OS structure and function.

METHODS. Hypothyroidism was induced in Wistar male rats by the long-term use of thiamazole. Ten weeks later corneal cells were collected for impression cytology (IC). Rats were humanely killed, and tissues were evaluated by immunoperoxidase staining and Western blot for Thrb. The content of malondialdehyde (MDA) and acetylcholine (ACh) in LG was determined by spectrophotometry ($n = 5$ /group in all experiments).

RESULTS. LG weight was significantly lower in hypothyroid rats ($P < 0.05$). Western blot analysis indicated that LGs express Thrb and that hypothyroidism induces a higher expression of this receptor. IC was significantly different and ACh was significantly lower in hypothyroid rats ($P < 0.05$).

CONCLUSIONS. Chronically reduced levels of TH lead to biochemical and structural changes and modulate the levels of Thrb in LG. These events confirm that LG is a target organ for TH and may facilitate understanding of the mechanism related to dry eye in hypothyroidism. (*Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48:3038–3042) DOI:10.1167/iovs.06-1309

Altered levels of thyroid hormone (TH) are associated with a dry eye syndrome; however, the mechanisms that link TH to the lacrimal gland (LG) and to the ocular surface (OS) are unknown.^{1–4} TH induces protein synthesis, cell proliferation, and lipid production, which occur through their nuclear receptors α and β (Thra and Thrb), whereas Thrb is the receptor most abundantly expressed in adult epithelial lineage cells.^{5–7}

From the ¹Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço, and ²Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

Supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal em Nível Superior (CAPES), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Submitted for publication October 31, 2006; revised February 15, 2007; accepted April 6, 2007.

Disclosure: A.C. Dias, None; C.M. Módulo, None; A.G. Jorge, None; A.M. Braz, None; A.A. Jordão, Jr., None; R.B. Filho, None; J. Silva de Paula, None; E.M. Rocha, None

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

Corresponding author: Eduardo M. Rocha, Departamento de Oftalmologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Avenida Bandeirantes, 3900, 14049-900 Ribeirão Preto SP, Brazil; emrocha@fmrp.usp.br.

In addition, TH regulates oxidative metabolism, and hypothyroidism increases oxidative stress.^{6–8}

Previous studies have indicated that hypothyroidism reduces the size of Harderian glands, responsible for tear secretion in rodents, and that TH may change the sexual dimorphism of these glands.^{9,10} TH also influences lipid secretion and hair follicle homeostasis directly through Thrb.^{5,11}

Therefore, the objectives of the present study were to investigate whether LG and OS express Thrb, to evaluate hypothyroidism-induced oxidative stress by measuring reduced glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), and peroxidase, and to determine neurotrophic changes by measuring acetylcholine (ACh) in LG. Moreover, we compared the experimental and control groups regarding the secretory and structural changes in LG and OS related to TH suppression.

MATERIALS AND METHODS

Animal Model and Tissue Extraction

Eight-week-old male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were obtained from the Animal Breeding Center of the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto (Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil). Animals had free access to standard rodent chow and water. Hypothyroidism was induced with 500 mg/L thiamazole (Biolab Sanus, Taboão da Serra, São Paulo, Brazil) diluted in drinking water. Controls received regular water. All experimental procedures adhered to the Principles of Laboratory Animal Care (NIH publication no. 85 to 23) and the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research and were approved by the university's committee on animal experimentation.

After 10 weeks of daily use of thiamazole and after ensuring that corneal and caudal reflexes were abolished, comparative studies of the experimental and control groups were performed under ethyl ether anesthesia.

Schirmer Test and Impression Cytology

Tear secretion was measured in the right eye of each rat in both groups with the use of modified Schirmer test (Ophthalmos, São Paulo, Brazil),¹² by which a 1-mm wide, 20-mm long strip of Schirmer test paper was placed in the cul-de-sac of the eye for 5 minutes.

