

Cristiano Neiva Pessôa

Hormônio tireoideano (HT) e a expressão de células imunorreativas a opsinas M e S na retina de animais com mutação natural de receptores HT do tipo $\beta 2$.

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2005

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Hormônio tireoideano (HT) e a expressão de células imunorreativas a opsinas M e S na retina de animais com mutação natural de receptores HT do tipo $\beta 2$.

Cristiano Neiva Pessôa

INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO

Mestrado em Ciências Biológicas

ORIENTADORAS: PATRÍCIA FRANCA GARDINO
E JAN NORA HOKOÇ

RIO DE JANEIRO
2005

O presente trabalho foi realizado no laboratório de Neurobiologia da Retina, sob orientação das Profas Patrícia F. Gardino e Jan Nora Hokoç do Programa de Neurobiologia do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro. O trabalho foi desenvolvido na vigência de auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e PRONEX.

Ficha catalográfica

Pessoa, Cristiano Neiva

Hormônio tireoideano (HT) e a expressão de células imunorreativas a opsinas M e S na retina de animais com mutação natural de receptores HT do tipo $\beta 2$. Cristiano Neiva Pessoa. – Rio de Janeiro: UFRJ/ IBCCF^o, 2005.
xi, 83/f.

Orientadoras: Patrícia Franca Gardino e Jan Nora Hokoç
Dissertação (Mestrado) – UFRJ / IBCCF^o / Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), 2005.

Referências bibliográficas: 73-83

1. Retina. 2. Hormônio Tireoidiano. 3. Diferenciação. 4. Cones.
I. Gardino, Patrícia Franca. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro III. Hormônio tireoideano (HT) e a expressão de células imunorreativas a opsinas M e S na retina de animais com mutação natural de receptores HT do tipo $\beta 2$.

Aos meus pais.

Agradecimentos

Inicialmente agradeço as minhas orientadoras Patrícia Farca Gardino e Jan Nora Hokoç, por todo o carinho e dedicação nestes quatro anos de laboratório.

As professoras Carmem Cabanelas Pazos Moura e Tânia Maria Ortiga de Carvalho toda a atenção e por terem me orientado pelo misterioso mundo da endocrinologia.

As irmãs Letícia e Diana, que me ajudaram muito neste projeto.

Aos professores Fernando G. de Mello, Cristina Mello, Edna Yamasaki e Ricardo Reis, por terem participado de alguma forma deste e processo.

A minha família por todo apoio e carinho.

Aos amigos do nosso laboratório: Antônio, Rose, Pedro, Anna Cláudia, M. Castro, Amanda, Isabela, Renatinha, Luciana, Patrícia, Flávia, Camila, Clarissa e Fernanda.

A todos os amigos.

Ao meu Bebê, pelo carinho, dedicação, incentivo, apoio nas horas difíceis e por todo o amor sincero.

Abreviações

Cones M - Cones que expressão as opsinas sensíveis ao comprimento de onda média.

Cones S - Cones que expressão as opsinas sensíveis ao comprimento de onda curta.

DBD – Domínio de ligação ao DNA.

DNA – Ácido desoxirribonucléico.

DRs – Seqüência de repetições diretas.

HRE – Elementos responsivos ao hormônio.

HT – Hormônio Tireoidiano.

LDB – Domínio de ligação ao ligante (hormônio).

NCoR – Repressor do receptor nuclear.

Opsinas M – Opsinas sensíveis ao comprimento de onda média.

Opsinas S – Opsinas sensíveis ao comprimento de onda curta.

RNA – Ácido ribonucléico.

RTH – Síndrome de resistência ao hormônio tireoidiano.

RTHG – Resistência generalizada ao hormônio tireoidiano.

RXR – Receptor do Ácido retinóico.

SMRT – Mediador do hormônio tireoidiano e retinóides.

T3 – 3,5,3'-triiodotironina.

T4 – 3,5,3',5'-tetraiodotironina (Tiroxina).

Thra – Gen que codifica os receptores do hormônio tireoidiano do tipo α .

Thrb - Gen que codifica os receptores do hormônio tireoidiano do tipo β .

TR - Receptor do hormônio tireoidiano.

TRE – Elemento responsivo ao TR.

TRH - Hormônio liberador de Tirotropina.

TR α - Receptor do hormônio tireoidiano do tipo α .

TR β – Receptor do hormônio tireoidiano do tipo β

TSH – Hormônio estimulante da tireóide.

Resumo

A diferenciação do sistema visual é um dos inúmeros processos regulados por hormônios tireóideos (HT), através de seus receptores nucleares (TR). Em camundongos, a maioria dos cones co-expressam opsinas sensíveis a comprimentos de onda médio (M) e curto (S), além disso a deleção do TR β 2 causa perda seletiva da expressão de opsinas-M. Visão monocromática foi descrita em um paciente portador da síndrome de resistência ao hormônio tireoideano (RTH), entretanto não é um sintoma de hipotireoidismo. Objetivamos avaliar em camundongos com a mutação Δ 337T no TR β , também encontrada em pacientes RTH, alterações na expressão das opsinas M e S. Animais selvagens (wt), heterozigotos (ht) e homozigotos (hm) foram tratados com hormônio T4 ou com metimazole, que aumenta ou diminui os níveis hormonais (T3/T4), respectivamente. Imunohistoquímica para as opsinas S e M foi realizada em cortes (análise qualitativa) e em montagens planas das retinas (análise quantitativa). Independente do nível de HT, os animais wt e ht expressaram ambas as opsinas enquanto que os animais hm expressaram somente a opsina S. A quantitatificação dos cones S e M apresentou valores de densidade celular muito próximos entre os animais wt nos diferentes tratamentos. No entanto, os animais ht apresentaram uma densidade maior de cones S em relação aos cones M, se comparados aos wt. Os animais hm somente expressaram as opsinas S. Concluimos que somente os animais hm apresentam o fenótipo de visão monocromática e que o genótipo é determinante na densidade de cones S e M independentemente dos níveis séricos de HT.

Abstract

The visual system differentiation is one of the physiological processes regulated by the thyroid hormone (HT), through activation of nuclear receptors (TRs). In mice retina the majority of cones co-expresses short (S) and middle (M) wavelength photopigments. In addition, TR β 2 deletion leads to a selective loss in the expression of M-opsin. Furthermore, monochromatic vision was described as a consequence of thyroid hormone resistance syndrome (RTH) in humans, even though, this is not true for hypothyroidism. The aim of this work was to investigate if mutant mice (Δ 337T TR β) that carry the same gene mutation found in RTH patients, express altered S and M-opsins. We used specific anti-M or anti-S-opsin antibodies to study the expression of these proteins under different conditions as T4 and metimazole to increase and decrease the hormonal level, respectively. Retinal sections (qualitative analysis) and retinal wholemounts (quantitative data) were processed to immunohistochemistry. Wild type (wt) and heterozygous (ht) animals expressed both opsins. In the other hand, homozygous (hm) mice expressed only the S-opsin. These phenotypes were not altered by the different treatments. M- and S-opsin quantitative analysis showed similar results in the wt mice under different treatments. However, ht mice showed a higher density of S cones in relation to M cones and hm mice expressed only S opsins. Our data demonstrated that only hm mice presented monochromatic vision phenotype. In addition, the genotype is critical in the S and M cone density, but the different hormonal levels were not able to alter the opsins expression.

Sumário

Ficha catalográfica	iv
Dedicatória	v
Agradecimentos	vi
Abreviações	vii
Resumo	viii
Abstract	ix
Sumário	x
INTRODUÇÃO	01
Retina	01
Estrutura da retina	01
Desenvolvimento	06
Visão cromática	07
O pigmento visual	08
Fotorreceptores e transdução	09
A retina do camundongo	11
Hormônio tireoideano e o desenvolvimento do SNC	12
Mecanismo de ação do hormônio tireoideano	14
Receptores do hormônio tireoideano	15
Estrutura dos TRs	17
Mecanismo de ação	19
Isoformas dos TRs e sua localização	20
Modelos animais	21
A síndrome de resistência ao hormônio tireoideano	23
Animal de estudo	26
A retina do <i>Knock-out</i> TR β 2	27
OBJETIVOS	28
MATERIAL E MÉTODOS	29
Animal	29
Administração das drogas	29
Fixação e obtenção dos tecidos	30
Imunohistoquímica	32
Análise e contagem de células	34
RESULTADOS	35
Análise dos cortes	35
Tratamentos	37
Tratamento com Metimazole	37
Tratamento com T4	40
Análise quantitativa	42
Heterozigoto	45

Homozigoto	47
Alterações topografia	49
Sem tratamento	49
Tratados com Metimazole	54
Tratados com T4	58
DISCUSSÃO	62
Análise	64
Restrição topográfica	64
Densidade	68
CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS	73

Introdução

Retina

A retina é uma estrutura nervosa localizada periféricamente, derivada do neuroectoderma, pertencente ao sistema nervoso central e responsável pela transdução da energia eletromagnética (luz) em potenciais de ação. Estes são conduzidos aos centros superiores através do nervo óptico (segundo par de nervos cranianos) por axônios derivados de um tipo particular de neurônio retiniano chamado célula ganglionar.

Contudo, o tecido retiniano não se restringe à simples sinalização para o cérebro da presença ou ausência de luz. Sua capacidade de promover um certo grau de modulação nos sinais neurais gerados a partir da imagem recebida confere a estes uma transmissão com perfil mais complexo. Assim, a imagem projetada sobre a retina é decomposta em diversas características físicas (como por exemplo: forma, movimento, cor e contraste simultâneo), as quais serão analisadas e reconstituídas pelos centros cerebrais para a produção da percepção da informação visual (DOWLING, 1987).

Estrutura da retina

A retina dos vertebrados (figura 1) consiste de duas principais divisões: uma camada única de células neuroepiteliais, chamada epitélio retiniano ou epitélio pigmentado, e de uma parte mais espessa consistindo de neurônios e células

gliais, dita sensorial, também denominada retina neural. A camada sensorial da retina está organizada basicamente em camadas nucleares onde se localizam os corpos celulares (camada nuclear externa, camada nuclear interna e camada de células ganglionares) intercaladas por camadas plexiformes contendo prolongamentos celulares (camada plexiforme externa, camada plexiforme interna e camada de fibras do nervo óptico) (Müller, 1856, apud Polyak, 1941). Em meio a esta organização laminar estão presentes seis tipos neuronais e três tipos de células gliais, que foram descritos nos estudos pioneiros de Santiago Ramón y Cajal, 1893.

Na camada plexiforme externa estão presentes terminais sinápticos de células fotorreceptoras e prolongamentos celulares de células bipolares, interplexiformes e células horizontais. Na camada plexiforme interna (cpi) encontram-se prolongamentos de células amácrinas, bipolares e os dendritos das células ganglionares.

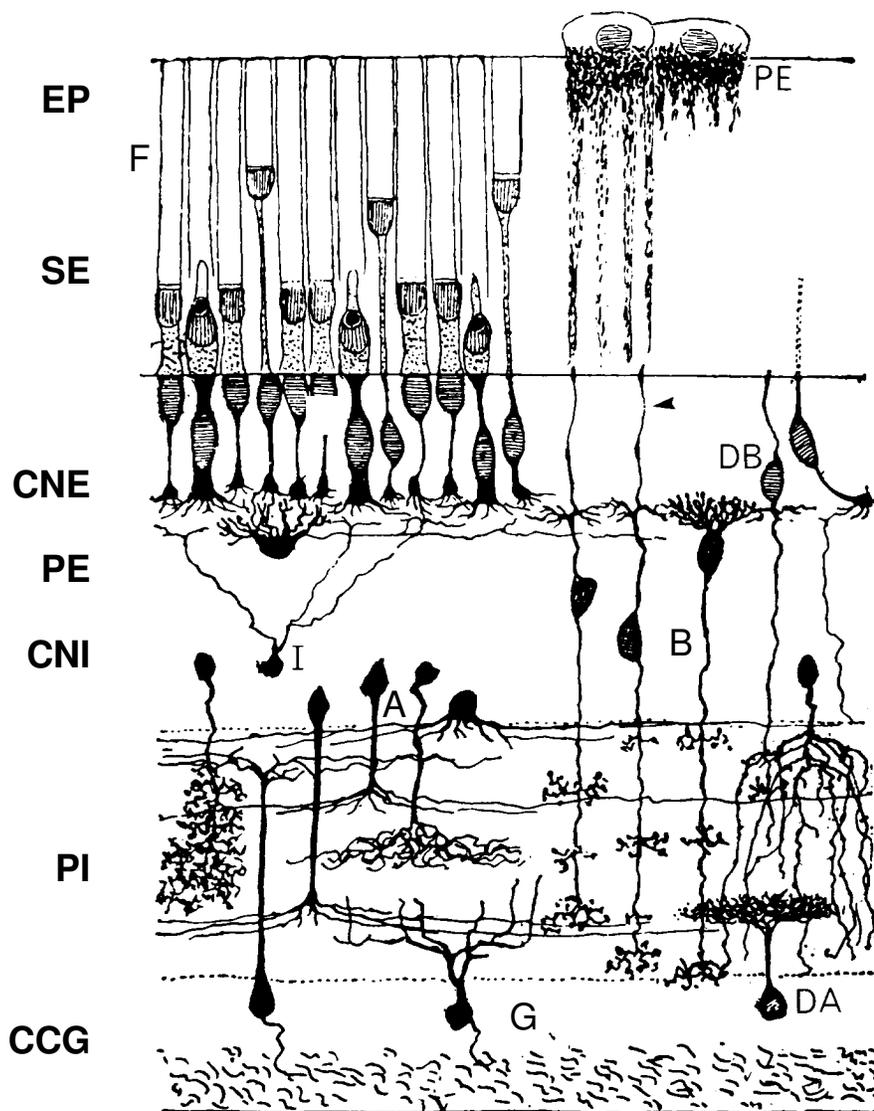


Figura 1. Desenho modificado de RAMÓN Y CAJAL (1911) mostrando a organização da retina com suas diversas células camadas: epitélio pigmentar (PE), fotorreceptores (F), célula interplexiforme (I), células amácrinas (A), células bipolares (B), células bipolares deslocadas (DB), células amácrinas deslocadas (DA), células horizontais (H), células ganglionares (G), epitélio pigmentado (EP), segmento externo dos fotorreceptores (SE), camada nuclear externa (CNE), plexiforme externa (PE), camada nuclear interna (CNI), plexiforme interna (PI) e camada de células ganglionares (CCG).

A camada nuclear externa é formada pelos corpos celulares das únicas células retinianas capazes de transduzir a energia luminosa em sinal neural, os fotorreceptores. Estes são classificados basicamente em dois tipos, que podem ser diferenciados principalmente pela morfologia de seus segmentos externos: os cones e os bastonetes. Os primeiros, que na maioria das vezes possui um segmento externo curto em forma de cone, são responsáveis pela visão fotópica (visão em alta intensidade luminosa), tem uma alta resolução temporal, sendo também responsáveis pela visão de cor, visto que existem diferentes populações de cones contendo diferentes fotopigmentos sensíveis a diferentes faixas do espectro luminoso. Os bastonetes são responsáveis pela visão escotópica (em baixa intensidade luminosa), possuem uma baixa resolução temporal e só possuem um tipo de pigmento visual, não apresentando, portanto resolução espectral (Dowling, 1987).

A camada nuclear interna é composta por corpos celulares de quatro tipos celulares: localizadas mais externamente estão as células horizontais, que na maioria dos vertebrados estão representadas por dois subtipos morfológicos (Galego, 1971). As células bipolares têm seus corpos celulares localizados numa região mais central desta camada. Estas células, nas retinas de mamíferos até então estudadas, são divididas basicamente em dois subtipos principais, um que faz contato exclusivo com bastonetes e outro com cones (Ramòn y Cajal, 1893; Kolb, 1970, 1977). Os corpos celulares localizados na parte mais interna da camada nuclear interna pertencem às células amácrinas, chamadas assim por Ramòn y Cajal por não apresentarem axônios, com seus dendritos estratificando na camada plexiforme interna. Estas células são responsáveis pela modulação

horizontal da informação nesta camada, fazendo contatos com dendritos de células bipolares, células ganglionares, células interplexiformes e com outras células amácrinas. As células amácrinas apresentam uma morfologia muito variada. Além dos corpos celulares destes quatro tipos neuronais, também está presente nesta camada um tipo de célula glial chamada célula de Müller, cujos prolongamentos se estendem por toda a retina formando as membranas limitante externa e interna.

A camada nuclear mais interna na retina é a camada de células ganglionares formada pelas células que levam a informação visual, através de seus axônios, aos centros superiores. Encontra-se também nesta camada os corpos celulares de células amácrinas (Ramòn y Cajal., 1893) ditas deslocadas, com seus dendritos estratificando na camada plexiforme interna.

Além das camadas acima descritas, ainda são encontradas na retina os segmentos externos dos fotorreceptores e as fibras do nervo óptico, composto pelos axônios das células ganglionares. Com relação às células gliais, além da célula de Müller, duas outras células gliais comuns ao restante do sistema nervoso central também são encontradas na retina: a microglia, localizada na camada plexiforme interna, e os astrócitos fibrosos (na camada de fibras e na camada de células ganglionares) e protoplasmáticos (camada plexiforme interna, nuclear interna, camada de células ganglionares e na camada de fibras do nervo óptico) (Polyak, 1941).

Desenvolvimento

A retina, assim como outras regiões do sistema nervoso central (SNC), deriva do tubo neural. Logo cedo na vida do embrião, o tubo neural sofre evaginações para formar as duas vesículas ópticas na região da cabeça. Cada vesícula se invagina formando um cálice onde sua região interna dará origem ao epitélio neural e a porção externa do epitélio pigmentado. Inicialmente, ambas as paredes do cálice óptico possuem a espessura de uma célula apenas, mas as células da parede interna se dividem e formam uma camada neuroepitelial com várias células de espessura (Dowling, 1987). Estas células denominadas neuroblastos têm potencial proliferativo e darão origem a todos os tipos celulares na retina (Altshuler, et al, 1991).

A histogêneses da retina de vertebrados segue um gradiente espacial onde todos os tipos celulares são gerados e começam a se diferenciar a partir da região mais interna para regiões mais externas. Além desse gradiente interno-externo, existe também um gradiente centro-periferia (Mann, 1964; Provis, et al, 1985). Quando examinamos o desenvolvimento dos fotorreceptores em várias espécies de mamíferos, observamos quase sempre a mesma seqüência de aparecimento dos fenótipos neuronais (Szél, et al, 1993; Bumsted, et al, 1997). Os primeiros tipos celulares a aparecerem são os bastonetes, alguns dias após, os cones que expressam ftopigmentos sensíveis ao comprimento de onda curta (cones S). Por último, aproximadamente na segunda semana pós-natal, surgem os cones que expressam ftopigmentos sensíveis ao comprimento de onda médio e longo (cones M e L).

Todas as espécies de mamíferos estudadas, tanto as que segregam os cones, expressando os diferentes tipos de cones predominantemente em determinada região da retina (camundongo, porquinho da índia e coelho), quanto às com disposição homogênea (rato e gerbil), demonstraram a mesma seqüência de aparecimento dos diferentes tipos celulares, durante o desenvolvimento da retina. Exceto na fóvea de primatas, aonde ainda existe certa controvérsia sobre qual tipo de cone precede (Bumsted, et al, 1997; Wikler, K.C. & Rakic, P. 1991).

Visão cromática

A visão de cores, em vertebrados, é possível devido à família de pigmentos visuais homólogos que reside dentro de uma classe de fotorreceptores, os cones. A luz visível ao olho humano ocupa um pequeno espectro eletromagnético entre 400nm e 700nm, entretanto, alguns animais possuem diferentes opsinas sensíveis a comprimentos de ondas na faixa do ultravioleta (UV). Entre as diferentes espécies de vertebrados, o número e a absorção máxima dos pigmentos visuais varia, gerando diversos sistemas diferentes de visão de cores. Humanos e primatas do velho mundo apresentam três tipos diferentes de pigmentos visuais, contudo, pássaros e peixes possuem quatro tipos. A maioria dos mamíferos, entretanto, expressam somente dois tipos de opsinas, estes animais apresentam um sistema dicromático de visão de cores (Smallwood, et al, 2003).

A visão cromática baseia-se na comparação dos diversos estímulos recebidos pelas diferentes opsinas, sendo aquela impossível com apenas um tipo de cone. As opsinas, sensíveis a um comprimento de onda específico são, na

verdade, capazes de responder a um diverso espectro de outros comprimentos de onda, dependendo da intensidade da luz. Entretanto, a frequência de respostas será sempre menor que a de um cone específico para aquele espectro. A informação recebida por estes dois fotorreceptores é levada para os centros superiores onde são comparadas para percepção da cor do objeto. Podemos então afirmar que já na retina começa a modulação da informação cromática, pois além da segregação dos diferentes comprimentos de onda feita pelos fotorreceptores, as células ganglionares possuem um sistema de oposição dos sinais (on e off) que atuam amplificando o contraste das cores (Lee, 2004).

Pigmento visual

O pigmento visual é um membro da família de moléculas que incluem os receptores acoplados a proteína G e consiste de uma proteína integral de membrana, opsina, e um cromóforo covalentemente ligado, 11 cis-retinal (vitamina A1) ou 3-dehidroretinal (vitamina A2) (Strader, et al, 1994). Nos cones os pigmentos visuais estão dispostos em dobras da membrana celular; enquanto nos bastonetes a rodopsina está contida nos discos membranosos, empilhados no interior da membrana celular. A diferença morfológica entre os segmentos externos de cones e bastonetes pode significar pelo menos em parte uma diferença funcional no mecanismo de fototransdução. A opsina compreende uma cadeia polipeptídica de aproximadamente 350 aminoácidos os quais formam sete alfa-hélices que atravessam a membrana, ao passo que o cromóforo consiste de uma isoforma da vitamina A. Até recentemente pensava-se que somente peixes,

anfíbios e répteis possuíssem ambas as isoformas da vitamina A. Entretanto, estudos recentes demonstraram que, apesar de não serem capazes de produzi-la, os fotorreceptores de mamíferos podem utilizar a vitamina A2 ingerida. Mudanças no espectro de sensibilidade dos pigmentos visuais aos comprimentos de ondas específicos são mediadas pela variação do cromóforo. As opsinas dos vertebrados são classificadas em cinco grupos evolucionários distintos (Collin, & Trezise, 2004):

1. Fotorreceptores de bastonetes (Rh1)
2. Similar ao Rh1 (Rh2)
3. Sensível ao comprimento de ondas curtas (SWS1)
4. Similar ao SWS1 (SWS2)
5. Sensível ao comprimento de ondas longas (LWS), médias (MWS) ou grupo das opsinas (LWS/MWS).

Fotorreceptores e Transdução

Os fotorreceptores são as únicas células da retina com a propriedade de transformar o estímulo luminoso em sinal elétrico neuronal. A transdução se inicia com a absorção de um fóton de luz, que provoca uma alteração na configuração do retinal 11-cis para todo-trans, em um processo de isomerização. Durante este processo, o cromóforo passa por diversas conformações, entre elas a forma ativa Metarodopsina II, capaz de ativar a proteína G, transducina, localizada na membrana do disco óptico. A transducina se torna ativa trocando uma molécula de GDP por GTP, em seguida, desloca suas subunidades alfa e beta que por sua

vez ativam a enzima fosfodiesterase (PDE). Esta catalisa a transformação do GMP-cíclico (GMPc) em 5'-GMP. A diminuição intracelular de GMPc causa o fechamento dos canais catiônicos, resultando na hiperpolarização do fotorreceptor e conseqüente diminuição da liberação dos neurotransmissores. A hiperpolarização do fotorreceptor é o primeiro passo para a conversão do sinal luminoso em sinal neural.

A membrana do segmento externo dos fotorreceptores possui canais catiônicos sensíveis à concentração intracelular de GMPc. No escuro os níveis de GMPc encontram-se elevados e os canais mantêm-se abertos permitindo o influxo passivo de cátions conforme o gradiente de concentração, constituindo a “corrente de escuro”. Esta corrente despolariza a célula e permite alta taxa de liberação do neurotransmissor pelo terminal sináptico. A “corrente de escuro” é composta de íons sódio (80%), cálcio (15%) e magnésio (5%).

A “corrente de escuro” flui do segmento externo para o segmento interno do fotorreceptor; e posteriormente flui para o meio extracelular carregada por íons potássio, através de canais seletivos para potássio. Uma bomba de sódio-potássio ATPase mantém as concentrações intra-celulares destes íons, bombeando sódio para o meio extra-celular e potássio para o meio intra-celular, garantindo a despolarização do fotorreceptor na ausência de luz.

A retina de camundongo

Assim como a maioria dos mamíferos, a retina dos camundongos possui dominância de bastonetes. Apenas 3% dos fotorreceptores são compostos por cones (Carter-Dawson & La Vail, 1979), valor alto quando comparado ao rato (1%) e considerando tratar-se de um animal de hábitos crepuscular ou noturno. A densidade média dos cones foi estimada em 12.400 células/mm² com um gradiente de duas vezes do ponto de maior densidade, localizado a 600um do nervo óptico, até a periferia. Por outro lado, os bastonetes apresentam uma distribuição mais homogênea, estando a densidade média por volta de 437.000 células /mm². Os números totais de cones e de bastonetes foram estimados em $0,18 \times 10^6$ e $6,4 \times 10^6$, respectivamente (Jeon, et al, 1998).

Apesar da baixa relevância numérica, o camundongo apresenta cones sensíveis a dois diferentes comprimentos de onda com topografias distintas. O primeiro sensível ao comprimento de onda médio (MWS), possui máxima sensibilidade entre 509-521nm, que compreende a faixa do verde, e o segundo pigmento, sensíveis ao comprimento de onda curta (SWS), possui máxima sensibilidade na faixa de 360nm, o qual corresponde a região do ultravioleta (UV) (Jacobs & Deegan, 1991).

O primeiro estudo a utilizar anticorpos para mapear a retina de camundongos revelou um arranjo espacial único no qual a maioria dos cones sensíveis ao comprimento de onda médio estava restrito a região dorsal das retina. Por outro lado, na região ventral da retina predominava os cones sensíveis ao comprimento de onda curta (Szél, et al, 1992). Pesquisas posteriores

demonstraram uma região de transição contendo cones co-expressando fotopigmentos sensíveis ao comprimento de onda curto e médio, estes estavam restritos a uma banda horizontal passando através da retina central (Röhlich, et al, 1994). Estudos subseqüentes de marcação confirmaram a co-expressão, mas propuseram que esta possuía uma extensão bem maior, atingindo toda a região inferior da retina (Glosmann & Ahnelt, 1998) ou mesmo a maioria dos cones de toda a retina (Applebury, et al, 2000).

A co-expressão de fotopigmentos nos cones de camundongos também é evidente em estudos de eletrorretinograma, nos quais a exposição dos olhos aos comprimentos de ondas longas, absorvidos exclusivamente pelos cones M, foi capaz de suprimir completamente a respostas de ambos os cones. Contudo, estudos utilizando testes comportamentais de discriminação e eletrorretinograma, demonstraram que camundongos possuem a capacidade de distinguir entre os dois comprimentos de onda (Jacobs, et al., 2004).

Hormônio Tiroideano e o desenvolvimento do SNC.

O desenvolvimento do sistema nervoso central ocorre através de diversos eventos precisamente coordenados. A indução do tecido neural, diferenciação e migração de tipos celulares específicos, especialização regional ou formação de sinapses são levados a efeito por diversos eventos intrínsecos, a maioria dos quais, são determinados por fatores genéticos (BERNAL, et al, 2003). No entanto, a importância do hormônio tiroideano, na regulação do desenvolvimento neural também já é bem conhecida. Em mamíferos, o hipotireoidismo pode causar retardo

mental e surdez, se a carência do hormônio ocorre cedo no desenvolvimento do feto ou do neonato (Forrest, et al, 2002).

O hormônio tireoideano é considerado essencial para a maturação do SNC em humanos e outros mamíferos. Entretanto, deve atuar dentro de uma janela de desenvolvimento, além da qual, a recolocação do hormônio não recupera a função normal, por exemplo, no cerebelo (Oppenheimer & Schwatz, 1997) e na cóclea (Uziel, A., 1986). A deficiência do hormônio tireoideano durante períodos críticos do desenvolvimento leva a profundos e potencialmente irreversíveis defeitos na maturação (Escobar, et al, 2000). A maioria das evidências apontam para o envolvimento do hormônio tireoideano na regulação de eventos tardios no desenvolvimento do SNC, tal como: migração celular, formação da camada cortical e na diferenciação de neurônios e células da glia. Estudos demonstraram que a deficiência do hormônio tireoideano resulta em alterações na migração celular no neocórtex, hipocampo e cerebelo (Berbel, et al, 1997).

Trabalhos recentes demonstraram que as diversas isoformas dos TRs são expressas durante o desenvolvimento normal da retina de camundongos em diferentes janelas temporais (Ng, et al, 2001). Enquanto, as isoformas $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\beta 1$, vão aumentando progressivamente durante o desenvolvimento, o TR $\beta 2$ tem seu pico na idade de 17 dias embrionários (figura 2). Estudos utilizando animais *knock-out* demonstraram que o Tr $\beta 2$ possui uma função ímpar na diferenciação das opsinas, que não pode ser suprida pelo TR $\beta 1$. A presença deste receptor integro inibe a diferenciação de cones S prematuros e permite, futuramente, a diferenciação de cones M.

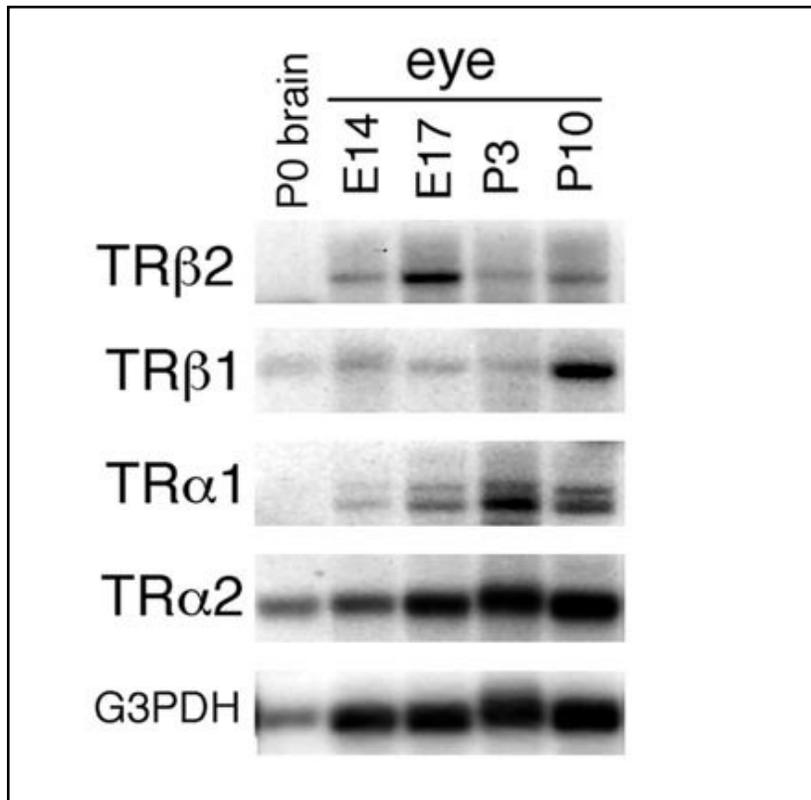


Figura 2. Análise por northern-blot da expressão dos RNAm, das diferentes isoformas dos TRs (α 1, α 2, β 1 e β 2), durante o desenvolvimento normal da retina de camundongos. G3PDH controle da integridade do RNAm. As análises das retinas foram realizadas durante as idades embrionárias de 14 e 17 dias de (E14 e E17) e durante as idades pós-natais de 3 e 10 dias (P3 e P10). Os olhos foram analisados em conjunto com o cérebro de camundongo recém nascido.

Mecanismos de ação do hormônio tireoideano

A importância do hormônio tireoideano no desenvolvimento, homeostase, proliferação e diferenciação celular tem sido bem documentadas. Sabe-se que, nos mamíferos, os HTs atuam em todos os órgãos e vias metabólicas e seus principais efeitos incluem o desenvolvimento de vários tecidos, consumo de

oxigênio, regulação da temperatura corporal, frequência cardíaca e o metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras. Além disso, participam da síntese e na degradação de muitos outros fatores de crescimento e hormônios, o que resulta em outros efeitos secundários (Barra, 2004).

A maior parte das ações do hormônio tireoideano é exercida via receptores nucleares, os quais atuam como fatores de transcrição dependentes de ligantes. O ligante fisiológico é o T3 (3,5,3'-triiodotironina), este é considerado a forma ativa do hormônio. O T4 (tiroxina), por ter baixa afinidade pelos receptores nucleares, pode ser considerado como o pró-hormônio, entretanto, é a forma secretada preferencialmente pela glândula tireóide. As vias de sinalização do hormônio tireoideano são mediadas pelos receptores, através das suas diferentes isoformas, ou a montante do receptor, pelos níveis séricos da forma ativa do hormônio (Forrest, et al, 2002).

Receptores do hormônio tireoideano.

Os receptores do hormônio tireoideano são membros da superfamília de receptores nucleares que compreende 49 genes e codificam 75 proteínas diferentes. Estas proteínas estão envolvidas na transdução dos sinais hormonais em diferentes respostas transcricionais (Robinson-Rechavi, et al, 2001). A identificação de receptores em insetos como membros da superfamília sugere uma origem comum destes receptores e claramente, demonstra que a sua evolução antecede a divergência de vertebrados e invertebrados (Ribeiro, et al, 1995).

Os membros da superfamília de receptores nucleares são fatores de transcrição dependentes de ligantes e atuam ligando-se a seqüências específicas no DNA denominadas elementos responsivos ao hormônio (HRE). Os HREs geralmente estão localizados na região promotora dos genes alvos, são específicos para cada receptor e possuem duas cópias perfeitas de um hexanucleotideo (AGGTCA), separadas por um numero aleatório de pares de bases (Barra, et al, 2004).

Uma subclasse da superfamília de receptores nucleares é representada pelo receptor do hormônio tireoideano (TR), do ácido retinoico (RXR), da vitamina D e dos proliferadores peroxissomais, que formam heterodímeros com o RXR (Mangelsdorf, et al, 1995). Estes receptores, na ausência do ligante, estão localizados predominantemente no núcleo, em solução ou ligados ao DNA. Quando associados ao DNA estão predominantemente ligados a seqüências de repetições diretas (DRs) do hexâmero AGGTCA n AGGTCA, onde “n” é o numero de bases para cada hexâmero (Ribeiro, et al, 1998). Os TRs se ligam aos HREs na forma de monômeros, homodímeros ou heterodímeros, associados ao ácido retinóico RXR. (Ribeiro, et al, 1998; Glass, 1994).

A ligação do hormônio ao receptor atua aumentando ou diminuindo a expressão dos genes alvos, dependendo se os promotores dos genes contêm elementos responsivos ao HT regulados de forma positiva ou negativa, respectivamente (Hu & Lazar, 2000; Yem, 2003). Recentes estudos, utilizando a técnica de microarray, demonstraram a grande variedade de genes que são regulados pelo TRs (Miller, et al, 2004).

Estrutura dos TRs

A análise dos TRs demonstraram uma estrutura modular com domínios funcionais distintos (figura 3). Os três principais domínios são: o amino-terminal, o de ligação ao DNA (DBD) e o de ligação ao hormônio (LDB). Existe também uma pequena região que liga o DBD com LDB que é conhecida como dobradiça.

O domínio amino-terminal é extremamente variável entre os membros da super família de receptores nucleares, tanto no tamanho quanto na seqüência de aminoácidos, e exibe uma função de ativação transcripcional independente do ligante, denominada função de ativação 1 (Warnmark, 2003). Para o TR, a sua importância ainda é pouco conhecida, pois estudos demonstraram que a deleção do domínio amino-terminal tem pouco efeito sobre a resposta transcripcional positiva ao T3 (Wu, et al, 2001).