Corneal samples were obtained from the ocular surface 0.45- μ m filter paper (Millipore, Billerica, MA) after anesthesia. Samples were collected from the same area (temporal), transferred to gelatin-coated slides, fixed with 70% ethanol, glacial acetic acid, and formalin, and stained with periodic acid-Schiff (PAS) and hematoxylin. Epithelium staging of squamous metaplasia was evaluated in a masked fashion, according to a four-stage classification scheme ranging from stage 0 (normal morphology) to stage 3 (squamous metaplasia).¹³

Tissue Collection

Next, body weight was measured, tissues were collected under ethyl ether anesthesia, and rats were humanely killed with excess anesthesia. LG and eye globes collected with their lids were fixed in optimum cutting temperature (OCT) compound (Sakura Fine Tek Inc., Torrance,

TABLE 1. Comparison of the Structural and Biochemical Parameters of LG between Hypothyroid and Control Rats

	Control	Hypothyroid	P
Body weight, g	555 ± 17.8	284 ± 8.9	<0.0001
LG weight, mg	65 ± 5.8	26 ± 3.1	<0.0001
Total T4, µg/dL	3.11 ± 0.16	<1.00	—
Free T4, ng/dL	2.03 ± 0.14	<0.30	—

Data are reported as mean ± SEM.

CA) and frozen in liquid nitrogen or homogenized in a buffer of the following composition: 50 mM Tris, pH 7.5, 500 mM NaCl, 0.1% Triton, and protease inhibitor cocktail set III (Calbiochem, San Diego, CA) with a polytron (Virsonic, Biopharma, Winchester, UK). Samples were frozen at -80°C until the time for the experimental procedure.

Thyroxine Analysis

Total and free thyroxine were measured by immunoassay in blood samples from animals of both groups and were developed by chemoluminescence (Immulite 2000; Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA) according to the manufacturer's instructions.

Histologic Analysis of the Meibomian Glands

Paraffin-embedded slides containing the 10th to the 14th sections of the eye globes with lids of both groups were submitted to hematoxylin-eosin staining (five samples per animal; n = 5/group). Digital photographs were obtained from the lids (Eclipse E800; Nikon USA, Melville, NY), and the structure and area of the meibomian glands (MGs) were compared in a masked manner by the authors to detect differences between groups.

Assay of ACh and Peroxidase Content in LG

Acetylcholine and peroxidase were measured with the use of an ACh assay kit (Amplex Red; Molecular Probes, Eugene, OR) to compare the amounts of this key neurotransmitter and of enzymes related to oxidative stress in the LGs of both groups (n = 5/group), as previously described.¹⁴ For the measurement of ACh, 0.1 mL medium and volumes of tissue homogenates, determined after protein normalization (200 µg), were spotted in duplicate onto 96-well microplates. Standard

ACh curves were used in each experiment. A 0.1-mL aliquot of assay buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5) containing 0.2 M reagent (Amplex Red; Molecular Probes), 2 U/mL horseradish peroxidase, 0.2 U/mL choline oxidase, and 10 U/mL acetylcholinesterase was added to each well. After incubation, absorbance was determined with a spectrophotometer (Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA) at 530-nm emission wavelength, compared with a standard titration curve, and ACh levels were expressed in millimolar per gram of protein.

For the measurement of peroxidase, a volume of tissue homogenate obtained after protein level normalization and 0.1 mL medium were spotted in duplicate onto 96-well microplates. A 0.1-mL aliquot of assay buffer containing 0.2 M reagent (Amplex Red; Molecular Probes) and 0.2 M hydrogen peroxide was added to each well, and absorbance was determined as described after 30-minute incubation. Peroxidase activity was expressed as units of peroxidase activity per gram of protein against a standard H₂O₂ curve and was compared between groups.

Lipid Peroxidation and GSH Levels

Lipid peroxidation was determined by measuring MDA using the thiobarbituric acid test. Samples of 200 µL LG homogenates of both groups were deproteinized with 20% trichloroacetic acid, gently shaken for 30 minutes, and centrifuged at 5000g. The supernatant was exposed to 0.7% thiobarbituric acid, heated to 95°C for 45 minutes, and cooled. Next, absorbance was read at 530 nm (DU 640 spectrophotometer; Beckman Coulter, Fullerton, CA).¹⁵

GSH was determined by the reaction between LG homogenates and 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). After protein level normalization and incubation for 5 minutes, absorbance was read at 412 nm (DU 640 spectrophotometer; Beckman Coulter).