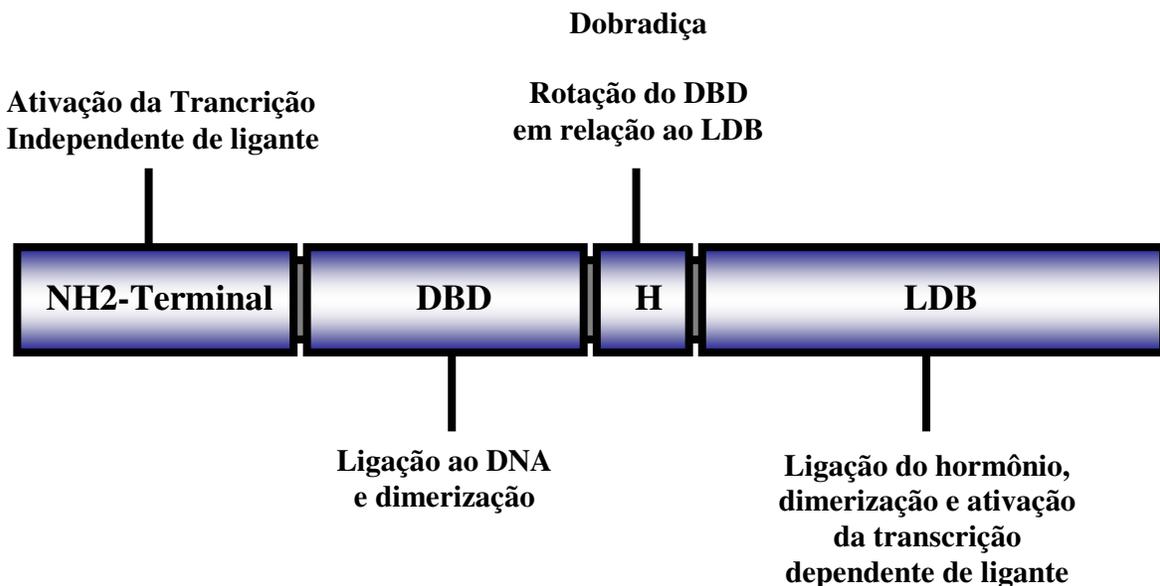


Figura 3. Desenho modificado de Barra, G.B. (2004) Estrutura primaria representando os domínios funcionais dos receptores tireoideanos. Domínio amino-terminal (NH₂-T), domínio de ligação ao DNA (DBD), dobradiça, domínio de ligação ao hormônio (LBD) e suas respectiva funções.

O domínio de ligação ao DNA é o mais bem conservado entre todos os receptores nucleares e tem como função principal a ligação ao DNA. Este domínio situa-se na porção central dos receptores e é organizado por dois segmentos estruturais conhecidos como dedos de zinco. Neste segmento quatro resíduos de cisteína de cada dedo formam duas estruturas independentes em forma de alças (Mangelsdorf & Evans, 1995). Três aminoácidos da base do primeiro de representam a região chamada de caixa P. Estes aminoácidos são responsáveis pelo reconhecimento do elemento responsivo específico para cada receptor. Ao passo que a sequência de cinco aminoácidos, localizada entre a primeira e a segunda cisteína na base do segundo dedo, é denominada de caixa D, uma região importante para a dimerização de receptor (Umesono & Evans, 1989).

O LBD é menos conservado que o DBD, refletindo a variedade de ligantes que atuam nestes receptores. Este domínio localiza-se na região carboxi-terminal e possui várias funções, como a homo e heterodimerização do receptor, localização nuclear e interação com proteínas co-repressoras e co-ativadoras (Glass & Rosenfeld, 2000; McKenna & O'Malley, 2002). Além dessas funções, o LBD contém uma superfície que é fundamental para a ativação transcripcional, que se forma com a ligação do hormônio ao receptor. Após a ligação do hormônio, esta região denominada função de ativação 2 (AF-2), passa a se interagir com os co-ativadores, que permitirão a formação de um complexo protéico envolvido na ativação da transcrição.

A região que conecta o DBD ao LBD, e que age como uma dobradiça, é extremamente variável entre os diferentes receptores (Yen, 2001). No caso

específico do TR, a principal função seria promover o movimento de rotação do DBD em relação ao LBD, possibilitando que o TR se ligue nos HREs com diferentes orientações (Ribeiro, et al, 1995; Glass, 1994; Kurokawa, et al, 1993).

Mecanismo de ação

Nos genes que são positivamente regulados pelo HT, os TRs não ligados suprimem a transcrição basal deste gene pela interação com uma classe de proteínas nucleares co-repressoras, como o repressor do receptor nuclear (NCoR) e o mediador do silenciador do receptor de HT e retinóides (SMRT). Recentemente foi demonstrado que os co-repressores podem formar complexos com outros repressores como o SIN3 e as deacetilases de histona. Tendo esta, provavelmente, um papel crucial na repressão basal pelo complexo co-repressor/TR não ligado. Isto ocorre porque a estrutura da cromatina local adquiriu uma conformação que impede a transcrição basal (Ciguere, 1999). A ligação do T3 ao receptor provoca uma mudança conformacional no TR, que aumenta a ocupação do HRE pelos heterodímeros TR/RXR, libera o complexo co-repressor e recruta co-ativadores como os co-ativadores de receptor de esteróide (SRC1, SCR2 e SCR3) e o complexo de proteínas que interage com o receptor de vitamina D/proteína associada ao TR (Complexo TRIP-TRAP), todos com atividade histona acetiltransferase (Neves, F.A.R., 2002). A estrutura da cromatina vai se modificar, ocorrendo perda de um nucleossomo na região promotora, com isso a transcrição do gene será ativada. Os mecanismos que envolvem os genes que são negativamente regulados pelo HT, como TSH, são

menos compreendidos, provavelmente envolvem a mesma classe de moléculas em um HRE diferente, onde os co-repressores se tornam ativadores e vice e versa (Ciguere, 1999).

Isoformas dos TRs e sua localização

Existem dois genes que codificam os TRs, Thra e Thrb, localizados no cromossomo humano 17 e 3 respectivamente (Yen, 2001). Cada um deles codificam diferentes proteínas, $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\Delta\alpha 1$, $\Delta\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\Delta\beta 3$, que são resultados do processamento alternativo do RNAm ou da utilização de promotores diferentes (Flamamnt & Samarut, 2003). Entretanto somente as isoformas $\alpha 1$, $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$ são capazes de se ligarem ao hormônio.

A expressão dos genes e a distribuição dos seus produtos variam de tecido para tecido e nos diferentes estágios do desenvolvimento. O HT também regula de forma diferenciada a expressão dos genes e as sua isoformas (Mangelsdorf, et al, 1995).

A expressão dos mRNAs dos TRs varia com o desenvolvimento e com a diferenciação celular (Lazar, 1993). Os mRNA dos $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ e $\beta 2$ são expressos em quase todos os tecidos, ainda que em níveis diferentes. Assim, a isoforma $\alpha 1$ é abundante em músculos esquelético, gordura marrom e no coração. O $\alpha 2$ é particularmente abundante no cérebro. O TR $\beta 1$ é expresso em grande quantidade no fígado, rim e cérebro. No desenvolvimento de sistema nervoso central, a isoforma tr $\alpha 1$ é largamente expressa, por outro lado, as variantes TR β são mais

limitadas a tecidos específicos (Barra, et al, 2004). O TR β 2 mostra uma expressão mais restrita localizada apenas na camada de fotorreceptores da retina neural, na cóclea, hipotálamo e na glândula pituitária anterior (Sjöberg, et al, 1992; Bradley, et al, 1994; Hodin, et al, 1989; Cook, et al, 1992).

Modelos animais

A importância dos TRs no mecanismo de ação do HT tem sido demonstrada através de modelos animais com ausência dos receptores e, conseqüentemente, RTH. Atualmente, existem dois diferentes modelos com deleções similares no gen do TR β (Williams, 2000) e três linhagens de camundongos com diferentes deleções no gen do TR α . Estudos com camundongos knock-out para o gene *thra* apontam a importância do TR α 1 para a ação do HT na frequência cardíaca, controle de temperatura e gasto energético. O camundongo *knock-out* TR β possui TSH elevado, níveis elevados de hormônio tireoideano, bócio e surdez sensorial, portanto, com fenótipo idêntico ao observado em humanos com deleção do gene TR β (Refetoff, et al, 1993). A hipófise dos animais TR β *knock-out* possuem baixa sensibilidade ao hormônio tireoideano, devido à predominância dos receptores TR β 2 nesta glândula. Isto faz com que a retro-alimentação negativa esteja inibida, mantendo alta a secreção de TSH, que, por sua vez, vai estimular ainda mais a produção de HTs pela tireóide. Análise deste modelo permite concluir que o TR β não é necessário para a up-regulation do TSH existente na deprivação do HT, porém este receptor exerce

papel fundamental na down-regulation e supressão completa do TSH (Lin, et al, 1997). Camundongos duplo *knock-out*, TR α e TR β possuem níveis do hormônio tireoideano e TSH dramaticamente elevados, bócio e retardo. Definitivamente a ausência do TR α acentua o fenótipo de resistência existente quando somente o TR β esta ausente. Porém, embora os animais sejam menores, eles são capazes de sobreviver na ausência total de TRs (Ritchie, 2003). Estudos em modelos animais possibilitaram a elucidação da ação específica de cada isoforma nos diferentes tecidos, assim como as conseqüências das diferentes mutações no fenótipo.

Síndrome de resistência ao hormônio tireoideano

A síndrome de resistência ao hormônio tireoideano (RTH) foi primeiro descrita por Refetoff e colaboradores em 1967. Eles analisaram dois indivíduos que apresentavam bócio, surdo-mudez e atraso na idade óssea. Os níveis séricos do hormônio tireoideano (HT) eram elevados contrastando com os sintomas de hipotiroidismo. A administração de HT exógeno não produziu efeito metabólico esperado e também não suprimiu o hormônio (TSH) estimulado pelo hormônio regulador de tireotrofinas (TRH). Após 20 anos as bases moleculares da RTH foram elucidadas e a síndrome se deve a anormalidades no receptor β do hormônio tireoideano. Desde os primeiros relatos, foram identificados mais de 700 indivíduos com a síndrome de resistência ao hormônio tireoideano (RTH) provenientes de cerca de 250 famílias. A prevalência da RTH é de aproximadamente 1 em 50.000 recém nascidos (Usala, 1995).

A síndrome de resistência ao hormônio tireoideano é caracterizada pela reduzida resposta dos tecidos alvos ao hormônio tireoideano apesar das elevadas concentrações de T3 e T4 livres, associada a concentrações elevadas de TSH ou inapropriadamente normais, característico da sensibilidade reduzida das células produtoras de TSH (Carvalho & Ramos, 2004). O padrão de herança da RTH é autossômico dominante sendo que a transmissão recessiva foi identificada em apenas uma família (Takeda, 1992). O fenótipo da RTH é bastante variável, mesmo entre membros da mesma família com mutações idênticas do TR β . A maioria dos pacientes apresenta sintomas leves a moderados. Esta variabilidade nas manifestações clínicas se deve, em parte, à severidade da resistência hormonal, da efetividade dos mecanismos compensatórios, da presença de fatores genéticos moduladores e dos efeitos de tratamentos anteriores (Weiss, et al, 1997).

A ausência de feedback negativo do T3 na hipófise, resulta em uma secreção persistente de TSH, estimulação da glândula tireoideana e conseqüente aumento da síntese dos HTs. Os tecidos alvos respondem diferencialmente aos altos níveis de T3, dependendo da predominância dos receptores do hormônio tireoideano, tipo α ou tipo β , que são expressos nestes. Portanto, alguns indivíduos manifestam sintomas sugestivos de privação de HT como retardo do crescimento, habilidades cognitivas reduzidas e hipercolesterolemia, enquanto que outros apresentam sintomas de excesso de HT como taquicardia, avanço da idade óssea ou hiperatividade. O mesmo indivíduo pode apresentar sintomas de ambos, excesso e deficiência de HT (Ribeiro, et al, 1995; Warnmark, 2003).

Bócio é a anormalidade mais comumente encontrada no exame físico, ocorrendo em 85% dos casos. Taquicardia, que ocorre em 90% dos indivíduos com RHT, é causada pela ação do HT em níveis elevados no TR α (Warnmark, et al, 2003). Metade dos pacientes com RHT tem dificuldade no aprendizado, freqüentemente associada com a hiperatividade e déficit de atenção e, em geral, baixo quociente de inteligência. Entretanto, retardo mental ocorre em apenas 3% dos casos. Discreto ou moderado retardo no crescimento e atraso na idade óssea estão presentes em 25% dos casos. Defeitos auditivos estão presentes em um quarto dos pacientes. Outras manifestações foram observadas, como infecções repetidas nas vias aéreas superiores, diminuição da massa óssea, surdez, hipotonia e convulsão (Ribeiro, et al, 1998; Fondell, et al, 1996).

Muitas das características clínicas encontradas em alguns pacientes com RTH podem ser manifestações da privação tecido-específica do HT durante estágios precoces do desenvolvimento. A severidade dos sintomas esta relacionada à expressão relativa do alelo mutante e dos co-fatores de forma tecido-especifica. O curso da doença, assim como a sua apresentação, pode ser variável. Alguns indivíduos têm o crescimento e o desenvolvimento normal, outros apresentam graus variáveis de retardo mental e/ou de crescimento. Estudos em humanos e em camundongos TR β *knock-out* demonstraram que a severidade da doença tende a melhorar com o envelhecimento (Warnmark, et al, 2003).

A visão monocromática foi reportada em humanos com a síndrome recessiva de resistência ao hormônio tireoideano (Newell & Diddie, 1977), presumivelmente devido a um defeito no TR do tipo β 2. Entretanto, não esta claro ainda se esta deficiência visual está presente na forma típica dominante da

síndrome, já que relatos sobre a visão em pacientes são escassos na literatura (Refetoff, et al, 1993). Análises preliminares de alguns pacientes apresentando a síndrome na forma dominante não demonstraram nenhum déficit na visão cromática (apud, Gurnell & Chatterjee, comunicação pessoal). A cegueira cromática não é geralmente mencionada em crianças com hipotireoidismo, gerando uma incerteza se a ação do TR β 2 é T3 dependente ou independente. Contudo, estudos *in vitro* com culturas retinianas aumentaram a possibilidade da expressão das opsinas S e M, serem influenciadas pelo hormônio tireoideano.

Animal de estudo

Para estudar o papel dos TR na formação dos tecidos do SNC em desenvolvimento, era necessário desenvolver modelos para a síndrome de resistência ao hormônio tireoideano. Pacientes com hipotireoidismo e síndrome de resistência ao hormônio tireoideano apresentam dificuldades significantes de movimentação e de aprendizado, entretanto estas alterações não foram reportados nos modelos knock-out para os TRs (Gauthier et al, 1999; Gothe, et al, 1999).

Hashimoto e colaboradores, em 2001, desenvolveram um animal com uma mutação pontual, uma deleção no aminoácido treonina do TR β (Δ 337T), gerando um modelo *knock-in* da síndrome de resistência ao hormônio tireoideano (KINDRED S) em camundongos. Os receptores apresentando esta mutação inibem, de forma dominante, a transcrição do gen por eles regulados, mesmo na

presença do ligante. A síndrome associada a esta mutação foi primeiro descrita por Ono e colaboradores, em 1991, numa família de parentes consangüíneos, na qual, os pais (heterozigotos) apresentavam um quadro severo de RHT e, os filho (homozigotos) sucumbiam com pouco tempo de vida. Esta mutação impede totalmente a ligação do T3 ao receptor, resultando na ausência do efeito do receptor dependente do ligante. Contudo, a estrutura do receptor permitia a este se ligar ao DNA e recrutar os co-repressores, N-CoR e SMRT. Logo, a repressão ou ativação, causada pelos TRs truncados era maior em relação a um animal *knock-out*, no qual não existia o receptor.

Estudos demonstraram que este modelo apresentava mudanças no SNC características de um quadro de hipotireoidismo, apesar de um elevado nível do hormônio tireoideano. Os resultados do trabalho demonstraram que o modelo em homozigose apresenta um cerebelo com massa menor, devido a uma diminuição no número de células de Purkinje. Além disso, o animal também apresentou déficit de aprendizado em testes em labirinto aquático (Hashimoto, et al, 2001).

A retina do *Knock-out* TR β 2

Os receptores do hormônio tireoideano do tipo β 2 demonstraram ter grande influência na visão dicromática de camundongos. Experimentos utilizando animais em homozigose para uma mutação knock-out no gen do TR β 2, mostraram a importância deste na formação da via alternativa de expressão das opsinas M. Além disso, os animais *knock-out* expressaram prematuramente as opsinas S, na

idade de 17 dias embrionários. Contudo, estas mudanças não acarretaram em alterações no número total de cones.

Os resultados demonstraram que, os cones imaturos possuem o potencial de seguir a via de formação dos cones S (default) e, o TR β 2 é responsável pela supressão dos opsinas S, até o momento apropriado, e mais tarde, pela indução das opsinas M, através de fatores intermediários (Ng, et al, 2001).

Objetivos

1. Observar a expressão das opsinas sensíveis aos comprimentos de ondas médias e curtas na retina de camundongos, apresentando diferentes genótipos: selvagem, homozigoto e heterozigoto, para a mutação $\Delta 337T$ no gen do receptor do hormônio tireoideano tipo beta.
2. Avaliar a expressão das opsinas S e M, dos diferentes genótipos, em diferentes níveis séricos do hormônio tireoideano.
3. Realizar uma análise quantitativa dos cones expressando as opsinas S e M, nos diferentes genótipos e tratamentos.
4. Estudar a distribuição topográfica dos cones que expressam opsinas S e M, nos diferentes tratamentos e genótipos.

Material e métodos

Animal

Foram utilizados camundongos heterozigotos para a mutação $\Delta 337T$ no gen do TR β , gerados por Hashimoto e colaboradores. Utilizou-se neste estudo animais selvagens (wt), heterozigotos (ht) e homozigotos (hm), de ambos os sexos, provenientes do acasalamento de animais em heterozigose. Assim como, foram utilizados camundongos com ausência da expressão dos receptores TR $\beta 2$, gerados por Abel e colaboradores, 1999. O genótipo dos filhotes foi determinado através da análise do DNA, extraído da cauda do camundongo, utilizando a técnica de PCR (Polymerase chain reaction). Já os resultados das dosagens hormonais foram obtidos através da técnica de radioimunoensaio. Os procedimentos de genotipagem e dosagem dos níveis hormonais foram realizados pelo laboratório de Endocrinologia Molecular, em colaboração com o nosso laboratório. Os animais foram mantidos sob condições de luz (12 horas claro e 12 horas escuro) e temperatura ($24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ controlados). A manipulação e sacrifício dos animais seguiram as normas estabelecidas pela sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC) e aprovada pela comissão de uso de animais experimentais do IBCCF^o.

Administração das drogas

As fêmeas grávidas foram tratadas com o fármaco Metimazole (MMI), desde o primeiro momento em que foram colocadas em contato com os machos.

O Metimazole foi ministrado na água de beber, na concentração de 0,1% do fármaco. O Metimazole é um composto que bloqueia a síntese do hormônio tireoidiano T3 e T4, atuando na fase de organificação do iodo, inibindo a enzima tireoperoxidase. Este é capaz de atravessar a barreira placentária e também de ser excretado no leite materno.