Evaluation of the Expression of Thrb in Lacrimal Gland

Thrb expression in whole cell lysates from LGs of rats of both groups was determined by Western blot analysis. After homogenization, protein was quantitated by the biuret dye test. Samples were treated with Laemmli buffer, and equal amounts of protein per sample (200 µg) were subjected to SDS-PAGE (10% Tris-acrylamide) in a miniature laboratory gel apparatus (Miniprotein; Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA), in parallel with prestained protein standards and β-mercaptoethanol (Bio-Rad, Hercules, CA). Proteins were then electrotransferred from the gel to

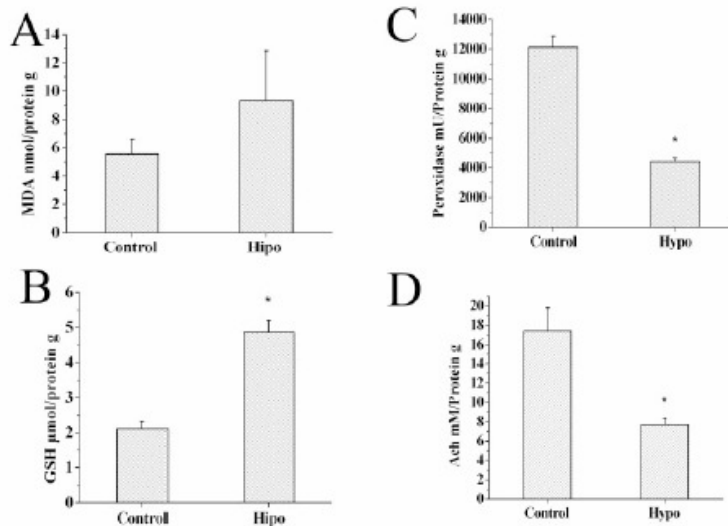


FIGURE 1. Analysis of MDA (nmol/g) (A), peroxidase activity (U/g) (B), GSH (µM/g) (C), and ACh (mM/g) (D) content in homogenates of LG of control and hypothyroid rats (n = 5 to 8/group). After 10 weeks of tiamazole treatment, tissues were homogenized and exposed to colorimetric reagents. Spectrophotometric analysis was performed, normalized to the protein concentration (g), and compared with standards. *P < 0.05 (Mann-Whitney U test).

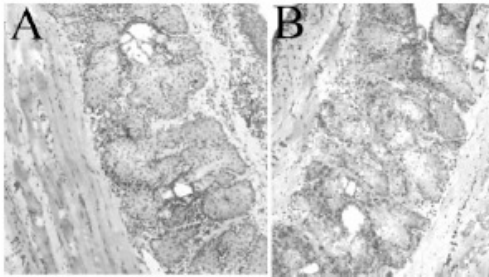


FIGURE 2. Illustrative similarity of MG in control (A) and hypothyroid (B) rats. Lids were excised, frozen fixed, and stained with hematoxylin and eosin. Digital images obtained from slices of central lids were evaluated, and the MG area was measured and compared between groups. Original magnification, $\times 100$.

an enhanced chemiluminescence (ECL) nitrocellulose membrane (Hybond; Amersham, Buckinghamshire, UK) for 2 hours at 120 V in a miniature transfer apparatus (Miniprotean; Bio-Rad Laboratories). After blocking, the membranes were incubated overnight using rabbit polyclonal anti-Thrb or anti-tubulin (a cytoskeleton protein) antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) at a concentration of $0.4 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ in a buffer containing 3% bovine serum albumin (BSA) and were washed three times as described. Blots were then incubated with immunoperoxidase and developed by DAB (Amersham, Buckinghamshire, UK). Membranes were scanned, converted to digital files, and analyzed (Scion Image Analysis Software; Scion Corp., Frederick, MD).

Immunochemical Localization of Thrb in the LG, Conjunctiva, and Cornea of Rats

Thrb expression was evaluated by immunohistochemistry in the LG, conjunctiva, and cornea of rats. OCT-blocked LG, conjunctiva, and cornea-OCT compound (Sakura Fine Tek Inc.) were cut into $6\text{-}\mu\text{m}$ sections at -20°C and transferred to poly-L-lysine-coated glass slides (Perfecta, São Paulo, SP, Brazil).