O tratamento com T4 visou aumentar os níveis séricos do hormônio tireoidiano. Este hormônio é convertido a T3, pelas enzimas desiodases, sendo esta a forma que possui uma maior afinidade pelo receptor. O T4 atravessa a barreira placentária com maior dificuldade do que o MMI, e também pode ser ingerido através do leite materno. Desde o primeiro dia de contato com o macho a fêmea começou a receber injeções diárias na concentração de 5ug de T4 por 100g de peso corporal. Durante toda a gestação e até os primeiros cinco dias de nascimento, a progenitora foi a única a receber as doses. A partir do sexto dia de nascimento, até o dia do sacrifício, a prole passou a ser injetada com o hormônio tireoideano. O sacrifício ocorreu com no mínimo vinte e dois dias de nascimento. O sangue foi coletado para dosagem hormonal dos animais e os olhos fixados para imunohistoquímica.

Fixação e obtenção do tecido.

Os animais foram sacrificados entre as idades de 22 a 30 dias, em câmara de CO₂ e decapitados. Em seguida, a região superior do globo ocular foi identificado com uma marca na córnea o que permitiu a posterior orientação da retina. Os olhos foram então enucleados e fixados por imersão em

paraformaldeído 4% (PA 4%), diluído em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2, por duas horas à temperatura ambiente. Em seguida, o tecido foi lavado em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2 com um mínimo de três trocas e mantidas nesta solução por uma noite.

Para a obtenção dos cortes, as retinas foram imersas previamente em solução de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2 com concentrações crescentes de sacarose (10%, 20% e 30%) com o objetivo de crioproteção. Após um pernoite em solução de sacarose 30%, a retina foi dissecada e montada em meio de inclusão (OCT) (Sakura Finetek, Torrance, CA) sobre uma placa de alumínio e congelada em nitrogênio líquido (-196° C). Na montagem do bloco foram colocadas amostras das retinas de camundongo: homozigoto, heterozigoto, tipo selvagem e knock-out (controle negativo) para que estes fossem coletados na mesma lâmina. Cortes transversais de 12 µm eram obtidos em criostato numa temperatura entre -15° C a -20° C. As lâminas eram previamente gelatinizadas no mínimo com um dia de antecedência, e deixadas a secar por um pernoite à temperatura ambiente antes de serem devidamente estocadas. O preparo da gelatina consistia da diluição da gelatina a 0,5% e 0,2% de alúmen de cromo em água destilada, a solução era aquecida durante o processo de diluição.

As lâminas, com os cortes coletados secavam a temperatura ambiente, eram armazenadas em caixas fechadas envolvidas com filme plástico e mantidas a -20°C até o momento da utilização. Quando era necessário utilizá-las, as caixas eram retiradas do freezer e, após alcançarem a temperatura ambiente, podiam ser abertas a fim de retirar as lâminas desejadas.

As retinas cujo objetivo era a montagem plana não passavam pelo gradiente de sacarose. Após a fixação e consecutiva lavagem, estas eram dissecadas, com o auxílio de uma lupa, em solução de PBS. Um talho era sempre feito na região superior da retina para que não se perdesse a orientação. A retina era então disposta entre duas lâminas de vidro e achatada por 24 horas em solução de PBS. No dia seguinte, estas eram transferidas para uma placa contendo quatro poços, onde iniciavam os procedimentos de imunohistoquímica por imersão.

Imunohistoquímica

Os procedimentos de imunomarcacão simples foram feitos para observar a expressão diferencial das opsinas sensíveis ao comprimento de onda curta (S) e médio (M). Utilizamos os anticorpos policlonais obtidos comercialmente da Santa Cruz Biotechnology ou doados pelo Dr. J. Nathans (JN-492; JN-455) nas concentrações finais de 1:1.000 e 1:10.000, respectivamente.

Tanto os cortes, quanto as retinas intactas a serem processadas para imunocitoquímica, foram previamente imersas em tampão fosfato salina com 0,25% de triton (PBS + triton 0,25%), para que os cortes fossem lavados e tornar as membranas mais permeáveis à passagem do anticorpo. Seguiu-se então a incubação em albumina soro bovina (BSA) 5%, por no mínimo 2 horas. Além dessas, todas as diluições do protocolo foram feitas em solução de fosfato salina (PBS) com 0,25% de triton.

Os cortes foram incubados por um pernoite com o anticorpo primário, entretanto, as retinas intactas incubadas por imersão foram mantidas por seis dias, devido à dificuldade de penetração do anticorpo na região central, mais espessa, sendo seguida de lavagem em PBS + triton 0,25% (3 vezes por 10 minutos cada).

Após a incubação com o anticorpo primário, tanto os cortes quanto as retinas intactas seguiam o mesmo protocolo. As retinas foram incubadas por 2 horas com o anticorpo secundário biotilado feito em coelho anti-carneiro (Santa Cruz) ou feito em carneiro anti-coelho (JN), todos os anticorpos secundários foram obtidos da Vector e utilizados numa diluição de 1:200. As amostras foram novamente lavadas em PBS + triton 0.25% (3 vezes, por 10 minutos) e incubados em avidina-biotina peroxidase (ABC), (1:50; Kit Elite Vectastain, Vector), por no mínimo 2 horas. A solução de ABC foi preparada com antecedência mínima de 30 minutos do uso, conforme recomendação do fabricante. Finalmente, após lavagem em PBS+ triton (3 vezes, por 10 minutos), a reação foi revelada com o cromógeno DAB (0,05% 3,3-diaminobenzidina tetrahydrocloroto) na presença de 0,01% peróxido de hidrogênio em tampão Tris-HCl 0,1M, pH 7,6 ou com o kit para peroxidase com o cromógeno SG (Vector) por 10 minutos. Os cortes eram lavados em PBS e montados com meio de glicerol tamponado (40% em tampão fosfato 0,2M).

Análise e Contagem de células

Para análise dos cortes histológicos e das montagens planas das retinas de camundongo foi utilizado o microscópio óptico Axioskop (Zeiss). Para a contagem das células imunorreativas foram previamente desenhados os mapas da retina. Utilizávamos um ampliador fotográfico para projetar a imagem sobre o papel milimetrado e desenhar um mapa da retina na escala de 1:10. Neste momento a região superior da retina foi identificada para posterior orientação.

Para a contagem utilizamos uma grade acoplada a ocular de 10x, que junto com a objetiva de 63x, abrangia uma área de $0,0256\text{mm}^2$. Os campos foram contados a cada $0,5\text{mm}^2$, baseando-se no mapa previamente feito. Ao término do processo, aproximadamente 10% da retina havia sido contada. Foram analisadas, aproximadamente, três retinas de cada genótipo, com os diferentes tratamentos.

Os resultados foram usados para montar um modelo da densidade de cada retina e das diferentes regiões. A área superior (retina dorsal) e inferior (retina ventral) foram diferenciadas baseado na marcação feita no momento da enucleação e montagem. A densidade média dos fotorreceptores, assim como as duas regiões anteriormente citadas, foram calculadas com o auxílio de programa estatístico. Os dados foram analisados estatisticamente usando one-way ANOVA e o pós-teste (não paramétrico) de Tukey.

Resultados

Análise dos cortes

Inicialmente, imunoreagimos os cortes obtidos ao criostato para observarmos a expressão das opsinas S e M dos diferentes genótipos, Selvagem, heterozigoto e homozigoto, para a mutação $\Delta 337T$. Nos modelos *knock-out* em homozigose, ou seja, com ausência dos receptores do tipo beta, já havia sido demonstrado que ocorre somente a expressão das opsinas sensíveis aos comprimentos de ondas curtas (S), servindo este como controle negativo do nosso experimento. Os camundongos selvagens, entretanto, foram nossos controles positivos, pois na literatura já esta bem definida a expressão dos dois tipos diferentes de opsinas (S e M) (Jacobs, et al, 1991). Nestes animais, os resultados das imunohistoquímicas confirmaram a expressão de ambas as opsinas (fig. 3; wt), assim como os animais em heterozigose, que também apresentaram marcação para os dois tipos de opsinas (fig. 4; ht). Entretanto, os animais homozigotos não expressaram as opsinas sensíveis ao comprimento de onda médio, assim como o animal *knockout*, confirmando os resultados de Lily Ng em 2001 (fig. 4; hm e ko).

SEM TRATAMENTO

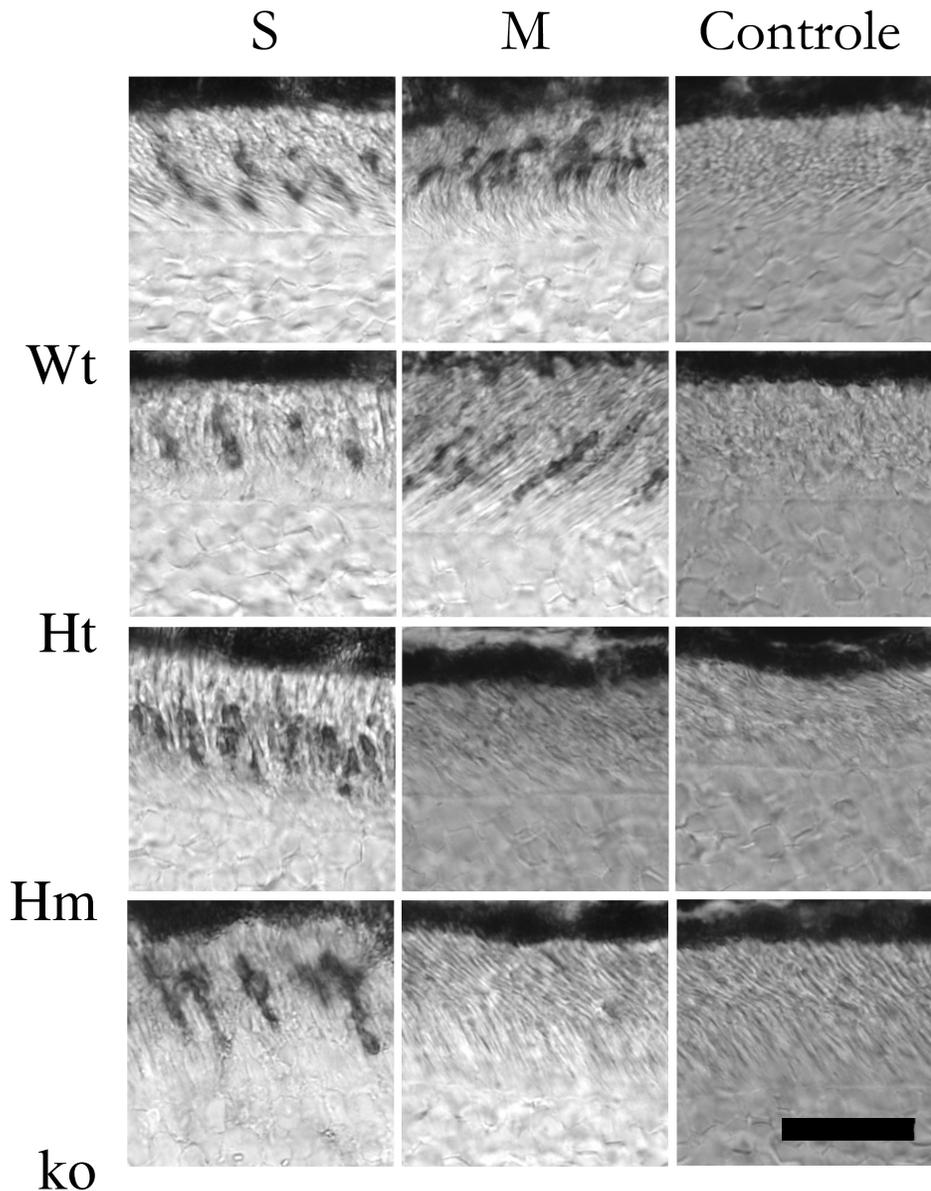


Figura 4. Fotomicrografias de cortes transversais da retina (porção mais externa) de camundongos mostrando a expressão das opsinas S e M, dos diferentes genótipos. As colunas indicam a expressão diferencial de opsinas S, opsinas M e o controle da reação imunológica. As linhas mostram os genótipos do animal: selvagem (wt), heterozigoto (ht), homozigoto (hm) para a mutação $\Delta 337T$ no TR β e knock-out (Ko) para o TR $\beta 2$ (n=3 por genótipo). As marcações aparecem somente na camada dos segmentos externos dos fotorreceptores. Todos os genótipos apresentaram a expressão das opsinas S, porém, os animais hm e ko não expressaram as opsinas M. Barra de calibração = 20 μ m.

Tratamentos.

Com o objetivo de estudar possíveis alterações na expressão das opsinas S e M, os camundongos *knock-in* e *knock-out* foram submetidos a dois tratamentos diferentes para aumentar e diminuir os níveis hormonais.

O tratamento com o fármaco Metimazole, primeiramente na progenitora e depois nos filhotes até o sacrifício, visou induzir o hipotireoidismo no período intra-uterino e neonatal. Já o tratamento com o hormônio T4, tinha como objetivo aumentar os níveis séricos de T3, e assim, induzir o hipertireoidismo nos animais selvagens e aumentar os níveis de T3 nos animais heterozigotos, já que estes apresentam níveis ligeiramente maiores. Os animais em homozigose apresentam níveis tão elevados dos hormônios tireoidianos, que nenhum aumento significativo foi esperado.

Tratamento com metimazole

Novamente foram analisados os três genótipos, selvagem, heterozigoto e homozigoto, para a mutação $\Delta 337T$. Porém, o animal knock-out em homozigose só foi observado no tratamento com o fármaco metimazole. Nossos resultados foram comparados com os obtidos com os animais sem o tratamento, para analisarmos possíveis alterações qualitativas causadas pelos diferentes níveis séricos do hormônio. As retinas dos modelos tratados com MMI seguiram o mesmo protocolo dos animais anteriormente analisados. Os animais com o genótipo selvagem e heterozigoto, apresentaram o mesmo fenótipo dos animais

eutiroideos, ambos expressaram as opsinas S e M (figura 5; wt e ht). Entretanto, os animais em heterozigose demonstraram pequenas alterações morfológicas em relação ao animal do tipo selvagem. Os camundongos em homozigose e os animais *knock-out* expressaram apenas as opsinas sensíveis ao comprimento de ondas curtas, apresentando o fenótipo de visão monocromática (Figura 5; hm e ko).

Tratados com metimazole

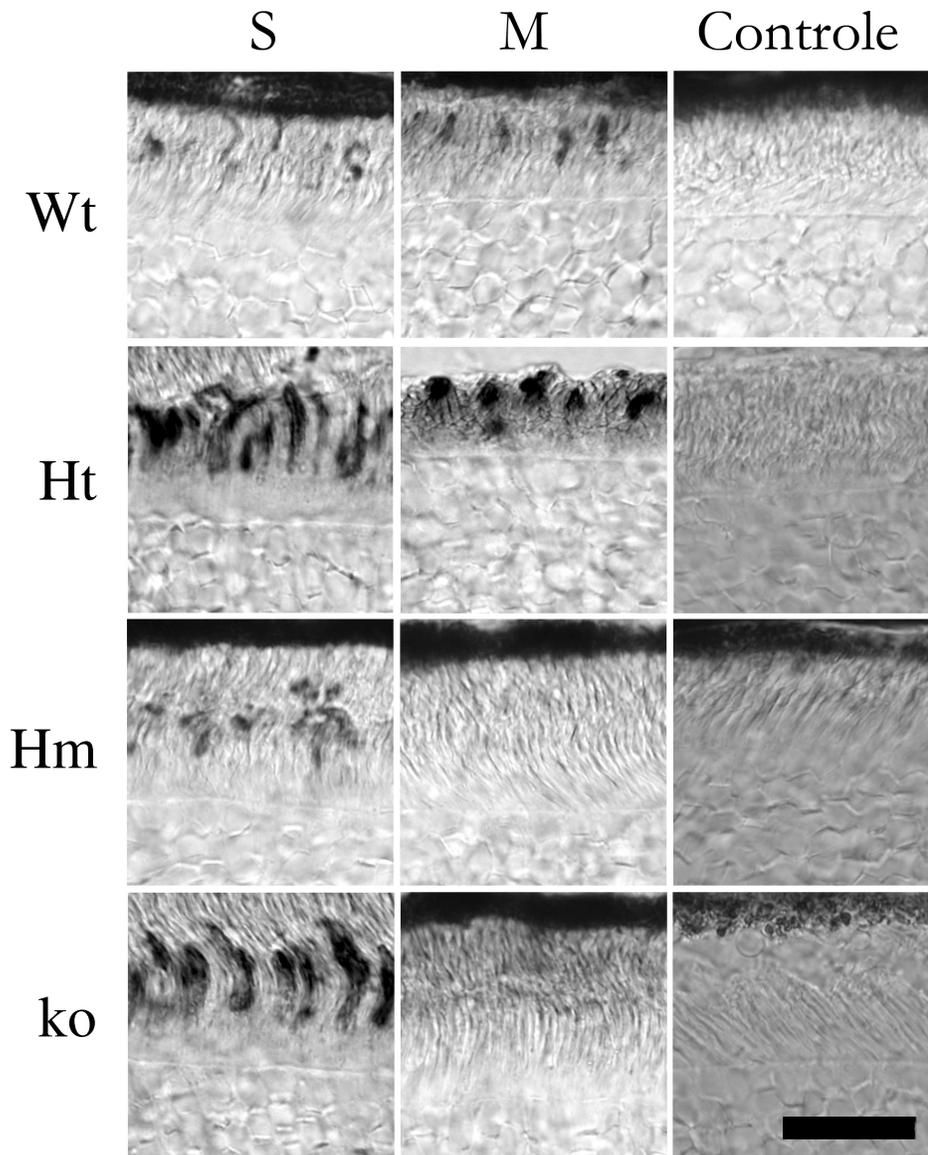


Figura 5. Fotomicrografias de cortes transversais da retina (porção mais externa) de camundongos hipotireoideos mostrando a expressão das opsinas S e M, dos diferentes genótipos. As colunas indicam a expressão diferencial de opsinas S, opsinas M e o controle da reação imunológica. As linhas mostram o genótipo do animal: selvagem (wt), heterozigoto (ht), homozigoto (hm) para a mutação $\Delta 337T$ no TR β e knock-out (Ko) para o TR $\beta 2$ (n=3 por genótipo). As marcações aparecem somente na camada dos segmentos externos dos fotorreceptores. Todos os genótipos apresentaram a expressão das opsinas S, porém, os animais hm e ko não expressaram as opsinas M. Barra de calibração = 20 μ m.

Tratamento com T4

Os animais tratados com o hormônio T4, genótipo selvagem e heterozigotos, apresentaram o mesmo padrão dos outros dois tratamentos, ambos expressaram as opsinas sensíveis ao comprimento de ondas curtas e médias (Figura 6; wt e ht). Assim como, os animais em homozigose somente expressaram as opsinas sensíveis ao comprimento de onda curta (Figura 6; hm). Não tivemos acesso aos animais de genótipos *knock-out* para o TR β 2, dos animais que sofreram o tratamento com T4.