Slides were incubated in 0.1% H_2O_2 for 5 minutes, washed in PBS (0.05 M sodium phosphate, 0.15 M sodium chloride, pH 7.3), and exposed to 2% normal goat serum solution (Vector, Burlingame, CA) for 20 minutes at 4°C . Sections were then overlaid with an aliquot of anti-Thrb rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology) at a concentration of $4 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ with 1% BSA (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) in PBS. Controls included 0.1% BSA in PBS and preimmune immunoglobulin G (IgG; Sigma, St. Louis, MO).

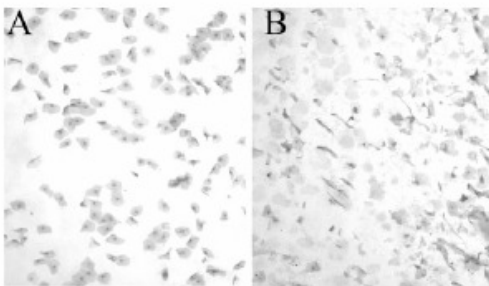


FIGURE 3. Representative microphotographs of impression cytology of the corneas from control (A) and hypothyroid (B) rats ($n = 8/\text{group}$). Grades 0 to 3 were assigned to each sample in a masked manner, considering the shape of the cell, size of the nuclei, and presence of mucus. Data differed significantly between hypothyroid and control rats ($P = 0.002$; Fisher exact test).

After incubation with primary antibody for 4 hours in a humidified chamber at 4°C , the sections were washed in PBS and incubated with a biotinylated goat anti-rabbit IgG antibody (Vector). After incubation with the second antibody, sections were again washed in PBS and incubated with an avidin-biotin complex (Vector) for 30 minutes at 25°C before they were developed with a diaminobenzidine (DAB) substrate kit (Vector).

Photographic documentation was performed with a microscope (Eclipse E 800; Nikon).

Statistical Analysis

Data are reported as mean \pm SEM. Comparisons were made using the Mann-Whitney U test for continuous data (StatView software; SAS Institute, Cary, NC) and the Fisher exact test for categorical data (GraphPad 3.0 software; Prism, San Diego, CA). Densitometric values are reported as a percentage of the mean value obtained for the control group, which was defined as 100% in each experimental assay. The level of significance was set at $P < 0.05$.

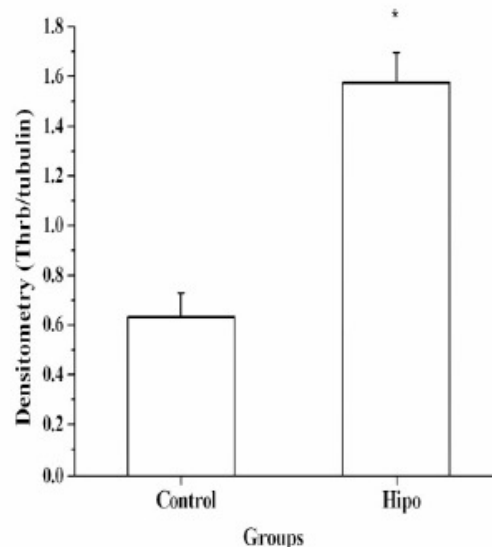
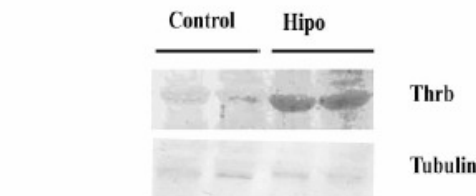


FIGURE 4. Effect of hypothyroidism on Thrb expression in LG. After 10 weeks of thiamazole treatment, LGs were excised, and extracts ($n = 5$ animals per group) were analyzed by Western blot using anti-Thrb and anti-tubulin antibodies. Data represent the ratio between Thrb/tubulin, reported as mean \pm SEM. Values obtained for the control group were defined as 100%, and values obtained for hypothyroid animals are expressed as a percentage of this value. Results are representative of three independent experiments. Higher expression of Thrb was detected in the LGs of hypothyroid animals ($P = 0.02$).