Tratados com T4

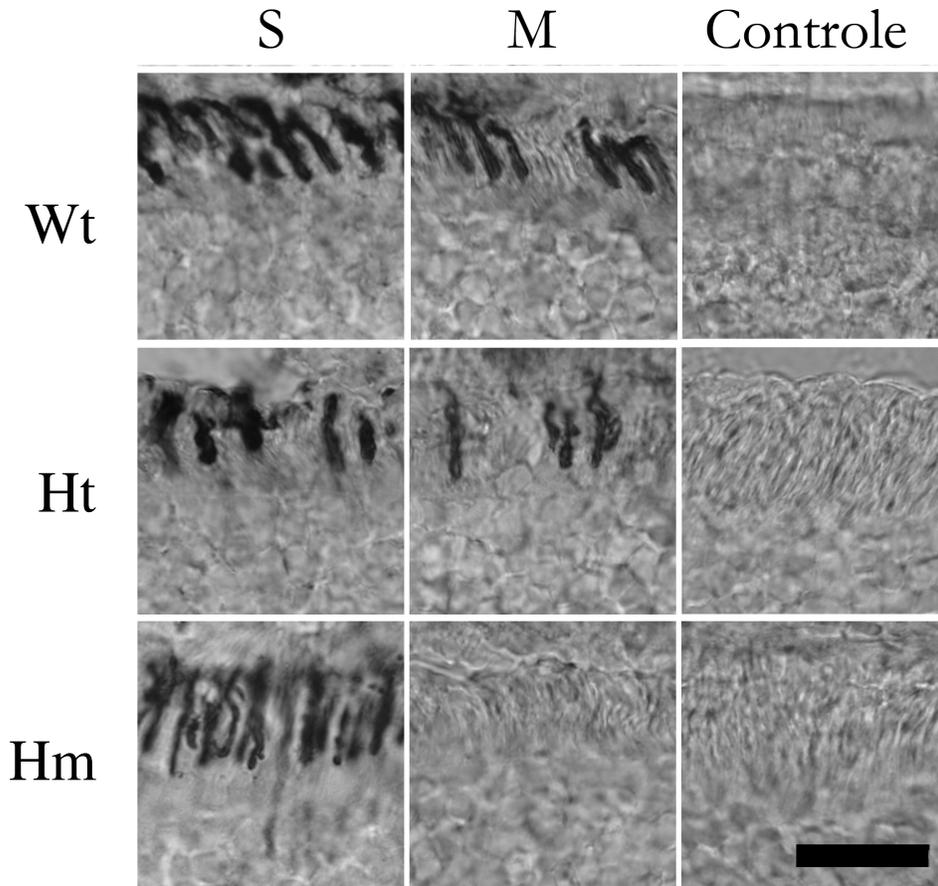


Figura 6. Fotomicrografias de cortes transversais da retina (porção mais externa) de camundongos hipertireoideos mostrando a expressão das opsinas S e M, dos diferentes genótipos. As colunas indicam a expressão diferencial de opsinas S, opsinas M e o controle da reação imunológica. As linhas mostram o genótipo do animal: selvagem (wt), heterozigoto (ht) e homozigoto (hm) para a mutação $\Delta 337T$ no $TR\beta$ (n=3 por genótipo). As marcações aparecem somente na camada dos segmentos externos dos fotorreceptores. Todos os genótipos apresentaram a expressão das opsinas S, porém, o animal hm não expressou as opsinas M. Barra de Calibração = 20 μ m.

Análise quantitativa

Com o intuito de avaliar possíveis alterações quantitativas no número de células expressando as opsinas S e M, foram feitas montagens planas das retinas do camundongo. Primeiramente, estas foram imunorreagidas com anticorpos específicos contra as opsinas S e M, em seguida, os campos amostrais foram contados. A área total observada foi de aproximadamente 10% da retina. Novamente, foram analisados modelos que não sofreram tratamento e tratados com metimazole e T4. Nosso objetivo neste momento era quantificar o número de cones S e M na retina de camundongos, para observarmos possíveis alterações causadas pelos diferentes genótipos e/ou tratamentos. Os nossos resultados foram separados entre os diferentes genótipos para facilitar a comparação. Os resultados das análises quantitativas representam a média da contagem de três retinas por genótipo.

Genótipo Selvagem

O genótipo selvagem apresentou valores bastante semelhantes entre os três tratamentos (gráfico 1). Quando comparamos a densidade de cones S e M, na retina de animais que não sofreram o tratamento, observamos valores muito próximos entre os diferentes grupos de cones (cones S: 11.429,7cones/mm²; cones M: 10.972,6cones/mm²; P>0,05). Porém, quando analisamos a densidade de cones na retina de animais tratados com T4, observamos que o número de

cones S em relação aos cones M foi um pouco maior, entretanto, esta diferença também não foi estatisticamente significativa (cones S: 10.035,2cones/mm²; cones M: 10.972,6cones/mm²; P>0,05). Somente os animais tratados com metimazole apresentaram uma diferença estatisticamente significante entre o número de cones expressando as diferentes opsinas S e M. A densidade de cones M sofreu uma pequena diminuição em relação à densidade de cones S (cones S: 12.125,0cones/mm²; cones M: 9.984,4cones/mm²; P<0,001). Estes resultados sugerem a importância do hormônio tireoidiano na diferenciação de cones na retina de camundongos.

Animais Selvagens

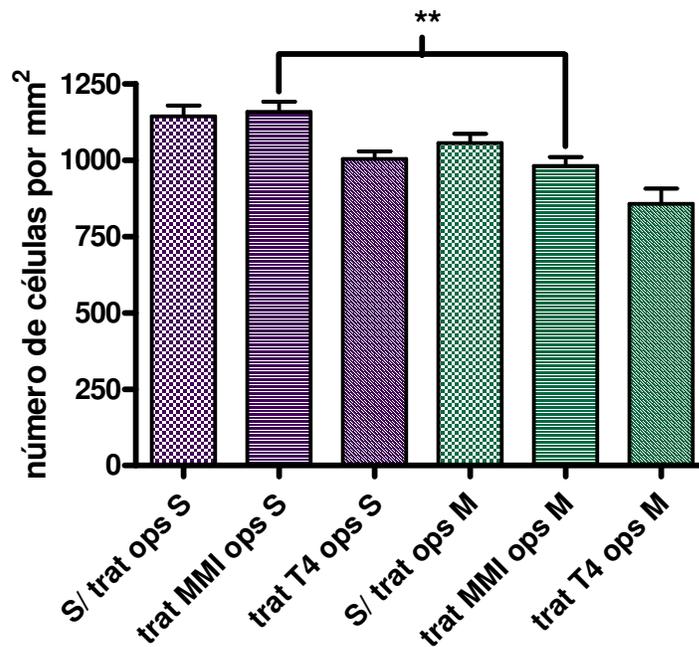


Gráfico 1. Densidade média de cones expressando as opsinas S e M, dos animais genótipo selvagem. O gráfico compara a expressão das opsinas S e M entre os diferentes tratamentos. Cada coluna representa a média de três experimentos com retinas diferentes (n = 3). (** P < 0,01).

Heterozigose

Os resultados obtidos com animais em heterozigose apresentaram diferenças marcantes entre a expressão das diferentes opsinas (gráfico 2). Os animais que não sofreram tratamentos expressaram uma diferença estatisticamente significativa entre o número de cones S e M (Cones: 12.058,6cones/mm²; Cones M: 7.835,9cones/mm²; P<0,001). O mesmo ocorreu com os animais tratados com o fármaco metimazole, que demonstraram uma significativa diferença entre a densidade de cones expressando as opsinas S e M (cones S: 13.839,9cones/mm²; cones M: 8.847,7cones/mm²; P<0,001). Apesar de apresentar uma densidade maior de cones S, o número de cones M também aumentou, mantendo a diferença entre a densidade de cones S e M, proporcional ao observado nos animais sem tratamento. Por fim, os animais tratados com T4 apresentaram valores similares de cones S e M (cones S: 12.468,8cones/mm²; cones M: 7.074,2 cones/mm²; P<0,001), quando comparado com os animais sem tratamento de mesmo genótipo.

Animais heterozigotos

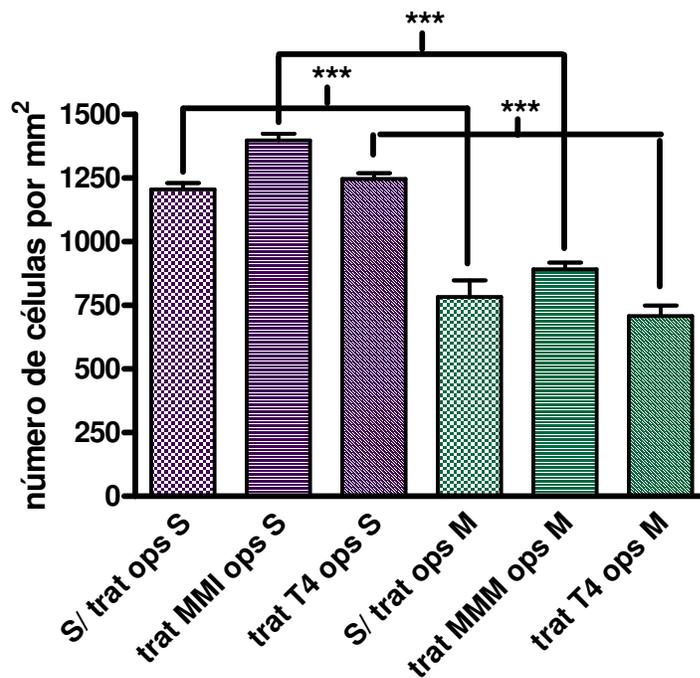


Gráfico 2. Densidade média total de cones expressando as opsinas S e M, dos animais genótipo heterozigoto. O gráfico compara a expressão das opsinas S e M entre os diferentes tratamentos. Cada coluna representa a média de três experimentos com retinas diferentes (n = 3). (***) P<0,001).

Homozigoto

Os animais em homozigose apresentaram em todos os tratamentos, ausência total de expressão das opsinas M (gráfico 3). Conseqüentemente, demonstraram os maiores valores de densidade de cones S (wt: 13.031,3cones/mm²; ht: 15.187,5cones/mm²; hm: 13.992,2cones/mm²) que em todos os outros genótipos. As densidades de cones S dos animais em homozigose não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os diferentes tratamentos.

Os resultados sugerem a importância da presença dos receptores do hormônio tireoidiano viáveis na densidade de células expressando as opsinas S e M, se sobrepondo o genótipo, sobre os níveis séricos dos hormônios.

Animais homozigotos

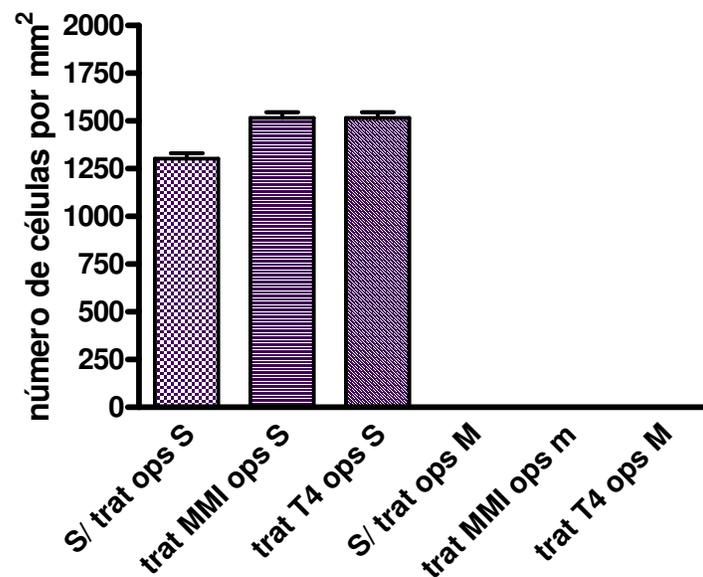


Gráfico 3. Densidade média total de cones expressando as opsinas S e M, dos animais genótipo homozigoto. O gráfico compara a expressão das opsinas S e M entre os diferentes tratamentos. Cada coluna representa a média de três experimentos com retinas diferentes (n=3).

Alterações topográficas

Com o intuito de perceber alterações no mapa topográfico da retina dos camundongos, os campos amostrais, contados anteriormente, foram separados em região dorsal e ventral da retina, orientados pela marcação feita previamente a enucleação dos olhos. Szél, e colaboradores, em 1992, apresentaram um modelo para a retina do camundongo, no qual foi vista a regionalização das opsinas S e M. Na região dorsal ocorre predominantemente a expressão das opsinas M, ao passo que, na região ventral predomina a expressão das opsinas S. Nosso estudo visa observar se as alterações na densidade de cones S e M na retina de camundongos, observadas nos experimentos anteriores, ocorrem preferencialmente em uma das regiões (dorsal ou ventral) da retina.

Os resultados foram separados em três gráficos ($n = 3$), apresentando em cada um os diferentes tratamentos. As análises foram feitas observando as diferenças nas densidades de cones S e M, que ocorrem nos diferentes genótipos, e comparado entre as regiões, dorsal e ventral.

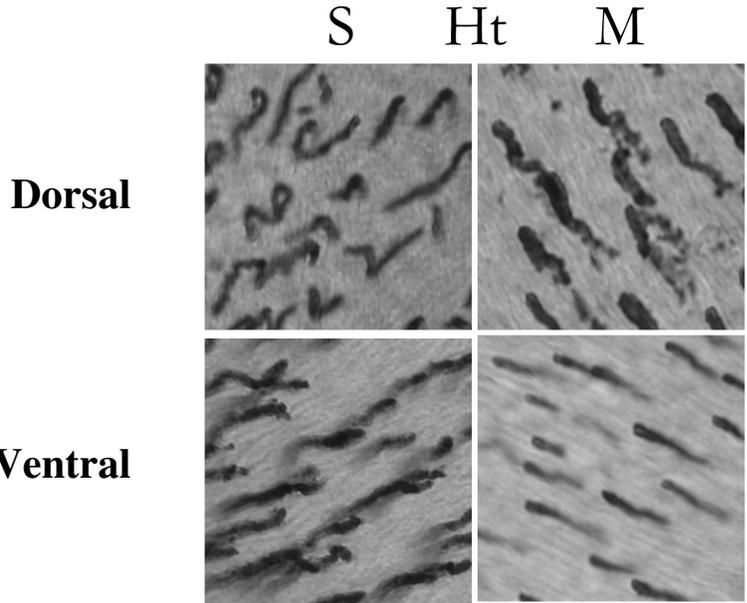
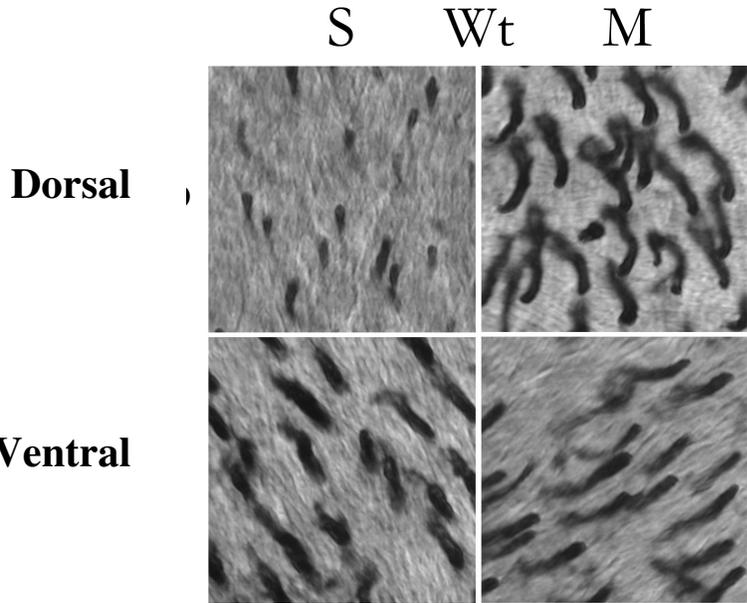
Sem tratamento

O gráfico 4 corrobora os resultados de Szél, A., 1992, quando apresenta uma pequena regionalização na expressão das opsinas S e M, no genótipo selvagem. A região dorsal apresenta uma maior densidade de cones M, ao passo que, na região ventral predomina os cones S.

A análise da região dorsal dos animais não tratados demonstrou valores crescentes na expressão das opsinas S, entre os genótipos (wt: 9.648,4cones/mm²; ht: 11.457,0cones/mm² e hm: 12.449,2cones/mm²). O mesmo ocorreu na região ventral da retina (wt: 12.511,7cones/mm²; ht: 12.992,2cones/mm² e hm: 13.558,6cones/mm²), entretanto, em menores proporções. Isto porque, a densidade de cones S já está elevada na região ventral, perto do número total de cones, não podendo crescer além deste limite.

Por outro lado, os cones expressando as opsinas M vão diminuindo entre os genótipos (wt: 12.515,6cones/mm² e ht: 10.765,6cones/mm²), se tornando completamente ausente no animal em homozigose, independente da região. A densidade de cones M é naturalmente menor na região ventral da retina, entretanto, houve uma drástica diminuição do número de cones M no animal em heterozigose nesta região (wt: 9.121,1cones/mm² e ht: 3.527,3cones/mm²; P<0,001). Estes resultados sugerem que inibição da expressão das opsinas ocorra preferencialmente na região ventral da retina.

Sem Tratamento



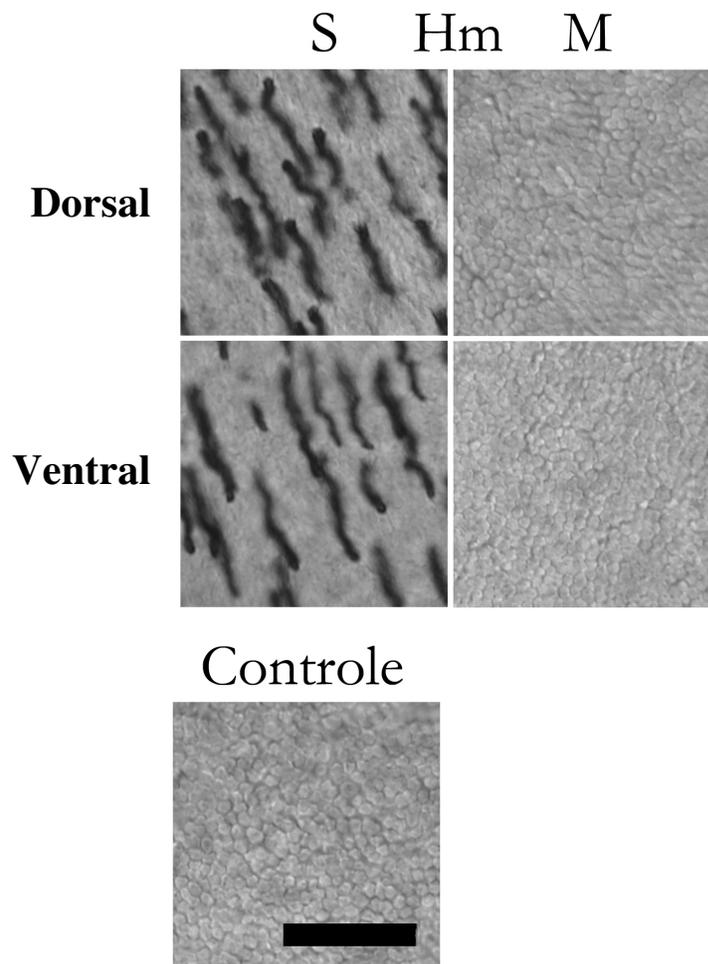


Figura 7. Fotomicrografia de montagens planas da retina de camundongos sem tratamento, mostrando a expressão das opsinas S e M, dos diferentes genótipos. As figuras mostram a região superior (dorsal) e inferior (ventral) da retina dos diferentes genótipos: selvagem (Wt), heterozigoto (ht) e homozigoto (hm) (n=3 por genótipo). Todos os genótipos apresentaram a expressão das opsinas S, porém, o animal hm não expressou as opsinas M. Barra de calibração = 20 micrometros.

Gráfico da densidade de cones S e M, de animais sem tratamento

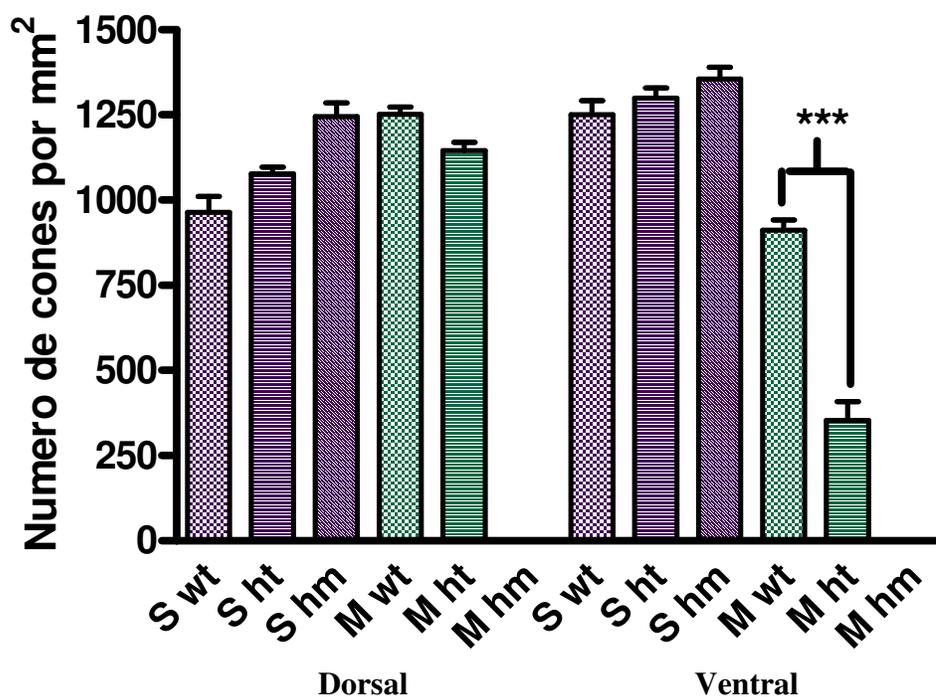


Gráfico 4. Densidade média de cones expressando as opsinas S e M, dos animais sem tratamento. O gráfico compara a região dorsal com a região ventral da retina, dos diferentes genótipos. Cada coluna representa a média de três experimentos com retinas diferentes (n = 3). (***) P < 0,001

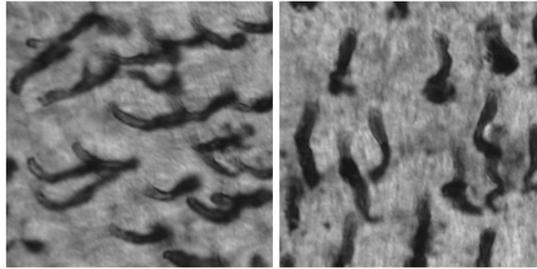
Tratados com Metimazole

Os animais selvagens tratados com metimazole não apresentaram a mesma disposição topográfica visto nos animais sem tratamento, e por Szél, em 1992 (gráfico 5). Os resultados mostram uma maior densidade de cones S, tanto na região dorsal, quanto na ventral. Em ambas as regiões, ocorreram o aumento na densidade de cones S dependente do genótipo (dorsal: wt: 12.691,4cones/mm²; ht: 13.597,7cones/mm² e hm: 15.031,3cones/mm²; Ventral: wt: 11.472,7cones/mm²; ht: 14.101,6cones/mm² e hm: 15.300,8cones/mm²). Da mesma forma, observamos a diminuição no número de cones M dependendo do genótipo (dorsal: wt: 11.140,6cones/mm² e ht: 9.757,8cones/mm²; ventral: wt: 8.609,4cones/mm² e ht: 7.968,8cones/mm²). Como visto nos animais sem tratamento, a densidade de cones M foi sempre menor na região ventral da retina. Esta proporção se manteve nos diferentes genótipos.

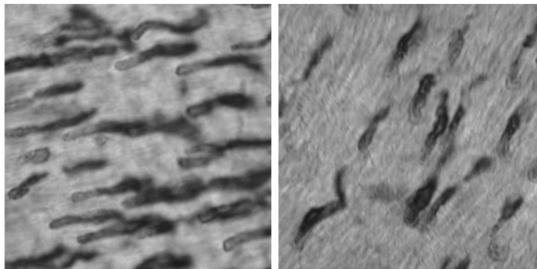
Tratados com Metimazole

S W_t M

Dorsal

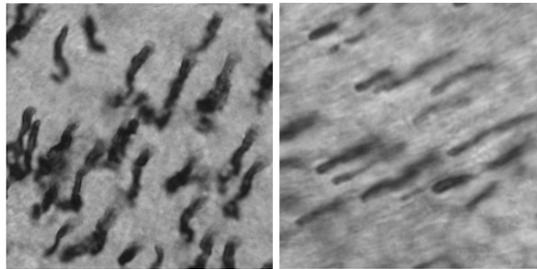


Ventral

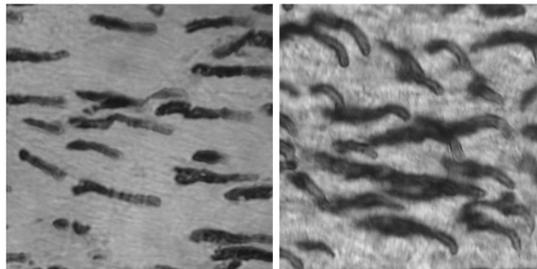


S H_t M

Dorsal



Ventral



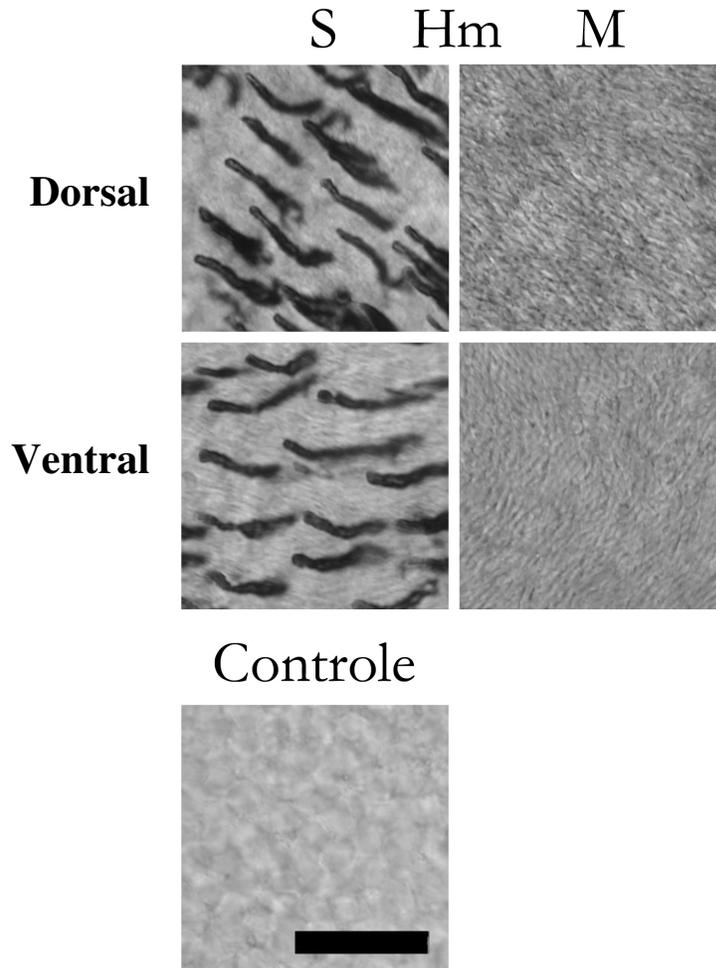


Figura 8. Fotomicrografia de montagens planas da retina de camundongos tratados com metimazole, mostrando a expressão das opsinas S e M, dos diferentes genótipos. As figuras mostram a região superior (dorsal) e inferior (ventral) da retina dos diferentes genótipos: selvagem (Wt), heterozigoto (ht) e homozigoto (hm) (n=3 por genótipo). Todos os genótipos apresentaram a expressão das opsinas S, porém, o animal hm não expressou as opsinas M. Barra de calibração = 20 micrometros.

Gráfico da densidade de cones S e M, de animais tratados com metimazole

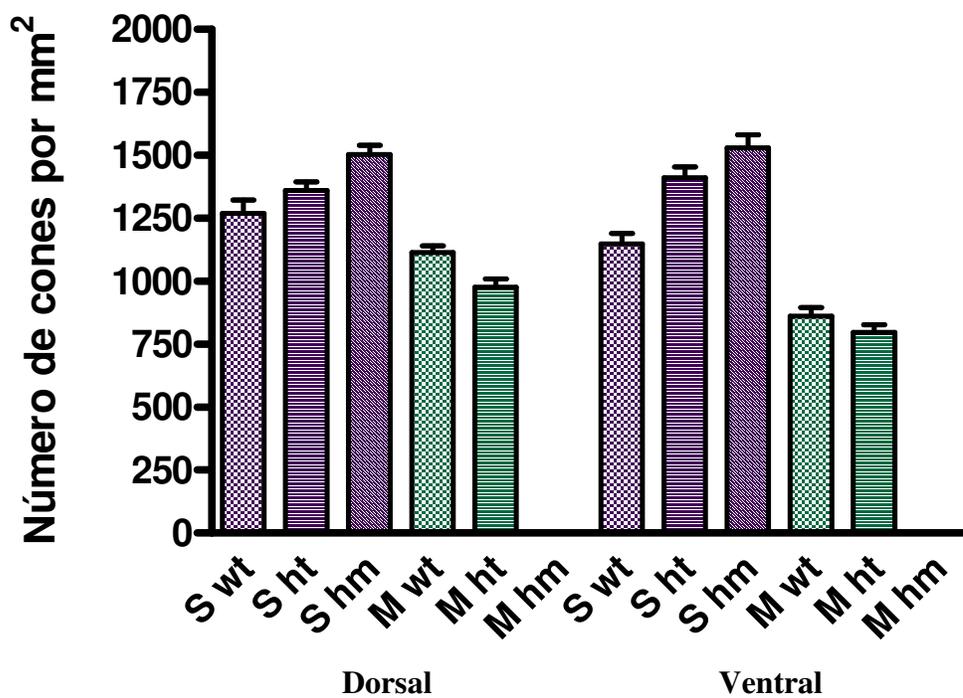
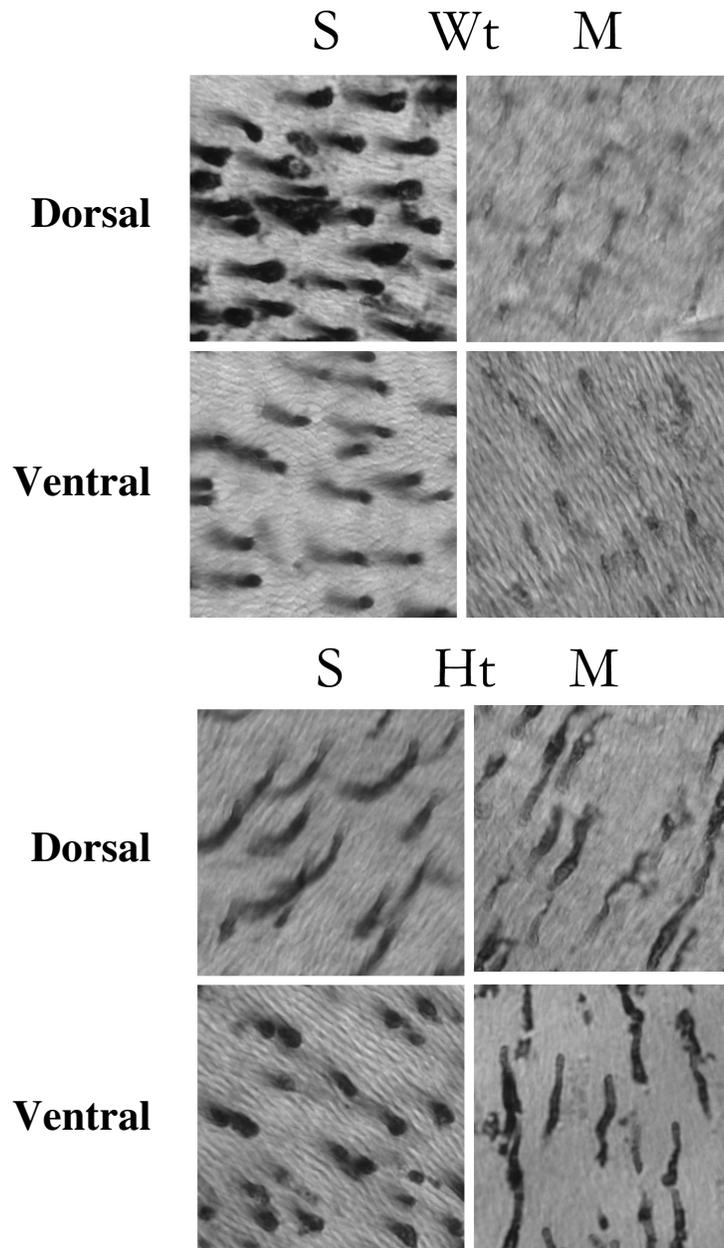


Gráfico 5. Densidade média de cones expressando as opsinas S e M, dos animais tratados com metimazole. O gráfico compara a região dorsal com a região ventral da retina, dos diferentes genótipos. Cada coluna representa a média de três experimentos com retinas diferentes (n = 3).

Tratados com T4

Os animais tratados com T4 expressaram a mesma regionalização de cones S e M, na região ventral, observada nos animais sem o tratamento. Contudo, a diferença da densidade de cones S e M na área dorsal, não foi estatisticamente significativa (gráfico 6). Os camundongos tratados com T4 aumentaram o número de cones S na região dorsal e ventral, de forma bastante similar entre os diferentes genótipos (dorsal: wt: 10.558,6cones/mm²; ht: 11.527,3cones/mm² e hm: 13.347,7cones/mm²; ventral: wt: 9.589,8cones/mm² ht: 13.453,1cones/mm² e hm: 13.347,7cones/mm²). Entretanto, ocorreu um aumento maior na densidade de cones S dependente do genótipo, na região ventral da retina (P<0,001). A densidade de cones M diminuiu em proporções semelhantes entre a região ventral e dorsal (dorsal: wt: 10.558,6cones/mm² e ht: 8.714,8cones/mm²; ventral: wt: 6.257,8cones/mm² e ht: 5.082,0cones/mm²). Os resultados demonstram que as alterações ocorridas nas densidades dos cones S e M, são bastante similares às obtidas nos diferentes tratamentos.

Animais tratados com T4



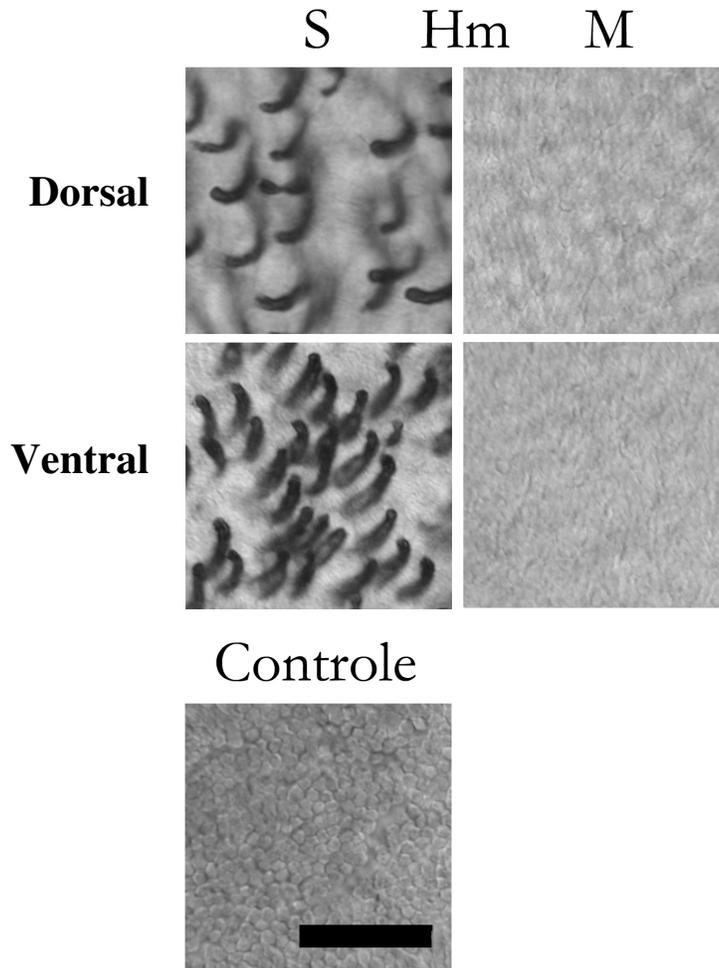


Figura 9. Fotomicrografia de montagens planas da retina de camundongos tratados com T4, mostrando a expressão das opsinas S e M, dos diferentes genótipos. As figuras mostram a região superior (dorsal) e inferior (ventral) da retina dos diferentes genótipos: selvagem (Wt), heterozigoto (ht) e homozigoto (hm) (n=3 por genótipo). Todos os genótipos apresentaram a expressão das opsinas S, porém, o animal hm não expressou as opsinas M. Barra de calibração = 20 micrometros.