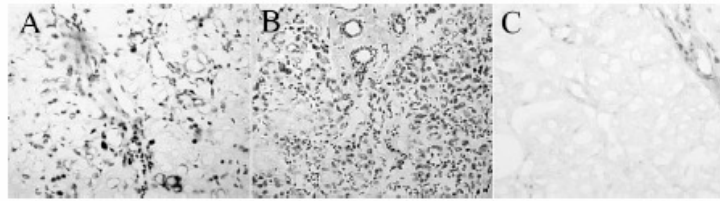


FIGURE 5. Representative immunohistochemical slide of the LG of a normal male rat. (A, B) Staining shows Thrb in the nuclei of acinar and ductal cells of control and hypothyroid LG, respectively. (C) Negative control; only mild background staining was present. Micrographs are representative of three independent experiments with five animals each. Original magnification, $\times 100$.

RESULTS

Body weight, LG weight, and both forms of T4 (total and free) were lower in the hypothyroid group (Table 1). Control and hypothyroid animals had similar levels of MDA ($P = 0.7$) but significantly higher levels of GSH ($P = 0.008$), and ACh and peroxidase levels were significantly lower in the hypothyroid group ($P = 0.01$ and 0.008 , respectively; Mann-Whitney U ; Fig. 1).

The Schirmer test showed 8.0 ± 1.9 mm in controls and 3.2 ± 0.3 mm in the hypothyroid group ($P = 0.004$). Structural evaluation revealed no differences in MG area or structure (Fig. 2); however, IC of the cornea indicated a higher level of epithelial cell alteration but no metaplastic keratinization in the hypothyroid group ($P = 0.002$; Fisher exact test; Fig. 3).

Expression of the Thrb/tubulin protein ratio was detected in the LG of rats, and higher levels of expression were detected in extracts of hypothyroid animals compared with controls ($n = 5$ per group; $P = 0.001$). These results were confirmed in three independent experiments (Fig. 4). No significant differences were found in Thrb between normal male and female LG (data not shown).

Immunohistochemistry demonstrated Thrb expression in the nuclei of acinar and ductal cells of LG (Fig. 5). In addition, Thrb expression was observed in corneal and conjunctival epithelia, with higher density in basal layers (Figs. 6A, 6B, 7A, 7B).

DISCUSSION

As previously indicated, TH regulates the structure and function of LG, and its deficiency may predispose to OS structural changes and dry eye syndrome. The present study showed the presence of Thrb predominantly in the nuclei of epithelial cells of LG acini, cornea, and conjunctiva. These findings, in addition to higher expression of Thrb in hypothyroid LG, indicate that this tissue is a direct target organ for TH and for other hormones previously investigated.

After 10 weeks of TH deprivation, Thrb upregulation was observed in LG tissue compared with controls and was inter-

preted as a compensatory effect, though it was unable to reverse the changes in LG and ocular surface. Similar findings were obtained specifically with Thrb in fish retina after 4 to 6 weeks of hypothyroidism.¹⁶ In contrast, 10 to 16 days after castration or hypophysectomy, reduced expression of androgen receptors was observed in the LG of male rats. After 4 weeks of streptozotocin-induced diabetes mellitus type 1, reduced insulin receptor (IR) activity was observed in the retina and LG.¹⁷⁻¹⁹ These differences—related to the deprivation of these hormones and of their influence on their receptors—indicate variable receptor regulation, depending on tissue and hormone specificity, which may affect the hormone signaling, tissue function, and time course of disease manifestation.

Confirming previous epidemiologic, clinical, and experimental data regarding hypothyroidism and dry eye syndrome, our study revealed that hypothyroidism has an impact on tear secretion and on the epithelial cells of the cornea because it reduces the Schirmer test values and alters the impression cytology findings.⁴

The hypothesis that autoimmune damage leads to LG and thyroid gland dysfunction has been raised in clinical studies. However, a synergic effect combining tear film dysfunction resulting from inflammation and lower TH stimulation of exocrine glands and epithelial tissues of the ocular surface is also appropriate because, in the present study and in previous studies, TH suppression was the adopted model, and no lymphocyte infiltration was observed in LG, ocular surface, or MG.^{2,3,9}

A mechanistic explanation tested here to explain the LG changes was the impaired inhibition of reactive oxygen species. In our study, significantly higher GSH levels and a trend to increased MDA and peroxidase levels suggested that oxidative stress may play a role in dry eye related to hypothyroidism, as observed in other organs.⁸ MDA levels varied widely in the LG of the hypothyroid group in different assays, which was not observed in other tissues or in the LG of other animal models. Although our data may confirm our hypothesis, the wide variations of these parameters, mostly MDA, also suggest a limitation of the assays performed in the present model.