Gráfico da densidade de cones S e M, de animais tratados com T4

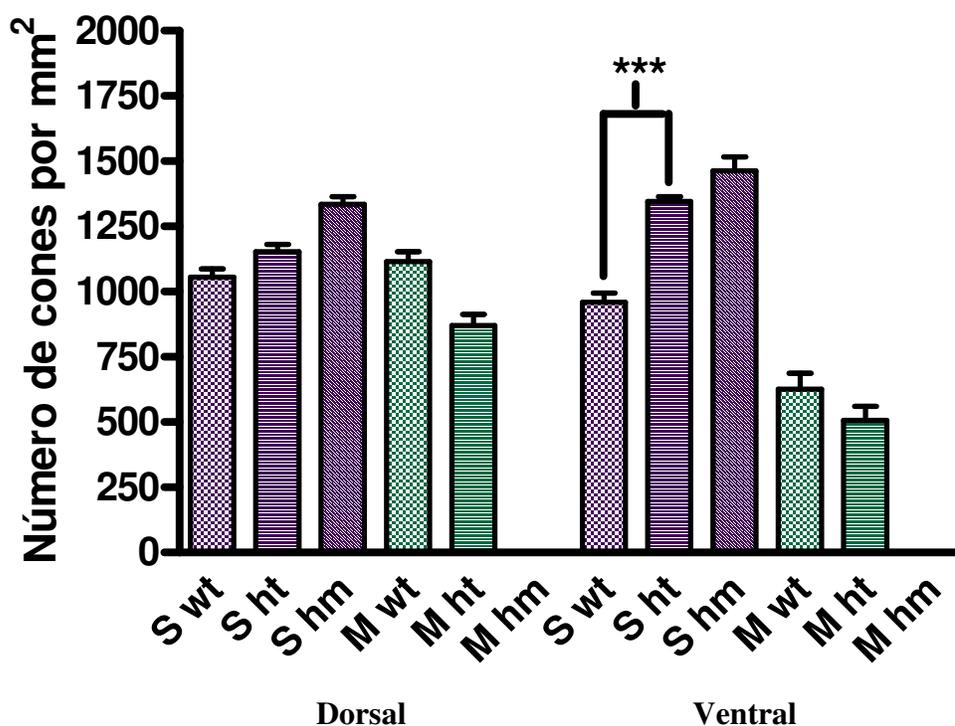


Gráfico 6. Densidade média de cones expressando as opsinas S e M, dos animais tratados com T4. O gráfico compara a região dorsal com a região ventral da retina, dos diferentes genótipos. Cada coluna representa a média de três experimentos com retinas diferentes (n = 3). (***) P < 0,001).

Discussão

O estudo dos receptores do hormônio tireoidiano tem ganhado destaque nas últimas décadas. A atuação destes, em diversas doenças, tem se mostrado mais importante do que os níveis séricos do hormônio T3. Doenças como a síndrome de resistência ao hormônio tireoidiano, por exemplo, já se sabe ser causada pela expressão de um receptor alterado, e a presença desta mutação remete a um quadro clínico mais severo do que a simples ausência do receptor (Yem, 2003). Casos como este nos fazem questionar sobre quem recai a maior importância no quadro final do paciente, o receptor ou o hormônio.

Os pacientes, com esta síndrome apresentam um quadro clínico concomitante de hipo e hipertiroidismo tecido específico. Isto ocorre porque os receptores do tipo β , com reduzida ou nenhuma afinidade pelo HT, diminuem o feedback negativo que ocorre fisiologicamente sobre as glândulas hipófise, esse quadro mantém elevados os níveis séricos do hormônio tireoidiano. Entretanto, como os receptores do tipo alfa estão funcionais, ocorre o aumento da resposta de tecidos onde é expressa predominantemente esta classe de receptores, que não estão alterados.

A síndrome de resistência ao hormônio tireoidiano foi descrita em 1956 por Refetoff, desde então diferentes anomalias foram descritas em humanos. Entretanto, pouco se estudou a respeito de alterações na retina destes pacientes. Apenas um caso foi descrito na literatura, sobre um paciente com a síndrome na forma recessiva, o qual apresentava dificuldades em distinguir os diferentes espectros de cores (Newell, et al, 1977).

Estudos recentes de Ng e colaboradores, 2001, demonstraram a ausência de expressão das opsinas sensíveis ao comprimento de ondas médios em retinas de camundongos *knock-out*, para o gene do TR β 2 do hormônio tireoideano. Este trabalho concluiu que, primeiramente, o TR β 2 inibiam a formação de cones S imaturos e, mais tarde, a indução das opsinas M, através de fatores intermediários. Na ausência deste receptor houve uma diminuição do número de cones M. Entretanto, não era vista alterações na densidades celulares, indicando que os genes regulados pelos TRs não causavam nem a morte dos cones M, nem o aparecimento de novos cones S. Contudo, o trabalho de Ng e colaboradores, 2001, se restringiu a analisar animais com a ausência dos receptores

Os animais *knock-in* para uma mutação similar a síndrome de resistência ao hormônio tireoidiano (kindred S), possuem um receptor truncado devido a uma mutação pontual em uma região “hot spot”, delta337T (Usala, 1991). Neste caso, os receptores ainda estão aptos a se ligarem ao DNA, mas não ao hormônio. Esta atuação caracteriza um novo nível de controle e com isso, o complexo de repressão se mantém ligado impedindo a regulação transcripcional dependente do HT, o que não ocorre com os animais *knock-out*, que não expressa o receptor. Além disso, nos animais *knock-out* em heterozigose para o gen do receptor do hormônio tireoidiano, os receptores viáveis não competem pelos sítios de ligação ao DNA, como ocorre em animais com a mutação dominante negativa.

Análise

Os animais *knock-in*, no nosso estudo, apresentaram um fenótipo semelhante, com relação à expressão das opsinas, aos animais TR β 2 estudado por Ng e colaboradores, 2001. Os animais selvagens e heterozigotos para o gen mutado demonstraram serem capazes de expressar os dois tipos de opsinas presentes normalmente na retina de camundongos. Mesmo com os dois tipos diferentes de tratamentos utilizados, visando aumentar e inibir a disponibilidade de hormônio tireoidiano T3, a expressão de ambas as opsinas se manteve presente nos animais selvagem e heterozigoto. Entretanto, alterações nas intensidades das marcações nos fizeram supor na possibilidade dos diferentes tratamentos modificarem a topografia dos cones da retina, mesmo que não iniba a expressão por completo de uma das opsinas. Os animais em homozigose, em todos os três fenótipos, se mostraram incapazes de expressarem a opsina M seguindo unicamente a via basal de formação das opsinas S. Os cones S, entretanto, apresentaram um número maior de células marcadas. Sugestivo de que, de fato, a via de diferenciação de cones em camundongos seja esta, demonstrada por Ng e colaboradores, 2001.

Restrição topográfica

Szél e colaboraderes em 1992 apresentaram um estudo no qual descrevem a distribuição topográfica de cones da retina de camundongos. Em seu trabalho eles demonstraram que a retina apresenta na sua região dorsal, uma concentração maior de cones expressando os comprimento de ondas médios. Por

outro lado, na região ventral da retina, predominava os de cones expressando as opsinas sensíveis a comprimento de ondas curtas S.

Nossos resultados demonstraram existir uma concentração maior de cones M na região superior da retina, em relação a inferior, dos animais com genótipo selvagens. Contudo, esta variação de números não se aproxima aos resultados obtidos anteriormente por Szél, em 1992. As retinas dos camundongos apresentaram na região superior, uma concentração entre 15% e 16% maior de células imunomarcadas para opsinas M do que para opsinas S. Na região inferior, o oposto também é verdadeiro, sendo esta povoada tanto por cones S quanto por cones M. Estas diferenças quantitativas obtidas com os nossos resultados de imunomarcção, podem ser devido ao tempo de exposição ao anticorpo, aumentado em nosso trabalho. Contudo, o menor tempo de interação impedia que a área central da retina fosse marcada pelos anticorpos. Acreditamos que o maior tempo de exposição e o tipo diferente de anticorpo, tenha permitido que, cones que expressavam as opsinas específicas, porém em menores quantidades, fossem marcados mais acentuadamente e pudessem ser computados durante as nossas análises.

Inicialmente, durante a visualização dos cones em cortes, e também depois, na contagem de cones em montagens planas, pudemos observar claramente que diferentes áreas da retina apresentavam uma marcação mais forte ou mais fraca das opsinas. Contudo, nossas contagens foram feitas não objetivando diferenciar o grau de expressão, mas verificar a presença ou ausência desta, o que representa a função espectral ou não destes cones. Experimento futuros,

utilizando a técnica de *immunoblot*, poderão confirmar se existe um acúmulo de opsinas nas diferentes regiões da retina.

A visão cromática baseia-se na comparação de um mesmo estímulo luminoso, processado de forma diferente pelos cones expressando opsinas sensíveis a comprimentos de ondas distintos. Deste modo, os centros superiores são capazes de analisar uma imagem a partir de diferentes curvas de absorção espectral e extrai a percepção cromática. A pequena densidade de cones, de um tipo específico, em uma região da retina, poderia dificultar o contraste dos sinais prejudicando a informação cromática. Por outro lado, a co-expressão também seria bastante prejudicial à visão a cores. Contudo, aumentaria o espectro de sensibilidade dos cones, aprimorando a capacidade visual. Trabalhos recentes comprovam a discriminação cromática de camundongos (Jacobs, et al, 2004), estes resultados sugerem que, a maior quantidade de cones, vista em nosso trabalho, pode ser realmente necessária à visão de cores.

Estudos posteriores demonstraram que ao contrário dos resultados de Szél e colaboradores em 1992, a região inferior da retina é povoada por diversos cones que co-expressão os dois tipos de opsinas (Glosmann & Ahnelt, 1998). Trabalhos mais recentes demonstraram que esta co-expressão poderia estar dispersa por toda a retina (Applebury, et al, 2000).

Em nossos resultados, observamos que os animais em homozigose para a mutação $\Delta 337T$ apresentam sempre uma densidade similar de cones S, independente dos diferentes tratamentos. Baseando-se nos resultados de Ng e colaboradores (2001), os quais demonstraram que durante o desenvolvimento da

retina não ocorre morte celular e sim uma via alternativa de formação dos cones, podemos inferir que a densidade total de cones da retina é igual à densidade de cones imunorreagidos para opsina S, em animais em homozigose. Esta idéia foi confirmada em nossos experimentos, onde utilizamos os dois anticorpos diferentes, incubados simultaneamente (anti-opsina S e anti-opsina M), para observar a densidade média dos cones totais da retina de camundongos (dados não mostrados). Neste experimento (n=2), o valor obtido (1.408,98 células/mm²) foi similar à densidade média de cones S, observado nos animais em homozigose nos diferentes tratamentos. Estes dados não só ratificam a teoria de Ng, et al, 2001, da via alternativa de cones, assim como demonstraram não haver alterações, causadas pelos diferentes tratamentos, tais como, morte celular ou mesmo indução de proliferação, na densidade média dos cones dos animais em homozigose. Somente os animais tratados com o fármaco MMI apresentaram diferenças estatísticas entre os outros tratamentos. Porém, a densidade média não diferiu significativamente dos cones totais da retina.

A hipótese de co-expressão parcial das opsinas na retina de camundongos selvagens também foi corroborada em nosso experimento. Analisando a densidade de cones nas marcações isoladas (S e M), se somadas, apresentam valores muito maiores do que os obtidos na densidade de cones totais. Esses dados indicam que a grande maioria dos cones deve co-expressar ambas as opsinas. Estudos com dupla marcação serão realizados futuramente.

Densidade

Considerando o papel dos HTs na modulação dos genes regulados pelos TR β s, perguntamos qual o papel do T3 na expressão das diferentes opsinas. Assim, para identificarmos se os diferentes tratamentos causavam uma alteração na topografia dos cones foram feitas contagens de pequenas áreas amostrais da retina. Os resultados foram analisados como número total de cones expressando as duas diferentes opsinas e, baseados nos resultados de Szél e colaboradores, em 1993, divididas em região dorsal e ventral, para posterior comparação.

Os resultados demonstraram que os diferentes tratamentos não alteraram drasticamente a expressão das opsinas. Mesmo em camundongos selvagens onde ambos os receptores estavam ativos, o tratamento com T4, visando o aumento dos níveis séricos de HTs circulantes, não foi capaz de induzir o aumento da expressão das opsinas M. Porém, o tratamento com o inibidor da glândula tireóide (Metimazole) gerou um pequeno aumento no número de cones S em prejuízo dos cones M. Estes resultados demonstram a importância do hormônio tireoideano na diferenciação das opsinas, estimulando a expressão das opsinas S e inibindo as opsinas M. Entretanto, o tratamento com T4 não foi capaz de alterar a expressão das opsinas. Isto sugere que a deficiência de HT pode causar alterações, mesmo que discretas, na expressão das opsinas, mas que em excesso não interferem nesta.

Os animais heterozigotos, em contrapartida apresentaram em todos os tipos de tratamento, um aumento no número de cones expressando as opsinas S e uma diminuição no número de cones expressando as opsinas M. Este resultado

evidencia que o fenótipo retiniano do heterozigoto é mais acentuado do que o dos animais selvagens tratados com MMI. Além disso, em ambos os tratamentos a proporção de inibição se manteve semelhante. Portanto, o efeito dominante negativo do receptor mutado, independente do hormônio tireoideano, parece ser determinante do fenótipo.

Os animais homozigotos, apesar dos diferentes tratamentos, apresentaram somente cones expressando as opsinas S. Assim como, as amostras reagidas contra as opsinas sensíveis ao comprimento de onda médio demonstraram sempre o mesmo padrão de ausência total de marcação. Este resultado corrobora o papel essencial do TR β para a diferenciação normal das opsinas.

Os nossos resultados da análise quantitativa de cones marcados para as diferentes opsinas demonstraram que a presença do receptor, normal ou mutado, é mais importante na determinação do fenótipo final do que os níveis séricos do hormônio tireoidiano. Primeiramente, quando analisamos os animais com o genótipo selvagem, apenas uma pequena diferença foi obtida com o tratamento com Memitazole. Entretanto, os níveis elevados do hormônio não foram capazes de alterar a expressão das diferentes opsinas. Em seguida, a análise dos animais em heterozigose também revelou a expressão similar de opsinas S e M, entre os diferentes tratamentos, porém, uma diferença relevante em relação a expressão das diferentes opsinas. As opsinas S apresentaram-se, sempre, em uma concentração maior (cerca de 16%) do que os cones M, quando avaliamos a retina inteira. Esta diminuição no numero de cones M, e o conseqüente aumento

de cones S, era esperada, devido à dificuldade imposta pelo receptor truncado à ligação do hormônio. Contudo, o receptor funcional se mostrou capaz de suprir, em parte, o dano causado pelo mutante.

Nas duas regiões analisadas, dorsal e ventral, o padrão de expressão se manteve sempre o mesmo nos diferentes tratamentos. As alterações na expressão das opsinas S e M ocorridas nos diferentes genótipos, foram analisadas comparando a região dorsal com ventral da retina. Os resultados demonstraram que a inibição da expressão das opsinas ocorre concomitantemente nas diferentes áreas da retina. Somente os cones M, na região ventral da retina dos animais sem tratamento, e os cones S, na região dorsal dos animais tratados com T4, apresentaram alterações estatisticamente significantes. Os cones M expressaram uma drástica diminuição de densidade quando comparados com o genótipo ht na região dorsal. Assim como, ocorreu um aumento na densidade de cones S, no mesmo genótipo (ht), na região dorsal dos animais tratados com T4. Estes resultados serão refeitos para comprovar uma possível alteração causada pelos diferentes tratamentos e/ou genótipos na densidade de cones, em uma região preferencial da retina.

Nos animais heterozigotos, o receptor alterado pode se ligar ao DNA e impedir a transcrição, mas devem competir com o receptor normal pelos sítios de ligação. Contudo, os receptores de cada cone existente na retina podem interagir de formas diferentes com o DNA. Durante a janela de diferenciação, a ligação dos receptores ao DNA, pode alternar diversas vezes entre o TR normal e truncado. A presença do receptor alterado durante todo o processo é capaz de inibir

completamente a expressão das opsinas M, como visto nos animais em homozigose. Entretanto, esta alternância claramente favorece a expressão das opsinas M, já que estas estão presentes em grande quantidade nos animais em heterozigose. Acreditamos que a ligação do receptor normal ao DNA, durante certo período da janela de diferenciação, seja capaz de impedir a diferenciação prematura dos cones S e, mais tarde, promover a expressão das opsinas M, as quais, mesmo que em pequenas concentrações, serão marcadas durante os procedimentos de imunohistoquímica e computadas como cones M.

Apesar da mutação (delta337) no TR beta expressar de forma dominante a síndrome de resistência ao hormônio tireoídiano, o fenótipo de visão monocromática em camundongos é expresso de forma recessiva. Em humano, há grande possibilidade de que os pacientes que sofram com a síndrome de resistência ao hormônio tireoídiano em homozigose, expressem a visão monocromática. Além disso, os pacientes em heterozigose podem expressar dificuldades de distinguir cores um pouco maior já que, em nossos modelo, apresentaram alterações na densidade de cones S e M.

Conclusões

1. O fenótipo de visão monocromática é recessivo em camundongos com a mutação delta337T
2. Em uma análise qualitativa, a expressão das opsinas M e S ocorreu independentemente dos níveis séricos do HT, alterados através dos diferentes tratamentos (MMI e T4).
3. Os genótipos dos camundongos foram determinantes na densidade de cones expressando as opsinas S e M, se sobrepondo aos diferentes níveis séricos do hormônio tireoideano.
4. A análise quantitativa demonstrou possíveis alterações na topografia da retina de camundongos causadas pelos diferentes genótipos e tratamentos. Entretanto, estas alterações merecem um estudo maior para retificar os resultados obtidos.

Referências

- ABEL, E.D., BOERS, M.E., PAZOS-MOURA, C., MOURA, E.E., KAULBACH, H., ZAKARIA, M., LOWELL, B., RADOVICK, S., LIBERMAN, M.C. & WONDISFORD, F. Divergent roles for thyroid hormone receptor β isoforms in the endocrine axis and auditory system. J Clin Invest, 104: pp. 291-300, 1999a.
- ABEL, E.D., KAULBACH, H.C., CAMPOS-BARROS, A., AHIMA, R.S., BOERS, M.E., HASHIMOTO, K., *et al.* Novel insight from transgenic mice into thyroid hormone resistance and the regulation of thyrotropin. J Clin Invest, 103: pp. 271-279, 1999b.
- ALTSHULER, D.M., TURNER, D.L. & CEPKO, C.L. Specification of the cell type in the vertebrate retina. In *Developmental of the visual system*. Press, Boston, M.A. pp.37-58, 1991.
- APPLEBURY, M.L., ANTOCH, M.P., BAXTER, L.C., CHUN, L.L., FALK, J.D., FARHANGFAR, F., KAGE, K., KRZYSTOLIK, M.G., LYASS, L.A. & ROBBINS, J.T. The murine cone photoreceptor: a single cone type expresses both S and M opsins with retinal spatial patterning. Neuron, 27: pp. 513-523, 2000.
- BARRA, G.B., VELASCO, L.F.R., PESSANHA, R.P., CAMPOS, A.M., MOURA, F.N., DIAS, S.M.G., POLIKARPOV, I., RIBEIRO, R.C.J., SIMEONI, L.A. & NEVES, F.A.R. Mecanismo molecular da ação do hormônio tireoidiano. Arg Bras Endocrinol Metabol, 48: pp. 25-39, 2004.

- BERBEL, P., AUSO, E., GARCIA-VELASCO, J.V., MOLINA, M.L. & CAMACHO, M. Role of thyroid hormones in the maturation and organization of rat barrel cortex. Neurosci, 107: pp. 383-394, 2001.
- BERNAL, J., GUADANÕ-FERRAZ, A. & MORTE, B. Perspectives in the study of thyroid hormone action on brain development and function. Thyroid, 13: pp. 1005-1012, 2003.
- BRADLEY, D.J., TOWLE, H.C. & YOUNG, W.S. Alpha and beta thyroid hormone receptor (TR) gene expression during auditory neurogenesis: evidence for TR isoform-specific transcriptional regulation *in vivo*. Proc Natl Acad Sci, 91(2): PP. 439-443, 1994.
- BROWMAN, H.I. & HAWRYSHYN, C.W. The developmental trajectory of ultraviolet photosensitivity in rainbow trout is altered by thyroxine. Vision Res, 34: pp. 1397-1406, 1994.
- BUMSTED, K., JASONI, C., SZÉL, A. & HENDRICKSON, A. Spatial and temporal expression of cone opsins during monkey retinal development. J Comp Neurol, 378: pp. 117–134, 1997.
- CARTER-DAWSON, L.D. & LA VAIL, M.M. Rods and cones in the mouse retina. J Comp Neurol, 188: pp. 245–262, 1979.
- CARVALHO, G.A. & RAMOS, H.E. Síndrome de resistência ao hormônio tireoidiano. Arq Bras Endocrinol Metabol, 48(1): pp. 83-92, 2004.
- CAVALIERI, R.R., SIMEONI, L.A., PARK, S.W., BAXTER, J.D., SCHARSCHMIDT, B.F., RIBEIRO, R.C., *et al.* Thyroid hormone export in rat FRTL-5 thyroid cells and mouse NIH-3T3 cells is carrier-mediated, verapamil-sensitive, and stereospecific. Endocrinology, 140: pp. 4948-4954, 1999.

- CEPKO, C. Giving in to the blues. Nat Genet, 24: pp. 99-100, 2000.
- COLLIN, S.P. & TREZISE, A.E.C. The origins of colour vision in vertebrates. Clin Exp Optom, 87(4-5): pp. 217-223, 2004.
- COOK, C.B., KAKUCSKA, I., LECHAN, R.M. & KOENIG, R.J. Expression of thyroid hormone receptor beta 2 in rat hypothalamus. Endocrinology, 130(2): pp. 1077-1079, 1992.
- DOWLING, J.E. Retinal cells and information processing. In: The retina: an approachable part of the brain. London, The Belknap Press of Harvard University Press, 1 ed., chap. 2, 1987.
- ESCOBAR, M.G., OBREGÓN, M.J. & REY, F.E. Is neuropsychological development related to maternal hypothyroidism, or to maternal hypothyroxinemia? J Clin Endocrinol Metab, 25: pp. 168-288, 2000.
- FLAMANT, F. & SAMARUT, J. Thyroid hormone receptors: lessons from knockout and knock-in mutant mice. Trends Endocrinol Metab, 14: pp. 85-90, 2003.
- FONDELL, J.D., BRUNEL, F., HISATAKE, K. & ROEDER, R.G. Unliganded thyroid hormone receptor alpha can target TATA-binding protein for transcriptional repression. Mol Cell Biol, 16: pp. 281-287, 1996.
- FORREST, D., ERWAY, L.C., NG, L., ALTSCHULER, R. & CURRAN, T. Thyroid hormone receptor beta is essential for development of auditory function. Nat Genet, 13: pp. 354-357, 1996.
- FORREST, D., REH, T.A. & RÜSCH, A. Neurodevelopmental control by thyroid hormone receptors. Current opin in Neurobiol, 12: pp. 49-56, 2002.
- GALEGO, A. Horizontal and amacrine cells in the mammal's retina. Vision Res, 3: pp. 33-50, 1971.

- GAUTHIER, K., CHASSANDE, O., PLATEROTI, M., ROUX, J.P., LEGRAND, C., PAIN, B., *et al.* Different functions for the thyroid hormone receptors TR α and TR β in the control of thyroid hormone production and post-natal development. EMBO J, 18: pp. 623-631, 1999.
- GIGUERE, V. Orphan nuclear receptors: from gene to function. Endocr Rev, 20: pp. 689-725, 1999.
- GLASS, C.K. & ROSENFELD, M.G. The co-regulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. Genes Dev, 14: pp. 121-41, 2000.
- GLASS, C.K. Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. Endocr Rev, 15: pp. 391-407, 1994.
- GLOSMANN, M. & AHNELT, P.K. Coexpression of M- and S- opsin extends over the entire inferior mouse retina. Invest Ophtamol and Vis Sci, 39: p. 1059, 1998.
- GURNEL, E.M. & CHATTERJEE, V.K. Dehydroepiandrosterone replacement therapy. Eur J Endocrinol, 145(2): pp. 103-6, 2001.
- HASHIMOTO, K., CURTY, F.H., BORGES, P.P., LEE, C.E., ABEL, E.D., ELMQUIST, J.K., COHEN, R.N. & WONDISFORD, F.E. An unliganded thyroid hormone receptor causes severe neurological dysfunction. PNAS, 98: pp. 3998-4003, 2001.
- HODIN, R.A., LAZAR, M.A., WINTMAN, B.I., DARLING, D.S., KOENIG, R.J., LARSEN, P.R., MOORE, D.D. & CHIN, W.W. Identification of a thyroid hormone receptor that is pituitary-specific. Science, 244(4900): pp. 76-9, 1989.

- HU, I. & LAZAR, M.A. Transcriptional repression by nuclear hormone receptors. Trends Endocrinol Metab, 11: pp. 6-10, 2000.
- JACOBS, G.H. The distribution and nature of colour vision among the mammals. Biol Rev Camb Philos, 3: pp. 413-71, 1993.
- JACOBS, G.H. Ultraviolet vision in vertebrates. Am Zool, 32: pp. 544–554, 1992.
- JACOBS, G.H., NEITZ, J. & DEEGAN, J.F. 2ND. Retinal receptors in rodents maximally sensitive to ultraviolet light. Nature, 353(6345): pp. 655-656, 1991.
- JACOBS, G.H., WILLIAMS, G.A. & FENWICK, J.A. Influence of cone pigment coexpression on spectral sensitivity and color vision in the mouse. Vision research, 44: pp.1615-1622, 2004.
- JEON, C.J., STRETTOI, E. & MASLAND, R.H. The major cell populations of the mouse retina. J Neurosci, 18(21): pp. 8936-8946, 1998.
- KELLEY, M.W., TURNER, J.K. & REH, T.A. Ligands of steroid/thyroid receptors induces cone photoreceptors in vertebrate retina. Development, 121: pp. 3777-3785, 1995.
- KOLB, H. Organization of the outer plexiform layer of the primate retina: electron microscopy of Golgi-impregnated cells. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 258: pp. 261-283, 1970.
- KOLB, H. The organization of the outer plexiform layer in the retina of the cat: electron microscopic observations. J Neurocytol, 6: pp. 131-153, 1977.
- KUROKAWA, R., YU, V.C., NAAR, A., KYAKUMOTO, S., HAN, Z., SILVERMAN, S., *et al.* Differential orientations of the DNA-binding domain and carboxy-terminal dimerization interface regulate binding site selection by nuclear receptor heterodimers. Genes Dev, 7: pp. 1423-1435, 1993.

LAZAR, M.A. Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. Endocr Ver, 14(2): pp. 184-193, 1993.

LEE, B.B. Paths to colour in the retina. Clin Exp Optom, 87(4-5): pp. 239-248, 2004.

LIN, K.H., ZHU, X.G., HSU, H.C., CHEN, S.L., SHIEH, H.Y., CHEN, S.T., *et al.* Dominant negative activity of mutant thyroid hormone alpha1 receptors from patients with hepatocellular carcinoma. Endocrinology, 138: pp. 5308-5315, 1997.

MANGELSDORF, D.J. & EVANS, R.M. The RXR heterodimers and orphan receptors. Cell, 83: pp. 841-850, 1985.

MANGELSDORF, D.J., THUMMEL, C., BEATO, M., HERRLICH, P., SCHUTZ, G., UMESONO, K., *et al.* The nuclear receptor superfamily: the second decade. Cell, 83: pp. 835-839, 1995.

MANN, I. The developing of human eye. Grune and Stratton, New York, 1964.

MARQUARDT, T. & GRUSS, P. Generating Neuronal diversity in the retina: one for nearly all. Trends in Neurosciences, 1: pp. 32-37, 2002.

MCKENNA, N.J., & O'MALLEY, B.W. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and co-regulators. Cell, 108: pp. 465-474, 2002.

MILLER, L.D., MCPHIE, P., SUZUKI, H., KATO, Y., LIU, E.T. & CHENG, S.Y. Multi-tissue gene-expression analysis in a mouse model of thyroid hormone resistance. Genome Biology, 5: p. 31, 2004.

NEVES, F.A.R., WEBB, P., RIBEIRO, R.C.J. & BAXTER, J.D. Syndrome of Resistance to glucocorticoid and mineralocorticoid hormones. In: Genetics in Endocrinology, Lippincott Williams & Wiltkins, 2002.

- NEWELL, F.W. & DIDDIE, K.R. Typical monochromacy, congenital deafness, and resistance to intracellular action of thyroid hormone. Klin Monatsbl Augenheilkd, 171(5): pp. 731-734, 1977.
- NG, L., HURLEY, J.B., DIERKS, B., SRINIVAS, M., SALTÓ, C., VENNSTRÖM, B., REH, T.A. & FORREST, D. A thyroid hormone receptor that is required for the development of green cone photoreceptors. Nature gen, 27: pp. 94-98, 2001.
- ONO, S., SCHWARTZ, O., MUELLER, T., ROOT, A.W., USALA, S.J. & BERCU, B.B. Homozygosity for a dominant negative thyroid hormone receptor gene responsible for generalized resistance to thyroid hormone. J Clin Endocr and metabol, 73: pp. 990-994, 1991.
- OPPENHEIMER, J.H. & SCHWARTZ, H.L. Molecular basis of thyroid hormone-dependent brain development. Endocr Rev, 18: pp. 462-475, 1997.
- POLYAK, S.L. The Retina. The anatomy and the histology of the retina in Man, Ape, and Monkey, including the consideration of visual functions, the history of Physiological Optics, and the Histological Laboratory Technique. Chicago, University of Chigaco Press, 1941.
- PROVIS, J.M. & VAN DRIEL, D. Retinal development in humans: the roles of differential growth rates, cell migration and naturally occurring cell death. Aust N Z J Ophthalmol, 13(2): pp. 125-133, 1985.
- RAMÓN y CAJAL, S. The vertebrate retina. San Francisco: W.H. Freeman. 1893.
- RASTINEJAD, F., PERLMANN, T., EVANS, R.M. & SIGLER, P.B. Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. Nature, 375: pp. 203-11, 1995.

- REFETOFF, S., DEWIND, L.T. & DEGROOT, L.J. Familial syndrome combining deaf-mutism, stippled epiphyses, goiter and abnormally high PBI: possible target organ refractoriness to thyroid hormone. J Clin Endocrinol Metab, 27: pp. 279-294, 1967.
- REFETOFF, S., WEISS, R.E. & USALA, S.J. The syndromes of resistance to thyroid hormone. Endocr Ver, 14(3): pp. 348-399, 1993.
- RIBEIRO, R.C., APRILETTI, J.W., WAGNER, R.L., FENG, W., KUSHNER, P.J., NILSSON, S., *et al.* X-ray crystallographic and functional studies of thyroid hormone receptor. J Steroid Biochem Mol Biol, 65: pp. 133-141, 1998a.
- RIBEIRO, R.C.J., APRILETTI, J.W., WAGNER, R.L., WEST, B.L., FENG, W., HUBER, R., *et al.* Mechanisms of Thyroid Hormone Action: Insights from X-ray Crystallographic and Functional Studies. Recent Prog Horm Res. 53: pp. 351-394, 1998b.
- RIBEIRO, R.C.J., KUSHNER, P.J., & BAXTER, J.D. The nuclear hormone receptor gene superfamily. Ann Rev Med, 4: pp. 43-53, 1995.
- RITCHIE, J.W., SHI, Y.B., HAYASHI, Y., BAIRD, F.E., MUCHEKEHU, R.W., CHRISTIE, G.R., *et al.* A role for thyroid hormone transporters in transcriptional regulation by thyroid hormone receptors. Mol Endocrinol, 17: pp. 653-661, 2003.
- ROBINSON-RECHAVI, M., CARPENTIER, A.S., DUFFRAISSE, M. & LAUDET, V. How many nuclear hormone receptors are there in the human genome? Trends Genet, 5: pp. 54-56, 2001.
- ROHLICH, P., VAN VEEN, T. & SZÉL, A. Two different visual pigments in one retinal cone cell. Neuron, 13: pp. 1159-1166, 1994.

- SJÖBERG, M., VENNSTRÖM, B. & FORREST, D. Neuropathologic findings after long-term intrathecal infusion of morphine and bupivacaine for pain treatment in cancer patients. Anesthesiology, 76(2): pp. 173-186, 1992.
- SMALLWOOD, P.M., OLVECZKY, B.P., WILLIAMS, G.L., JACOBS, G.H., REESE, B.E., MEISTER, M. & NATHANS, J. Genetically engineered mice with an additional class of cone photoreceptors: implications for the evolution of color vision. Proc Natl Acad Sci USA, 100(20): pp. 11706-11711, 2003.
- STRADER, C.D., FONG, T.M., TOTA, M.R. & UNDERWOOD, D. Structure and function of G protein-coupled receptors. Annu. Rev. Biochem, 63: pp. 101–132, 1994.
- SZÉL, A., ROHLICH, P., CAFFE, A.R., JULIUSSON, B., AGUIRE, G. & VAN VEEN, T. Unique separation of two spectral classes of cones in the mouse retina. J Comp Neurol, 325: pp. 327–342, 1992.
- SZÉL, A., RÖHLICH, P., MIEZIEWSKA, K., AGUIRRE, G. & VAN VEEN, T. Spatial and temporal differences between the expression of short- and middle-wave sensitive cone pigments in the mouse retina, a developmental study. J Comp Neurol, 331: pp. 564–577, 1993.
- TAKEDA, K., SAKURAI, A., DEGROOT, L.J. & REFETOFF, S. Recessive inheritance of thyroid hormone resistance caused by complete deletion of the protein-coding region of the thyroid hormone receptor-beta gene. J Clin Endocrinol Metab, 74: pp. 49-55, 1992.
- UMESONO, K. & EVANS, R.M. Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. Cell, 57: pp. 1139-1146, 1989.

USALA, S.J. Thyroid Hormone Resistance. In: Weintraub, B.D., editor. Molecular endocrinology. Basic concepts and clinical correlations. 1st ed. New York: Raven Press, 1995.

USALA, S.J., MENKE, J.B., WATSON, T.L., WONDISFORD, F.E., WEINTRAUB, B.D., BERARD, J., BRADLEY, W.E., ONO, S., MUELLER, O.T. & BERCU, B.B. A homozygous deletion in the c-erbA beta thyroid hormone receptor gene in a patient with generalized thyroid hormone resistance: isolation and characterization of the mutant receptor. Mol Endocrinol, 5(3): pp. 327-335, 1991.

UZIEL, A. Periods of sensitivity to thyroid hormone during the development of organ of corti. Acta Otorynqol, 492: pp. 23-27, 1986.

WAGNER, R.L., HUBER, B.R., SHIAU, A.K., KELLY, A., CUNHA-LIMA, S.T., SCANLAN, T.S., *et al.* Hormone selectivity in thyroid hormone receptors. Mol Endocrinol, 15: pp. 398-410, 2001.

WARNSMARK, A., TREUTER, E., WRIGHT, A.P., & GUSTAFSSON, J.A. Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. Mol Endocrinol, 17: pp. 1901-1909, 2003.

WEISS, R.E., FORREST, D., POHLENZ, J., CUA, K., CURAN, T. & REFETTOFF, S. Thyrotropin regulation by thyroid hormone receptor beta-deficient mice. Endocrinology, 138: pp. 3624-3629, 1997.

WIKLER, K.C. & RAKIC, P. Relation of an array of early-differentiating cones to the photoreceptor mosaic in the primate retina. Nature. 351: pp. 397-400, 1991.

- WILLIAMS, G.R. & GA, B. Thyroid hormone response elements. In: Molecular endocrinology: Basic concepts and clinical correlations. Weintraub BD, editor. New York:Raven Press; pp. 217-239, 1995.
- WILLIAMS, G.R. Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms. Mol Cell Biol, 20: pp. 8329-8342, 2000.
- WU, Y., XU, B. & KOENIG, R.J. Thyroid hormone response element sequence and the recruitment of retinoid X receptors for thyroid hormone responsiveness. J Biol Chem, 276: pp. 3929-3936, 2001.
- YEN, P.M. Molecular basis of resistance to thyroid hormone. Trends Endocrinol Metab, 14: pp. 327-333, 2003.
- YEN, P.M. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. Physiol Rev, 81: pp. 1097-1142, 2001.
- YOKOYAMA, S. & STARMER, W.T. Evolution of the G-protein-coupled receptor superfamily. In *Human Genome Evolution*, ed. M Jackson, T Strachan, G Dover, pp. 93–119. Oxford: BIOS Sci, 1996.
- YUKOYAMA, S. Molecular genetic basis of adaptive selection: examples from color vision in vertebrates. Annu Rev Genet, 31: pp. 315-336, 1997.

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](#)