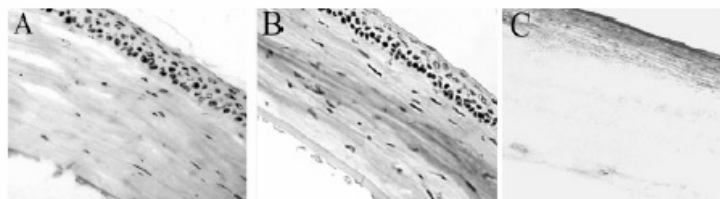


FIGURE 6. Representative immunohistochemical slides demonstrating Thrb staining in the corneas of normal rats (A), hypothyroid rats (B), and (C) negative control samples. Selected micrographs are representative of three independent experiments with five animals each. Original magnification, $\times 400$.

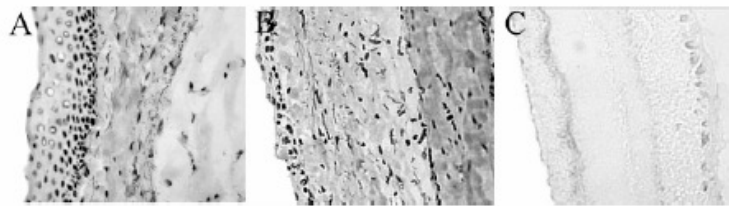


FIGURE 7. Representative immunohistochemical slides demonstrating Thrb staining in the conjunctiva of normal rats (A), hypothyroid rats (B), and (C) negative control samples. Selected micrographs are representative of three independent experiments with five animals each. Original magnification, $\times 400$.

Given the well-known impact of hypothyroidism in the early phases of neural and retinal development,^{16,20} we investigated the possibility of neurotrophic impairment of LG. Reduced levels of ACh in the LG of the hypothyroid group indicate that reduced neuronal inputs may contribute to the reduced tear secretion occurring in this condition.

Sexual dimorphism in LG related to TH suppression has been observed in previous studies⁹; however, thyroxine was unable to reverse the reduction on LG weight or tear volume caused by the reduction in testosterone levels by orchidectomy.²¹ We compared the expression of Thrb in LG of normal age-matched males and females and did not observe a sex difference, in disagreement with other sex-related differences in hormone receptors in LG (e.g., androgen and insulin).^{22,23} Further studies are necessary to determine whether and how female sex or sex hormones and hypothyroidism are related factors in dry eye syndrome.

Moreover, the present data support the idea of an investigation of ocular discomfort in subclinical thyroid disease, another condition more prevalent in women, defined by higher levels of TSH and normal levels of TH, with a characteristic clinical presentation.²⁴ The possible association of subclinical hypothyroidism and dry eye syndrome may offer an explanation for several undetermined cases of dry eye in the population.

In conclusion, our study indicates that LG has specific thyroid hormone receptor and that hypothyroidism impairs LG function and may be directly driven. Future studies that conclusively prove an association between hypothyroidism and dry eye would contribute to the understanding of ocular discomfort in hypothyroid patients and may lead to future research in more specific treatments for these patients.

Acknowledgments

The authors thank Renata C. Lataro and Vani Maria Alves Correa for excellent technical assistance.

References

- Williamson J, Cant JS, Mason DK, Greig WR, Boyle JA. Sjögren's syndrome and thyroid disease. *Br J Ophthalmol*. 1967;51:721-726.
- Coll J, Anglada J, Tomas S, et al. High prevalence of subclinical Sjögren's syndrome features in patients with autoimmune thyroid disease. *J Rheumatol*. 1997;24:1719-1724.
- Moss SE, Klein R, Klein BE. Prevalence of and risk factors for dry eye syndrome. *Arch Ophthalmol*. 2000;118:1264-1268.
- Eckstein AK, Finkenrath A, Heiligenhaus A, et al. Dry eye syndrome in thyroid-associated ophthalmopathy: lacrimal expression of TSH receptor suggests involvement of TSHR-specific autoantibodies. *Acta Ophthalmol Scand*. 2004;82(pt 1):291-297.
- Billoni N, Buan B, Gautier B, Gaillard O, Mahe YF, Bernard BA. Thyroid hormone receptor beta1 is expressed in the human hair follicle. *Br J Dermatol*. 2000;142:645-652.
- Lazar MA. Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocr Rev*. 1993;14:184-193.
- Brent GA. The molecular basis of thyroid hormone action. *N Engl J Med*. 1994;331:847-853.
- Sarandol E, Tas S, Dirican M, Serdar Z. Oxidative stress and serum paraoxonase activity in experimental hypothyroidism: effect of vitamin E supplementation. *Cell Biochem Funct*. 2005;23:1-8.
- Hoffman RA, Wertz P, Habeeb P. Harderian glands of golden hamsters: morphological and biochemical responses to thyroid hormones. *J Comp Physiol [B]*. 1989;159:293-299.
- Miller PE, Panciera DL. Effects of experimentally induced hypothyroidism on the eye and ocular adnexa of dogs. *Am J Vet Res*. 1994;55:692-697.
- Goolamali SK, Evered D, Shuster S. Thyroid disease and sebaceous function. *Br Med J*. 1976;1:432-433.
- Nguyen DH, Toshida H, Schurr J, Beuerman RW. Microarray analysis of the rat lacrimal gland following the loss of parasympathetic control of secretion. *Physiol Genomics*. 2004;18:108-118.
- de Rojas MV, Rodriguez MT, Ces Blanco JA, Salorio MS. Impression cytology in patients with keratoconjunctivitis sicca. *Cytopathology*. 1993;4:347-355.
- Zoukhrif D, Kublin CL. Impaired neurotransmitter release from lacrimal and salivary gland nerves of a murine model of Sjögren's syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42:925-932.
- Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol*. 1990;186:407-421.
- Mader MM, Cameron DA. Effects of induced systemic hypothyroidism upon the retina: regulation of thyroid hormone receptor alpha and photoreceptor production. *Mol Vis*. 2006;12:915-930.
- Rocha FJ, Wickham LA, Pena JD, et al. Influence of gender and the endocrine environment on the distribution of androgen receptors in the lacrimal gland. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1993;46:737-749.
- Rocha EM, de M Lima MH, Carvalho CR, Saad MJ, Velloso LA. Characterization of the insulin-signaling pathway in lacrimal and salivary glands of rats. *Curr Eye Res*. 2000;21:833-842.
- Reiter CE, Wu X, Sandirasegarane L, et al. Diabetes reduces basal retinal insulin receptor signaling: reversal with systemic and local insulin. *Diabetes*. 2006;55:1148-1156.
- Clos J, Ghandour S, Eberhart R, Vincendon G, Gombos G. The cholinergic system in developing cerebellum: comparative study of normal, hypothyroid and underfed rats. *Dev Neurosci*. 1989;11:188-204.
- Sullivan DA, Block L, Pena JD. Influence of androgens and pituitary hormones on the structural profile and secretory activity of the lacrimal gland. *Acta Ophthalmol Scand*. 1996;74:421-435.
- Sullivan DA, Wickham LA, Rocha EM, Kelleher RS, da Silveira LA, Toda I. Influence of gender, sex steroid hormones, and the hypothalamic-pituitary axis on the structure and function of the lacrimal gland. *Adv Exp Med Biol*. 1998;438:11-42.
- Rocha EM, Hirata AE, Cameiro EM, Saad MJ, Velloso LA. Impact of gender on insulin signaling pathway in lacrimal and salivary glands of rats. *Endocrine*. 2002;18:191-199.
- Kek PC, Ho SC, Khoo DH. Subclinical thyroid disease. *Singapore Med J*. 2003;44:595-600.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)